

ため、スズメと同じフィンチ類に属し、入手し易いブンチョウを用いて、次の2つの感染実験を行った。

B. 研究方法

各実験とも、ペットとして流通しているブンチョウを用いた。飼育はP2施設のアイソレーター内で行い、餌は市販の殻付きの種子餌を不断給餌し、水と餌は毎日交換した。また、実験前にクロアカスワブを採取して、サルモネラを保有していないことを確認した。各実験の詳細は以下の通り。

【実験1】ブンチョウ(成鳥)14羽を4群にわけ、1群(対照群、n=2)は生食を、2群(n=3)はST40を $3.1 \log_{10}$ CFU、3群(n=6)はST40を $5.1 \log_{10}$ CFU、4群(n=3)はST40を $7.1 \log_{10}$ CFU単回経口接種した。

【実験2】ブンチョウにおけるST40の毒性を明らかにするため、ST40($5.1 \log_{10}$ CFU)とヒトの食中毒患者より分離された*Salmonella* Typhimurium(HST: $4.7 \log_{10}$ CFU)を6羽ずつ(幼鳥2羽、成鳥4羽)に単回経口接種した。

接種後1ヶ月間臨床経過を観察し、経時的に糞とクロアカスワブを採材、微生物学的検査にてST40の排菌状況を確認した。

実験終了時に全ての生存個体を安楽死後、剖検を実施し、肝臓、脾臓、そ嚢、腸管およびクロアカスワブを微生物学的に、また、全身諸臓器を病理学のおよび免疫組織学的に検索した。

C. 結果

【実験1】1群対照(生食)と2群には死亡例はなかった。3群では8~19日目までに全羽死亡し、4群では2羽死亡した。

死亡個体では接種後7日目から下痢がみ

られ、 $5.1 \log_{10}$ CFU接種群で8~18日目、 $7.1 \log_{10}$ CFU接種群では7~11日目までに下痢や軟便といった糞の異常がみられた。膨羽・衰弱・嗜眠などの臨床症状は死の1~5日前より認められた。

経時的なクロアカスワブによる検査では、死亡個体のうち1羽が斃死前日、1羽が斃死5日前に1回ずつST40が分離された。

すべての死亡個体で肉眼的に肝臓、脾臓の腫大と肝臓の白色結節形成がみられ、組織学的に肝臓の多発性巣状壊死、チフス結節の形成、全身諸臓器の血管内に無反応性の菌塊形成とときに血栓形成が観察された(図1)。なお、スズメで高率に観察された偽膜性そ嚢炎はみられなかった。ST40は肝臓、脾臓、そ嚢、腸管と死亡直前のクロアカスワブから分離された。生き残った個体の臓器からST40は分離されず、ST40関連病変もなかった(表1、2、3)。

【実験2】ST40接種群(n=6)では、5羽が発症し、その後、状態の悪化による安楽死もしくは死亡した個体が3羽いた。HST接種群(n=6)は成鳥1羽が発症したが、回復し死亡例はなかった。肝臓の腫大の程度や白色結節の有無、壊死の程度などの病変はST40接種群でより高度であった(図2)。死亡個体の病理像は実験1と同様であった。

死亡個体すべてで、臓器からST40が分離されたが、生き残った個体の臓器および実験に供した全個体のクロアカスワブからST40は検出されなかった。

病理組織学的には、短期間の経過で死亡した個体では、一般に細菌に対する炎症反応が弱く、特に、脳や消化管ではその傾向が強かった。生存期間の長いものでは肺や腎臓に膿瘍や壊死巣、肝臓での肉芽腫形成、ときに血栓形成が観察された。なお、 $5.1 \log$

10⁶CFU 接種群の 1 羽(ST506)にのみ、そ嚢粘液腺房内に菌塊が認められたが、組織学的にも、そ嚢炎はみられなかった(表 3)。

抗サルモネラ 04 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、死亡個体の全身臓器で陽性の菌塊が観察された(図 3、4)。

D. 考察

サルモネラはグラム陰性の通性嫌気性桿菌で腸内細菌科に属し、2 菌種に分類され、そのうち、サルモネラ *Salmonella enterica*、亜種 I に属する菌が、急性腸管感染症(サルモネラ症)を起す。

その症状は、免疫能の低い小児や高齢者では重篤となることがあるが、一般的に、健康な成人では胃腸炎にとどまり、その病原性は宿主側の要因によって異なると思われる。動物においても同様の傾向があり、サルモネラ単独で、成体に致死的に働くことは、それほど多くない。また、発症は用量に依存しており、通常 10⁵ 以上の菌量が必要とされている。

以上のことから、北海道におけるスズメ大量死の病理発生を解析するため、ブンチョウを用いてスズメ由来 *Salmonella* Typhimurium ST40 の病原性について検討した。

その結果、ST40 は、ブンチョウに対し用量依存性に致死性に働くことが明らかになった。特に、実験 1 では、発症の目安とされる 10⁵ で、100%の死亡率を示した。キンカチョウを用いてキンカチョウ由来 ST を接種した 2 つの報告では、32 羽中 1 羽(10⁵ 接種 16 羽中 1 羽)のみの死亡であった。また、ジュウシマツ由来 ST をジュウシマツおよびニワトリ雛に接種した 4 つの報告でも、10⁵ 接種した 16 羽中 2 羽のみが死亡した。

よって、成鳥をも、高率に致死に至らしめる ST40 の高病原性が示された。なお、キンカチョウ *Taeniopygia guttata* とジュウシマツ *Lonchura striata* var. *domestica* は、ブンチョウ *Padda oryzivora* と同様にフィンチ類スズメ目カエデチョウ科に属していることから、動物種による感受性の違いは少ないと判断した。しかし、これを検証するために、ST40 とヒト食中毒患者より分離された ST(HST)を用いて、実験 2 を実施した。

その結果、ST40 接種群の幼鳥はすべて死亡し、成鳥は 75%の発症率で、死亡率は 25%であった。これに対して、HST では 1 羽で発症がみられたものの耐過して、死亡例はなかった。よって、ブンチョウという鳥種が ST 全般に感受性が高いわけではなく、ST40 自体の病原性が高いことが再確認された。また、幼鳥での死亡率が高いことから、多くのサルモネラと同様に年齢に症状が依存するものと考えられた。なお、実験 1 と死亡率が異なったが、これは、異なる繁殖施設からブンチョウを購入したことに関係するかもしれない。

今回の実験により、ST40 の高病原性が証明されたが、このファージ型 40 は、今まで、国内でヒトからも動物からも分離されることがない。しかしながら、諸外国の野鳥の ST 症では、最も一般的なファージ型である。このことから、何らかのルートで国内に持ち込まれたものと推察される。新興感染症の定義の 1 つに「その土地には存在しなかったが、新たに病気として確認できた疾患」という項目があるが、その意味では、北海道で突発的に発生したスズメの ST 症は新興感染症として捉えられるかもしれない。

国内外のスズメの自然発生性 ST40 症の

病理像と本実験例のそれと比較したところ、そ嚢炎の有無を除いて、ほぼ一致したが、ブンチョウの病変は、壊死傾向が強く、細胞反応の乏しい菌塊が認められ、急性病変を主体としていたことから、早期に敗血症化し死に至ると考えられた。

そ嚢炎は、自然発生性スズメのST症の特徴的病理像とされる。ブンチョウでそ嚢炎が観察されなかった理由として、先述のように急性経過で死亡すること、鳥種差、接種量と回数などが考えられた。なお、自然発生性のST症にみられるそ嚢炎の病理発生については、明らかにされていないが、食物とともに飲み込まれたサルモネラがそ嚢内にとどまり、局所から侵入する、あるいは、血行性に到達するなどが考えられる。今回、2羽のみであるが、そ嚢あるいは食道の上皮下の血管内に菌塊を観察したところから、血行性に菌がそ嚢に到達し、炎症をおこすのかもしれない。すなわち、そ嚢炎は、敗血症の1分症としての病変かもしれない。

接種後、経時的にクロアカスワブによって排菌状況を追跡したが、死亡時には、全例から検出されたが、生前の検査では死亡個体2羽のみ、各1回の排菌で、ブンチョウでは、死ぬ間際にならないと排菌ほとんどないことおよび、耐過個体では諸臓器からSTが分離されないことは、自然発生性のスズメST症の状況と異なるものであった。この理由として、鳥種差などが考えられたが、いずれにしても、ST40が自然界でどのようにSTが維持され、集団発生に結びつくのか、さらなる検討が必要と考える。

E. 参考文献

- (1) 宇根有美、三部あすか、鈴木智、仁和岳史、加藤行男、川上和人(2007) スズメ *Passer montanus* の *Salmonella* Typhimurium 感染症、獣医畜産新報、60(5):384-385.
- (2) 宇根有美(2007) 北海道のスズメ大量死事例から見出された *Salmonella* Typhimurium DT40 感染症、病原微生物検出情報、28(2):19-21.
- (3) Yumi Une, Asuka Sanbe, Satoshi Suzuki, Takeshi Niwa, Kazuto Kawakami, Reiko Kurosawa, Hidemasa Izumiyama, Haruo Watanabe, Yukio Kato (2008) The *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium infectious disease that was found in the sparrow mass death in Hokkaido. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 61:166-167.

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表等

学会発表

- 1) 添田琴恵、政岡智佳、鈴木智、仁和岳史、加藤行男、石原ともえ、宇根有美：北海道のスズメ (*Passer montanus*) 大量死事例より分離された *Salmonella* Typhimurium DT40 の病原性と病理発生に関する検討。第8回人と動物の共通感染症研究会学術集会、北里大学薬学部コンベンションホール、2008年11月1日。

表2 死亡個体における臓器材料からのST分離菌量(CFU/g)

	ST501(14)	ST502(8)	ST503(11)	ST504(15)	ST505(11)	ST506(19)	ST701(8)	ST702(10)
肝臓	1.8×10 ⁷	1.5×10 ⁸	5.7×10 ⁶	4.3×10 ⁸	4.0×10 ⁶	2.4×10 ⁸	8.3×10 ⁷	2.7×10 ⁸
脾臓	2.0×10 ⁷	1.8×10 ⁸	4.5×10 ⁸	2.2×10 ⁸	8.8×10 ⁸	*	1.8×10 ⁸	1.3×10 ⁸
そ嚢	6.0×10 ⁶	1.4×10 ⁶	8.9×10 ⁶	9.3×10 ⁶	1.1×10 ⁶	8.4×10 ⁵	5.9×10 ⁴	4.6×10 ⁵
腸管	9.0×10 ⁷	1.4×10 ⁸	2.0×10 ⁸	4.0×10 ⁷	2.8×10 ⁷	3.9×10 ⁷	1.8×10 ⁸	3.7×10 ⁸

* : 操作ミスにより検出されず / ()内の数値は死亡時期

表3. 死亡個体と生存個体にみられた共通所見とサルモネラ症のズメの一般所見

死亡個体	生存個体	サルモネラ症のズメ
肝臓・脾臓の腫大 肝臓の白色結節 肝臓の多発性巣状壊死 全身諸臓器の血管内に 菌塊がみられ、細胞反応 は乏しかった 肝臓・脾臓・そのう・腸 管・クロアカスワブからS Tを分離	ST関連病変は なかった 臓器からSTは分離され なかった	肝臓・脾臓の腫大 肝臓の白色結節 そのうでの白色結節 全身諸臓器での壊死性 化膿性炎

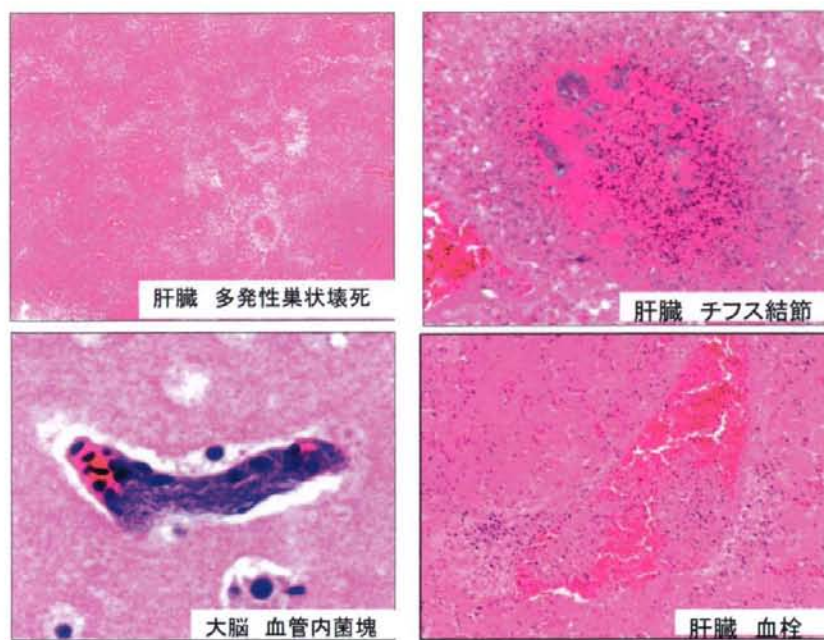


図1 死亡個体の組織所見 (HE染色)

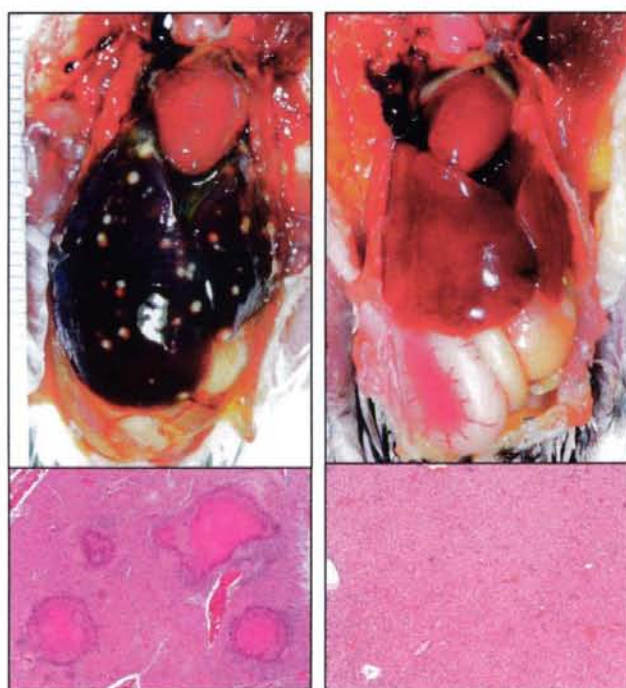


図2 肝臓病変の比較
 左：ST40接種群 右：HST接種群
 上段：肉眼写真 下段：組織写真(HE染色)

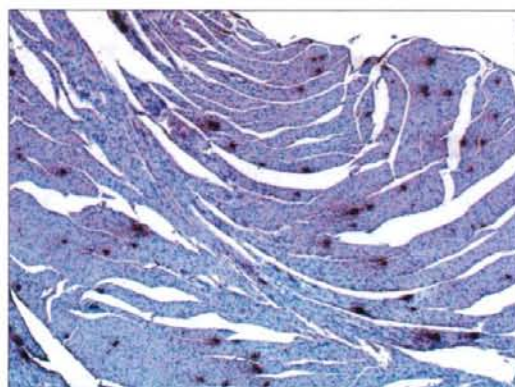


図3 心臓
抗サルモネラO4抗体を用いた免疫染色



図4 食道
抗サルモネラO4抗体を用いた免疫染色

表1. 排菌と臨床症状（実験1）

		0	3	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
10 ₅ 接種群	ST501	(-)	(-)	(-)							(+)					
	ST502	(-)	(-)	(-)	(+)											
	ST503	(-)	(-)	(-)				(+)								
	ST504	(-)	(-)	(-)							(+)	(+)				
	ST505	(-)	(-)	(-)				(+)								
	ST506	(-)	(-)	(-)								(+)				(+)
	糞															
10 ₇ 接種群	ST701	(-)	(-)	(-)	(+)											
	ST702	(-)	(-)	(-)			(+)									
	ST703	(-)	(-)	(-)							(-)					
	糞															

: 臨床症状がみられた日
 : 死亡日
 : 糞便に異常のみられた日

(+): スワブからST分離 (-): スワブからSTが分離されなかった

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

4. 危機管理対応のための診断技術開発に関する研究

研究分担者：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、福土秀悦、水谷哲也、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旧世界アレナウイルスである。LCMV は、ウイルス蛋白質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、①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、②近年分離した LCMV M1 株が既知の LCMV とは遺伝的距離があることを明らかにした。本年度は、旧世界アレナウイルスの L および GPC 遺伝子で高度に保存された領域で設計されたプライマーを用いて遺伝子増幅を行った結果、LCMV の代表株である Armstrong 株と WE 株のみならず、既知の LCMV とは異なるグループの M1 株についても効率良く検出でき、さらにラッサ、モバラ、モペイヤウイルスも検出できた。

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リンパ球性脈絡髄膜炎の病原体で、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 (Dandenong virus) が同定されている (N Engl J Med. 358:991-8, 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: 272-81, 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 の遺伝子検出に関する文献 (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、米国での臓器移植により感染した患者や、国内でのマウスからの検出の場合でも、原因となった LCMV 株の遺伝子配列が部分的に決定されてから、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 (Dandenong virus) 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 (数十万種類のシーケンスが数時間で行なえる) の網羅的遺伝子配列解析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質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 やラッサウイルスでは、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。

近年、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。これまでに、既にゲノム配列の判明している LCMV 2 株 (Armstrong 株、M1 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。また、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ため、LCMV M1 株の配列決定と分子遺伝学的解析を行った。その結果、M1 株は Dandenong virus (臓器移植に関連して死亡した患者分離株) と共に既知の LCMV とは異なるグループ (LCM-like ウイルスグループ) を形成することを明らかにした。しかし、RDV 法は、検出感度が特異的 RT-PCR より感度が低いことやウイルスが分離されていることを前提とした検査法であるため、患者や動物検体から直接ウイルス遺伝子を検出するためには Consensus-PCR 法の確立が必須である。そこで、本年度はアレナウイルス既知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および GPC 蛋白質で高度に保存された領域でのより高感度な遺伝子増幅条件の検討を行った。

B. 方法

1. Consensus-PCR 法: Vieth S et al. (*Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101: 1253-64, 2007) の L 遺伝子検出用 RT-PCR (Old arena L1)、それを modified して degenerate primer set とした RT-PCR (Old arena L2)、及び Günther S.らによる GPC 遺伝子検出 RT-PCR (Old arena GPC)。
2. LCMV 株の RNA 抽出: LCMV Armstrong 株、WE 株、M1 株をそれぞれ感染させた Vero E6 細胞から ISOGEN を用いて virus RNA を抽出し、ランダムプライマ

一を用いて cDNA を作製した。

3. LCMV M1 株での検出感度の比較 : LCMV M1 株の L 蛋白質および GPC 蛋白質の PCR での各遺伝子増幅部位を含む部分配列を pGEM-T vector にクローニングし、PCR による検出限界のコピー数を算出した。
4. 旧世界アレナウイルス分離株間での比較 : Lassa virus Josiah 株と Pinneo 株、Mobala virus、Mopeia virus、LCMV の培養上清から抽出した RNA を用いて RT-PCR を行った。これらは、GHSAG Labonet での VHF-workshop においてカナダ National Microbiology Laboratory の BSL4 施設で調整されたものである。

C. 結果

1. Consensus-PCR 法の LCMV 株間での比較 : LCMV Armstrong 株、WE 株、M1 株感染細胞から抽出した RNA の cDNA を用いて Consensus-PCR 法を行った結果、Old arena L1, L2 および Old arena GPC のいずれの primer sets によっても、全ての LCMV 株の L 遺伝子、GPC 遺伝子特異的 PCR 産物がそれぞれ得られた。これまで、報告されている LCMV 特異的 RT-PCR 法に比べて、これらの方法は遺伝的に他の LCMV と異なる M1 株に対しても有効であった。
2. Consensus-PCR 法の LCMV M1 株での検出感度の検討 : M1 の L 遺伝子および GPC 遺伝子の部分遺伝子をクローニングしたプラスミドを用いた検出感度の検討では、1 反応あたり L 遺伝子では 10 コピー (図 1)、GPC 遺伝子では 10^2 コピーまで検出できた。
3. Consensus-PCR 法の旧世界アレナウイルス間での比較 : ラッサウイルスでは、いずれの RT-PCR も検出感度は数 100

コピーであった。カナダの BSL4 施設で調整されたラッサウイルス遺伝子を検出した結果、L 遺伝子検出系は、Old arena L1 では約 1pfu、Old arena L2 では約 0.1pfu、Old arena GPC では約 8pfu のラッサウイルスを検出できた。次に、各種出血熱ウイルス等の検出を試みた結果、3 種の RT-PCR いずれもラッサウイルスの Josiah 株、Mobala ウイルス、Mopeia ウイルスは検出できたが、エボラウイルス、CCHF ウイルス、RVF ウイルスは検出できなく、旧世界アレナウイルスに特異的であった。しかし、ラッサウイルス Pinneo 株に関しては、アレナウイルス検出に最も高感度であった Old arena L2 は検出できなかった (表 1)。

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。しかし、日本の野生マウスが LCMV を保有していることが報告されていることから検査体制の整備は必須である。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、致死的な 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 に感染していたことが明らかになっている。しかし、近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、LCMV は動物由来感染症として注目されている。

一方、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。これまでに、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、また RDV 法の改良を行ってきた。しかし、これらの方法では特異的なプライマーを用いないことで広範囲な遺伝子検出が可能であるが、検出感度に限界があった。また、臨床検体等から直接遺伝子を検出できず、ウイルスが分離されていることが前提となる。

LCMV や LCMV を含む旧世界アレナウイルスを標的とする遺伝子検出法では、保存性の高い領域でのこれらウイルスに共通な degenerated primers による Consensus-RT-PCR 法が至適化できれば、より高感度に LCMV が検出できる。このような観点から、LCMV の代表株である Armstrong 株、WE 株、遺伝的に既知の LCMV と最も離れている M1 株を用いて検討した結果、最近開発された旧世界アレナウイルス検出用の degenerated primers やその改良型が、いずれの株に対しても非常に有用であった。特に、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標的とした primer set では、遺伝的に既知の LCMV と離れている M1 株も非常に高感度に検出でき、また、他の旧

世界アレナウイルスも広範囲に検出することができた。

E. 結論

代表的な LCMV 株のみならず、既知の LCMV と遺伝的に距離がある M1 株を含む LCMV のウイルス遺伝子を広範囲かつ高感度に検出できる Consensus-RT-PCR 法ができた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamao T, Eshita Y, Kihara Y, Satho T, Kuroda M, Sekizuka T, Nishimura M, Sakai K, Watanabe S, Akashi H, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Miyata T, Sakata A, Hosokawa M, Nakashima M, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Nakauchi M, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. : Novel virus discovery in field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). Arch Virol., 154(1):153-8, 2008.
2. Ure AE, Ghiringhelli PD, Possee RD, Morikawa S, Romanowski V. : Argentine hemorrhagic fever diagnostic test based on recombinant Junin virus N protein. J Med Virol., 80(12):2127-33, 2008.
3. Sakai K, Ueno Y, Ueda S, Yada K, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Mutoh K, Yoshioka K, Nakamura M, Takehara K, Morikawa S, Mizutani T. : Novel reovirus isolation from an Ostrich (*Struthio camelus*) in Japan. Vet Microbiol., 134: 227-32 2009
4. Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K,

- Maejima M, Fukushi S, Morikawa S, Taguchi F. : Entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein. *J Virol.*, 82(23):11985-91, 2008.
5. Takimoto K, Taharaguchi M, Morikawa S, Ike F, Yamada YK. : Detection of the antibody to lymphocytic choriomeningitis virus in sera of laboratory rodents infected with viruses of laboratory and newly isolated strains by ELISA using purified recombinant nucleoprotein. *Exp Anim.* 57(4):357-65, 2008.
 6. Watanabe S, Mizutani T, Sakai K, Kato K, Tohya Y, Fukushi S, Saijo M, Yoshikawa Y, Kurane I, Morikawa S, Akashi H. : Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). *J Clin Virol.* 43(1):56-9, 2008.
 7. 北本憲利, 森川茂, 西條政幸, 加藤陽二, 田中智之 : 抗ワクシニアウイルス単クローン抗体のサル痘ウイルスに対する反応性とその有用性. *感染症学雑誌* 82(3):224-5, 2008.
 8. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. : Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol.* 172(6):1625-37, 2008.
 9. Ami Y, Nagata N, Shirato K, Watanabe R, Iwata N, Nakagaki K, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S, Taguchi F. : Co-infection of respiratory bacterium with severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Microbiol Immunol.* 52(2):118-27, 2008.
 10. Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Iizuka I, Sakai K, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. : Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains. *Jpn J Infect Dis.* 61(2):140-2, 2008.
 11. Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi N, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani T. : Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). *Emerg Infect Dis.* 14(2):347-9, 2008.
2. 学会発表
国内学会
1. 酒井宏治・水谷哲也・福士秀悦・西條政幸・緒方もも子・飯塚愛恵・遠藤大二・池郁生・倉根一郎・森川茂「リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) M1 株の遺伝子配列と分子系統学的解析」、第 145 回日本獣医学会学術集会、DP2-3、相模原、2008 年 3 月
 2. 渡辺俊平・水谷哲也・酒井宏治・福士秀悦・緒方もも子・遠矢幸伸・吉川泰弘・森川茂・倉根一郎・明石博臣「網羅的ウイルスゲノム検出法 (RDV 法) の改良」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、1D09、岡山、2008 年 10 月
 3. 西條政幸・網康至・須崎百合子・永田典代・長谷川秀樹・飯塚愛恵・塩田智之・緒方もも子・酒井宏治・中内美名・福士秀悦・水谷哲也・倉根一郎・森川茂「劇症型サル痘に関する解析: 症状, ウイルス学的検査所見, 病理」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、1P126、岡山、2008

年 10 月

10 月

4. 飯塚愛恵・西條政幸・網康至・須崎百合子・永田典代・長谷川秀樹・緒方もも子・酒井宏治・塩田智之・中内美名・福士秀悦・水谷哲也・倉根一郎・森川茂「Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法によるサル痘迅速診断」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、1P128、岡山、2008 年 10 月
5. 福士秀悦・中内美名・酒井宏治・西條政幸・水谷哲也・緒方もも子・倉根一郎・森川茂「リフトバレー熱ウイルスの NP に対する単クローン抗体の作製と抗原検出 ELISA 法への応用」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2P046、岡山、2008 年 10 月
6. 中内美名・福士秀悦・酒井宏治・水谷哲也・緒方もも子・倉根一郎・西條政幸・Victor Romanowski・森川茂「南米出血熱の実験室診断法の開発」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2P047、岡山、2008 年 10 月
7. 酒井宏治・網康至・水谷哲也・岩切章・山本正悟・平井明香・須崎百合子・滝本一広・田原口元子・飯塚愛恵・福士秀悦・西條政幸・永田典代・片山紀代・長谷川秀樹・山田靖子・倉根一郎・森川茂「急性呼吸器患者から分離された新型レオウイルスの性状解析及びマウスでの感染実験」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、3C18、岡山、2008 年 10 月
8. 水谷哲也・山尾卓也・江下優樹・片野晴隆・黒田誠・関塚剛史・渡辺俊平・明石博臣・竹原一明・木原悠希・佐藤朝光・西村美保・酒井宏治・福士秀悦・西條政幸・緒方もも子・中内美名・倉根一郎・森川茂「ウイルスの網羅的検出法 (RDV 法) と次世代シーケンサーによる新しいウイルスの発見」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、3WSF6、岡山、2008 年

図 1. M1 株の L-遺伝子の Old arena L1 による検出

L 遺伝子検出用プライマーセット

Forward primers

LV 3359A-plus

LV 3359D-plus

LV 3359G-plus

Reverse primers

LV 3754A-minus

LV 3754D-minus

AGAATTAGTGAAAGGGAGAGCAATTC

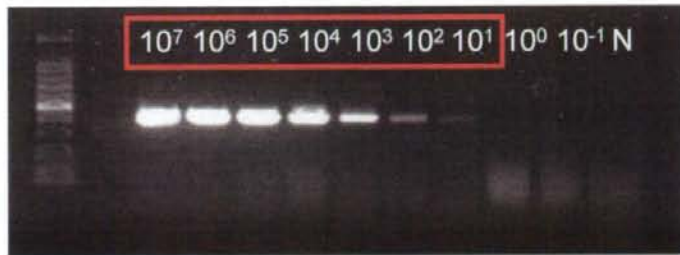
AGAATCAGTGAAAGGGAAAGCAATTC

AGAATTAGTGAAAGGGAGAGTAACTC

CACATCATTTGGTCCCCATTTACTATGATC

CACATCATTTGGTCCCCATTTACTGTGATC

(Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 101: 1253-64, 2007)



(copies/reaction)

表 1. 各種旧世界アレナウイルスの consensus RT-PCR による検出結果

sample	Old arena L1	Old arena L2	Old arena GPC
Lassa Josiah	+++	+++	+++
Lassa Pinneo	+	neg	+
Mobala	+++	+++	+
Mopeia	+++	+++	++
LCMV	++	+	+
RVFV CDC	neg	neg	neg
RVFV Kenya2007	neg	neg	neg
CCHF C68031	neg	neg	neg
CCHF 10200	neg	neg	neg
Ebola	neg	neg	neg
Vaccinia	neg	neg	neg
(-)	neg	neg	neg

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

5、翼手目の生理学的研究および感染症媒介動物としての評価

研究代表者 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 興一郎（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、コウモリリッサ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、マールブルグ病ウイルスなども分離されており、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、病原体と宿主の相互関係は不明のままであり、コウモリ媒介感染症の科学的なリスク評価は困難な状況である。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、免疫グロブリン FcRn、IFN- α 、 β などの解析及び IgG 抗原エピトープの翼手目における類似性、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。

今回新たに免疫関連因子として、T 細胞分化に関わる主要なサイトカイン群ならびに自然免疫において重要な因子である Toll-like receptors(TLR)について塩基配列の決定を行い、TLR に関しては臓器別の mRNA 発現を検索した。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。そこで環境汚染物質の蓄積が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、ウイルスの自然環境での生態学及び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。

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。また、病原体の自然宿主を含めた生態系を明

らかにしない限り、野生動物からヒトや家畜に由来する感染症の有効な防御法を確立することは困難である。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。本研究においては、フィリピンを拠点とする野生コウモリの疫学調査とともに、コウモリの基盤情報として、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ている。

B. 研究方法

1. 翼手目の Th1/Th2 関連サイトカインに関する研究

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、Th1/Th2 細胞バランスに関わるサイトカイン群 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, TNF- α) について蛋白コード領域の塩基配列を決定し、既に報告されている他動物種の相同遺伝子と相同性の比較を行い、コウモリ特有の機能があるか否かを検索した。

2. 翼手目の Toll-like receptor3, 7, 9 に関する研究

1 と同様デマレルーセットオオコウモリの脾臓由来 cDNA を用い、自然免疫に関与する Toll-like receptors (TLR) のうち、特にウイルスに関連する TLR について蛋白コ

ード領域の塩基配列を決定し、ドメイン構造が保存されているかを検討した。また、報告されている他動物種の相同遺伝子と相同性の比較を行った。さらに、半定量 RT-PCR により TLR3, 7, 9 の臓器ごとの発現を調べた。

3. 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。

3-1. 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)。

3-2. 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 のシークエンスを行い、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 酵素活性の誘導性を解析した。

C・D. 研究結果・考察

1. 翼手目の Th1/Th2 関連サイトカインに関する研究

本研究では Th1 サイトカインである IL-2, IL-12p40, TNF- α および Th2 サイトカインである IL-4, IL-6, IL-10 の塩基配列の決定を行った。(Fig. 1(A)) 既に報告のあるヒト、イヌ、ウシ、ウマの相同遺伝子と塩基配列の比較をおこなった。デマレルーセットオオコウモリの各種サイトカインは、イヌやウマと相同性が高く、ついでウシ、ヒトの順で相同性が高いことが明らかになった。これは、他の遺伝子における報告と一致していた。また、各サイトカインの機能に関わるシグナルペプチド部位、システイン残基、N 結合型糖鎖付加部位について調べたところ、シグナルペプチド部位およびシステイン残基は検索した動物すべてで保存されていたが、N 結合型糖鎖付加部位の配列については異なっていた。コウモリの糖鎖付加部位はウマやイヌのサイトカインと一致していたが、ヒトやマウスとは異なっていた(Fig. 1(B))。このことから、コウモリのサイトカインはウマやイヌのサイトカインと機能的に類似していることが示唆された。本研究により Th1/Th2 サイトカインの動態を調べることが可能になり、コウモリのウイルス感染時の病態解明につながることを期待される。

2. 翼手目の Toll-like receptor3, 7, 9 に関する研究

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機能がある(Fig. 2(A))。本研究ではコウモリ媒介感染症に多い RNA ウイルス感染を認識する TLR3, 7, 9 について塩基配列の決定を行った。デマレルーセットオオコウモリの TLR3, 7, 9 は、いずれも他の哺乳類の TLR3, 7, 9 と高い相同性を示し、中でもウマやイヌと相同性が高かった(Fig. 2(B))。この結果は、前述のサイトカインを含む他遺伝子の結果と一致していた。また、TLR に特徴的な微生物認識構造ドメインであるロイシンリッチリピート構造ならびに細胞内シグナル伝達に関わる TIR ドメインは、いずれもコウモリと他の哺乳類でよく保存されていた(Fig. 2(C))。このことから、コウモリの TLR は他の哺乳類と類似した機能を有していることが示唆された。また、TLR3, 7, 9 mRNA の各臓器における発現は、TLR3 が肝臓において高い発現、TLR7 は脾臓、小腸、肺で高い発現、TLR9 は脾臓で高い発現がみられた(Fig. 3(A)-(C))。TLR7, 9 の発現はヒトにおける報告と類似していた。一方、TLR3 はヒトの肝臓では発現が低いことが知られており、コウモリの発現パターンは特徴的であった。この結果から、コウモリは肝臓において特徴的な免疫機能を有している可能性が示唆された。肝臓において TLR の主要発現細胞である樹状突起細胞(DC)の状況を検索する必要がある。

3. コウモリ肝臓における薬物代謝酵素の活性

3-1. 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。

3-2. 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(A))。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知られており、環境汚染のバイオマーカーとして注目されている。β-naphthoflavone 投与によりエジプトルーセット CYP1A の活性およびタンパク質発現が誘導された (Fig. 5(B) (C))。このことから、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可能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

これまで同定した生体防御因子、薬物代謝因子の系統学的な解析により、コウモリは奇蹄目・食肉目と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塩基配列の決定及び臓器別発現ならびに機能解析が行われ、包

括的なコウモリの免疫機能解明にむけて、有用な基礎データが得られた。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、サイトカインの動態解析など、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、汚染物質暴露など環境要因が、免疫因子に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・上田直也・伊波興一郎・Joseph Masangkay・明石博臣・吉川泰弘・高崎智彦・倉根一郎
フィリピンのコウモリにおけるアルボウイルス暴露について

第 43 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、観音寺、2008 年 5 月

- 2) 上田直也・大松勉・渡辺俊平・伊波興一郎・由井志乃ぶ・鈴木聡・佐藤哲男・

濱崎裕子・石井寿幸・遠矢幸伸・久和茂・明石博臣・吉川泰弘

コウモリ CYP1A の特性

第 146 回日本獣医学会学術集会、宮崎、2008 年 9 月

2. 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 — 系統学的・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,

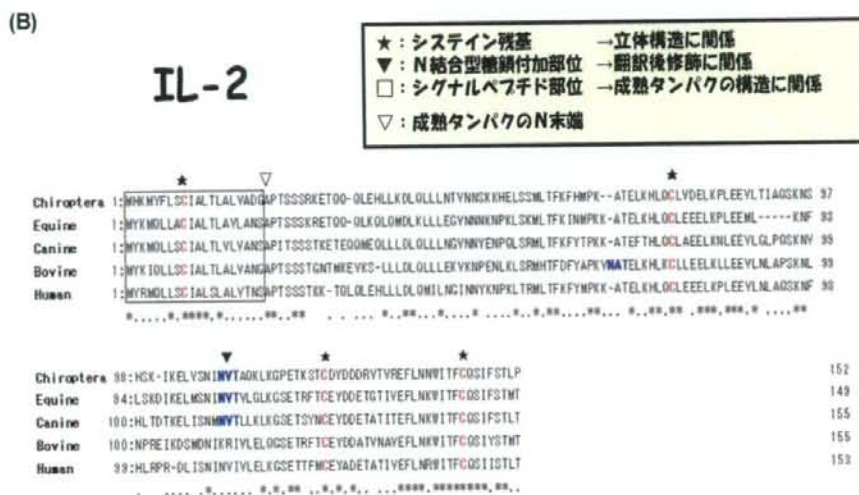
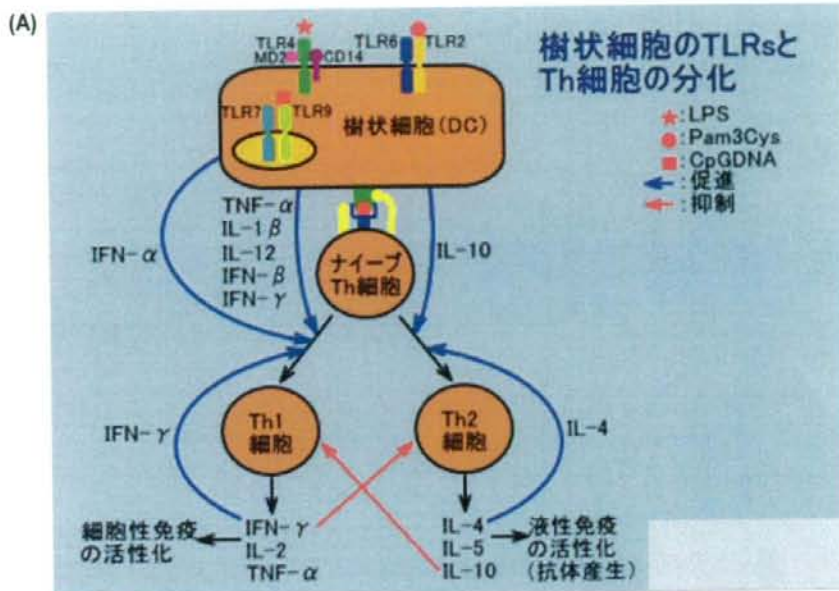
Yasuhiro Yoshikawa

Induction and Sequencing of Roussette Bat Interferon alpha and beta genes

Veterinary Immunology and Immunopathology 2008

Jul;124(1-2):169-76.

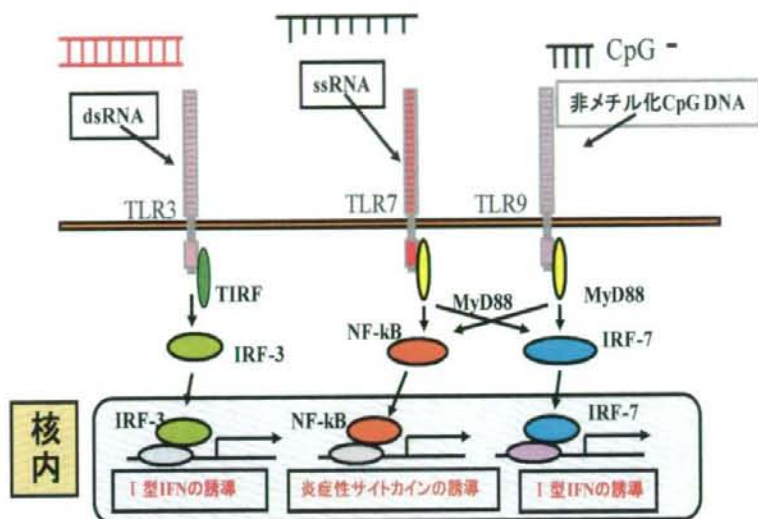
H. 知的財産権の出願・登録情報
なし



システイン残基、シグナルペプチドの位置はどの動物でも保存
 糖鎖付加部位はウマ、イヌでのみ保存

Fig.1 (A)T細胞の分化と各種サイトカインの関わり (B) IL-2アミノ酸配列

(A)



(B)

相同性の比較

TLR3			
	CDS lengths (bp)	Nucleotides (%)	Amino acids (%)
Chiroptera	2718	-	-
Equine	2715	89.7	88.5
Canine	2718	89.6	85.9
Bovine	2715	85.5	82.8
Human	2715	89.6	84

TLR7			
	CDS lengths (bp)	Nucleotides (%)	Amino acids (%)
Chiroptera	3150	-	-
Equine	3153	90.5	87.9
Canine	3153	88.2	86
Bovine	3177	88.7	87
Human	3150	88.2	85.7

TLR9			
	CDS lengths (bp)	Nucleotides (%)	Amino acids (%)
Chiroptera	3080	-	-
Equine	3086	82.3	77.2
Canine	3083	82.4	76.6
Bovine	3080	81.6	75.6
Human	3089	80.6	74.3

(C)

ドメイン構造の比較

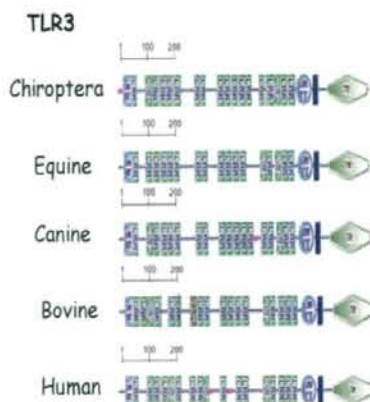


Fig.2 (A)TLR3,7,9のウイルス認識機構 (B) コウモリTLR3,7,9と他動物相同遺伝子の相同性 (C)哺乳類TLR3のドメイン構造の比較