

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成22年度博士課程 入学

氏 名 谷口 怜

指導教員名 久和 茂

論文題目 Serological and epidemiological studies on zoonotic emerging infectious diseases in primates and bats in the Philippines

(フィリピンにおける翼手目及び霊長類の動物由来新興感染症に対する血清学的・疫学的研究)

医学やウイルス学の発展とともに、エボラ出血熱や、クリミアコンゴ出血熱(CCHF)、ラッサ熱といった致死性の新興感染症が数多く同定されたが、2011年に報告された重症熱性血小板減少症候群(SFTS)や、2012年に報告された中東呼吸器症候群(MERS)を初め、今日でも多くの新興感染症が出現している。これらの新興感染症の多くはウイルス感染症であり、その大部分は野生動物が宿主として保有しているウイルスが、偶発的にヒトに感染したことで生じる動物由来感染症である。ウイルス性動物由来新興感染症の中でも出血熱を伴う感染症は、ヒト及び動物に対し高い致死率を示すことが多く、これらの感染症の制圧は公衆衛生上極めて重要である。アジアには、出血熱を伴う動物由来ウイルス感染症の原因ウイルスとして、レストンウイルス(RESTV)、CCHF ウイルス(CCHFV)、腎症候性出血熱ウイルス(HFRSV)、そして SFTS ウイルス(SFTSV)が存在する。これらのウイルスのうち、RESTV 及び CCHFV は感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律により一種病原体等、HFRSV 及び SFTSV は三種病原体等に分類され、RESTV 及び CCHFV は BSL4 施設、HFRSV 及び SFTSV は指定された BSL3 施設でしか扱うことができない。日本には稼働している

BSL4 施設はなく、BSL3 施設も限られるため、これらのウイルスの研究は制限されている。

本研究では、RESTV 及び SFTSV に着目し、血清学的診断法の確立とそれを用いた血清学的な解析及び疫学的研究を行った。RESTV はフィロウイルス科に属し、過去に数回カニクイザルにおいて致死性のウイルス性出血熱の流行を引き起こしている。また、2008 年にはブタで RESTV 感染が確認されブタの輸出が禁止され畜産上でも大きな問題となった。RESTV が属するフィロウイルスの自然宿主は不明であるが、近年フィロウイルス科のマールブルグウイルス及びエボラウイルスでアフリカのオオコウモリより抗体及び遺伝子が検出され、コウモリが自然宿主であると考えられている。また、SFTSV は 2011 年に中国で初めて報告されたブニヤウイルス科に属するマダニ媒介性のウイルスであるが、疫学的な研究は開始されたばかりであり自然界での感染環、地理的な分布は不明である。

コウモリは哺乳類の中で唯一飛翔能力を持ち、げっ歯類に次いで種数が多く南極を除く全ての大陸に分布する。また、一部の種は数十万頭の巨大コロニーを形成する特性を持つ。近年、フィロウイルスだけではなく、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、SARS コロナウイルス、MERS コロナウイルスがコウモリを自然宿主としていることが報告されている。私はコウモリの特性、そして多くのウイルスの自然宿主であるという点に着目し、RESTV 及び SFTSV の血清学的な調査を行った。また、1996 年の RESTV によるサル施設でのウイルス性出血熱流行時のカニクイザル血清を用いて、終宿主と考えられるカニクイザルにおける免疫応答について解析を行った。

各章の要約は以下の通りである。

(第 1 章)

1996 年の RESTV によるサル施設でのウイルス性出血熱流行時のカニクイザルにおける免疫応答について解析した。バキュロウイルスタンパク発現系により昆虫細胞で発現、精製した RESTV の核蛋白(NP)及び膜糖蛋白(GP)を抗原とした IgG-ELISA と、RESTV の NP 及び GP を発現した哺乳類細胞を抗原とした間接蛍光抗体法(IFA)を作製した。さらに RESTV GP を外套したシュードタイプ水胞性口炎ウイルスを作製し、これを代替ウイルスとして用いた中和試験法を確立した。生ウイルスを用いず BSL2 施設で実施可能なこれらの RESTV の抗体検出系と、既に報告されている RESTV NP の抗原検出 ELISA (Ag-ELISA)を用いて、RESTV 感染カニクイザル 27 検体の血清の抗体応答を解析した。また、これらの血清中の各種サイトカイン、ケモカインの値を測定した。その結果、血清 27 検体中 10 検体で NP、GP 両方に対する抗体の上昇がみられ、これらの血清は中和抗体陽性、ウイルス抗原陰性であった。一方、GP 抗体陰性の検体は、中和抗体が陰性、ウイルス抗原陽性であったことから、GP 抗体の有無と中和抗体、血清中ウイルス抗原の有無には強い相関が認められた。一方、血清中のウイルス抗原の有無と NP 抗体の有無には相関は認められなかった。ウイルス抗原陰性、中和抗体陽性の検体では IFN- γ 、IL-8、IL-12、MIP-1 α の有意な上昇が認められた。GP 抗体の上昇が中和抗体の上昇と血清中のウイルス抗原の陰性化と相関したことが

ら、RESTV 自然感染カニクイザルにおいて、GP 抗体はウイルス排除に重要な免疫応答であることが明らかになった。ウイルス抗原陰性、中和抗体陽性検体において有意な上昇が認められたサイトカインは、RESTV 感染からの回復に重要な役割を果たすと考えられ、この結果はブンディブギョエボラウイルス感染症におけるヒトの回復期検体の報告とよく一致した。

(第2章)

アフリカでは、エボラウイルスやマールブルグウイルスの遺伝子や抗体がコウモリから検出されており、フィロウイルスの宿主動物はコウモリである可能性が示唆されている。そこで私は RESTV の自然宿主も同様にコウモリであると仮定した。第1章で作製した RESTV 特異的 IgG-ELISA、IFA を用い、2007 から 2011 年にフィリピンで捕獲された野生コウモリ 17 種、298 検体の RESTV 抗体保有状況を調査した。コウモリ血清中の抗体検出には、二次抗体として抗コウモリ IgG ウサギ免疫血清と、抗ウサギ IgG 標識抗体を用いた。また、東京大学農学部附属牧場で飼育されているデマレルーセットオオコウモリに、組換え RESTV GP 及び NP を免疫して陽性対照血清を作製した。フィリピンで捕獲されたコウモリ血清を対象に RESTV NP 及び GP 特異的 IgG ELISA を行った結果、ルーセットオオコウモリ属に属するジュフロアルーセットオオコウモリの血清 23 検体のうち、NP 特異的 IgG-ELISA で 5 検体、GP 特異的 IgG-ELISA で 5 検体が陽性を呈した。IgG-ELISA で NP 抗体、GP 抗体がともに陽性であった血清は 3 検体であった。これらのうち、NP 特異的 IgG-ELISA で高 OD 値を示した 2 検体と、GP 特異的 IgG-ELISA で高 OD 値を示した 1 検体は、IFA でも NP, GP に対して明瞭な抗体陽性反応を呈した。他のコウモリ種（16 種、275 検体）の血清は全て抗体陰性であった。マールブルグウイルスは、ルーセットオオコウモリ属（エジプトルーセットオオコウモリ）から検出されている。RESTV 抗体がフィリピンに分布するルーセットオオコウモリ属から検出されたことは、本コウモリが RESTV の自然宿主である可能性を示唆しており、今後遺伝子検出も含めた大規模な疫学的調査が必要であると考えられた。

(第3章)

SFTSV の流行地である中国では、SFTSV の感染環に動物（ヤギ、ヒツジ、ウシ、イヌ、ニワトリ等）とマダニが重要な役割を果たしている。SFTSV が、SFTF 患者の発生している中国、日本、韓国以外のアジア諸国に存在するのか、また、翼手目などがウイルスの感染環に含まれるか等は全く不明である。そこで私は、SFTSV のアジアにおける感染環の解明、翼手目における感染の有無を解明することを目的として、2007 年から 2013 年にフィリピンで捕獲した野生コウモリ 14 種、404 検体を対象に SFTSV に対する抗体保有状況を調査した。抗体検出法には、SFTSV 感染細胞ライセートを抗原とした IgG-ELISA と、ウイルス感染細胞を用いた IFA を作製した。また、SFTSV と同じフレボウイルス属に分類されるリフトバレー熱ウイルス(RVFX)感染細胞を抗原とした IFA も併せて行った。その結果、コイヌガオフルーツコウモリ、ジュフロアルーセットオオコウモリ、ビロードフルーツコウモリに IgG-ELISA 及び IFA で抗体陽

性の個体が確認された。これらの抗体陽性血清は、RVFV 感染細胞を抗原とした IFA では全て陰性を示した。これらの結果から、SFTSV あるいは SFTSV に類似したウイルスがフィリピンにも分布する可能性が示唆された。今後、フィリピンを含む東南アジアにおいてコウモリを含む種々の野生動物における SFTSV あるいは SFTS 様ウイルスの感染実態を解明していく必要があると考えられた。

以上のように、血清学的診断系を用いたアプローチで、第 1 章では終宿主であるカンクザルを対象に RESTV 自然感染時の免疫応答の解析、第 2 章では RESTV の自然宿主と考えられるコウモリを対象とした疫学的研究、第 3 章では SFTSV のアジアにおける感染環の解明、翼手目における感染の有無の解明を目的とした疫学調査を行った。エボラウイルスを実験感染させ免疫応答を解析した実験は多くなされているが、ヒト以外の霊長類における自然感染時の免疫応答を解析した報告はない。このため、第 1 章で行われた研究成果は今後への大きな知見になると考えられる。第 2 章ではコウモリを対象とした RESTV の疫学的研究から、ルーセットオオコウモリが RESTV の宿主動物である可能性を示唆する成果を得たが、他の研究者による調査により、中国のズタからも RESTV が検出され、中国及びバングラディッシュのルーセットオオコウモリから RESTV 抗体が検出されている。また、インドネシアのボルネオ島のオラウータンからもフィロウイルスに対する抗体が検出されている。RESTV の自然宿主はコウモリであると考えられたが、今後コウモリからの RESTV 遺伝子検出あるいは RESTV 分離がその証明には必要である。第 3 章では、フィリピンに SFTSV あるいはそれに近縁なウイルスが存在する可能性を示した。アメリカ大陸では SFTSV と近縁なハートランドウイルスが、インド、アフリカ及びヨーロッパではバンジャウイルスが分離されている。今後、東南アジアにおいて、SFTSV あるいはそれに近縁などのようなウイルスが存在するのかを解明するために、野生動物や家畜を対象としたウイルス遺伝子検出やウイルス分離が必要であると考えられる。その解明は、ヒトへのリスクを評価する上でも重要な知見となる。