

2009310/2A

厚生労働科学研究費

新型インフルエンザ等新興・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 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 荻和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費

新型インフルエンザ等新興・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 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 荻和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

平成 22 (2010) 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 苅和宏明	3
II. 分担者研究報告	13
1. ダニ媒介性脳炎ウイルスの疫学 高島郁夫	15
2. ハンタウイルス感染症に関する研究 有川二郎	20
3. Q熱の診断と疫学 福士秀人	25
4. バルトネラ感染症の疫学 丸山総一	28
5. YOP と LPS を抗原にした ELISA 法によるヒトエルシニア症の血清学的診断と 沖縄本島やんばる地域に生息するノネズミからの <i>Salmonella</i> と病原性 <i>Yersinia</i> の分離 林谷秀樹	34
6. サル痘ウイルス感染症におけるサル痘ウイルスの各種蛋白に 対する抗体応答 西條政幸	42
7. Puumala 型ハンタウイルスの実験的感染ハムスターを用いた病理学的検討 永田典代	49
8. フラビウイルス脳炎の重症化に関わる病原性発現機序の解析 早坂大輔	53
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

研究代表者 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

ダニ媒介性脳炎(Tick-borne encephalitis; TBE)ウイルスの存続様式を調べるため、道南地域で得られた野鼠の臓器からのウイルス分離を試みた。北海道の北斗町上磯地区のアカネズミからダニ媒介性フラビウイルス抗原陽性を示す感染性ウイルスが分離された。分離されたウイルスは塩基配列の解析によりTBEウイルスと同定され、上磯分離株であるOshima株と非常に近縁である事が示された。ハンタウイルス肺症候群(HPS)は南北アメリカ大陸で流行しており、様々なハンタウイルスがHPSの原因ウイルスとなっている。シンノンブレウイルス(SNV)、アンデスウイルス(ANDV)、およびラグナネグラウイルス(LANV)感染患者の血清を入手し、バキュロウイルスベクターを用いて発現させたN末端欠損ヌクレオキャプシド(NP)と反応させたところ、これらの患者の感染ウイルス型を鑑別することが可能であった。Puumala型ハンタウイルスの病原性を明らかにするために、実験的に感染した4週齢と8週齢のSyrian hamsterの組織標本を用いて、病理学的検討を行った。皮下接種後のウイルス感染増殖の程度は感染時の週齢によって違いがみとめられることが病理組織学的に明らかとなった。すなわち、4週齢のシリアンハムスターでは肺の上皮細胞、腎尿細管上皮細胞、副腎実質細胞、小脳プルキンエ細胞において軽度の炎症性反応が観察された。一方、8週齢動物では明らかな組織学的変化は認められなかった。*Coxiella burnetii*感染症(Q熱)の感染状況を明らかにするために北海道の5牧場において飼育されているウシの血清431検体を、*C. burnetii*感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法(IFA)に供したところ、1牧場(109検体)において陽性率28.3%と非常に高値を示した(他牧場322検体では4.3%)。北米(カナダ、アメリカ)、アジア(日本、韓国、中国)、およびヨーロッパ(イギリス、スウェーデン、ロシア)の8カ国で分離された*Bartonella grahamii*について遺伝子系統解析を行ったところ、分離株は、日本、韓国、および中国分離株からなるAsia系統と、カナダ、アメリカ、ロシア、スウェーデン、およびイギリス分離株からなるAmerica/Europe系統に分類された。エルシニア症が疑われるヒト血清57検体をYOPとLPSを抗原にしたELISA法に供したところ、57検体中29検体(50.9%)がエルシニア症陽性と判定された。また、エルシニア症陽性患者はいずれも*Y. pseudotuberculosis*の感染によるもので、7血清型が同定された。輸入感染症対策として重要な感染症のひとつであるサル痘ウイルスに感染した場合の、サル痘ウイルスの各種蛋白に対する免疫応答を、カニクイザルのサル痘ウイルス感染モデルを用いてプロテオミク解析により明らかにした。その結果、サル痘ウイルス感染時には、全身感染に重要な働きを有するEEV関連抗体を含め、多くの蛋白に対する抗体が誘導されることが明らかにされた。フラビウイルス脳

炎の重症化に関わる病原性発現機序を調べるために、日本脳炎ウイルス(JEV) JaOArS982 株を感染させたマウスモデルを用いた解析を行った。その結果、JEV 感染における重症化の病態発現機序には神経組織へのウイルス感染に加え、全身性の免疫およびストレス応答のバランスが重要であることが示唆された。

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
永田典代・国立感染症研究所・室長
早坂大輔・長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究協力者

桑崎俊昭・小樽検疫所・所長
松本泰治・小樽検疫所・室長
小原真弓・富山県衛生研究所・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、東欧各国を中心に年間 8,000 名以上の患者が報告されている。その他にも、国内外においてサル痘、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

ダニ媒介性脳炎： 北海道の北桧山町、北斗町上磯地区にて2008年の10月に疫学調査を行い、捕獲された122匹の野鼠を麻醉下での心採

血により安楽殺して解剖し、脾臓、腎臓、肺を採取し、使用まで -80°C で保存した。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を実施した。ELISAで抗体陽性が疑われた野鼠の血清は、さらにBHK細胞と96ウェル平底マイクロプレートを用いた中和試験(50%フォーカス減少法)を実施した。中和抗体価が40倍以上となった血清を中和試験陽性とした。捕獲した野鼠の脾臓1~6匹分を1プールとして、合計16プールについて脾臓乳剤を調製し、これを1~2日齢のBALB/c哺乳マウスの脳内に25 μl 接種した。乳剤を接種したマウスは接種後14日目まで観察を行った。

ハンタウイルス感染症： アメリカ合衆国とアルゼンチンから、シンノンブレウイルス(SNV)、アンデスウイルス(ANDV)、およびラグナネグラウイルス(LANV)感染患者の血清を入手した。また、SNV、ANDV、および LANV 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。4週齢および8週齢のシリアンハムスターに Puumala 型ハンタウイルスの標準株である Sotkamo 株を 3,300ffu 皮下接種し、7, 14, あるいは 28 日目に臓器を採取した(一群 1 匹あるいは 2 匹)。対照群には細胞培養液(MEM)を皮下接種し材料を採取した。これら採取した組織材料は10%ホルマリン緩衝液に浸漬固定した。このホルマリン固定組織材料とウイルス特異的抗体を用いて病理学および免疫組織学的検索を行い、病理学的変化とウイルス抗原の検出を行った。なお、感染ハムスターの実験は北海道大学大学院獣医学研究科における動物実験指針に沿って行った。

Q 熱： 北海道の 5 牧場で飼育されるウシから採血を行い、血清 431 検体を得た。IFA の抗原として、*C. burnetii* 感染 BGM 細胞を用いた。

バルトネラ感染症： 日本(15 株)、韓国(2 株)、中国(4 株)、イギリス(1 株)、ロシア(2 株)、スウェーデン(5 株)、カナダ(6 株)、およびアメリカ(3

株)で分離された合計 38 株の *B. grahamii*について(表1), 本属菌のハウスキーピング遺伝子 6 領域(16S rRNA, *ftsZ*, *groEL*, *gltA*, *ribC*, および *rpoB*)を用いた Multi Locus Sequence Analysis (MLSA)を行った。

エルシニア感染症: 2005 年 2 月~2009 年 10 月の間に全国の病院から、エルシニア症の疑いがあり血清学的診断のために東京農工大学農学部獣医学科獣医衛生学研究室に送付された 57 名分の血清を供試検体とした。供試血清の年齢は 11 ヶ月~50 歳の間に分布しており、平均年齢は 9.92 歳であった。ELISA のための抗原として、病原性 *Yersinia* の産生する菌体外膜タンパク (YOP) ならびに LPS を用いた。

サル痘: 1. カニクイザル 3 頭のカニクイザルにサル痘ウイルス Zr-599 株または Liberia 株を、それぞれ 106 PFU の感染価で皮下接種した。感染前、感染後第 10 日(または 13 日目)、21 日目に末梢血液を採取した。血漿を分離し、熱非働化(56 度 30 分)処理した後、プロテオミックス解析に供した。

(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。

日本脳炎: 10^4 pfu の JaOArS982 株を B6 マウスに皮下接種後、13 日目に重症個体と軽症個体を体重変化率により区別し、各個体の中枢神経組織のウイルス量、大脳皮質および脾臓における遺伝子発現量を定量 RT-PCR により測定した。また、血清中のサイトカインを ELISA により測定した。JEV を用いた実験は BSL2 実験室で行い、動物実験は長崎大学における動物実験指針に沿って行った。

C. 研究結果

ダニ媒介性脳炎

1990年代に北海道南部(道南)で行われたげっ歯類の血清疫学調査により、道南にはTBEVの流行地域があることが判明している。そこで1990年代に陽性であった道南地域においてげっ歯類の抗体調査を行った。北海道では2001年、2008年を合わせて224検体が集められ、まずSP-ELISA法によりそれら全ての野鼠血清中の抗TBEウイルス抗体を検査した。その結果、SP-ELISAでは17検体が陽性と判定された。

これら血清について中和試験を行った結果、17検体全てで中和抗体価が40倍以上あり、抗体陽性と判定された。北檜山の2001年の検体では、アカネズミ21検体中5検体、エゾヤチネズミ15検

体中2検体が抗体陽性となった。同地域の2008年の検体では、エゾヤチネズミ68検体中1検体、ヒメネズミ6検体中2検体が抗体陽性となった。上ノ国の2001年の検体では、エゾヤチネズミ35検体中2検体が抗体陽性となった。上磯の2008年の検体ではアカネズミ19検体中2検体、エゾヤチネズミ9検体中2検体、ヒメネズミ20検体中1検体が抗体陽性となった。陽性検体の中和抗体価は全て80倍以上あり、640倍以上という高い抗体価を持つものも多く検出された。

以上により、道南地域では10年以上にわたって、抗TBEウイルス抗体を保有する野鼠が存在していることが示された。

北海道の野鼠検体から16プールの脾臓乳剤を作成し、それぞれ哺乳マウスに脳内接種を行った。そのうち、上磯で捕獲されたアカネズミ由来の脾臓乳剤を接種した群で、接種後7日目で1匹の衰弱個体が現れた。衰弱個体1匹分の脳乳剤を作成し、Kamiiso-2008-AS2w(以下AS2w)として以後の実験に使用した。脳乳剤AS2wを接種した細胞の培養上清を新たにBHK細胞に接種し、CPEの観察とIFAIによるウイルス抗原の検出を行った。その結果、AS2wの細胞培養上清をBHK細胞に接種したものでは、CPEは観察されなかったがIFAIにてウイルス蛋白が確認された。

脳乳剤を接種した細胞からRNAを抽出し、TBEウイルス特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。AS2wのレーンに陽性対照と同じ位置のバンドが確認され、TBEウイルスRNAが検出された。以上より、上磯のアカネズミから1株のTBEウイルスが分離された。AS2wの塩基配列のうち、E蛋白領域の1,488塩基配列が決定され、既知のウイルス株との系統樹を作成した。系統樹から、AS2wは極東亜型に分類され、中でもOshima株と同じ集団を形成し、ロシアで分離されたSofjin株やKH98株とは明らかに異なるクラスターに属することが示された。

ハンタウイルス感染症

様々なハンタウイルスが原因となって南北アメリカ大陸でHPSが発生している。シンンブレウイルス(SNV)、アンデスウイルス(ANDV)、およびラグナネグラウイルス(LANV)感染患者の血清を入手し、バキュロウイルスベクターを用いて発現させたN末端欠損ヌクレオキャプシド(NP)と反応させたところ、これらの患者の感染ウイルス型を鑑別することが可能であった。

Puumala型ハンタウイルスの病原性を明らかにするために、実験的に感染した4週齢と8週齢のSyrian hamsterの組織標本を用いて、病理学

的検討を行った。皮下接種後のウイルス感染増殖の程度は感染時の週齢によって違いが認められることが病理組織学的に明らかとなった。すなわち、4 週齢のシリアンハムスターでは肺の上皮細胞、腎尿細管上皮細胞、副腎実質細胞、小脳プルキンエ細胞において軽度の炎症性反応が観察された。一方、8 週齢動物では明らかな組織学的変化は認められなかった。

Q 熱

Coxiella burnetii 感染症 (Q 熱) の感染状況を明らかにするために北海道の 5 牧場において飼育されているウシの血清 431 検体を、*C. burnetii* 感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法 (IFA) に供したところ、1 牧場 (109 検体) において陽性率 28.3% と非常に高値を示した。一方、他の 4 牧場 322 検体では 4.3% と明らかに陽性率が低かった。

バルトネラ感染症

北米 (カナダ, アメリカ), アジア (日本, 韓国, 中国), およびヨーロッパ (イギリス, スウェーデン, ロシア) の 8 カ国で分離された *Bartonella grahamii* について遺伝子系統解析を行ったところ、分離株は、日本, 韓国, および中国分離株からなる Asia 系統と、カナダ, アメリカ, ロシア, スウェーデン, およびイギリス分離株からなる America/Europe 系統に分類された。Asia 系統に属する分離株に、極東ロシアのハバロフスク市で分離された 3 株の *B. grahamii* を加え、*gltA* 領域に基づく系統解析を行ったところ、わが国の分離株は、極東ロシア分離株と同一の遺伝子系統を形成するものと、韓国と中国分離株と同一の遺伝子系統を形成するものの 2 系統に分類された。

エルシニア感染症

エルシニア症が疑われるヒト血清 57 検体を YOP を抗原にした ELISA 法に供したところ、57 検体中 29 検体 (50.9%) がエルシニア症陽性と判定された。さらにこれらの 29 検体は、LPS に対する ELISA でも反応が認められ、血清型別が可能であった。エルシニア感染陽と判定された 29 検体のいずれも *Y. pseudotuberculosis* による感染で、血清型は 1b が 8 検体 (27.6%)、3 型が 6 検体 (20.7%)、6 型が 5 検体 (18.5%)、2a, 2b および 4b がそれぞれ 3 検体 (10.3%)、ならびに 2c が 1 検体 (3.5%) であった。

サル痘

輸入感染症対策として重要な感染症のひとつであるサル痘ウイルスに感染した場合の、サル痘ウイルスの各種蛋白に対する免疫応答を、カ

ニクイザルのサル痘ウイルス感染モデルを用いてプロテオミク解析により明らかにした。その結果、サル痘ウイルス感染時には、全身感染に重要な働きを有する EEV 関連抗体を含め、多くの蛋白に対する抗体が誘導されることが明らかにされた。

日本脳炎

フラビウイルス脳炎の重症化に関わる病原性発現機序を調べるために、日本脳炎ウイルス (JEV) JaOArS982 株を感染させたマウスモデルを用いた解析を行った。その結果、JEV 感染における重症化の病態発現機序には神経組織へのウイルス感染に加え、全身性の免疫およびストレス応答のバランスが重要であることが示唆された。

D. 考察

ダニ媒介性脳炎

今回、北海道の血清疫学調査と野鼠からのウイルス分離により、上磯では 10 年以上に渡って TBE ウイルスの流行巣が維持されていることを確認し、その他の道南地域でも依然として TBE ウイルスの流行巣が存在することが示唆された。今後も、抗体陽性検体が検出された地域を中心に、より詳細な疫学調査を行い、ウイルスを分離してその性状を解析すること、また、調査範囲を拡大し、新たに TBE ウイルスの流行巣が存在する地域を特定することで、TBE ウイルス流行地域住民への危険度を評価するとともに、TBE 患者発生の予防に役立てることが重要である。

ハンタウイルス感染症

ELISA により、日本での保有が難しく中和試験を行うことができない、HPS 関連ウイルスの鑑別診断が可能となった。また、Puumala 型ハンタウイルス感染のモデル動物としてシリアンハムスターが適していることが明らかになった。

バルトネラ感染症

わが国に分布する *B. grahamii* は極東ロシア型、および韓国・中国型の 2 つの遺伝子系統に分類されたことから、わが国の *B. grahamii* には、異なる地域から移入したと思われる 2 つの系統が存在することが明らかとなった。

エルシニア感染症

今回、供試した検体は臨床症状からエルシニア症が疑われながらも、糞便などから菌分離ができなかったため確定診断できなかった患者の血清であるが、本研究によりエルシニア症が疑われた検体のうち、約半数がエルシニア症であり、そのすべてが *Y. pseudotuberculosis* の感染であることがわか

った。本研究により、平成 20 年度に開発した YOP と LPS を抗原とした ELISA 法はエルシニア症の迅速な血清学的診断法として有用であると思われた。

サル痘

サル痘ウイルス感染霊長類におけるオルソポックスウイルスの発現する各種抗原に対する抗体応答が明らかにされた。これらの成績は、ヒトにおけるサル痘ウイルス感染症の診断や治療、病態解析に有用な知見を提供するものと考えられる。

日本脳炎

JEV JaOArS98 感染後の重症個体と軽症個体で中枢神経および全身性の免疫およびストレス応答に違いがみられたことから、重症化の病態発現機序にはウイルス感染、免疫およびストレス応答のバランスが重要であることが示唆された。

E. 結論

北海道において 10 年以上にわたりダニ媒介性脳炎ウイルスの流行巣が維持されていることが判明した。ハンタウイルス肺症候群の鑑別診断法が開発された。バルトネラの 1 種である *B. grahamii* の日本への侵入経路が 2 つ以上あることが判明した。エルシニア感染症の診断法として YOP と LPS を抗原とした ELISA が非常に有用であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

今回北海道渡島管内北斗町上磯地区でダニ媒介性脳炎ウイルスが分離されたことからウイルス汚染が 10 年以上にわたり持続しており、住民に対する感染予防のための対策が必要と思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshii, K., Ikawa, A., Chiba, Y., Omori, Y., Maeda, J., Murata, R., Kariwa, H., Takashima, I.: Establishment of a neutralization test involving reporter gene-expressing virus-like particles of tick-borne encephalitis virus. *J. Virol. Methods.* 161: 173-176, 2009.
- 2) Kariwa H, Tkachenko EA, Morozov VG, Seto T, Tanikawa Y, Kolominov SI, Belov SN, Nakamura I, Hashimoto N, Balakiev AE, Dzagurnova TK, Daud NH, Miyashita D, Medvedkina OA, Nakauchi M, Ishizuka M, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, and Takashima I.: Epidemiological study of hantavirus infection in the Samara Region of European Russia. *J Vet Med Sci* 2009. 71:1569-1578.
- 3) Truong T-T, Yoshimatsu K, Araki K, Lee B-H, Nakamura I, Endo R, Shimizu K, Yasuda PS, Koma T, Taruishi M, Okumura M, Truong U-N, and Arikawa J. Molecular epidemiological and serological studies of hantavirus infection in Northern Vietnam. *J Vet Med Sci* 2009. 71:1357-1363.
- 4) Chandy S, Yoshimatsu K, Boorugu HK, Chrispal A, Thomas K, Peedicyil A, Abraham P, Arikawa J, and Sridharan G. Acute febrile illness caused by hantavirus: serological and molecular evidence from India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009. 103:407-412.
- 5) Chandy S, Okumura M, Yoshimatsu K, Ulrich RG, John GT, Abraham P, Arikawa J, and Sridharan G. Hantavirus species in India: A retrospective study. *Indian J Med Res* 2009. 27:348-350.
- 6) Russell-Lodrigue, KE., Andoh, M., Poels, MW., Shive, HR., Weeks, BR., Zhang, GQ., Tersteeg, C., Masegi, T., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., McMurray, DN., Samuel, JE.: *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. *Infect. Immun.* 77 : 5640-5650, 2009
- 7) Fukushi, H., Inoue, K., Saito, L., Ohya, K., Sashihara, N., Yamaguchi, T., Hirai, K.: Survival rates of *Coxiella burnetii* in mayonnaise and constituents. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 62 : 481-484, 2009.
- 8) Inoue, K., Kabeya, H., Kosoy, M.Y., Bai, Y., Smirnov, G., McColl, D., Artsob, H., and Maruyama S.: Evolutional and geographical relationships of *Bartonella grahamii* isolates from wild rodents by multi-locus sequencing analysis. *Microb. Ecol.* 57: 534-541, 2009
- 9) Bouchouicha, R., Durand, B., Monteil, M., Chomel, B. B., Berrich, M., Arvand, M., Birtles, R., J., Breitschwerdt, E. B., Koehler, J. E., Maggi, R., Maruyama, S., Kasten, R., Petit, E., Boulouis, H-J., and Haddad, N. 2009. Molecular epidemiology of feline and human *Bartonella henselae* isolates. *Emer. Infect. Dis.* 15(5):813-816

- 10) Lee, K., Iwata, T., Shimizu, M., Taniguchi, T., Nakadai, A., Hirota, Y., and Hayashidani, H.: A novel multiplex PCR assay for *Salmonella* subspecies identification. *J. Appl. Microbiol.*, 107: 805–811, 2009.
- 11) Ly, T.L.K., Tran, T.P., Nguyen, T.T., Iwata, T., Kobayashi, H., Okatani, A.T., Taniguchi, T., Ha, T. T. and Hayashidani, H. Prevalence of *Escherichia coli* O157 from cattle and foods in the Mekong Delta, Vietnam. *J. Vet. Epidemiol.* 13: 107–113, 2009.
- 12) Nakamura, S., Hayashidani, H., Iwata, T., Takada, T., Une, Y.: Spontaneous yersiniosis due to *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 7 in a squirrel monkey. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 1657–1659, 2009.
- 13) Ly, T.L.K., Tran, T.T.D., Nguyen, V.H., Tran, T.P., Iwata, T., Taniguchi, T., Ha, T. T. and Hayashidani, H. Isolation of *Salmonella* from flies in the Mekong Delta, Vietnam. *J. Vet. Epidemiol.* (in press)
- 14) Nakamura, S., Hayashidani, H., Iwata, T., Namai, S. and Une, Y. Pathological findings of spontaneous yersiniosis due to *Yersinia enterocolitica* serovar O: 8 in captive monkeys. *J. Comp. Pathol.* (in press)
- 15) Iwata, T., Une, Y., Nakamura, S., Taniguchi, T., and Hayashidani, H. Seroepidemiological survey of pathogenic *Yersinia* in breeding squirrel monkeys in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* (in press)
- 16) Iwata, T. and Hayashidani, H.: Yersiniosis in Breeding Monkeys in Japan, *JARQ*, (in press)
- 17) Saijo, M., Ami, Y., Suzuki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Iizuka, I., Shiota, T., Sakai, K., Ogata, M., Fukushi, S., Mizitani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. *J. Gen. Virol.* 90:2266–2271, 2009
- 18) Nakauchi, M., Fukushi, S., Saijo, M., Mizutani, T., Ure, A.E., Romonowski, V., Kurane, I., Morikawa S.: Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. *Clin. Vaccine Immunol.* 16:1132–1138, 2009
- 19) Saijo, M.: Emerging and re-emerging infection threats to society. *J. Disaster Res.* 4:291–297, 2009
- 20) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I. : Diagnostic systems for viral hemorrhagic fevers and emerging viral infections prepared in the National Institute of Infectious Diseases. *J. Disaster Res.* 4:315–321, 2009
- 21) Morimoto, K., Saijo, M.: Imported rabies cases and preparedness for rabies in Japan. *Journal of Disaster Research* 4:346–357, 2009
- 22) Iizuka, I., Saijo, M., Shiota, T., Ami, Y., Suzuki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Ogata, M., Nakauchi, M., Kurane, I., Mizuguchi, M., and Morikawa, S.: Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *J. Med. Virol.* 81:1102–1108, 2009.
- 23) Hayasaka, D., Nagata, N., Fujii, Y., Hasegawa, H., Sata, T., Suzuki, R., Gould, E.A., Takashima, I., and Koike, S. Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses. *Virology* 390 : 139–150, 2009
- 24) Hayasaka, D., Nagata, N., Hasegawa, H., Sata, T., Takashima, I., and Koike, S. Early Mortality following Intracerebral Infection with the Oshima Strain of Tick-Borne Encephalitis Virus in a Mouse Model. *J. Vet. Med. Sci.* in press.

2. 学会発表

- 1) 村田亮、橋口和明、好井健太郎、野田寛、伊川綾恵、原田祐里、苅和宏明、高島郁夫：極東ロシアの野鳥におけるウエストナイル熱の血清疫学調査と中和試験の評価：第148回日本獣医学会学術集会、鳥取（2009，9）
- 2) 持館景太、好井健太郎、大森優紀、千葉裕美子、村田亮、真田崇弘、前田潤子、苅和宏明、高島郁夫：日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査：第148回日本獣医学会学術集会、鳥取（2009，9）
- 3) 高野絢子、大森優紀、好井健太郎、石塚万理子、村田亮、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスSofjin株のレプリコンの構

- 築:第148回日本獣医学会学術集会、鳥取(2009,9)
- 4) 好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫、Holbrook Micael:オムスク出血熱ウイルスの感染性cDNAの構築:第148回日本獣医学会学術集会、鳥取(2009,9)
 - 5) 高島郁夫:ダニ媒介性脳炎ウイルスの生態学:第57回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009,10)
 - 6) 好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫:オムスク出血熱ウイルスの感染性cDNAの構築:第57回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009,10)
 - 7) 高野絢子、大森優紀、好井健太郎、石塚万理子、村田亮、苺和宏明、高島郁夫:ダニ媒介性脳炎ウイルスSofjin株のレプリコンの構築:第57回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009,10)
 - 8) 持舘景太、好井健太郎、大森優紀、千葉裕美子、村田亮、真田崇弘、前田潤子、苺和宏明、高島郁夫:日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査:第57回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009,10)
 - 9) 村田亮、好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫:極東ロシアの野鳥におけるウエストナイル熱の血清疫学調査と中和試験の評価:第57回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009,10)
 - 10) Kariwa,H., Sanada,T., Seto,T.,Tanikawa,Y., Yoshii,K.,Yoshimatsu,K.,Arikawa,J.,and Takashima,I.: Development of diagnostic methods applicable to various serotypes of hanatavorus infections 43rd Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative medical Science Program, Philadelphia, Pennsylvania. USA (2009.7)
 - 11) 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:複数のハンタウイルス血清型に対応可能な診断法の開発. 第43回日本ウイルス学夏季シンポジウム、十勝温泉「かんぼの宿」(2009.7)
 - 12) 吉川佳佑、苺和宏明、瀬戸隆弘、真田崇弘、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫、極東ロシアの野鼠からのハンタウイルスの分離と人におけるウイルス感染状況の調査. 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)
 - 13) 吉田喜香、苺和宏明、Ramos Celso, Hernandez Cornelio S. Almaraz Maria L.R. 高野絢子、戸谷理詩、宮下大輔、Ngonda Saasa、瀬戸隆弘、真田崇弘、吉川佳佑、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が保有するハンタウイルスの遺伝子解析 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)
 - 14) Yasuda Shumpei P., Endo Rika, Shimizu Kenta, Koma Takaaki, Tegshduuren Erdenesaikhan, Luan Vu Dinh, Yoshimatsu Kumiko, Huong Vu Thi Que and Arikawa Jiro: Hantavirus genome quantification in experimentally infected laboratory rats and naturally infected wild rats (*Rattus norvegicus*) 10th International Mammalogical Congress, Mendoza, Argentina, August, 2009
 - 15) 駒貴明、吉松組子、垂石みどり、遠藤理香、清水健太、安田俊平、エルデネサイハンテグシドーレン、海老原秀喜、Cornelio S. Hernandez, Maria L. R. Almaraz, Celso Ramos, 宮下大輔、瀬戸隆弘、苺和宏明、高島郁夫、Delia Enria, 有川二郎: 新世界ハンタウイルス感染の血清型鑑別ELISA法の確立. 第43回日本ウイルス学夏季シンポジウム、十勝温泉「かんぼの宿」(2009.7)
 - 16) 新井 智、田原研司、Oh Hong-Shik、高田伸弘、Song Jin-Won,Kang hae Ji,N.Bennett Shannon,多屋馨子、有川二郎、岡部信彦、Yanagihara Richard: Genetically distinct hantavirus in the Asian lesser white-toothed shrew on Jeju island,Korea.第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)
 - 17) エルテネサイハンテグシドーレン、清水健太、吉松組子、遠藤理香、駒 貴明、安田俊平、有川二郎、石原智明:トガリネズミ目(旧食虫目)由来ハンタウイルスThottapalayamウイルス(TPMV) 核蛋白の単クローン抗体を用いた抗原領域の解析 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)
 - 18) 安田俊平、吉松組子、遠藤理香、清水健太、駒貴明、Erdenesaikhan Tegshduuren,垂石みどり、有川二郎:ハンタウイルス自然感染ラットと実験感染ラットにおける病態の比較 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)
 - 19) 駒 貴明、吉松組子、垂石みどり、遠藤理香、清水健太、安田俊平、エルテネサイハンテグシドーレン、海老原秀喜、Cornelio S.Hernandez, Maria L. R. Almaraz, Celso Ramos, 宮下大輔、瀬戸隆弘、苺和、宏明、高島夫,Delia Enria,有川二郎:新世界ハンタウイルス感染の血清型鑑別ELISA法の確立

- 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)
- 20) 遠藤理香、吉松組子、駒 貴明、清水健太、安田俊平、Erdenesaihan Tegshduuren、垂石みどり、海老原秀喜、宮下大輔、瀬戸隆弘、Cornelio S.Hernandez, Maria L.R.Almaz, Celso Ramos, 苅和宏明、高島郁夫、有川二郎: 汎用PCRプライマーを用いたハンタウイルス遺伝子検出スクリーニング法の確立 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)
- 21) 清水健太、イブラハムイマヌリサ、吉松組子、遠藤理香、安田俊平、駒 貴明、エルテネサイハンテグシドーレン、有川二郎: インドネシアのげっ歯類におけるハンタウイルス感染症の疫学 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)
- 22) 奥田秀子、大屋賢司、安藤匡子、小宮智義、野村彩朱、矢野竹男、平井克哉、福士秀人: *Coxiella burnetii* 外膜蛋白質 Com1 の診断用抗原としての有用性: 第147回日本獣医学会、宇都宮(2009.4)
- 23) 井上快、壁谷英則, Kosoy, M.Y., Bai, Y., 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、北海道(2007.9)
- 24) 井上快、壁谷英則, Kosoy, M.Y., Bai, Y., Smirnov, G., McColl, D., Artsob, H., 丸山総一: 野鼠由来 *Bartonella grahamii* の進化系統と地理的起源: 第40回日仏獣医学会、東京(2009.2)
- 25) 井上快、壁谷英則、川端寛樹、宇根有美、吉川泰弘、丸山総一: 小型哺乳類を自然宿主とする病原性 *Bartonella* 属菌の生態に関する研究: 第147回日本獣医学会プレナリーセッション、栃木(2009.4)
- 26) Inoue, K., Kabeya, H., Kosoy, M.Y., Bai, Y., Smirnov, G., McColl, D., Artsob, H., and Maruyama S.: Evolutional and geographical relationships of *Bartonella grahamii* isolates from wild rodents by multi-locus sequencing analysis: 6th International Conference on *Bartonella* as Medical and Veterinary Pathogens, Liverpool, UK (2009.6)
- 27) 吉村遥子、岩田剛敏、中村進一、林谷秀樹、宇根有美、マーラ (*Dolichotis patagonum*) の致死性 *Salmonella* Enteritidis 感染症の集団発生、第148回日本獣医学会学術集会(2009.9)
- 28) 中村進一、宇根有美、代田欣二、林谷秀樹、ラットにおける *Yersinia pseudotuberculosis* の感染防御抗原の検討、第148回日本獣医学会学術集会(2009.9)
- 29) 林谷秀樹、秋山豊延、岩田剛敏、中村進一、TaqMan Real-Time PCR法による *Yersinia pseudotuberculosis* の検出法の開発、第148回日本獣医学会学術集会(2009.9)
- 30) 塩田智之、森川茂、飯塚愛恵、倉根一郎、西條政幸: 293T細胞を用いた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19回日本抗ウイルス療法研究会、東京(2009.6)
- 31) Bukbuk, D.N., Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., George, A., Shuetsu, F., Mizutani, T., Kurata, T., Kurane, I., Morkawa, S.: Recombinant nucleocapsid protein-based diagnosis of and seroepidemiological study on Lassa fever. The 109th ASM General Meeting, Philadelphia, PA (2009.05)
- 32) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Iizuka, I., Shiota, T., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Pathology of monkeypox in nonhuman primates leading to the difference in virulence between Gongo Basin and West African strains. 43rd Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program and Special Minisymposium on enterovirus 71, Philadelphia, PA (2009.07)
- 33) 西條政幸、網至康、須崎百合子、永田典代、長谷川秀樹、新村靖彦、横手公幸、飯塚愛恵、塩田智之、佐多徹太郎、倉田毅、倉根一郎、森川茂。痘そうワクチンLC16m8およびLister株免疫時におけるIMVおよびEEV蛋白に対する抗体応答とサル痘予防効果。第13回日本ワクチン学会学術総会、札幌(2009.09)
- 34) 中道一生、伊藤陸代、奴久妻聡一、森本金次郎、倉根一郎、西條政幸。脳脊髄液中のJCポリオーマウイルスを検出するためのリアルタイムPCR検査系の確立と進行性多巣性白質脳症(PML)の診断支援。第57回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009.10)
- 35) 酒井宏治、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、松井珠乃、網康至、平井理香、須崎百合子、水谷哲也、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、藤本嗣人、山田靖子、岡部信彦、佐

- 多徹太郎, 倉根一郎, 森川茂. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 36) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. SARS-CoV感染動物における宿主Th1/Th2バランスと重症化の関連. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 37) 塩田智之, 飯塚愛恵, 森川茂, 倉根一郎, 水口雅, 西條政幸. 293T細胞を用いた単純ヘルペスウイルスならびに水痘帯状疱疹ウイルス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57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 38) 森川茂, 福士秀悦, 酒井宏治, 永田典代, 長谷川秀樹, 松井珠乃, 水谷哲也, 平井理香, 網康至, 緒方もも子, 西條政幸, 山田靖子, 岡部信彦, 佐多徹太郎, 倉根一郎. カニクイザルの致死性のイヌジステンパーウイルス感染事例の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 39) 飯塚愛恵, 塩田智之, 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 水口雅, 森川茂. 痘そうワクチンLC16m8株の温度感受性に関する解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 40) 水谷哲也, 前田健, 渡辺俊平, 久和茂, 吉川泰弘, 明石博臣, 中内美名, 酒井宏治, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. ウイルスの網羅的検出法(RDV法ver 3.1)を用いたコウモリ由来新規 β ヘルペスウイルスの同定第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 41) 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, Austin Ure, Victor Romanowski, 森川茂. 南米出血熱の実験室診断法の開発. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 42) 中道一生, 伊藤陸代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 定位微量投与系を用いたマウスポリオマウイルスの脳における持続感染様式の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 43) 岩田奈織子, 永田典代, 辻隆裕, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 横田恭子, 水谷哲也, 西條政幸, 森川茂, 佐多徹太郎. SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの免疫効果と副作用について. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 44) 佐山勇輔, 福士秀悦, 斎藤麻理子, 飯塚愛恵, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 鈴木陽, 神垣太郎, 玉記雷太, 倉根一郎, 押谷仁, 森川茂. フィリピンのレストランエボラウイルス感染症のウイルス遺伝子解析と感染状況の実態調査. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 45) 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 塩田智之, 飯塚愛恵, 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, 倉根一郎, 佐多徹太郎, 倉田毅, 森川茂. コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルスの臓器親和性と病原性. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 46) 早坂大輔. ダニ媒介性脳炎ウイルスをマウスに異なる経路で接種した際の発症・致死性の比較: 第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 千歳(2009.6)
- 47) 早坂大輔. ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)をマウスに異なる経路で接種した際の発症・致死性の比較: 第46回日本ウイルス学会九州支部総会, 佐賀(2009.9)
- 48) 早坂大輔, 永田典代, 長谷川秀樹, 佐多徹太郎, 高島郁夫, 小池智: ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性: 第148回日本獣医学会学術集会, 鳥取(2009.9)
- 49) 早坂大輔, デイン テュアン デュク, 木下一美, 田中香苗, 藤井克樹, 鈴木隆二, 森田公一: 日本脳炎ウイルス感染症の重症化のメカニズム: 第16回トガ・フラビ・ペステウイルス研究会, 東京(2009,10)
- 50) 早坂大輔, 永田典代, 長谷川秀樹, 佐多徹太郎, 高島郁夫, 小池智: ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性: 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009,10)
- 51) 北浦一孝, 藤井克樹, 早坂大輔, 高崎智彦, 鈴木隆二, 倉根一郎: ダニ媒介性脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎発症に関わる脳内浸潤T細胞の解析: 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009,10)

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

研究分担者 高島 郁夫 北海道大学 教授

研究要旨:ダニ媒介性脳炎(Tick-borne encephalitis; TBE)ウイルスは人に対して重篤な脳炎を引き起こす人獣共通感染症の原因ウイルスである。今回、日本各地のTBEウイルスの分布を調べるため、野鼠を対象とした血清疫学調査を行うとともに、道南地域で得られた野鼠の臓器からのウイルス分離を試みた。北海道、青森、富山、岐阜、愛知、島根、徳島、対馬からの合計931検体の野鼠血清を検査した。中空ウイルス様粒子(Subviral Particles; SPs)を抗原として用いたSP-ELISA法により、抗TBEウイルス抗体を保有する野鼠血清をスクリーニングし、その後特異性の高い中和試験により確定診断を行った。スクリーニングでは31検体が陽性と判定され、中和試験を行う検体を3.4%に絞り込むことが出来た。北海道において224検体中17検体、北海道以外では島根県において58検体中2検体の抗TBEウイルス抗体陽性例が検出され、同地域にTBEウイルスの流行巣が存在する事が示唆された。また、北海道の北斗町上磯地区のアカネズミから、蛍光抗体法でダニ媒介性フラビウイルス抗原陽性を示す感染性ウイルスが分離された。分離されたウイルスは塩基配列の解析によりTBEウイルスと同定され、上磯分離株であるOshima株と非常に近縁である事が示された。

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、北海道においてダニ媒介性脳炎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。

本研究では、北海道、及び全国的なTBEウイルスの分布状況を調査することを目的とし、SP-ELISA法によるスクリーニングと中和試験による確定診断を行い、日本全国の野鼠における血清疫学調査を行った。更に、北海道で現在流行しているTBEウイルスの性状を解析し、疫学的な危険度を評価することを目的に、道南地域

で得られた野鼠の臓器からのウイルス分離を試みた。

B. 研究方法

1) 被検サンプル

北海道、及び全国各地から集められた血清は、56°Cで30分加熱し非働化した後、使用まで-40°Cで保存した。北海道の北檜山町、北斗町上磯地区にて2008年の10月に疫学調査を行い、捕獲された122匹の野鼠を麻酔下での心採血により安楽殺して解剖し、脾臓、腎臓、肺を採取し、使用まで-80°Cで保存した。

2) TBEウイルスの中空ウイルス様粒子(SPs)の産生と回収

TBEウイルスのprM蛋白とE蛋白領域をpCAGGSプラスミドにクローニングしたpTBEprMEを、293T細胞にトランスフェクションし、組み換え蛋白を発現させ、SPsを産生させ、ELISAの抗原に用いた。

3) 抗TBEウイルス抗体陽性の野鼠血清のスクリーニング用SP-ELISA法

抗E蛋白ウサギIgG抗体を捕捉抗体とし、陽性抗原としてSPs溶液、陰性抗原としてポリエチレングリコール沈殿した正常293T細胞培養上清を用い、捕捉抗体と反応させた。その後被検血清、ALP標識抗マウスIgG抗体、基質としてp-nitrophenyl phosphate (pNPP) (Sigma)を反応させ、吸光度を求め、本ELISAのOD値とした。

4) フォーカス減少法による中和試験

BHK細胞と96ウェル平底マイクロプレートを用いた、50%フォーカス減少法により実施した。中和抗体価が40倍以上となった血清を中和試験陽性とした。

5) 臓器乳剤の哺乳マウス脳内接種

哺乳マウスへの脳内接種を行う検体は、中和抗体価が80倍のもの及び中和抗体価が無いものから恣意的に選んだ。1~6匹を1プールとして、合計16プールを脳内接種に用いることとした。野鼠の脾臓乳剤を作成し、これを1~2日齢のBALB/c哺乳マウスの脳内に25 μ l接種した。乳剤を接種したマウスは接種後14日目まで観察を行った。

6) 分離株の塩基配列決定

得られたPCR産物を用い、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。得られたデータはATGC ver.6 (GENETYX CORPORATION)によって解析し、塩基配列を決定した。

7) 分離株の系統樹解析

E蛋白質の1,488塩基対を元に、近隣接合法 (NJ法)を用いて多重解析を行い、MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 4.0プログラムパッケージを使用して系統樹を作成した。

(倫理面からの配慮について)

特に無し

C. 研究結果

1) 北海道の野鼠における抗体調査成績

1990年代に行われた血清疫学調査により、野鼠が抗TBEウイルス抗体を保有していることが判明している、道南地域の野鼠検体において抗体調査を行った。北海道では2001年、2008年を合わせて224検体が集められ、まずSP-ELISA法

によりそれら全ての野鼠血清中の抗TBEウイルス抗体を検査した。その結果、SP-ELISAでは17検体が陽性と判定された。

これら血清について中和試験を行った結果、17検体全てで中和抗体価が40倍以上あり、抗体陽性と判定された。北檜山の2001年の検体では、アカネズミ21検体中5検体、エゾヤチネズミ15検体中2検体が抗体陽性となった。同地域の2008年の検体では、エゾヤチネズミ68検体中1検体、ヒメネズミ6検体中2検体が抗体陽性となった。上ノ国の2001年の検体では、エゾヤチネズミ35検体中2検体が抗体陽性となった。上磯の2008年の検体ではアカネズミ19検体中2検体、エゾヤチネズミ9検体中2検体、ヒメネズミ20検体中1検体が抗体陽性となった。陽性検体の中和抗体価は全て80倍以上あり、640倍以上という高い抗体価を持つものも多く検出された。

以上により、道南地域では10年以上にわたって抗TBEウイルス抗体を保有する野鼠が存在していることが示された。

2) 北海道以外の野鼠における抗体調査成績

北海道以外の地域では、これまでTBEウイルスの存在は確認されていない。そこで、今回は北海道以外の地域においても、野鼠における抗体調査を行った。北海道以外の検体は707検体が集められ、上記のようにまずSP-ELISAを行ったところ、14検体が陽性と判定された。

それら検体について中和試験を行ったところ、多くは抗体陰性と判定されたが、島根県の58検体中2検体で抗体陽性検体が検出された。2検体の野鼠種はどちらもアカネズミであり、TBEウイルスに対する中和抗体価は640倍以上と320倍であった。

青森、富山、岐阜、愛知、徳島、対馬の検体からは、抗体陽性検体は検出されなかった。

3) 北海道の野鼠からのウイルス分離

北海道の野鼠検体から16プールの脾臓乳剤を作成し、それぞれ哺乳マウスに脳内接種を行った。そのうち、上磯で捕獲されたアカネズミ由来の脾臓乳剤を接種した群で、接種後7日目まで1匹の衰弱個体が現れた。衰弱個体1匹分の脳乳剤を作成し、Kamiiso-2008-AS2w(以下AS2w)として以後の実験に使用した。

4) 感染性の確認とRT-PCRによるウイルスRNAの検出

脳乳剤AS2wを接種した細胞の培養上清を新たにBHK細胞に接種し、CPEの観察とIFAIによるウイルス抗原の検出を行った。その結果、AS2wの細胞培養上清をBHK細胞に接種したもので、CPEは観察されなかったがIFAIにてウイルス蛋白が確認された。

脳乳剤を接種した細胞からRNAを抽出し、TBEウイルス特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。AS2wのレーンに陽性対照と同じ位置のバンドが確認され、TBEウイルスRNAが検出された。以上より、上磯のアカネズミから1株のTBEウイルスが分離された。

5) 分離株の一部RNAにおける系統樹解析

AS2wの塩基配列のうち、E蛋白領域の1,488塩基配列が決定され、既知のウイルス株との系統樹を作成した。系統樹から、AS2wは極東亜型に分類され、中でもOshima株と同じ集団を形成し、ロシアで分離されたSofjin株やKH98株とは明らかに異なるクラスターに属することが示された。

D. 考察

今回、北海道の血清疫学調査と野鼠からのウイルス分離により、上磯では10年以上に渡ってTBEウイルスの流行巣が維持されていることを確認し、その他の道南地域でも依然としてTBEウイルスの流行巣が存在することが示唆された。また、日本全国での血清疫学調査により、島根県においてTBEウイルスの流行巣の存在が示唆された。今後も、抗体陽性検体が検出された地域を中心に、より詳細な疫学調査を行い、ウイルスを分離してその性状を解析すること、また、調査範囲を拡大し、新たにTBEウイルスの流行巣が存在する地域を特定することで、TBEウイルス流行地域住民への危険度を評価するとともに、TBE患者発生の予防に役立てることが重要である。

E. 結論

本研究では、日本国内の野鼠におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査を行うとともに、北海道の野鼠検体からのウイルス分離を試みた。血清疫学調査の結果では、北海道において10年以上にわたり流行巣が維持されていること、北海道以外では今回初めて島根県において流行巣の存在が示唆された。また、北海道の野鼠から試みたウイルス分離では、1株のTBEウイルスが分離することが出来た。

F. 健康危険情報

今回北海道渡島管内北斗町上磯地区でダニ媒介性脳炎ウイルスが分離されたことからウイルス汚染が10年以上にわたり持続しており、住民に対する感染予防のための対策が必要と思

われた。

G. 研究発表

1.論文発表

1)Yoshii, K., Ikawa, A., Chiba, Y., Omori, Y., Maeda, J., Murata, R., Kariwa, H., Takashima,

I. :Establishment of a neutralization test involving reporter gene-expressing virus-like particles of tick-borne encephalitis virus. J. Virol. Methods. 161: 173-176, 2009.

2)Hayasaka, D., Nagata, N., Fujii, Y., Hasegawa, H., Sata, T., Suzuki, R., Gould, E.A., Takashima, I., Koike, S. :Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses. Virology. 390: 139-150, 2009

2.学会発表

1)村田亮、橋口和明、好井健太郎、野田寛、伊川綾恵、原田祐里、苺和宏明、高島郁夫：極東ロシアの野鳥におけるウエストナイル熱の血清疫学調査と中和試験の評価：第148回日本獣医学会学術集会、鳥取（2009、9）

2)持館景太、好井健太郎、大森優紀、千葉裕美子、村田亮、真田崇弘、前田潤子、苺和宏明、高島郁夫：日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査：第148回日本獣医学会学術集会、鳥取（2009、9）

3)高野絢子、大森優紀、好井健太郎、石塚万理子、村田亮、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株のレプリコンの構築：第

- | | |
|---|-----------------|
| 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取 (2009, 9) | なし |
| 4)好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫、Holbrook Micael: オムスク出血熱ウイルスの感染性 cDNA の構築: 第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取 (2009, 9) | 2. 実用新案特許
なし |
| 5)高島郁夫: ダニ媒介性脳炎ウイルスの生態学: 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009,10) | 3. その他
なし |
| 6)好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫: オムスク出血熱ウイルスの感染性 cDNA の構築: 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009,10) | |
| 7)高野絢子、大森優紀、好井健太郎、石塚万理子、村田亮、苺和宏明、高島郁夫: ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株のレプリコンの構築: 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009,10) | |
| 8)早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、高島郁夫、小池智: ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性: 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009,10) | |
| 9)持舘景太、好井健太郎、大森優紀、千葉裕美子、村田亮、真田崇弘、前田潤子、苺和宏明、高島郁夫: 日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査: 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009,10) | |
| 10)村田亮、好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫: 極東ロシアの野鳥におけるウエストナイル熱の血清疫学調査と中和試験の評価: 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009,10) | |

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

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

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:近年げっ歯類やベクターによって媒介される人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」: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。また、NP の N 末端を削除したトランクエート抗原を同様に発現させ、血清型鑑別のための ELISA 抗原とした。また、全長の NP はさらに pET43.1 ベクターを用いて大腸菌に発現させ、精製して ELISA 抗原として用いた。

「新世界げっ歯類に対する2次抗体の作成」: Cotton rat の血清から Protein A カラムを用いて IgG 分子を精製し、これをマウスに免疫して抗血清を得た。ここから IgG 分子を精製し、さらにビオチンでラベルして2次抗体とした。

「ELISA、Western blotting」: ELISA および Western blotting 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」: Sin Nombre virus (SNV)/ Andes virus (ANDV)/ Laguna Negra