

200500668A

厚生労働科学研究費

新興・再興感染症研究事業

野生げっ歯類及び節足動物に由来する感染症の
診断、疫学及び予防に関する研究

平成 17 年度 総括研究報告書

平成 18 (2006) 年 3 月

主任研究者 高 島 郁 夫
北海道大学大学院獣医学研究科

目次

I. 総括研究報告	
野生げっ歯類及び節足動物に由来する感染症の診断、疫学及び 予防に関する研究	1
高島郁夫	
II. 分担者研究報告	
1. ハンタウイルス感染症の疫学的研究	8
荻和宏明	
2. ハンタウイルス感染症の診断法の開発に関する研究	13
有川二郎	
3. Q熱の診断と疫学	19
福士秀人	
4. わが国の野生齧歯類における Bartonella 属菌の分布と その分離株の分子生物学的特性	21
丸山総一	
5. エルシニア感染症の疫学	25
林谷秀樹	
6. バベシア感染症の診断法の開発と疫学	30
辻 正義	
7. 中枢神経組織はなぜ特定の RNA ウイルスに脆弱か?	36
岩崎琢也	
8. 回帰熱ボレリアの抗原解析	42
福長将仁	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷	49

総括研究報告書

野生げっ歯類及び節足動物に由来する感染症の診断、疫学
及び予防に関する研究

主任研究者 高島郁夫 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

研究要旨

ダニ媒介性脳炎の準ウイルス様粒子を用いて人用の IgG-ELISA および IgM-ELISA による感度と特異性に優れた血清診断法の開発を行った。ハンタウイルスの流行型を血清学的に鑑別する ELISA を開発した。アジア諸国（タイ、インドネシア、ベトナム、インド、韓国）において疫学調査を実施しハンタウイルス感染症の病原巢の野生げっ歯類の種類と流行ウイルス型を特定した。Bardoneella 感染症の国内での野生げっ歯類における疫学調査を実施し、アカネズミ（56.3%、27/48）、ヒメネズミ（59.1%、13/22）が陽性であることを明らかにした。Yesinia 感染症について LAMP 法（2004 年に開発）を用いて国内の野生げっ歯類が高率に汚染していることおよびサル感染症致死例を発見した。B.rodhaini がヒト赤血球に寄生することを証明した。アライグマが B.nicroti 様原虫を国内に持ち込んでいる実態を明らかにした。回帰熱ボレリアの抗原蛋白遺伝子 3 種をクローン化して大量発現に成功した。

研究分担者

荻和宏明・北海道大学・助教授
有川二郎・北海道大学・教授
福士秀人・岐阜大学・教授
丸山総一・日本大学・助教授

林谷秀樹・東京農工大学・助教授
岩崎琢也・長崎大学・教授
辻 正義・酪農学園大学・助教授
福長将仁・福山大学・教授

A. 研究目的

国内ではダニ媒介性脳炎の患者が発見され、原因ウイルスが分離された。またハンタウイルス抗体陽性者、バベシア症患者、Q 熱患者、エルシニア感染症患者およびボレリア感染症患者が国内で確認されている。これら 6 種

の感染症については全国的な疫学調査が実施されていないため、汚染地や実際の患者数も不明のままである。海外ではダニ媒介性脳炎はロシアを中心にユーラシア大陸で毎年 10,000 人前後の患者発生があり、また新種のハンタウイルス性肺症候群の流行が北

米、南米の諸国で発生し、これらの流行地へ渡航する日本人の感染が懸念されている。また日本へは毎年海外から70万匹以上のげっ歯類が輸入され、感染症の検査なしに愛玩動物として一般家庭で飼育されているため、上記の感染症にヒトが感染する危険性がある。そこで上記6種の感染症につき、精度の高い診断法を確立し、疫学調査を実施して国内汚染地の特定とヒトにおける感染状況の解明に努める。輸入げっ歯類について抗体調査と病原体分離の成績をもとに、リスクアナリシスを行い、検査体制を整える。また海外においても調査を実施し、疫学情報の収集と病原体分離を行う。新規ワクチン（ダニ媒介性脳炎）を開発するため、ウイルスの病原性の分子基盤を解明する。

B. 研究方法

ダニ媒介性脳炎ウイルス様粒子を用いたヒト用のIgG-、IgM-ELISAによる血清診断法を開発する。ハンタウイルスの遺伝子組み換え技術により作出した抗原を用いた迅速で特異性の高い血清診断法を開発する。これを用いたハンタウイルス感染症の国内および国外での疫学調査を実施し、ウイルスを分離して遺伝子性状と抗原性を調べる。Coxsackie を培養細胞に接種し、診断用抗原として蛍光抗体法を開発する。国内の野生げっ歯類から *Bartonella* 属菌を分離し、遺伝子性状

を調べる。エルシニア感染症の迅速な遺伝子診断法を開発し疫学調査を実施する。バベシア症の疫学調査を日本国内およびユーラシア大陸各地で行い病原体の型別を行う。回帰熱ボレリアの菌体表層蛋白の一種 VmpP 遺伝子をクローニングし発現タンパクにおいてエピトープを特定する。

（倫理面への配慮）

ヒトの血清と剖検材料の採取はいんフォームドコンセントに基づき行い、成績の公表は氏名を伏せて実施する。本研究における動物実験は各研究機関に属する動物委員会に計画を申請し、承認を得た後に実施する。ウイルスを用いた実験はP-3実験室において行う。

C. 研究結果

ダニ媒介性脳炎(TBE)：北海道で分離された TBE ウイルス Oshima 株のレプリコンを相補的に発現させたウイルス構造蛋白によりパッケージさせる系を構築した。さらに緑色蛍光物質やネオマイシン耐性遺伝子などを組み込んだレプリコンをパッケージさせることで、外来遺伝子を導入させることにも成功した。準ウイルス様粒子を用いて、IgG-、IgM-ELISA による敏感度と特異度の高いヒト用の血清診断法を開発した。

ハンタウイルス感染症：ハンタウイルスのヌクレオキャプシド蛋白質を

標的とした抗原検出用 ELISA とウイルスの S 遺伝子を標的とした Real-time PCR を開発した。またアジアにおけるハンタウイルス感染症のヒトにおける感染型を診断できる血清抗体スクリーニングシステムを開発した。本法システムを用いてタイ、ベトナムおよびインドの不明熱患者にハンタウイルスの抗体陽性例を見出した。

Q 熱：Coxiella 感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法を開発し、蛍光抗体法の染色線の違いにより、発症患者抗体と未発症患者抗体を識別できる血清学的診断法を開発した。

Bartonella 感染症：国内の野生げっ歯類の Bartonella 属菌の保菌状況について疫学調査を実施した。アカネズミの 56.3% (27/48)、とヒメネズミの 59.1% (13/22) から Bartonella 属菌が分離された。分離菌株の PCR-RFLP 法により多くの菌株がヒトに視神経網膜炎を起す B.grahamii と同定された。

エルシニア感染症：平成 16 年度に開発した Yersinia pseudotuberculosis ならびに Yersinia enterocolitica の迅速診断用 LAMP 法を臨床例(野生げっ歯類、サル、トリ)へ応用し、その有用性を確認するとともに、分離された Y. pseudotuberculosis の病原遺伝子の保有状況を明らかにした。これまで非病原性と考えられていた Yersinia kristensenii によるサルの感染致死例を発見し、その分離株のげっ歯類に対す

る病原性を明らかにした。

バベシア症：Babesia microti (ヒトバベシア症の主要病原体)とは別種のヒトに感染しないと思われていた B. rodhaini がヒト赤血球に感染することを SCID マウスモデルを用いて始めて証明した。北米原産のアライグマは、近年、わが国に外来種として定着するだけでなく、新たな B.microti 様原虫を国内へ持ち込んでいる実態がはじめて明らかとなった。

回帰熱：回帰熱ボレリアの抗原蛋白遺伝子を新に3種クローン化して大量発現に成功した。抗原蛋白 VmpP のエピトープ構造を5アミノ酸以内に特定することに成功した。

D. 考察

1993 年北海道上磯町で日本で初めてダニ媒介性脳炎(TBE)の患者が発見された。その後の我々の疫学調査で原因の TBE ウイルス Oshima 株が患者発生地区のおとりの犬から分離された。そのため、国内における TBE のヒトにおける感染状況を調査する必要性が課題となっている。ヒトの感染状況を明らかにするための血清疫学調査において今回開発した IgG-, IgM-ELISA は有用と考えられる。

今回開発したハンタウイルスの血清抗体スクリーニングシステムは N 蛋白上の血清型特異的なエピトープを反応用抗原として用いるものであり、ヒトにおけるハンタウイルス感染

血清型を同定できる。今回システムを用いてタイ、ベトナム、インド等のアジア各国でハンタウイルス感染の患者が潜在していることが明らかになった。

Coxiella 感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法により、発症と未発症の患者を鑑別診断可能となった。これにより国内の Q 熱のヒトにおける顕性感染と不顕性感染の状況が明らかになる。

日本国内に生息する野生げっ歯類のうちアカネズミとヒメネズミは *Bartonella* 属菌を高率 (57.1%) に保菌していることが明らかになった。また分離菌の多くがヒトに視神経網膜炎を起す菌類であるため、今後ヒトにおける疫学調査が必要となって来た。

国内に生息するアライグマは外来動物として定着しているが、*Babesia microti* 様原虫を国内に持ち込んでいることが考えられ、対策が必要とされる。

E. 結論

ダニ媒介性脳炎の ELISA による生ウイルスを用いない安全な血清診断法が開発された。ハンタウイルスの感染血清型を特定できる抗体スクリーニングシステムが確立された。Q 熱の顕性感染者と不顕性感染者の鑑別が可能となった。日本国内に生息するアカネズミとヒメネズミがヒトに視神経網膜炎を起す *Bartonella grahamii* を

保菌することが判明した。国内に生息するアライグマが *Babesia microti* 様原虫を保有することが判明した。回帰熱ボレリアの抗原蛋白の大量発現に成功した。

F. 健康危険情報

1) 国内に生息するアカネズミとヒメネズミがヒトに視神経網膜炎を起す *Bartonella grahamii* を保菌することが明らかとなった。

2) 国内に定着したアライグマが *Babesia microti* 様原虫を保有していた。

3) サルにおいて *Yersinia kristensenii* の感染致死例が発見されたので、動物園などの動物展示施設における衛生管理が重要となって来た。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshii, K., Hayasaka, D., Goto, A., Kawakami, K., Kariwa, H. and Takashima, I. 2005: Packaging the replicon RNA of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus into single-round infectious particles: development of a heterologous gene delivery system. *Vaccine* 2005, 23, 3946-3956

2) Goto, A., Yoshii, K., Obara, M., Ueki, T., Mizutani, T., Kariwa, H. and Takashima, I.: Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion. *Vaccine* 2005, 23, 3043-3052

- 3) Schmidt, J., Jandrig, B., Klempa, B., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Meisel, H., Niedrig, M., Pitra, C., Kruger, D.H. and Ulrich, R.: Nucleocapsid protein of cell culture-adapted Seoulvirus strain 80-39: analysis of its encoding sequence, expression in yeast and immuno-reactivity. *Virus Gene* 2005, 30, 37-48.
- 4) Chandy, S., Mitra, S., Sathish, N., Vijayakumar, T.S., Abraham, O.C., Jesudason, M.V., Abraham, P., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Sridharan, G.: A pilot study for serological evidence of hantavirus infection in human population in south India. *Indian J Med Res* 2005, 122, 211-215.
- 5) Zhang, G., To, H., Russell, K. E., Hendrix, L.R., Yamaguchi, T., Fukushima, H., Hirai, K., Samnel, J. E. Identification and characterization of an immunodominant 28-kilodalton *Coxiella burnetii* outer membrane protein specific to isolates associated with acute disease. *Infect Immun.*, 2005, 13, 1561-1567.
- 6) Iwata T., Une Y., Okatani A.T., Kaneko S., Namai S., Yoshida S., Horisaka T., Horikita T, Nakadai A. and Hayashidani H.: *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 infection in breeding monkeys in Japan. *Microbiol.Immunol.* 2005, 49:,1-7.
- 7) Kawabuchi, T., Tsuji, M., Kuwahara, S., Nishida, A., Shimofurutachi, T., Oka, H. and Ishihara, C. 200 Isolation of a human erythrocyte-adapted substrain of *Babesia rodhainiana* and analysis of the merozoite surface protein gene sequences. *J. Vet. Med. Sci.* 2005, 67, 901-907.
- 8) Kawabuchi, T., Tsuji, M., Sado, A., Matoba, Y., Asakawa, M. and Ishihara, C. 2005; *Babesia microti*-like parasites detected in feral raccoons (*Procyon lotor*) captured in Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2005, 67, 825-827.
- 7) Shao, R., Mitani, H., Barker, SC., Takahashi, M., and Fukunaga, M.: Novel mitochondrial gene content and gene arrangement indicate illegitimate inter-mtDNA recombination in the chigger mite, *Leptotrombidium pallidum*. *J. Mol. Evol.*, 2005, 60,764-773
- 9) Shao, R., Barker SC., Mitani, H., Aoki, Y., and Fukunaga, M.: Evolution of duplicate control regions in the mitochondrial genomes of metazoa: a case study with Australasian Ixodes ticks. *Mol. Biol. Evol.*, 2005, 22, 620-629.
- 10) 林谷秀樹 *Yersinia pseudotuberculosis* 感染症(仮性結核)モダンメディア 2005;51:211-216.

- 11) 苅和宏明 ハンタウイルス感染症 Virus Report 2005; 2(2): 27-34.
- 12) 高島郁夫、早坂大輔、後藤明子、好井健太郎、苅和宏明 日本と極東ロシアのダニ媒介性脳炎ウイルスの系統解析と病原性 ウイルス 2005; 55(1): 35-44.
- 13) 高島郁夫 8)ダニ媒介性脳炎 Progress in Media 2006; 26(1):61-63
- 14) 林谷秀樹、岩田剛敏 *Yersinia pseudotuberculosis* 感染症(仮性結核) モダンメディア 2005; 51(9): 1-6.

2. 学会発表

- 1) 苅和宏明：野生げっ歯類を対象としたハンタウイルス感染症の比較疫学的研究：第 139 回 日本獣医学会学術集会、和光 (2005, 3)
- 2) 谷川洋一、苅和宏明、萩谷友洋 Nandadeva Lokugamage、Kumari Lolugamage、館敦史、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：野生げっ歯類からのハンタウイルス抗原検出用 ELISA の開発：第 139 回 日本獣医学会学術集会、和光 (2005, 3)
- 3) 野田寛、苅和宏明、浅野淳、安居院高志、倉野義裕、内田好昭、藤井信之、高島郁夫：重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスに対するモノクローナル抗体エピトープ解析：第 139 回 日本獣医学会学術集会、和光 (2005, 3)
- 4) 野田寛、苅和宏明、浅野淳、安居院高志、倉野義裕、内田好昭、藤井信之、岡田政久、高島郁夫：重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスのヌクレオキャプシドに対するモノクローナル抗体の性状解析：第 140 回 日本獣医学会学術集会、鹿児島 (2005, 9-10)
- 5) 谷川洋一、苅和宏明、萩谷友洋、Nur Hardy Bin Abu Dand、Nandadeva Lokugamage、Kumari Lolugamage、館敦史、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：ゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*)における Puumala 型ハンタウイルスの感染様式の解析：第 140 回 日本獣医学会学術集会、鹿児島 (2005, 9-10)
- 6) 伊川綾恵、好井健太郎、川上和江、後藤明子、小原真弓、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス組み換え蛋白を用いた ELISA 法による野鼠血清スクリーニング法の開発：第 140 回 日本獣医学

会学術集会、鹿児島（2005, 9-10）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症の予防、診断及び疫学に関する研究

ハンタウイルス感染症の疫学的研究

分担研究者 苅和 宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 助教授

研究要旨

ハンタウイルスはげっ歯類を病原巣動物として自然界に分布し、人が感染すると腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)などの重篤な疾病を引き起こす。日本においてはドブネズミと北海道のエゾヤチネズミにがハンタウイルスの病原巣動物となっている。エゾヤチネズミの保有するウイルスはヨーロッパなどで HFRS を引き起こす Puumala 型に非常に近縁であることが判明している。Puumala 型のウイルスには定量的なウイルス検出法やワクチンの評価に用いることのできるような確立した感染動物モデルが存在しないことから、本ウイルスに対するワクチン開発は非常に遅れていた。そこで、ハンタウイルスのヌクレオキャプシド蛋白質 (NP) を標的とした抗原検出用 ELISA とウイルスの S 遺伝子を標的とした Real-time PCR を開発した。NP 免疫ウサギ血清を捕捉抗体に用い、Puumala 型ハンタウイルス感染マウス血清を検出用抗体に使用することにより、NP の検出を行った。その結果、ウイルスの感染価と ELISA の吸光度との間にほぼ直線的な関係が得られたことから、本 ELISA によって NP を定量的に検出することが可能となった。次にウイルス RNA の S 遺伝子を標的とした TaqMan Real-time PCR 法の確立を試みた。蛍光強度が 0.2 を上回る PCR のサイクル数を Ct 値としたところ、Ct 値はウイルス感染価とウイルス遺伝子のいずれに対しても相関係数 0.98 以上の強い正の相関を示すことが明らかになった。したがって、本 Real-time PCR により、ウイルス遺伝子の定量的な検出が可能になった。Puumala 型ウイルスに感受性の高い実験動物を検索するための一環として、4 週令のシリアンハムスターに Puumala 型ハンタウイルスを皮下接種し、抗原検出 ELISA と Real-time PCR を用いてハムスターの肺におけるウイルスの増殖様式を解析した。感染 14 日目にウイルス抗原とウイルス RNA がピークに達し、抗体の上昇する 28 日目以降はウイルス抗原は検出されなくなるものの、ウイルス RNA は 3 日目から 70 日目まで継続して検出された。成熟した実験動物にハンタウイルスを感染させてウイルスがこのような活発に増殖し、しかも持続感染が成立する動物実験系はこれまでほとんど報告がなく、シリアンハムスターと Puumala 型ハンタウイルスを用いた動物実験系がワクチンや抗ウイルス剤の評価に有用であることが明らかになった。

A. 研究目的

ハンタウイルスはげっ歯類を自然宿主とする、マイナス一本鎖の RNA ウイルスで、Hantaan 型、Seoul 型、Puumala 型など 20 種類以上のウイルス型の存在が知られている。本ウイルスは人に感染すると腎症候性出血熱 (HFRS) やハンタウイルス肺症候群 (HPS) などの重篤な疾患を引き起こす。現在中国などで、Hantaan 型と Seoul 型ハンタウイルスに対するワクチンが実用化されているが、欧州やヨーロッパロシアに分布する Puumala 型ハンタウイルスに対するワクチンは未だ開発されていない。そこで本研究では、まず短時間でウイルスを定量的に検出可能な 2 つの診断法 (抗原検出 ELISA と Real-time PCR) の開発を試みた。次に、ワクチン評価用の実験動物を検索するための第一歩として、ゴールデンハムスターに Puumala 型ハンタウイルスを接種し、抗原検出 ELISA と Real-time PCR で感染動物体内のウイルスの検出を試みた。

B. 研究方法

1. ハンタウイルス株

Vero E6 細胞に Puumala 型の Sotkamo 株を感染させ、14 日間培養を行った。感染細胞の培養上清を回収し、ウイルスストックとして -80 °C で使用時まで保存した。

2. 抗原検出 ELISA

Sotkamo 株のウイルスストックもしくはハンタウイルス感染エゾヤチネズミの肺を高濃度塩化カリウム、TritonX-100 等を含む lysis buffer で可溶化して検体とし、ハンタウイルスの Nucleocapsid

protein (NP) を抗原検出用 ELISA で検出した。ELISA の術式は以下の通りである。

- (1) 抗 NP ウサギ血清、(2) ブロッキング、(3) 検体、(4) 抗 NP モノクローナル抗体、(5) ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体、(6) 基質 (オルトフェニレンジアミン)、(7) 吸光度の測定。

3. Real-time PCR

ハンタウイルスの S 遺伝子を標的として TaqMan Real-time PCR 用のプライマーとプローブを調整した。RNA の抽出は型のごとく行い、逆転写反応を行った後、TaqMan Real-time PCR を実施した。蛍光強度が 0.2 を上回る PCR のサイクル数を Ct 値とし、段階希釈したウイルスストックごとに Ct 値を求めた。

4. ゴールデンハムスターへのウイルス接種

4 週齢のゴールデンハムスターに Puumala 型ハンタウイルスの Sotkamo 株を 3.3×10^3 ffu/head で皮下接種した。接種後 3 日、7 日、14 日、28 日、42 日、55 日、および 70 日目にそれぞれ 2~3 匹の動物から血液及び各臓器を採取した。

C. 研究結果および考察

ストックウイルス液を用いて、今回開発を行った抗原 ELISA でウイルスの NP が検出できるかどうかについて検討を行った。その結果、ウイルスの感染価と ELISA の吸光度との間にほぼ直線的な関係が得られたことから、本 ELISA によって NP が定量的に検出できることが可能となった。次にウイル

ス RNA の S 遺伝子を標的とした TaqMan Real-time PCR 法の確立を試みた。蛍光強度が 0.2 を上回る PCR のサイクル数を Ct 値としたところ、Ct 値はウイルス感染価とウイルス遺伝子のいずれに対しても相関係数 0.98 以上の強い正の相関を示すことが明らかになった。したがって、本 Real-time PCR により、ウイルス遺伝子の定量的な検出が可能になった。

Puumala 型ハンタウイルスの感染動物としての有用性を明らかにするために、ゴールデンハムスターにウイルスを接種し、抗原 ELISA と Real-time PCR で肺中のウイルスの検出を行った。ハムスターにウイルスを接種後、採材に供するまで毎日動物の観察を行ったが、死亡及び元気消失は見られなかった。抗ハンタウイルス抗体は接種後 14 日目から上昇し始め、28 日目以降から 70 日目まで一定のレベルを維持し続けた。NP は接種後 7 日目で検出され始め、14 日目にもっとも多量に発現した。しかし 28 日目以降は検出されなくなった。ウイルス遺伝子は接種後 3 日目から 70 日目まで継続的に検出されたが、14 日目でピークを迎え、若干減少した後、28 日目から 70 日目までほぼ一定のレベルを維持した。これらのことからゴールデンハムスターは臨床症状は示さないものの、Puumala 型ハンタウイルスに感受性であることが明らかになった。

D. 結論

今回開発を試みた抗原検出 ELISA と Real-time PCR で Puumala 型ハンタウイルスが定量的に検出できることが明らかになった。また、自然宿主であるヨーロッパヤチネズミを除き、Puumala 型ハンタウイルスが成熟した実験

動物においてよく増殖する系はこれまで存在しなかったことから、本モデルがワクチン開発などの評価系として有用である可能性が示唆された。今後は本モデルにおいて、ワクチン候補物質を投与後、ウイルスによる攻撃実験を行い、本モデルの有用性について、さらに検討する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 苅和宏明 ハンタウイルス感染症 Virus Report 2005; 2(2): 27-34.
- 2) 高島郁夫、早坂大輔、後藤明子、好井健太郎、苅和宏明 日本と極東ロシアのダニ媒介性脳炎ウイルスの系統解析と病原性 ウイルス 2005; 55(1): 35-44.
- 3) Kogaki H, Uchida Y, Fujii N, Kurano Y, Miyake K, Kido Y, Kariwa H, Takashima I, Tamashiro H, Ling AE, Okada M. Novel rapid immunochromatographic test based on an enzyme immunoassay for detecting nucleocapsid antigen in SARS-associated coronavirus. J Clin Lab Anal. 2005; 19(4):150-9.
- 4) Yoshii K, Hayasaka D, Goto A, Kawakami K, Kariwa H, Takashima I. Packaging the replicon RNA of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus into single-round infectious particles: development of a heterologous gene delivery system. Vaccine. 2005; 23(30):3946-56.
- 5) Shirato K, Miyoshi H, Kariwa H, Takashima I. Related Articles, Links Detection of West Nile virus and

- Japanese encephalitis virus using real-time PCR with a probe common to both viruses. *J Virol Methods*. 2005; 126(1-2):119-25.
- 6) Goto A, Yoshii K, Obara M, Ueki T, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion. *Vaccine*. 2005; 23(23):3043-52.
2. 学会発表
- 1) 苅和宏明：野生げっ歯類を対象としたハンタウイルス感染症の比較疫学的研究：第 139 回 日本獣医学会学術集会、和光(2005,3)
- 2) 谷川洋一、苅和宏明、萩谷友洋、Nandadeva Lokugamage、Kumari Lokugamage、館敦史、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：野生げっ歯類からのハンタウイルス抗原検出用 ELISA の開発：第 139 回 日本獣医学会学術集会、和光(2005,3)
- 3) 野田寛、苅和宏明、浅野淳、安居院高志、倉野義裕、内田好昭、藤井信之、高島郁夫：重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスに対するモノクローナル抗体エピトープ解析：第 139 回 日本獣医学会学術集会、和光(2005,3)
- 4) 野田寛、苅和宏明、浅野淳、安居院高志、倉野義裕、内田好昭、藤井信之、岡田政久、高島郁夫：重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスのヌcleoキャプシドに対するモノクローナル抗体の性状解析：第 140 回 日本獣医学会学術集会、鹿児島(2005, 9-10)
- 5) 谷川洋一、苅和宏明、萩谷友洋、Nur Hardy Bin Abu Dand、Nandadeva Lokugamage、Kumari Lokugamage、館敦史、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：ゴールデンハムスター(*Mesocricetus auratus*)における Puumala 型ハンタウイルスの感染様式の解析：第 140 回 日本獣医学会学術集会、鹿児島(2005, 9-10)
- 6) 伊川綾恵、好井健太郎、川上和江、後藤明子、小原真弓、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス組み換え蛋白を用いた ELISA 法による野鼠血清スクリーニング法の開発：第 140 回 日本獣医学会学術集会、鹿児島(2005, 9-10)
- 7) 中村一郎、吉松組子、奥村恵、YANAGIHARA Richard、苅和宏明、高島郁夫、有川二郎：食虫類由来ハンタウイルス(トツタパラセンウイルス)のシンクスにおける感受性の検討：第 140 回 日本獣医学会学術集会、鹿児島(2005, 9-10)
- 8) 好井健太郎、後藤明子、小原真弓、伊川綾恵、苅和宏明、高島郁夫：フラビウイルス prM 蛋白のアミノ酸配列保存領域のウイルス粒子出芽への影響：第 53 回 日本ウイルス学会、横浜(2005, 11)
- 9) 伊川綾恵、好井健太郎、後藤明子、小原真弓、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス組み換え蛋白を用いた ELISA 法による野鼠血清スクリーニング法の開発：第 53 回 日本ウイルス学会、横浜(2005, 11)

- 10) 苅和宏明、谷川洋一、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：ゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*)における Puumala 型ハンタウイルスの感染様式の解析：第 53 回 日本ウイルス学会、横浜(2005, 11)
- 11) 中村一郎、吉松組子、奥村恵、垂石みどり、苅和宏明、高島郁夫、有川二郎： タイランド型ハンタウイルス感染症の血清診断系の開発：第 53 回 日本ウイルス学会、横浜(2005, 11)
- 12) Yoshii K, Goto A, Hayasaka D, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Single point mutation in tick-borne encephalitis virus prM protein induces a reduction of virus particle secretion. 13th International Congress of Virology. San Francisco, U.S.A., 2005, July.
- 13) Arikawa J, Pattamadilok S, Lee B-H, Kumperasart S, Yoshimatsu K, Okumura M, Nakamura I, Araki K, Khoprasert Y, Dangsupa P, Panlar P, Jandrig B, Kruger DH, Klempa B, Jakel T, Schmidt J, Ulrich R, Kariwa H. Serological detection and antigenic and genetic characterization of Thailand virus, genus hantavirus, in humans and rodents in Thailand. 13th International Congress of Virology. San Francisco, U.S.A., 2005, July.
- 14) Takashima I, Shirato K, Goto A, Kariwa H. Viral envelope glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. 13th International Congress of Virology. San Francisco, U.S.A., 2005, July.
- 15) Kariwa H, Lokugamage K, Lokugamage N, Miyamoto H, Iwasa MA, Hagiya T, Araki K, Tachi A, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Genetic and antigenic characterization of hantavirus isolates in Amur and Far East genotypes. 13th International Congress of Virology. San Francisco, U.S.A., 2005, July.
- 16) Kariwa H, Tanikawa Y, Lokugamage K, Lokugamage N, Nur Hardy Bin Abu Daud, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Puumala virus infection in several rodent species of laboratory animal.
- 17) Yoshii K, Konno A, Goto A, Hayasaka D, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Single point mutation in tick-borne encephalitis virus prM protein induces a reduction of virus particle secretion. 13th International Congress of Virology. San Francisco, U.S.A., 2005, July.

野生齧歯類および節足動物に由来する感染症の診断、疫学および予防に関する研究

ハンタウイルス感染症の診断法の開発に関する研究

分担研究者 有川 二郎 北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設 教授

研究要旨: 昨年度までの研究で、アジアにおけるハンタウイルス感染症の流行を診断するために、新たに2種類のハンタウイルス(Thailand (THAIV))および Thottapalayam virus (TPMV)の血清診断用 NP 抗原を開発した。また、モノクローナル抗体 E5/G6 の認識する NP 上のエピトープも決定した。この結果に基づき今年度は、TPMV 抗原に E5/G6 認識エピトープを導入し抗原固着のためのタグ配列を持つ診断抗原を開発した。この抗原を用いて E5/G6 抗体で Hantaan (HTNV), Puumala (PUUV), SinNombre (SNV), TPMV の4種類の組み換え抗原を同等にプレートに固着して ELISA を行うことが可能となり、ハンタウイルス血清抗体網羅的スクリーニングシステムが完成した。HTNV に陽性の場合にはさらに、HTNV/SEOV/DOBV/THAIV の鑑別 ELISA によって簡便に罹患ウイルスタイプを決定することが可能となった。このシステムを用いて、タイの不明熱患者から TPMV 抗体陽性例を、ベトナムの健常人・不明熱患者・港湾労働者血清から SEOV 抗体陽性例を、さらに、インドの不明熱患者血清から THAIV 罹患と思われる例を見いだした。さらにインドネシアで捕獲されたスunks に抗体陽性例を見いだした。本システムを用いて疫学的調査を拡大することで、新たな感染例が明らかになってゆくと考えられる。

A. 研究目的

ハンタウイルス感染症は、げっ歯類媒介性の人獣共通感染症で、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)が知られている。ハンタウイルスのうち、Hantaan (HTNV)、Seoul (SEOV)、Dobrava (DOBV) および Puumala (PUUV)の少なくとも4つの血清型

が HFRS の原因となる。また SinNombre virus を始めとするアメリカネズミ亜科のげっ歯類によって媒介されるハンタウイルスは HPS の原因ウイルスである。HTNV および SEOV および DOBV はネズミ亜科のげっ歯類、そして PUUV はハタネズミ亜科のげっ歯類によって媒介される。3つのグループのウイルスは互い

に抗原性が大きく相違し交差反応性が低いことから、ハンタウイルス感染症の血清診断を行うためには少なくとも3種類の抗原が必要であると考えられる。また、げっ歯類からハンタウイルス抗原を検出する場合でも、3種類の抗血清が必要である。

南アジア地区はげっ歯類の発生した地域と考えられており、げっ歯類の種類が豊富である。また、研究報告は少ないもののこれまでに、病原性との関連が明らかでないハンタウイルスが数多く報告されている。不明熱とされている中にハンタウイルス感染症が存在する可能性も考えられている。インドにおいて食虫目のスルクスより分離されたハンタウイルス Thottapalayam virus (TPMV) は最も特殊なハンタウイルスである。げっ歯類でも、タイの *Bandicota indica* から分離された THAIV が報告されている。本研究では、これらのウイルスに罹患した患者あるいは齧歯類・食虫類を検出することを目的として、TPMV 診断抗原に改良を加えた。すなわち、これまでに確立した診断抗原と同様にモノクローナル抗体 E5/G6 のエピトープをタグを導入し、既報の各種ハンタウイルス抗原と同時に 抗原捕捉 ELISA を行うことによって血清の反応性を比較検討できる系を確立した。

B. 研究方法

ウイルス：TPMV はハワイ大学の R. Yanagihara 博士から、THAIV は韓国の HFRS reference center より分与された。

「抗原」：TPMV および THAIV を VERO E6 細

胞に感染させ、ガラスプレート上に固着後アセトン固定し、間接蛍光抗体法(IFA)抗原とした。また、感染細胞は SDS で処理し、Western blotting 抗原とした。TPMV NP の全長(アミノ酸：全長抗原)をプラスミドベクターを用いてバキュロウイルスベクター (AcNPV:BAC-TO-BAC GIBCO BRL)を用いて昆虫細胞(High Five)に発現させた。その際、昨年度の分析結果を考慮し、3カ所のアミノ酸変異を導入し E5/G6 抗体との反応性を確保した。組み換えバキュロウイルス感染細胞は SDS で処理し、Western blotting 抗原とした。また、ガラススライドに固着後アセトン固定し IFA 抗原とした。

「ELISA、Western blotting, 中和試験」：Western blotting 中和試験は既報の方法に従った(Reference)。

「患者血清、免疫血清」：HTNV/SEOV に感染した中国・韓国・日本の患者血清、タイおよびインドの不明熱患者血清、インドネシアで捕獲されたスルクス血清を用いた。TPMV を接種したマウス血清・スルクス血清、組み換え核蛋白を免疫されたウサギ血清を用いた。

(倫理面からの配慮について)

用いた感染血清(患者血清)は何れも、韓国、中国、タイ、インドの研究所から分与されたものである。当該研究所で既に研究目的で使用が認められているものであり、さらに無記名で分与されたものであることから、倫理面からの問題は無い。各種免疫血清の採血は、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものであり、

動物福祉の観点からも問題はないと判断された。

C. 研究結果

TPMV:E5/G6 抗体エピトープタグを導入した組み換え TPMV 抗原は E5/G6 抗体と結合することが IFA で確認された。一方、野生型組み換え TPMV 抗原は反応しなかった。また、タグ導入抗原に対し TPMV 感染マウス血清は IFA 抗体価 12800 と強く反応し、これは野生型組み換え抗原と同等の反応であることから、導入したタグが感染時に誘導される抗体の反応性に影響を与えないことが明らかとなった。このタグ導入抗原を E5/G6 抗体を用いてプレートに固着し、ELISA 系の検討を行った。大腸菌発現組み換え TPMV 抗原に対するウサギの抗血清、TPMV 感染スunks血清を陽性コントロールとして用いて ELISA 系の最適化を行った。

疫学的研究成果： タイ国立衛生研究所の Sirima Patamadilok と共同で進めている疫学調査において、IFA で TPMV に何らかの反応を示した不明熱患者 11 血清（検査総数 194 血清/158 患者由来、デング熱、日本脳炎、レプトスピラ症検査陰性）について、今年度開発した TPMV 診断 ELISA, Western blot, 中和試験を行った。その結果、同一患者からの 2 血清が低いながらもすべての試験法で抗体が検出され、TPMV 関連ウイルスのヒトへの感染を示唆する初めての例となった。しかしながら、この抗体は急性期および回復期で抗体価の変化がなく、IgM 抗体も検出されなかったことから、疾患との関連は不明である。さらにインドネシ

ア国立衛生研究所 Ima Nurisa Ibrahim と共同で進めている疫学調査において、ジャカルタ近郊の Thousand island 諸島で捕獲された 11 匹のスunksのうち 2 匹から抗 TPMV 抗体が検出された。そのうち一匹では WB 抗体および中和抗体も確認された。また、同地域のドブネズミおよびクマネズミからは多数の抗 SEOV 陽性例が検出された。種の特定とともに現在解析を進めている途中である。また、84 例の不明熱患者血清については 1 例の抗 SEOV 抗体が検出されたが抗体価は低く IgM は検出されなかった。インド南部の都市 Verolle のキリスト教病院に所属する Sara Chandy と進めている疫学調査において、インドで行われた市販キットによる検査（母数不明）で陽性例となったものの 12 例のうち 4 例で抗ハンタウイルス抗体を検出した。うち 3 例：腎機能不全患者、1 例：不明熱患者であった。また上記 4 例のうち 2 例が鑑別 ELISA で THAIV 型の感染が示唆され、2 例は鑑別不能であった。ベトナム国立衛生研究所の Truong Ninh と共同で進めている疫学調査において、ベトナム北部 8 省由来の健康人・不明熱患者・港湾労働者合計 2500 名について調べたところ、北部 3 省由来の 12 例（Haiphong 港の労働者 6/150, Thanh Hoa 省患者 3/146, HaNam 省の健康人 2/158 患者 1/58、から抗体が検出された。血清型鑑別 ELISA の結果、多くが SEOV 感染によるものと考えられたが、HaNam および Thanh Hoa 省の陽性例では鑑別不能の例も得られた。齧歯類については、Than Hoa 省、Ha Nam 省、Tay Nguyen 省から得られた 255 例の齧歯類農地

HaNam 省および Tay Nguyen 省から得られた血清に 7/48, 1/61 とそれぞれ陽性例が確認された。また、Haiphong 港で捕獲されたラット類で 14/120 の陽性が確認された。

D. 考察

昨年度までに進めていた TPMV についての抗原性の解析およびエピトープタグの解析を基にエピトープタグを持つ TPMV 抗原を作成した。これですべてのハンタウイルス感染症をスクリーニングすることが可能となる 4 種類の診断抗原をそろえることができた。すなわちユーラシア大陸で HFRS の原因となるハンタウイルスを検出する HTNV, PUUV 抗原、および、アメリカ大陸で HPS の原因となるウイルスを検出するための SNV 抗原、および食虫目由来ハンタウイルスを検出する TPMV 抗原である。HTNV 関連ウイルスのうち病原性を持つことが知られている HTNV, SEOV, DOBV, THAIV に関しては血清型鑑別診断 ELISA の構築が終了し、迅速に血清型を予測することができる。

本年度は、完成したシステムを用いて一部の疫学調査を開始した。その結果、ヒトで初めて TPMV 関連ウイルスに感染した疑いのある抗体陽性例が見つかった。この血清はタイの不明熱患者由来ではあるが、本症例はラオスで発症した後タイの病院を受診したラオス人であるため、タイではなくラオスで感染した可能性がある。今後どのように調査をすすめてゆくか慎重に計画する必要がある。また、インドネシアのスンクスで陽性例が見つかったが、1960 年

代にインドで捕獲されたスンクスから TPMV が分離されて以来、スンクスの疫学調査は行われておらず、本当に TPMV がスンクス由来であるのか明らかではなかった。そのため、この抗体陽性例の存在は TPMV の分布を考える上で重要である。また、インド Verolle 周辺のハンタウイルス抗体陽性例を血清型鑑別 ELISA で調べた結果、THAIV 感染が示唆される例と、鑑別不能例が見つかった。このことは THAIV の自然宿主である *Bandicota indica* がインドにも広く分布していることに関連すると考えられる。しかしながら、鑑別不能例の存在は、インド南部に新規の HTNV 関連ウイルスが存在する可能性を示唆している。また、ベトナムでは港湾地区を中心に SEOV 感染がヒトおよびラットで確認されたが、内陸部の陽性例に鑑別不能例が確認されている。これらの結果はアジア地区においてハンタウイルスが予想以上のバリエーションで存在し、ヒトに感染しうることを示唆すると考えられるが、例数を重ねたさらなる解析が必要と考えられる。

また、インド南部の Verolle は TPMV が分離された地域でもある。今回はこの地域で TPMV 感染例は見つからなかったが、今後ヒトおよびスンクスにおける TPMV 感染にも注意を払って疫学的調査を続けてゆく必要がある。TPMV が分離されたインド、ヒトの感染例が見いだされたラオス、そしてスンクスの感染例が見つかったのがインドネシアという結果から、TPMV が東南アジア、南アジアの広範囲にスンクスの分布にあわせて存在する可能性が考えられる。

E. 結論

本研究によって、TPMV, THAIV を加えたさらに広範囲なハンタウイルス感染症の血清診断体制を整えた。さらに、広範囲な疫学的調査を開始し、スンクスが真に TPMV の自然宿主であり、ヒトへ感染しうることを示唆する結果を得た。また、インドおよびベトナムでの調査の結果から未知のハンタウイルス感染症(HTNV 関連ハンタウイルスに含まれる)の発見が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Schmidt, J., Jandrig, B., Klempa, B., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Meisel, H., Niedrig, M., Pitra, C., Kruger, D.H. and Ulrich, R.: "Nucleocapsid Protein of Cell Culture-Adapted Seoulvirus Strain 80-39: Analysis of its Encoding Sequence, Expression in Yeast and Immuno-Reactivity." *Virus Gene*, 30(1)37-48 (2005)
- 2) S. Chandy, S. Mitra, N. Sathish, T.S. Vijayakumar, O.C. Abraham, M.V. Jesudason, P. Abraham, K. Yoshimatsu, J. Arikawa & G. Sridharan: "A pilot study for serological evidence of hantavirus infection in human population in south India" *Indian J Med Res* 122, 211-215(2005)
- 3) Lee B-H, Yoshimatsu K, Araki K, Okumura M, Nakamura I, Arikawa J, "A pseudotype vesicular stomatitis virus containing Hantaan virus envelope glycoproteins G1 and G2 as an alternative to hantavirus vaccine in mice." *Vaccine* in press.

2. 学会発表

- 1) Yoshimatsu K, Arikawa J, Kariwa H, "Rattus and its close allies as hosts and vectors for viral diseases." IX International Mammalogical Congress. Sapporo, Japan (2005.7-8).
- 2) Pattamadilok, S., Lee, B.H., Kumperasart, S., Yoshimatsu, K., Okumura, M., Nakamura, I., Araki, K., Khoprasert, Y., Dangsupa, P., Panlar, P., Jandrig, B., Kruger, D.H., Klempa, B., Jakel, T., Schmidt, J., Ulrich, R., Kariwa, H. and Arikawa, J.: "Serological detection and antigenic and genetic characterization of Thailand virus genus Hantavirus in humans and rodents in Thailand." XIII International Congress of Virology, San Francisco, California, USA, Moscone Convention Center (2005.7)
- 3) Kariwa, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Iwasa, M. A., Hagiya, T., Araki, K., Tachi, A., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.: "Genetic and Antigenic Characterization of Hantavirus Isolates in Amur and Far East Genotype." XIII International Congress of Virology, San Francisco, California, USA, Moscone Convention Center (2005.7)
- 4) Matsuura Y, Yoshimatsu K, Suzuki M, Yokoyama M, Igota H, Arikawa J, "prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in wild sika deer in Japan." The 1st Scientific Meeting of the Asian Zoo & Wildlife Medicine. Bangkok, Thailand (2005. 10).

5) 木村享史、澤 洋文、片倉 賢、中村一郎、有川二郎、松本芳嗣、R.P.V.Jayanthe Rajapakse、高島郁夫、梅村孝司：スリランカ津波被災地ならびにその近郊に生息する野生げっ歯類の病理学的検査、第 140 回日本獣医学会学術集会 鹿児島 (2005.9)

6) 谷川洋一、苺和宏明、Nur Hardy bin Abu Daud, Nandadeva Lokugamage, Kumari Lokugamage、館 敦史、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：ゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*) における Puumala 型ハンタウイルスの感染様式の解析、第 140 回日本獣医学会学術集会 鹿児島 (2005.9)

7) 中村一郎、吉松組子、奥村 恵、Yanagihara Richard、苺和宏明、高島郁夫、有川二郎：食虫類由来ハンタウイルス (トッタパラヤンウイルス) のスカンクにおける感受性の検討、第 140 回日本獣医学会学術集会 鹿児島 (2005.9)

8) 谷川洋一、苺和宏明、萩谷友洋、Nandadeva Lokugamage, Kumari Lokugamage、館 敦史、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：野生げっ歯類からのハンタウイルス抗原検出用 ELISA の開発、第 139 回日本獣医学会学術集会 和光 (2005.3)

9) 苺和宏明、谷川洋一、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：ゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*) における Puumala

型ハンタウイルスの感染様式の解析、第 53 回日本ウイルス学会 横浜 (2005.11)

10) 奥村 恵、吉松組子、荻野倫子、中村一郎、垂石みどり、有川二郎：Thottapalayam 型ハンタウイルスの血清診断法の確立、第 53 回日本ウイルス学会 横浜 (2005.11)

11) 中村一郎、吉松組子、奥村 恵、垂石みどり、苺和宏明、高島郁夫、有川二郎：タイランド型ハンタウイルス感染症の血清診断系の開発、第 53 回日本ウイルス学会 (2005.11)

12) 吉松組子、奥村 恵、垂石みどり、有川二郎：ハンタウイルスエンベロップ糖蛋白の分泌の解析、第 53 回日本ウイルス学会 (2005.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし