

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10595

研究課題名(和文) 熱帯性慢性腎臓病に関連する新規ハンタウイルス、ランカウイルスの解析

研究課題名(英文) Studies on novel orthohantavirus named Lanka virus relating to tropical chronic kidney disease

研究代表者

森松 組子(吉松組子)(Yoshimatsu, Kumiko)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：90220722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CKDは先進国では生活習慣に関連した疾病であるが、熱帯では背景となる疾病なく発症するCKDが問題となっていて熱帯腎症あるいはCKDuとも呼ばれる。これまでに、スリランカのCKDuにおいてハンタウイルス感染歴が危険因子であること、またげっ歯類が新規ハンタウイルスを保有することを報告してきた。本研究では鑑別診断法、遺伝子検出法を開発し検体へ応用した。その結果、2010以前からCKDu流行地においてランカウイルスの人への感染が起こっていたことが確認され、ランカウイルスの新規感染は軽症感冒様であることが示唆された。今後、ランカウイルスがどのようにCKDuの発症と関連するのかを明らかにする必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、低病原性のハンタウイルスが慢性疾患に関与することを示したことは、他に類例をみない発見である。さらに関連するウイルスはMus属を宿主とすることが確認された初めてのハンタウイルスである。宿主であるインドハツカネズミの生態とウイルスの排泄様式は、ヒトへの感染様式に大きな影響を与えていると考えられ、これを解明し感染の制御につなげることが、CKDuの問題の解決に有効であると考えられる。スリランカのみならず中米の熱帯腎症も重要な課題である。中米でも低病原性のハンタウイルスの存在が報告されている。熱帯のCKDu問題の解決を目指すことは社会的意義の高い課題である。

研究成果の概要(英文)：CKD is a lifestyle-related disease in developed countries, but in the tropics, CKD, which develops without background diseases, is an important public health problem and is also called tropical nephropathy or CKDu. We have previously reported that a hantavirus seropositivity is a risk factor in CKDu, Sri Lanka, and that rodents carry novel orthohantaviruses in CKDu endemic areas. In this study, a serotyping diagnosis method and a viral genome detection method were developed and applied to CKDu and febrile patients sera. As a result, it was confirmed that people were infected with Lanka virus in CKDu endemic areas before 2010, suggesting that acute Lanka virus infection causes mild flu-like clinical symptoms. In future, it is necessary to clarify how Lanka virus infections are associated with the development of CKDu.

研究分野：ウイルス学、病原微生物学、実験動物学

キーワード：慢性腎臓病 CKD 熱帯腎症 ハンタウイルス Thailand orthohantavirus Sri Lanka Mus booduga Lanka virus

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は2002年に米国腎臓財団によって提唱された概念である。先進国では成人人口の13%を占めるとされ、そのほとんどが糖尿病や高血圧等の生活習慣病を原疾患とする。一方で、このような原疾患を持たない原因不明のCKDがスリランカ、インドの一部、中南米から報告されており、CKDuと呼ばれている。スリランカのCKDuは1990年代後半から注目されるようになった疾患である。この疾患は健康な米作農家の労働年齢の男性に頻発し、明確な「流行地」を持つことが特徴である。慢性感染症ではあるものの、北部州の成年の一番の死亡原因との報告や診断後平均5年で死亡に至るとの報告もあり、従来のCKDの概念に当てはまらない「死に至る病」である。そのためCKDuはスリランカの国家的な問題となっている。これまでにいくつかの欧米・スリランカおよび日本の研究グループがスリランカのCKDuの原因を明らかにすることを試みてきた。その原因として、当初はヒ素やカドミウムなどの環境要因が疑われたが、京都大学医学部の研究グループの詳細な疫学調査により否定された。井水中のフッ素濃度の高い地域はCKDuの流行地とオーバーラップするため、継続してCKDuとの関連が疑われている。一方で飲料水中の高濃度フッ素汚染地でかつCKDu非流行地域が確認されていることから、フッ素単独ではCKDuの原因となるとは考えづらい。疫学的解析ではCKDuが健康な労働年齢の水田で労働する男性に頻発する。屋外労働は人獣共通感染症のリスクの1つである。近年申請者らは、CKDu患者の約半数が抗ハンタウイルス抗体陽性であることを見だし、ハンタウイルス感染症が慢性腎臓病の発症に関与していることを疫学的解析により示してきた。さらに、CKDuの流行地のげっ歯類からハンタウイルスを検出し、このウイルスが感染源となっている可能性をみいだした。これらの結果から以下の新たな課題が生じた。

- (1)人へ感染しているハンタウイルスの種類の特異とその急性期の病原性の有無
- (2)ハンタウイルス感染症の後遺症としてCKDuが発症するのか、ハンタウイルス感染がCKDuのステージの進展を加速するのかを解明

これらの疑問を解明するため、本課題では以下の研究が必要となった。

2. 研究の目的

本研究では、このスリランカ固有の新規ハンタウイルスであるランカウイルスおよびアンゾロベウイルスの抗原性および遺伝子を解析し、この情報を基礎に血清診断法、分子生物学的診断法を開発する。さらにこれらの診断法を用いて、ヒトおよびげっ歯類におけるこれらのウイルスの感染状況を解明する。

3. 研究の方法

ランカウイルスとアンゾロベウイルスの血清診断法による鑑別診断法を開発し、ランカウイルス感染か他のハンタウイルス感染かを区別する方法を開発する。ハンタウイルス外被糖タンパク(GP)の抗原性の解析から、ランカウイルスとアンゾロベウイルス、既知の関連ウイルスであるタイランドウイルスはGn領域が異なることが明らかとなった。この領域に着目し、2種類の鑑別診断法の確立を試みた。はじめに、pCAGGSプラスミドベクターにより組換えGPおよび組換えGnを発現させた。組換えGPを用いてシュードタイプ水泡性口内膜炎ウイルス(VSV)を作製し、中和試験を実施した。またGn領域の単独発現による蛍光抗体法(IFA)を実施した。ランカウイルスの宿主であるインドハツカネズミおよびアンゾロベウイルスの宿主であるクマネズミのうち、ゲノムが検出された個体由来の血清を陽性コントロールとして鑑別診断抗原の評価を実施した。陰性抗原としてはウイルスゲノム陰性、抗体陰性の個体を用いた。さらに確立した鑑別診断法により、CKDu患者および同一地域に居住するコントロールグループの保存血清のGP抗体保有状況を調べた。さらにGP抗体陽性例について罹患ウイルスを推測した。次にランカウイルス遺伝子検出法を開発した。これにより、高感度にランカウイルスを検出することが可能となった。さらに急性期熱性疾患患者の特異抗体およびウイルスゲノムの検出を実施した。CKDu流行地であるギラドゥルコッテおよびポロンナルワのRegional Hospitalにおいて2022年前期に各100名ずつの発熱患者血清を収集した。血清の一部はRNA Later試薬と1:1に混合し、遺伝子検出用に保存した。その後Qiagen Viral RNA mini kitを用いてRNAを抽出し、RivertraAce (Toyobo)によりランダムプライマーを用いてcDNAを合成し、Lゲノムセグメントの保存領域をターゲットとするPCRを実施した。PCR産物は磁気ビーズ(Toyobo)を用いて精製し、Minionとそのキットおよびデバイス一式(Nanopore Technologies)を用いて配列を決定した。血清はmu-capture ELISAによりIgM抗体の検出、IFAによるIgG抗体の検出および鑑別診断を実施した。

さらに陽性者の記録から、急性期患者における症状を明らかにすることを試みた。これらの研究はスリランカのペラデニア大学の倫理委員会の審査による承認を得て実施した。

4. 研究成果

本研究により、ランカウイルス血清鑑別診断法を樹立することができた。シュードタイプ VSV を用いた中和試験ではスリランカに共存するアンゾロベウイルス、タイに由来するタイランドウイルスとの鑑別は不可能であった。患者血清がタイランドウイルスを中和することはすでに確認・発表されていたため、この報告と一致する結果となった。しかしながら、エンペローブ蛋白の Gn 領域を用いたトランケート抗原の反応性の比較では、陽性コントロール血清は明瞭に特異的な反応性を示し、抗体価の比較により鑑別する方法が樹立できた。その結果、以下のような診断の流れが確立された。

- (1) 組み換え N 蛋白抗原および GP 抗原による抗体陽性 1:200 希釈によるスクリーニング
- (2) 組み換え Gn 抗原に対する抗体価の測定、2 倍階段希釈による
- (3) 抗体価の比較 ランカウイルス Gn: アンゾロベウイルス Gn の比率が 8 倍以上の場合に判定し、4 倍以内は判定不能とする。

これらの方法を用いて京都大学に 2016 年までに収集され保存されていた CKDu 患者血清および 2018 年以降にペラデニア大学で収集された血清を調べた結果、やはり CKDu 患者集団で有意に高い抗体陽性率が確認された。これらをさらに組換え GP 抗体の保有率を調べたところ、これまでに組換え N 蛋白抗原で得られた結果とほぼ一致することが明らかとなった。陽性率を検定したところ、CKDu 集団では明らかにハンタウイルス感染がリスクであることが確認された。さらに鑑別血清診断法により、陽性例の 85%でランカウイルス罹患が示唆された。残りは鑑別不能であり、アンゾロベウイルス感染の頻度は著しく低いことが示された。

また、スリランカの研究室において、L 分節遺伝子をターゲットする遺伝子検出およびシークエンス法も構築することができた。これを用いてポロンナルワの熱性疾患患者血清 99 検体中 2 検体よりランカウイルスゲノムが検出された。IgM 抗体陽性も 2 例のみであり、ゲノム陽性例と一致した。この 2 名は労働年齢の男性であり、発熱以外の症状はほとんどなく、1 名が吐き気を訴えたが、腎臓に関連する症状は認められなかった。このうち一名は回復期血清を得ることができた。解析の結果、IgM 抗体の低下、ウイルスゲノムの排除、IgG 抗体価の上昇が確認され、ランカウイルス感染の急性期であったことが確認された。ギランドウルコッテの熱性患者 100 名では IgM 抗体陽性およびウイルスゲノム陽性者は検出されなかった。また熱成果疾患の多くは COVID-19 によるものであったと考えられた。

以上の結果からランカウイルスは CKDu 流行地においてヒトに感染しうる低病原性のハンタウイルスであると考えられた。今後どのように CKDu の発症と関連するかを明らかにすることが重要な課題となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Muthusinghe Devinda S., Shimizu Kenta, Lokupathirage Sithumini M. W., Wei Zhouxing, Sarathkumara Yomani D., Fonseka G. R. Amanda, Senarathne Pavani, Koizumi Nobuo, Kawakami Tomonori, Koizumi Akio, Wickramasinghe Chaminda, Ebihara Hideki, Matsuno Keita, Tsuda Yoshimi, Arikawa Jiro, Gamage Chandika D., Yoshimatsu Kumiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification of Novel Rodent-Borne Orthohantaviruses in an Endemic Area of Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology (CKDu) in Sri Lanka	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1984 ~ 1984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13101984	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wei Zhouxing, Shimizu Kenta, Nishigami Kumpei, Tsuda Yoshimi, Sarathkumara Yomani, Muthusinghe Devinda S., Gamage Chandika D., Granathne Lishanta, Lokupathirage Sithumini M. W., Nanayakkara Nishanta, Arikawa Jiro, Kikuchi Fuka, Tanaka-Taya Keiko, Suzuki Motoi, Morikawa Shigeru, Arai Satoru, Yoshimatsu Kumiko	4. 巻 166
2. 論文標題 Serological methods for detection of infection with shrew-borne hantaviruses: Thottapalayam, Seewis, Altai, and Asama viruses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 275 ~ 280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-020-04873-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sarathkumara, Gamage, Lokupathirage, Muthusinghe, Nanayakkara, Gunarathne, Shimizu, Tsuda, Arikawa, Yoshimatsu	4. 巻 11
2. 論文標題 Exposure to Hantavirus is a Risk Factor Associated with Kidney Diseases in Sri Lanka: A Cross Sectional Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 700 ~ 700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v11080700	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Lokupathirage Sithumini M.W., Muthusinghe Devinda S., Shimizu Kenta, Nishigami Kumpei, Noda Kisho, Tsuda Yoshimi, Sarathkumara Yomani D., Gunawardana Sirimevan, Arikawa Jiro, Gamage Chandika D., Yoshimatsu Kumiko	4. 巻 19
2. 論文標題 Serological Evidence of Thailand Orthohantavirus or Antigenically Related Virus Infection Among Rodents in a Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology Endemic Area, Girandurukotte, Sri Lanka	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vector-Borne and Zoonotic Diseases	6. 最初と最後の頁 859 ~ 866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/vbz.2018.2429	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Gamage Chandika D., Nanayakkara Shanika, Sarathkumara Yomani D., Muthusinghe Devinda S., Shimizu Kenta, Arikawa Jiro, Lokupathirage Sithumini M. W., Nanayakkara Nishantha, Gunarathne Lishanthe, Chandrajith Rohana, Harada Kouji H., Koizumi Akio, Yoshimatsu Kumiko	4. 巻 71
2. 論文標題 Hantavirus infection as a risk factor for chronic kidney disease of unknown aetiology (CKDu) and its prevalence in endemic areas of Sri Lanka since 2010 according to a retrospective serological analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 1630 ~ 1630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmm.0.001630	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wei Zhouxing, Shimizu Kenta, Sarii Rakiiya S., Muthusinghe Devinda S., Lokupathirage Sithumini M. W., Nio-Kobayashi Junko, Yoshimatsu Kumiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Pathological Studies on Hantaan Virus-Infected Mice Simulating Severe Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2247 ~ 2247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14102247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Devinda S. Muthusinghe, Kenta Shimizu, Sithumini M. W. Lokupathirage, Yomani D. Sarathkumara, Hideki Ebihara, Keita Matsuno, Yoshimi Tsuda, Jiro Arikawa, Chandika D. Gamage, Kumiko Yoshimatsu
2. 発表標題 Identification of novel rodent-borne hantaviruses in an endemic area of chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu) in Sri Lanka
3. 学会等名 American Society for Virology (ASV) 39th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kumiko Yoshimatsu, Chandika D Gamage, Hideki Ebihara
2. 発表標題 Molecular biological analysis of hantavirus relating to chronic kidney disease by unknown etiology (CKDu) in Sri Lanka
3. 学会等名 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Muthusinghe Devinda S., Shimizu Kenta, Lokupathirage Sithumini M.W., Sarathkumara Yomani D., Ebihara Hideki, Tsuda Yoshimi, Arikawa Jiro, Gamage Chandika D., Yoshimatsu Kumiko
2. 発表標題 Identification of a novel Mus-borne hantavirus, Lanka virus, in endemic area of chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka.
3. 学会等名 The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
4. 発表年 2019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
研究分担者	清水 健太 (Shimizu Kenta) (20466840)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	津田 祥美 (Tsuda Yoshimi) (70447051)	北海道大学・医学研究院・講師 (10101)	

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