

学 位 論 文 題 名

Ecological Studies of Tick-borne
Encephalitis Virus in Japan

（日本におけるダニ脳炎ウイルスの生態学的研究）

学位論文内容の要旨

ダニ脳炎ウイルスはダニ媒介性のフラビウイルス科に分類されるウイルスである。そのフラビウイルスは生態学的に他にカ媒介性のものがあり、日本脳炎ウイルスや黄熱ウイルスそしてデングウイルスなどが含まれ、熱帯や温帯の国々で公衆衛生上の深刻な問題となっている。このカ媒介性のウイルスと同様に、ダニ媒介性のフラビウイルスはダニ脳炎ウイルスをはじめ、跳躍病ウイルス、オムスク出血熱ウイルス、キャサヌール森林熱ウイルスおよびポワッサン脳炎ウイルスなどが含まれ、対応する媒介マダニの分布域に従って、世界各地で年間数千の発症例をみる。この内、ダニ脳炎ウイルスは、致死率がおよそ30%以上の強い病原性を示す重篤な神経疾患の原因ウイルスである。

1993年10月に北海道渡島支庁管内において酪農業を営んでいた37歳の主婦においてウイルス性脳炎が確認された。その後の調査で患者発生地区で10頭の放し飼いのイヌの血液から3株のウイルスが分離された。これらのウイルスはモノクローナル抗体を用いてダニ脳炎ウイルスと同定され、これにより日本で初めてダニ脳炎ウイルスの存在が確認された。

Ixodidae科のマダニはダニ脳炎ウイルスの主たる媒介マダニである。そのマダニは野ネズミなどをその生活環の中で宿主にしている。ダニ脳炎ウイルスは、マダニの生活環に従って卵から幼ダニ、幼ダニから若ダニ、若ダニから成ダニという垂直感染が知られ、さらに成虫から卵への経卵巣感染も確認されている。従ってこれらの予防のためには、ウイルスを維持する病原性動物を明らかにすること、およびウイルスの土着性や地域的分布状況等の把握が必要である。そこで本研究では日本におけるTBEウイルスの感染状況を明らかにするため、マダニおよび野ネズミからのウイルス分離と本ウイルスの流行地の特定を行った。

日本のダニ脳炎ウイルスを媒介するマダニ種の特定を行うために、患者発生地区に生息する、マダニの優生種からウイルスの分離ができるか試みた。マダニの採取には、植生上からコットンフランクセルの材質の旗による旗ずり法と、イヌの体表からは櫛剥き法の、2つの方法を用いた。旗ずり法により、4月から7月までの植生上から採取したマダニ847匹の内、ヤマトマダニ *Ixodes ovatus* が839匹（99%）であった。またイヌの体表に生息しているマダニ相を調べた結果、ヤマトマダニの雌が合計427匹（84%）で最も多いことが確認された。さらにこれらのイヌのダニ脳炎ウイルスに対する抗体陽性数は、マダニの咬着のべ数に比例して増加し、最終的には半数が抗体陽性になった。

これらの結果からヤマトマダニが優生種であり、媒介マダニである可能性が高いので、ヤマトマダニについてダニ脳炎ウイルスの分離を試みた。ウイルスの分離のために採取したマダニは雌雄と採取場所で分けて、20匹1プールにまとめ、すり潰して1日齢の哺乳マウスの脳内に接種した。約5日で哺乳マウスは、発症した。その発症したマウスから脳乳剤を作成し、ウイルス同定に用いるためにハムスターの腎臓由来のBHK細胞で感染細胞を作製した。ヤマトマダニを雌雄それぞれ15プールずつ調べた結果、雌の2プールから脳炎症状を起こすウイルスが分離された。同定は、ウィーン大学のF. X. Heinz博士により分与された、既に公表されているモノクローナル抗体を用いた(Heinzら1981、1982)。マダニより分離した2株ともダニ脳炎ウイルスに特異的なモノクローナル抗体について陽性反応を示したことから、この2株はダニ脳炎ウイルスであると同定された。結果としてこのヤマトマダニから2株のダニ脳炎ウイルスを分離したことが確認された。現在までダニ脳炎ウイルスについてはヤマトマダニから分離された報告はなく、これは最初の報告となった。

さらにこのマダニは野ネズミを宿主にしていることから、この地域に生息する野ネズミの調査を行うことにより、このウイルスの土着性を明らかにできると考えた。そこで患者発生地区を含めた地域の土着状況の把握を行う目的で、まず患者発生地区周辺で捕獲した野ネズミの脾臓から乳剤を作製し、マダニの方法と同様にしてウイルス分離同定を試みた。

野ネズミはシャーマントラップを一晩設置して捕獲した。この地域で捕獲した野ネズミはエゾヤチネズミ*Clethrionomys rufocanus*、エゾアカネズミ*Apodemus speciosus*、エゾヒメネズミ*A. argentatus*、ドブネズミ*Rattus norvegicus*、オオアシトガリネズミ*Sorex unguiculatus*そしてエソトガリネズミ*S. spp.*であった。分離はこれらの野ネズミの脾臓を無菌的に取り出し、すり潰して、一日齢のマウスに脳内接種して行った。同定はマダニから分離同定した同様の方法を用いた。これらの内、1995年に捕獲したエゾアカネズミ11匹中1匹、1996年に捕獲したエゾヤチネズミ79匹中1匹からウイルスが分離できた。これらはダニ脳炎ウイルスに特異的なモノクローナル抗体について陽性反応を示したため、この2株はダニ脳炎ウイルスであると同定した。

さらにこの地区で捕獲した野ネズミと北海道全域で集めたウマとイヌについての中和試験による血清学的調査の結果、野ネズミについては患者発生地区から10キロ以上離れた3カ所で陽性が認められた。またウマとイヌについては、ウマから桧山、後志で3検体、イヌから渡島、胆振で18検体の陽性例を発見した。この結果から、道南に陽性ポイントが存在することが判明した。

以上より結果として、

1. ヤマトマダニから初めてダニ脳炎ウイルス株が分離された。
2. 患者発生地区周辺に生息する野ネズミからダニ脳炎ウイルスが分離された。
3. 患者発生地区周辺の野ネズミに特異抗体陽性例が認められた。
4. イヌおよびウマにおいて北海道内4支庁で抗体陽性例を発見した。

上記の結果に示されたようにマダニと野ネズミからウイルスが分離できたことから、ヤマトマダニと野ネズミのエゾヤチネズミおよびエゾアカネズミはこの地域におけるダニ脳炎ウイルスの感染環の一端を担っていることが示唆された。また本研究は今まで報告例のなかったヤマトマダニからウイルスが分離されたことにより、媒介マダニ種の新しい記録となった。今回ウイルスが分離されたヤマトマダニの生息域は人口の密集する本州以南に広がっていることが山口ら(1971)および宮本ら(1990、1992)の報告により知られていることから、現在、全く調査の行われていない本州以南への広域の調査の必要性を

示した。

結論として、

1. ダニ脳炎ウイルスの媒介マダニ種としてヤマトマダニを初めて確認した。
2. ヤマトマダニとエソヤチネズミおよびエソアカネズミはこの地域におけるダニ脳炎ウイルスの感染環の一端を担っていることを示唆した。
3. 少なくとも現在まで、北海道の広い範囲においてダニ脳炎ウイルスが土着していることを確認した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 東 正 剛

副 査 教 授 岩 熊 敏 夫

副 査 教 授 高 島 郁 夫 (大学院獣医学研究科)

副 査 助 教 授 新 岡 正

学 位 論 文 題 名

Ecological Studies of Tick-borne Encephalitis Virus in Japan

(日本におけるダニ脳炎ウイルスの生態学的研究)

ダニ脳炎はマダニによって媒介される感染症であり、約30%以上の高い致死率を有し、また、重篤な後遺症を引き起こす。ダニ脳炎の発症は年間数千例報告されるが、これまで、日本を除く北アジアにおける報告に限られていた。しかし、1993年10月に北海道渡島支庁管内において酪農業従事者1名にウイルス性脳炎が確認され、その後、患者発生地区のイヌからダニ脳炎ウイルスが分離・同定されたことより、日本にダニ脳炎ウイルスが存在することが初めて確認された。ダニ脳炎ウイルスは、マダニの生活環に従って卵と成虫間の伝播が確認されている。本研究はマダニ及びマダニが吸血する野ネズミからのウイルス分離と本ウイルスの流行地の特定を行うことによって、日本におけるダニ脳炎ウイルスの感染状況を明らかにしようとするものである。

本論文は4章からなる。第1章は序論であり、ダニ脳炎について概説している。第2章では、日本のダニ脳炎ウイルスを媒介するマダニ種の特定を行うために、患者発生地区に生息するマダニの優性種からのウイルス分離を試みた結果について述べている。旗振り法により植生上から採取した全マダニ種のなかで、ヤマトマダニは99%を占めることを明らかにし、またイヌの体表のマダニ種中では、84%がヤマトマダニの雌であることを確認した。調査終了時には、マダニの採取に用いたイヌの半数がダニ脳炎ウイルスに対して抗体陽性を示したことから、この地域の優性種はヤマトマダニであり、また、ヤマトマダニはウイルスに感染していると考えられることを示した。つぎに、ヤマトマダニからのダニ脳炎ウイルスの分離について述べている。まず、ウイルス分離の方法として採取したマダニを雌雄と採取場所ごとにまとめ(20匹1プール)、乳剤にし、1日齢のマウスに脳内接種し、脳炎症状を引き起こしたマウスの脳から乳剤を作製した。つい

で、ハムスター腎臓由来のBHK細胞を用いて感染細胞を作製し、ウイルス同定に用いた結果、ヤマトマダニ雌雄それぞれ15プールのうち、雌の2プールから脳炎症状を引き起こすウイルスが分離され、既に公表されているモノクローナル抗体により（Heinzら 1981、1982）、この2株はダニ脳炎ウイルスであることを明らかにした。これまでダニ脳炎ウイルスについて、ヤマトマダニから分離された報告はなく、本研究によりヤマトマダニがダニ脳炎ウイルスの媒介マダニ種となっていることが初めて明らかになった。

第3章では患者発生地区を含めた地域の土着状況の把握を行う目的で、患者発生地区周辺で捕獲した野ネズミの脾臓から乳剤を作製し、マダニの方法と同様にしてウイルスの分離・同定を試みた結果について述べている。捕獲したエゾアカネズミ（11匹）およびエゾヤチネズミ（79匹）の中からウイルスが同定・分離された（各1匹）。さらにこの地区で捕獲した野ネズミと北海道全域で集めたウマとイヌについて中和試験による血清学的調査の結果、野ネズミについては患者発生地区から10km以上離れた3地点で陽性例が認められたことを述べている。またウマとイヌについては、ウマから桧山、後志で3検体、イヌから渡島、胆振で18検体の陽性例を発見した。このことから、道南に陽性地区が存在することを明らかとした。また、これらの結果により、ヤマトマダニと野ネズミのエゾヤチネズミおよびエゾアカネズミは、この地域におけるダニ脳炎ウイルスの感染環の一端を担っていることが示唆された。本研究でダニ脳炎ウイルスを媒介することが明らかになったヤマトマダニの生息域は人口の密集する本州以南に広がっていることから、現在全く調査の行われていない本州以南への調査の必要性を明らかにした。

第4章は結論として以下の点について述べている。

1. ダニ脳炎ウイルスの媒介マダニ種としてこれまで報告例のないヤマトマダニが、媒介マダニ種となっていることを初めて明らかにした。
2. ヤマトマダニとエゾヤチネズミおよびエゾアカネズミがこの地域におけるダニ脳炎ウイルスの感染環の一端を担っていることを示唆した。
3. 少なくとも現在まで、北海道の広い範囲においてダニ脳炎ウイルスが土着していることを確認した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また大学院における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が研究者として誠実かつ熱心であり、博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。