

学位論文題名

Development of the animal model resembling hantavirus infection in natural rodent hosts and isolation of hantavirus using a newly established cell line derived from a wild rodent species

(自然宿主でのハンタウイルス感染に類似した動物モデルの確立および新たに樹立した野生げっ歯類由来細胞を用いたハンタウイルスの分離)

学位論文内容の要旨

ハンタウイルスはネズミ目やトガリネズミ目などの小型哺乳動物を自然宿主としたウイルスで、人に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)といった重篤な疾患を引き起こす。ハンタウイルス感染症は世界各地において年間数万人もの患者が発生しており、公衆衛生学上重要な問題となっている。

ハンタウイルスはこれまで40種類以上ものウイルスが報告されており、それぞれが特有の種の小型哺乳動物において症状を示すことなく持続的に維持されている。しかし、ウイルスの分離が困難なことから一部のウイルスしか分離されておらず、ハンタウイルスの性状について明らかにされていない点が多い。また自然宿主における感染機構や感染様式はいまだ不明な点が多い。これらを解明することはハンタウイルス感染症の予防や人における病原性との違いを把握するうえで非常に重要な知見となる。そこで*in vivo*と*in vitro*においてハンタウイルスの感染様式を解明するための研究を行った。

まずは、自然宿主におけるハンタウイルス感染を模した動物モデルの構築を行った。ハンタウイルスは自然宿主である小型哺乳動物においては感染しても症状を示すことはなく長期間に渡って持続的な感染が成立する。しかし、現在、自然宿主におけるハンタウイルスの持続感染を解析できるような実験動物系がないために、いまだ本ウイルスが持続感染を起こすメカニズムは解明されていない。そこで自然宿主におけるハンタウイルス感染に類似した動物モデルの確立を試みた。

4週齢のシリアンハムスターにハンタウイルスに属するPuumalaウイルス (PUUV)を皮下接種し、実験感染させたところ、PUUVのウイルス遺伝子が肺で最も多く検出され、腎臓、脾臓、心臓、肝臓および脳の各種臓器からも検出された。またウイルス遺伝子量は感染後14日目がピークとなり、その後、中和抗体の誘導に伴い各種臓器でのウイルス遺伝子量は減少するものの、感染後70日までウイルス遺伝子が検出された。病理学的解析の結果、感染後14日目の個体の肺、腎臓、副腎および小脳においてウイルスの抗原が検出された。肺、副腎および小脳においてわずかな炎症反応がみられたもののその他臓器では顕著な病変はみられず、また体重減少や臨床症状もみられなかった。

中和抗体存在下にもかかわらず、持続的に感染するという特徴は自然宿主におけ

るハンタウイルスの感染様式と類似している。これまで新生動物や免疫不全動物を用いた持続感染モデルの報告はあったものの通常の実験動物を用いて本ウイルスの持続感染を再現した系はなく、PUUV感染ハムスターの系は、今後自然宿主におけるハンタウイルスの持続感染機構を解明するうえで有用なモデルになると考えられる。

続いてハンタウイルスの宿主となる野生げっ歯類より細胞株を樹立し、ハンタウイルス分離への応用を行った。従来、ハンタウイルスに関する*in vitro*での研究は主にアフリカミドリザルの腎臓に由来するVeroE6細胞を用いて行われてきた。しかし、VeroE6細胞中でのハンタウイルスの増殖は遅く、ウイルスの分離も非常に困難であった。そこで本研究では、ハンタウイルスの自然宿主であるエゾヤチネズミ(*Myodes rufocanus bedfordiae*)の腎臓より新たな培養細胞株を樹立した。さらに本細胞株を用いて、未だ分離されていないハンタウイルスの一種であるHokkaidoウイルス(HOKV)の分離を試みた。

エゾヤチネズミの腎臓細胞より、安定した性質を持つ培養細胞株を得ることに成功し、MRK101細胞と命名した。MRK101細胞の各種ハンタウイルスに対する感受性を解析した結果、*Myodes*属のげっ歯類を宿主とするPUUVに対して高い感受性を示した。一方で、*Apodemus*属を宿主とするHantaanウイルス感染に対してはほとんどフォーカスの形成は見られなかった。また本細胞株を用いることにより、エゾヤチネズミを宿主とするHOKVの分離に成功した。分離されたHOKVの遺伝子解析を行った結果、S、MおよびL遺伝子のいずれにおいてもHFRSの病原体であるPUUVと最も近縁で、アミノ酸配列の一致率はSでは94~96%、Mでは90~92%、Lでは95~96%であった。また系統樹解析においてもS、M、およびL遺伝子ともにHOKVはPUUVと最も近縁であった。さらに、分離されたHOKVをMRK101細胞およびVeroE6細胞に感染させたところ、HOKVはMRK101細胞でのみ増殖が見られ、VeroE6細胞での増殖は見られなかった。

以上の結果が示すようにMRK101細胞株を用いることでハンタウイルスの分離が容易になる可能性が示された。またHOKVは宿主であるエゾヤチネズミを由来とする細胞中では増殖するものの、VeroE6細胞中では増殖できないことが明らかとなったことから、HOKV以外でもVeroE6細胞での増殖性が低いために分離されていないハンタウイルスが多く存在する可能性が示唆された。

本研究において確立されたハンタウイルスの持続感染動物モデルや、自然宿主由来の細胞株、および本細胞株を用いて分離されたHOKVは、自然宿主におけるハンタウイルスの感染様式を解析するうえで非常に重要なツールとなると考えられる。今後これらを用いて、ハンタウイルスと宿主との相互作用が分子レベルで解明されることが期待される。

# 学位論文審査の要旨

主査	准教授	荻和宏明
副査	教授	大橋和彦
副査	教授	高田礼人
副査	講師	長谷部理絵

## 学位論文題名

### Development of the animal model resembling hantavirus infection in natural rodent hosts and isolation of hantavirus using a newly established cell line derived from a wild rodent species

(自然宿主でのハンタウイルス感染に類似した動物モデルの確立および新たに樹立した野生げっ歯類由来細胞を用いたハンタウイルスの分離)

ハンタウイルスはネズミ目やトガリネズミ目などの小型哺乳動物を自然宿主としたウイルスで、人に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)などの重篤なハンタウイルス感染症を引き起こす。世界各地において年間数万人ものハンタウイルス感染症の患者が発生しており、公衆衛生上重要な問題となっている。ハンタウイルスはこれまで40種類以上ものウイルスが報告されており、それぞれが特有の種の小型哺乳動物において症状を示すことなく持続的に維持されている。しかし、ウイルス分離が困難なことから一部のウイルスしか分離されておらず、ハンタウイルスの生物学的性状は明らかにされていない点が多い。また自然宿主におけるウイルスの持続感染機構はいまだ不明な点が多い。そこで *in vivo* と *in vitro* においてハンタウイルスの感染様式を解明するための実験系の構築を試みた。

4週齢のシリアンハムスターにハンタウイルスの一種であるPuumalaウイルス(PUUV)を皮下接種し、実験感染させたところ、ウイルス遺伝子は肺で最も多く検出され、腎臓、脾臓、心臓、肝臓および脳の各種臓器からも検出された。またウイルス遺伝子量は感染後14日目がピークとなり、その後、中和抗体の誘導に伴い各種臓器でのウイルス遺伝子量は減少するものの、感染後70日までウイルス遺伝子が検出された。病理学的解析の結果、感染後14日目の個体の肺、腎臓、副腎および小脳においてウイルス抗原が検出された。肺、副腎および小脳においてわずかな炎症反応がみられたものの他の臓器では顕著な病変はみられず、また体重減少や臨床症状もみられなかった。中和抗体存在下にもかかわらず、無症状で持続感染するという特徴は自然宿主におけるハンタウイルスの感染様式と類似している。これまで新生動物や免疫不全動物を用いた持続感染モデルの報告はあったものの、通常の実験動物を用いて本ウイルスの持続感染を再現した系はなく、PUUV感染ハムスターの系は、今後自然宿主におけるハンタウイルスの持続感染機構を解明するうえで有用なモデルになると考えられる。

エゾヤチネズミから得られた腎臓の細胞を継代培養し、培養細胞株の樹立を試み

たところ、100代以上継代しても安定した性質を持つ培養細胞株を得ることに成功した。本細胞株をMRK101細胞と命名し、各種ハンタウイルスに対する感受性を解析した結果、*Myodes*属のげっ歯類を宿主とするPUUVに対して高い感受性を示した。一方、*Apodemus*属を宿主とするHantaanウイルス感染に対してはほとんどフォーカスの形成が見られなかった。また本細胞株を用いることにより、エゾヤチネズミを宿主とするHokkaidoウイルス(HOKV)の分離に成功した。分離されたHOKVの遺伝子解析を行った結果、S、MおよびL遺伝子のいずれにおいてもHFRSの病原体であるPUUVと最も近縁で、アミノ酸配列の一致率はSでは94～96%、Mでは90～92%、Lでは95～96%であった。また系統樹解析においてもS、M、およびL遺伝子ともにHOKVはPUUVと最も近縁であった。さらに、分離されたHOKVをMRK101細胞およびVeroE6細胞に感染させたところ、HOKVはMRK101細胞でのみ増殖が見られ、VeroE6細胞での増殖は見られなかった。このように、MRK101細胞を用いることでハンタウイルスの分離が容易になる可能性のあることが示された。

本研究において確立されたハンタウイルスの持続感染動物モデルや、エゾヤチネズミ由来の細胞株であるMRK101細胞、および本細胞株を用いて分離されたHOKVは、自然宿主におけるハンタウイルスの感染様式を解析するうえで非常に重要なツールとなると考えられる。

以上の研究業績は、ハンタウイルス感染症の研究遂行上障害となっていた問題点を解決したものとして高く評価される。よって審査員一同は、上記博士論文提出者真田崇弘氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。