

200829027A

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 20 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 21 (2009) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告	1
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	3
荻和宏明	
II. 分担者研究報告	13
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	27
丸山総一	
5. 病原性 <i>Yersinia</i> の迅速遺伝子診断法ならびに血清診断法の開発	30
林谷秀樹	
6. サル痘ウイルス感染症の皮膚病変と内臓病変	38
西條政幸	
7. フラビウイルス感染組織の免疫組織化学	47
長谷川秀樹	
8. ダニ媒介性脳炎ウイルスのマウスモデルでの病原性発現機序の解析とリアルタイムPCR法によるTBEVウイルス検出法の確立	52
早坂大輔	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	56
IV. 研究成果の刊行物・印刷	57

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

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 苺和宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 准教授

研究要旨

ハンタウイルス属に含まれるウイルスのうち、Thailand ウイルス(THAIV)のヒトおよびラット類の感染に対する簡易鑑別診断法を開発した。本法は THAIV の組換えヌクレオキャプシド(NP)抗原の N 末端を 50 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、それを抗原とする ELISA である。本 ELISA は THAIV 感染ヒトとラットの血清中の抗体を型特異的に検出することができた。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 TBEV 特異抗体を検出する ELISA を開発した。本法を日本各地の野鼠の血清を用いた疫学調査に実施したところ、新たに島根県で TBEV の抗体陽性例を確認した。TBEV の致死性に関わる病原性発現機序について、マウスモデルを用いた解析を行った。TBEV の大量接種(10^7 FFU/mouse)群では致死率は 90% であり、中枢神経全体へのウイルス感染が直接の死因になっていると考えられた。一方、少量接種(10^3 FFU/mouse)群では死亡開始時期が遅れるとともに、致死率は 40%にとどまった。本群における中枢神経へのウイルス感染の度合いは致死個体と回復個体で差は見られなかったが、致死個体では全身性のストレス応答と TNF α の発現が有意に上昇していた。日本脳炎、ウエストナイル熱・脳炎、およびダニ媒介性脳炎の病理組織学的診断に使用する抗体の検討を行い、抗 TBEV 抗体はパラフィン切片を用いた免疫組織化学染色に有用であることが判明した。神奈川県丹沢山系のニホンジカ 8 頭、および寄生マダニ 3 種 178 匹、ヒメシカシラミバエ 5 匹について *Bartonella* 属菌の分布状況を調査した。その結果、ニホンジカ血液の 25%(2/8)、寄生マダニの 42.7%(76/178)、およびヒメシカシラミバエの 80%(4/5)から *Bartonella* 属菌の DNA が検出された。検出された遺伝子はヒトに対して筋肉痛や関節痛などを引き起こす *B. melophagi* と近縁であることが明らかになった。Real-time PCR 法による *Yersinia pseudotuberculosis* の迅速な定量的検出法の開発を試みた。その結果、inv 遺伝子を標的遺伝子として *Y. pseudotuberculosis* の 21 血清群すべてが検出できる Real-time PCR 法の開発に成功した。さらに、菌体外膜蛋白質(YOP)と LPS を抗原とする ELISA の開発によって、病原性 *Yersinia* の菌種と血清型の鑑別が可能な血清診断法が開発された。サル痘ウイルス感染症の病態を明らかにするため、カンクイザルにおけるサル痘ウイルス感染症(いわゆるサル痘)の内臓病変について解析した。強毒型のコンゴ盆地型サル痘ウイルス株の感染個体では皮膚病変のほかにリンパ系組織、呼吸器、消化器、および泌尿生殖器等に肉眼病変とウイルス抗原が認められた。一方、弱毒型の西アフリカ株の感染個体では肺、皮膚およびリンパ系組織にのみ病変とウイルス抗原が認められた。

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
福土秀人・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、当徳各国を中心に年間 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、バルトネラ感染症、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かかわらず、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: ハンタウイルス属に含まれるウイルスのうち、Thailand ウイルス (THAIV) の組換えヌクレオキャプシド (NP) 抗原を作出し、さらにその N 末端を 50 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、それを抗原とする ELISA により、ウイルス型別用の血清診断法の確立を試みた。

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、この SPs を用いて野鼠における抗 TBEV 抗体検出用の ELISA の開発を行った。日本各地でのげっ歯類

から得られた野生げっ歯類の血清中の抗 TBEV 抗体の検索を本 ELISA によって実施した。TBEV の致死性に関わる病原性発現機序について、マウスモデルを用いた解析を行った。大腸菌で発現させた TBEV のエンベロープ蛋白質 Domain III に対する免疫家兎血清が免疫組織学的な染色に応用可能かどうかについて検討した。

Q 熱:

バルトネラ感染症: 神奈川県丹沢山系のニホンジカ 8 頭、および寄生マダニ 3 種 178 匹、ヒメシカシラミバエ 5 匹について *Bartonella* 属菌の分布状況を調査した。

エルシニア感染症: *Yersinia* 属菌の *inv* 遺伝子を標的遺伝子として Real-time PCR 法による迅速な定量的検出法の開発を試みた。病原性 *Yersinia* の菌種と血清型の鑑別が可能な血清診断法として菌体外膜蛋白質 (YOP) と LPS を抗原とする ELISA の開発を試みた。

サル痘: サル痘ウイルス感染症の病態を明らかにするため、カニクイザルにけるサル痘ウイルス感染症 (いわゆるサル痘) の内臓病変について解析した。サル痘ウイルス Zr-599/SC 株と Liberia 株を皮下接種と鼻腔内噴霧接種によりカニクイザルに接種し、3 週間の症状観察と病理検索を実施した。

(倫理面からの配慮について)

カニクイザルの感染実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

ハンタウイルス感染症

THAIV は抗原性が SEOV に近く、どちらもクマネズミからの検出が報告されている。そのため、この THAIV/SEOV 感染の簡易鑑別診断法をヒトおよびラット類で開発した。組換え NP 抗原の N 末端を 50 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。また、THAIV および 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。また野生 *B. indica* 血清も使用した。THAIV 感染ヒト血清は同一患者から一年間隔で二度の採血の二検体を抗 THAIV 血清として用いた。SEOV 感染は実験動物に関連した患者血清を用いた。THAIV 抗原のための鑑別診断抗原も既報の HTNV, SEOV,

DOBV 抗原と同様に型特異的反応を示し、今後の調査に有効であることが明らかとなった。

ダニ媒介性脳炎

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%とともに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。全国各地の野鼠血清の抗体調査では島根県の 58 検体のうち 2 検体が TBEV 特異抗体陽性となった。このことから北海道以外に TBEV の汚染地が存在することが示唆された。TBEV の致死性に関わる病原性発現機構について、マウスモデルを用いた解析を行った。TBEV の大量接種(10^7 FFU/mouse)群では致死率は 90% であり、中枢神経全体へのウイルス感染が直接の死因になっていると考えられた。一方、少量接種(10^3 FFU/mouse)群では死亡開始時期が遅れるとともに、致死率は 40%にとどまった。本群における中枢神経へのウイルス感染の度合いは致死個体と回復個体では見られなかったが、致死個体では全身性のストレス応答と TNF α の発現が有意に上昇していた。日本脳炎、ウエストナイル熱・脳炎、およびダニ媒介性脳炎の病理組織学的診断に使用する抗体の検討を行い、抗 TBEV 抗体はパラフィン切片を用いた免疫組織化学染色に有用であることが判明した。

Q 熱

Coxiella burnetii 感染症(Q 熱)の血清診断法の開発を目的として、組み換え蛋白質を抗原とした酵素抗体法(ELISA)を開発した。

バルトネラ感染症

今回検討したニホンジカ血液の 25.0% (2/8)、オオトゲチマダニの 42.3% (69/163)、ヒゲナガ

チマダニの 50.0% (3/6)、フタトゲチマダニの 66.7% (2/3)、チマダニ属の 33.3% (2/6)、およびヒメシカシラミバエの 80.0% (4/5)から、わが国で初めて *Bartonella* 属菌の DNA が検出された。また、マダニの発育ステージ別にみた *Bartonella* 属菌 DNA 陽性率は、雄成ダニの 51.9% (40/77)、雌成ダニの 32.1% (17/53)、若ダニの 37.2% (16/43)、幼ダニの 33.3% (1/3)であった。さらに、飽血マダニの 44.2% (23/52)、および非飽血マダニの 42.1% (53/126)がそれぞれ *Bartonella* 属菌 DNA 陽性であった。

さらに、シカ血液、オオトゲチマダニマダニ 2 匹およびヒメシカシラミバエ 2 匹から得られた *Bartonella* 属菌の塩基配列は、分子系統解析により、既存の *Bartonella* 属菌とは異なるクレードを形成し、*B. melophagi* と高い相同性(94.9-95.6%)を示した。

エルシニア感染症

Real-time PCR 法による *Yersinia pseudotuberculosis* の迅速な定量的検出法の開発を試みた。その結果、inv 遺伝子を標的遺伝子として *Y. pseudotuberculosis* の 21 血清群すべてが検出できる Real-time PCR 法の開発に成功した。さらに、菌体外膜蛋白質(YOP)と LPS を抗原とする ELISA の開発によって、病原性 *Yersinia* の菌種と血清型の鑑別が可能な血清診断法が開発された。

サル痘

サル痘ウイルス実験感染カニクイザルにおいて、感染経過、致死率、および内臓病変について解析した。強毒型のコンゴ盆地型サル痘ウイルス株の感染個体では皮膚病片のほかにリンパ系組織、呼吸器、消化器、および泌尿生殖器等に肉眼病変とウイルス抗原が認められた。一方、弱毒型の西アフリカ株の感染個体では肺、皮膚およびリンパ系組織にのみ病変とウイルス抗原が認められた。

D. 考察

ハンタウイルス感染症

THAIV 鑑別診断抗原の開発: THAIV 実験感染ラット血清、THAIV 自然感染 *B. indica* 血清は明らかに他のハンタウイルス感染と鑑別することが可能であったことから、今後も野生げっ歯類の血清疫学に有用なツールとなると考えられる。また、SEOV 感染と考えられたヒトの中に THAIV 感染を効率よく検出できることから、今後東南アジア等においてより正確な疫学的情報を得ることができるようになると考えられる。

ダニ媒介性脳炎

今回開発した TBEV の SPs を用いた ELISA 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 TBEV 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。この ELISA と中和試験による野鼠の抗体調査で島根県に新たな TBEV の汚染地を発見した。TBEV の少量接種マウス群では中枢神経組織でのウイルス感染および炎症反応に加えて、全身性のストレス反応および TNF α の上昇が関与した反応が要因となって死亡時期が遅れるものと考えられた。

Q 熱

Coxiella burnetii 感染症 (Q 熱) の血清診断法の開発を目的として、組み換え蛋白質を抗原とした酵素抗体法 (ELISA) を開発した。

バルトネラ感染症

神奈川県丹沢山系に生息するニホンジカには、人に対し病原性を有する *B. melophagi* が分布していることが明らかとなった。さらに、マダニとシラミバエがわが国において、本菌の主要なベクターとなっている可能性が示唆された。

エルシニア感染症

今回開発した TaqMan Real-Time PCR 法は、*Y. pseudotuberculosis* のすべての血清型を増幅できる特異性の高いものであった。また、本法は病原性 *Yersinia* に自然感染した動物からの本菌の検出に有用であることが判明した。

サル痘

コンゴ盆地型サル痘ウイルスの病原性は、西アフリカ型サル痘ウイルスのそれよりも高いと考えられ、その差は臓器指向性の違いによるものと推測された。

E. 結論

ハンタウイルス感染症、ダニ媒介性脳炎、バルトネラ感染症、エルシニア感染症、サル痘について簡便な診断法が開発され、疫学調査や病原性解析への応用が可能となった。

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, Mai le 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.
- 8) Takashima, I, Kariwa, H, Shirato, K.: Epidemiology and diagnosis of West Nile virus infection. *Glo. Env. Res.* 12: 21-25, 2008.
- 9) 有川二郎:「ハンタウイルス肺症候群」新臨床内科学 (第9版) 2008.
- 10) 有川二郎:「ハンタウイルス」 ■ウイルスハンドブック No. 10 2.呼吸器系ウイルス P25-27, 2008.
- 11) Chandy S, Yoshimatsu K, Ulrich R.G, Mertes M, Okumura M, John T, Balraj V, Muliyl J, Mammen J, Abraham P, Arikawa J, Sridharan G.: Seropidemiological study on hantavirus infections in India. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 102: 70-74, 2008.
- 12) 有川二郎:「ハンタウイルス肺症候群 (HP S)」特集 輸入感染の可能性のある希少感染症. 化学療法の領域. 24: 2008.
- 13) 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 press.
- 14) Yamamoto H, Li Tian-Cheng, Koshimoto C, Ito K., Kita M, Miyashita N, Arikawa J, Yagami K., Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa T, Shibahara T, Furuya M, Mohri S, Sato H, Ohsawa K, Ibuki K, Takeda N.: Serological Evidence for Hepatitis E Virus infection in Laboratory Monkeys and Pigs in Animal Facilities in Japan. *Exp Anim.* 57: 367-376, 2008.
- 15) Arai S, Ohdachi DS, Asakawa M, Kang HJ, Mocz G, Arikawa J, Okabe N, Yanagihara R.: Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpodeis*). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 16296-16301, 2008.
- 16) 有川二郎:「10ハンタウイルス」バイオセーフティの事典 病原微生物とハザード対策の実際. P285-287, 2008.
- 17) 有川二郎:「腎症候性出血熱」小児疾患診療のための病理生理 小児内科 40 増刊号 第4版. P1222-1225, 2008.
- 18) Inoue K., Maruyama S, Kabeya H, Yamada N, Ohashi N, Sato Y, Yukawa M, Masuzawa T, Kawamori F, Kadosaka T, Takada N, Fujita H, Kawabata H.: Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* species isolated from wild rodents in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 74: 5086-5092, 2008.
- 19) Jittapalapong S, Sangwaranond A, Inpukaew T, Phasuk C, Pinyopanuwat N, Chimnoi W, Kengradomkij C, Arunwipat P, Maruyama S: Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dairy cows in northeastern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 39: 1-5, 2008.
- 20) Inoue K, Kabeya H, Kosoy M, Bai Y, Smirnov G, McColl D, Artsob H, Maruyama, S: Evolutional and geographical relationships of *Bartonella grahamii* isolates from wild rodents by multi-locus sequencing analysis. *Microb Ecol.* in press, 2009.
- 21) Inoue K, Maruyama S, Kabeya H, Kawanami

- K, Yanai K, Jitchum S, Jittapapong S.: Prevalence of *Bartonella* infection in cats and dogs in the Bangkok metropolitan areas, Thailand. *Epidemiol Infect.* *in press*, 2009.
- 22) Lee K, Iwata T, Shimizu M, Taniguchi T, Nakadai A, Hirota Y, Hayashidani H.: A novel multiplex PCR assay for *Salmonella* subspecies identification. *J Appl Microbiol.* *in press*, 2009.
- 23) Ogasawara N, Tran TP, Ly TLK., Nguyen TT, Iwata T, Watanabe M, Taniguchi T, Hirota Y, Hayashidani H.: Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* from domestic animals, food and human in the Mekong Delta, Vietnam. *J Vet Med Sci.* 70: 1159-1164, 2008.
- 24) 林谷秀樹、岩田剛敏、中臺文: 爬虫類とサルモネラ. 54: 165-170, 2008.
- 25) Saijo M., Suzutani ., Mizuta K., Kurane I, Morikawa S.: Characterization and susceptibility to antiviral agents of herpes simplex virus type 1 that codes a unique thymidine kinase gene with an amber codon between the first and the second initiation codons. *Arch Virol.* 153: 303-314, 2008.
- 26) 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: 140-142, 2008.
- 27) 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 coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Am J Pathol.* 172: 1625-1637, 2008.
- 28) 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 SARS coronavirus includes an exacerbated pneumonia in mice. *Infect Microbiol.* 52: 118-127, 2008.
- 29) 福士秀悦、平井明香、新倉綾、山田靖子、前田健、吉川泰弘、横山勝、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 発現細胞を用いた SARS コロナウイルスの感染性の解析. 獣医畜産新報. 61:199-201, 2008.
- 30) 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: 224-225, 2008.
- 31) 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: 56-59, 2008.
- 32) Saijo M., Morikawa S, Kurane I.: Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics. *Exp Opin Med Diagnost.* 2: 1155-1171, 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、苺和宏明、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 CS, 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、苺和宏明、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、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 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 回日本ウイルス学界学術集会、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 回日本ウイルス学界学術集会、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 回日本ウイルス学界学術集会、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回日本ウイルス学界学術集会、岡山 (2008, 10)
- 14) 苅和宏明、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)
- 15) Yoshimatsu K, Taruishi M, Arikawa J.: Analysis of the hantavirus-specific CD8+ T cell response in mice.: The 7th Japan-China International Conference of Virology University of Tokyo School of Medicine.
- 16) 土佐紀子、吉松組子、有川二郎: マウスの異常行動における環境エンリッチメントの効果: 第55回日本実験動物学会総会 (2008.5)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) Endo R, Ishiguro N, Shirkoohi R, Teramoto S, Ariga T, Yoshimatsu K, Arikawa J.: Seroepidemiology of human bocavirus infection in Japan: XII International Congress of Virology. Istanbul, Turkey (2008.8)
- 20) 新井智、大館智志、浅川満彦、有川二郎、Mocz Gabor、岡部信彦、Yanagihara R.: 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、岡山 (2008.10)
- 21) 駒貴明、吉松組子、垂石みどり、遠藤理香、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、岡山 (2008.10)
- 22) 井上 快、壁谷英則、篠原ひとみ、小林俊元、高野愛、山内健生、丸山総一: 丹沢の鹿および寄生節足動物における *Bartonella* 属菌 DNA の検出状況: 第16回 ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー熊野古道大会、和歌山 (2008.5)
- 23) 井上 快、大島夕佳、壁谷英則、野上貞雄、坂田義美、丸山総一: 関東の猫におけるトキソプラズマバルトネラ FIVFeLV およびフィリアの感染状況の年次推移: 日本獣医師会学会平成20年度地区学会、茨城 (2008.9)
- 24) 井上 快、壁谷英則、篠原ひとみ、小林俊元、高野愛、山内健生、丸山総一: 神奈川県丹沢山系のニホンジカとその寄生節足動物における *Bartonella* DNA の検出状況: 第146回日本獣医学会学術集会、宮崎 (2008.9)
- 25) 吉川聡一、井上快、小磯祐介、壁谷英則、丸山総一: 分子生物学的手法を用いた *Bartonella* の菌種同定法の確立: 第146回日本獣医学会学術集会、宮崎 (2008.9)
- 26) 下長根藍、井上快、壁谷英則、川端寛樹、高田伸弘、林谷秀樹、丸山総一: わが国の野鼠における *Yersinia enterocolitica* の保有

- 状況と分離株の *gylB* 遺伝子系統解析: 第 146 回日本獣医学会学術集会、宮崎(2008.9)
- 27) 林谷秀樹、中臺文、岩田剛敏、黒木俊郎、佐伯和美、馬場浩、吉田信一郎、加藤行男、廣田好和: ヘビ類における *Salmonella* 属菌保有のメカニズムに関する研究: 第 146 回日本獣医学学会、宮崎(2008.9)
- 28) 藤原あずさ、馬場智成、林谷秀樹、宇根有美: リスザル (*saimiri sciureus*) の *Yersinia enterocolitica* O3 感染症の 1 例とリスザル由来 *Y. enterocolitica* O3 の病原性の検討: 第 145 回日本獣医学学会、相模原(2008.3)
- 29) 林谷秀樹、久野格、岩田剛敏、李謙一、廣田好和: グレープフルーツ種子抽出物の抗菌活性とその応用: 145 回日本獣医学学会、相模原(2008.3)
- 30) 西條政幸、塩田智之、錫谷達夫、倉根一郎、森川茂: 293T 細胞における HSV-1 組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用: 第 18 回抗ウイルス療法研究会、鹿児島(2008. 5)
- 31) Saijo M.: Virological insight into Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak in Xinjiang China: Third AREVA-Pasteur Forum, Shanghai, China (2008. 6)
- 32) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Iwata N, Ogata M, Fukushi S., Mizutani T, Kurane I, Kurata T, Morikawa S.: Post-exposure vaccination with a highly attenuated vaccinia vaccine LC16m8 for protection of nonhuman primates from monkeypox: 13th International Conference on Infectious Diseases. KL, Malaysia (2008. 6)
- 33) Izuka I, Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Ogata M, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Kurane I, Morikawa S.: The loop-mediated isothermal amplification-based diagnostics for monkeypox virus infection: 13th International Conference on Infectious Diseases. KL, Malaysia (2008. 6)
- 34) 西條政幸: 1 類感染症: 第 3 回輸入感染症講習会、逗子市(2008. 9)
- 35) 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、岡山市 (2008. 10)
- 36) 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、滝本一弘、田原口元子、飯塚愛恵、福士秀悦、西條政幸、永田典代、長谷川秀樹、山田靖子、倉根一郎、森川茂: 急性呼吸器疾患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、岡山市 (2008. 10)
- 37) 永田典代、岩田奈織子、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 感染動物モデルを用いた SARS 発症機序の解明と治療法の検討: 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山市 (2008. 10)
- 38) 石岡賢、佐藤友香、金子久俊、西條政幸、錫谷達夫: HSV-1 に対するアシクロビルとインターフェロンが相乗効果を示す機構について: 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山市 (2008. 10)
- 39) 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：性状ウイルス学的所見病理：第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山市（2008.10）
- 40) 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、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：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 岡山市（2008.10）
- 41) 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、岡山市（2008.10）
- 42) 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、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、岡山市（2008.10）
- 43) 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、塩田智之、佐多徹太郎、倉田毅、倉根一郎、森川茂：高度弱毒痘そうワクチン LC16m8 の霊長類におけるサル痘発症予防：長期予防効果に関する検討：第12回日本ワクチン学会学術集会、熊本市（2008.11）
- 44) 早坂大輔、永田典代、藤井克樹、長谷川秀樹、佐多徹太郎、鈴木隆二、小池智：ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)の皮下接種マウスモデルにみられる早い時期と遅い時期の致死性：第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山(2008.10)
- 45) 飛梅実、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、徹太郎：狂犬病ウイルス抗原の細胞内局在に関する解析：第97回日本病理学会総会、金沢（2008.5）

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. 研究分担者報告

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

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、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。ここで開発した ELISA をスクリーニングに用い、中和試験で確認する方法で日本の各地の野鼠の血清を用いた血清疫学調査を実施したところ、島根県で TBEV の抗体陽性例を確認した。

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

ュペーター内で一晚培養し、細胞をフラスコ底面に吸着させた。TransIT-LT1 transfection reagent (Mirus) 120 μ l と Opti-MEM™ (GIBCO BRL) 2000 μ l を穏やかに混和し、室温で15分間静置した後、pCAGprME を40 μ g 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 インキュペーター内で36時間培養し、TBE ウイルスの SPs を発現させた。

トランスフクション後、36時間培養した293T細胞培養上清を回収し、12000 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)8000、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、16000 \times g、4°Cで20分間遠心して上清を除き、沈澱を160 μ l 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 μ g/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 μ l ずつ分注したものを、4°C にて一晚静置した。これを各ウェル 200 μ l 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 μ l 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、それぞれ ELISA buffer (0.5% BSA

加 PBST) で150倍に希釈したものを50 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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(SP_s)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)と敏感度(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。

さらに青森、島根、富山、愛知、岐阜で捕獲した野鼠の血清692検体について ELISA でのスクリーニングと中和試験での確定による抗体調査を実施した。

(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%とともに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。

全国各地の野鼠血清の抗体調査では島根県の 58 検体のうち 2 検体が TBEV 特異抗体陽性となった。このことから北海道以外に TBEV の汚染地が存在することが示唆された。

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。この ELISA と中和試験による野鼠の抗体調査で島根県に新たな TBEV の汚染地を発見した。

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) Takashima I, Kariwa H, Shirato K. : Epidemiology and diagnosis of West Nile virus infection. *Glo. Env. Res.* 12: 21-25 2008.

2. 学会発表

- 1) 大森優紀、伊川綾恵、川上和江、好井健太郎、荻和宏明、高島郁夫: ダニ媒介性脳炎ウイルスの中空ウイルス用粒子のワクチンへの応用: 第56回日本ウイルス学会、岡山(2008 10)
- 2) 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、荻和宏明、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回日本ウイルス学会、岡山(2008 10) | なし |
| H. 知的財産権の出願・登録状況 | 2. 実用新案特許 |
| なし | なし |
| 1. 特許取得 | 3. その他 |
| | なし |

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

「抗原」:ハンタウイルスを Vero E6 細胞に感染させ、ガラスプレート上に固着後アセトン固定し、間接蛍光抗体法(IFA)抗原とした。また、感染細胞

は SDS で処理し、Western blotting 抗原とした。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)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 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、Western blotting 中和試験」: Western blotting と中和試験は既報の方法に従った(Araki et al. J. Clin. Microbiol. 2001)。

「患者血清および野生動物血清」: Hantaan virus (HTNV)/ Seoul virus (SEOV)/Puumala virus (PUUV)に感染した HFRS 患者血清および、ベトナム、タイの不明熱患者血清・インドネシアおよびベトナムで捕獲されたげっ歯類血清およびスンス血清を用いた。陽性コントロールとして、HTNV SEOV および Thailand virus (THAIV)を接種したラットおよびマウス血清、TPMV を接種したマウス血清・スンス血清を用いた。

(倫理面からの配慮について)

用いた感染血清(患者血清)は何れも、韓国、中国、タイ、インド、フィンランド、スウェーデン、ドイツの研究所から分与されたものである。当該研究所で既に研究目的で使用が認められているものであり、さらに無記名で分与されたものであることから、倫理面からの問題は無い。各種免疫血清の採血は、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものであり、動物福祉の観点からも問題は無いと判断された。

(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. THAIV 感染鑑別診断法の開発

THAIV は抗原性が SEOV に近く、どちらもクマネズミからの検出が報告されている。そのため、この THAIV/SEOV 感染の簡易鑑別診断法をヒトおよびラット類で開発した。組換え NP 抗原の N 末端を 50 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。また、THAIV および 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。また野生 *B. indica* 血清も使用した。THAIV 感染ヒト血清は同一患者から一年間隔で二度の採血の二検体を抗 THAIV 血清として用いた。SEOV 感染は実験動物に関連した患者血清を用いた。THAIV 抗原のための鑑別診断抗原も既報の HTNV SEOV DOBV 抗原と同様に型特異的の反応を示し、今後の調査に有効であることが明らかとなった。

2. ベトナム齧歯類・スunks およびヒトの調査

ベトナム南部のホーチミン市周辺およびサイゴン港湾地区のおよそ 100 頭の小型小動物の血清疫学調査を行った。その結果サイゴン湾地区のドブネズミから陽性が検出された。また、同時に検出された *R. exulance* から抗体陽性例が見つかった。これらはソウルウイルスに関連したハンタウイルスの感染であると考えられた。また、ゴム農園において9頭のスunks が捕獲され、そのうち二頭が抗 TPMV 抗体陽性であった。この血清は IFA や WB のみではなく TPMV に対して強い中和を示した。さらにベトナム山岳部・ハイランド地域のスunks およびヒトからも TPMV 抗体陽性例が検出された。これらの抗体は量も限られているため、追加解析が困難であり、さらなる調査が必要である。またホーチミン市の第12地区からハンタウイルス感染症と考えられる患者が見いだされ (IgM 陽性) 患者住居周辺のげっ歯類を捕獲したところ、ソウルウイルスを保有していることが明らかとなった。

3. インドネシアげっ歯類の調査

インドネシアはげっ歯類の種数の多い地域であり、その分類も未確定で困難な場合が多い。Thousand island 諸島で捕獲されたラット類の陽性例についてその罹患ウイルスの鑑別を試みた。*R. norvegicus* の多くが SEOV 感染を示唆する結果を示したが、Black rat complex を形成するラットの一部 (*R. r. tanezumi* *R. r. diardi* など) では HTNV SEOV THAIV 感染のはっきりしたパターンを示さない例が見られ、異なるウイルスが存在する可能性が示された。種の特定およびハンタウイルス遺伝子検索の必要性が示された。