

20030548

厚生労働科学研究費

新興・再興感染症研究事業

野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症の
予防、診断及び疫学に関する研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 高島郁夫

平成16(2004)年3月

目 次

I.	総括研究報告	
	野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症の予防、 診断及び疫学に関する研究	1
	高島郁夫	
II.	分担者研究報告	
1.	野生齧歯類及びダニ類に由来する病原体の病原性	8
	岩崎琢也	
2.	ハンタウイルス感染症の疫学的研究	17
	苅和宏明	
3.	ハンタウイルス感染症の診断法の開発に関する研究	23
	有川二郎	
4.	バベシア感染症の診断法の開発と疫学的研究	28
	辻 正義	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	36
IV.	研究成果の刊行物・別刷	38

総括研究報告書

野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症の予防、
診断及び疫学に関する研究

主任研究者 高島郁夫 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

研究要旨

ダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルス Oshima 株の遺伝子組換え抗原を哺乳動物細胞においてウイルス様粒子として発現させた。この組換え抗原を IgM-ELISA に用いて、敏感度と特異性に優れた TBE の血清診断法を確立した。TBE ウイルスの病原性に関連して、BHK-21 細胞に適応した変異株がマウスにおける神経侵入性毒力が低下していることを見出した。この変異は Oshima 株のエンベロープ蛋白のドメイン II のアミノ酸の 1 ヶ所の置換によっていた。極東ロシアのハバロフスクにおいて腎症候性出血熱患者の血清について、ハンタウイルス核タンパクの部分切断抗原を用いた ELISA により感染ウイルスの血清型別を行った。陽性血清はすべてソウル型、ドブラバ型、プーマラ型よりもハンターン型に強く反応した。患者血餅から M 遺伝子の一部を増幅したところ、ハンターン型またはアムール型よりも極東型に近い塩基配列を持っていた。スナネズミを用いたプーマラ型ウイルスの分離のための効率の良い方法を開発した。ハンターンウイルスに持続感染させた新生マウスのウイルス特異的 CD8⁺-T-細胞の持続感染との関連を明らかにした。1985 年に集められた人血清 1,335 例について *Babesia microti* 様原虫に対する抗体を間接蛍光抗体法で測定したところ、18 例(1.3%)が陽性であった。これらの血清をウエスタンブロット法で調べたところ、14 例は穂別型に 3 例は神戸型に反応した。

研究分担者

岩崎琢也・長崎大学・教授
荻和宏明・北海道大学・助教授
有川二郎・北海道大学・教授
辻正義・酪農学園大学・助教授

F. 研究目的

ダニ媒介脳炎、ハンタウイルス感染症とバベシア症について、精度の高い診断法を確立し、疫学調査を実施し、国内の汚染地の特定とヒトに

おける感染状況の解明に努める。またロシアシベリア、極東地区における疫学調査を実施する。さらにこれらの感染症の発症機序を解明し、ワクチン（ダニ媒介脳炎）による予防法を確立する。

G. 研究方法

遺伝子組換え技術を用いてウイルス抗原を発現させ、この抗原を用いた ELISA による血清学的診断法を確立する。国内およびロシアにおいて疫学調査を実施し、マダニ類、野生げっ歯類および患者から病原体を分離する。患者の病理組織学的検索を行う。病原体の遺伝子の塩基配列を決定し、系統樹解析と病原性の解明を行う。

（倫理面への配慮）

ヒトの血清と剖検材料の採取はインフォームドコンセントに基づき行い、成績の公表は氏名を伏せて実施する。本研究における動物実験は各研究機関に属する動物実験委員会に計画を申請し、承認を得た後に実施する。ウイルスを用いた実験は P-3 実験室において行う。

C. 研究結果

ダニ媒介脳炎：北海道で分離された TBE ウイルス Oshima 株の病原性を遺伝子レベルで解析するととも

に ELISA による血清診断法を開発した。変異株 Oshima cl-1 はマウスにおける皮下接種による神経侵入性毒力は親株より弱かった。Oshima cl-1 のウイルス血症の力価は親株の 1/100 と低かった。Oshima cl-1 のエンベロープ蛋白のアミノ酸置換は電荷の変化に関係していた。ウイルス用粒子（VLPs）を用いた ELISA IgG テストと中和試験との比較を患者血清 95 検体について行ったところ敏感度は 98.8%、特異性は 100%であった。さらに日本脳炎の患者血清はすべて陰性であった。ハンタウイルス感染症：極東ロシアのハバロフスクにおいて臨床的に腎症候性出血熱(HFRS)と診断された血清について、感染ウイルスを型別できる ELISA 法を用いて抗体を測定した。その結果はほとんどすべての陽性血清はハンター型ウイルスに強く反応していた。患者血餅から増幅した M 遺伝子は極東型に 96%以上の相同性を示した。これらのことからハバロフスクで流行し人の HFRS の原因となっているのはハンター型の極東亜型のウイルスであることが判明した。さらにこれまで分離が難しいとされて来たプーマラ型ウイルスを効率よく分離するため、哺乳スナネズミ脳内接種法を確立した。これまでよく解析がされていなかった HFRS ウイルスのげっ歯類宿主における持続感染の機序を解明するために、新生マウスにおける持続

感染モデルを作出した。これを用いて HFRS ウイルスの体内からの排除には機能的な HFRS 特異的 CD8⁺-T-細胞が必要であることが判明した。

バベシア症：日本で人の *Babesia microti* 様原虫感染の初発例が発見されたのは 1999 年であった。それ以前に日本での本症の感染例があったのかどうか明らかにするため、1985 年に採取された人血清 1,335 例について抗体調査を実施した。間接蛍光抗体価陽性例は 18 例検出され、さらにウエスタンブロット法で 14 例が穂別型、3 例が神戸型の *Babesia microti* 様原虫に反応した。これらのことから日本では 1999 年以前から本原虫の感染が人の間に発生していたことが判明した。

D. 考察

1993 年北海道上磯町で日本で初めてのダニ媒介性脳炎の患者が発見された。その後の我々の疫学調査で原因の TBE ウイルス Oshima 株が患者発生地区のおとりの犬から分離された。TBE ウイルス Oshima 株の病原性の分子基盤を明らかにすることにより、脳炎発症機序の解明だけでなく、生ワクチンの開発に有用な情報が得られる。

Oshima 株の BHK-21 細胞に適應した変異株 Oshima cl-1 株は神経侵入性毒力が親株より低かった。この弱毒化の機序としてエンベロープ

蛋白のドメイン II における 1ヶ所のアミノ酸の置換が末梢でのウイルス増殖の低下と、ウイルス血症のレベルの減少に致り、その結果ウイルスが脳内に侵入できなかったことが考えられた。これは Oshima cl-1 が体内に多量存在するグリコサミノグリカン様物質にトラップされたためと考えられた。

これまで特異的な TBE の診断法として中和試験が用いられて来た。今回は生ウイルスによらない安全で、敏感度と特異度に優れた血清診断法として VLPs を用いた ELISA の開発を試みた。開発した IgG-ELISA は敏感度と特異度に優れた血清診断法であることが判明した。

これまで極東ロシアは腎症候性出血熱(HFRS)の流行地として考えられて来たが、ハンタウイルスの遺伝子解析や病原巣動物についての報告はほとんどない。今回極東ロシアのハバロフスクにおいて患者の血清疫学調査とハンタウイルス RNA の増幅に成功し、比較することができた。その結果からハバロフスクの重症の腎症候性出血熱の患者はハンター型極東亜型ウイルスに起因することが判明した。

バベシア症につき、日本で初発例のあった 1999 年以前の人での感染状況を推定するために 1985 年に採血された人血清について検討を加えた。その結果 1985 年にすでに人での *Babesia microti* 様原虫に

感染している成績が得られた。さらに穂別型と神戸型に陽性例が発見された。この成績は日本の初発例以前すでに人での散発的感染が存在していた事を示している。

E 結論

ダニ媒介脳炎(TBE)について、ウイルス様粒子を用いた IgMELISA による感度と特異性に優れた人用の血清診断法を確立した。TBE ウイルス Oshima 株の神経侵入性毒力に関与するエンベロープ蛋白の 1ヶ所のアミノ酸変異を同定した。ハンタウイルス感染症では極東ロシアハバロフスクの患者はハンター型極東亜型ウイルスの感染によることを明らかにした。さらにプーマラ型ウイルスのスナネズミによる効率的な分離方法とハンタウイルスの新生マウスを用いた持続感染モデルを確立した。バベシア症では、1999年の日本での初発例以前に人の感染例が存在したことを明らかにした。

F. 健康危険情報

極東ロシアでは重篤な腎症候性出血熱の流行が存在するので、当地を旅行する日本人は野ネズミとの接触を避けるなどの予防対策が必要である。バベシア症では 1985年に感染例が発見されたため、さらに広範な血清疫学調査を実施し感染地を特定する

必要がある。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Yoshii, K., Hayasaka, D., Goto, A., Obara, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L., Mizutani, T., Kariwa, H., Takahima, I.: Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens expressed in mammalian cells for serodiagnostics of tick-borne encephalitis. *J. Virol. Methods.* 108: 171-179. 2003
- 2) Goto, A., Hayasaka, D., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I.: A BHK-21 cell culture-adapted tick-borne encephalitis virus mutant is attenuated for neuroinvasiveness. *Vaccine.* 21:4043-4051. 2003
- 3) Miyamoto, H., Kariwa, H., Araki, K., Lokugamage, K., Hayasaka, D., Cui, B. Z., Lokugamage, N., Ivanov, L. I., Mizutani, T., Iwasa, M.A., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.: Serological analysis of hemorrhagic fever with renal syndrome(HFRS) patients in Far Eastern Russia and identification of the causative hantavirus genotype. *Arch. Virol.* 148: 1543-1556. 2003
- 4) Lokugamage, N., Kariwa, H., Lokugamage, K., Hagiya, T.,

- Miyamoto, H., Iwasa, M.A., Araki, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Mizutani, T., Takashima, I.: Development of an efficient method for recovery of Puumala and Puumala-related viruses by inoculation of Mongolian gerbils. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 1189-1194. 2003
- 5) Araki, K., Yoshimatsu, K., Lee, B-H., Kariwa, H., Takashima, I., Arikawa, J. : Hantavirus-specific CD8+-T-cell responses in newborn mice persistently infected with hantavirus. *J. Virol.* 77: 8408-8417. 2003
- 6) Kariwa, H., Tanabe, H., Mizutani, T., Kon, Y., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Iwasa, M. A., Hagiya, T., Araki, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. Takashima, I. : Synthesis of *Seoul virus* RNA and structural proteins in cultured cells. *Arch. Virol.* 148: 1671-1685. 2003
- 7) Lokugamage, K., Kariwa, H., Lokugamage, N., Iwasa, M. A., Hagiya, T., Araki, K., Tachi, A., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Iwasaki, T., Takashima, I. : Comparison of virulence of various hantaviruses related to hemorrhagic fever with renal syndrome in newborn mouse model. *Jpn. J. Vet. Res.* 51 : 143-149. 2004.3.
- 8) 荻和宏明 : ハンタウイルス感染症の疫学. *バムサ会誌.* 15 : 335-340.2003
- 9) Lee, B-H., Yoshimatsu, K., Araki, K., Ogino, M., Okumura, M., Tsuchiya, K., Kareiwa, H., Arikawa, J. Detection of antibody for the serodiagnosis of hantavirus infection in different rodent species. *Arch. Virol.* 148: 1885-1897.
- 10) Takakura, A., Goto, K., Itoh, T., Yoshimatsu, K., Takashima, I., Arikawa, J.: Establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hantavirus antibody of rats using a recombinant nucleocapsid protein expressed in *Escherichiacoli.* *Exp. Anim.* 52: 25-30. 2003.
- 11) Ogino, M., Ebihara, H., Lee, B-H., Araki, K., Lundkvist, A., Kawaoka, Y., Yoshimatsu, K., Arikawa, J.: Use of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing Hantaan or Seoul virus envelope proteins in a rapid and safe neutralization test. *Clin. Lab. Immuno.* 10: 154-160. 2003.
- 12) Yoshimatsu, K., Lee, B-H., Araki, K., Morimatsu, M., Ogino, M., Ebihara, H., Arikawa, J.: The multimerization of hantavirus

nucleocapsid protein depends on type-specific epitopes. J. Virol. 77: 943-952. 2003.

13) Arai, S., Tsuji, M., Maiho, I., Murayama, H., Zamoto, A., Wei, Q., Okabe, N., Kamiyama, T., Ishihara, C.: Retrospective seroepidemiological survey for human babesiosis in an area in Japan where a tick-borne disease is endemic. J. Vet. Med. Sci. 65: 335-340. 2003.

14) Zamato, A., Tsuji, M., Wei, Q., Cho, S-H., Shin, E-H., Kim, T-S., Leonova, G., Hagiwara, K., Asakawa, M., Kariwa, H., Takashima, I., Ishihara, C.: Epizootiological survey for *Babesia microti* among small wild mammals in Northeastern Eurasia and a geographic diversity in the B-tubulin gene sequences. J. Vet. Med. Sci. (in press). 2004

2.学会発表

1) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス replikon および packaging system の構築：第 135 回日本獣医学会、東京(2003, 3)

2) 後藤明子、好井健太郎、小原真弓、植木智隆、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスのエンベロープ糖蛋白の糖鎖欠損が

ウイルス粒子形成に与える影響：第 135 回日本獣医学会、東京(2003, 3)

3) 白戸憲也、木村亨史、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ウエストナイルウイルス(WNV)NY 株および Eg101 株のマウスにおける病原性の比較：第 135 回日本獣医学会、東京(2003, 3)

4) 高島郁夫：ウエストナイルウイルスの現状とその対策：第 136 回日本獣医学会、青森(2003, 10)

5) 植木智隆、早坂大輔、後藤明子、好井健太郎、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスの感染性 cDNA を用いた病原性解析：第 136 回日本獣医学会、青森(2003, 10)

6) 赤穂芳彦、水谷哲也、三好洋嗣、小林正之、白戸憲也、江下優樹、木村亨史、山盛 徹、稲波 修、苅和宏明、梅村孝司、桑原幹典、高島郁夫：西ナイルウイルスの感染における JNK の役割：第 136 回日本獣医学会、青森(2003, 10)

7) Nandadeva Lokugamage , 苅和宏明、Kumari Lokugamage、萩谷友洋、岩佐真宏、宮本大伸、荒木幸一、吉松組子、有川二郎、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：Isolation of Puumala-related virus from *Clethrionomys rufocanus* in Sakhaline, Russia:第 136 回日本獣医学会、青森(2003,10)

8) 岩佐真宏、苅和宏明、萩谷友洋、

崔 百忠、水谷哲也、高島郁夫：自然環境下で生息するエゾヤチネズミ集団におけるハンタウイルスの感染動態について：第 136 回日本獣医学会、青森（2003, 10）

9) 萩谷友洋、苺和宏明、前田顕司、岩佐真宏、宮本大伸、Nandadeva Lokugamage、Kumari Lokugamage、荒木幸一、吉松組子、有川二郎、水谷哲也、高島郁夫：北海道、サハリンおよび極東ロシアにおける *C. rufocanus* と Puumala-related ハンタウイルスの共進化の解析：第 136 回日本獣医学会、青森（2003, 10）

10) 苺和宏明、ロクガマゲクマリ、ロクガマゲ ナンダデバ、岩佐真宏、萩谷友洋、宮本大伸、荒木 幸一、吉松組子、有川二郎、水谷哲也、高島郁夫：極東ロシアにおけるハンタウイルスの多様性：第 51 回 日本ウイルス学会、京都（2003, 10）

11) 宮本 剛、吉松組子、荒木幸一、Lee Byoung-Hee、苺和宏明、高島郁夫、有川二郎：SNV NP の抗原性の解析と血清診断法の確立：第 51 回 日本ウイルス学会、京都、（2003, 10）

12) 後藤明子、好井健太郎、小原真弓、植木智隆、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスのエンベロープ糖蛋白の糖鎖欠損がウイルス粒子形成に与える影響：第 51 回 日本ウイルス学会、京都（2003, 10）

13) 水谷哲也、小林正之、江下優樹、白戸憲也、赤穂芳彦、三好洋嗣、木村亨史、高崎智彦、梅村孝司、苺和宏明、倉根一郎、高島郁夫：蚊の細胞へのウエストナイルウイルスの侵入における活性化 JNK の重要性：第 51 回 日本ウイルス学会、京都、（2003, 10）

14) 早坂大輔、好井健太郎、岩崎琢也、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎 ウイルス Sub-genomic replicon の作製：第 51 回 日本ウイルス学会、京都、（2003, 10）

15) 白戸憲也、木村亨史、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：West Nile ウイルス NY 株および Eg101 株のマウスにおける病原性の比較：第 51 回 日本ウイルス学会、京都、（2003, 10）

16) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明子、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス replicon RNA の trans-complementation によるパッケージング系の構築：第 51 回 日本ウイルス学会、京 都、（2003, 10）

17) 荒木幸一、吉松組子、Lee Byoung-Hee、苺和宏明、高島郁夫、有川二郎：Adult げっ歯類でのハンタウイルス持続感染とウイルス特異的 CD8T 細胞応答：第 51 回日本ウイルス学会、京都、（2003, 10）

H. 知的財産の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

野生齧歯類及びダニ類に由来する病原体の病原性

（代表研究者：高島郁夫）

分担研究者 岩崎琢也（長崎大・熱帯医学研 国立感染研・感染病理部）

協力研究者 早坂大輔（長崎大・熱帯医学研）

佐藤由子・佐多徹太郎・倉田 毅（国立感染研・感染病理部）

苅和宏明・高島郁夫（北海道大学大学院・獣医学・環境獣医科学講座）

研究要旨 本年度は①野生齧歯類より分離されたハンタウイルスの病原性を明らかにすることと②ウイルス抗原の免疫組織学的検出系を確立する目的で研究を行った。生後 24 時間以内に皮下にハンタウイルスが接種された新生児 BALB/c マウスを経時的に病理学的に解析した。接種したウイルスは Amur genotype の H5 と B78 株、Far East genotype の Bao 14 株、Hantaan virus の 76-118 株であり、接種量は 1 focus forming unit である。接種 7 日、11 日、14 日に脳、脊髄、肺、心、肝、腎、脾等を採材し、ホルマリン固定後、組織学的ならびに抗ハンタウイルス nucleoprotein (NP)抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。その結果、感染細胞の形態学的変化は乏しく、数的に感染細胞と同定できる数は少ないのに比し、NP 抗原の免疫組織化学的検索ではいずれの株でも、脳、脊髄、肺、心、肝、腎、脾と非常に広範囲に感染細胞が分布していることが判明した。NP 抗原は細胞質に検出され、核内に検出されることはなかった。ウイルス抗原陽性細胞は巣状に分布し、感染する細胞の種類としてはいずれの組織でも従来いわれている血管内皮あるいは間質細胞で有り、これ以外の細胞として中枢神経組織では neuron が主体であり時に脈絡叢上皮、肝では肝細胞、心では心筋細胞に感染が認められた。Far East genotype の感染では腎の尿細管上皮に感染が認められた株間の病原性の差は数的違いはかなり目立ち、とくに 76-118 株では感染細胞数は 14 日目でも非常に少なかった。Amur と Far East genotypes の 3 株の感染マウスは感染 7 日目には感染細胞数は陰性あるいは極く少数であったが、11 日、14 日目には経時的にその数が急激に増加し、特に脳内の陽性細胞が激増したこの解析により、①ハンタウイルスは新生児マウスに経皮的に感染が成立すること、②感染細胞の形態学的変化はみられるもののそれほど強くはないこと、③炎症応答も乏しいこと、④広範な壊死あるいは出血性変化等は認められないこと、⑤NP 抗原を検出する免疫組織学的解析が有効であることが明らかにされた。

A. 研究目的

野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症のうち、この分担ではウイルス感染症を主として対象とし、人体におよぼす病原性の組織病理学的解析、発症病理の解明、病理学的診断的方法の確立を目的として研究を行っている。

今年度は経皮的に 4 種類のハンタウイルス

株 H5、B78、Hantaanvirus 76-118 が接種されたマウスのホルマリン固定組織について組織病理学的変化ならびにハンタウイルス抗原の局在について免疫組織学的に検討した。なお、これらのウイルス感染実験は北海道大学大学院の Biosafety Level 3 の動物実験施設においてガイドラインに従って行われた。接種後のマウス

の生存、体重変化、脳・肺・腎のウイルス量、抗体応答については Lokugamage K、らにより解析されている (Lokugamage K et al. in prep)。

B. 研究方法

マウス：specific-pathogen-free の BALB/c 妊娠マウスを SLC (浜松) より購入し、出生後 24 時間以内のものを実験に使用した。

ウイルス：中国において分離された H5, B78, Bao 14 株と Lee らにより Apodemus の肺から分離された Hantaan 76-118 株 (Lee et al. 1978) を使用した。これらのウイルスは Vero E6 細胞で継代調整され、うち 76-118 株は 11 代、残りの株は 3 代継代されている。また、接種するウイルス価は Vero E6 細胞でウイルス接種後の focus を抗ウイルス抗体を用いた間接蛍光抗体法により定量されている (focus forming unit)。

ウイルス接種と採材：生後 24 時間以内の新生児マウスの皮下に 1 FFU 値のウイルス液 100 μ l を接種し、経時的に生存を解析しながら、接種後 7 日、11 日、14 日目に採材した。採材した組織は直ちに緩衝ホルマリン溶液 (4%ホルムアルデヒド・PBS) に浸漬した。

組織学的解析：上記緩衝ホルマリン固定組織(脳、脊髄、肺、心、肝、腎、脾)を通常の方法に従い、パラフィン包埋し、薄切切片を作製した。hematoxylin-eosin 染色後、光学顕微鏡により観察した。

免疫組織学的解析：ウイルス抗原の免疫組織学的検出には抗ハンタウイルス nucleoprotein (NP) ウサギ血清を使用した。この抗血清はウサギにハンタウイルス nucleoprotein の N-末よりの 230 アミノ酸残基のレコンビナント蛋白を接種し得られている (Araki et al. 2003)。

パラフィン切片を脱パラフィン後、親水化し、0.3% H_2O_2 /methanol 中で 30 分処理を行い内因性 peroxidase activity を失活させた。トリプシン処理

37 度、30 分処理を行い、組織内のウイルス抗原を賦活化した。正常ヤギ血清で非特異反応をブロックしたあとに、抗ハンタウイルス NP ウサギ血清と 4°C で一晩反応させ、結合した抗体を LSAB-HRP (DAKO) を用いて検出した。DAB を基質としたペルオキシダーゼ反応により発色させた。核染色には必要に応じて hematoxylin あるいは methylgreen を用いた。

C. 研究結果

1. H5 皮下接種マウス：接種後 7 日 (n=2)、11 日 (n=3)、14 日 (n=2) を観察した。この株を 1 FFU 接種したマウスは 10 日目以降より死亡し始め、20 日目まで 100% 死亡している。

通常の組織学的解析に使用するヘマトキシリン・エオシン染色で容易に認識できる変化は接種後 14 日目の中枢神経組織にのみ認められた。この変化は神経細胞の細胞質の好酸性変性と核濃縮であり、これらの変化が強いところでは血管周囲に細胞浸潤 perivascular cuffing も生じていた。neuronophagia も認められた。これらの神経細胞の変化はとくに辺縁系で見つけることが容易であった。

ウイルス抗原陽性細胞は初期は肝 (Figure 1) に検出され、以後中枢神経組織 (Figure 2)、腎 (Figure 3)、脾、心、肺と全身性に検出される。肝では主として肝細胞に顆粒状に nucleoprotein 抗原が検出され、Kupffer 細胞ならびに血管内皮の感染を伺わせる像もみられた。中枢神経組織ではウイルス抗原陽性細胞は神経細胞 neuron と脈絡叢上皮であり、とくに前者では組織学的変化と相関していた。腎では髄質の間質細胞が陽性となった。心では心筋細胞が陽性であり、一部の血管内皮も陽性であった。これらの陽性細胞は経過に比例し数的に増加し、とくに中枢神経細胞では多数の陽性細胞が認められるようになった。

2. B78 皮下接種マウス：接種後 7 日 (n=2)、11 日 (n=3)、14 日 (n=4) を観察した。1 FFU 接種後の

経過はほぼ H5 に準じている。

組織学的ならびに免疫組織学的検索結果も H5 とほぼ同様であるが、接種後 7 日目では殆ど陽性細胞が認められず、H5 に比較しやや経過が遅い傾向が窺われた。

3. Bao14 皮下接種マウス：接種後 7 日(n=2)、11 日(n=3)、14 日(n=5)を観察した。1 FFU 接種後の経過はほぼ H5 と B78 に比較し 5 日程度遅くなっているが、100%死亡している。ただし、接種後 14 日目で死亡したマウスはいない

組織学的ならびに免疫組織学的検索結果も H5 と B78 に準じているが全体的に感染細胞内のウイルス抗原量は少なく、とくに腎髄質の陽性細胞数は多くはない。しかし、この比較は感染後 14 日目で行ったものであり、感染末期の像はまだみていないため感受性細胞が少ないのか、ウイルス増殖が遅いためなのかははっきりとはしない。Bao14 感染マウスと他の株を接種したマウスと最も異なっている所見は腎尿管上皮にウイルス抗原を検出した点である。

4. HTN 皮下接種マウス：接種後 14 日(n=3)の 1 時点のみを比較のため観察した。1 FFU 接種後は他の株と違い 50%の死亡率であり、その経過も最も遅く、接種後 14 日目で死亡したマウスはいない。

組織学的にはっきりとした形態学的変化を認めたマウスはなく、ウイルス抗原は中枢神経、肝、肺、心にごく少数の細胞に検出した。

D. 考察

本研究で対象とした旧世界ハンタウイルスは人体においては主として種々の程度の発熱・出血・腎障害が主たる臨床症状(流行性腎症 epidemic nephropathy、腎症候性出血熱 hemorrhagic fever with renal syndrome)である。旧世界ハンタウイルスはウイルス株の違いにより病原性が異なり、Puumala ウイルスは最も病原性が弱く死亡率は 1%未満、Hantaan ウイルス

は 5-15%程度とされている。

ウイルス感染の発症病理を解明する際に動物を用いた感染モデルは非常に有用であるが、旧世界ハンタウイルスに関してはその報告はそれほど多くはなく、以下にこれまでのマウスを対象としてハンタウイルスを実験的に感染させた代表的な研究報告を総括してみる。

Tsai ら(1982)は乳呑みマウスがハンタウイルスに脳内接種経路で感受性を有していることを初めて明らかにした。

Kurata ら(1983)は生後 2-4 日の ICR マウスに Hantaanvirus 76-118 を脳内(20 μ l)あるいは腹腔内(30 μ l)接種し、LD₅₀ならびに ID₅₀ 値、血清抗体の変動、組織内ウイルス量、凍結切片を使用したウイルス抗原の局在の解析を行った。接種後の症状として、バサバサとした毛、うずくまり、興奮、嗜眠、昏睡、痙攣等が認められている。脳内接種した 38 匹と腹腔内接種した 17 匹のウイルス抗原陽性細胞はどちらでも全身の血管内皮細胞に感染が認められている。脳、肺、心、肝、腎にはコンスタントに感染細胞が検出され、脾、下垂体、脂肪織、胸腺、唾液腺、膵、副腎、リンパ節、横紋筋、消化管にも陽性細胞が認められている。脳内ならびに腹腔内接種後のウイルス感染細胞の局在は脳以外では差がなかった。脳内接種したマウスでは脈絡叢、脳室上衣細胞、海馬、髄膜、基底核がコンスタントに、ついで、視床、橋、小脳、三叉・後根神経節が陽性であり、一方、腹腔内接種では大脳皮質と視床がコンスタントに陽性で脈絡叢は陰性であった。肝では主として肝細胞、Kupffer 細胞、内皮細胞が陽性であった。腎では髄質の間質の血管内皮が陽性であり、ときに尿管上皮にもウイルス抗原が検出されている。これらのウイルス抗原陽性部位の組織学的変化としては、脳では鬱血と小さな壊死巣、グリア増殖、稀に出血がみられ、血管周囲とくも膜下腔の炎症性細胞浸潤も認められている。心では間質性

心筋炎の組織像が、肝では Glisson 鞘の細胞浸潤、肺では鬱血、浮腫が見られている。腎の変化も鬱血と出血であった。

Yamanouchi ら(1984)は Hantaan virus 76-118 株と B-1 株を乳呑みマウスと乳呑みラットに脳内ならびに腹腔内接種し、感受性、抗体価、ウイルス分離を比較した。ウイルス分離は 76-118 株は脳と肺から、B-1 株は脳、肺、心、腎、脾、肝より分離され、とくに脳、肺、脾のウイルス量が多い結果を得ている。間接蛍光抗体法を用いて感染細胞をウイルス病理学的に解析しているが、それでは中枢神経組織では神経細胞、膠細胞、血管内皮細胞、神経節では外套細胞と Schwann 細胞、神経節細胞、腎糸球体ではメサンギウム細胞、尿細管上皮、髄質の間質細胞、脾では Langerhans 島細胞と腺房細胞、肺では肺胞細胞と間質細胞、肝では Kupffer 細胞と血管内皮細胞がウイルス抗原に陽性となっている。肝細胞は陰性であった。

Kim と Mackee (1985)は乳呑み ICR マウスに Hantaan virus 76-118 株を脳内、腹腔内、筋肉内、皮下の 4 種類のルートで接種し、LD₅₀ を PFU 値として比較した。脳内接種が最も少量であり、今回の研究では皮下接種で行っているが Kim らのデータでは LD₅₀ は 6.6×10^2 であった。次にマウスの年齢による感受性を 10 LD₅₀ (830 x 0.02)量を脳内接種したマウスで死亡率で解析しているが、それでは生後 3 日以内は 100% の死亡率を示し、徐々に減少し、生後 5 日では 50%、10 日では 40%と感受性が低下している。接種後の臨床症状として、体重減少、ぼさぼさとした毛の状態、運動量の減少、下肢の麻痺等が出現し、接種後 16-17 日で死亡している。皮下接種の場合は臨床経過が 2-3 日遅れて出現している。接種後生存したマウスは 30 日前後で回復している。皮下接種した群のマウスのウイルス血症は 7 日—16 日まで認められ、最高値は 8-10 日で 10^5 PFU/ml を越えている。蛍光抗体

法で検出できる血清抗体は接種後 12-15 日以降に陽性となり、中和抗体はさらに数日遅れて出現している。マウスのストレインの違いによる感受性も同時に検討しているが SJL, A/J は抵抗性であり、C3H, C57Bl, DBA, SWR, BALB/c の inbred strains はほぼ同様の感受性を示していた。この研究の病理組織学的解析は McKee らによりまとめられている。

Wichmann らは C57Bl/6, BALB/c, AKR/J, SJL/J の成熟マウス、さらに IFN- α/β receptor のノックアウトマウス(IFNAR-1^{-/-})に Hantaan virus 76-118 株を接種した。C57Bl/6, BALB/c, AKR/J, SJL/J の成熟マウスのこのウイルスの腹腔内接種に対する感受性解析では接種後 5-6 日で体重減少、活動量の低下、バサバサとした毛の状態となり、神経症状出現後 24-36 時間後に死亡している。マウスのストレイン解析では C57Bl/6 が最も感受性をしめし、このストレインで行った LD₅₀ の検討では 60 PFU であり、これ以後の解析は 100 LD₅₀ で接種している。次に IFNAR-1^{-/-}に 100 LD₅₀ のウイルスを腹腔内接種したところ、接種後 4 日で体重減少が認められ、24-36 時間後に死亡している。次に、これらの感染マウス内のウイルスの局在を RT-PCR によるゲノム検出、組織学、免疫組織化学、in situ ハイブリダイゼーション(ISH)により検討している。ウイルスゲノムは脳、肺、肝、腎、脾に検出され全身性感染であることが確認された。組織学的には脳では血管炎、血管周囲の浸出と細胞浸潤、ときに神経細胞の細胞質の好酸性変性と核破壊がみられた。これらの所見よりこれらの成熟マウスはウイルス性脳炎により致死性的転帰を示したと判断している。肝には小葉中心性の壊死と Glisson 鞘内の細胞浸潤、脾には白脾髄の肥大が見られているが、腎と肺には変化が見出されていない。ISH ではウイルスゲノムは神経細胞に検出されている。

Lokugamage ら(in prep)は本研究のマウスの接

種後の経過ならびに脳、肺、腎組織内のウイルス量、抗体価を解析している。1FFU を接種した新生児マウスにおいて H5 と B78 はほぼ同じ病原性を示し、接種後 15-17 日で 100% 致死性転帰を示す。Bao 14 は接種後 21 日前後で 100% 死亡した。Hantaan virus 76-118 接種マウスは 50% の死亡率で接種後 22 日以降に死亡している。ウイルス定量の解析では、Hantaan virus 76-118 を接種したマウスでは肺からのみウイルスが 10^7 オーダーで分離されるが、脳ならびに腎内のウイルス量は少ない。一方、Bao 14、H5、B78 株を接種したマウスでは脳内のウイルス量が接種後 14 日で最も多く、 10^{9-11} オーダーに達している。

以上のマウスを用いた実験の解析結果は報告によりその所見にかなりの差が存在しているが、共通しているのはマウスにおいてはウイルスはどのルートで接種しても脳炎を引き起こし、この脳炎により致死性状態になっている。私たちの今年度の研究結果でもほぼ同様の所見であり、マウス実験的感染は直接脳内に接種しなくても脳炎を引き起こし、この程度によりマウスの予後が決定されると考えてよい。

ハンタウイルスの感染は主として血管内皮に感染し、毛細血管内腔の拡張、浮腫を伴う。これらの変化は血管内皮の機能障害に応じて生じると考えられている。しかし、実際に致死性状態に近い接種後 14 日のマウスの中枢神経組織を観察するとウイルス抗原は主として灰白質に局在し、白室には殆ど認められない。しかし、今回の免疫組織学的検索がホルマリン固定パラフィン切片で行ったものであり、Kurata らの 1984 年の報告が凍結切片を使用しているため、この両者の結果を単純に比較することはできない。今回の解析でも血管内皮細胞の細胞質にウイルス抗原を検出しているが、実質細胞内のウイルス抗原はそれよりも遥かに強く陽性となっていた。血管内皮よりも強く陽性となった細胞は、神経細胞、肝細胞、

心筋細胞、尿管上皮細胞等であった。血管内皮細胞の陽性所見は感染後 7 日目でも認められるのに対し、これらの実質細胞はより後期に陽性となることを考慮すると、皮下接種後、全身の血管内皮細胞に感染する時期があり、それから内皮細胞下の実質細胞に感染し、この実質細胞の障害の程度により臨床症状が発生すると考えるのが妥当と思われる。

マウスと人体のハンタウイルス感染の病理増はこれらの報告からすれば明らかに異なっているが、唯一 Far East genotype の B 14 株の接種で尿管上皮細胞が陽性となっており、この株による腎障害をさらに検討することにより、腎障害マウスモデルの開発の可能性の余地がある。しかし、この株も神経病原性が強く、この神経病原性が attenuation される必要がある。

E. 結論

生後 1 日以内の BALB/c マウスに 4 種類のハンタウイルス株を接種し、マウスにおいてはいずれの株も主として神経病原性が主たる病原性であることをウイルス病理学的に明らかにした。また、この過程でホルマリン固定パラフィン標本上でハンタウイルス抗原の検出系を確立した。

引用文献

1. Groen J, Gerding M, Koeman J, Roholl P, van Aerogen G, Jordans H, Niesters H, Osterhaus A. A macaque model for hantavirus. *J Infect Dis.* 172: 38-44, 1995
2. Kim GR, McKee KT. Pathogenesis of Hantaan virus infection in suckling mice: Clinical, virologic, and serologic observations. *Am J Trop Med Hyg.* 342: 388-95, 1985
3. Klingstrom J, Plyusnin A, Vaheri A, Lundkvist A. Wild-type Puumala hantavirus infection induces cytokines, C-reactive protein, creatine, and nitric oxide in cynomolgus macaques. *J Virol* 76: 444-9, 2002
4. Kurata T, Tsai TF, Bauer SP, McCormick JB. Immunofluorescence studies of disseminated Hantaan virus infection of suckling mice. *Infect Immun* 41: 391-8, 1983
5. Lee HW, Lee PW, Johnson KM. Isolation of the

- etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 137: 298-308, 1978
6. Lokugamage K, Kariwa H, Lokugamage N, Iwasa M, Hagiya T, Araki K, Tachi A, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Iwasaki T, Takashima I. Comparison of virulence among various hantaviruses related with hemorrhagic fever with renal syndrome in newborn mouse mode. (in prep)
 7. McKee KT, Kim GR, Green DE, Peters CJ. Hantaan virus infection in suckling mice: Virologic and pathologic correlates. *J Med Virol* 17: 107-117, 1985
 8. Tsai TF, Bauer SP, McCormick JB, Kurata T. Intracerebral inoculation of suckling mice with Hantaan virus. *Lancet* i: 503-4, 1982
 9. Ulrich R, Lundkvist A, Meisel H, Loletzki D, Sjoelander KB, Gelderblom HR, Borisova G, Schnitzler P, Darai G, Krueger DH. Chi maeric HBV core particles carrying a defined segment of Puumala hantavirus nucleocapsid protein evoke protective immunity in an animal model. *Vaccine* 16: 272-280, 1998
 10. Wichmann D, Groene HJ, Frese M Pavlovic J, Anheier B, Haller O, Klenk HD, Feldmann H. Hantaan virus infection causes an acute neurological disease that is fatal in adult laboratory mice. *J Virol* 76: 8890-9, 2002
 11. Yamanouchi T, Domae K, Tanishita O, Takahashi Y, Yamaniishi K, Takahashi M, Kurata T. Experimental infection in newborn mice and rats by hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus. *Microbiol Immunol* 28: 1345-53, 1984
- F. 健康危機情報
なし
- G. 研究発表
論文発表
1. Inoue S, Sato Y, Hasegawa H, Noguchi A, Yamada A, Kurata T, Iwasaki T. Cross-reactive antigenicity of nucleoproteins of lyssaviruses recognized by a monospecific anti-rabies virus nucleoprotein antiserum on paraffin sections of formalin-fixed tissues. *Pathology International* 53:525-33, 2003.
 2. Yoshikawa T, Goshima F, Akimoto S, Ozaki T, Iwasaki T, Kurata T, Asano Y, Nishiyama Y. Human herpesvirus 6 infection of human epidermal cell line: Pathogenesis of skin manifestations. *J Med Virol* 71: 62-68, 2003
 3. Hayasaka D, Yoshii K, Ueki T, Iwasaki T, Takashima I. Sub-genomic replicons of tick-borne encephalitis virus. *Arch Virol* (in press)
 4. Iwasaki T, Inoue S, Tanaka K, Sato Y, Morikawa S, Hayasaka D, Moriyama M, Ono T, Kanai S, Yamada A, Kurata T. Characterization of Oita virus 296/1972 isolated from a horseshoe bat as a new genus of Rhabdoviridae. *Arch Virol* (in press)
- G. 知的所有権の取得状況
なし

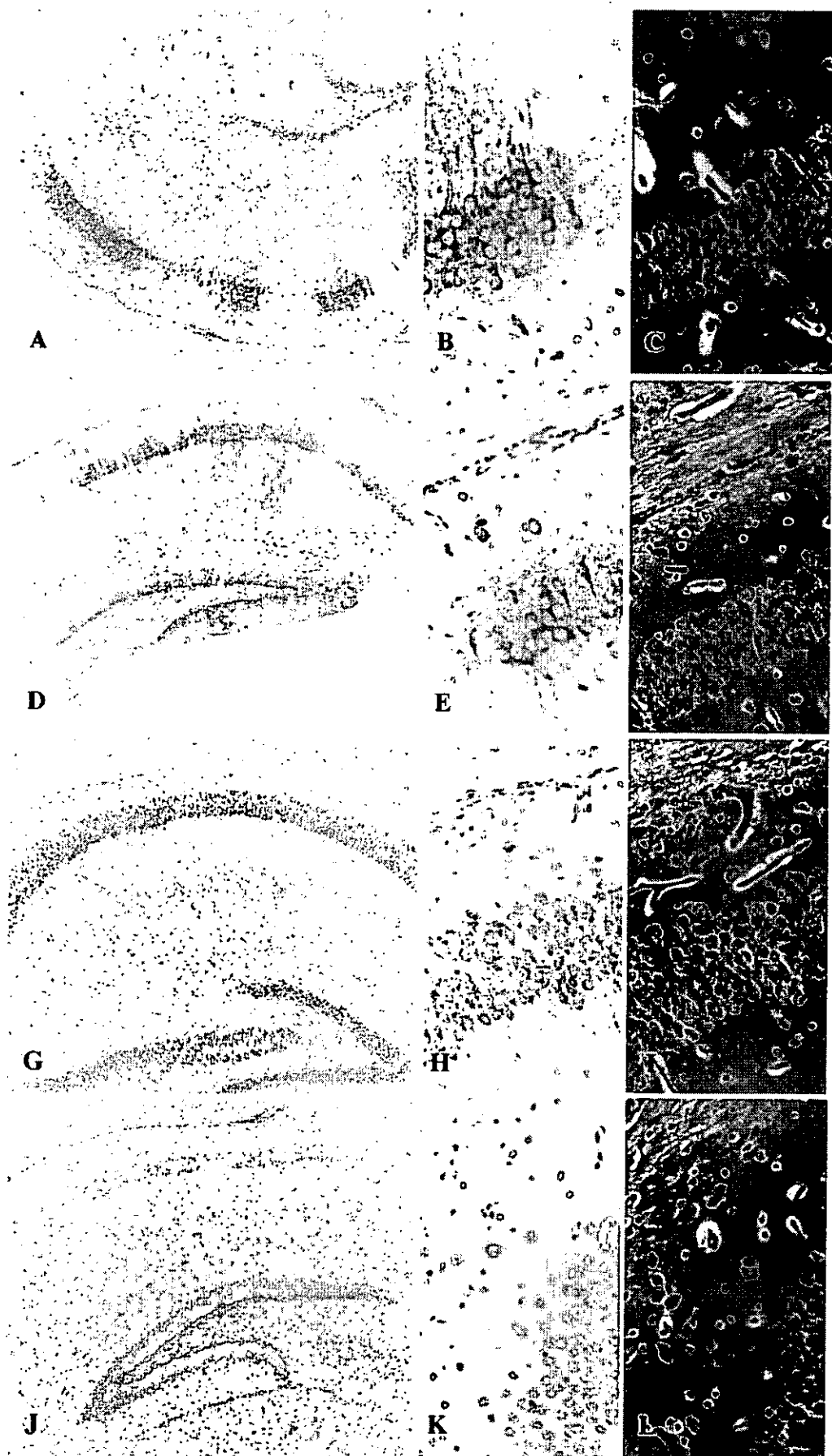


Figure 1. Limbic system of the mouse brain on day 14 post-inoculation. A-C: H5; D-F: B78; G-I: Bao 14; and J-L: HTN. A,B, D,E, G, H, J, K: Immunohistochemistry using anti-nucleoprotein of hantavirus. C, F, I, L: HE.

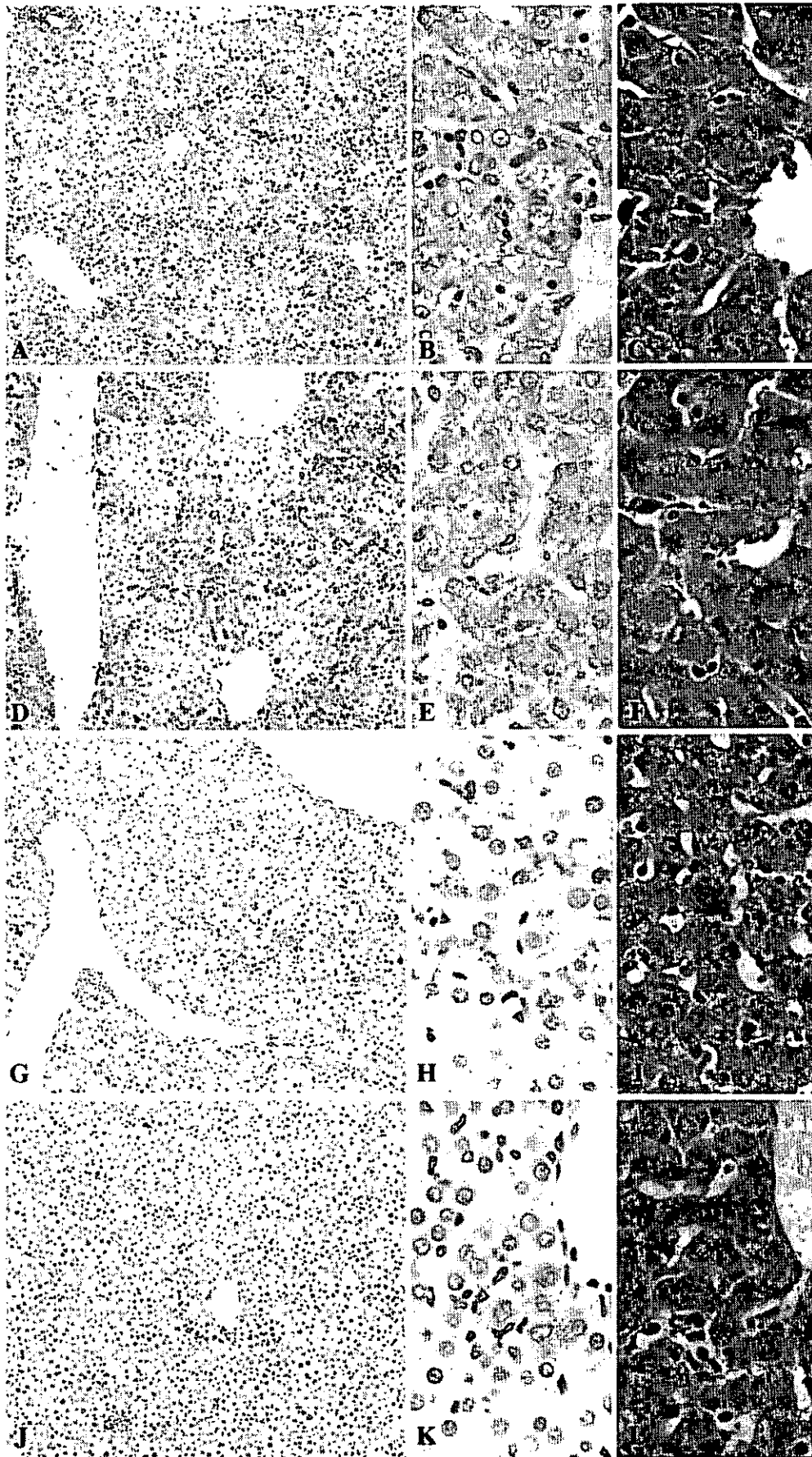


Figure 2. Liver of mice on day 14 post-inoculation.
 A-C: H5; D-F: B78; G-I: Bao 14; and J-L: HTN. A,B, D,E, G, H, J, K:
 Immunohistochemistry using anti-nucleoprotein of hantavirus. C, F, I, L: HE.

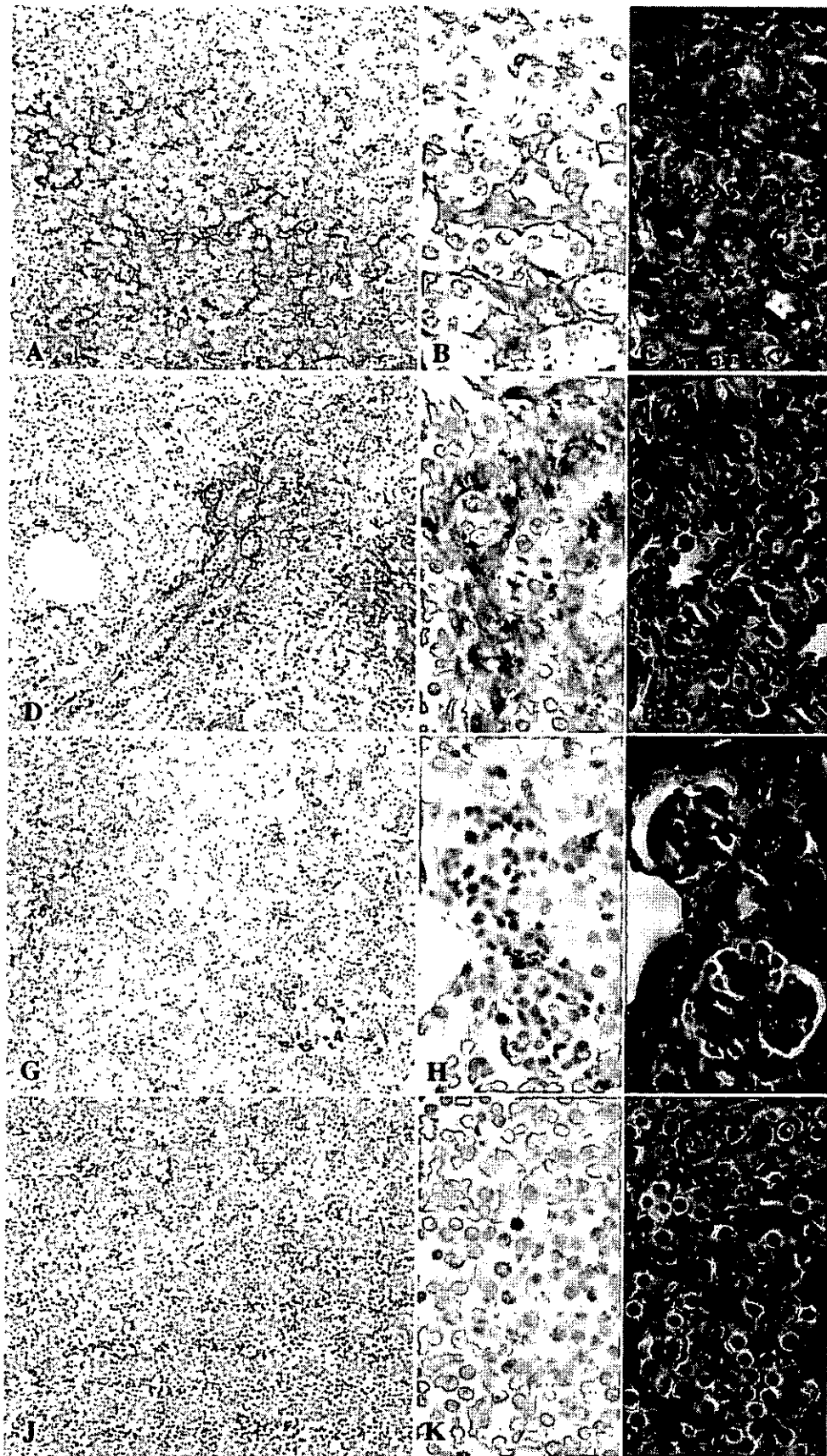


Figure 3. Mouse kidneys on day 14 post-inoculation.
 A-C: H5; D-F: B78; G-I: Bao 14; and J-L: HTN. A,B, D,E, G, H, J & K:
 Immunohistochemistry using anti-nucleoprotein of hantavirus. C, F, I & L: HE.

野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症の予防、診断及び疫学に関する研究

ハンタウイルス感染症の疫学的研究

分担研究者 荻和 宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 助教授

研究要旨

ハンタウイルスはげっ歯類を病原巣動物として自然界に分布し、人が感染すると腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)などの重篤な疾病を引き起こす。2000年の8月に極東ロシアのハバロフスクでHFRSと診断された患者の血液材料を入手し、ハンタウイルスの抗体検索とウイルス遺伝子の検出を行った。49例のHFRS患者血清のうち急性期血清の全例(17/17)および回復期血清の31例(31/32)からハンタウイルス抗体が検出された。次に急性期患者の血液からRNAを抽出し、ウイルスのM遺伝子をRT-PCRで検出したところ、3例からFar East型のハンタウイルスが検出された。2004年8月に極東ロシアのハバロフスク近郊でげっ歯類の捕獲調査を行い、ハンタウイルスの抗体検査を実施した。捕獲された102匹のげっ歯類のうち、5例のセスジネズミ(5/46)と7例のタイリクヤチネズミ(7/39)が抗体を保有していた。これらの抗体陽性のセスジネズミからRT-PCRによりウイルスのM遺伝子の検出を試みたところ、7例全例のハントウアカネズミがPCR陽性となった。増幅された遺伝子の塩基配列を決定したところ、2000年のハバロフスクで得られたHFRS患者のウイルス遺伝子と97%以上の高い一致率を示した。したがって、極東ロシアではセスジネズミによってFar East型のハンタウイルスが媒介され、HFRSを引き起こしていることが判明した。また、Far East型は既知のハンタウイルスのとの比較でHantaan型に90%と最も高い一致率を示した。極東ロシアではハントウアカネズミによって保有されるAmur型のウイルスもHFRSの原因になることを昨年度の報告で紹介した。しかし、Far East型はAmur型とは82%の一致率しか示さず、Amur型よりもHantaan型により近いことが明らかになった。

A. 研究目的

腎症候性出血熱(HFRS)は、ハンタウイルスによって引き起こされるウイルス性

人獣共通感染症である。本症は世界中に分布しており、臨床的には高熱、出血症候と

腎機能障害を主徴とする重篤な疾患である。本ウイルスの病原巣動物は野生げっ歯類であり、現在有効なワクチンが存在しないことから、疫学的情報を得ることが本症の予防対策や公衆衛生の向上のために重要となる。本研究では、極東ロシアのハバロフスクで HFRS と臨床的に診断された患者とハバロフスク近郊で捕獲されたげっ歯類を調査対象にしてハンタウイルス抗体調査を行うとともに、患者とげっ歯類の材料からウイルス遺伝子を検出して塩基配列を決定し、極東ロシアで流行中の HFRS 関連ウイルスの生態を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

1. HFRS 患者被検血清

2000 年に極東ロシアのハバロフスクで HFRS と臨床的に診断された 17 例の急性期患者血清と 32 例の回復期血清を用いた。

2. げっ歯類の疫学調査

2002 年の 8 月、ハバロフスクの近郊でげっ歯類の疫学調査を実施した。この際捕獲された 102 例のげっ歯類から採取された血清につき、蛍光抗体法 (IFA) によりハンタウイルス抗体を測定した。

3. IFA

ハンタウイルス感染 VeroE6 細胞を抗原として使い、げっ歯類の血清を反応させた後、FITC 標識 protein G で染色してハンタウイルスの細胞質内抗原が検出される血清の最高希釈倍数の逆数を IFA 抗体価とした。

4. 遺伝子増幅法 (PCR) によるウイルス遺伝子の検出

HFRS 患者の血液および IFA にて抗体陽性となったげっ歯類の肺を Isogen

(Nippon Gene) により乳化し、全 RNA を抽出した。ウイルスの M および S 遺伝子を標的として逆転写反応後、PCR を実施した。

5. ウイルス遺伝子の塩基配列の決定

HFRS 患者の血液から増幅された PCR 産物は pCR2.1 ベクター (Invitrogen) にクローニングし、PRISM Dye Sequencing Kit (Applied Biosystems) により塩基配列の決定を行った。また、げっ歯類からの PCR 産物についてはクローニングせずに、直接塩基配列を決定した。

C. 研究結果および考察

極東ロシアのハバロフスクで HFRS と診断された患者の血液材料を入手し、ハンタウイルスの抗体検索とウイルス遺伝子の検出を行った。急性期 17 例と回復期 32 例の合計 49 血清のうち急性期血清の全例および回復期血清の 31 例からハンタウイルス抗体が検出された。次に急性期患者の血液から RNA を抽出し、ウイルスの M 遺伝子を RT-PCR で検出したところ、3 例から Far East 型のハンタウイルスが検出された。Far East 型はすでに極東ロシアの重症型 HFRS 患者から遺伝子が検出されており、Hantaan 型とは遺伝子性状がやや異なることが知られていた。。しかし、Far East 型の病原巣動物は不明であった。そこで、Far East 型の病原巣動物を明らかにするために、2004 年 8 月極東ロシアのハバロフスク近郊でげっ歯類の捕獲調査を行い、ハンタウイルスの抗体検査を実施した。捕獲された 102 匹のげっ歯類のうち、5 例のセスジネズミ (5/46) が Hantaan 型の抗原に対して強く反応する抗体を保有し、7 例の