

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 駒 貴明

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)

【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 抗原とした場合で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% の肺胞に滲出液を認め、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。