

学位論文題名

Studies on methods of differential diagnosis, epidemiology and pathological mechanism of hantavirus infection

（ハンタウイルス感染症の鑑別診断法、疫学および病態機構に関する研究）

学位論文内容の要旨

【緒言】ハンタウイルスは粒子内に3本のマイナス鎖のRNA（S、M、Lセグメント）をゲノムとして有する。ハンタウイルスは主にげっ歯類を自然宿主とし、自然宿主内では不顕性に持続感染している。ヒトへはウイルスに汚染された糞尿等を介して呼吸器感染する。南北アメリカ大陸に棲息するげっ歯類由来のハンタウイルス（新世界ハンタウイルス）は、重篤な肺水腫を特徴とし、高い致死率を示すハンタウイルス肺症候群（HPS）を引き起こす。一方で、ユーラシア大陸に棲息するげっ歯類由来のハンタウイルス（旧世界ハンタウイルス）は腎機能障害と肺水腫を特徴とする腎症候性出血熱（HFRS）を引き起こす。本研究では、ハンタウイルス感染症の診断法、疫学および病態機構の解析について実施した。

（1）組換え核タンパクを用いた血清型鑑別 ELISA 法の開発

【背景と目的】南米の Andes virus（ANDV）と Laguna Negra virus（LANV）は同所的に存在し、どちらも HPS を引き起こす。ANDV はハンタウイルスの中で唯一ヒトからヒトへの感染を引き起こし、致死率も 45% 前後と極めて高い。一方、LANV による HPS は軽症型（致死率 15% 以下）である。同様に北米の Sin Nombre virus（SNV）による HPS の致死率は 40% 前後であるのに対し、同所的に存在する Carizal virus（CARV）は病原性がほとんどない。このため、流行国では臨床や疫学調査に有用な迅速な血清学的鑑別診断法の開発が望まれてきた。そこで、本研究では血清型鑑別診断法の開発を行うことを目的とした。

S ゲノムセグメントがコードする核タンパク（N）のアミノ末端より 100 番目までのアミノ酸領域には交差反応エピトープが存在し、230-302 番目のアミノ酸領域は低保存領域で血清型特異的エピトープが存在する。そこで、新世界ハンタウイルスの低保存領域のアミノ酸の一致度を比較し、一致度をもとに血清型の予測が可能であるか検討した。さらに、アミノ末端の交差反応エピトープを削除した組換え抗原（trN100）を作出し、血清型鑑別診断 ELISA 用抗原としての有用性について評価を行った。

【材料と方法】SNV、ANDV、LANV、CARV の trN100 をバキュロウイルス発現システムにより作出し、各ウイルスに感染したヒトおよびげっ歯類の血清との反応性を検討した。対照として各 N の全長を発現させた whole rN を用いた。

【結果と考察】ヒトおよびげっ歯類のいずれの血清を用いても、whole rN を ELISA 抗原とした場合、抗原間で強い交差反応が認められた。一方で trN100 を ELISA 抗原とした場合は各抗原とホモの血清が最も強く反応した。

【結論】この鑑別法によって、新世界ハンタウイルスの鑑別が血清学的に迅速に実施出来るため、病原性の強弱の推定、自然宿主動物の予測などが可能となり、本疾患のコントロールのために有用な情報を与えると考えられる。この鑑別 ELISA システムはヒトだけでなくげっ歯類のハンタウイルス感染の疫学調査にも有用であると考えられた。

（2）ベトナム北部における野生ラットが保有するげっ歯類媒介性病原体の調査

【背景と目的】げっ歯類は種々の人獣共通感染症病原体を保有する媒介動物であり、ヒトの居住地に棲息する野生ラット（*Rattus* spp.）はヒトの脅威となるハンタウイルス、レプトスピラ、ラット E 型肝炎ウイルス（HEV）およびペスト等のげっ歯類媒介性病原体の主要な感染源である。従って、げっ歯類におけるげっ歯類媒介性病原体の感染状況を知り、げっ歯類との接触を避けることが感染予防に重要である。しかし、東南アジアを中心とした途

上国ではげっ歯類における病原体の感染状況が十分に把握されていない。近年、ベトナムの都市部でハンタウイルス感染患者が報告された。また、レプトスピラ抗体陰性の不明熱患者からもハンタウイルスに対する抗体が検出された。そこでベトナムの都市部に棲息するげっ歯類が保有するげっ歯類媒介性病原体の抗体保有調査を実施した。

【材料と方法】2011年1月にベトナム北部のハノイとハイフォン市街で220個のトラップを用いて捕獲調査を行ない、100匹のラットを捕獲し、血清を採取した。げっ歯類が媒介するハンタウイルス、レプトスピラ、ラットHEVならびにペストに対するIgG抗体保有状況をELISA法により調査した。

【結果】IgG抗体保有率はハンタウイルス(14%)、レプトスピラ(22%)、ラットHEV(23%)、ペスト(0%)であった。

【結論】人口密度が高い市街地において、ハンタウイルス、レプトスピラ、ラットHEVの抗体を保有したげっ歯類が棲息していることが明らかとなり、ヒトへの感染症としての危険性が示された。今後も継続したげっ歯類の調査が必要であり、さらにこれらの地域の不明熱患者を中心とした抗体保有調査の実施が必要である。

(3) 肺水腫を呈すハンタウイルス感染 SCID における好中球の役割

【背景と目的】ハンタウイルス感染によって引き起こされる肺水腫は非心原性で肺血管透過性の亢進により起こると考えられているが、その機序は明らかではない。ハンタウイルスは細胞傷害性がなく、患者においては好中球やウイルス特異的 T 細胞の増加が認められることから、疾患は免疫病原性によるものであると考えられている。好中球は、HPS と症状が類似の急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) の発症機序に大きく関与し、様々な血管透過性因子を産生することが知られている。このため、ハンタウイルス感染症においても好中球が肺血管透過性を亢進させ、肺水腫を引き起こしている可能性が考えられる。近年、HPS ウイルス感染で致死的となるハムスターモデルを用いた実験で、T 細胞以外の細胞がハンタウイルス感染の免疫病原性に関与していることが示唆されているが、好中球の役割は明らかではない。

一般に、ハムスターモデルでは免疫学的解析試薬などの研究手段がマウスに比べて限られており、詳細な解析には限界がある。一方、マウスにハンタウイルスを感染させてもウイルスは早期に排除され、症状は現れないことが知られている。しかし、申請者は、機能的な T 細胞、B 細胞を欠失している CB17 Scid (SCID) マウスにハンタウイルスを感染させると、重篤な一過性の肺水腫が出現することを発見した。そこで、本研究では、この肺水腫を呈す SCID マウスモデルを用いて、好中球の肺水腫出現への役割について明らかにすることを目的として実施した。

【材料と方法】6-8 週齢のメスの SCID マウスに Hantaan virus (HTNV) cl-1 を腹腔内投与した。7 日おきに肺水腫の程度、好中球数を調べ、肺水腫が出現し始める感染 28 日目の肺中の好中球の割合を調べた。また好中球と肺水腫との関係を調べるために HTNV 感染 SCID マウスにおいて、好中球の枯渇を行い、肺水腫の程度と肺血管透過性へ与える影響を調べた。

【結果と考察】感染 28 日目から肺水腫が観察されはじめ、感染 35 日目のマウスの肺では約 80% の肺泡に滲出液を認め、その割合はピークに達した。好中球数は感染 21 日目から有意に増加し、感染 28 日目には非感染群のその約 3 倍まで増加していた。肺水腫が出現し始める感染 28 日目の肺中の好中球の割合は非感染群と比べ有意に増加していた。好中球の枯渇実験を行ったところ、感染 33 日目の肺では水腫の出現が 90% 以上抑制され、肺血管透過性も有意に抑制された。従って、このハンタウイルス感染 SCID マウスにおいては好中球が肺血管透過性の亢進を引き起こし、肺水腫の出現に関与していると考えられた。今後、ウイルスと好中球、好中球と血管透過性亢進との関係性について詳細に解析して行く必要がある。

学位論文審査の要旨

主査	教授	玉城英彦
副査	教授	大滝純司
副査	教授	瀬谷司
副査	教授	有川二郎

学位論文題名

Studies on methods of differential diagnosis, epidemiology and pathological mechanism of hantavirus infection

(ハンタウイルス感染症の鑑別診断法、疫学および病態機構に関する研究)

申請者は新世界ハンタウイルス感染の鑑別診断法を開発するために、ハンタウイルスの核タンパクの交差反応エピトープを欠損させた trN100 抗原を作出し、鑑別 ELISA に応用した。今回の研究により新世界ハンタウイルスに感染したヒトおよびげっ歯類の血清型鑑別を可能とした。またベトナム北部のラットにおけるレプトスピラ、ソウル型ハンタウイルス、ラット HEV およびペスト菌の抗体保有率を調べるために、ハノイ市内とハイフォン港湾内でラットを捕獲した。この病原体の保有調査から、ハノイやハイフンの都市部のラットにおいてはレプトスピラ、ソウル型ハンタウイルス、ラット E 型肝炎ウイルスが流行していることが明らかとした。次に、ハンタウイルスを感染させた SCID マウスにおいて認められた肺水腫について、申請者は好中球の関与を疑い枯渇実験を行った。その結果、好中球を枯渇したマウスでは肺血管透過性の亢進が有意に抑制され、肺水腫も認められなくなることを証明した。この結果から好中球がハンタウイルス感染で認められた血管透過性の亢進や肺水腫形成の中心的役割を果たしていることを解明した。

審査会での質疑応答では、4 人の審査担当者より以下の質問がなされた。副査の大滝教授より、日本国内でのヒトおよびげっ歯類におけるハンタウイルスの感染状況について、鑑別診断を行う際のカットオフ値および感度、特異性について、また鑑別診断法の臨床での有用性についての質問があった。これに対して申請者は現在、国内では患者が発生していないこと、北海道においては感染したげっ歯類が存在すること、および、カットオフ値、感度、特異性を説明した。副査の瀬谷教授より、モノクローナル抗体による治療に関連づけてアンデス型ハンタウイルスがヒト-ヒト感染を起こすウイルス学的な知見について、また好中球を枯渇する際に用いた抗 Gr-1 抗体の特異性についての質問があった。これに対して申請者は、アンデス型ハンタウイルスのどの部分がヒト-ヒト感染を引き起こしているかは現在のところ不明であるが、その部分に対するモノクローナル抗体が作成出来れば予防や治療につながると回答を行った。また抗 Gr-1 抗体の投与を行った際には、マクロファージに影響しないことを確認しており、さらにマクロファージについてはクロドロネートリポソームを用いて単独枯渇を行い、肺水腫に影響を及ぼさないことを確認していると回答を行った。主査の玉城教授より、鑑別診断法として ELISA 法を選択した理由と、アメリカ

大陸で流行しているウイルス感染の鑑別診断法を、日本に在籍している申請者が研究を行った理由について質問があった。これに対して申請者は、既存の中和試験法や PCR 法の問題点を述べ、イムノストリップ法については別の研究員が作成中であると回答した。また国内で研究を行っている理由については、輸入感染症が危惧されるためであると回答を行った。副査の有川教授から腎症候性出血熱を引き起こすハンターン型ハンタウイルスを感染させて肺水腫が認められた理由および本肺水腫モデルの妥当性についての質問があった。これに対して申請者は、腎症候性出血熱とハンタウイルス肺症候群の両疾患は血管透過性の亢進に起因する疾患であり、肺水腫も共通して認められるため、またハンターン型ハンタウイルスは特に肺への親和性が高く、肺でウイルスが大量に複製されるために肺水腫が認められたと回答を行った。さらに、本モデルの肺水腫がヒトと同じ血管透過性の亢進に起因するという共通の病態機構で起きているのであれば、モデル動物としては妥当であると回答を行った。

この論文は、新世界ハンタウイルスの鑑別診断法を開発し、ラットにおける各種病原体の保有率を明らかにし、さらに好中球が血管透過性の亢進および肺水腫の形成に関与していることを明らかにしたことで高く評価され、今後のさらなる診断・疫学研究およびウイルス感染における病原性発現機構解明への基礎研究の発展を期待させるものである。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を取得するのに十分な資格を有するものと判定した。