

20072604/A

厚生労働科学研究費

新興・再興感染症研究事業

国内で発生のないベクター媒介性感染症の
疫学診断法等の研究

平成 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 荻和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

平成 20 (2008) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- 国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断法等の研究 1
 荻和宏明

II. 分担者研究報告

1. ダニ媒介性脳炎ウイルスの疫学 15
 高島郁夫
2. ハンタウイルス感染症に関する研究 19
 有川二郎
3. Q熱の診断と疫学 24
 福士秀人
4. バルトネラ感染症の疫学 26
 丸山総一
5. *Salmonella* ならびに病原性 *Yersinia* の迅速遺伝子診断法の開発 29
 林谷秀樹
6. Loop-Mediated Isothermal Amplification 法を用いたサル痘ウイルス遺伝子
 増幅によるサル痘迅速診断法：西アフリカ型およびコンゴ盆地型サル
 ウイルスの鑑別を含めて 39
 西條政幸
7. げっ歯類媒介性感染症の病理学的検索 46
 長谷川秀樹
8. ダニ媒介性脳炎ウイルスのマウスモデルにおける接種量と致死性の解析
 50
 早坂大輔

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 53

IV. 研究成果の刊行物・印刷 55

I. 総括研究報告

国内で発生のないベクター媒介性感染症の 疫学診断法等の研究

苅和宏明

厚生労働科学研究費補助金(振興・再興感染症研究事業)

総括研究報告書

国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断等の研究

主任研究者 荻和宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 准教授

研究要旨

ハンタウイルス感染症について診断法を開発し、野生げっ歯類の調査に応用した。北海道の中川町と当別町の森林でエゾヤチネズミの捕獲調査を行い、ハンタウイルスのげっ歯類集団内での感染動態の解明を試みた。その結果、オスの抗体陽性率がメスのそれよりも有意に高かった。ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)の中空ウイルス様粒子(SPs)を用い、野鼠から抗 TBEV 特異抗体を検出する ELISA を開発した。TBEV のマウス感染モデルを用い、病原性発現機序を解析したところ、マウスの致死にはウイルスの神経細胞への直接障害に加え、宿主側の要因も大きく関わっていることが示唆された。野生げっ歯類における Q 熱病原体(*Coxiella burnetii*)の抗体保有状況を調査を行ったところ、北海道のエゾヤチネズミの 79%(69/87)とアカネズミの 56%(10/18)が抗体陽性であった。北海道の野鼠とネズミノミから *Bartonella* 属菌の分離や DNA 検出を行い、北海道の野鼠の 68%(36/53)、ネズミノミの 35%(14/40)が *Bartonella* 属菌を保有していた。*Salmonella* および病原性 *Yersinia* について、迅速かつ簡便な遺伝子検出法として multiplex PCR 法を開発した。サル痘の迅速診断法としての Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法を開発した。サル痘ウイルス感染サルの病理組織学的検索を行い、上皮系細胞とマクロファージにウイルス抗原が存在することが明らかになった。

研究分担者

高島郁夫・北海道大学・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・教授

林谷秀樹・東京農工大学・准教授

西條政幸・国立感染症研究所・室長

長谷川秀樹・国立感染症研究所・室長

早坂大輔・(財)東京都医学研究機構

東京都神経科学総合研究所・

主任研究員

A. 研究目的

ハンタウイルス感染症はこれまで中国、ロシア、ヨーロッパなどで多く報告され、年間の患者発生数が約 10 万人ほどとされているが、世界的に調査が不十分な地域が多く存在する。ダニ媒介性脳炎はロシアやヨーロッパ各国を中心に年間 8,000 名以上の患者が報告されている。国内外においてアレナウイルス感染症、サル痘、Q 熱、ハルトネラ感染症、エルシニア感染症、およびサルモネラ感染症の患者が多数報告されているにもかかわらず、げっ歯類や野生動物における感染状況は不明な点が多い。本研究で取り上げる

上記の感染症はいずれもげっ歯類媒介性の重篤な人獣共通感染症であり、国内外における汚染地やヒトにおける感染状況に関する情報は不足している。さらに、わが国には年間 70 万匹のげっ歯類が輸入され、愛玩動物として一般家庭で飼育されているにも関わらず、輸入げっ歯類を対象とした検査体制も未整備である。そこで本研究ではこれらの感染症について、新規に簡便で信頼性の高い診断法を開発し、輸入げっ歯類の検査に応用するとともに、感染動物モデルを確立する。

B. 研究方法

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タンパク質(NP)を大腸菌およびバキュロウイルスを用いて発現させ、診断用抗原を調整した。発現させた各種 NP を用いて ELISA による抗体検出を行った。また、NP を標的とした抗原検出用の ELISA も確立した。ネズミ亜科げっ歯類由来ハンタウイルスの遺伝子診断用プライマーの設計を行った。北海道の中川町と当別町の森林において合計 199 匹のエゾヤチネズミを捕獲し、血液、肺、腎臓、脾臓、肝臓を採取した。

ダニ媒介性脳炎:TBEV の中空ウイルス様粒子(SPs)を哺乳類細胞で発現させ、培養上清を回収して SPs を調整した。この SPs を用いて抗 TBEV 抗体検出用の ELISA を確立した。TBEV Oshima 株を接種量を変えて雌5週齢 C57BL/6j マウスに皮下および脳内接種し、神経症状、体温、体重、生死を経日観察した。また、 10^3 と 10^7 PFU 接種後の末梢、神経組織でのウイルス増殖を調べた。

Q 熱

北海道で 2004 年から 2005 年に捕獲されたエゾヤチネズミ *Myodes rufocanus* 87 検体およびア

カネズミ *Apodemus speciosus* 18 検体について IFA により抗 *C. burnetii* 抗体の検出を試みた。

バルトネラ感染症

2005 年 8 月に北海道札幌市で捕獲した野鼠 53 頭(アカネズミ 31 頭, ヒメネズミ 5 頭, エゾヤチネズミ 17 頭)の血液と野鼠の体表から採取したネズミノミ 40 匹 (*Ctenophthalmus congener truncus* 32 匹, *Hystrihopsylla microti* 3 匹, *Neopsylla sasai* 5 匹)について、バルトネラ属菌の検索を行った。

サルモネラ感染症

サルモネラの 6 つの遺伝子を同時に増幅することが可能な Multiplex PCR 法を開発した。

エルシニア感染症

Y.pseudotuberculosis と病原性 *Y.enterocolitica*, さらに“American Strains”を迅速かつ簡便に検出できる multiplex PCR 法を開発した。

サル痘

サル痘ウイルス感染症の迅速診断法として Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を開発した。本 LAMP 法をサル痘感染カニクイザルからのサル痘ウイルス DNA の検出に応用した。サル痘感染カニクイザルについて病理検索を実施した。

(倫理面からの配慮について)

野生げっ歯類の捕獲は日本国内の野生動物保護の理念に基づいて、北海道に事前に申請され、許可されたものである。動物実験は主任および分担研究者の所属する機関における動物実験指針に沿って実施した。

C. 研究結果

ハンタウイルス感染症

ネズミ亜科げっ歯類由来ハンタウイルスの遺伝子診断法の開発を試み、最終的に従来の汎

用プライマーよりも良い検出効率を持つプライマー3種類を選定した。この3種類でヘミネスティドPCRを行うことで、高感度かつ網羅的診断が可能となると考えられた。北海道の中川町と当別町の森林において合計199匹のエゾヤチネズミを捕獲した。抗体検出用ELISA(Ab-ELISA)によりエゾヤチネズミの血清中の抗ハンタウイルス抗体が検出できることが明らかになった。また、抗原検出用ELISA(Ag-ELISA)によりエゾヤチネズミの肺中のハンタウイルスNPが検出された。したがってAb-ELISAとAg-ELISAは、感染げっ歯類のハンタウイルス感染を検出するのに有用であることが明らかになった。エゾヤチネズミ集団全体の抗体保有率は5.0%(10/199)であった。オスとメスの抗体保有率を比較するとそれぞれ11.5%(6/52)と2.7%(4/147)であり、オスの抗体保有率が有意に高かった($P < 0.01$)。エゾヤチネズミの集団ではオスがハンタウイルスの感染伝播に重要な役割を果たしていることが示唆された。

ダニ媒介性脳炎

中和試験を基準として、SPsを用いたELISAの抗体検出精度を検討した。中和試験陽性35検体、陰性85検体の野鼠に対し、本ELISAを用いて抗体の検出を行った。その結果、Cut off値0.089において感度91.4%、特異度100%とともに高い検出精度を示した。TBEV Oshima株はマウスに皮下接種後、接種量に依存しない致死性を示した。

Q熱

北海道で捕獲された*M. rufocanus*の79%(69/87)と*A. speciosus*の56%(10/18)が抗体陽性であった。

バルトネラ感染症

今回検討した野鼠の*Bartonella*保菌率は67.9%(36/53)であった。野鼠別の保菌率はアカネズミ

で93.5%(29/31)、ヒメネズミで60.0%(3/5)、エゾヤチネズミで23.5%(4/17)であった。ネズミノミ40匹中14匹から*Bartonella* DNAが検出された。

サルモネラ感染症

今回開発したmultiplex PCR法により、供試したサルモネラ53株中50株(94.3%)はPCR法による生物型別と生化学性状試験による生物型別の成績が一致した。

エルシニア感染症

今回開発したMultiplex PCR法により、*Y.pseudotuberculosis*と病原性*Y.enterocolitica*および*Y.enterocolitica*のAmerican strainsについて、バンドの大きさおよび増幅パターンの違いにより鑑別することが可能であった。

サル痘

今回開発したLAMP法により、コンゴ盆地型と西アフリカ型のサル痘ウイルスを型特異的に診断することが可能となった。また、本法は定量的にウイルス血症レベルを測定することが可能であった。サル痘感染カニクイザルの痘疱部位は、中心部の痂皮あるいはびらん、潰瘍形成と真皮層への組織球、リンパ球、好中球の浸潤とその周囲の表皮層の増生からなっていた。増生した表皮の有棘層には配列が乱れ、大小不同となり淡明化、膨化した扁平上皮細胞が見られた。

D. 考察

ハンタウイルス感染症

組換えNPを用いて新規に開発した抗体検出用と抗原検出用のELISAが、エゾヤチネズミにおけるハンタウイルスの感染状況を調査する上で有用であることが判明した。ウイルスの感染率はオスの方がメスよりも有意に高く、オスがウイルスの伝播や感染の維持により重要な役割を担っている可能性が示唆された。

ダニ媒介性脳炎

今回開発した野鼠血清用 ELISA 法は、中和試験の結果と非常に高い相関性をもつことが示された。本法は TBE ウイルス汚染地域特定のためのスクリーニング法として有用であると考えられる。TBEV のマウスモデルにおいて皮下接種後にみられる致死性の接種量非依存性はウイルスの神経侵入、神経細胞への感染による直接の傷害が主たる要因ではなく、それ以降すなわち宿主側の炎症反応もしくはその他の要因が大きく関わっていると思われる。

Q 熱

我が国の野生げっ歯類が高率に *C. burnetii* 抗体を保有している事が明らかになり、げっ歯類が Q 熱の伝播に関与している可能性が示唆された。

バルトネラ感染症

わが国の野生げっ歯類に *Bartonella* 属菌が高率に感染していることが判明し、ネズミノミが *Bartonella* 属菌のベクターである可能性が示唆された。

サルモネラ感染症

今回開発した multiplex PCR 法は、*Salmonella* を迅速に同定でき、同時に生物群の同定も可能な有益な遺伝子診断法であると思われた。

エルシニア感染症

今回開発した multiplex PCR 法は、病原性を有する *Yersinia* 属菌の迅速かつ簡便な検出に有用な遺伝子診断法であると思われた。

サル痘

LAMP 法は、ヒトサル痘の病勢、予後、疫学的診断に有用な手法であると考えられた。サル痘ウイルス感染カニクイザルにおいてウイルス抗原が陽性であったのは上皮系細胞とマクロファージであった。

E. 結論

ハンタウイルス感染症、ダニ媒介性脳炎、Q 熱、バルトネラ感染症、サルモネラ感染症、エルシニア感染症、およびサル痘について簡便な診断法が開発された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bin Abu Daud, N.H., Kariwa, H., Tanikawa, Y., Nakamura, I., Seto, T., Miyashita, D., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Takashima, I.: Mode of Infection of Hokkaido Virus (Genus *Hantavirus*) among Grey Red-Backed Voles, *Myodes rufocanus*, in Hokkaido, Japan. *Microbiol. Immunol.* 51: 1081-1090, 2007
- 2) Kariwa, H., Yoshimatsu, K., and Arikawa, J.: Hantavirus infection in East Asia. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 341-356, 2007. Review.
- 3) Kariwa, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L.I., Iwasaki, T., and Takashima, I. A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia. *Jpn. J. Vet. Res.* 54: 145-161, 2007.
- 4) Matsuura, Y., Suzuki, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., Yokoyama, M., Igota, H., Yamauchi, K., Ishida, S., Fukui, D., Bando, G., Kosuge, M., Tsunemitsu, H., Koshimoto, C., Sakae, K., Chikahira, M., Ogawa, S., Miyamura, T., Takeda, N. and Li, T. C.: Prevalence of antibody to hepatitis E

- virus among wild sika deer, *Cervus Nippon*, in Japan. Arch Virol 152:1375-1381, 2007
- 5) Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Araki, K., Okumura, M., Nakamura, I., Kajino, K., Arikawa, J.: Analysis of the immune response of Hantaan virus nucleocapsid protein-specific CD8+ T cells in mice. Virology sep1: 365(2) 292-301, 2007
- 6) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Truong, U.T., Truong, U.N.: Hantavirus Infection-typical rodent-borne viral zoonosis. Tropical Medicine and health 35(2) 55-59, 2007
- 7) Chandy, S., Yoshimatsu, K., Ulrich, R.G., Mertens, M., Okumura, M., George, R.P., John, T., Balraj, V., Muliyl, J., Mammen, J., Abraham, P., Arikawa, J., Sridharan, G.: Seroepidemiological study on hantavirus infections in India: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 102(1) 70-74, 2008
- 8) 有川二郎: ハンタウイルス肺症候群, 日本臨床, 65 巻, 増刊号 3: 126-130, 2007
- 9) 有川二郎: 腎症候性出血熱, 日本臨床, 65 巻, 増刊号 3: 112-116, 2007
- 10) Terajima, M., Hayasaka, D., Maeda, K. and Ennis, FA.: Immunopathogenesis of hantavirus pulmonary syndrome and hemorrhagic fever with renal syndrome: Do CD8+ T cells trigger capillary leakage in viral hemorrhagic fevers? Immunol. Lett. 113 : 117-120, 2007
- 11) Hayasaka, D., Terajima, M. and Ennis, FA.: Pathogeneses of respiratory infections with virulent and attenuated vaccinia viruses. Virol. J. 27 : 4-22, 2007
- 12) Hayasaka, D., Maeda, K. and Ennis, FA. and Terajima, M.: Increased permeability of human endothelial cell line EA.hy926 induced by hantavirus-specific cytotoxic T lymphocytes. Virus Res. 123 : 120-127, 2007
- 13) 蔡燕, 野村彩朱, 矢野竹男, 中尾義喜, 福士秀人 Q 熱コクシエラ抗体スクリーニング検査法の改良. 獣医畜産新報, 60:374-375, 2007
- 14) Kosoy, M., Morway, C., Sheff, K. W., Ying Bai, Colborn, J., Chalcraft, L., Dowell, S. F., Peruski, L. F., Maloney, S. A., Baggett, H., Sutthirattana, S., Sidhirat, A., Maruyama, S., Kabeya, H., Chomel, B. B., Kasten, R., Popov, V. Robinson, J., Kruglov, A., and Petersen, L. R. : *Bartonella tamiæ* sp. nov., a Newly Recognized Pathogen Isolated from Three Human Patients from Thailand. J. Clin. Microbiol. 46:772-775, 2008.
- 15) 丸山総一: 吸血昆虫と新興感染症, ダニと新興再興感染症, 267-276, 2007 (株) 全国農村教育協会, 東京
- 16) Iwata, T., Une, U., Okatani, A. T., Kato, Y., Nakadai, A., Lee, K., Watanabe, M., Taniguchi, T., Elhelaly, A. E., Hirota, Y., Hayashidani, H.: Virulence characteristics of *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from breeding monkeys in Japan. Vet. Microbiol. 2008 (印刷中)
- 17) 中臺文, 塩谷亮, 加藤行男, 黒木俊郎, 岩田剛敏, 廣田好和, 林谷秀樹: 家庭で飼育されている爬虫類におけるサルモネラの保有状況. 獣畜新報 60, 386-387, 2007.
- 18) 岡谷友三アレシヤンドレ, 加藤行男, 林谷秀樹: 豚丹毒 - 古くて新しい人獣共通感染症 -, モダンメディア 53:231-237, 2007

- 19) Shirato K, Nishimura, H., Saijo, M., Okamoto, M., Noda, M., Tashiro, M., Taguchi, F.: Diagnosis of human respiratory syncytial virus infections using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Virol. Methods* 139:78-84, 2007
- 20) Ike, F., Bourqade, B., Sato, H., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S., Yamada, Y., Jaubert, J., Berard, M., Nakata, H., Hiraiwa, N., Mekada, K., Takakura, A., Itoh, T., Obata, Y., Yoshiki, A., Montagutelli, X.: LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. *Comp. Med.* 53:272-281, 2007
- 21) Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Yokoyama, M., Harashima, A., Sato, Y., Saijo, M., Morikawa, S., 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.* 81:1848-1857, 2007
- 22) Sakai, K., Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Endoh, D., Kurane, I., Takehara, K., Morikawa, S.: An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences of avian RNA viruses. *Arch. Virol.* 152:1763-1765, 2007
- 23) Morikawa S, Saijo M, Kurane I.: Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus (in French: Connaissances actuelles sur la moindre virulence du virus Ebola Resoton). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis* 30:391-398, 2007
- 24) Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., Romanowski, V., Fukushi, S., Mizutani, T., Georges, A.J., Kurata, K., Kurane, I., Morikawa, S.: Recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever: development of diagnostic assays, which do not require infectious virus for antibody and antigen detection. *Clin. Vac. Immunol.* 14:1182-1189, 2007
- 25) Fukushi, S., Mizutani, T., Sakai, K., Saijo, M., Taguchi, F., Yokoyama, M., Kurane, I., Morikawa, S.: Amino acid substitutions in S2 region enhance SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells. *J. Virol.* 81: 10831-10834, 2007
- 26) Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I.: Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30:375-389, 2007
- 27) 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. *International J. Exp. Pathol.* 88:403-414, 2007

2. 学会発表

- 1) 瀬戸隆弘、苺和宏明、谷川洋一、Nur Hardy Bin Abu Daud、中村一郎、宮下大輔、好井健太郎、高島郁夫：ロシアのボルガ川流域に生息する野生げっ歯類におけるハンタウイルスの感染調査と遺伝子解析：第 143 回日本獣医学会、つくば (2007, 4)
- 2) 宮下大輔、苺和宏明、村田亮、Nur Hardy Bin Abu Daud、瀬戸隆弘、好井健太郎、高島郁夫：メキシコの野生げっ歯類におけるハンタウイルス感染症の血清疫学調査：144 回日本獣医学会、江別 (2007, 9)
- 3) 村田亮、好井健太郎、原田祐里、苺和宏明、高島郁夫：ウエストナイルウイルスの E 蛋白上糖鎖付加がウイルス増殖に与える影響：144 回日本獣医学会、江別 (2007, 9)
- 4) 大森優紀、伊川綾恵、川上和江、好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス様粒子およびその組換え発現プラスミドを抗原とした針無加圧式注射によるワクチン接種の有効性の検討：144 回日本獣医学会、江別 (2007, 9)
- 5) 中内美名、好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫：SARS コロナウイルス N たんぱく質の粒子形成における機能領域の解析：第 55 回日本ウイルス学会、札幌 (2007, 10)
- 6) 瀬戸隆弘、苺和宏明、谷川洋一、吉松組子、中村一郎、宮下大輔、中内美名、好井健太郎、有川二郎、高島郁夫：ロシアのボルガ川流域におけるハンタウイルス感染症の疫学的研究：第 55 回日本ウイルス学会、札幌 (2007, 10)
- 7) 宮下大輔、苺和宏明、瀬戸隆弘、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：メキシコの野生げっ歯類におけるハンタウイルス感染症の疫学調査：第 55 回日本ウイルス学会、札幌 (2007, 10)
- 8) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., and Kariwa, H.: Epidemiology and epizootiology of hantavirus infection in East Asian countries: VII International Conference on HFRS, HPS, and Hantaviruses, Buenos Aires (2007, 6)
- 9) Yoshimatsu, K., Taruishi, M., Kariwa, H., and Arikawa, J.: Studies on structure and function of N and GP of Hantaan virus: VII International Conference on HFRS, HPS, and Hantaviruses, Buenos Aires (2007, 6)
- 10) Kariwa, H., Tanikawa, Y., Bin Abu Daud, N. H., Lokugamage, N., Lokugamage, K., Seto, T., Miyashita, D., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., Nakauchi, M., and Takashima, I.: Animal models for Puumala virus infection using several rodent species of laboratory animal: VII International Conference on HFRS, HPS, and Hantaviruses, Buenos Aires (2007, 6)
- 11) Yoshii, K., Goto, A., Obara, M., Ueki, T., Ikawa, A., Ishizuka M., Kariwa, H., and Takashima, I.: Role of the N-linked glycan of envelope protein of tick-borne encephalitis virus in viral maturation process: US-Japan Cooperative Medical Science Program, 41st Joint Working Conference on Viral Diseases, Baltimore, (2007, 7)
- 12) Kariwa, H., Seto, T., Tanikawa, Y., Nakamura, I., Hashimoto, N., Bin Abu Daud, N.H., Nakauchi, M., Miyashita, D., Tkachenko, E.A., Ivanov, L.I., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Takashima, I.: Epidemiological study of hantavirus infection in Volga-Side Federal Region, Russia: US-Japan Cooperative Medical Science Program, 41st Joint Working Conference on Viral Diseases, Baltimore,

- (2007, 7)
- 13) 有川二郎:腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)ーげっ歯類媒介性の人獣共通感染症:第54回日本実験動物学会総会(2007.5)
- 14) 山本博、李天成、伊藤薫、越本知大、宮下信和泉、有川二郎、八神健一、他:国動協および公私動協傘下の動物実験施設において動物実験に用いられたサルおよびブタのHEV感染調査:第54回日本実験動物学会総会(2007.5)
- 15) Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Araki, K., Okumura, M., Nakamura, I., Kajino, K., Arikawa, J.: Pathological and immunological analysis of the experimental model mice of the Hantaan virus infection. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
- 16) Okumura, M., Yoshimatsu, K., Kumperasart, S., Nakamura, I., Ogino, M., Taruishi, M., Sungdee, A., Pattamadilok, S., Ibrahim, I.N., Erlina, S., Agui, T., Yanagihara, R., Arikawa, J.: Studies of Thottapalayam Virus: a Hantavirus Isolated from Shrew. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
- 17) 吉松組子、垂石みどり、有川二郎:ハンタウイルスエンベロープ糖タンパク G2 の細胞外ドメインに関する研究、第55回日本ウイルス学会(2007.10)
- 18) 垂石みどり、吉松組子、エルデネサイハンテグシドーレン、有川二郎:ハンタウイルス持続感染モデルマウスにおけるウイルス特異的T細胞の解析、第55回日本ウイルス学会(2007.10)
- 19) エルデネサイハン テグシドーレン、吉松組子、垂石みどり、有川二郎、石原智明:ホンドネズミ (*Microtus montebelli*)の Puumala 型ハンタウイルスおよび Tula 型ハンタウイルスに対する感受性に関する研究、第55回日本ウイルス学会(2007.10)
- 20) 早坂大輔:向神経ウイルスのマウス経鼻感染モデルを用いた病原性発現機序の解析:第4回ウイルス学キャンプ in 湯河原、湯河原(2007, 6)
- 21) 早坂大輔、寺嶋正教、小池智:向神経ウイルスのマウス経鼻感染モデルを用いた病原性発現機序の解析:第144回日本獣医学会学術集会、江別(2007, 9)
- 22) 早坂大輔:脳炎性フラビウイルスのマウスモデルにおいて致死性=病原性=神経侵入性?:第14回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、札幌(2007, 10)
- 23) 早坂大輔、小池智:ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)をマウスに皮下感染させた際の接の違いによる病原性発現機序の解析:第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌(2007, 10)
- 24) 井上 快、丸山総一、壁谷英則、山田直之、川端寛樹:わが国の小型哺乳類に分布する *Bartonella* 属菌:第36回日仏獣医学会、恵比寿(2007, 2)
- 25) 井上 快、壁谷英則、Kosoy, M. Y., Ying, B., Smirnov, G., McColl, D., Artsob, H., 丸山総一:野鼠由来 *Bartonella grahamii* の遺伝的多様性と地理的分布の関係、第144回日本獣医学会、山口(2007, 8)
- 26) 李謙一、中臺文、岩田剛敏、廣田好和、林谷秀樹:Multiplex PCR法による *Salmonella* の生物型別、第144回日本獣医学会、江別(2007.9)
- 27) 林谷秀樹、松本周、又吉正直、岩田剛敏、中臺

- 文,佐伯和美,馬場浩,吉田信一郎,廣田好和:
沖縄県由来 *Salmonella Weltevreden* の分子
遺伝子型別,第 144 回日本獣医学学会,江別
(2007.9)
- 28) 岩田剛敏,松本周,李謙一,宇根有美,廣田好
和,林谷秀樹:マウスにおける *Yersinia*
pseudotuberculosis の感染防御抗原の検討,
第 144 回日本獣医学学会,江別(2007.9).
- 29) 李謙一,中臺文,岩田剛敏,廣田好和,林谷秀
樹:アライグマおよびハクビシンにおける人獣
共通感染症原因菌の保有状況,第 7 回人と動
物の共通感染症研究会学術集会,東京
(2007.11).
- 30) Saijo, M: Cytokine responses in
monkeys infected with monkeypox virus:
xSAMPLES Japan seminar. Yokohama
(2007. 5)
- 31) Saijo M: Highly attenuated vaccinia
vaccine, LC16m8, lacking B5R membrane
protein expression, protects monkeys
from monkeypox: The 1st US-Japan
Biodefence Meeting, Washington (2007.
6)
- 32) 西條政幸:国立感染症研究所における新興
ウイルス感染症対策と感染動物実験:第 4 回
北海道実験動物研究会,札幌(2007. 7)
- 33) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N.,
Hasegawa, H., Iwata, N., Ogata, M.,
Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I.,
Kurata, T., Morikawa, S.: Therapeutic
vaccination with a highly attenuated
vaccinia vaccine, LC16m8, for protection
of nonhuman primates from monkeypox:
41st annual meeting of the US-Japan
Cooperative Medical Science, Baltimore
(2007. 7)
- 34) 西條政幸、網康至、須崎百合子、永田典代、
岩田奈織子、長谷川秀樹、緒方もも子、福士
秀悦、水谷哲也、佐多徹太郎、倉田毅、倉根
一郎、森川茂:高病原性コンゴ盆地型サル痘
ウイルス(MPXV)と低病原性西アフリカ型
MPXV の鑑別可能な定量的 PCR 法による
MPXV 感染症の診断:第 55 回日本ウイルス
学会・学術集会,札幌(2007.10)
- 35) 佐藤朝光、江下優樹、酒井宏治、見明史雄、
牛島廣治、高崎智彦、小滝徹、遠藤大二、福
士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、
森川茂、水谷哲也:タイで採集されたネットイ
シマカからの RDV 法による RNA ウイルスの
検出:第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札
幌(2007.10)
- 36) 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
(2007.10)
- 37) 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
(2007.10)
- 38) 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(2007.10)
- 39) 西條政幸、網康至、永田典代、長谷川秀樹、
福士秀悦、水谷哲也、飯塚愛恵、佐多徹太郎、
倉田毅、倉根一郎、森川茂:高度弱毒化天然

痘ワクチン LC16m8 の暴露後使用時の天然
痘予防効果: 霊長類におけるサル痘モデルに
よる検討: 第11回日本ワクチン学会学術集会,
横浜(2007.12)

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

II. 分担者研究報告

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

国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断法等の研究

ダニ媒介性脳炎ウイルスの疫学

分担研究者 高島 郁夫 北海道大学 教授

研究要旨:TBEVの中空ウイルス様粒子(SPs)を用い、野鼠からTBEV特異抗体を検出するELISA法を開発した。野鼠における本法の診断結果と中和試験での結果を比較したところ、敏感度 91.4%、特異度 100%とともに高い検出精度を示した。さらに本法は、TBEV流行地区での疫学調査で得た野鼠にも応用可能であったことから、TBEV分布状況の把握のためのスクリーニング法として有用であることが示された。

A. 研究目的

ダニ媒介性脳炎(Tick-borne encephalitis: TBE)ウイルスは、フラビウイルス科フラビウイルス属に属し、マダニ類によって媒介される危険度の高い人獣共通感染症の原因ウイルスとして知られ、ヒトに致命的な脳炎を引き起こす。

近年、北海道において患者の発生が確認され、さらに患者発生地区のヤマトマダニ(*Ixodes ovatus*)と野ネズミからTBEウイルスが分離されたことによって、患者発生地区に本ウイルスの流行巣が存在する事が明らかになった。北海道各地および本州にも、ベクターとなるマダニや病原巣となりうる小型野生げっ歯類が広く分布する事から、日本国内においてTBEウイルスが分布

している可能性が高いと思われる。従って、TBEウイルス流行への防止対応策の確立が必要とされている。

対応策の確立には、TBEウイルスに対する診断法により疫学調査を行い、ウイルスの分布状況を把握し、流行の予測を図ると同時に、ワクチンなどの予防法や特異的な治療法の確立が必要である。しかし、TBEウイルスは危険度が高く、生のウイルスを用いるためにはP3レベルの高度安全施設が必要であるなど、その使用は大きく制限されている。そこで本研究では、TBEウイルスの組換えウイルス粒子を作成し、診断法や予防法の確立へ応用した。

B. 研究方法

TBE ウイルスの中空ウイルス様粒子 (SPs) の発現と回収:

TBE ウイルスの prM 蛋白と E 蛋白領域を含むプラスミド pCAGprME(112)を、293T 細胞にトランスフェクションし、SPs を発現した。

293T 細胞を 150 cm² 細胞培養用フラスコに 3 × 10⁶ 個となるように加え、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で一晩培養し、細胞をフラスコ底面に吸着させた。TransIT-LT1 transfection reagent (Mirus) 120 μl と Opti-MEM™ (GIBCO BRL) 2,000 μl を穏やかに混和し、室温で 15 分間静置した後、pCAGprME を 40 μg 加えて穏やかに混和し、室温で 15 分間静置した。150 cm² フラスコの細胞培養液を L-グルタミン (2 mM) および BSA (1%) を含む DMEM に交換したのち、混合液を加え、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 36 時間培養し、TBE ウイルスの SPs を発現させた。

トランスフェクション後、36 時間培養した 293T 細胞培養上清を回収し、12,000 rpm、4°C、20 分間遠心し、上清を回収した。終濃度が 10% ポリエチレングリコール (PEG) 8,000、1.9% NaCl となるように PEG-NaCl 溶液を加え、4°C で 2 時間、穏やかに振盪した。その後、16,000 × g、4°C で 20 分間遠心して上清を除き、沈澱を 160 μl の

PBS(-) で懸濁し、この懸濁液を ELISA 用抗原として用いた。

サンドイッチ ELISA 法の術式:

抗 E 蛋白ウサギ IgG 抗体を Capture 抗体とし、Carbonate-bicarbonate buffer (Sigma) で 5 μg/ml となるように希釈し、96 ウェル EIA プレート (Costar) に各ウェル 50 μl ずつ分注したものを、4°C にて一晩静置した。これを各ウェル 200 μl の PBST で 5 回洗浄し、超純水で 4 倍に希釈したブロックエースを各ウェル 200 μl 加え、37°C で 1 時間静置し、ブロッキングを行った。再び PBST で洗浄後、陽性抗原に SPs、陰性抗原に pCAGprME をトランスフェクションしていない 293T 細胞の培養上清を SPs と同様に処理したものを扱い、それぞれ ELISA buffer (0.5% BSA 加 PBST) で 150 倍に希釈したものを 50 μl 加え、37°C で 1 時間静置し、抗原と反応させた。再度洗浄した後、ELISA buffer で 100 倍に希釈した被検血清を 50 μl 加え、37°C で 1 時間静置した。再度洗浄した後、ELISA buffer で 5000 倍に希釈した ALP 標識抗マウス IgG 抗体を 50 μl 加え、37°C で 1 時間静置した。再度洗浄した後、基質として p-nitrophenyl phosphate (pNPP) (Sigma) を各ウェル 100 μl ずつ加え、37°C で 60 分反応させ、405 nm の吸光度から 620 nm の吸光度を引いたものを測定した。

サンドイッチ ELISA 法の成績評価:

ELISA 法の成績は、陽性対照(P)と陰性対照(N)の差を次の式に従って算出した。

$P-N$ 値 = 陽性抗原(SPs)における OD 値 - 陰性抗原(トランスフェクションしていない 293T 細胞の培養上清)における OD 値

既に中和試験の結果が分かっている上磯町の野鼠血清から、中和試験陽性の血清 35 検体、陰性の血清 85 検体について ELISA 法を行った。各 $P-N$ 値において、中和試験の結果を基準として特異度(中和試験陰性の検体のうち、ELISA 陰性である割合)と感度(中和試験陽性の検体のうち、ELISA 陽性である割合)を求め、検出精度が最も高くなる $P-N$ 値を Cut off 値と定めた。各野鼠血清の ELISA 法における $P-N$ 値が、この Cut off 値を越える場合、ELISA 陽性と判断した。

(倫理面からの配慮について)

特に無し

C. 研究結果

TBE ウイルスの疫学調査に用いる上で有用と考えられる野鼠の血清から、TBE ウイルス特異抗体を検出するサンドイッチ ELISA 法を開発した。本法の抗原には、以前当研究室で作成した中空のウイルス様粒子(Subviral particles; SPs)

を用いた。SPs は、組換え prM、E 蛋白を哺乳動物細胞で発現させることで作成され、本来のウイルスと同様の抗原性および免疫原性を示すことが明らかとなっている。中和試験を基準とした本法の検出精度を検討するため、中和試験陽性 35 検体、陰性 85 検体の野鼠に対し、本法を用いて抗体の検出を行った。その結果、Cut off 値 0.089 において感度 91.4%、特異度 100%ととも高い検出精度を示した。さらに、極東型 TBE ウイルス流行地区のロシアハバロフスク市で行った疫学調査で得た野鼠血清に対し、本法を応用した。疫学調査から得られた野鼠 29 検体のうち、3 検体が ELISA 陽性と判定され、中和試験においても高い中和抗体価を示した。また、本法で陰性と判定された 26 検体全てが中和試験でも陰性と判断された。

E. 結論

今回開発した野鼠血清用サンドイッチ ELISA 法は、中和試験の結果と非常に高い相関性をもつことが示され、また本法によって、TBE ウイルスの流行地区での疫学調査から得られた野鼠血清より、陽性検体の検出が可能であった。さらに本法は、一度に多検体を短時間、かつ簡便に処理できることなどの利点から TBE ウイルス汚染地域特定のためのスクリーニング法として有

用であると考えられる。

現プラスミドを抗原とした針無加圧式注射によるワクチン接種の有効性の検討:第144回

F. 健康危険情報

日本獣医学会、江別(2007, 9)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

G. 研究発表

なし

1.論文発表

1. 特許取得

なし

なし

2.学会発表

2. 実用新案登録

1) 大森優紀、伊川綾恵、川上和江、好井健太

なし

朗莉和宏明、高島郁夫:ダニ媒介性脳炎ウイ

3. その他

ルスのウイルス様粒子およびその組換え発

なし

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

国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断法等の研究

ハンタウイルス感染症に関する研究

分担研究者

有川二郎

北海道大学大学院医学研究科

教授

研究要旨:近年げっ歯類やベクターによって媒介される獣共通感染症の検査体制の確立が緊急の課題となっている。本研究ではハンタウイルス感染症について診断法を開発し、輸入げっ歯類の検査に応用する。さらに、わが国や諸外国の流行地域、病原巣動物、および流行株の性状を明らかにする。

A. 研究目的

ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類される RNA ウイルスで腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候(HPS)の原因ウイルスである。ヒトは、ハンタウイルスに不顕性に持続感染したげっ歯類の排泄物などを吸引することにより感染する。このためハンタウイルスは代表的な齧歯類媒介性ウイルス性人獣共通感染症の原因ウイルスであり、公衆衛生上重要なウイルスである。様々なげっ歯類が多くの血清型や遺伝子型のハンタウイルスの病原巣動物であるため、一種類の検出法ではそれら全てのハンタウイルス感染症を検出することはできない。本研究では、ハンタウイルス感染症全般を検出する診断システムを開発することを目的とする。

B. 研究方法

1. ハタネズミ亜科齧歯類を病原巣動物とするハンタウイルスの診断法と鑑別法の開発:核蛋白の主要抗原領域である N 末端の103アミノ酸を大

腸菌ベクターで発現・精製し、診断抗原を準備した。さらにヨーロッパヤチネズミの持つ HFRS の原因となる Puumala virus(PUUV)とヨーロッパハタネズミの持つ病原性が無いとされる Tula virus (TULAV)を日本産ハタネズミに接種し、抗血清を用意した。また、核蛋白の可変領域とその立体構造を支える部位をバキュロウイルス発現系で発現し、これを抗原とした ELISA を中和試験の代替法とするシステムを準備した。

2. ネズミ亜科由来ハンタウイルスの遺伝子検出用プライマーセットの開発:ウイルス遺伝子を検出する RT-PCR のプライマーセットを開発するために公表されている多くの株の S ゲノム遺伝子の遺伝子配列を調べ、6種類のプライマーを選定した。これにこれまで用いていた汎用プライマー組を加えて8個のプライマーを用いて増幅効率を比較した。Hantaan, Seoul, Dobrava, Thailand virus の同定済みの cDNA を鋳型とし、検出効率の良いプライマーを選定することを試みた。

3. 北米・南米由来ハンタウイルスの診断法の開

発: HPS の原因となるグループのハンタウイルスの cDNA から全長の核蛋白を発現させ、ELISA 抗原とする。

4. 食虫類由来ハンタウイルスの診断法の開発

発: ハンタウイルスの中で最も異なるグループとして、食虫類由来ウイルスが注目を集めている。唯一 1960 年代に分離された Thottapalayam virus (TPMV) の cDNA から抗体検出用の診断抗原を作成した。

(倫理面からの配慮について)

不明熱患者血清は匿名で提供され、提供の同意および個別データは現地の研究協力者が管理している。

C. 研究結果

1. ハタネズミ亜科げっ歯類由来ハンタウイルスの血清診断法の開発: 日本産ハタネズミは PUUV および TULAV に感受性を持ち、有意な抗体の上昇が確認された。これを用いて診断法の評価を行ったところ、大腸菌で大量発現した核蛋白の N 末端は TULAV も PUUV もそれぞれ高い抗原性を示し、ELISA 抗原として有用であることが明らかとなった。バキュロウイルス発現系で調製した抗原も同様に良い抗原性を示した。さらに、血清型鑑別のために中和試験代替法となると考えられる、N 末端を削除した核蛋白抗原は現在、発現を進めている。

2. ネズミ亜科げっ歯類由来ハンタウイルスの遺伝子診断法の開発: 最終的に従来の汎用プライマーよりも良い検出効率を持つプライマー 3 種類を選定した。この 3 種類でヘミネステイド PCR を行うことで、高感度かつ網羅的診断が可能となると

考えられる。この PCR 産物から得られる遺伝子情報もおよそ 800 塩基 (従来は 250 塩基) と長く、その後のシーケンス解析で十分な情報量を得ることができると考えられた。

3. 北米・南米由来ハンタウイルスの血清診断法の開発: データベース解析の結果から、北米・南米由来ハンタウイルス核蛋白抗原中に抗原性が共通する部位 (N 末端) があることが予想され、この部位が診断抗原として有用であると考えられた。さらに、可変領域には少なくとも 4 種類のタイプが見つかり、代替中和法で鑑別できる可能性が示された。従来保有していた北米型のハンタウイルス遺伝子に加え、今回、南米アンデス型の遺伝子を分与されたが、データベース解析の結果から予想される、上記の異なった可変領域をもつ他のハンタウイルスについても、これらの遺伝子について分与を受けられるかどうか検討を進めている。

4. 食虫類由来ハンタウイルスの診断法の開発: TPMV の核蛋白を大腸菌およびバキュロウイルス発現系で発現させ、診断抗原を作成した。この抗原を用いて、実験感染マウス、ラット、スunks 血清を用いて診断法の評価を行った。その結果、ELISA, Western blot, 試験を確立することができた。また、アミノ酸変異を導入することで、モノクローナル抗体の結合性をもたせた抗原を開発した。これを用いて IgM 抗体検出システムを構築することができた。

D. 考察

一般に、血清診断法の開発には、抗原および陽性血清が必要である。また、遺伝子診断法の開発にはより多くの多様なウイルスの遺伝子情報