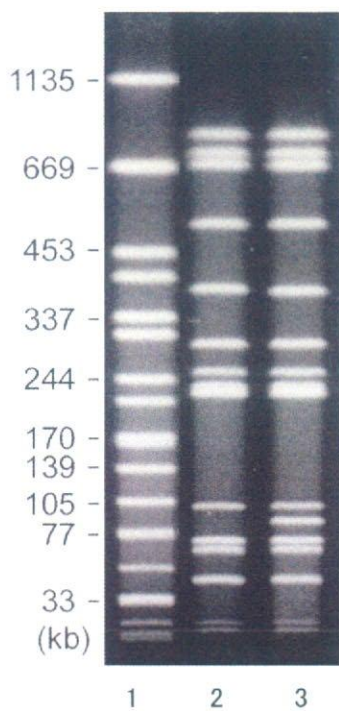
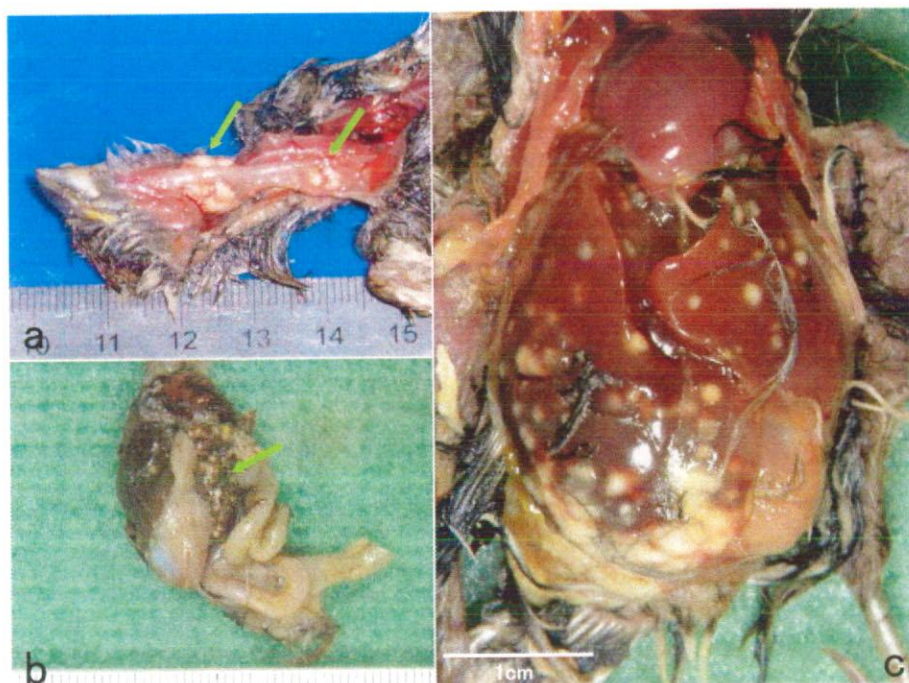


<Fig.1a> PFGE 法
 Line 1.死亡したスズメ肝臓由来
 Line 2.捕獲したスズメ肝臓由来
 Line 3.死亡したカンムリヅル脾臓由来
 Line 4. Molecular marker

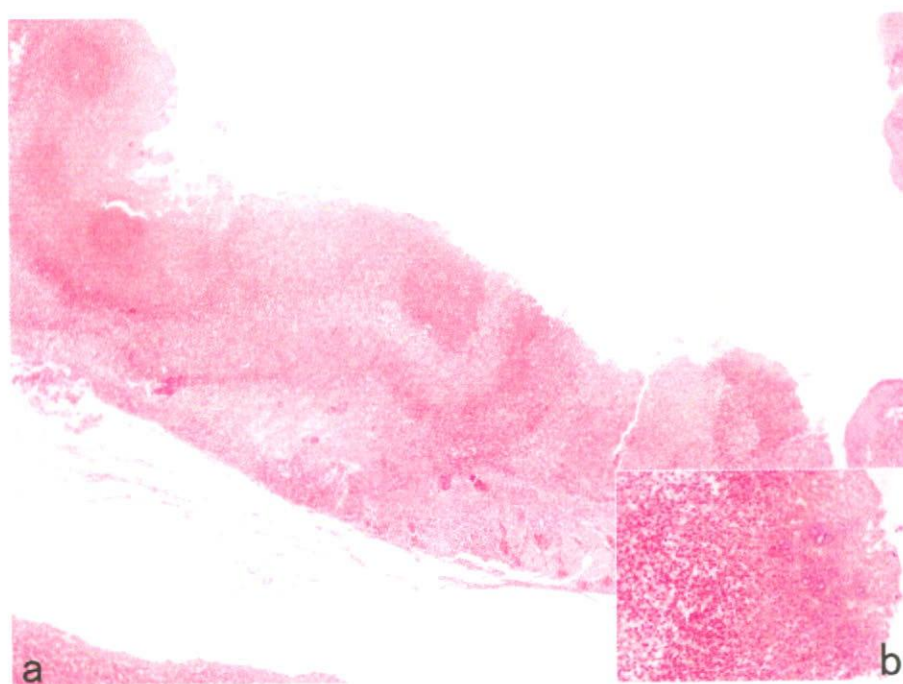


<Fig.1b> PFGE 法
 Line 1.Molecular marker
 Line 2.本州由来
 Line 3.北海道由来



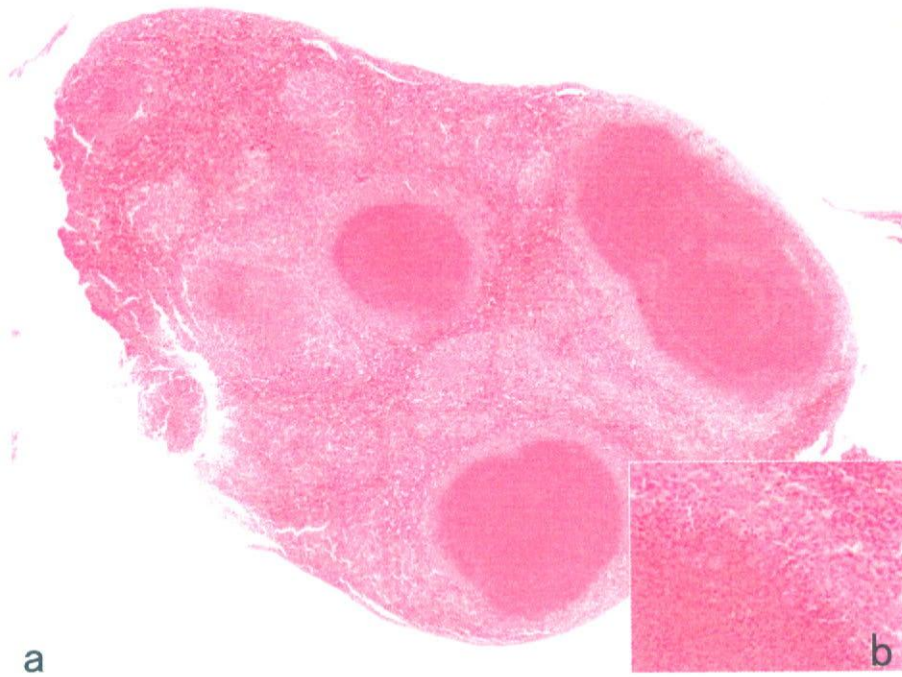
<Fig.2> 肉眼写真

- a) 頭頸部: 食道上部とそ嚢に粟粒大の白色結節の集合がみられる(矢印)。
 b) 腹腔諸臓器: 脾臓(矢印)は高度に腫大、針頭大～粟粒大の白色結節が多発している。
 c) 胸・腹腔全景: 肝臓は高度に腫大し、針頭大～粟粒大の白色結節が多発している。

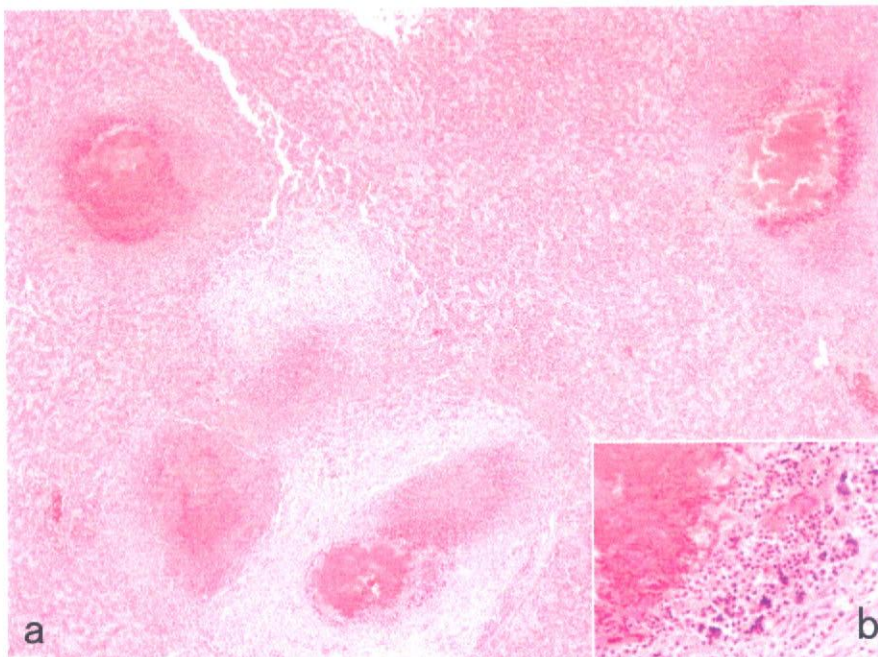


<Fig.3> 組織写真、HE 染色

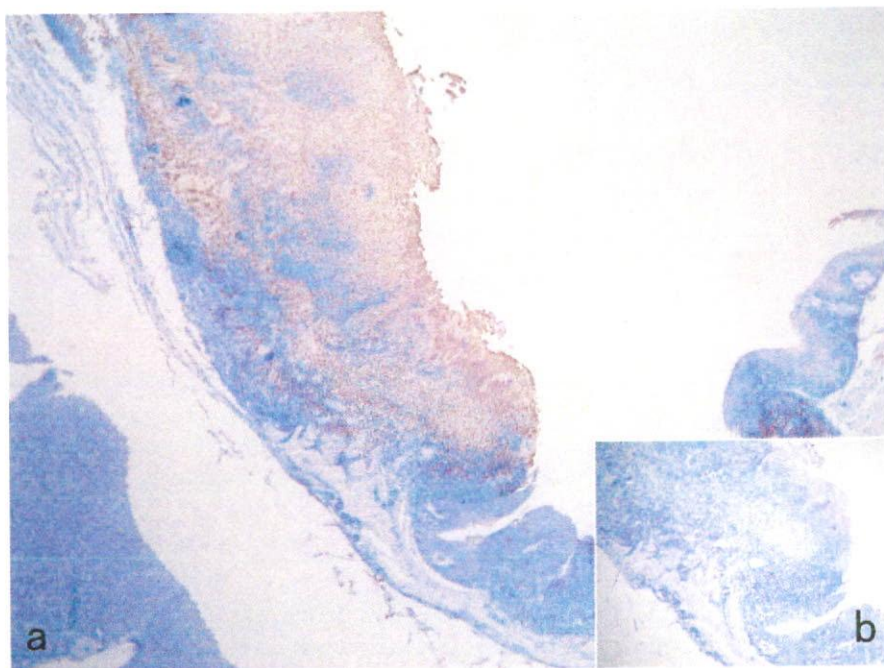
そ嚢: 貫壁性に壊死性化膿性炎が生じ(a)、壊死部には大量の菌塊が確認された(b)



〈Fig.4〉 組織写真、HE 染色
 脾臓：巣状壊死性化膿性炎が生じ(a)、壊死部には菌塊が観察された(b)

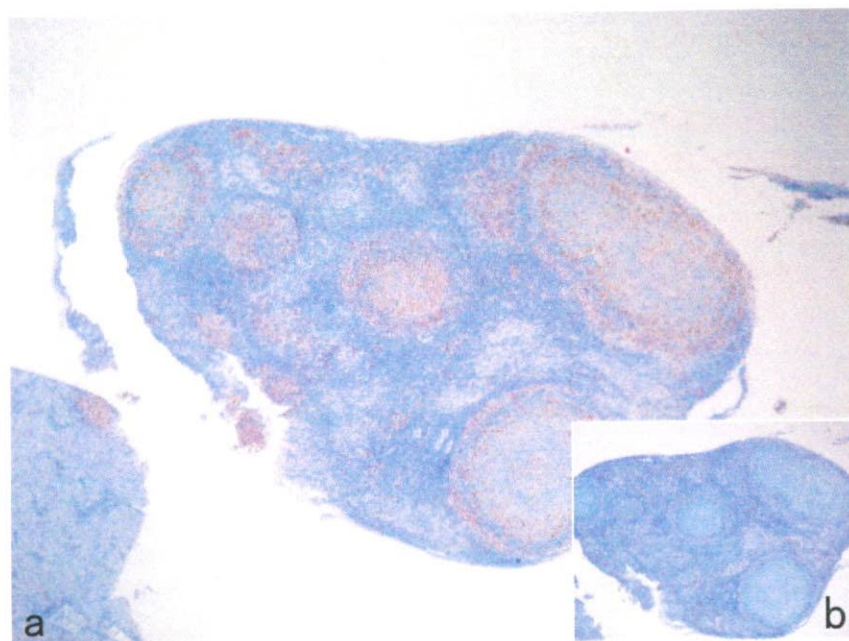


〈Fig.5〉 組織写真、HE 染色
 肝臓：多病巣性壊死性化膿性炎が生じ、肉芽腫の形成もみられ(a)、
 壊死部には多量の菌塊が観察された(b)



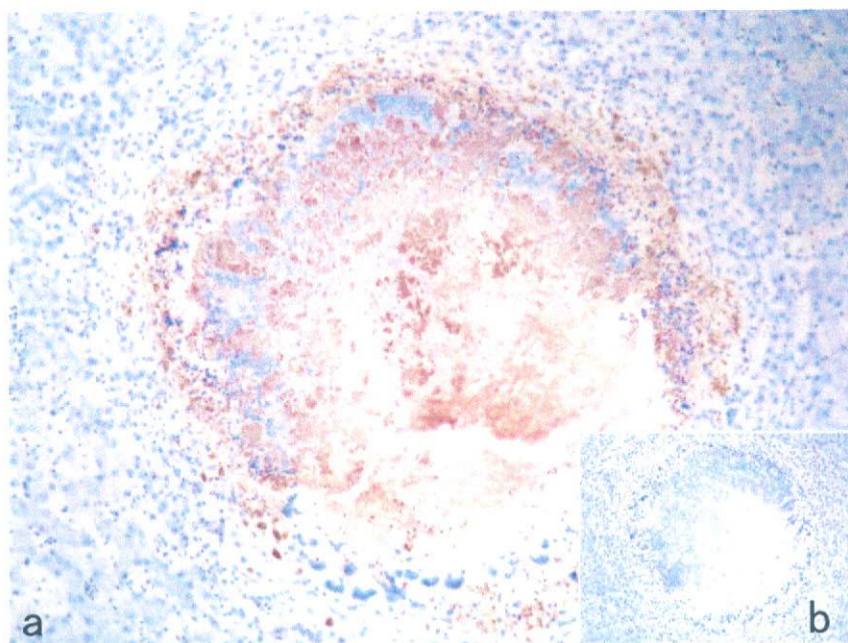
〈Fig.6〉 免疫染色.そ嚢

a)病変部に見られた菌体に一致して陽性像を示した b)Negative Control



〈Fig.7〉 免疫染色.脾臓

a)病変部に見られた菌体に一致して陽性像を示した b)Negative Control



<Fig.7> 免疫染色.肝臓

a)病変部に見られた菌体に一致して陽性像を示した b)Negative Control

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
分担研究報告書

動物由来感染症のコントロール法の確立に関する研究

5、危機管理対応のための診断技術開発に関する研究

分担研究者：森川茂（国立感染症研究所ウイルス第1部第1室長）

協力研究者：酒井宏治、水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、倉根一郎（同、ウイルス第1部）
池郁夫（理研 BRC）

研究要旨：リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)は、マウスを自然宿主とする動物由来感染症でラッサウイルスに近縁なアレナウイルスである。LCMV は、ウイルス蛋白のアミノ酸配列は良く保存されているが、遺伝子配列は同義置換が多いため、全てのウイルス株を網羅できる RT-PCR 用プライマーの設定が難しい。これまで、ウイルス特異的 primers を用いない Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV)法により、LCMV 検出が可能であることを明らかにした。近年、我々が分離した LCMV M1 株の S-segment の配列から、既知の LCMV と遺伝的距離があることが明らかになっているが、L-segment の全配列を決定し解析した結果、M1 株は昨年臓器移植により感染・死亡した患者から分離された LCMV-like arenavirus と近縁であることが明らかとなった。

A. 研究目的

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (Lymphocytic choriomeningitis virus; LCMV) はマウスを自然宿主とする動物由来感染症で、原因ウイルスはラッサウイルスなどと共に旧世界アレナウイルスに分類される。LCMV はマウスを自然宿主とするが感受性の高いハムスターからヒトへの感染が海外では報告されている。近年米国でハムスターから LCMV に感染したドナーからの臓器移植で死亡例が報告されている (N Engl J Med. 354: 2235-49, 2006)。さらに、昨年同一ドナーからの臓器移植で 3 名が死亡し、LCM-like ウイルスが同定されている (N Engl J Med. 358:991-998, 2008)。また、国内では理研 BRC がフランスから導入したマウス系統が LCMV に汚染していたことが 2005 年に明らかになっている (Comp Med,

57(3): 272-281, 2007)。このように、LCMV および近縁なウイルスの動物由来感染症としてのリスクは増大していると考えられる。これまで、LCMV の RT-PCR に関する文献 (Virology 1999, 257:73-83) で用いられている primer set による RT-PCR では、LCMV の検出は不十分で、米国での患者検体の場合も、国内でのマウスからの検出の場合も、原因となった LCMV 株の遺伝子配列が決定されてから、その株特異的な primers を設定することにより高感度な検出が初めて可能となっている。さらに、昨年の臓器移植に関連して死亡した患者からの LCM-like ウイルスの同定には、患者組織の RNA から増幅した DNA を 454 Life Science を用いた mega-sequence (数十万種類のシークエンスが数時間で行なえる) からウイルスが同定されている。

特に変異の多いウイルスへのPCR法の適用として、CODEHOP-PCR (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers-PCR)と Consensus-PCR 法がある。前者は、保存されているウイルス蛋白のアミノ酸配列から mixed primers をデザインして行なうPCR法であり、後者はこれまで既知の遺伝子配列から複数の primers をデザインして行なうPCR法である。LCMVは、例えばS-RNAにコードされるNPとGPのアミノ酸配列は良く保存されているが、遺伝子配列ではトリプレットの3番目に非常に変異が多い(同義置換の多い)ウイルスである。このため、遺伝子両末端と中央部分のヘアピン構造をとる部位のみ高度に保存されているが、他の領域ではウイルス株ごとに種々の同義置換が認められる。これまで、CODEHOP-PCR や Consensus-PCR 様の primers のデザインを試みたが全てのウイルス株に共通に適用できるような primers は見出せなかった。

最近、我々はウイルス感染培養細胞の上清や血清のような細胞のRNAが比較的少ない検体を対象として、ウイルスRNA由来cDNAの均等増幅と特殊な primers の組み合わせによる二次増幅によりウイルス由来 amplicons を single あるいは数個の産物として増幅する系を確立した (rapid determination of viral RNA sequences : RDV法; *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, 13: 322-4.)。RDV法では、遺伝子配列の決定まで遺伝子クローニングを必要としないため、未知のウイルスに対しても文部科学省の遺伝子組換え実験の承認を必要としない。また、RDV法は逆転写反応でランダムプライマーを用いるため、LCMVのように変異の多いウイルスの検出に適していると考えられる。昨年度は、既にゲノム配列の判明している LCMV 2株を対象にRDV法が適用できることを明らかにし、危機管理対応のための診

断技術として有用であることを示した。しかし、LCMVの様に変異は多いものの同一のウイルス種を標的とした遺伝子検出法の改良のためには、できるだけ多くのウイルス遺伝子情報を得る必要がある。本年度は、LCMV M1株が他の LCMV 株とSセグメントの配列による分子系統樹上距離があることがわかっているため、Lセグメントの全配列を決定しM1株の分子系統学的一を明らかにし、できるだけ多くの LCMV 株の遺伝子を検出できるプライマーを設定することを目的とした。

B. 方法

1. LCMV M1 株の L-segment の全塩基配列 : LCMV M1 株感染 Vero E6 細胞から RNA を抽出し、random hexamer primer で cDNA を合成した。これを鋳型に遺伝子配列既知の LCMV 株の配列情報から作製した primers あるいは、RDV 法により得られた M1 株の L-segment の部分配列情報から作製した primers を用いた PCR により全長をカバーする PCR 産物を得た。これらをダイレクトシーケンシングして L-segment の全配列を決定した。
2. LCMV M1 株の分子遺伝学的解析 : 得られた L-segment の配列及びこれまでに決定した S-segment の配列を Mega4 program により他の LCMV 等と分子遺伝学的解析を行なった。
3. LCMV 共通遺伝子検出法に用いられる primers の検討 : 得られた配列から既知のアレナウイルスの配列とのアライメントにより保存された領域に至適な primers を設定して検討した。

C. 結果

1. LCMV M1 株の L-segment の全塩基配列 : LCMV M1 株感染 Vero E6 細胞から RNA を抽出し、random hexamer

primer で cDNA を合成した。これを鋳型に遺伝子配列既知の LCMV 株の配列情報から作製した primers あるいは、RDV 法により得られた M1 株の L-segment の部分配列情報から作製した primers を用いた PCR により全長をカバーする PCR 産物を得た (図 1)。これらをダイレクトシーケンスして L-segment の全配列を決定した。その結果、L-segment は 7,244bases、S-segment は、3,376bases であった。

- LCMV M1 株の分子遺伝学的解析：得られた L-segment にコードされる Z 蛋白質、L 蛋白質のアミノ酸配列及びこれまでに決定した S-segment にコードされる GPC 蛋白質、N 蛋白質のアミノ酸配列を Mega4 program により他の LCMV 等と分子遺伝学的解析を行なった (図 2)。その結果、いずれのウイルス蛋白質のアミノ酸配列による分子系統学的解析でも、M1、M2 株は、昨年オーストラリアで臓器移植により感染した致死性 LCM 患者から分離されたウイルス (LCMV-like Dandenong virus) とフランスで死亡胎児 (羊水) から分離された LE 株に最も近縁であり、これらは既知の LCMV とは異なるグループを形成した。しかし、いずれのグループも、西アフリカで African pigmy mouse (*Mus Nannomys minutoides*) から検出された LCMV に近縁な Kodoko virus とは、明確に区別できた。
- LCMV 共通遺伝子検出法に用いられる primers の検討：M1 株、LE 株や Dandenong virus のように既知の LCMV とは異なるグループを形成するウイルスの存在が明らかになった。これらの塩基配列情報をもとに、L 蛋白質のポリメラーゼ活性領域の最も

保存された領域をアライメントして primers の至適化の検討を行った (図 3)。その結果、最近開発された旧世界アレナウイルス検出用の degenerated primers (Trans R Soc Trop Med Hyg. 101: 1253-64, 2007) が、M1 株に対しても非常に高感度に検出できる primers であった。

D. 考察

リンパ球性脈絡髄膜炎は、マウスを自然宿主とする旧世界アレナウイルスの LCMV 感染による動物由来感染症である。米国等では、無菌性髄膜炎、脳炎の一部が LCMV によることが明らかにされているが、日本では LCMV による無菌性髄膜炎等の報告はない。一方、これまで、LCMV のヒトへの感染は高感受性動物であるハムスターを介する感染が主体であったが、近年臓器移植に関連した、致死性 LCMV 感染がたびたび報告されている。この場合、ドナーが飼育していたハムスターから LCMV に感染していた。しかし、昨年オーストラリアで臓器移植に関連した 3 例の致死性 LCMV 感染のドナーは、ユーゴスラビア郊外旅行時に自然宿主からウイルスに感染したと考えられている。このように、LCM は動物由来感染症として注目されている。

近年、海外から導入したマウス系統から分離された LCMV は、これまで報告されていた LCMV 検出プライマーの内いくつかのプライマーを用いた RT-PCR で遺伝子が検出されたが、最終的には分離されたウイルス (M1、M2 株) の S-RNA の全遺伝子配列を決定して、この株特異的なプライマーで再検討した結果、同一系統のマウスの 100% がウイルスに感染していることが初めて明らかになった。このように、同義置換が非常に多い LCMV の様なウイルスの場合は、既知のウイルス遺伝子配列情報から作製さ

れたプライマーでは検出感度が低い、あるいは検出されないウイルス株がある。昨年度はウイルス特異的プライマーを用いないウイルス遺伝子増幅法 RDV 法により M1 株を含めた LCMV 遺伝子が検出可能であることを示した。しかし、LCMV を標的とする遺伝子検出では、ウイルス共通な degenerated primers による RT-PCR が最適化できれば、より高感度に LCMV が検出できる。そのためにはより多くのウイルス株の遺伝子配列情報が必要となる。このような観点から、遺伝的に既知の LCMV と離れている M1 株の L-segment の全遺伝子配列を決定し、これまで決定した S-segment 配列と併せて至適な primers のデザインを試みた。その結果、最近開発された旧世界アレンウイルス検出用の degenerated primers が、M1 株に対しても非常に高感度に検出できる primers であった。また、得られた配列情報から分子系統学的解析を行った結果、M1 株は昨年オーストラリアで臓器移植により感染した致死性 LCM 患者から分離されたウイルスに近縁であることが明らかとなった。この患者から分離されたウイルスと M1、M2 株は、既知の LCMV と遺伝的に有意な差があることから LCMV-like virus と言えるかもしれない。

E. 結論

海外から導入したマウス系統から分離された LCMV M1、M2 株は、昨年オーストラリアで臓器移植により感染した致死性 LCM 患者から分離されたウイルスに近縁であることが明らかとなった。これらのウイルスは、既知の LCMV と遺伝的に距離があるが、このようなウイルス遺伝子を検出できるシステムの構築が必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Yokoyama, M., Harashima, A., Sato, Y., Saijo, M., Morikawa, S., and Sata, T. : Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus, *J. Virol.*, 81(4):1848-57, 2007
2. Mizutani, T., Endoh, D., Okamoto, M., Shirato, K., Shimizu, H., Arita, M., Fukushi, S., Saijo, M., Sakai, K., Limn, C.K., Ito, M., Nerome, R., Takasaki, T., Ishii, K., Suzuki, T., Kurane, I., Morikawa, S., and Nishimura, H. : Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 13(2): 322-4, 2007.
3. Sakai, K., Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Endoh, D., Kurane, I., Takehara, K., and Morikawa, S. : An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences of avian RNA viruses. *Arch. Virol.* 152(9):1763-5, 2007
4. Saijo, M., George-Corbot, M., Philippe, M., Victor, R., Fukushi, S., Mizutani, T., George, A., Kurata, T., Kurane, I. and Morikawa, S. : Development of recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever. *Clin Vaccine Immunol.* 14(9):1182-9, 2007
5. Ike, F., Bourgade, F., Ohsawa, K., Sato, H., Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I., Takimoto, K., Yamada, Y.K., Jaubert, J., Berard, M., Nakata, H., Hiraiwa, N., Mekada, K., Takakura, A., Itoh, T., Obata, Y., Yoshiki, A., and Montagnutelli, X. : LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. *Comp. Med.*, 57(3): 272-281, 2007.
6. Morikawa, S., Saijo, M. and Kurane, I. :

- Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30(5-6):391-8, 2007
7. Morikawa, S., Saijo, M. and Kurane, I. : Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30(5-6):375-89, 2007
 8. Fukushi, S., Mizutani, T., Sakai, K., Saijo, M., Taguchi, F., Yokoyama, M., Kurane, I., and Morikawa, S. : Amino acid substitutions in S2 region enhance SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells. *J. Virol.* 81(19):10831-4, 2007
 9. Kihara Y, Satho T, Eshita Y, Sakai K, Kotaki A, Takasaki T, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Lapcharoen P, Sumroiphon S, Iwanaga S, Ushijima H, Endoh D, Miyata T, Sakata A, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. : Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in the field. *J Virol Methods.* 146(1-2):372-4, 2007
 10. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Sato Y, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Ami Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T. : Pathology and virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. *Int J Exp Pathol.* 88(6):403-14, 2007.
2. 学会発表
国内学会
1. 水谷哲也、木原悠希、佐藤朝光、江下優樹、酒井宏治、高崎智彦、小滝徹、遠藤大二、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、倉根一郎、森川茂「新興、再興ウイルスの網羅的検出方法、蚊媒介ウイルスへの応用」第 144 回日本獣医学会学術集会、江別、2007 年 9 月
 2. 酒井宏治、水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、遠藤大二、岡村雅史、中村政幸、竹原一明、倉根一郎、森川茂「改良網羅的ウイルスゲノム検出方法を用いた鳥由来ウイルスの同定」第 144 回日本獣医学会学術集会、江別、2007 年 9 月
 3. 水谷哲也、西村秀一、酒井宏治、前田健、清水博之、遠藤大二、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂「新興ウイルス感染症の網羅的検出方法の確立と応用」、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月
 4. 前田健、本道栄一、安本茂、遠藤大二、森川茂、水谷哲也「コウモリ由来ウイルスの分離・増殖のための新規培養細胞の樹立とその応用」、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月
 5. 酒井宏治、水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、遠藤大二、倉根一郎、森川茂「網羅的ウイルスゲノム検出方法を用いたリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) の同定」、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月
 6. 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代真人、田口文広「高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討」、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月
 7. 福士秀悦、前田健、平井明香、新倉綾、山田靖子、横山勝、吉川泰弘、水谷哲也、酒井宏治、西條政幸、倉根一郎、森川茂「コウモリ由来 ACE2 を用いた SARS コロナウイルスの感染性の解析」、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月

8. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎「SARS-CoV 感染動物モデルにおける加齢による免疫応答の相違」、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月

図1. M1株のL-segment配列決定法

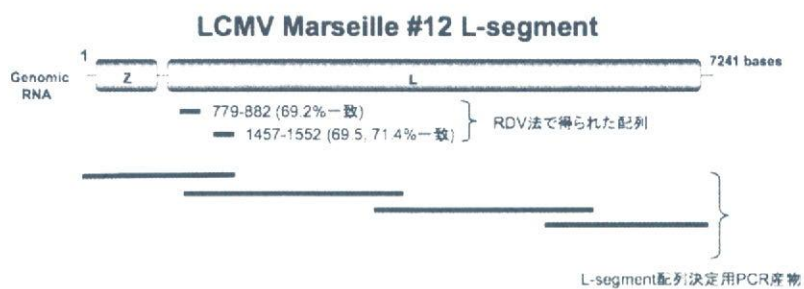
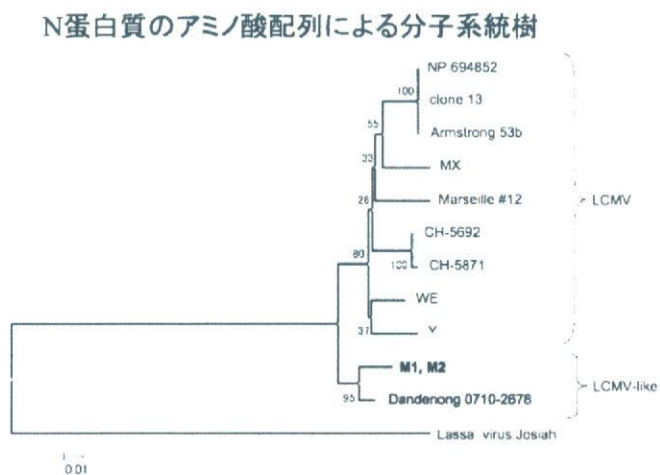
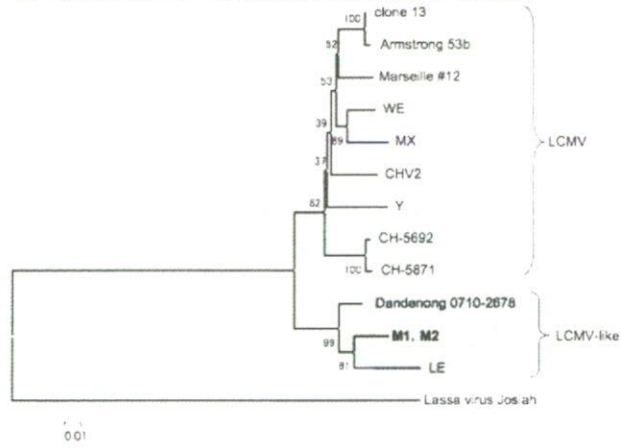


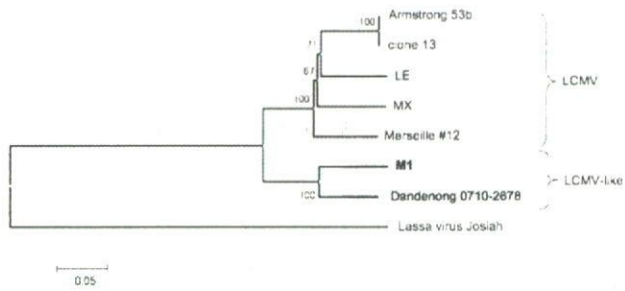
図2. 各ウイルス蛋白質のアミノ酸配列に基づく分子系統樹



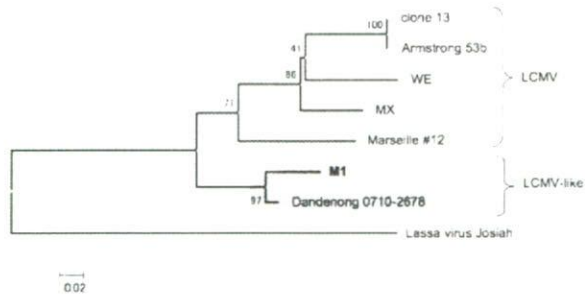
GPC蛋白質のアミノ酸配列による分子系統樹



L蛋白質のアミノ酸配列による分子系統樹



Z蛋白質のアミノ酸配列による分子系統樹



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究）事業
分担研究報告書

6. 翼手目由来感染症に関する研究

主任研究者 吉川 泰弘（東京大学大学院 農学生命科学研究科 教授）
協力研究者 大松 勉（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
上田 直也（東京大学 農学部）
伊波 興一朗（東京大学 農学部）

研究要旨

翼手目（以下、コウモリ）は、狂犬病ウイルスをはじめニパウイルス、ヘンドラウイルスの自然宿主であるほか、bat-SARS-CoV やエボラ出血熱ウイルス、マールブルグウイルスなどの自然宿主と考えられている。このようにコウモリは新興・再興感染症の病原体保有動物として極めて重要である(Fig.1)。

しかし、コウモリの免疫機能をはじめとする生理学的研究はほとんど行われておらず、コウモリ媒介感染症の科学的なリスク評価は困難である。そこで繁殖・飼育を行ったエジプトルーセットオオコウモリ及びデマレルーセットオオコウモリを対象として、免疫関連因子（自然免疫及び獲得免疫機能）の同定及び動態解析を行った。以前の報告で、ミトコンドリア DNA 及び CD4、IgFcRn、IFN- α 、 β などの解析及び IgG 抗原エピトープの類似性、コウモリ腎由来初代培養細胞及びコウモリ肺由来株化細胞における poly(I:C)およびコウモリ type I IFN 処置による type I IFN mRNA の発現誘導について報告した。本研究では、免疫関連因子として自然免疫において重要な因子である Toll-like receptors(TLR)について同定及び遺伝子解析を行った。また、宿主防御機構に影響を及ぼす外的因子として環境汚染物質の蓄積が考えられる。環境汚染蓄積性化学物質は免疫抑制作用や変異原性作用があることが知られている。

そこで環境汚染物質の蓄積が、コウモリにどのような影響を及ぼすかを評価するために、コウモリの薬物代謝酵素チトクローム P450(CYP)について、酵素活性の検索及び遺伝子同定を行った。コウモリの免疫機構及び他のリスク因子の解析は、今後のコウモリ媒介感染症の総合的なリスク評価に有用である。また海外委託研究の一環として、ポリロ島およびパナイ島での野生コウモリの捕獲を行い、保有微生物の調査を進めた。

A. 研究目的

新興感染症の科学的リスク評価には、従来型の病原体の疫学調査や病原性評価のみならず、媒介動物と病原体の相互作用を考慮に入れないと正確な評価は行えない。そのためには、媒介動物の特性を理解し、この相互作用に影響を与える様々な因子を総合的に評価することが重要である。コウモリは数多くの人獣共通感染症を媒介することが明らかになってきている。これは、コウモリが他の動物と比べて、特殊な生態学的、生理学的特徴を有していることに起因すると考えられる。従って、コウモリの免疫機構を始めとした生理機構及びその機構に影響を及ぼす因子の解析を行うことは野生動物由来感染症の制御にきわめて重要である。そこで本研究においてはコウモリの基礎情報として、その遺伝学的背景、免疫因子の特徴および生理的機能を明らかにし、加えて環境汚染など宿主防御機構に影響を及ぼす様々な因子のリスク評価を行い、コウモリ由来感染症の総合的なリスク評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. コウモリ免疫関連因子の遺伝子解析

本研究では、飼育・繁殖したデマレルーセットオオコウモリを用いた。デマレルーセットオオコウモリ脾臓由来 mRNA から cDNA を作成し、自然免疫に関与する **Toll-like receptors (TLR)** について蛋白コード領域の全長塩基配列を決定し解析を行った。

2. コウモリ肝臓における薬物代謝酵素の

活性

環境汚染は宿主防御機構に影響を及ぼすリスク要因の一つであることが知られる。そこで、コウモリに対する環境汚染のリスク評価系の作成を目的とし、生体において環境汚染物質代謝を担うチトクローム P450 (以下 CYP) の同定及び酵素活性の測定を行った。

2-1. コウモリ肝臓における CYP 活性の網羅的検索

コウモリの代謝系についての報告はほとんどない。そこで、コウモリの肝臓において、どのような薬物代謝酵素が発現し、活性を有しているかを検索するために、主要な CYP サブタイプについて酵素活性の検索を行った。コウモリの肝臓からミクロソーム分画を抽出し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて主要な CYP サブタイプの活性を測定した (Fig. 4)。

2-2. コウモリ CYP1A の遺伝子解析及び酵素誘導

またエジプトルーセットオオコウモリ肝 cDNA を作成し、CYP サブファミリーのうち、ダイオキシンなど主要な環境汚染物質の代謝を担う CYP1A のシーケンスを行い、アミノ酸配列の決定を行った。さらに、ダイオキシン様構造を有す β -naphthoflavone をエジプトルーセットに投与し、CYP1A 酵素活性の変動をみた。

C・D. 研究結果・考察

1. コウモリ免疫関連因子の遺伝子解析

TLR は、ウイルスや細菌など病原体の比

較的保存された構造を認識し、IFN の産生など自然免疫応答を誘導する分子である。TLRは現在までに13種類がデータベース上に報告されている。現在まで明らかになっているコウモリ媒介感染症のほとんどが、RNA ウイルスによるものである。従って我々は、RNA ウイルスの複製時に現れる二本鎖RNA 構造を認識するTLR3について遺伝子解析を行った(Fig. 2)。TLR3 の蛋白コード領域は2718bp、906 アミノ酸からなり、他の哺乳類と極めて類似した機能ドメインを有していた(Fig. 3)。現在、RNA ウイルスに関連するTLR7やTLR9といった他のTLRについても機能解析を行っている。今後、TLRと下流の因子の動態解析を行う予定である。

2. コウモリ肝臓における薬物代謝酵素の活性

2-1. コウモリ肝臓におけるCYP活性の網羅的検索

飼育しているコウモリ及び共同研究を行っているフィリピン大学の協力を得て捕獲したコウモリなど計17種のコウモリを用いてCYP活性の検索を行った。コウモリの肝臓では、CYP3Aと2Eの活性が高く、CYP1Aの活性はヒトに比べて高かった。また、コウモリではヒトで活性のみられる主要なCYPのうち活性の検出できないものが存在した。

2-2. コウモリCYP1Aの遺伝子解析及び酵素誘導

エジプトルーセットオオコウモリCYP1A1の蛋白コード領域は、1551塩基、516アミノ酸から構成されていた。他の哺乳類のCYP1A1と比較すると、相同性は約80%で、系統解析の結果、奇蹄目や食肉目と近縁で

あった(Fig. 5)。CYP1Aは、ダイオキシンなどの環境汚染物質暴露により誘導されることがしられ、環境汚染のバイオマーカーとして注目されているが、 β -naphthoflavone投与によりエジプトルーセットCYP1Aの活性が誘導されたことから、他の動物同様、CYPの活性及び発現量を用いた環境汚染評価が有用であることが示唆された。

今後、環境汚染物質暴露がコウモリの代謝、免疫機能にどのような影響を与えるかを検索する予定である。

E. 結論

これまで同定した因子の系統学的な解析により、コウモリは奇蹄目・食肉目・偶蹄目などとの近縁であることが示唆された。本研究では、現在までに多くのコウモリ免疫関連因子の同定及び機能解析が行われた。一方、コウモリの代謝機能については、コウモリの肝臓に発現する薬物代謝酵素の遺伝子及び活性、加えてダイオキシン類似物質によるCYP1A活性の誘導などの基盤情報が得られた。今後は、コウモリの免疫機能については、TLR作動時の下流因子の動態解析など、病原体と免疫関連因子の相互関係を検索する予定である。また、汚染物質暴露により免疫因子がどのような影響を与えるかについても検索する予定である。このように複合的な解析を行うことにより、コウモリ由来感染症の総合的なリスク評価法の確立を行う。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 大松勉・渡辺俊平・川口友浩・朴銀庭・石井寿幸・桑原正貴・遠矢幸伸・久和茂・明石博臣・吉川泰弘、翼手目の特性について、実験動物学会、神戸、2006年5月
 - 2) 上田直也・鈴木聡・由井志乃ぶ・佐藤哲男・大松勉・渡辺俊平・遠矢幸伸・久和茂・明石博臣・吉川泰弘、コウモリの肝代謝酵素チトクローム P450(CYP)の活性について、実験動物学会、神戸、2006年5月
 - 3) 上田直也・大松勉・由井志乃ぶ・鈴木聡・佐藤哲男・渡辺俊平・石井寿幸・遠矢幸伸・久和茂・明石博臣・吉川泰弘
コウモリの肝代謝酵素チトクローム P450(CYP)の活性の検出とその特徴について
獣医学会、山口、2006年9月
 - 4) T Omatsu, S Sekiguchi, M Suzuki, Y Ishii, S Kyuwa, Y Yoshikawa.
The histological studies of bat retina.
The American College of Veterinary Pathologists, 57th Annual Meeting, (Tucson, Arizona), December 2006
 - 5) Yasunhiro Yoshikawa, Joseph Masangkay, Zoonosis control from bat, AVPS/AWLA/JPSP、Joint symposium, August 2007, Taipei China
 - 6) Yasuhiro Yoshikawa, Zoonosis control Germany-Japan, Veterinary Association, Feb. 2007 Ohmiya, Japan
3. 論文発表
- 1) Omatsu T, Ishii Y, Kyuwa S, Milanda

EG, Terao K, Yoshikawa Y.

Molecular evolution inferred from immunological cross-reactivity of immunoglobulin G among Chiroptera and closely related species. *Exp Anim.*, JALAS, 52(5): 425-8.; 2003

2) Omatsu T, Nishimura Y, Bak EJ, Ishii Y, Tohya Y, Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y. Molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the bat CD4. *Vet Immunol Immunopathol.*, ELSEVIER, 111(3-4); 309-13.; 2006.

4) 大松勉、渡辺俊平、西村順裕、石井寿幸、朴銀庭、寺尾恵治、遠矢幸伸、久和茂、明石博臣、吉川泰弘
翼手目の特性について —系統的・免疫学的・分子生物学的検索—
獣医畜産新報 JVM 59:282-283, 2006.

5) Omatsu T, Watanabe S, Akashi H, Yoshikawa Y. Biological characters of bats in relation to natural reservoir of emerging viruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007 Sep;30(5-6):357-74.Review.

6) Tsutomu Omatsu, Eun-Jung Bak, Yoshiyuki Ishii, Shigeru Kyuwa, Yukinobu Tohya, Hiroomi Akashi, Yasuhiro Yoshikawa Induction and Sequencing of Roussette Bat Interferon alpha and beta genes *Veterinary Immunology and Immunopathology* (in press)

H. 知的財産権の出願・登録情報
なし

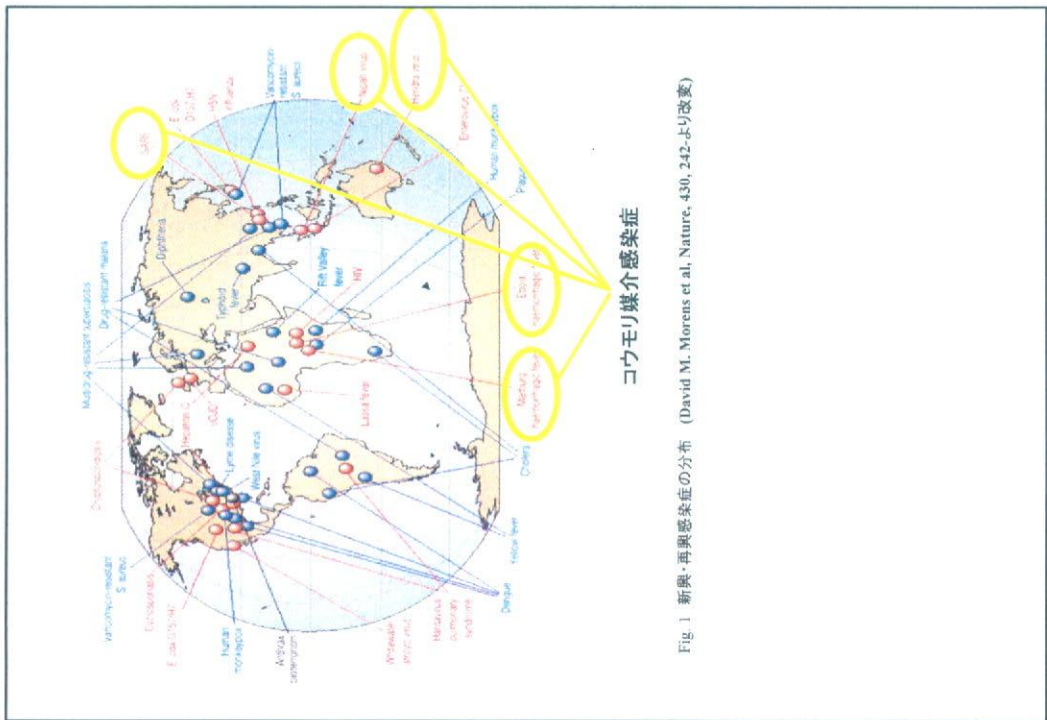


Fig. 1 新興・再興感染症の分布 (David M. Morens et al. Nature, 430, 242-より改変)

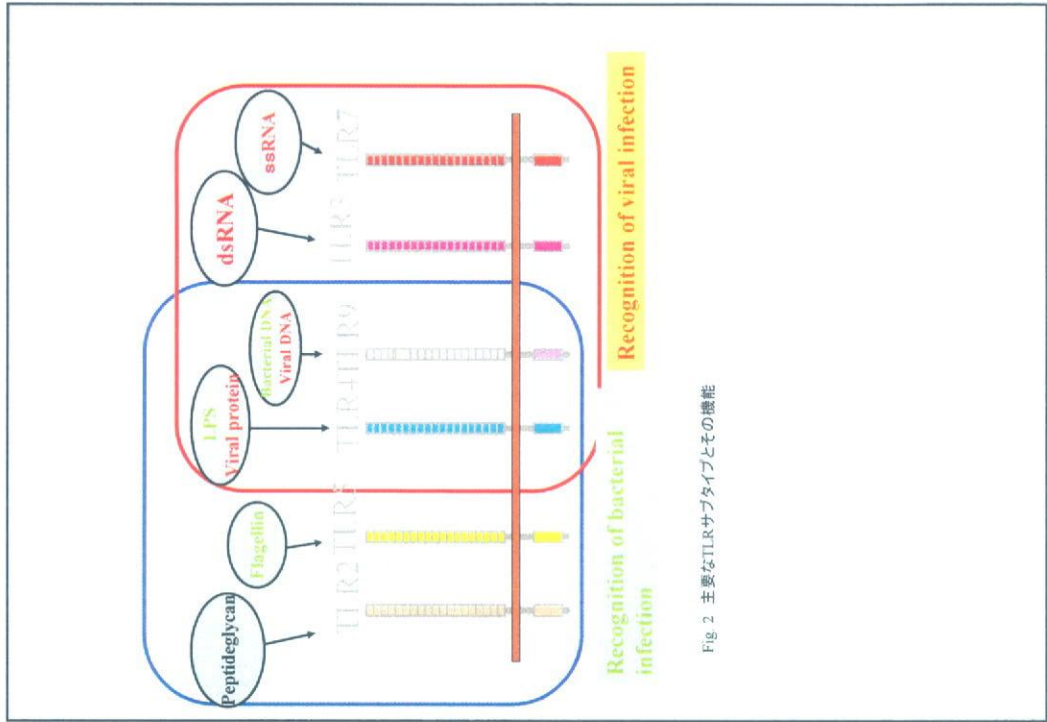


Fig. 2 主要なTLRサブタイプとその機能

