

3. ダニ媒介性ウイルス感染症に対するコトシラットのモデル

動物としての有用性の検証

○渡 慧 (北海道立衛生研究所)

【研究目的】

エゾウイルス感染症は 2019 年に新規ダニ媒介性感染症として世界で初めて北海道から報告され、すでに北海道に定着している。治療法等の開発は喫緊の課題であるが、感染症モデル動物の樹立が大きな課題である。当所が保有するコトシラットは様々なウイルス感染症に高感受性であり、モデル動物となる可能性が高い。本研究では、コトシラットを用いたエゾウイルス感染症モデル動物の樹立を目的とする。

【研究の必要性】

エゾウイルスは 2019 年に北海道内の患者より発見された新規ダニ媒介性ウイルスであり、発熱、白血球減少、血小板減少などを主症状とするエゾウイルス感染症を引き起こす¹⁾。エゾウイルスは、自然界においてマダニと野生動物の間で感染環を形成しており、ヒトへの主な感染経路はウイルス保有マダニの刺咬である。エゾウイルス感染症に関する知見は十分ではなく、本症に対する特異的な治療法またはワクチンは存在しない。

北海道内における感染状況を把握するため、当所でエゾウイルス感染症の後方視的調査を行った。具体的には 2014 年から 2020 年までの間に、マダニ媒介性感染症を疑い、当所に行政検査の依頼があった北海道内の 250 症例からエゾウイルス遺伝子の検出を試みた。その結果、7 症例からエゾウイルス遺伝子が検出され、最も古い症例は 2014 年のものであった。また他の調査研究において、道内で採集されたマダニからエゾウイルス遺伝子が検出され、エゾシカなどの野生動物からエゾウイルスタンパク質に対する抗体が検出された¹⁾。以上のことからエゾウイルスは北海道内に定着しており、今後エゾウイルス感染者数が増加することが予想されることから、当所では行政検査検体を用いた前向き探索を実施している。

エゾウイルスに対する治療法やワクチンの開発を目的とした基礎研究を進める上で問題となるのが、多くのマウスに接種してもウイルスが増幅せず、臨床症状を示さないため、モデル動物が存在しない点である。この問題点を解決するためにコトシラットに着目した。コトシラットはインフルエンザなどの様々なウイルスに高感受性であり、多くのウイルス感染症の研究で用いられてきた実験動物である^{2, 3)}。当所はエゾウイルス研究に携わるかつコトシラットを有する日本で唯一の地方衛生研究所である。本研究ではコトシラットにエゾウイルスを接種し、病態を解析することでエゾウイルス感染症の新規モデル動物とし

ての有用性を評価し、今後の治療法やワクチン開発に貢献することを目的とする。

【研究計画】

患者血清から分離・増幅させたエゾウイルスをコトナラットに腹腔内接種した（ウイルス接種群：陰性対照群＝6匹：4匹）。陰性対照群にはエゾウイルスを増幅させるために用いた細胞の培養上清を接種した。臨床症状として体重の増減、血液生化学性状（白血球数・血小板数など）を精査した。採血は経時的に行い（ウイルス接種後経過日数：1, 2, 5, 7, 9, 14、図1）、ウイルス量の増減をリアルタイムPCRによって定量した。ウイルス接種および採血は麻酔を行い、実験者および実験動物の安全に十分考慮した上で実施した。

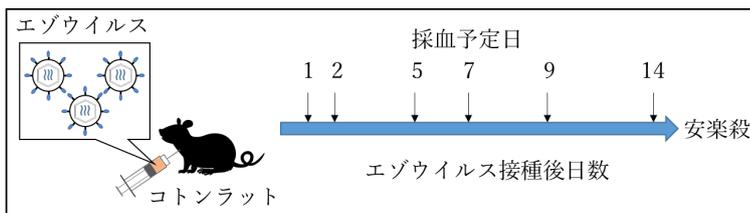


図1 エゾウイルスの接種計画

【実施内容・結果】

コトナラットに 2.4×10^5 FFU のエゾウイルスを $200 \mu\text{l}$ /匹で腹腔内に接種し、エゾウイルスを接種した日を Day0 とした。コトナラットが麻酔により動かなくなったのを確認した後、体重測定および採血を行った。麻酔はイソフルラン吸入麻酔薬を用いた。また採血はアニマルランセットを用いて行い、一度の採血で $20 \sim 200 \mu\text{l}$ の血液を得た。回収した血液は Celltac α （日本光電社）を用いて血液生化学性状を検査した。検査した項目は白血球数（WBC）、赤血球数（RBC）、血色素量（HGB）、ヘマトクリット（HCT）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）、平均赤血球血色素濃度（MCHC）および血小板数（PLT）である。Day0 での各項目の数値を 1 とし、経時的な変化量をグラフに示した（図2, 3）。血液生化学性状の検査を実施した後、残った血液から QIAamp Viral RNA Mini（QIAGEN 社）を用いて RNA 抽出した。接種後 14 日目にイソフルラン吸入麻酔薬の過剰投与により安楽殺した後に肝臓、脾臓および尿（一部のみ）を採材した。肝臓および脾臓はバイオマッシャー II を用いて乳剤を作製し、RNeasy® Mini（QIAGEN 社）により RNA を抽出した。尿は血液と同様に QIAamp Viral RNA Mini を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA は、エゾウイルス S 分節遺伝子を標的としたリアルタイム PCR により定量解析した。

体重

エゾウイルスを接種した群では 1 個体でのみ体重の減少が認められたが、5 個体では体重の変化なし、または緩やかな体重上昇が確認された。細胞の培養上清を接種した陰性対照群と比較したところ、有意な差は認められなかったが、エゾウイルスを接種した群の方が体重の上昇が抑制されている傾向が認められた（図 2a）。

血液生化学性状

エゾウイルス感染症に罹患したヒトの主症状は白血球減少および血小板減少であるため、WBCおよびPLTの変化を解析した。

WBC

ヒトのエゾウイルス感染症で確認されているWBCの減少は認められなかった(図2b)。接種後9日目にWBCの異常な上昇が全個体のうち半分で認められた(図2c)。

PLT

接種後1日目において、エゾウイルスを接種した6個体のうち、3個体において血小板の減少が認められた。さらに接種後2日目および5日目においても4個体で血小板の減少が認められ、接種後5日目が最も血小板が減少している個体が多かった。また陰性対照群では血小板の減少はいずれの日においても認められなかった(図2d)。

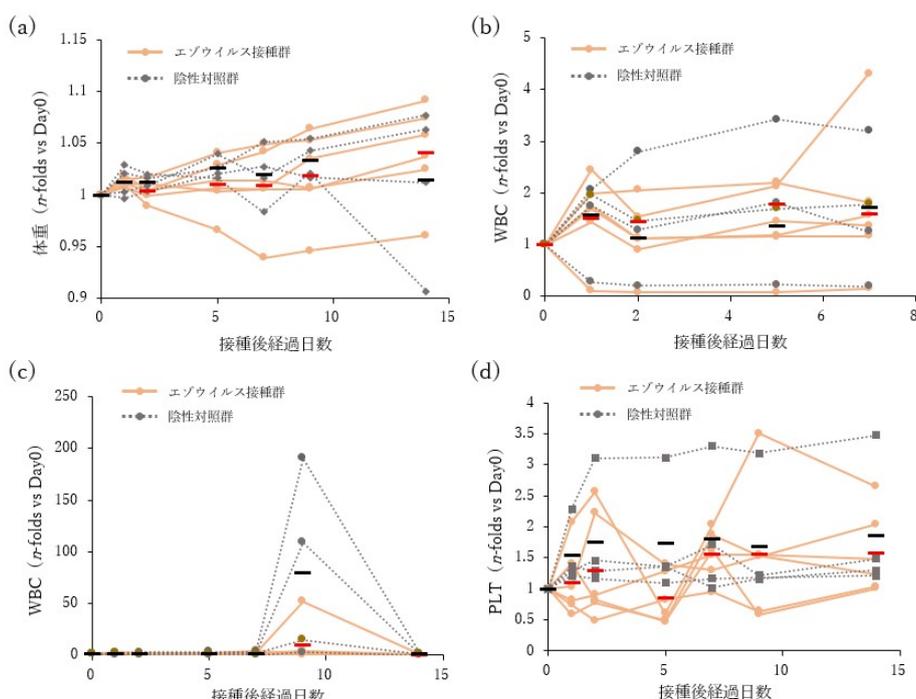


図2 エゾウイルス接種群および陰性対照群の体重、WBCおよびPLTの変化
エゾウイルスまたは細胞の培養上清をコトラットに接種し、接種後0、1、2、5、7、9、14における体重(a)、WBC(b)およびPLT(d)を測定した。(c) WBCの接種後0、1、2、5、7の結果を示した。Day0における各項目の数値を1として、経過日数による変化量をグラフに示した。赤いバーはエゾウイルス接種群、黒いバーは陰性対照群の平均を示した。

RBC、HGB、HCT、MCV、MCH、MCHC

エゾウイルス接種群および陰性対照群を比較したところ、観察した全期間において差は認められなかった。(図3)。

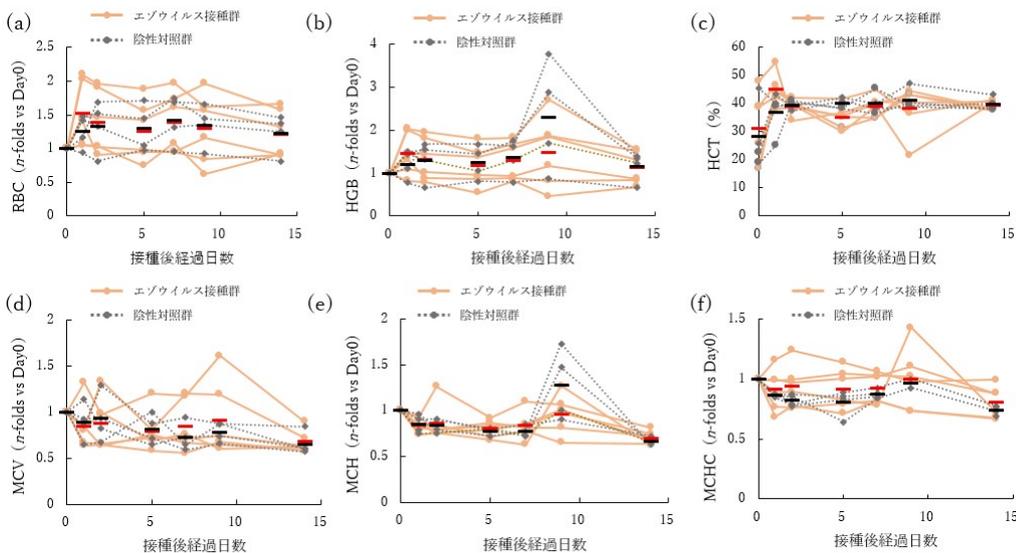


図3 エゾウイルス接種群および陰性対照群のRBC、HGB、HCT、MCV、MCH、MCHCの経時的変化
 エゾウイルスまたは細胞の培養上清をコトラットに接種し、接種後0、1、2、5、7、9、14における(a) RBC、
 (b) HGB、(c) HCT、(d) MCV、(e) MCHおよび(f) MCHCを測定した。Day0における各項目の数値を1として、
 経過日数による変化量をグラフに示した(a, b, d-f)。赤いバーはエゾウイルス接種群、黒いバーは陰性対照群の平均を示
 した。

ウイルス量

エゾウイルス接種群では接種後1日目から5個体において、接種後2日目においてはすべての個体でエゾウイルスS分節遺伝子を検出した。さらに検出された遺伝子量を接種後1日目と2日目と比較したところ、2日目で有意に上昇していることを確認した。接種後5日目では4個体においてエゾウイルスS分節遺伝子を検出したが、その量は2日目と比較して有意に減少していた。接種後7日目以降ではエゾウイルスS分節遺伝子は検出されなかった。また陰性対照群では全期間においてエゾウイルスS分節遺伝子は検出されなかった(図4)。接種後14日目に採材した肝臓、脾臓および尿でもエゾウイルスS分節遺伝子を検出した(資料未記載)。

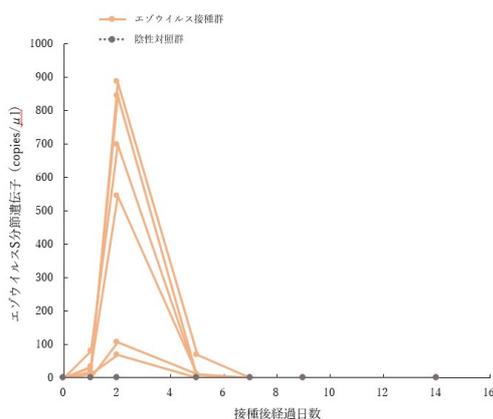


図4 エゾウイルス接種群および陰性対照群の血中に含まれるウイルス量の測定
 エゾウイルスまたは細胞の培養上清をコトラットに接種し、接種後0、1、2、5、7、9、14
 における血中に含まれるエゾウイルスS分節遺伝子をリアルタイムPCRにより測定し、定量解析した。

【考察と今後の課題】

コトラットへのエゾウイルス接種により体重増加の抑制、PLT減少、接種後1日目から接種後2日目にかけてウイルス遺伝子が増加し、接種後5日目で減少することが確認さ

れた。また安楽殺後に採材した肝臓、脾臓および尿でもエゾウイルスの遺伝子を検出した。RBC、HGB、HCT、MCV、MCH および MCHC はウイルス接種による差は認められなかったが、これはヒトのエゾウイルス感染症でも同様である。これら以上のことからコトナラットがエゾウイルスに感受性があり、モデル動物としての有用性が示唆された。

今回実施した感染実験ではデータにバラつきが多かった。その理由としては本研究で用いたコトナラットは自家繁殖し、系統維持している個体であるため、遺伝的多様性があると考えられる。今後は今回実施したウイルス接種試験をもう一度実施することでモデル動物としての有用性を再検証する。そのときには肝臓の指標となる AST および ALT なども測定する予定である。本研究では経時的な採血にアニマルランセットを用いたが、頬静脈に穿刺できずに採血量が極端に少ない日があった。より安定した採血を実施するために眼窩静脈叢からの採血も検討している。また本研究ではウイルス遺伝子を検出したが、感染性のあるウイルスが増幅しているかは不明である。このことを明らかにするため、接種後 2 日目または 3 日目の検体（血清、肝臓および脾臓）を用いてウイルス分離も実施する予定である。

【参考文献】

- 1) Kodama F, et al. A novel nairovirus associated with acute febrile illness in Hokkaido, Japan. Nat Commun 2021; 12: 5539.
- 2) Boukhvalova M, et al., Cotton rat model for testing vaccines and antivirals against respiratory syncytial virus. Antivir Chem Chemother 2018; 26: 2040206618770518.
- 3) Braun L, et al. Co-infection of the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) with *Staphylococcus aureus* and influenza A virus results in synergistic disease. Microb Pathog. 2007; 43(5-6): 208-16.

【経費使途明細】

使 途	金 額
動物実験関連の消耗品 (注射針、タイベック、アニマルランセット、バリカン等)	100,584 円
消耗品 (グローブ、チューブ、マスク、オートクレーブバック等)	150,810 円
試薬 (0.5M EDTA、イソフルラン吸入麻酔液等)	44,426 円
振込手数料	4,180 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円