

平成 31 年 4 月 20 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 296

氏 名

丸山 隼輝

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： テキサス州ガルベストン（国名： 米国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
ラッサ熱患者における急性難聴発症機序の解明
3. 派遣期間：平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
University of Texas Medical Branch
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可）**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

【研究の背景】

ラッサウイルス (LASV) によって引き起こされるラッサ熱は急性の出血熱を特徴とし、続発性の神経後遺症を残すこともある公衆衛生上重要な人獣共通感染である。LASV はアレナウイルス科に属し、表面糖タンパク質 (GPC)、核タンパク質 (NP)、RING フィンガータンパク質 (Z) および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (L) の 4 つのウイルスタンパク質を持つ一本鎖 RNA ウイルスで、他のアレナウイルス同様に齧歯類を自然宿主とする。LASV はその高い病原性から高度封じ込め施設であるバイオセーフティーレベル 4 (BSL4) 内での取り扱いが必要である。ラッサ熱の発生地域である西アフリカ諸国では毎年 500,000 人以上が感染のリスクにさらされており、入院患者の致死率は 25%にも及ぶ (Eze et al, *Afr J Health Sci*, 2010)。またナイジェリアでは毎年のようにラッサ熱の感染が発生しており、2018 年には 413 の感染例 114 の死亡例が、2019 年 1 月 1 日から 2 月 10 日までに 324 人感染例が報告され、そのうち 72 人の死亡が確認されている (WHO website 2019 年 4 月 18 日現在: <https://www.who.int/csr/don/14-february-2019-lassa-fever-nigeria/en/>)。またラッサ熱は致死性感染症としてだけでなく、感染回復期において生存患者の約 1/3 が突発性難聴を発症することが問題となっている (McCormick et al, *J Infect Dis*, 1987)。難聴は Quality of Life (QOL) に対して多大な影響を与えることから看過できない問題であるが、LASV 感染による難聴の詳細な発症機序は未だに解明されていない。

当研究では LASV 感染による突発性難聴の動物モデルを用い、その発症機序の解明を試みた。

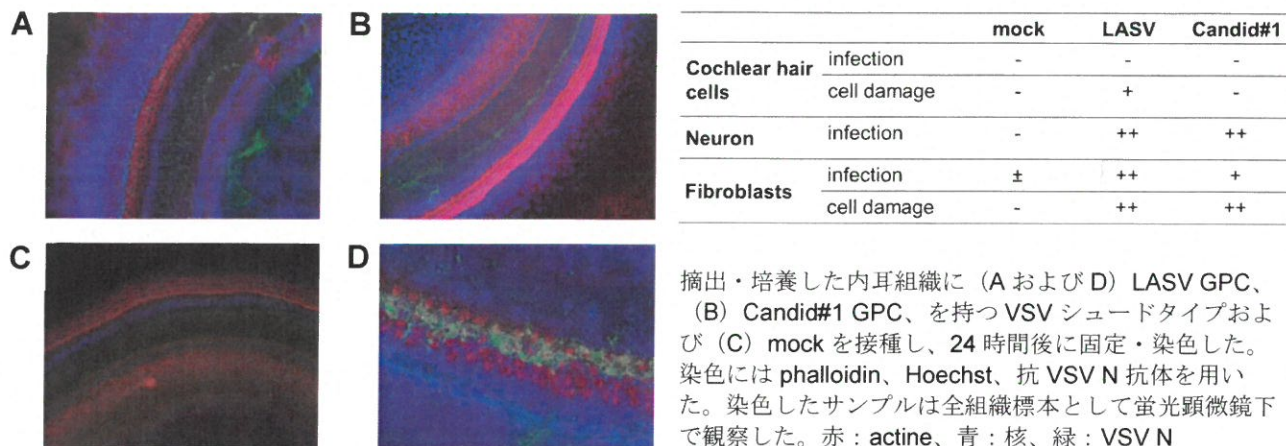
【研究実施状況】

①LASV の内耳組織に細胞に対する感染性評価

生後 2-5 日のマウスから内耳組織を摘出・培養し、LASV の GPC を持つ水胞性口炎ウイルス (VSV) シュードタイプを感染させ LASV の GP の持つ細胞指向性を評価した。比較対照として同じアレナウイルス科に属しアルゼンチン出血熱に対するワクチン株である Candid#1 の GPC を用いた。

VSV シュードタイプを用いることで細胞侵入に関わるウイルス表面タンパク質の影響のみを比較することができ、すべての作業は BSL2 内で可能である。摘出した内耳組織は、ウイルス感染細胞を VSV の N タンパク質に対する抗体を用いて染色し、全組織標本として蛍光顕微鏡を用いて観察した。切片の作成抜きに実施可能な全組織標本を用いた方法は蝸牛のような脆弱で切片を作成することが困難な組織を観察する上で有効な手法である。

Fig. 1 VSV シュードタイプ接種後蝸牛纖毛上皮細胞の蛍光顕微鏡像



その結果、LASV および Candid#1 の GPC を持つ VSV シュードタイプは繊維芽細胞および神経細胞によく感染していた一方で、蝸牛纖毛上皮細胞には感染していなかった (Fig. 1)。特筆すべき事柄として、LASV の GPC をもつ VSV シュードタイプを感染させたときのみに顕著に蝸牛纖毛上皮細胞の脱落が見られた。これらの結果から、アレナウイルスの持つ唯一の表面糖タンパク質である GPC が関与する細胞侵入の段階で LASV と Csndid#1 に大きな違いが見られなかったことから、内耳組織に対する細胞指向性はアレナウイルス間に違いはなく、LASV のみが引き起こす難聴の発症機序に大きな関わりを持たないことが予想される。また今回用いた *ex vivo* の手法は他の難聴を引き起こすウイルス感染症の研究にも応用することが可能であると思われる。

②聴性脳幹反応検査 (ABR) および歪成分耳音響放射検査 (DPOAE) の習得

ABR および DPOAE の習得および実際に LASV の難聴モデルの実験で用いる予定である Stat1-KO マウスを用いて基礎データの採取を行った。ABR は聴覚刺激による脳幹の活動電位を測定する検査で、音刺激によって励起される蝸牛纖毛上皮細胞からの大脳皮質までの神経活動電位の活性化を評価する。DPOAE は内耳で発生する音響放射を測定する検査で、蝸牛纖毛上皮細胞の状態を評価する。これらの聴覚検査の評価方法の違いから、難聴によるおおよその障害部位を特定することができる。

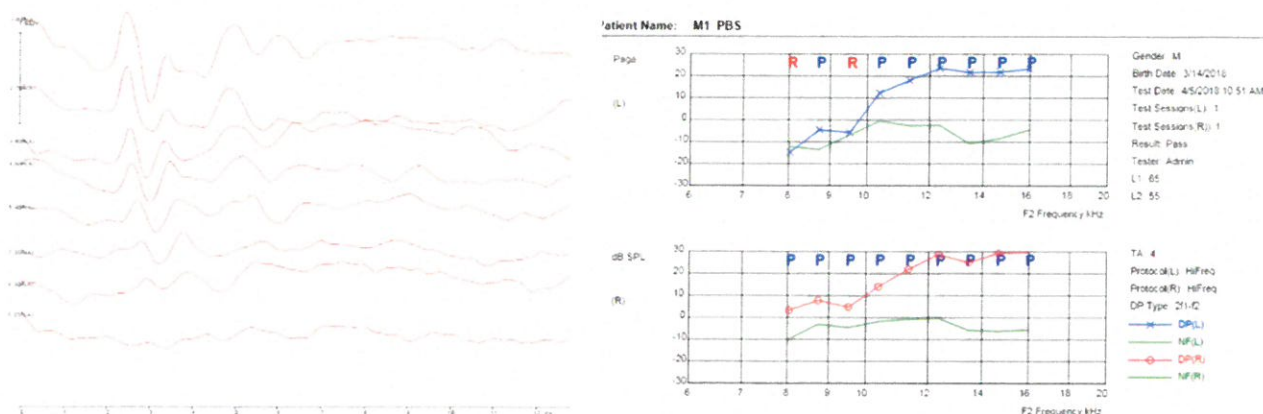
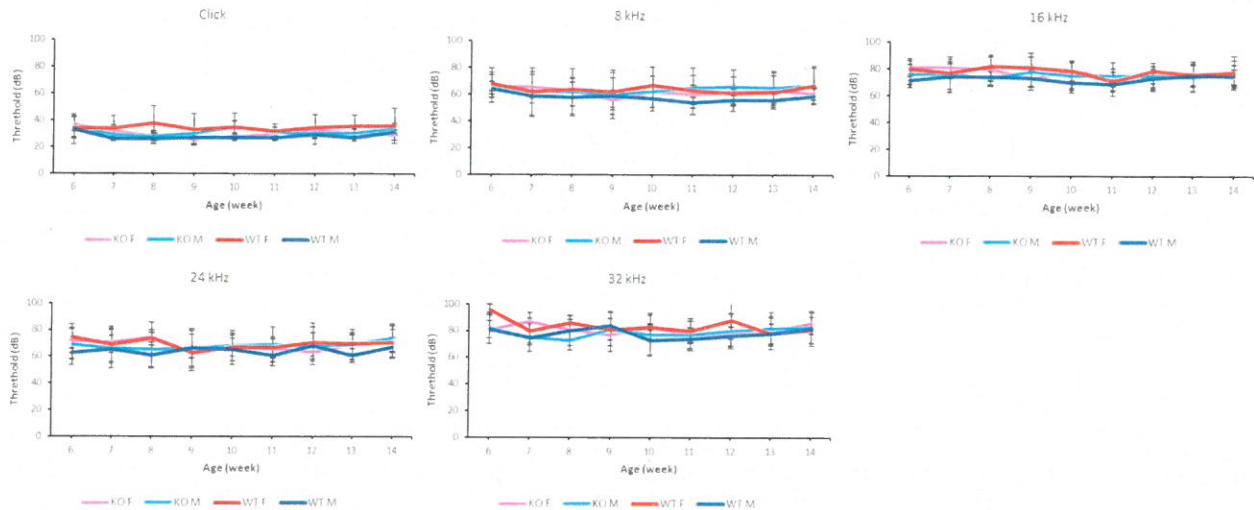


Fig. 2 各マウス聴力検査

実際に取得された (左) ABR および (右) DPOAE のデータの例。

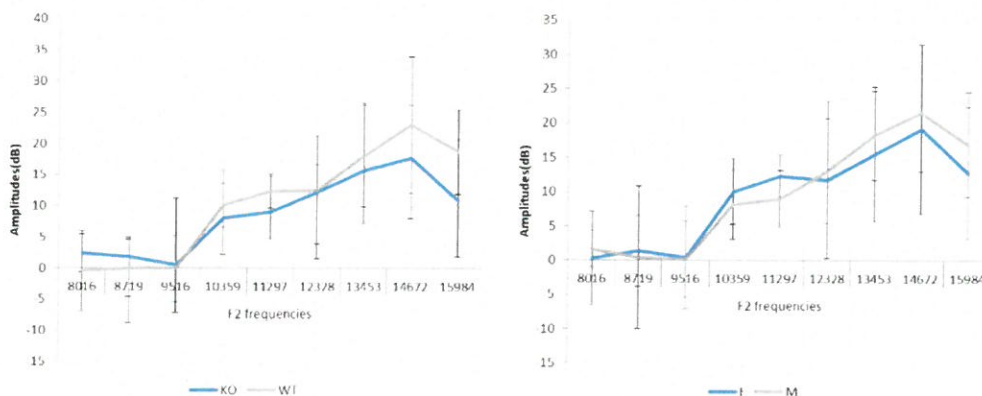
Stat1-KO マウスおよび wild type (WT) マウスを用い 6 週齢から 14 週齢までの 2 か月間に渡り、毎週 ABR および DPOAE を実施した。測定時には Ketamine および Xylazine の混合薬をマウスに投与し鎮静化し、遮音素材で作成した箱の中にマウスを静置した。ABR の測定には Click 音 (4 kHz をピークとする集合音)、8、16、24 および 32 kHz の単一音を用いて刺激を行った。その結果、Stat1-KO と WT マウス間において聴力に有意な差は見られず、刺激音の中では Click 音に対する感度が高いことが判明した (Fig. 3 および 4)。

Fig. 3 Stat1-KO マウスおよび WT マウスにおける ABR の結果



Stat1-KO マウスおよび WT マウスを用いて 6 週齢から 14 週齢まで ABR による聴力検査を行った。Stat1-KO メス、Stat1-KO オス、WT メスおよび WT オス各 5 匹の Click、8、16、24 および 32 kHz の平均値および標準偏差を示す。横軸は週齢、縦軸は知覚可能な最低音量を示す。

Fig. 4 Stat1-KO マウスおよび WT マウスにおける DPOAE の結果



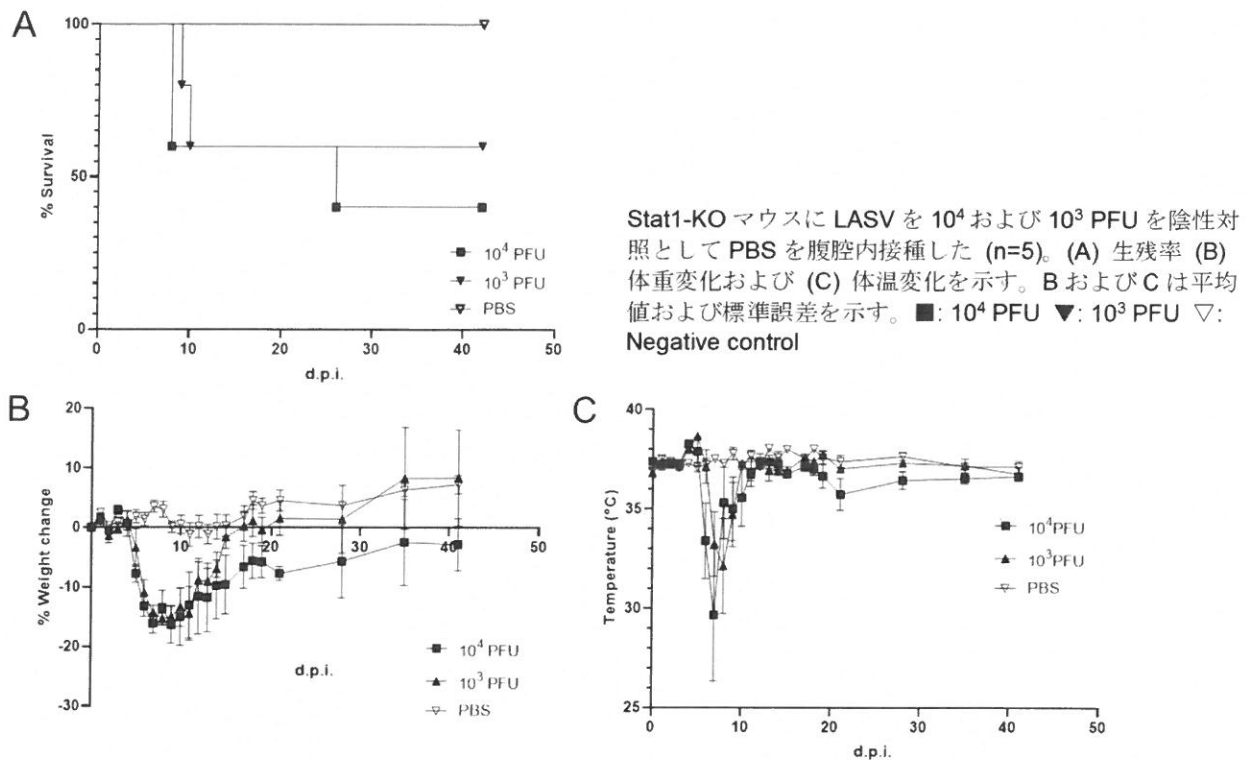
Stat1-KO マウスおよび WT マウスを用いて 6 週齢から 14 週齢まで DPOAE による聴力検査を行った。図に示すのは 12 週齢における Stat1-KO と WT および雌雄間の比較の様子。各 10 匹の平均値および標準偏差を示す。横軸は周波数、縦軸は音響放射の音量を示す。

これらの結果から実際に BSL4 内で感染性ウイルスを用いる実験には ABR では最も感度高い Click 音のみの測定を行い、DPOAE では最も感度の高い F2=14672 Hz を使用して聴力の評価を行うこととした。

③BSL4 内での感染性 LASV を用いた ABR および DPOAE の実施

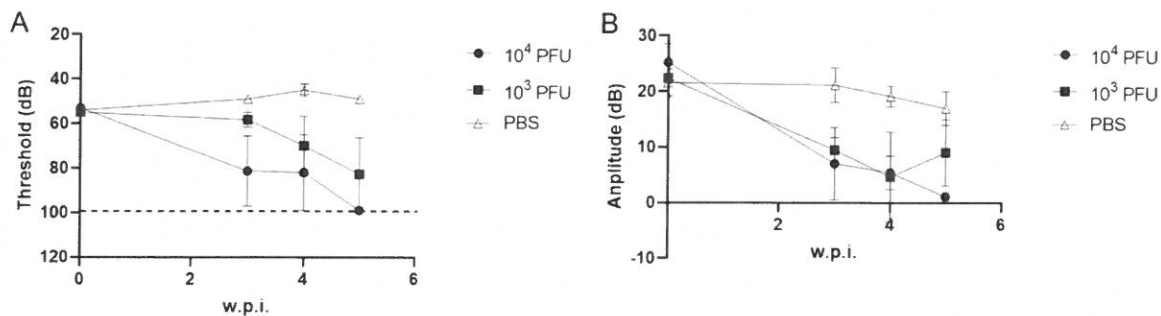
BSL4 内で LASV を Stat1-KO マウスに 10^4 および 10^3 plaque forming unit (PFU) 腹腔内接種し感染 6 週間後まで体温・体重変化を測定した。ABR および DPOAE は感染マウスが回復期に入る感染 3 週間後から実施した。BSL4 内での聴力実施に際しての陰性対照群として PBS のみを接種腹腔内接種した。その結果 LASV 接種群では感染 4 日目から顕著な体重減少を示し、感染 6 日目から低体温を示した。LASV 接種マウス 10 匹中 5 匹が感染 7 日目から 25 日目にかけて死亡または人道的エンドポイントに達したことにより安楽殺された (Fig. 5)。臨床症状としては感染 6 日後から被毛粗剛、低活動性が見受けられ、感染 21 日目からは異常反射亢進、振戦、平衡感覚異常の神経症状を示す個体も観察された。

Fig. 5 LASV 感染 Stat1-KO マウスの生残曲線および体重・体温変化



LASV 感染から回復した 5 匹および陰性対照群 5 匹に対して ABR および DPOAE を感染回復期である 3 週間後から毎週実施し、聴力を評価比較した。その結果 LASV 感染耐過 Stat1 マウス 5 匹中 4 匹が感染 3 週間後から難聴傾向を示し、感染後 5 週目には難聴と判定された (Fig. 6)。ABR と DPOAE の結果から LASV 感染による難聴は蝸牛繊毛細胞とそこから脳へと続く聴覚神経の障害の両方の可能性が示唆された。当実験により得られた結果は LASV 感染による聴覚障害を評価する手法を確立したものであり、今後のワクチン開発においては聴覚障害の副作用を評価する手法として、治療法開発においては難聴の発症を抑制できるかという新たな指標として有用なものである。

Fig. 6 LASV 感染 Stat1-KO マウスの聴力検査



Stat1-KO マウスに LASV を 10^4 および 10^3 PFU を陰性対照として PBS を腹腔内接種した (n=5)。 (A) ABR (B) DPOAE の平均値および標準誤差を示す。 A の破線は測定限界を示す。 ●: 10^4 PFU ■: 10^3 PFU △: Negative control

当該研究は UTMB の Dr. Tomoko Makishima との共同研究として実施したもので、現在論文投稿準備中である。

④その他

申請書に直接記載してはいないが、関連する研究内容を以下に記載する。

- アデノウイルスベクターを用いた新規ラッサ熱ワクチンの開発 (論文投稿準備中)

- LASV における Mini-genome assay の構築
- ヒト由来 Pol-I ポリメラーゼを利用したアレナウイルスにおけるリバーシジェネティクス法の確立
- LASV 感染モデルマウスにおける平衡感覚器の病理解析（論文投稿準備中）
- 臨床検体から分離された LASV のモルモットにおける病原性の比較および新規ラッサ熱モルモットモデルの開発（論文投稿準備中）
- 新規抗 LASV 薬の薬効評価（日本の製薬会社との共同研究）