

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14600

研究課題名(和文)ハートランドウイルスの病態発現機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of pathogenesis of heartland banda virus in mice

研究代表者

藤井 ひかる (Fujii, Hikaru)

岡山理科大学・獣医学部・助教

研究者番号：10734444

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): I型インターフェロンノックアウトマウスにおけるハートランドウイルス(HRTV)の接種経路による感受性の違いを検証し、致死モデルおよび軽症モデルを作製した。またこれを用いて、HRTV感染時の重症個体と軽症個体における症状の発現の様子の違い、各臓器におけるウイルス量、血中サイトカイン・ケモカイン量等の違いについて経時的に解析を行い、病態の推移の詳細について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、新たなHRTVマウスモデルが作出された。また、本マウスモデルを使用して、HRTV感染時の重症個体と軽症個体において、血液検査、生化学的検査、各臓器におけるウイルス量、血中サイトカイン・ケモカイン量等病態の詳細について初めて解析がなされた。本研究結果は、HRTV感染時の病態発現機構の解明や重症化の指標、治療ターゲットの探索の一助になることが期待される。

研究成果の概要(英文): The susceptibility of heartland bandavirus (HRTV) to type I interferon knockout mice was examined, and a novel lethal HRTV infection model was established. In this study, the pathogenesis of survived mice and dead mice were compared following HRTV infection. The pathogenesis was compared based on the differences in clinical signs including hematology values and blood chemistry parameters, the levels of HRTV RNA in tissues, and the levels of cytokines and chemokines in blood of HRTV infected mice. This is the first study which analyzed chronological changes in pathology of HRTV in mice precisely.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ハートランドウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

重症熱性血小板減少症ウイルス (SFTSV) は、近年日本においてヒト、動物における感染例の報告が増加しているダニ媒介性のウイルスである。SFTSV と同じくブニヤウイルス目フェニウウイルス科フレボウイルス属に属するハートランドウイルス (HRTV) は、SFTSV とアミノ酸レベルで 60% 以上の相同性 (類似性では 75% 以上) を有し、ダニにより媒介される。SFTSV 及び HRTV がヒトに感染した際の症状についても類似点が多く、発熱、血小板減少、白血球減少、肝酵素レベルの上昇等が観察され、重症例では死亡する。また、SFTSV は野生動物のみならず、家畜や伴侶動物において高率に抗体を保有しており、HRTV についても野生動物において高率に抗体が保有されている。HRTV については動物 ヒト間での感染報告やヒト以外の動物における発症報告はないが、SFTSV については感染したイヌやネコからヒトへ感染したという報告や、ヒトのみならずイヌ、ネコ、チーターの発症疑い例が報告されている。更に、SFTSV や HRTV が属するブニヤウイルス属ではリアソートメントが報告されている。SFTSV が日本をはじめ東アジアに分布するのに対し、HRTV はアメリカ合衆国のみで報告されているが、HRTV が日本に輸入された際には、HRTV 自体の拡散のみならず、SFTSV との間でリアソータントを形成し、新たな人獣共通感染症として問題になる可能性がある。このようなリスクへの対策には、各々のウイルスの特性についての理解が不可欠である。SFTSV の病態については実験動物を用いて、感染後経時的なウイルス量や血球数、サイトカインレベルの変化等について詳細な研究がなされており、また I 型インターフェロン (IFN) 経路の SFTSV 増殖における重要性やウイルス因子の I 型 IFN 経路阻害メカニズムについても明らかになりつつある。一方、HRTV については、2016 年に病態モデルについて初めて報告されたが、詳細な病態やその発現機構の解析はなされていない。唯一、HRTV の非構造蛋白質を培養細胞において過剰発現した際に、I 型 IFN 経路を阻害することが HRTV 病態発現機構解析の報告として存在するが、SFTSV のそれとは異なる機構であり、また感染細胞や *in vivo* における解析はなされていない。即ち、HRTV の病態の詳細についての解析が求められる。

## 2. 研究の目的

HRTV 感染症はヒトにおける症例は 50 例程度であり、その病態や重症化のメカニズムの詳細については不明点が多い。本研究では、HRTV マウスモデルを用いて、重症化するマウスと生残するマウスにおいて、HRTV の病態を経時的に詳細に解析、比較することで、病態発現に重要な機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、ウイルス量やウイルス動態、サイトカインおよびケモカイン量の比較を通して、HRTV 感染時の重症化のメカニズムについて解明することを旨とする。

## 3. 研究の方法

### (1) IFNAR<sup>-/-</sup>マウスを用いた HRTV 致死モデルの作製

当初、HRTV を接種した際に、若齢では致死率が 0%、高齢では致死率が 20% 程度で体重が 15-35% 減少するモデルを作出していたことから、本系を用いて HRTV 病態発現機構の解析を行う予定であった。しかし、高齢マウスの個体数を確保することが困難であることが予想されたことから、若齢でも致死となるモデルの作製をまず試みた。HRTV を皮下接種、腹腔内接種、眼窩下接種し、症状と血中 HRTV RNA 量を指標に感受性の違いを検証した。また、HRTV 感受性が最も高かった腹腔内接種において、LD<sub>50</sub> 値を算出した。

### (2) HRTV 病態発現機構の解析

重症化マウスモデルとして、IFNAR<sup>-/-</sup>マウスへ HRTV を腹腔内接種した群を、生残マウスモデルとして、同マウスへ同量の HRTV を皮下接種した群を用意し、病態の比較解析を行った。コントロール群においては等量の培養液を腹腔内接種した。接種 1, 2, 3 日後に各種臓器 (脳、腋下リンパ節、肺、肝臓、脾臓、腎臓、胃、腸管、腸間膜リンパ節) 及び血液を採取し、定量的 RT-PCR による HRTV RNA 量の測定を行った。更に血液については、血液検査、生化学的査、サイトカイン及びケモカイン量の測定を行い、各種臓器については病理解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) マウスを用いた HRTV 致死モデルの作製

IFNAR<sup>-/-</sup>マウスにおける HRTV の接種経路による感受性の違いを検証した。HRTV を皮下接種、眼窩下接種、腹腔内接種したところ、いずれの接種経路においても体重減少が観察され、生存率は皮下接種群、眼窩下接種群、腹腔内接種群においてそれぞれ 100%、33%、0% であった。接種 2 日後の血中 HRTV RNA 量は腹腔内接種群、眼窩下接種群、皮下接種の順で高いことが示された。

また、HRTV 感受性が最も高かった腹腔内接種時の LD<sub>50</sub> 値を算出したところ、 $3.2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> となった。(第 2 回 SFTS 研究会・学術集会、第 67 回日本ウイルス学会学術集会、第 162 回日本獣医学会学術集会にて発表、Viruses submitted)

## (2)HRTV 病態発現機構の解析

### (2)-1：解剖所見

接種3日後にHRTV腹腔内接種群、HRTV皮下接種群、コントロール群において解剖所見を比較したところ、HRTV腹腔内接種群においては、腹水の貯留、肝臓に大理石紋様、脾臓の肥大化、腋窩リンパ節および腸間膜リンパ節の腫脹、腸管の脆弱化が観察された。一方、HRTV皮下接種群においては、腹水の貯留および腋窩リンパ節の腫脹のみが観察された。

### (2)-2：各種臓器におけるHRTV RNA量

HRTV腹腔内接種群においては、採取したいずれの臓器においてもHRTV RNAが検出され、特に脾臓、肝臓、腸間膜リンパ節においては高値を示した。HRTV皮下接種群においても、採取したいずれの臓器においてもHRTV RNAが検出され、特に腋窩リンパ節において高値を示した。

### (2)-3：血液検査

HRTV腹腔内接種群においては、接種1,2日後のリンパ球数がコントロール群と比較して有意に低下し、接種3日後の赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値がコントロール群と比較して有意に増加した。一方、HRTV皮下接種群においてはコントロール群と比較して血球数に有意な変化は観察されなかった。

### (2)-4：生化学的血液検査

HRTV腹腔内接種群においては接種2,3日後に、HRTV皮下接種群においては接種3日後にコントロール群と比較してアルブミン値の有意な低下が観察された。HRTV腹腔内接種群においては接種1-3日後に、HRTV皮下接種群においては接種3日後にコントロール群と比較してアルカリフォスファターゼ値の有意な低下が観察された。HRTV腹腔内接種群においては接種1-3日後に、HRTV皮下接種群においては接種3日後にコントロール群と比較してグルコース値の有意な低下が観察された。HRTV腹腔内接種群においては接種2,3日後に、HRTV皮下接種群においては接種3日後にコントロール群と比較してグロブリン値の有意な低下が観察された。

### (2)-5：血中サイトカイン・ケモカイン量

HRTV腹腔内接種群においては接種1,2日後にコントロール群およびHRTV皮下接種群と比較してCXCL1値が有意に上昇した。HRTV腹腔内接種群においては接種1,3日後にコントロール群およびHRTV皮下接種群と比較してTNF- $\alpha$ 値が有意に上昇した。HRTV腹腔内接種群においては接種1-3日後にコントロール群およびHRTV皮下接種群と比較してIFN- $\gamma$ 値が有意に上昇した。いずれの接種経路においても、IL-1 $\beta$ 値の上昇は観察されなかった。サイトカイン・ケモカインの誘導とHRTV病態の関連については現在解析中である。

以上の解析結果を第165回日本獣医学会学術集会、第69回日本ウイルス学会学術集会において発表予定であり、学術雑誌への投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井ひかる、吉河智城、谷口怜、福士秀悦、下島昌幸、山田壮一、谷英樹、宇田晶彦、前木孝洋、林昌宏、原田志津子、森川茂、西條政幸
2. 発表標題 接種経路の違いによるハートランドウイルスのI型インターフェロン受容体欠損マウスにおける病態の比較解析
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井ひかる、吉河智城、谷口怜、福士秀悦、下島昌幸、山田壮一、谷英樹、宇田晶彦、前木孝洋、林昌宏、原田志津子、森川茂、西條政幸
2. 発表標題 I型インターフェロン受容体欠損マウスにおけるハートランドウイルスの感受性解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井ひかる、谷英樹、谷口怜、福士秀悦、吉河智城、山田壮一、林昌宏、伊藤（高山）睦代、前木孝洋、黒須剛、下島昌幸、宇田晶彦、森川茂、西條政幸
2. 発表標題 I型インターフェロン受容体欠損マウスに対するSFTSウイルスおよびハートランドウイルスの感染感受性の比較
3. 学会等名 第2回SFTS研究会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井ひかる、谷英樹、谷口怜、吉河智城、福士秀悦、山田壮一、原田志津子、林昌宏、伊藤（高山）睦代、前木孝洋、黒須剛、下島昌幸、宇田晶彦、米納孝、中嶋希、古田要介、森川茂、西條政幸
2. 発表標題 ハートランドウイルス感染マウス致死モデルの作製とこれを用いたリバビリンおよびT-705の治療効果の検証
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井ひかる、谷英樹、江川和孝、谷口怜、吉河智城、林昌宏、伊藤睦代、前木孝洋、黒須剛、福士秀悦、下島昌幸、宇田晶彦、米納孝、中嶋希、古田要介、森川茂、西條政幸
2. 発表標題 in vitroおよびin vivoにおけるハートランドウイルス感染に対するリバビリンおよびファビピラビルの効果の検証
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井ひかる、谷 英樹、谷口怜、吉河智城、林 昌宏、伊藤（高山）睦代、前木孝洋、黒須 剛、福士秀悦、下島昌幸、宇田晶彦、米納 孝、中嶋 希、古田要介、森川 茂、西條政幸
2. 発表標題 SFTSVおよびHRTV感染に対するリバビリンおよびファビピラビルの抗ウイルス効果の比較
3. 学会等名 第1回日本SFTS研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉河智城、谷口怜、加藤博史、藤井ひかる、柴村美帆、渡辺俊平、稲垣拓也、杉元聡子、Supranee Phanthanawiboon、原田志津子、黒須剛、福士秀悦、下島昌幸、山田壮一、森川茂、西條政幸
2. 発表標題 SFTSV遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルスLC16m8株のSFTSマウスモデルを用いたワクチン効果の検証
3. 学会等名 第1回日本SFTS研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井ひかる、谷英樹、江川和孝、谷口怜、吉河智城、林昌宏、伊藤睦代、前木孝洋、黒須剛、福士秀悦、下島昌幸、宇田晶彦、森川茂、西條政幸
2. 発表標題 ハートランドウイルス感染における感受性動物モデルの検証
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井ひかる、谷英樹、江川和孝、谷口怜、吉河智城、林昌宏、伊藤睦代、前木孝洋、黒須剛、福土秀悦、下島昌幸、宇田晶彦、森川茂、西條政幸
2. 発表標題 Establishment of an animal model of Heartland virus infection and evaluation of the efficacy of ribavirin and T-705 in vitro and in vivo
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------