学位論文題名

Studies on Hantavirus Nucleocapsid Protein ; Application
for Diagnostic Antigen and Characterization for Its
Immunological Role.

(ハンタウイルスの核蛋白に関する研究；診断抗原
としての応用およびその免疫学的役割の解析)

学位論文内容の要旨

ハンタウイルス(HV)はげっ歯類によって媒介される腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)などの病原体で、ブニヤウイルス科ハンタウイルス属に分類されている。標準株であるHantaan 76-118株は1978年に韓国型出血熱の原因ウイルスとしてセスジネズミ(*Apodemus agrarius*)から分離され、それ以来、各種の小型哺乳動物から現在までに100種類以上のウイルス株の分離が報告されている。HV感染症の病勢は、無症状から致死的経過をたどるものまで様々ではあるが、臨床的には高熱、出血傾向、腎機能不全などを特徴とするHFRS型と急性の呼吸器不全症候を主徴とするHPS型の二つに分かれている。HFRSとHPSは臨床症状に大きな違いはあるものの原因ウイルスの抗原性や病原性には共通点が多い。

HVの遺伝子は3分節からなるマイナス一本鎖のRNAであり、また各分節はその大きさによってそれぞれ、L, M, Sと呼ばれている。すなわちM分節はウイルスの膜蛋白(Env)を構成するG1とG2蛋白を、S分節はウイルスの核蛋白(NP)を、またL分節はL蛋白をコードする。EnvのG1とG2蛋白はウイルス表面に存在し、他のウイルスと同様に中和に関係したエピトープを含んでいる。NPはHV属に特有な保存的蛋白であって、C末端側の100アミノ酸にRNA結合領域をもち、ウイルス粒子中でゲノムRNAと結合してRNA-NP複合体を形成する。また、L蛋白はウイルスのRNAポリメラーゼであると考えられている。L, M, Sそれぞれの分節の3'末端にはHV属に特有の塩基配列が認められることから本属はブンヤウイルス科の第5番目の新属として分類された。

本研究は二つの部分から構成されているが、まず、第1、第2と第3章では、組換えNPの診断抗原としての応用について検討し、ついで、第4と第5章でNPの免疫学的役割、特に抗原性と防御免疫との関係について解析を行った。

第1章では、バキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞(Sf-9)にHVのNPを発現させ、これを間接蛍光抗体法(IFA)での診断抗原に応用した。これまで、HV感染の血清診断用のIFA抗原にはHVを感染させたVero細胞が用いられてきたために、この取扱い中に発生する実験室内

感染事故の問題が指摘されていた。しかし、組換えバキュロウイルスベクターに感染したSf-9細胞でHVのNPを発現し得たことから、これを従来のIFA抗原の代替として安全に使用できることが判明した。しかし、組換え抗原では、従来のHV感染Vero細胞で特徴的に見られた顆粒状蛍光像を欠き、細胞質全体に一様に蛍光が分布するため、特異的蛍光像と非特異的なものとの区別が困難であった。

第2章では、カイコに感染するバキュロウイルスベクター(BmNPV)にHVのNP遺伝子を組込ませてカイコ虫体でHVのNPを大量発現させ、これをWestern blotting (WB)法の抗原として応用した。この組換えNP蛋白を用いて実験感染ラットの血中抗体の消長をWB法で検討したところ、IgM抗体はIFAの場合よりも約2日早く、感染後3日目から検出され、しかもIgG抗体価はIFA抗体価よりも約10倍高かった。そこでIFAによる判定が困難で中和活性を示さなかった偽陽性血清を選び、WB法で反応を調べたところ、これらの血清は組換えNPとは全く反応せず、非特異反応例と判定された。以上の成績から、本WB法はIFA法より感度が高く、しかも特異性にも優れることから、IFAや酵素抗体法(ELISA)などの反応例の確定診断法としても実用性が認められた。

第3章では、このWB法をヒトのHFRSの血清診断に応用した。本診断法の検出感度はヒト血清でもIFAよりはるかに高く、また非特異蛍光が

強くて診断不可能と判定された血清でも、WB法では判定が可能であった。すなわちWB法はヒト血清でも、HV感染の確定診断法として推奨された。

第4と第5章では、NPの免疫学的役割について解析を行った。ウイルスの内部蛋白であるNPは、ゲノムRNAと結合して、細胞内でのウイルスゲノムの翻訳・複製に関与していると考えられている。従ってNP抗原は本来中和抗体を誘導することができない。しかしNPは抗体依存性細胞障害(ADCC), 補体依存性細胞傷害(CDCC), 細胞傷害性Tリンパ球等の細胞性免疫にもとづく感染防御能を誘導できることが幾つかのウイルスで知られている。そこで第4章では、HV構成蛋白のうちNPとEnvの防御免疫誘導能を組換え抗原を用いて解析した。バキュロウイルスベクターを使ってそれぞれの組換え蛋白を発現させたSf-9細胞でマウスを免疫し、これから得られた免疫脾細胞と免疫血清を用いて、哺乳動物での受動免疫実験を行った。HVを哺乳動物に接種し、さらに一日後に免疫脾細胞を移入したところ、NPとEnvのいずれでも、生残数の有意な増加と延命効果が認められた。従って、HVのNPとEnvはいずれも免疫細胞を介して感染防御に関与すると考えられた。また、組換えNPあるいはEnvに対する免疫血清とNPを認識する単クローン性抗体(MAb) ECO2はいずれも中和活性を欠くにも関わらず、マウスで延命効

果を示した。そこで抗NP抗体による感染防御の機序を明らかにするために、HV感染Vero細胞の表面抗原を解析したところ、Env抗原が感染細胞表面にも存在することが確認され、ADCCとCDCCが感染防御に関与している可能性が示唆された。しかしNP抗原はほとんど検出できなかった。

第5章では、NPの免疫学的な構造と機能についてさらに多くの解析を試みた。まず結合競合試験によってNPの抗原部位を調べたところ、少なくとも7カ所の抗原部位の存在が確認され、さらにそれらが部分的に重なり合う3つの抗原領域 (I, II, III) に大別された。次に、HVのNPを部分的に発現させ、MAbとの反応性をもとにエピトープの位置を解析したところ、それらの各領域はそれぞれアミノ酸1番から103番 (I)、アミノ酸104番から204番 (II)とアミノ酸205番から402番 (III)に配列すると推測された。特に、感染免疫による抗血清は領域Iを発現する組換え蛋白とのみ反応することから、領域Iはイムノドミナントな抗原領域を含むと判断された。次に、感染細胞内に産生されたNPの各抗原部位の機能を明らかにするために、スクレエローディング法を用いて細胞内にMAbを導入し、抗体による細胞内でのウイルス増殖の阻止を調べた。すなわち、各抗原領域を認識するMAbのうちの少なくとも一つは細胞内でウイルス増殖を阻害し、さらにそのMAbは哺乳マウス

への非経口的な投与によって受動的な感染防御活性を示した。特に領域IIに対するMAb E5/G6は、細胞内とマウスのいずれでも著しく強い感染防御活性を示した。さらに、合成ペプチドを用いた実験からMAb E5/G6に対するエピトープはアミノ酸166番から175番の間にあることが明らかとなり、この領域が細胞に感染したHVの増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 橋 本 信 夫
副 査 教 授 喜 田 宏
副 査 教 授 齊 藤 昌 之
副 査 助 教 授 高 島 郁 夫

学 位 論 文 題 名

Studies on Hantavirus Nucleocapsid Protein ; Application for Diagnostic Antigen and Characterization for Its Immunological Role.

(ハンタウイルスの核蛋白に関する研究 ; 診断抗原
としての応用およびその免疫学的役割の解析)

ハンタウイルス (HV) はげっ歯類によって媒介される腎症候性出血熱やハンタウイルス肺症候群などの病原体で、ブニヤウイルス科ハンタウイルス属に分類されている。HVの核蛋白 (NP) はハンタウイルス属の共通抗原性を有し、ゲノムRNAと結合して細胞内でのウイルス増殖に関与するとされている。

申請者は遺伝子組換え法を用いて作製された組換えNPをハンタウイルス感染症の診断用抗原として応用するとともにNPの免疫学的性状の解析を行った。本論文は英文75頁からなり、参考論文18編を付している。

まずHV遺伝子をバキュロウイルスベクターに組み込んで昆虫細胞にNPを発現させることに成功した。さらにこの組換えNPをカイコ虫体で大量に発現させ、間接蛍光抗体法 (IFA) とWestern Blotting法 (WB) の抗原としてラットとヒトの血清診断に応用したところ、本NPを用いた反応は特異性が高く、従来のIFA抗原の代替として使用できることが判明した。またWBはIFAより高感度で特異性に優れ、HFRSの確定診断法として高い実用性が認められた。

次にこの組換えNPをマウスに免疫して得られた免疫脾細胞を哺乳マウスに移入してHVを接種したところ、死亡率の減少と延命効果が認められた。さらに抗NP単クローン性抗体を細胞にスクレエローディング法により移入した場合もウイルス増殖の抑制が認められた。さらに合成ペプチドを用いた実験から増殖抑制を示した抗体に対する抗原エピトープはNPのアミノ酸配列166-175番目の間にあり、このエピトープ領域がHVの細胞内増殖に関連していることが明らかとなった。

これらの成果はハンタウイルス感染症の診断と予防に貢献するところ大である。よって審査員一同は森松 (吉松) 組子氏が博士 (獣医学) の資格を有するものと認めた。