

F. 健康危険情報

北陸においても、病原性のある日本脳炎ウイルスを野外蚊が保有し、病原ウイルス存在の事実に注意が必要であろう。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yamakawa J, Ishigaki Y, Takao F, Takahashi T, Yoshida J, Moriya J, Takata T, Tatsuno T, Sasaki K, Ohta T, Takegami T, Yoshizaki F: The Kampo Oregedokuto, Bofutsushosan and Boiogito have different activities to regulate gene expression in differentiated rat white adipocytes: Comprehensive analysis of genetic profiles. **Bio Pharm Bull** 31: 2083-2089, 2008
- (2) Wakabayashi K, Murakami M, Takegami T et al.: Morphology and gene analysis of hybrids between two congeneric sea stars with different medes of development. **Bio Bull** 215: 89-97, 2008
- (3) Sun W, Dong L, Takegami T et al. : Bacterial diversity in synovial fluids of patients with RMD determined by cloning and sequencing analysis of the 16S ribosomal RNA gene. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 105:566-571, 2008
- (4) Maeda M, Murakami M, Takegami T, Ota T: Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol **Toxicology and Applied Pharmacology** 229:232-238, 2008
- (5) Nagao A, Takegami T, Nakagawa H, Matsui S, Matsunaga T, Ishigaki Y: Multiple shRNA expressions in a single plasmid vector improve RNAi against the XPA gene. **Biochem. Biophys. Res Commun** 370: 301-305, 2008

2. 学会発表

- 1) 村上 学、上村 清、及川陽三郎、太田隆英、石垣靖人、竹上 勉: 石川県での分離 JEV の生物活性 第 43 回 日本脳炎ウイルス生態学研究会、観音寺 (2008.5)
- 2) 竹上 勉、村上 学、佐藤杏子、太田隆英、石垣靖人: 日本脳炎ウイルス感染に伴う宿主遺伝子発現の網羅的解析、第 12 回神経ウイルス研究会、屋久島 (2008.7)
- 3) 太田隆英、前田雅代、村上 学、竹上 勉、達家雅明: B16メラノーマ細胞の実験転移に対するlapacholの二面的な作用、第 67 回日本癌学会総会、名古屋 (2008.10)
- 4) 竹上 勉、村上 学、佐藤杏子、太田隆英、石垣靖人: 日本脳炎ウイルス感染による宿主遺伝子発現および miRNA 動態への影響、第 15 回トガ・フラビ・ベステウイルス研究会、岡山 (2008.10)
- 5) 村上 学、佐藤杏子、竹上 勉: 石川県(1998 年—2008 年)での野外蚊からの日本脳炎ウイルス分離と生物活性、第 56 回日本ウイルス学会、岡山 (2008.10)
- 6) 佐藤杏子、村上 学、竹上 勉: HCV-NS3 発現細胞における宿主遺伝子発現の解析、第 56 回日本ウイルス学会、岡山 (2008.10)
- 7) 佐藤杏子、村上 学、太田隆英、石垣靖人、竹上 勉: HCV-NS3 導入による宿主遺伝子の発現誘導、第 31 回日本分子生物学会、神戸、(2008.12)

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

アルボウイルスの病原性

デングウイルスの細胞トロピズムについての研究

研究分担者 森田 公一 長崎大学・熱帯医学研究所 教授

研究要旨：現在、デング熱・デング出血熱（DF/DHF）は熱帯地域において猛威をふるっており我が国にとっては輸入伝染病として重要である。この感染症はフラビウイルスに属するデングウイルス感染による急性熱性疾患である。時に致死性的でもあるデング出血熱の発症機序については従来から、2次感染における抗体依存性の感染増強現象（antibody dependent enhancement: ADE）や遺伝的素因、細胞免疫の高度な刺激、ウイルスの差異などさまざまな要因が提唱されている。このうちデングウイルス自体の重症化に対する関与は疫学的には推測されているものの、分子レベルでの解析は今のところ不十分である。我々はデングウイルスの病原性をより詳細に解析するため、デング出血熱患者からその標的細胞と患者血液中のウイルスを解析して、デングウイルスの患者血液中の多様性と細胞向性の多様性が認められることを発見しその分子基盤を解明した。このウイルスの多様性がデングウイルス感染の多様な症状や重症度を説明する1つの要素となると考えられた。

A. 研究目的

デングウイルス感染でみられる重症型のデング出血熱の発症メカニズムを解明するため、デング出血熱患者のウイルス感染細胞と患者血液中に存在するデングウイルスの多様性を分子レベルで解析した。

B. 研究方法

1) 患者血清

ベトナムとフィリピンにおいてデング熱と診断された患者から、長崎大学倫理規定と現地病院の倫理規定で承認を得たのち患者あるいは患者親族にインフォームドコンセントを実施して了解を得たのち採血した。

2) フローサイトメトリー解析

患者末梢血からPBMC分画を得てデングウ

イルス特異的標識抗体と各種の血球標識マーカーによる2重染色をおこない、ベクトン社製のFACSCaliburとCellQuest softwareにより解析した。

3) ウイルス分離

患者血清をヒトスジシマカ培養細胞クローンC6/36細胞、およびヒト血球系の細胞であり我々がクローン化したK562/3細胞、およびRaji細胞、RPMI8226細胞、Audi細胞、やサル由来のVero細胞、LLC-MK2細胞に接種し、7日後に細胞培上清中のウイルス抗原をELISA法により検出するか、RT-PCR法により遺伝子を検出することでウイルスの存在を確認した。

4) ウイルス遺伝子の解析と3次元解析
遺伝子解析はABI社製PRISM3100により実施し、得られた情報はMolecular Operating Environment software (MOE ver.2009.19)により立体構造を解析した。

C. 結果

1) デングウイルス抗原陽性細胞の検出

ベトナムでデング出血熱と診断された患者血液サンプルのフローサイトメトリー解析では (Fig.1) に示したようにCD19陽性の細胞群の約60%にデングウイルス抗原が陽性であった。このことはB細胞系の細胞にウイルスが感染または付着していることをしめしていた。

2) 分離ウイルスの遺伝子上の差異

上記の患者から種々の培養細胞を用いてウイルス分離を実施したが、C6/36細胞とK562/3細胞によりデングウイルスが分離された。これをそれぞれVN18-CおよびVN18-Kと名付けた。ウイルスの全塩基配列を決定した結果、Table 1.に示すように4つの塩基の差がありそのうち3つはアミノ酸の差異を持つ変異であった。このうち1つはEタンパク質、1つはNS2B、1つはNS4B蛋白質上であった。

3) 分離ウイルスの生物学的差異

上記のウイルスは Fig.2 にしめしたようにVN18-C (Cタイプ) はC6/36細胞でよく増殖するがVN18-K (Kタイプ) は増殖がよくなかった。一方、KタイプウイルスはK562/3細胞やRPMI8226などではよく増殖したがCタイプはほとんど増殖しなかった。(Fig.3)

4) 分離ウイルスのB細胞株への結合能

KタイプとCタイプウイルスのB細胞系の培養細胞であるRPMI8226への結合能力をフローサイトメトリーにて解析した。結果、Fig.4に示すようにKタイプはよく細胞に結合し

ているのに対し、Cタイプはほとんど結合していないことが明らかになった。

5) E蛋白質の3次元解析

アミノ酸変異をともなう変異のうちウイルス粒子表面にある1個のEタンパク質上の変異について3次元モデルでの解析を行った。その結果 Fig.5 に示すようにEタンパク質上の変異はEタンパク質2量体構造の中でお互いに向かいあうように位置しておりE蛋白質の立体構造を変化させる性質をもっていた。これによりKタイプウイルスにおいては4) でみられたRPMI8226細胞への結合性が獲得されたものと思われる。

D. 結論

- 1) ベトナムのDHFの患者1名の末梢血中のB細胞群(CD19+)にデングウイルス抗原陽性例が確認された。
- 2) この患者から生物学的に異なる性質をもつ2つのウイルス株が分離された。
- 3) とくに1つの株はB細胞系の培養細胞株RPMI8826に吸着、感染した。
- 4) 2つのウイルス株のRPMI8226細胞への吸着性の差異はウイルスEタンパク質の62番目のアミノ酸の差が原因であった。

E. 考察

デングウイルスには同一流行、や同一個体においても遺伝子の多型性があることが知られているが、今回、1患者体内においても細胞向性の異なる複数のウイルス株が感染していることが明らかになった。ウイルスが感染する細胞が異なることで、デングウイルス感染における病態の複雑さや重症度に差異が発生することが考えられる。今後、デングウイルスの病原性を理解するうえで、ウイルスのさらなる詳細な調査と分子レベルでの解析が必要と考えられた。

F. 研究発表

1) 論文発表

Takeshi Nabeshima, Phan Thi Nga, Posadas Guillermo, Maria del Carmen Parquet, Fuxun Yu, Nguyen Thanh Thuy, Bui Minh Trang, Nguyen Tran Hien, Vu Sinh Nam, Shingo Inoue, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita.

Isolation and Molecular Characterization of Banna Virus from Mosquitoes, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 14(8), 1276-1279; 2008

Basu Dev Pandey, Kouichi Morita, Santa Raj Khanal, Tomohiko Takasaki, Isao Miyazaki, Tetsuro Ogawa, Shingo Inoue, Ichiro Kurane. Dengue virus, Nepal. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 14(3), 514-515; 2008

Manmohan Parida, Santhosh Sannarangaiahl, Paban Kumar Dash, P. V. L. Raol and Kouichi Morita: Loop mediated isothermal amplification(LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology* Vol. 18: 407-422:2008

Kazuya Hidari, Naonori Takahashi, Masataka Arihara, Masato Nagaoka, Kouichi Morita, Takashi Suzuki. : Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga, *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol.376, 91- 95: 2008

Protective and Enhancing HLA Alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for Severe Forms of Dengue Virus Infection, Dengue Hemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome

Nguyen Thi Phuong Lan, Mihoko Kikuchi, Vu Thi Que Huong, Do Quang Ha, Tran Thi Thuy, Vo Dinh Tham, Ha Manh Tuan, Vo Van Tuong, Cao Thi Phi Nga, Tran Van Dat, Toshifumi Oyama, Kouichi Morita, Michio Yasunami, Kenji Hirayama. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Vol. 2. e304, 2008

Prior immunization with severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. Yasui F, Kai C, Kitabatake M, Inoue S, Yoneda M, Yokochi S, Kase R, Sekiguchi S, Morita K, Hishima T, Suzuki H, Karamatsu K, Yasutomi Y, Shida H, Kidokoro M, Mizuno K, Matsushima K, Kohara M. *J Immunol*. Vol. 181(9):6337-48. 2008

Characterization and application of monoclonal antibodies specific to West Nile virus envelope protein. Liu J, Liu B, Cao Z, Inoue S, Morita K, Tian K, Zhu Q, Gao GF. *J Virol Methods*. Vol. 154(1-2):20-6. 2008

森田公一:「日本脳炎ウイルス」、*Drug Delivery System* 23(2):159-161, 2008.

森田公一:「西ナイル熱」、*Medical Practice* 25(5):799-801, 2008

森田公一:「ウエストナイルウイルス」、「日本脳炎ウイルス」、*ウイルスハンドブック*、32-35 河野茂 編集、日本医学館 2008

2) 学会発表

国際会議における発表

Morita K.: Arbovirus situation in Vietnam. Third AREVA-Pasteur Forum, "Mosquito and tick-borne viruses and their environment", Shanghai, China June 12-14, 2008

Morita K Isolation and Characterization of B-cell tropic dengue virus from a dengue hemorrhagic fever patient in Vietnam: 1st Philippine International Dengue Symposium, Quezon City, Philippines, 27 September, 2008.

Morita K. Isolation and Characterization of B-cell tropic dengue virus type 2 from a dengue hemorrhagic fever patient. The 3rd Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases, Nagasaki Japan. 10-11 October, 2008.

H. Kinoshita, V.T.Q. Huong, E.G. Mathenge, N.T. Hung, A. Kumatori, S. Inoue, K. Morita and F. Hasebe : CELL TROPISM OF DENGUE VIRUSES: POSSIBLE VIRUS POPULATION SWITCHING BETWEEN PATIENT AND MOSQUITO. The Second International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever - Global Innovation to Fight Dengue. Phuket, Thailand, 2008年10月15-17日. (Oral Presentation 1: Molecular virology and diagnosis)

Basu Pandey, Ramesh Pun, Om Shah, Krishina Pant, Kouichi Morita, Shingo Inoue, Yae Kurosawa and Ichiro Kurane : EMERGENCE OF DENGUE VIRUS IN

TARIA REGION OF NEPAL. The Second International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever - Global Innovation to Fight Dengue. Phuket, Thailand, 2008年10月15-17日. (Poster Presentation)

Kyaw-Zin Thant, Mya M. Ngwe-Tun, Yee-Yee Lwin, Sanda Lin, Kay-Thi Aye, Pe-Thet Khin, Tin Myint, Khin Htwe, Takeshi Nabeshima, Shingo Inoue, Maria D.C. Parquet and Kouichi Morita : MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF DENGUE VIRUSES CO-CIRCULATING IN UPPER MYANMAR IN THE YEAR 2006. The Second International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever - Global Innovation to Fight Dengue. Phuket, Thailand, 2008年10月15-17日. (Poster Presentation)

国内会議における発表

吉川亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一：長野県におけるイノシシの日本脳炎抗体保有率調査（1）。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市（琴弾荘）、2008年5月30日・31日

鍋島武、井上真吾、住吉誠、春田泰弘、Phan Thi Nga, Hyunh Thi Kim Loan、Vu Thi Que Huoung、Maria del Carmen Parquet、長谷部太、森田公一：東アジア、東南アジアにおける日本脳炎ウイルス遺伝子型の遷移。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市（琴弾荘）、2008年5月30日・31日

井上真吾、福家功、石川豊数、Guillermo Posadas Herrera、Maria del Carmen Parquet、長谷部太、森田公一：西ナイルウイ

ルス不活化ワクチンの開発と最小有効投与量の評価. 第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市(琴弾荘)、2008年5月30日・31日

村木優子、松浦正明、福家功、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信、東雍、森田公一: ウエストナイルワクチンのマウス及びイヌにおける免疫原性について. 第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市(琴弾荘)、2008年5月30日・31日

左一八、在原雅貴、杉浦信夫、木全弘治、鈴木康夫、森田公一、鈴木隆: 硫酸化糖鎖分子に対するフラビウイルス結合性の解析: 第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市(琴弾荘)、2008年5月30日・31日

長谷部太、木下一美、VuThiQueHuong、Michael O.Baclig、Ronald R. Matias、Filipinas F.Natividad、井上真吾、森田公一: 第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市(琴弾荘)、2008年5月30日・31日

NGWE TUN MYA MYAT、Kyaw Zin Thant、Parquet Maria del C.、井上真吾、Yee Yee Lwin、Pe Thet Khin、Tin Myint、Khin Htwe、鍋島武、森田公一: ミャンマー北部におけるデングウイルス感染症の分子疫学および血清学的調査. Molecular epidemiological and serological surveillance on dengue virus infection in Upper Myanmar. 第49回日本熱帯医学会大会・東京都国立国際医療センター、2008年10月25-26日

鍋島武、Hyunh Thi Kim Loan、井上真吾、住吉誠、春田泰宏、Phan Thi Nga、Vu Thi Que Huong、Parquet Maria del Carmen、長谷部太、森田公一: 東アジア、東南アジアにお

ける日本脳炎ウイルス遺伝子型の遷移. Japanese encephalitis virus travelling from Southeast Asia to East Asia. 第49回日本熱帯医学会大会・東京都国立国際医療センター、2008年10月25-26日

木下一美、Huong Vu Thi Que、Hung Nguyen Thanh、Michael Baclig O、Corazon Buerano C、Ronald Matias R、Filipinas Natividad F、井上真吾、森田公一、長谷部太: デング患者の抹消血中におけるウイルス準種(viral quasispecies)と細胞向性. 第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日

左一八、森田公一、鈴木隆: フラビウイルス-硫酸化糖鎖分子間相互作用の解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日

長谷部太、Mai Le Thi Quynh、Thuy Nguyen Thi Thu、Thach Nguyen Co、Cuong Vuong Duc、Dinh Bui Thi、Phuong To Thanh、Ba Nguyen Van、井上真吾、余 福勲、Thong Vu Dinh、森田公一: ベトナムに棲息するコウモリにおける新興再興ウイルス感染症の調査. 第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日

鍋島武、井上真吾、Maria del Carmen Parquet、長谷部太、森田公一: 日本脳炎ウイルスの東南アジアから日本への移動経路について. 第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日

久保亨、井上真吾、鍋島武、森田公一: デングウイルスの4血清型の全てを同時に検出可能なデングウイルス共通 RT-LAMP法の確立. 第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日

久保亨、森田公一：黄熱病ウイルスに対する RT-LAMP 法の確立. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008 年 10 月 26-28 日

久保亨、井上真吾、岡本健太、森田公一：精製黄熱病ウイルスを用いた間接 ELISA 法による黄熱病血清疫学診断系の確立と、そのケニア共和国における応用. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008 年 10 月 26-28 日

余福勲、長谷部太、井上真吾、森田公一：JEV NS3 protein inhibit RNA polymerase activity of JEV NS5 protein in vitro. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008 年 10 月 26-28 日

森田公一：アジアにおける疫学. 第 12 回日本ワクチン学会学術集会・熊本市、2008 年 11 月 8-9 日

村木優子、松浦正明、福家功、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信、東雍、森田公一：培養細胞を用いた不活化ウエストナイルワクチンの開発. 第 12 回日本ワクチン学会学術集会・熊本市、2008 年 11 月 8-9 日

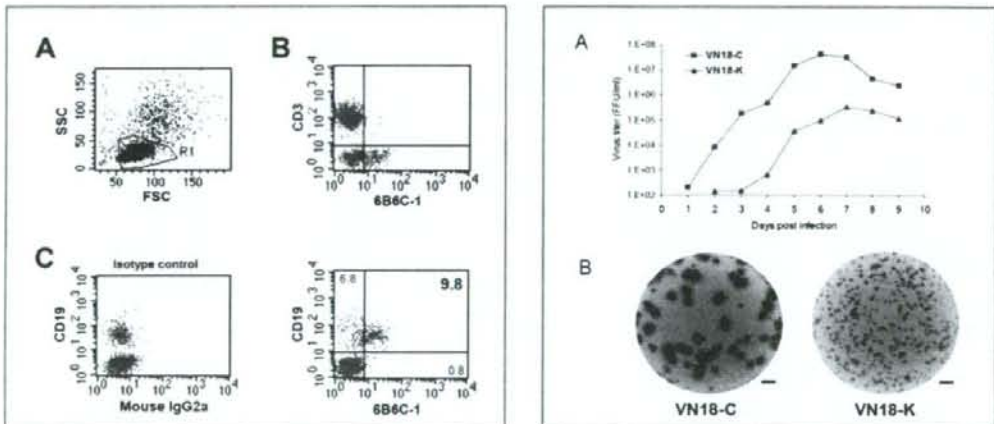
H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

(Table 1.)

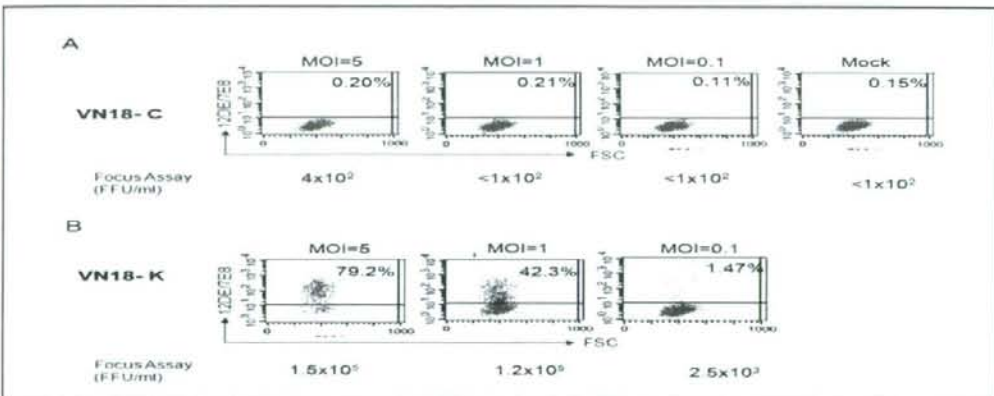
Amino acid position ^a	E-62 ^a	E-397 ^a	NS2B-114 ^a	NS4B-115 ^a
Nucleotide position ^b	1120 ^a	2127 ^a	4472 ^a	7169 ^a
virus ^c	^a	^a	^a	^a
VN18-C ^d	Glu ^a	Ser ^a	Ile ^a	Val ^a
^e	<u>GAG</u> ^a	<u>TCC</u> ^a	<u>ATA</u> ^a	<u>GTA</u> ^a
VN18-K ^d	Lys ^a	Ser ^a	Ile/Thr ^a	Ala ^a
^e	<u>AAG</u> ^a	<u>TCT</u> ^a	<u>A(T/C)^bA</u> ^a	<u>GCA</u> ^a

(Fig1.)

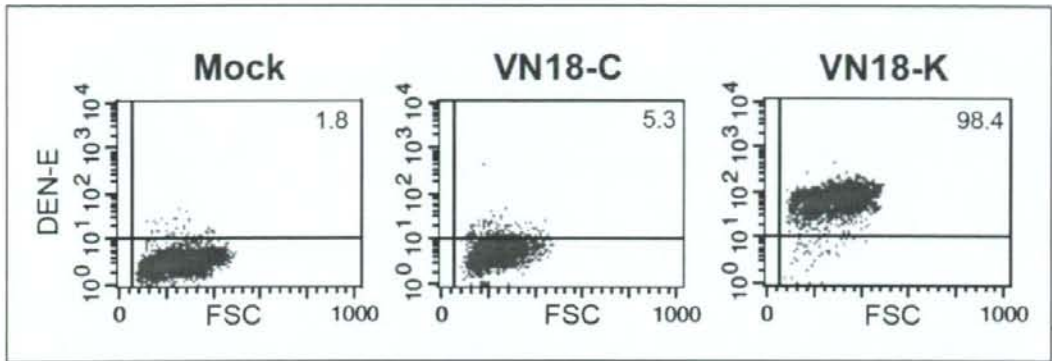
(Fig. 2)



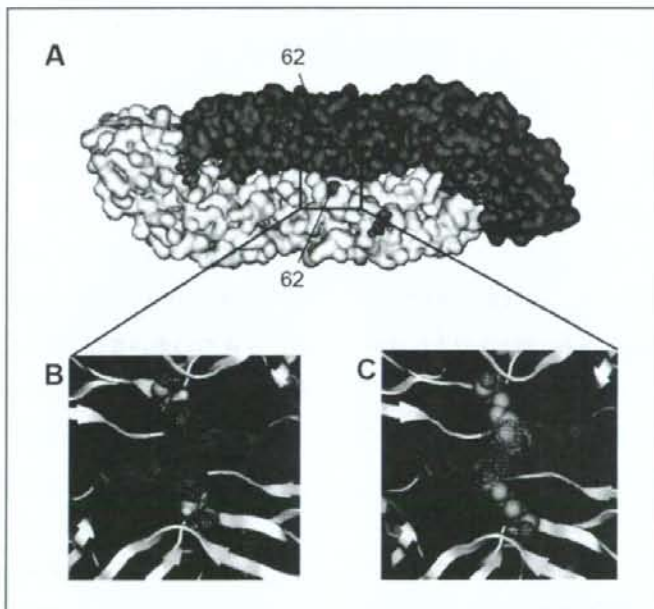
(Fig. 3)



(Fig. 4)



(Fig. 5)



ウイルス感染症の診断、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

研究分担者 有川二郎 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨： ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類され、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因ウイルスである。両疾患ともに持続感染したげっ歯類を自然宿主とする人獣共通感染症である。HFRS の流行は中国、極東ロシアや欧州を中心に広くユーラシア大陸全域で、また HPS は南北アメリカ大陸で報告され、公衆衛生上の大きな問題となっている。本研究では、迅速にハンタウイルス感染を検出するための血清診断法の開発、広い範囲のハンタウイルスをカバーする PCR 法の開発、およびアジアにおけるいわゆる不明熱にハンタウイルスが関与しているかどうかについて検討を行う。

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、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因ウイルスである。両疾患ともに持続感染したげっ歯類を自然宿主とする人獣共通感染症である。HFRS の流行は中国、極東ロシアや欧州を中心に広くユーラシア大陸全域で、また HPS は南北アメリカ大陸で報告され、公衆衛生上の大きな問題となっている。また、東南アジア諸国では、不明熱患者の発生が多く報告され、その中にハンタウイルスを原因とする流行の存在が危惧されてきた。これまで、タイをはじめベトナム、インドネシア、台湾などで人やげっ歯類にハンタウイルス抗体陽性例が報告され、東南アジア諸国において

も流行の存在が示唆されてきたが、感染の状況についての情報は極めて不足している。

ハンタウイルスのうち、Hantaan virus (HTNV)、Seoul virus (SEOV)、Dobrava virus (DOBV)およびPuumala virus (PUUV)の少なくとも4つの血清型がHFRSの原因となる。またSin Nombre virus (SNV)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。非常に多種類のウイルスが南北アメリカ大陸で見いだされているが、ヒトへの病原性を示すものとしては北米大陸のSin Nombre virus (SNV)および南米大陸由来のAndes virus (ANDV)が知られている。その他にも中米などからも多くのウイルスが検出されてい

るが、多くのウイルスはヒトへの病原性については明らかになっていない。また、ANDVは多様性が高く、どこまでをANDVの範疇とするのかについて未だ明確ではない。

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、SNVおよびANDVはアメリカネズミ亜科の齧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。ANDV、SNVの抗原性は交差が強いいため、どちらかひとつの抗原を用いてスクリーニングすることが可能である。逆にこの二つを血清学的に区別する場合中和試験が必要であるとされている。ANDVはしばしばヒト-ヒト感染を起こすことが知られているため、輸入感染症として見いだされた場合の注意が異なると考えられる。しかしながら、交差中和試験には感染性のあるウイルスを多種類準備し、これを安全に取り扱う施設の準備も必要である。これらの準備は大変なコストがかかり、結果を得るまでに時間がかかる。私たちはこれまでネズミ亜科由来ウイルスについて、中和試験の代替として、核蛋白の型特異的エピトープを利用した鑑別ELISAを報告してきた。今回、HPS関連ウイルスに関してこの試験の応用を試みた。

さらに、病原巣動物対策を実施するためには、これらの感染を迅速に摘発し鑑別する系を準備しておくことが、公衆衛生上必要があると考えられる。そこで、ラット属を病原巣動物と

するSEOVを用いて野生ラットの抗体検出系を改善することを試みた。ウイルスゲノムを保有していると見られる個体を迅速にスクリーニングするためにIgM抗体をマーカーとすることを試みた。

B. 研究方法

「抗原」：各ハンタウイルス組換え核蛋白(NP)の全長(アミノ酸：全長抗原)あるいはN末端トランケートNPを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。組み換えバキュロウイルス感染細胞は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、SDSで処理し、Western blotting 抗原とした。また、超音波処理後ELISA抗原とした。

「ELISA」：ELISAは基本的には既報の方法に従った(Araki et al. J. Clin Microbiol. 2001)(Miyamoto Arch. Virol. 2003)。

「患者血清、免疫血清」：SNVに感染した米国の患者血清、カナダで捕獲されたシカシロアシマウスの血清、ベトナムで捕獲されたドブネズミおよびクマネズミの血清を用いた。陽性コントロールとして、SNVウイルスの組換え核蛋白を免疫し家兎血清、SEOVを接種したラット血清を用いた。また、ラット(WKAH/hkm, 5週齢メス)にSEOVを接種し経時的に採血をし抗体の消長を観察した。

(倫理面からの配慮について)

用いた感染血清(患者血清)は米国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ない。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

(1)HPS 関連ウイルス感染鑑別診断法の開発
ANDV/SNV 感染の簡易鑑別診断法をヒトおよび病原巣動物で開発することを目的に抗原の作製を行った。SNV、ANDV、およびエルモロキャニオン様ウイルス (ELMCV;メキシコ由来で病原性を持たないと考えられているもの)の組換え NP 抗原の N 末端を 50 アミノ酸あるいは 100 アミノ酸欠いたトランケート抗原をバキュロウイルスベクターで発現させ抗原とした。これらの組換え抗原の発現量と抗原性を Western blotting および IFA で確認した。

(2) SEOV 感染ラット血清を準備し、ラット鑑別診断系の評価に用いた。SEOV を接種したラットから経時的に採血し、SEOV 特異的 IgM 抗体を測定したところ、接種後 9 日前後をピークとして上昇が見られた。HTNV, SEOV, THAIV のトランケート抗原を用いた鑑別 ELISA を IgM 抗体について実施したところ、反応はほとんど見られず、初期の IgM 抗体のほとんどが N 末端を認識する抗体であると考えられた。接種後 20 日をすぎると IgM 抗体が低下するころに IgG 抗体がプラトーに達する。この IgG 抗体に関して鑑別 ELISA を実施したところ、接種後 20 日をすぎると SOEV 感染パターンを示し型鑑別ができることが示され

た。この診断システムをベトナムのサイゴン湾で捕獲された野生ラットの陽性コロニー(高率で PCR 陽性である集団)の血清に応用したところ、IgM 抗体の陽性例が多いことが明らかとなった。持続感染マウスモデルを用いた我々のこれまでの解析では、持続感染個体では IgM 抗体の持続も確認されることから、野外ラットでの IgM 抗体の検出は、持続感染のマーカーとなりうる可能性が示唆された。IgM 抗体の有無を試験することにより、ウイルス分離やゲノム検出検体の選択を行い、今後の調査に有効であることが考えられた。

D. 考察

(1)HPS 関連ウイルス感染鑑別診断法の開発
ANDV/SNV 感染の簡易鑑別診断法に用いる抗原の発現に成功した。しかしながら現在のところこのシステムを検証する十分の陽性血清が得られていない。北米・南米の共同研究者に依頼して、患者血清および病原巣動物の血清の収集を進めている。今後は多数検体を用いて鑑別診断系の評価を進める必要がある。

(2) 実験的に SEOV 感染させたラットでは感染初期の IgM 抗体については鑑別 ELISA が機能しないことが示された。これと同様の現象が中和試験でも報告されており、中和試験の抗エンベロープ抗体でも、また今回の抗 N 抗体でも IgM 抗体の特異性が低いことが示された。IgG 抗体は接種後 20 日から鑑別 ELISA が有効であったことから、感染後期ほど本鑑別診断システムが有効であることが示された。今後は

野生ラットでの鑑別診断法の有用性を検討する必要がある。また、IgM抗体保有状況とウイルス遺伝子コピー数の対応を明らかにし、持続感染マーカーとしての有用性を更に確認する必要があると考えられる。

E. 結論

ハンタウイルスはその宿主によって、ネズミ亜科由来、ハタネズミ亜科由来、新世界ネズミ由来、および食虫類由来ウイルスの4つのグループに分けられ、その多様性から診断法はそれぞれについて必要である。また、次々と新規ウイルスが報告されつつあり、近い将来より多くのグループが認められるようになる可能性がある。それらについて情報を収集し、診断法を迅速に準備していくことが公衆衛生対策上必要であると考えられる。

健康危険情報

なし

F. 研究発表

1.論文発表

1) Chandy, S., Yoshimatsu, K., Ulrich, R.G., Mertes, M., Okumura, M., John, T., Balraj, V., Muliylil, J., Mammen, J., Abraham, P., Arikawa, J., Sridharan, G.: Seropidemiological study on hantavirus infections in India. *ELESEVIER/Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (2008)102:70-74

2) Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Hatsuse, R., Okumura, M., Nakamura, I., Arikawa, J.: Lack of vertical transmission of Hantaan virus

from persistently infected dam to progeny in laboratory mice.

(*Arch Virol* in 2008;153(8):1605-9. Epub (2008.7))

3) Arai, S., Ohdachi, D., S., Asakawa, M., Kang, H., J., Mocz, G., Arikawa, J., Okabe, N., Yanagihara, R.: Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotichus talpodeis*) *PNAS* Vol.105.No.42 (P16296-16301) (2008.10)

2.学会発表

1) Yoshimatsu, K., Taruishi, M., Arikawa, J., Analysis of the hantavirus-specific CD8+ cell response in mice
The 7th Japan-China International Conference of Virology
University of Tokyo, School of Medicine (2008.6)

2) 吉松組子、垂石みどり、有川二郎
マウスのハンタウイルスに対する細胞性免疫応答の解析: 第55回日本実験動物学会総会 (2008.5)

3) Okumura, M., Yoshimatsu, K., Kumperasart, S., Nakamura, I., Taruishi, M., Sungdee, A., Pattamadilok, S., Yanagihara, R., Arikawa, J.: Antigenic profile of thottapalayam virus and development of a serodiagnostic assay
XII International Congress of Virology
Istanbul, Turkey (2008.8)

4) Kariwa, H., Miyashita, D., Hernandez, C., Romero-Almaraz, M., Ramos, C., Seto, T.

- Murata, R. , Bin Abu Daud, N. , Ishizuka, M.
Nakauchi, M.,Yoshii, K.,Yoshimatsu, K.
Arikawa, J.,Takashima, I.: Epidemiological
Investigation of Hantavirus Infection in Mexico
XII International Congress of Virology
Istanbul,Turkey (2008.8)
- 海老原秀喜、有川二郎、:
新世界ハンタウイルス感染の血清型鑑別
診断法の確立:第56回日本ウイルス学会学術
集会(2008.10)
- 5) Endo, R., Ishiguro, N., Shirkoohi, R.
Teramoto,S., Ariga, T., Yoshimatsu, K.
Arikawa, J.: Seroepidemiology of human
bocavirus infection in Japan XII International
XII International Congress of Virology
Istanbul,Turkey (2008.8)
- 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
- 6)新井智、大館智志、浅川満彦、有川二郎
Mocz Gabor,岡部信彦、Yanagihara Richard,:
Newfound Hantavirus Sequences in the
Japanese Shrew Mole(Urotrichus talpoides)
第56回日本ウイルス学会学術集会(2008.10)
- G. 研究発表
- 1.論文発表
- 2.学会発表
- 7)Nur hardy Abu Daud,苺和宏明、石塚万里子、
瀬戸隆弘、宮下大輔、真田崇弘、中内美名、
好井健太郎、前田秋彦、吉松組子、有川二郎、
Evgeniy Tkachenko,高島郁夫、:
Genetic and antigenic characterization of
Puumala virus strain DTJ-Ufa-97
Isolated from a patient of hemorrhagic fever
With renal syndrome. 第56回日本ウイルス学
会学術集会(2008.10)
- 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
- 8)駒貴明、吉松組子、垂石みどり、遠藤理香、

ハンタウイルス感染症の疫学的研究

研究分担者 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。ハンタウイルスには様々なウイルスが知られているが、それぞれのウイルスが特定の自然宿主を持つことが大きな特徴となっている。米国やアルゼンチンなど、南北アメリカ大陸の諸国では HPS が多発しているが、メキシコにおいては HPS の発生はこれまで報告されていない。メキシコではハンタウイルス感染の流行状況がほとんど調査されていないことから、まずげっ歯類におけるハンタウイルス感染の疫学調査を実施した。2006 年にメキシコのゲレーロ州とモレロス州において 211 匹のげっ歯類を捕獲し、これらについて抗ハンタウイルス抗体とウイルス遺伝子の検出を行った。その結果、8 種のげっ歯類、すなわち *P. aztecus* の 71% (10/14)、*P. beatae* の 75% (3/4)、*Habromys simulatus* の 8.8% (3/34)、*R. sumichrasti* の 33% (3/9)、*R. fulvescens* の 50% (3/6)、*R. megalotis* の 4.4% (1/23)、*Neotoma picta* の 17% (1/6)、および *Megadontomys thomasi* の 17% (1/6)、合計 25 例が ELISA と Western blot により抗ハンタウイルス抗体陽性となった。これらの抗体陽性のげっ歯類の肺から RNA を抽出し、RT-PCR によってハンタウイルスの S 遺伝子の検出を試みたところ、19 例でウイルス遺伝子陽性となった。増幅された遺伝子の塩基配列をダイレクトシーケン法により決定し、これらの配列について系統樹解析を行ったところ、メキシコのハンタウイルスは *Peromyscus-Habromys* 属系、*R. fulvescens* 系、および *R. megalotis* 系の 3 系統のウイルスに大きく分類できることが判明した。これらのウイルスはいずれも新規のハンタウイルスであった。

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、マイナスイオン鎖の RNA ウイルスで、Hantaan、Seoul、Puumala、Sin Nombre など 20 種類以上のウイルス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。米国では 1993 年以来多数の HPS 患者が毎年報告されている

が、メキシコにおいてはハンタウイルス感染の流行状況がほとんど調査されていない。

そこでまずげっ歯類におけるハンタウイルス感染の疫学調査を実施し、病原巣動物や流行地の特定を試み、さらにハンタウイルスの遺伝子性状の解明を試みた。

B. 研究方法

1. げっ歯類の疫学調査

2006年5月にメキシコのゲレーロ州とモレロス州において合計211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。採取した臓器は使用時まで -80°C で保存し、血清は抗体検査時まで -40°C で保存した。

2. ELISAによる抗体検出

米国のシカシロアシマウス(*Peromyscus maniculatus*)から分離されたSin Nombreウイルスのヌクレオキャプシド蛋白質(NP)を大腸菌で発現させたもの(SNV-rNP)を抗原としてELISAを実施した。抗原をコートした96穴プレートを生血清アルブミンでブロッキングし、げっ歯類の血清をアプライした。抗体の検出はペルオキシダーゼ標識抗シカシロアシマウスIgGもしくはペルオキシダーゼ標識プロテインGを用いた。

3. Western blotによる抗体検出

ELISAで抗体陽性となった血清についてさらにWestern blot(WB)による抗体の検出を実施した。ELISAに用いたのと同じSNV-rNPをSDS-PAGEで電気泳動し、Polyvinylidenedifluoride(PVDF)膜に転写した。SNV-rNPの転写されたPVDF膜を転写用bufferに浸した後、ブロックエース(大日本製薬)に浸し、 4°C で一晩ブロッキングを行った。PBST[0.05% Tween-20 加PBS]で5分間4回洗浄後、PBSで1:400に希釈した被検血清に浸し、室温で1時間反応させた。再度洗浄後、PBSで1:5,000に希釈したペルオキシダーゼ標識抗*Peromyscus* IgG(KPL)に浸し、室温で1時間反応させた。再度洗浄後、ECL Detection Reagent(GE Healthcare)に室温で1分間浸し、発光をCCDカメラで検出した。

4. RT-PCR

抗体陽性のげっ歯類の肺からRNAを抽出し、ハンタウイルスのS遺伝子を標的としてRT-PCRを行った。RNAの抽出は型のごとく行い、SuperScript IIを用いて逆転写反応を行った後、Platinum Taq DNA Polymeraseを用いてウイルス遺伝子の増幅を行った。

5. 遺伝子解析

PCRにて増幅されたS遺伝子の一部(約550塩基)はダイレクトシークエンス法により、塩基配列を決定し、系統樹解析は近隣接合法にて行った。

(倫理面からの配慮について)

本調査はメキシコ国内の野生動物保護の理念に基づいて、国立公衆衛生研究所に事前に申請され、許可されたものである。

C. 研究結果

捕獲された合計211匹のげっ歯類血清についてELISAを行ったところ、28検体の抗体陽性率が検出された。ELISA陽性の28検体についてWBを行ったところ、25例で特異的なバンドが検出されたが、ELISA陰性例ではバンドが検出されなかった。WB陽性例の見られた8種類のげっ歯類の抗体陽性率は以下の通りであった。すなわち、*P. aztecus*: 71% (10/14)、*P. beatae*: 75% (3/4)、*Habromys simulatus*: 8.8% (3/34)、*R. sumichrasti*: 33% (3/9)、*R. fulvescens*: 50% (3/6)、*R. megalotis*: 4.4% (1/23)、*Neotoma picta*: 17% (1/6)、および*Megadontomys thomasi*: 17% (1/6)であった。*P. aztecus*、*P. beatae*、*H. simulatus*、*N. picta*、および*M. thomasi*でハンタウイルス感染が認められたのは今回が初めてであった。また、こ

これらの抗体陽性例について RT-PCR を行ったところ、*P. aztecus* (10 例)、*P. beatae* (2 例)、*H. simulatus* (3 例)、*R. sumichrasti* (1 例)、*R. fulvescens* (2 例)、および *R. megalotis* (1 例)、合計 19 例からハンタウイルスの S 遺伝子が検出された。また、増幅されたウイルス遺伝子の塩基配列を決定し、系統樹解析を行ったところ、メキシコのハンタウイルスは *Peromyscus-Habromys* 属系、*R. fulvescens* 系、および *R. megalotis* 系の 3 系統のウイルスに大きく分類できることが判明した。これらのウイルスはこれまで未報告の新規ハンタウイルスであった。

D. 考察

メキシコのげっ歯類のうち、*Peromyscus* 属、*Habromys* 属、および *Reithrodontomys* 属のネズミで多くの抗体陽性例が確認されたことから、メキシコではこれらの属のげっ歯類がハンタウイルスの主要な宿主となっていることが示唆された。また、今回 WB で抗体陽性となった 25 例中、24 例はゲレー州で捕獲されたものであり、モレロス州で捕獲された抗体陽性例はわずか 1 例であった。今後、抗体陽性例のげっ歯類が捕獲された地区の住民などの血清について抗体検出を行い、人におけるハンタウイルス感染の有無について検討する予定である。

E. 結論

HPS の多発している米国南部に隣接しているにもかかわらず、これまでメキシコでは HPS 患者が報告されていなかった。しかし、本研究で、少なくともメキシコ国内の多様なげっ歯類に複数のハンタウイルスが感染していることが判明した。今後、これらのウイルスが人

に感染性や病原性を示すのかについてさらに詳細な調査を行う必要があると考えられる。

本研究により、メキシコの野生げっ歯類におけるハンタウイルスの感染状況の一端が明らかになった。

なお、本研究はメキシコ国立公衆衛生研究所の Celso Ramos 博士とメキシコ国立自治大学の Cornelio S. Hernandez 博士および Maria L. R. Almaraz 博士との共同研究である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshii K, Goto A, Kawakami K, Kariwa H, Takashima I. Construction and application of chimeric virus-like particles of tick-borne encephalitis virus and mosquito-borne Japanese encephalitis virus. *J Gen Virol*. 89: 200-211, 2008.
- 2) Kariwa H, Noda H, Nakauchi M, Ishizuka M, Hashiguchi K, Hashimoto S, Yoshii K, Asano A, Agui T, Kogaki H, Kurano Y, Uchida Y, Fujii N, Okada M, Takashima I. Characterization and epitope mapping of monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Jpn J Vet Res*. 55: 115-127, 2008.
- 3) Dutta NK, Mazumdar K, Lee BH, Baek MW, Kim DJ, Na YR, Park SH, Lee HK, Kariwa H, Mai le Q, Park JH. Search for potential target site of nucleocapsid gene for the design of an epitope-based SARS DNA vaccine. *Immunol Lett*. 118: 65-71, 2008.

- 4) Nakamura I, Yoshimatsu K, Lee BH, Okumura M, Taruishi M, Araki K, Kariwa H, Takashima I, Arikawa J. Development of a serotyping ELISA system for Thailand virus infection. *Arch Virol.* 153: 1537-1542. 2008.
- 5) Lee HK, Lee BH, Dutta NK, Seok SH, Baek MW, Lee HY, Kim DJ, Na YR, Noh KJ, Park SH, Kariwa H, Nakauchi M, Maile Q, Heo SJ, Park JH. Detection of antibodies against SARS-Coronavirus using recombinant truncated nucleocapsid proteins by ELISA. *J Microbiol Biotechnol.* 18: 1717-1721, 2008.
- 6) Nakauchi M, Kariwa H, Kon Y, Yoshii K, Maeda A, Takashima I. Analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus structural proteins in virus-like particle assembly. *Microbiol Immunol.* 52: 625-630, 2008.
- 7) Abu Daud NH, Kariwa H, Tkachenko E, Dzagurnova T, Medvedkina O, Tkachenko P, Ishizuka M, Seto T, Miyashita D, Sanada T, Nakauchi M, Yoshii K, Maeda A, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Genetic and antigenic analyses of a Puumala virus isolate as a potential vaccine strain. *Jpn J Vet Res.* 56: 151-165, 2008.
2. 学会発表
- 1) 中内美名、藤井寛子、苅和宏明、前田秋彦、好井健太郎、高島郁夫：SARS コロナウイルスの N および M 蛋白質の粒子形成における機能解析：第 145 回日本獣医学会学術集会、相模原 (2008, 3)
- 2) 村田亮、好井健太郎、苅和宏明、江下優樹、高島郁夫：ウエストナイルウイルスの E 蛋白上糖鎖が宿主内におけるウイルス増殖に与える影響：第 145 回日本獣医学会学術集会、相模原 (2008, 3)
- 3) Nur Hardy AD, Kariwa H, Ishizuka M, Seto T, Miyashita D, Sanada T, Nakauchi M, Yoshii K, Maeda A, Yoshimatsu K, Arikawa Jiro, Tkachenko E, Takashima I: Genetic and antigenic characterization of Puumala virus strain DTK/Ufa-97 to evaluate as a future vaccine candidate for hemorrhagic fever with renal syndrome: 第 145 回日本獣医学会学術集会、相模原 (2008, 3)
- 4) Takashima I, Murata R, Hashiguchi K, Kariwa, H: A seroepidemiological study of a West Nile virus infection among wild birds in Far East Russia and the relationship between glycosylation of the virus: XIVth International Congress of Virology, Istanbul (2008, 8)
- 5) Kariwa H, Miyashita D, Hernandez GS, Romero-Almaraz ML, Ramos C, Seto T, Murata R, Abu Daud NH, Ishizuka M, Nakauchi M, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I: Epidemiological investigation of hantavirus infection in rodents from Mexico: XIVth International Congress of Virology, Istanbul (2008, 8)
- 6) 前田潤子、村田亮、苅和宏明、倉根一郎、、高島郁夫、前田秋彦：ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスの鑑別中和試験法の開発：第 146 回日本獣医学会学術集会、宮崎 (2008, 9)
- 7) 真田崇弘、苅和宏明、瀬戸隆弘、谷川洋一、

- 宮下大輔、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫：多種類のハンタウイルス血清型の検出が可能な抗原検出法の開発：第 146 回日本獣医学会学術集会、宮崎（2008, 9）
- 8) 千葉裕美子、伊川綾恵、好井健太郎、大森優紀、村田亮、苺和宏明、高島郁夫：ウイルス様粒子を用いたダニ媒介性脳炎の新たな診断法の開発：第 146 回日本獣医学会学術集会、宮崎（2008, 9）
- 9) 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中空ウイルス様粒子のワクチンへの応用：第 146 回日本獣医学会学術集会、宮崎（2008, 9）
- 10) 村田亮、江下優樹、前田秋彦、前田潤子、秋田紗希、田中智久、好井健太郎、苺和宏明、梅村孝司、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：第 56 回日本ウイルス学学術集会、岡山（2008, 10）
- 11) 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中空ウイルス様粒子のワクチンへの応用：第 56 回日本ウイルス学学術集会、岡山（2008, 10）
- 12) 真田崇弘、苺和宏明、瀬戸隆弘、谷川洋一、宮下大輔、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫：多種類のハンタウイルス血清型の検出が可能な抗原検出法の開発：第 56 回日本ウイルス学学術集会、岡山（2008, 10）
- 13) Nur Hardy Abu Daud、苺和宏明、石塚万里子、瀬戸隆弘、宮下大輔、真田崇弘、中内美名、好井健太郎、前田秋彦、吉松組子、有川二郎、Evgeniy Tkachenko、高島郁夫：Genetic and antigenic characterization of Puumala virus strain DTK/Ufa-97 isolated from a patient of hemorrhagic fever with renal syndrome：第 56 回日本ウイルス学学術集会、岡山（2008, 10）
- 14) 苺和宏明、瀬戸隆弘、Evgeniy A. Tkachenko、Vyacheslav G. Morozov、Alexander E. Balakiev、谷川洋一、中村一郎、橋本信夫、吉松組子、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 8 回人と動物の共通感染症研究会学術集会、東京（2008, 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

厚生労働科学研究費補助金(社会保障国際協力推進研究事業)

分担者研究報告書

ウイルス性出血熱の診断法の開発に関する研究:

病原性の異なるサル痘ウイルス株コンゴ盆地型(Zr-599 株)と西アフリカ型

(Liberia 株)における遺伝子の相違

研究分担者 西條政幸

国立感染症研究所ウイルス第1部第3室室長

研究要旨:サル痘ウイルスは、天然痘の病原体である痘瘡ウイルスと同様にポックスウイルス科オルソポックスウイルスに分類される二本鎖DNAウイルスであり、ヒトにおいて天然痘類似疾患(ヒトサル痘)を引き起こす。遺伝子型の違いから強毒株のコンゴ盆地型とそれに比較して病原性の低い西アフリカ型に区別される。10⁶PFUのZr-599とLiberia株をそれぞれカニクイザルに皮下接種すると、Zr-599感染の場合には4頭中3頭が死亡し、Liberia株感染の場合には3頭中1頭が死亡した。前者の病原性が高い。最近、その病原性の違いの遺伝的背景として、*D14L*、*D10L*、*B10R*の違いが原因でないかと報告された(Chen N, et al., *Virology* 340:46-63, 2006)。Liberia株は分泌型補体結合蛋白発現遺伝子*D14L*を欠損し、Zr-599では207アミノ酸からなる分泌型補体結合蛋白をコードする遺伝子が認められた。病原因子*B10L*遺伝子の塩基配列解析によるは、Zr-599株は221個のアミノ酸からなる病原因子を、Liberia株では早期ストップコドン出現により118個のアミノ酸からなる病原因子蛋白を発現すると予想された。IL-B結合蛋白発現*B14R*遺伝子塩基配列から、Zr-599株は、326個のアミノ酸からなるIL-B結合蛋白ではなく、フレームシフト変異により207個のアミノ酸配列からなるIL-B結合蛋白を発現するものと予想された。一方、Liberia株は163個のアミノ酸からなるIL-B結合蛋白を発現するものと考えられた。これらの成績により、中でも*D14L*または*B10R*遺伝子、または、その両方がコンゴ盆地型と西アフリカ型の病原性の違いに寄与しているもの予想される。

A. 研究目的

サル痘はサルにおける天然痘様疾患として1958年に初めて報告され、その病原体はサル痘ウイルスであることが明らかにされた。サル痘ウイルスは、天然痘の病原体(痘瘡ウイルス)と同様に、ポックスウイルス科オルソポックスウイルス属に分類される2本鎖

DNAウイルスである。1970年には、ヒトのサル痘ウイルス感染症(ヒトサル痘)がコンゴ民主共和国(旧ザイール)において天然痘様疾患としてはじめて報告された。ヒトサル痘は、中央および西アフリカにおいて流行しており、現在でもコンゴ民主共和国やスーダンなどで流行している。サル痘ウイルスはコンゴ盆地