

Hantaan ウイルスを接種したラット及びマウスの血清抗体価と 2, 3 血清臨床生化学値の推移

新潟大学医学部附属動物実験施設

新村末雄・前田宜俊・加藤明子
藤沢信義・佐藤徳光

新潟大学医学部ウイルス学教室

浜田忠弥

Fluctuation of Serum Antibody and Some Clinical Biochemical Values in Hantaan Virus-inoculated Rats and Mice

Sueo NIIMURA, Yoshitaka MAEDA, Akiko KATO
Nobuyoshi FUJISAWA and Norimitsu L. SATO

*Facilities for Comparative Medicine and Animal Experimentation,
Niigata University School of Medicine, Ichibancho,
Asahimachi-dori, Niigata 951, Japan*

Chuya HAMADA

*Department of Virology, Niigata University School of Medicine,
Ichibancho, Asahimachidori, Niigata 951, Japan*

The fluctuation of serum antibody titers in Hantaan virus-inoculated rats (Wistar, male) and mice (ICR, female) was observed by the indirect immunofluorescent staining. The activities of serum GOT, GPT and LDH were also examined by the clinical biochemical assays.

Hantaan virus (strain: 76-118) was inoculated intraperitoneally to rats (1.6×10^5 – 1.6×10^6 VAIU) and mice (0.8×10^5 VAIU), and in both species it produced an asymptomatic infection. In the rats, high antibody titers ranging from 1: 512 to 1: 2048 were produced between 2 to 5 weeks after inoculation. The highest antibody titer was usually detected about 3 weeks after inoculation. The antibody titers decreased temporarily and were retained at low levels up to 10 weeks after inoculation. In some individuals, antibody titers increased again to 1: 2048 about 7 to 10 weeks after inoculation. The activities of serum GOT and GPT in almost the infected rats were values in normal range. However, the values of LDH were undoubtedly high far from the normal range. In the mice, the antibody

Reprint requests to: Yoshitaka Maeda,
Facilities for Comparative Medicine
and Animal Experimentation, Niigata
University School of Medicine, Niigata
City, 951 JAPAN

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部附属動物実験施設

前田宜俊

appeared as early as two weeks after inoculation. The highest antibody titers ranging from 1: 128 to 1: 2048 were detected about 4 weeks after inoculation. In some individuals, high antibody titers of 1: 2048 were observed at 8 to 10 weeks after inoculation. The activities of serum GOT, GPT and LDH were all in normal range.

Key words: Hantaan virus, Experimental inoculation of rats and mice, Serum antibody titer, GOT, GPT and LDH
ハンタアンウイルス, ラット・マウスにおける実験感染, 血清抗体価, GOT, GPT と LDH.

はじめに

腎症候性出血熱 (HFRS) はブンヤウイルス科に属する Hantaan virus に起因し, ゲツ菌類を介してヒトに伝播する人獣共通感染症である。わが国では特に実験用ラットの感染が問題となり, これまで本症の予防制圧に関しさまざまな努力がなされてきた^{2) 3) 13)}。その結果, いわゆる HFRS 患者の発生は激減し目下のところ 0 で推移している。しかし実験ラットの汚染が完全に排除されたとは未だ言い難い。われわれは実験ラットの検疫の一環として抗体検査を続けているが, 散発的に 1: 16~1: 64 程度の低い抗体価を経験する。この低抗体価の意味については研究者の見解が分かれ論議の多いところである。われわれは, 実験用ラットに直接 Hantaan virus を接種し抗体の産生と抗体価の推移を見ておくことは有益であろうと考え, 以下の実験を行った。また比較の意味で日常, 抗体陽性例が全く見い出せないマウスについても同様な接種実験を試みた。

材料と方法

供試動物として Wistar 系雄ラット (8~12週齢) 10 匹及び ICR 系雌マウス (7週齢) 55匹を使用した。ラットは 1 匹ずつ個別のケージで, マウスは 1 ケージ当り 11 匹を 1 グループとして飼育した。

使用したウイルスは Hantaan virus 76-118 株で A549 細胞で増殖させたものである。このウイルスをラットには $1.6 \times 10^5 \sim 1.6 \times 10^6$ VAIU (viral antigen inducing unit), マウスには 0.8×10^5 VAIU をそれぞれ腹腔内に投与した。なお, VAIU とは 37°C, 10 日間の試験管内ウイルス増殖試験で, A549 細胞を抗原陽性細胞 (蛍光抗体法による) にするウイルス量を表現したものである。ウイルス接種後, 各週ごとに 10 週まで, ラットでは尾静脈より部分採血し, マウスでは心臓より全採血し, 常法通り血清を分離した。血清中ウイルス抗体価の測定は Hantaan virus 76-118 株感染 A549

細胞のアセトン固定標本を用いた間接蛍光抗体法によって行った¹⁾。なお, 抗体価は特異蛍光が認められる血清の最終希釈倍率をもって表わした。

また, 得られた血清量に余裕のみられた場合, GOT, GPT および LDH の測定もあわせて行い参考に供した。GOT, GPT 及び LDH の測定は RaBA-ACE (中外製薬) を用いて行った。

結 果

あらかじめラット 4 匹に Hantaan virus 1.6×10^5 VAIU をそれぞれ腹腔内投与し各週ごとの血清抗体価を測定してみた。結果は Fig 1 のごとくで, いずれも血清抗体価の上昇が認められたが, 抗体価およびその推移はラット個体によりかなり差のあることが分った。すなわちウイルス接種後 4 週目に 1: 512 を記録し一旦低下したのち 8 週目に再度 1: 512 に上昇する例からウイルス接種後 3 週目に既に 1: 2048 を記録しその後 1: 512~1: 2048 と乱高下を繰り返す個体など一様でなく, この観察から以後の本実験も個体ごとの追跡を行うこととした。

上記観察をもとに予備試験と同量のウイルス, あるいはさらに 10 倍量のウイルスを接種し, 抗体価の推移を追試するとともに, 血清 GOT, GPT および LDH の測定を行った。Hantaan virus 1.6×10^5 VAIU を接種したラット No. 5 は血清抗体価は 1: 256~1: 512 となり, GOT と GPT がやや高値を示すが LDH を含め異常値とは認め難かった (Fig 2)。同じく No. 6 のラットはウイルス接種後 2 週目で既に 1: 2048 の高抗体価を示し, 8 週目には 1: 4096 となった。その間, LDH 値の乱高下が目立つがこのラットはウイルス接種前の LDH 値がかなり高く, ウイルス接種による直接の影響か否か判定できなかった。GOT と GPT の値は有意な変動とは認め難かった (Fig 3)。No. 7 のラットは抗体価は 4 週目と 8 週目に 1: 512 を示し比較的低い値であった

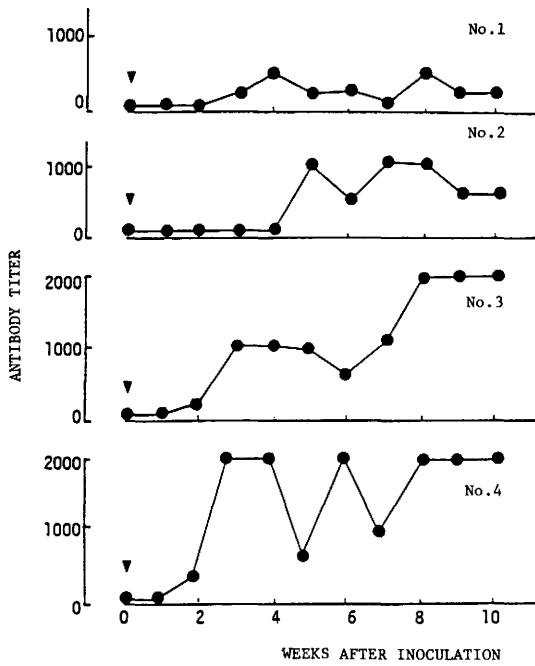


Fig. 1 Fluctuation of serum antibody titers in Hantaan virus-inoculated rats (No. 1~No. 4). Antibody titer was determined by indirect immunofluorescent staining. ▼: virus inoculation (1.6×10^5 VAIU).

が、8週目に観察された LDH の値は 6472IU/L と異常に高かった。GOT と GPT の値は正常範囲と判断された (Fig 4)。次いで10倍量の Hantaan virus (1.6×10^6 VAIU) を接種し、7週と9週目に同量の virus でさらに booster をかけ、この条件下で同様な観察を行った。結果は Fig 5~Fig 7 の通りであった。ラット個体 No. 8 ではウイルス接種後3週目に 1:1024、一旦下り7週目の同量ウイルスの booster により再度 1:1024、また下り9週目の booster には無反応というものであった。GOT、GPT の値に有意な変動はみられなかったが、LDH 値は8週以後上昇傾向を示すと思われた。No. 9 ラットはウイルス接種後3週目に抗体価 1:2048 を示し、その後急激に下降して7週目と9週目の booster にも反応がにぶかった。このラットの GOT と GPT の値は正常範囲にあるも、9週目の LDH は 6890IU/L と異常値を示した。No. 10 ラットはウイルス接種後3週目と7、9週目の booster に反応し抗体価は 1:2048 に上昇した。このラットの GOT と GPT の値は正常範囲

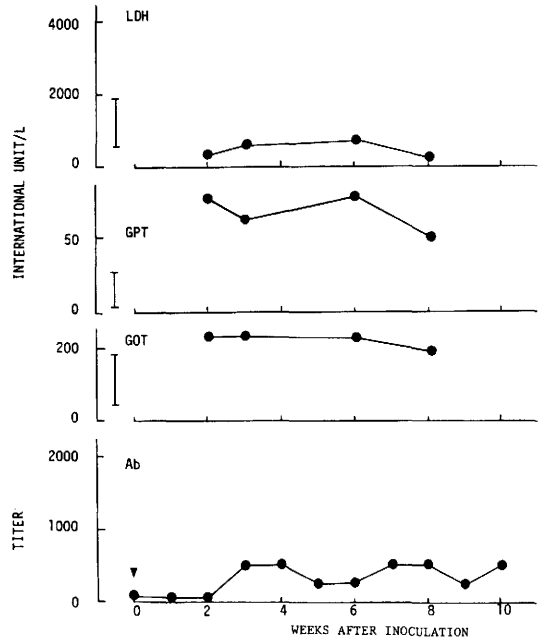


Fig. 2 Fluctuation of serum antibody titers and of LDH, GPT and GOT activities in a Hantaan virus-inoculated rat (No. 5). ▼: virus inoculation (1.6×10^5 VAIU).

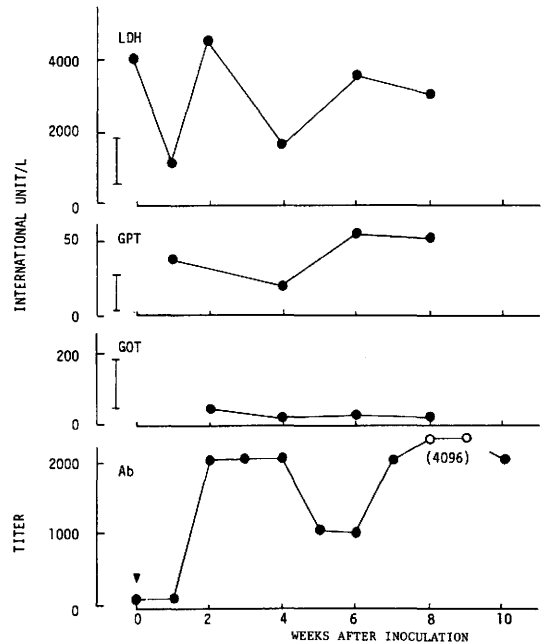


Fig. 3 Fluctuation of serum antibody titers and of LDH, GPT and GOT activities in a Hantaan virus-inoculated rat (No. 6). ▼: virus inoculation (1.6×10^5 VAIU).

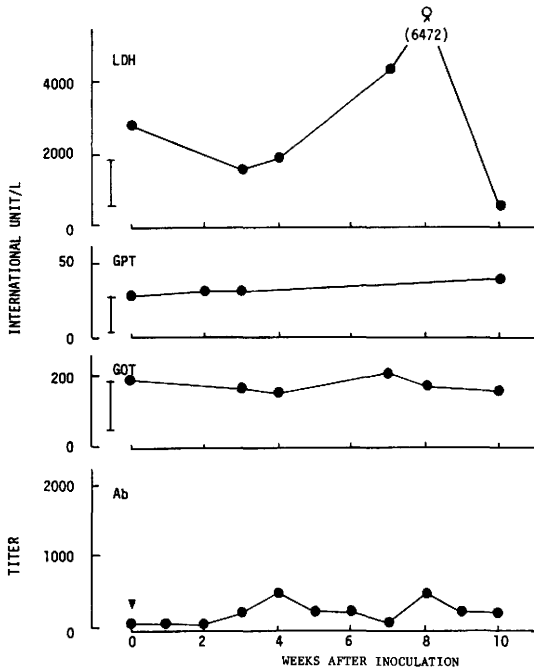


Fig. 4 Fluctuation of serum antibody titers and of LDH, GPT and GOT activities in a Hantaan virus-inoculated rat (No. 7).
▼: virus inoculation (1.6×10^5 VAIU).

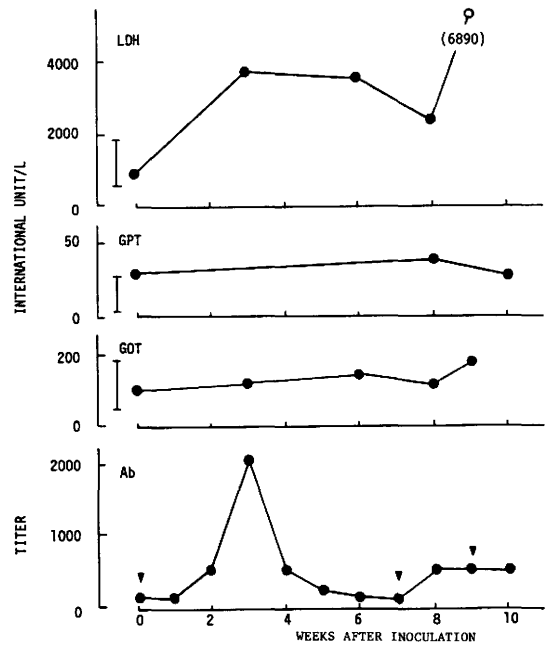


Fig. 6 Fluctuation of serum antibody titers and of LDH, GPT and GOT activities in a Hantaan virus-inoculated rat (No. 9).
▼: virus inoculation (1.6×10^6 VAIU).

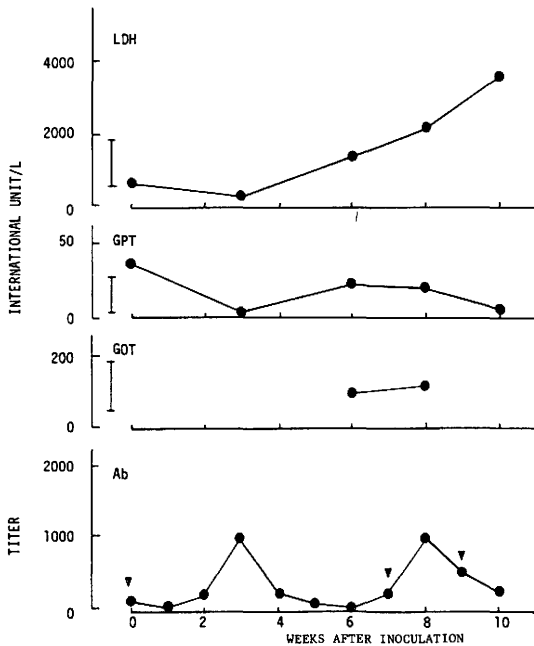


Fig. 5 Fluctuation of serum antibody titers and of LDH, GPT and GOT activities in a Hantaan virus-inoculated rat (No. 8).
▼: virus inoculation (1.6×10^6 VAIU).

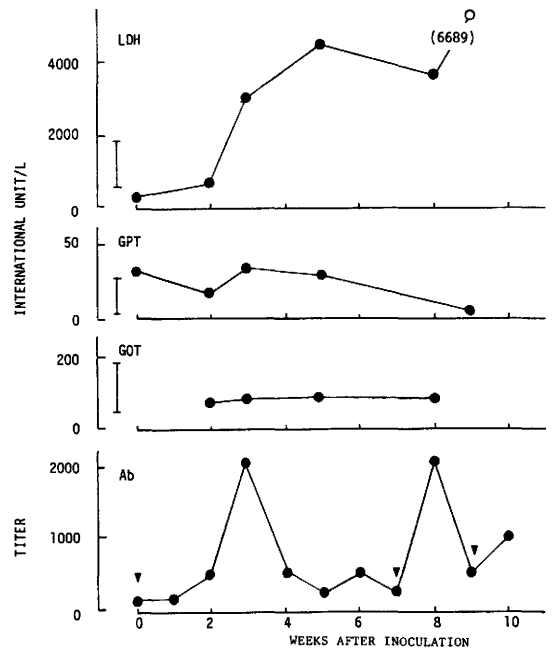


Fig. 7 Fluctuation of serum antibody titers and of LDH, GPT and GOT activities in a Hantaan virus-inoculated rat (No. 10).
▼: virus inoculation (1.6×10^6 VAIU).

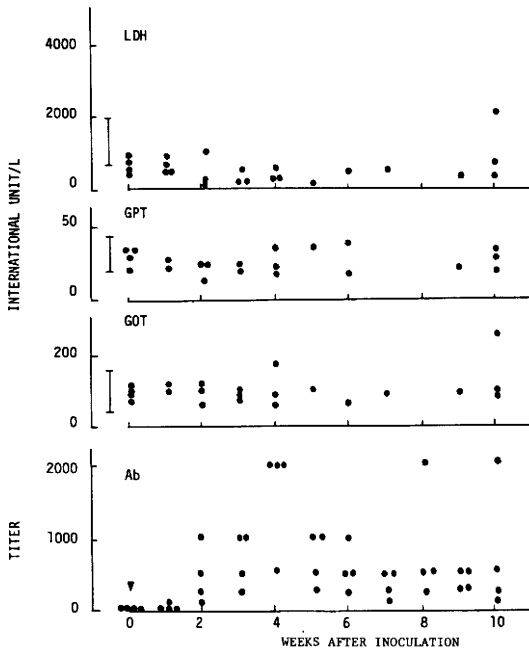


Fig. 8 Fluctuation of serum antibody titers and of LDH, GPT and GOT activities in Hantaan virus-inoculated mice.

▼: virus inoculation (0.8×10^5 VAIU).

にあるも、LDH 値は3週目より上昇傾向にあり9週目は6689IU/Lと異常であった。一方、上記全てのラットについて一般症状には特に見るべきものはなかった。

他方、マウスに Hantaan virus 0.8×10^5 VAIU を接種しラットと同様な観察を行った。ただし、マウスでは個体ごとの経時観察には無理があるので、ウイルス接種は初回の1回のみとし、また抗体価などの推移も平均像としてとらえた。結果は Fig 8 にまとめて示した。血清抗体価はウイルス接種2週目より上昇しはじめ4週目がピークと思われた。高い個体では1:2048のものが数匹あった。多くのマウスはその後抗体価は1:32~1:512まで下り持続するが中には8週目や10週目に1:2048と高い抗体価を示す個体があった。しかしいずれも一般症状には見るべきものがなく、血清 GOT, GPT および LDH もほぼ正常範囲にあるものと思われた。

考 察

ゲッ歯類において、Hantaan virus を接種した感染実験は、セスジネズミ (*Apodemus agrarius*)⁵⁾、ラット (*Rattus norvegicus*)^{6) 8) ~10) 12) 14)} およびサックリン

グマウス (*Mus musculus*)^{4) 11) 14)} で行われており、ウイルス抗原の出現時期と臓器分布、ウイルス接種後の生存率、感染経路ならびに感染成立に及ぼす種々の影響などが調べられている。ウイルス接種後の血清抗体価の変動については Lee ら⁶⁾ 及び前田ら⁸⁾ がラットで調べているが、マウスについてはいまのところ経時的に観察した報告はみられない。ラットにおいて Hantaan virus 76-118 株を接種した Lee ら⁶⁾ の感染実験によると、血清中のウイルス抗体はウイルス接種後10日で検出でき、30日ないし50日で最高に達し、60日以降でも高い抗体価が観察されたという。なお、これらの結果はラットに Wistar 系を用いても F344 系を用いても同様であったという。また前田ら⁸⁾ は Wistar 系ラットに Hantaan virus SR-11 株を接種したところ、血清中のウイルス抗体はウイルス接種後5日ないし7日で検出され、その後急激に上昇し、21日目でプラトーに達したと報告している。Hantaan virus 76-118 株を Wistar 系ラットに接種した本実験において、血清中の抗体価はウイルス接種後2週間で上昇し、2週ないし5週で高値となったが、多くは3週でピークを示した。その後、抗体価は徐々に低下したが、7週ないし10週に抗体価の上昇する個体も認められた。本実験における抗体価の推移は、前田らの報告⁸⁾ と似ているが、同じ Hantaan virus 76-118 株を用いた Lee らの結果と比べると、抗体価の上昇時期は本実験の方がやや早いように思われる。その原因は接種したウイルス量の相違に基づくのではないかと考えている。

一方、本実験において、Hantaan virus 76-118 株を ICR 系マウスに接種したところ、ウイルス接種後2週間で抗体の出現あるいは抗体価の上昇が認められ、4週目がピークであった。多くは5週以降低下し、低抗体価を持続する。中には8週目と10週目に高い抗体価を示している個体もあり、ラットとの類似性を思わせるが詳しい感受性の差は明らかでない。Hantaan virus 76-118 株の毒性(脳内接種による死亡率)はラットよりもマウスの方が高いという山之内らの実験結果¹⁴⁾もある。

ヒトにおいて、本症の顕性患者では血清中の GOT, GPT, LDH の値の上昇が知られており、特に LDH は多くの症例で著しく上昇し、その程度は他の腎疾患、すなわち急性腎不全や慢性腎不全の場合よりもさらに著しいという⁷⁾。なお、血清 LDH 値の増加と GOT 値、BUN 値の間には相関関係はないといわれている。また、血清 LDH 値の上昇は腎尿管壊死と腎血流量の減少により細胞から血中に LDH が離された結果であ

ろうと考えられている。本実験において、Hantaan virus を接種したラットでは正常値に比べ LDH はかなりの高値を示す個体が多かった。これが何らかの組織障害と結びつくものなのかどうかは今後の課題として残った。青山と倉田³⁾は Hantaan virus に感染したマウス及びラットにおいて、ウイルス抗原はほとんどすべての臓器に分布していることが蛍光抗体法では確かめられるが通常の光顕用染色標本では記載すべき組織変化はみられないと述べている。一般に、血清 LDH 値は腎疾患以外にも心疾患、肝疾患、脾疾患などで上昇するといわれているが、本実験の Hantaan virus 感染ラットで観察された LDH 値の上昇例がどの臓器のどの様な障害に由来するかなど、今後は微細構造も含めての病理学的検索が必要かと思われる。

さて、今回の感染実験でも明らかなようにラットは Hantaan virus に感染しても多くの場合一般症状にみるべきものはなく不顕性感染として推移するものと思われる。多くは一過性に反応しその後は低抗体価で推移するが、再び抗体価が上昇する例などもみられる。野鼠においては低抗体価であっても臓器中にウイルスの存在が認められたという倉田らの報告³⁾もあり、実験用ラットにおいても似たようなキャリア動物の存在は必ずしも否定できない。われわれの日常の検疫では SPF ラットでも時として低抗体価 (1:16~1:32) のものが検出されるが、もしこれが不顕性感染像を示すものであれば油断はできない。今後、さらに厳密な検討を加えなければならない。

マウスに関する今回のウイルス接種試験から、マウスもラットと相似した反応を示すように思われ、場合によってはマウスも当ウイルスに不顕性感染する可能性は否定できない。われわれの日常検疫ではマウスの抗体陽性例はこれまでのところ経験がない。しかしサックリングマウスが当ウイルスに感受性が高いという知見⁴⁾¹¹⁾¹⁴⁾もあり、マウスとラットの同居飼育や同室内繁殖は極力避けるべきであろうと思われる。

要 約

Hantaan virus (76-118 株) を腹腔内に接種した Wistar 雄ラット及び ICR 雌マウスについて、血清抗体価の推移をウイルス接種後10週まで経時的に調べるとともに、血清量の許す範囲で GOT, GPT 及び LDH の測定を行った。

ラットにおいて、接種したウイルス量にかかわらず、すべての個体で抗体価の上昇がみられた。抗体価の推移

は個体による変動が大きかったが、概ねウイルス接種後 2 ないし 5 週で高値を示し、3 週でピーク (1:512~1:2048) に達する個体が多かった。また、7 週ないし 10 週で再度抗体価の上昇する個体が観察された。血清 GPT 値はやや高い個体もあったが変化は少なく、GOT 値も正常値の域にあった。しかし LDH はかなりの高値を示す個体が多かった。

マウスにおいて、抗体価はウイルス接種後 2 週間で上昇しはじめ 4 週でピーク (~1:2048) を示した。その後、抗体価は低下したが中には 8 週目や 10 週目に 1:2048 と高い抗体価を示す個体もあった。なお、マウスでは血清 GOT, GPT, LDH の値に有意な変動はみられなかった。

参 考 文 献

- 1) Hamada, C., Sato, N.L., Niimura, S., Kato, A., Fujisawa, N., Maeda, Y., Kumanishi, T. and Lee, H.W.: Exp. Anim., 35: 1~9, 1986.
- 2) 川俣順一: 動物実験における人獣共通感染症、特に流行性出血熱の現状調査とそれらの防止策の研究。昭和54年度研究報告書。1980.
- 3) 北村 敬: 腎症候性出血熱 (HFRS) 診断法の確立及び疫学的研究。昭和60年度研究報告書。1986.
- 4) 小松俊彦, 森川 茂, 松浦善治, 杉山和良, 志賀定詞, 森田千春, 赤尾頼幸, 北村 敬: 第96回日本獣医学会講演要旨, 168: 1983.
- 5) Lee, H.W., Lee, P.W., Baek, L.J., Song, C.K. and Seong, I.W.: Am. J. Trop. Med. Hyg., 30: 1106~1112, 1981.
- 6) Lee, P.W., Amyx, H.L., Gibbs, C.J., Gajdusek, D.C. and Lee, H.W.: Infec. Immuni., 31: 334~338, 1981.
- 7) 李文鎬: 韓国型出血熱, pp. 50~85, 山本祐夫監訳, 近代出版, 東京。1983.
- 8) 前田俊郎, 有川二郎, 高島郁夫, 橋本信夫: 第99回日本獣医学会講演要旨, 196: 1985.
- 9) 森田千春, 松浦善治, 森川 茂, 飯田明広, 杉山和良, 北村 敬: 第31回日本実験動物学会総会講演要旨, 112: 1984.
- 10) 森田千春, 森川 茂, 飯田明広, 北村 敬: 第32回日本実験動物学会総会講演要旨, 82: 1985.
- 11) Tsai, T.F., Bauer, S., McCormick, J.B. and Kurata, T.: Lancet, August 28: 503~

- 504, 1982.
- 12) 山之内孝尚, 堂前嘉代子, 山西弘一, 高橋理明, 宮本博之, 倉田 毅, 川俣順一: 第18回日本実験動物学会講演要旨, 44: 1983.
- 13) 山之内孝尚: 流行性出血熱病原体による実験動物の汚染排除, 患者発生の予防制圧に関する研究. 昭和59年度研究報告書. 1985.
- 14) 山之内孝尚, 堂前嘉代子, 山西弘一, 高橋理明, 谷下 修, 高橋善行, 安田正秀, 倉田 毅: 第31回日本実験動物学会総会講演要旨, 113: 1984.
(昭和61年11月12日受付)

訂 正

本誌第101巻1号に掲載いたしました佐藤 攻他の原著論文に誤りがありましたので, 下記のとおり訂正いたします。

記

39頁英文抄録下1行: further investigations are indicated.

「…… are ……」

39頁本文下4行: 難治性膀胱疾患調査研究所

「……班」