

ち、酪農業・肉牛飼育・獣医師や牧場で遊ぶ子供達であった。自験例は、牛農家で実習した農業大学の学生と牛放牧に従事している職員であった。発症部位は、下肢に生じた1例<sup>4)</sup>を除くと全例が露出部に皮疹が生じていた。45例の病型は、頑癬・白癬性毛瘡・ケルスス禿瘡・体部白癬などであるが、自験例は2例とも体部白癬であった。45例中、感染源の牛の検索をしたものは2例しかなかった<sup>5,6)</sup>が、いずれの例も本菌種が検出された。

自験例の症例2でも感染源と考えられた子牛の検査を行ったところ、子牛の鱗屑の培養検査で本菌種が検出された。また、分子生物学的検索でも既知の本菌種と一致した。

自験例同様、最近では、分子生物学的検査はよく行われているようである<sup>1,4,7,8)</sup>。今後はこの検査が主流になっていくのかもしれない。

感染牛の治療は、体表面積が広いため困難であるが、1歳を過ぎると簡単に病変部は自然に治癒する<sup>9)</sup>という。自験例の子牛は、保健所の指導により外用していたようであるが詳細は不明であった。一般的にはヨード剤を噴霧する。

ヒトの治療は、抗真菌剤の外用で治療することもある<sup>10)</sup>が、治療に抵抗することも多く、イトラコナゾールやテルビナフィンが投与されている。自験例も症例1では、治療に抵抗し、イトラコナゾールとテルビナフィンを併用した。

#### E. 結論

牛飼育経験の浅いものは *T. verrucosum* による白癬に感染しやすいと言える。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 参考文献

- 1) 凌 太郎・他：牛飼育者の子供二人にみられた *Trichophyton verrucosum* 感染症。西日皮膚、66：153-156、2004。
- 2) 渡邊晴二・他：*Trichophyton verrucosum* による体部白癬の1例。西日皮膚、62：758-761、2000。
- 3) K. Ural and B. Ulutas: Immunization with *Trichophyton verrucosum* vaccine in hunter/jumper and dressage horses with naturally occurring *Trichophyton equinum* infection: A prospective, randomized,

double-blinded, placebo-controlled clinical trial. Journal of Equine Veterinary Science, 28: 590-93, 2008.

4) 三浦幹枝・望月隆：大腿部に生じた *Trichophyton verrucosum* による白癬。臨皮、62：1016-1019、2008。

5) 芝木晃彦・他：*Trichophyton verrucosum* による体部白癬の1例。日皮会誌、111：57、2001。

6) 小林博人・他：*Trichophyton verrucosum* による体部白癬の1例。日皮会誌、116：1093、2006。

7) 若松伸彦・他：畜産業従事者の顔面に生じた *Trichophyton verrucosum* による体部白癬の1例。臨皮、61：457-460、2007。

8) 寺田麻衣子・他：*Trichophyton verrucosum* 感染症。皮膚病診療、30：169-172、2008。

9) 比留間政太郎・他：家畜飼育者にみられた *Trichophyton verrucosum* 感染症。皮膚病診療、17：739-742、1995。

10) 高橋一朗・他：*Trichophyton verrucosum* 感染症の4例。真菌誌、46：96、2005。

(研究協力者：猿田隆夫；猿田皮膚科診療所)

## 研究発表

### 1. 著書

- 1) 「深在性真菌症 Q & A」改訂第 3 版  
病原真菌の真菌学・免疫・薬剤感受性  
Q 8 人獣共通の真菌症があるか? pp.  
37-39. 河野 茂 編. 佐野文子 (分担,  
他 44 名). 医薬ジャーナル社, 大阪,  
2009
- 2) [ズーノーシスハンドブック] 医  
療関係者・獣医療関係者のための診断・  
治療ガイド ヒストプラズマ症 pp182-  
184, 岸本寿男, 山田章雄 編. 佐野文  
子 (分担, 他 73 名) メディカルサイエ  
ンス, 東京, 2009
- 3) Sano A, Itano EN: "Current Advances in  
Molecular Identification of Fungi". Part II.  
Human pathological and clinical  
contributions. 18-Applications of loop-  
mediated isothermal amplification methods  
(LAMP) for identification and diagnosis of  
mycotic diseases: Paracoccidioidomycosis  
and *Ochroconis gallopava* infection. Voigt K  
ed. (他 57 名), *In press*. Springer, Germany,  
2010.

### 2. 原著

- 1) Naota M, Shimada A, Morita T, Kimura K,  
Ochiai K, Sano A: Granulomatous  
pericarditis associated with systemic  
mucormycosis in a finless porpoise  
(*Neophocaena phocaenoides*). *Journal of  
Comparative Pathology*. 140:64-6, 2009.
- 2) Muraosa Y, Morimoto K, Sano A,  
Nishimura K, Hatai K: A new  
peronosporomycete, *Haliotica  
noduliformans* gen. et sp. nov., isolated  
from white nodules in the abalone *Haliotis*  
spp. from Japan. *Mycoscience*. 50 :105-  
115, 2009.
- 3) Munchan C, Kurata O, Wada S, Hatai K,  
Sano A, Kamei K, Nakaoka N. *Exophiala  
xenobiotica* infection in cultured striped  
jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch &  
Schneider), in Japan. *J Fish Dis*, 32 :  
893-900, 2009.
- 4) Takayama A., Itano EN, Sano A, Ono MA,  
Kamei K: An atypical *Paracoccidioides  
brasiliensis* clinical isolate based on

multiple gene analysis. *Medical Mycology*.  
(in press)

- 5) Tatibana BT, Sano A, Uno J, Kamei K,  
Igarashi T, Mikami Y, Miyaji M,  
Nishimura K, Itano EN: Detection of  
*Paracoccidioides brasiliensis gp43* gene in  
sputa by loop-mediated isothermal  
amplification method (LAMP)  
*Paracoccidioides brasiliensis gp43* gene in  
sputa. *Journal of Clinical Laboratory  
Analysis*, 23: 139-143, 2009.
- 6) Vivan RH, Leonello PC, Nagashima LA,  
Kaminami MS, Tristão FS, Sano A, Ono  
MA, Béjar CV, Itano EN. Soluble  
Components of *Histoplasma capsulatum*  
var. *capsulatum* have hemagglutinin  
activity and induce syngeneic  
hemophagocytosis in vitro.  
*Mycopathologia*. 2009 Nov 8. [Epub ahead  
of print]

### 3. 総説・翻訳・その他

- 1) 佐野文子, 西村和子: 特集/皮膚真菌  
症診断ガイド—これだけは知っておきたい  
皮膚真菌症の知識—病原黒色真菌および  
類縁病原真菌の分離・同定について.  
*MB Derma*. 148: 55-63, 2009.
- 2) 佐野文子: 特集 子どもと動物-上手  
にふれあうためには-8.皮膚真菌症  
*小児科臨床* 62 : 739-749, 2009.
- 3) 佐野文子: 話題の感染症 ヒストプラ  
ズマ症の最新の知見-家庭内飼育動物が罹  
患したら- *モダンメディア* 55:36-45,  
2009.
- 4) 佐野文子: 珍しい真菌感染症.  
*InfoVets* 12(5): 18-24, 2009.2009.
- 5) 佐野文子, 高橋英雄, 村田佳輝, 亀井克  
彦: 特集 人と動物の共通感染症最前線-
- 6). 小動物臨床獣医師を対象としたヒス  
トプラズマ症に関する認識調査. *獣医畜  
産新報* 62 (6) : 467-468, 2009.
- 7) 佐野文子. 翻訳: スイスにおける人  
獣共通皮膚糸状菌症の原因菌  
*Trichophyton mentagrophytes* 複合菌種  
(*Arthroderma vanbreuseghemii* と  
*Arthroderma benhamiae*)の感染源である愛

玩動物。 原題 : Pets as the main source of two zoonotic species of the *Trichophyton mentaglyphytes* complex in Switzerland, *Arthroderma vanbreuseghemii* and *Arthroderma benhamiae*. 獣医皮膚科臨床, 19:61-68, 2009.

#### 4.国内外での学会発表

1) Itano EN, Nagashima LA, Sano A, Kamei K, Uno J, Nishimura K: Production and analysis of polyclonal antibodies to *Arthrographis kalrae* soluble antigens with hemolytic activity. Abstract: P333, 2009, May 26-30, Tokyo, Japan. PP-02-47

2) Itano EN, Marquez AS, Sano A, Vicentini AP, Kaminami MS, Ono MA, Camargo ZP: IgG-IgE and IgG-gp43 immune complexes in acute and chronic Paracoccidioidomycosis. Abstract: P334, 2009, May 26-30, Tokyo, Japan. PP-02-49

3) Yarita K, Sano A, Kamei K, de Hoog S, Nishimura K: A new species of genus *Ochroconis* closely related to *O. gallopava* isolated from a hot spring effluent. Abstract: P381, 2009, May 26-30, Tokyo, Japan. PP-04-11

4) Miyasato H, Hosokawa A, Sano A, Uezato H: First case of tinea corporis by *Microsporum gallinae* in Japan. Abstract: P416, 2009, May 26-30, Tokyo, Japan. PP-06-20

5) Ueda K, Sano A, Miyahara H, Uchida S: Repeated isolations of *Scedosporium apiospermum* from skin of manatees (*Trichechus manatus*). P Abstract: P448, 2009, May 26-30, Tokyo, Japan. PP-06-85-06-85

6) Itano EN, Leonello PC, Tristao FSM, Vivna RHF, Uno J, Ono EYS, Cenancio EJ, Sano A: IgG to *Histoplasma capsulatum* high MM antigens (hMMAGs) and IgG-hMMAGs immunocomplex in experimental histoplasmosis in mice. Abstract: P482, 2009, May 26-30, Tokyo, Japan. PP-07-63

7) Sano A, Takahashi H, Murata Y, Kamei K: Canine case of histoplasmosis *duboisii* in Japan. Abstract: P493, 2009, May 26-30, Tokyo, Japan. PP-08-6.

8) Murata Y, Mori S, Sano A, Nishimura K, Kamei K: A case of systemic infection of *Colletotrichum gloeosporioides* in a cat with feline immunodeficiency virus infection. Abstract: P493, 2009, May 26-30, Tokyo, Japan. PP-08-7

9) Sano A, Itano EN: An atypical isolate of *Paracoccidioides brasiliensis* found in our culture collection. Abstract: P131, 2009, May 26-30, Tokyo, Japan. CB-01-1

10) Takahashi Y, Sano A, Yarita K, Kamei K, Nishimura K: An endemic cross-infection between humans and cats and a non-endemic human infection caused by *Arthroderma vanbreuseghemii* and molecular epidemiology. Abstract: P417, 2009, May 26-30, Tokyo, Japan. PP-06-22.

11) 村上日奈子, 吉澤定子, 館田一博, 岩田基秀, 渋谷和俊, 佐野文子, 亀井克彦, 山口恵三: 血液培養より *Histoplasma capsulatum* を分離した HIV 感染症の 1 例 — 細菌学的所見を中心に —. 第 83 回日本感染症学会総会学術講演抄録, P314, 平成 21 年 4 月 23-24 日, 京王プラザホテル (東京).

12) 田熊大祐, 小林未歩子, 鈴木志奈子, 佐野文子, 畑井喜司雄: シラウオから分離された *Aphanomyces* 属菌種の新種について. 日本菌学会大 3 回大会 (鳥取) 講演要旨集. P62. 平成 21 年 8 月 19-21 日, 年鳥取大学農学部, 鳥取.

13) 佐野文子, 高橋英雄, 村田佳輝, 亀井克彦: 小動物臨床領域におけるヒストプラズマ症の診断法・治療法・安全対策. 平成 21 年度関東・東京地区獣医師大会 — 日本小動物獣医学会 (関東・東京), P43, 平成 21 年 9 月 13 日, ホテルグリーンタワー千葉, 千葉.

14) 村田佳輝, 井上敬子, 林大輔, 熊谷肇, 高橋英雄, 高山明子, 亀井克彦, 佐野文子: *Malassezia pachydermatis* を原因菌としない外耳道真菌症 (Otomycosis) の 5 症例. 平成 21 年度関東・東京地区獣医師大会 — 日本小動物獣医学会 (関東・東京), P44, 平成 21 年 9 月 13 日, ホテルグリーンタワー千葉, 千葉.

13) 猿田隆夫, 佐野文子. *Trichophyton verrucosum*による体部白癬の1例. 第54回日本皮膚科学会高知地方例会. 平成21年9月19日. 高知県教育会館, 高知.

14) 佐野文子, 山口さやか, 宮里仁奈, 兼島 孝, 川満武聡, 又吉栄一郎, 村田佳輝, 池田忠生, 鎗田響子, 高山明子, 花見有紀, 高橋容子, 亀井克彦, 細川 篤. 沖縄県で飼育されているシヤモより分離された人獣共通皮膚糸状菌症原因菌 *Arthroderma simii*. 第50回日本熱帯医学会大会 プログラム抄録集, P76, 平成21年10月22-23日. 沖縄コンベンションセンター, 沖縄.

15) 佐野文子. 「動物園・水族館で問題となっている真菌症」, 人と動物の共通感染症に関する研究会—水族館での真菌症対策—, 要旨集, P4, 平成21年10月24日. (財)海洋博覧会記念公園管理財団総合研究センター, 沖縄.

16) 佐野文子, 春成常仁, 鎗田響子, 花見有紀, 高山明子, 亀井克彦, 高橋容子, 谷川 力. ドブネズミより分離された *Arthroderma vanbreuseghemii*. 第9回人と動物の共通感染症研究会学術集会. 講演要旨集, P10. 平成21年11月7日. 文京シビックホール, 東京.

## 5.特許

「酵母 *Cyniclomyces guttulatus* の分離・同定方法およびそれに用いるキット」特許出願中  
特願 2009-191094 号

## 6.その他

新聞報道: 共通「白せん菌」発見. 宮古新報第3面. 平成21年10月29日.

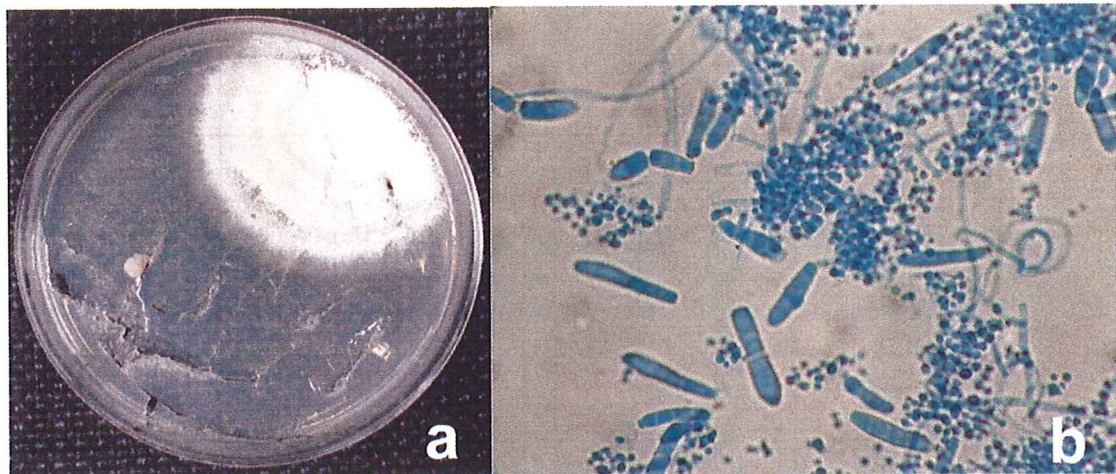


写真 1.

(a) ポテトデキストロス寒天平板培地にて、35°C、14日間培養して生育してきた集落。  
(b)大分生子，小分生子およびラセン体（ラクトフェノールコットンブルー固定染色，x200）

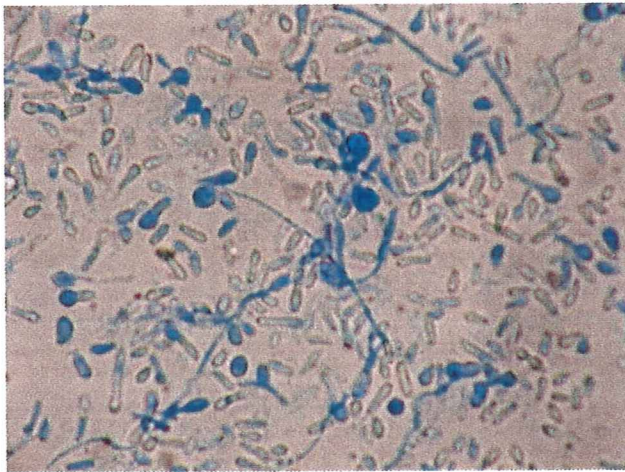


写真 2. ニワトリの肉冠から分離された *Cryosporium* sp.の掻き取り標本。（ラクトフェノールコットンブルー固定染色，x200）

イルカ呼気病原性酵母調査

No.	イルカ名	イルカ種	2009年2月	2009年4月	2009年6月	2009年8月	2009年10月	2009年12月
			菌種	菌種	菌種	菌種	菌種	菌種
1	ゴン	オキゴンドウ			C. tropicalis (1)	C. tropicalis (1)	C. tropicalis (11)	
2	スカイ	バンドウイルカ	C. tropicalis (6)	C. tropicalis (74)	C. tropicalis (121)	C. tropicalis (131)	C. tropicalis (36), P. guillermondii (2)	C. tropicalis (23)
3	サミ	ミナミバンドウイルカ		C. albicans (7)	C. albicans (19)	C. albicans (2)	C. albicans (1)	C. albicans (1)
4	フジ	バンドウイルカ		C. albicans (29)	C. albicans (1)			C. albicans (2)
5	オキ	ミナミバンドウイルカ		C. glabrata (5)	C. glabrata (44)	C. glabrata (2)	C. glabrata (2)	C. glabrata (2)
6	クルー	オキゴンドウ						
7	ルバン	カマイルカ		C. krusei (41)	C. krusei (17)	C. krusei (1)	C. krusei (2)	
8	コニー	バンドウイルカ x ミナミバンドウイルカ F1	C. albicans (35)	C. albicans (50)	C. albicans (23)	C. albicans (105)	C. albicans (21)	C. albicans (8)
9	チャオ	バンドウイルカ x ミナミバンドウイルカ F1	C. tropicalis (1)		C. tropicalis (622)	C. tropicalis (401)	C. tropicalis (401)	C. tropicalis (770)
10	クロ	ミナミバンドウイルカ	C. albicans (12)		C. albicans (1)	C. albicans (5) and C. haemulonii (1)		
11	ティダ	オキゴンドウ						
12	ムク	ミナミバンドウイルカ						
13	ダン	ミナミバンドウイルカ						
14	ポイ	ミナミバンドウイルカ					C. albicans (2)	
15	モモ	オキゴンドウ						
16	ローラ	カマイルカ						
17	バンドウ	バンドウイルカ						
18	シワハ4	シワハイルカ						
19	シワハ5	シワハイルカ						
20	バンドウ♀	バンドウイルカ		Pichia rhodanensis (2)	Pichia rhodanensis (127)	Pichia rhodanensis (104)	Pichia rhodanensis (6)	Pichia rhodanensis (157)
21	バンドウ10	バンドウイルカ	ND	ND	ND			
22	バンドウ11	バンドウイルカ	ND	ND	ND			

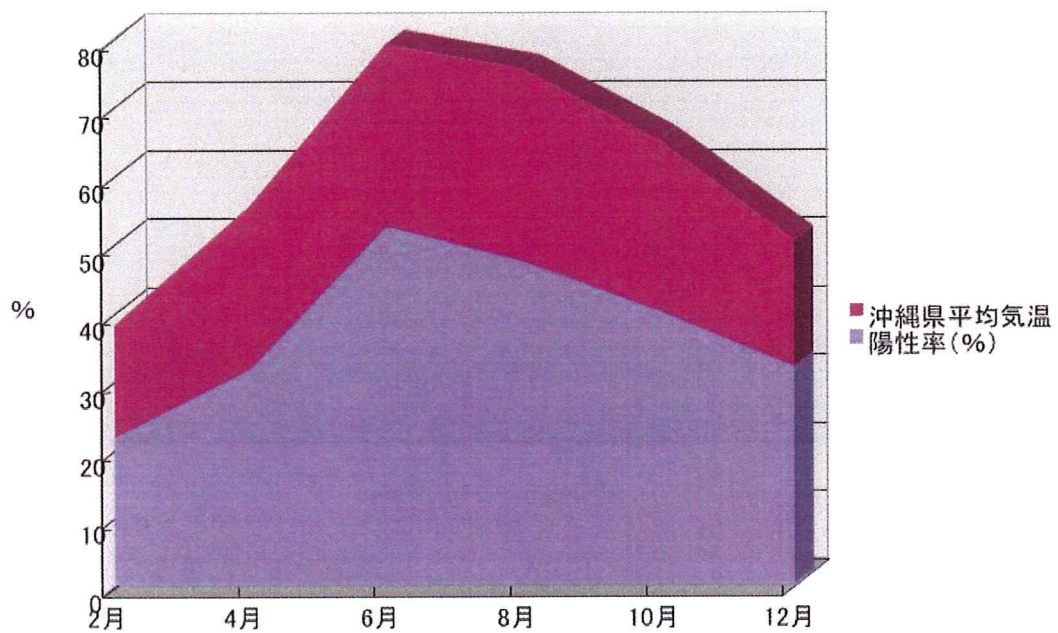


図 1. イルカ呼気中の病原性酵母保有率と沖縄県平均気温との相関.

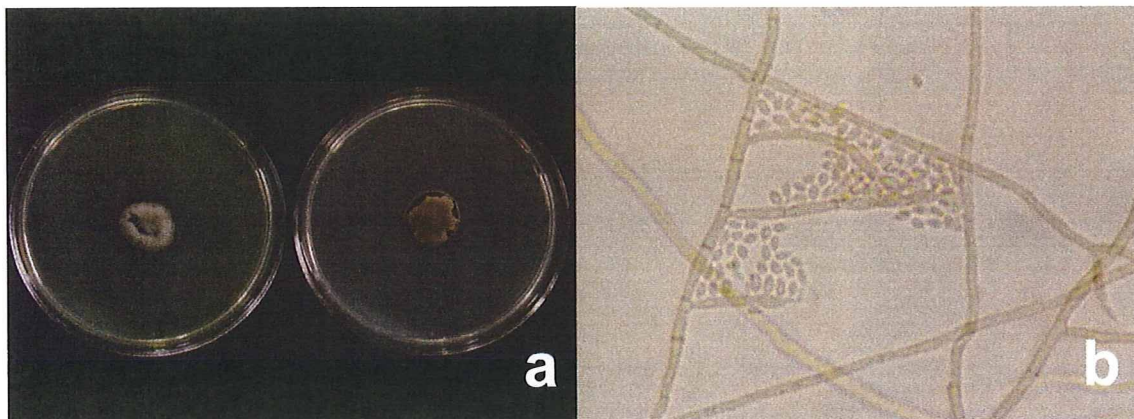


写真 3. カマイルカから分離された *Exophiala xenobiotica*.

(a)集落. 右: サブロー寒天, 左: ポテトデキストロース寒天, 25°C, 4 週間.

(b) ポテトデキストロース寒天での顕微鏡所見. (ラクトフェノール固定, 無染色, x400) .

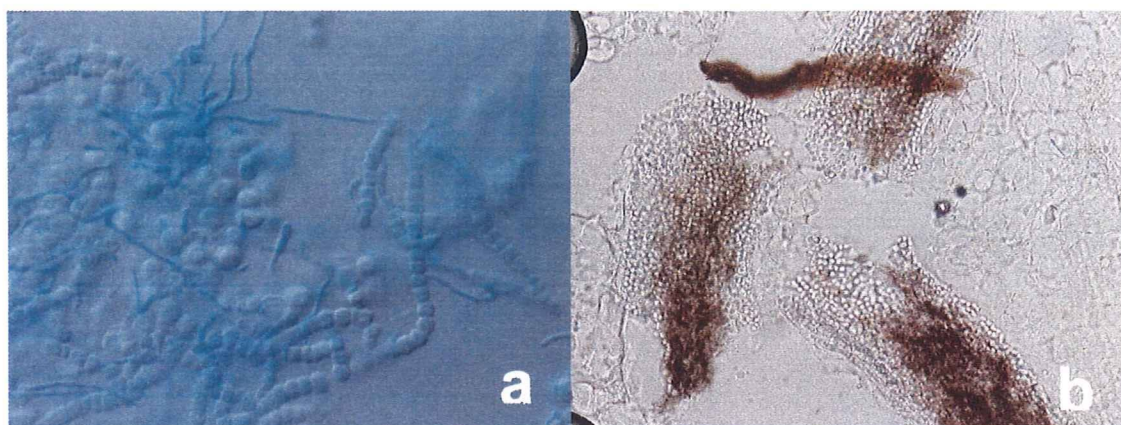


写真4. 症例1より分離された *Trichophyton verrucosum*.

(a) クロラムフェニコール (100 mg/L) および 1% イーストエキス, 1% ブドウ糖添加ブレインハートインフュージョン培地 (BHIA) 35°C, 4週間培養した菌体の掻き取り標本 (ラクトフェノールコトシブルー固定染色, x200) .

(b) ウシ被毛の KOH 標本. (x200) .



## 分担研究報告書

### 1.1. 翼手目を対象とした基盤研究及びエボラレストンの疫学

主任研究者 吉川泰弘 (東大)

協力研究者 明石博臣、久和茂、上田直哉、伊波興一郎

渡辺俊平 谷口怜、川口友浩 藤井ひかる (東大)

宇根有美 (麻布大)

森川茂 (感染研)

#### 研究要旨

翼手目(以下、コウモリ)はエボラ出血熱ウイルス、マールブルグウイルス、SARS コロナウイルス、狂犬病ウイルス、ニパウイルス等をはじめとする、人に致死的な複数の新興・再興感染症の病原体保有動物として公衆衛生上問題視されているが、その生理学的な背景や、病原体の疫学に関しては未だ不明な点が多い。これまで、実験動物施設において繁殖・飼育を行ったルーセットオオコウモリを用いて、①コウモリの感染免疫関連因子(I型インターフェロン、Toll-like receptors、Th1/Th2 サイトカイン等)に関する基礎的情報の収集、②コウモリ肝臓における薬物代謝酵素チトクローム P450(CYP)に関する基礎情報収集、さらに③フィリピンの野生コウモリの肝臓におけるCYP450の活性の測定結果について報告した。

本年度は、①コウモリにおけるレストンエボラウイルス(REBOV)の疫学手法の開発、及び②フィリピンの野生コウモリにおける疫学調査を行い、数頭のルーセットオオコウモリにおいてREBOV血清陽性がみられることを確認した。これらの結果から、これまで自然宿主が不明であったREBOVについても、コウモリが自然宿主である可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

レストンエボラウイルス(REBOV)は、フィロウイルス科エボラウイルス(EBOV)属に属するマイナス鎖RNAウイルスである。1989年フィリピンからアメリカへ輸出されたカニクイザルで初めてREBOVの感染・発症が確認され、その後数回フィリピン国内のカニクイザル及びフィリピンから輸出されたカニクイザルで発症が確認されている。2008年フィリピンの養豚施設の豚でREBOV感染が確認され、豚飼育施設内での感染拡大が明らかとなった。

EBOV属はREBOVを含め5種より構成されるが、REBOVを除く4種はアフリカで感染発症が確認されている。近年ヘニパウイルス感染症、狂犬

病、SARS コロナウイルス感染症など翼手目由来の重篤な動物由来感染症が公衆衛生上問題視されているが、EBOVも同科に属するマールブルグウイルス(MARV)とともに翼手目が自然宿主と考えられていて、アフリカ各所で翼手目に対するEBOV疫学調査が行われている。

REBOVは、フィリピンを起源とするサル出血熱発症が数回報告されているが、これまで大規模な翼手目の疫学調査は行われていない。そこで本研究では、翼手目を対象とするREBOV抗体検出系及び高感度なウイルス遺伝子検出系を確立し、フィリピン翼手目のREBOV疫学調査を実施した。

1. REBOV の組換え核蛋白及び糖蛋白を用いた IgG ELISA 及び間接蛍光抗体法の確立

REBOV の核蛋白(rNP)及び、糖蛋白(rGP)を組換えバキュロウイルスにより発現・精製し ELISA 抗原とした。また東大付属牧場で飼育しているデマレルーセットオオコウモリ及びウサギを REBOV rNP 及び rGP で免疫し、ウサギ及び翼手目の特異抗体を作製し、NP 及び GP 特異的 IgG-ELISA を確立した。さらに、REBOV rNP 及び rGP 発現 HeLa 細胞株を樹立し、間接蛍光抗体法 (IFA)を確立した。

2. REBOVGP を有する VSV シュードタイプによる代替え中和試験法の確立

REBOV rGP を外套した VSV シュードタイプウイルスを作製した。このシュードタイプウイルス

## C. 研究結果

1. IgG ELISA 及び間接蛍光抗体法：フィリピンルソン島を中心に捕獲された翼手目 140 個体の血清疫学調査を実施した結果、ルーセットオオコウモリ 16 検体中 7 検体が REBOV NP あるいは GP 抗体陽性であった。さらに、IgG ELISA による抗体陽性検体を IFA により解析した結果、ルーセットオオコウモリ 2 検体が NP 抗体陽性で 1 検体が GP 抗体陽性反応を呈した。

2. 中和試験法：REBOV rGP 免疫コウモリ及びウサギ血清を用いてシュードタイプを用いた中和試験（代替え中和試験）を行った結果、免疫ウサギ血清では中和抗体が検出されたが、免疫コウモリ血清では検出されなかった。フィリピンで捕獲されたコウモリ検体のうち IgG ELISA, IFA で抗体陽性を示した個体等を対象として代替え中和試験を行ったが、陽性個体は検出され

## B. 研究方法

は REBOV GP により細胞に流産感染 (abortive infection) し蛍光蛋白 GFP を発現する。

3. Semi-nested RT-PCR を用いた高感度な REBOVRNA 検出法の確立

REBOVRNA をターゲットとする semi-nested RT-PCR 法を確立し、従来用いられていた RT-PCR 法と検出感度を比較した。

4. 1-3 で確立した疫学手法を用いたフィリピンの野生コウモリにおける疫学調査

フィリピン大学との共同サンプリングにおいて捕獲された野生コウモリの血清および臓器由来 RNA サンプルを用いて、REBOV の疫学調査を行った。

なかった。

3. Semi-nested RT-PCR 法：従来用いられている RT-PCR 法の REBOVRNA 検出感度は 1,000 コピーだが、新たに開発した semi-nested RT-PCR 法の RNA 検出感度は 1 コピーで、従来の 1,000 倍の感度であった。フィリピンで捕獲されたオオコウモリ等を中心に脾臓 62 検体から semi-nested RT-PCR 法により REBOVRNA 検出を試みた結果、全て陰性であった。

## D. 考察

昨年、これまで想定されていなかった豚で REBOV 感染が確認されたことから、フィリピンにおける REBOV の疫学調査は公衆衛生上及び経済的にも非常に重要な調査であり、REBOV の自然界でのライフサイクルの把握は感染予防の点で極めて重要である。カニクイザルを対象とした疫学調査では、REBOV 感染症流行時のサル検体を用いて感度・精度が評価されている NP 特異的抗体検出系が有用である。一方、自然宿主の

可能性がある翼手目を対象とした疫学調査を実施する場合、REBOV 感染翼手目検体が入手不可能であるため血清診断法の感度・精度の評価が困難である。このような場合、より多くの血清診断法を用いることで、より正確な情報を得ることが可能と考えられる。そこで、本研究では NP 特異抗体検出系、GP 特異抗体検出系をそれぞれ 2 種類 (ELISA, IFA 法) 確立した。また、REBOV はバイオセーフティーレベル 4 の病原体で日本ではウイルス培養ができない。そこで、VSV シュードタイプ系を確立し代替ウイルス中和試験を行った。さらに、REBOV 遺伝子検出系に関して従来の RT-PCR 法の 1,000 倍の感度となる semi-nested RT-PCR 法を開発した。

これらを用いて、フィリピンの翼手目を対象とした疫学調査を実施した結果、REBOV 遺伝子検出は全て陰性であったがルーセットオオコウモリにのみ抗体陽性検体が数検体確認された。アフリカの EBOV やマールブルグウイルスは、ルーセットオオコウモリを含めたオオコウモリが宿主動物と考えられていることから、フィリピンのルーセットオオコウモリが REBOV の自然宿主である可能性が示唆された。今後、フィリピンのオオコウモリを対象としたより大規模な調査を実施し、REBOV 遺伝子を検出すること、本病原体の生態を明らかにする必要がある。

#### E. 結語

コウモリにおける REBOV の疫学調査のための複数の手法が開発された。また、これらを用いた疫学調査の結果から、REBOV の自然宿主がルーセットオオコウモリである可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Shumpei Watanabe, Naoya Ueda, Koichiro Iha, Joseph S. Masangkay, Hikaru Fujii, Phillip Alviola, Tetsuya Mizutani, Ken Maeda, Daisuke Yamane, Azab Walid, Kentaro Kato, Shigeru Kyuwa, Yukinobu Tohya, Yasuhiro Yoshikawa, Hiroomi Akashi. Detection of a new bat gammaherpesvirus in the Philippines. *Virus Genes*. 2009 Aug;39:90-3.

2. Iha K, Omatsu T, Watanabe S, Ueda N, Taniguchi S, Fujii H, Ishii Y, Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y. : Molecular cloning and sequencing of the cDNAs encoding the bat interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, and tumor necrosis factor-alpha. *J Vet Med Sci*. 2009 Dec;71(12):1691-5.

3. Iha K, Omatsu T, Watanabe S, Ueda N, Taniguchi S, Fujii H, Ishii Y, Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y. : Molecular Cloning and Expression Analysis of the Bat Toll-Like Receptor 3,7, and 9. *J Vet Med Sci*. 2009 Nov 25. [in press]

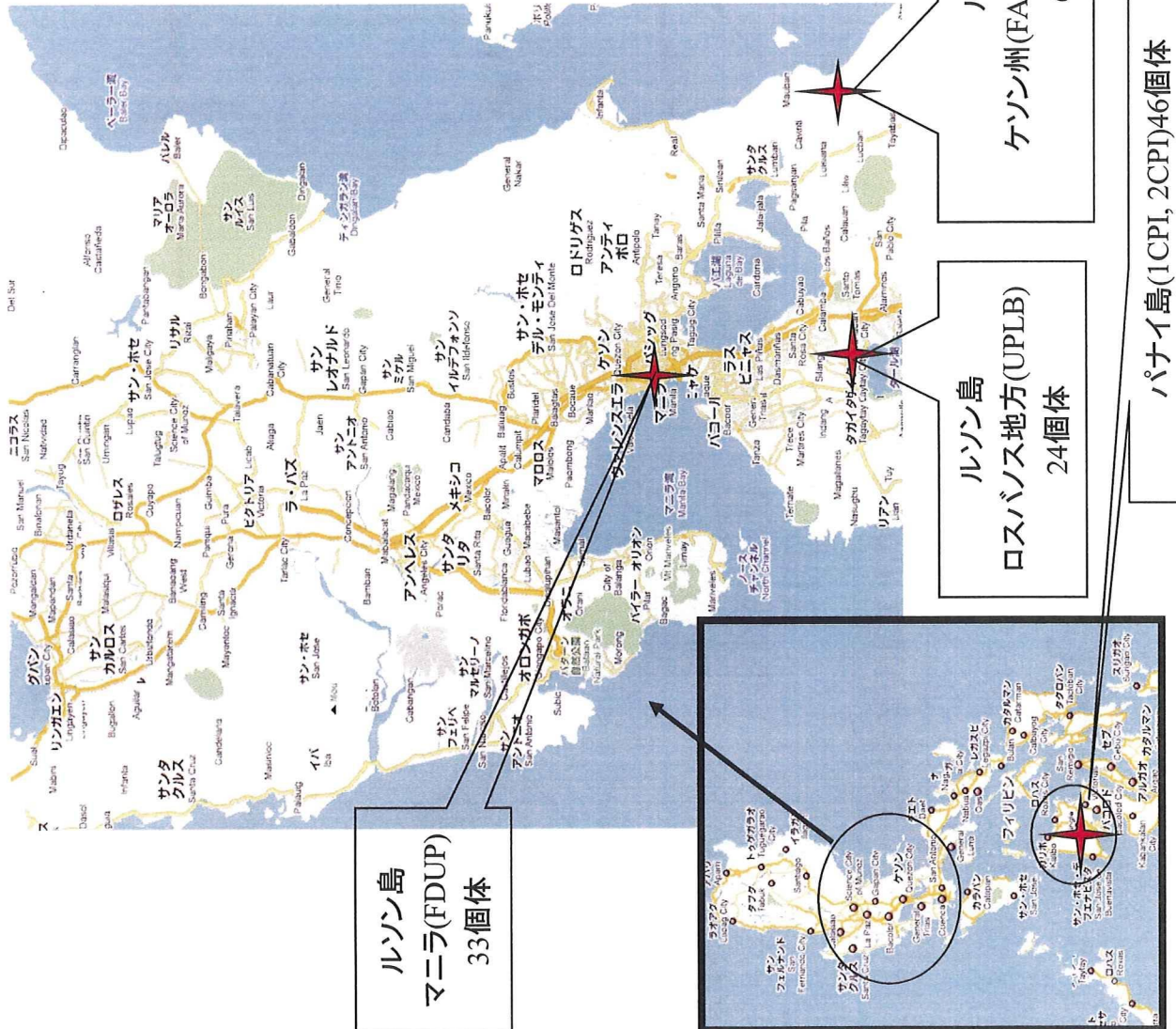
4. Fujii H, Watanabe S, Yamane D, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kato K, Tohya Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H. Functional analysis of *Rousettus aegyptiacus* "signal transducer and activator of transcription 1" (STAT1). *Dev Comp Immunol*. 2010 [in press]

## 2. 学会発表

1. 伊波興一朗、大松勉、渡辺俊平、上田直也、谷口怜、石井寿幸、久和茂、明石博臣、吉川泰弘 翼手目の Toll-like receptor (TLR) 3, 7, 9 の cDNA 塩基配列解析および臓器別 mRNA 発現量の比較 第 147 回日本獣医学会 (宇都宮) 2009 年 4 月
2. 藤井ひかる、渡辺俊平、上田直也、伊波興一朗、谷口 怜、加藤健太郎、遠矢幸伸、久和茂、吉川泰弘、明石博臣 エジプトルーセットオオコウモリにおける STAT1 のクローニングとその機能解析 第 148 回日本獣医学会 (鳥取) 2009 年 9 月
3. 渡辺俊平、前田健、水谷哲也、鈴木和男、藤井ひかる、上田直也、伊波興一朗、谷口 怜、加藤健太郎、遠矢幸伸、久和茂、吉川泰弘、明石博臣 RDV法を用いたコウモリ由来新規  $\beta$  ヘルペスウイルスの同定 第 148 回日本獣医学会 (鳥取) 2009 年 9 月
4. 渡辺俊平、前田健、水谷哲也、鈴木和男、加藤健太郎、吉川泰弘、明石博臣 網羅的ウイルスゲノム検出法を用いたコウモリ由来新規  $\beta$  ヘルペスウイルスの同定 第 15 回日本野生動物医学会 (富山) 2009 年 9 月
5. 渡辺俊平、水谷哲也、上田直也、伊波興一朗、藤井ひかる、谷口 怜、久和茂、吉川泰弘、明石博臣 フィリピンのコウモリにおける新規  $\gamma$  ヘルペスウイルスの検出 第 15 回日本野生動物医学会 (富山) 2009 年 9 月
6. 藤井ひかる、渡辺俊平、上田直也、伊波興一朗、谷口 怜、加藤健太郎、遠矢幸伸、久和茂、吉川泰弘、明石博臣 エジプトルーセットオオコウモリにおける STAT1 のクローニングとその機能解析 第 15 回日本野生動物医学会 (富山) 2009 年 9 月
7. 伊波興一朗、大松勉、渡辺俊平、上田直也、谷口怜、石井寿幸、久和茂、明石博臣、吉川泰弘 翼手目の各種サイトカインをコードする cDNA の塩基配列の解読および解析 第 15 回日本野生動物医学会 (富山) 2009 年 9 月
8. 上田直也、鈴木聡、大松勉、渡辺俊平、伊波興一朗、久和茂、明石博臣、吉川泰弘 コウモリの肝臓における薬物代謝酵素活性 第 15 回日本野生動物医学会 (富山) 2009 年 9 月
9. 谷口 怜、Masangkay Joseph, 渡辺俊平、大松勉、上田直也、伊波興一朗、藤井ひかる、水谷哲也、久和茂、明石博臣、吉川泰弘、森川茂 フィリピンのコウモリからのレストンエボラウイルス抗体検出 第 148 回日本獣医学会 (鳥取) 2009 年 9 月
10. 藤井ひかる、渡辺俊平、上田直也、伊波興一朗、谷口 怜、加藤健太郎、遠矢幸伸、久和茂、吉川泰弘、明石博臣 エジプトルーセットオオコウモリにおける STAT1 のクローニングとその機能解析 第 57 回日本ウイルス学会 (東京) 2009 年 10 月
11. 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 ver3.1) を用いたコウモリ由来新規  $\beta$  ヘルペスウイルスの同定 第 57 回日本ウイルス学会 (東京) 2009 年 10 月

# 捕獲したコウモリ種と匹数

date	location	species	number	serum number
March, 2009	FACQ	<i>Cynopterus brachyotis</i>	10	10
		<i>Rousettus amplexicaudatus</i>	15	15
		<i>Ptenochirus jagori</i>	8	8
		<i>Hipposideros diadema</i>	1	0
	FQNP	<i>Rhinolophus arcuatus</i>	1	1
		<i>Cynopterus brachyotis</i>	2	2
		<i>Haplonycteris fischeri</i>	6	6
		<i>Macroglossus minimus</i>	2	2
CQNP	<i>Ptenochirus jagori</i>	10	10	
	<i>Rhinolophus rufus</i>	2	2	
	<i>Emballonura alecto</i>	9	9	
	<i>Cynopterus brachyotis</i>	4	4	
UPLB	<i>Eonycteris spelaea</i>	3	3	
	<i>Ptenochirus jagori</i>	17	17	
	<i>Cynopterus brachyotis</i>	20	18	
	<i>Eonycteris spelaea</i>	2	2	
July, 2008	FDUP	<i>Ptenochirus jagori</i>	2	2
		<i>Rousettus amplexicaudatus</i>	1	1
	Microchiroptera	<i>Pipistrellus javanicus</i>	3	2
		<i>Scotophilus kuhlii</i>	5	5
ICPI	<i>Miniopterus australis</i>	9	6	
	<i>Miniopterus schreibersi</i>	15	8	
	<i>Miniopterus tristis tristis</i>	2	1	
	<i>Rhinolophus arcuatus</i>	1	0	
March, 2008	Megachiroptera	<i>Ptenochirus jagori</i>	1	1
		<i>Hipposideros diadema</i>	1	1
	Microchiroptera	<i>Miniopterus australis</i>	13	2
		<i>Miniopterus schreibersi</i>	3	0
Microchiroptera	<i>Mvotis macrotarsus</i>	1	1	
	unknown	1	1	
			170	140



ルソン島  
マニラ(FDUP)  
33個体

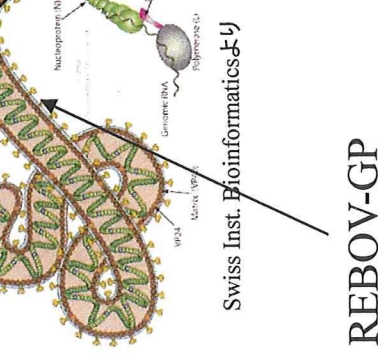
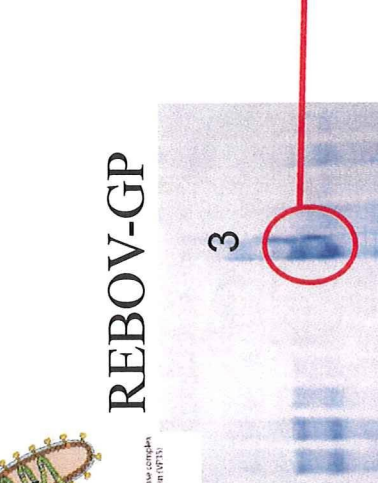
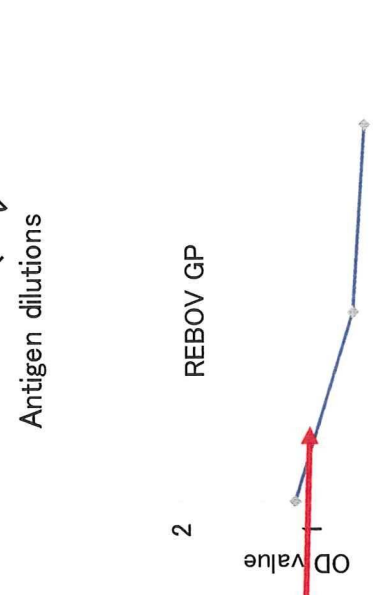
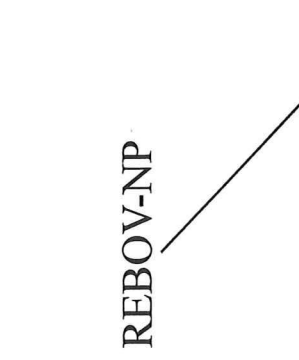
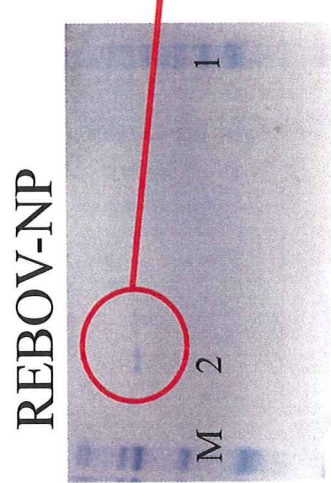
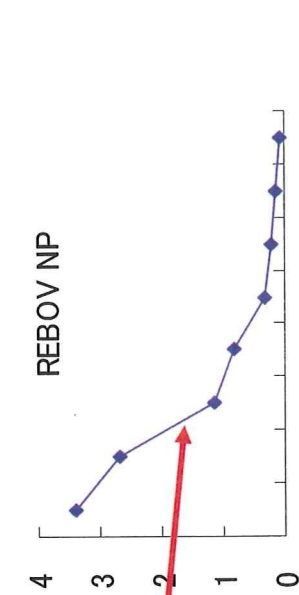
ルソン島  
ロスバナス地方(UPLB)  
24個体

ルソン島  
ケン州(FACQ, FQNP, CQNP)  
65個体

パナイ島(1CPI, 2CPI)46個体

# 組換え REBOV-NP, -GPを用いたIgG-ELISAの確立

組換えNP, GPの発現と精製

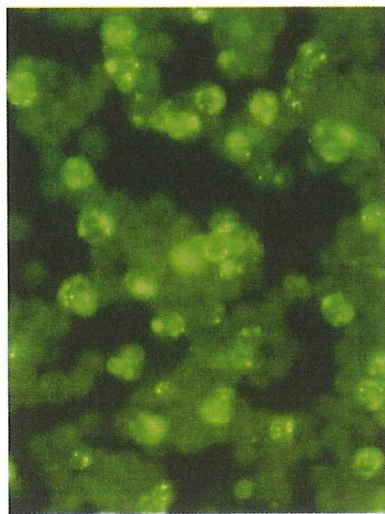


M: MW marker 1: 1% NP40 lysate  
2: 精製REBOV-NP 3: 精製REBOV-GP

Swiss Inst. Bioinformaticsより

# 間接蛍光抗体法(IFA)による REBOV-NP 及び び-GP 特異抗体の検出

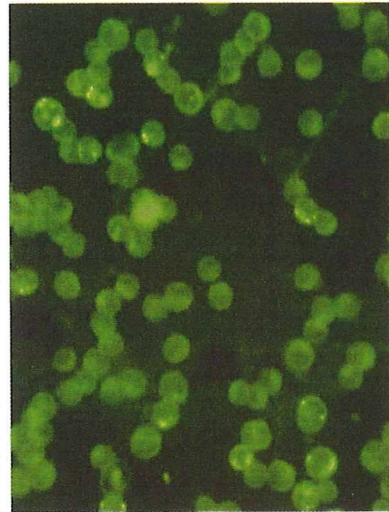
REBOV-NP 特異抗体の検出(細胞質内に顆粒状に抗原が検出される)



anti-REBOV NP bat#1

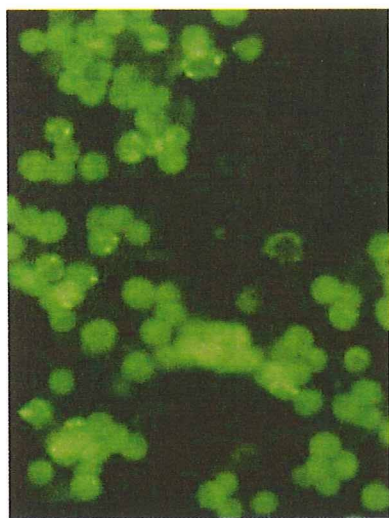
bat ID : 1539

(抗体価 : 1280倍)

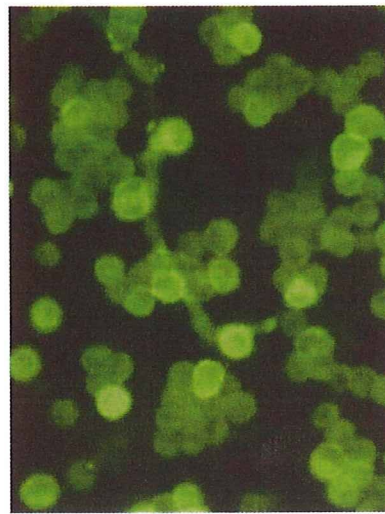


bat ID : 1660

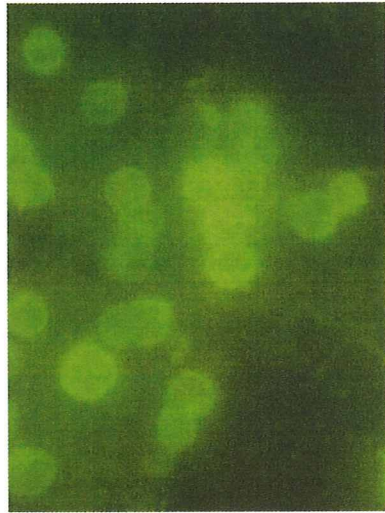
(抗体価 : 640倍)



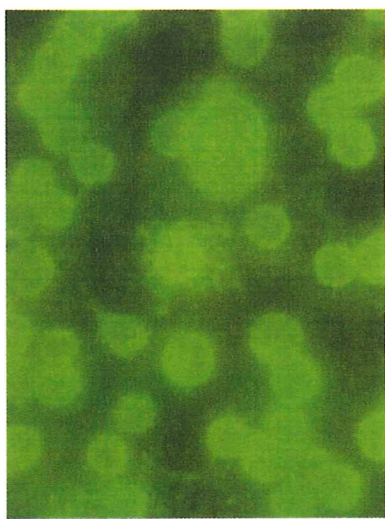
REBOV-GP 特異抗体の検出(細胞膜に抗原が検出される)



anti-REBOV GP rabbit#2



anti-REBOV GP/NP bat#1



ID 1642  
(抗体価 : 20倍)

## コウモリからのREBOV抗体検出

ルーセットオオコウモリにIgG-ELISAでNP及びGP抗体陽性個体がみられた。IFAでも陽性を呈した3検体(1539, 1642, 1660)に関して代替えウイルスによる中和試験を行った結果、中和抗体は検出されなかった。

ルーセットオオコウモリのELISA, IFA, 中和 結果一覧

捕獲地	検体数	ID	NP-ELISA	GP-ELISA	NP-IFA	GP-IFA	中和
マニラ	1	1539	2.13	-0.21	1280	neg	neg
		1632	0.88	0.20	neg	neg	ND
		1642	0.36	5.22	neg	20	neg
ケンソン州	15	1643	1.26	0.92	neg	neg	ND
		1651	1.61	1.02	neg	neg	ND
		1657	-0.45	1.69	neg	neg	ND
		1660	3.80	2.51	640	neg	neg
		その他(9検体)	average:0.17	average:0.38	neg	ND	ND
			5 (31%)	5 (31%)	2 (13%)	1 (7%)	

黄色: 陽性, ELISAのcut-off値: 平均+3X標準偏差

その他15種のコウモリからは抗体陽性は検出されなかった。



## コウモリからのREBOV遺伝子検出

- 1) RT-PCR : NP遺伝子を標的とする**REBOV**特異的な**semi-nested RT-PCR**を開発



検出感度は、

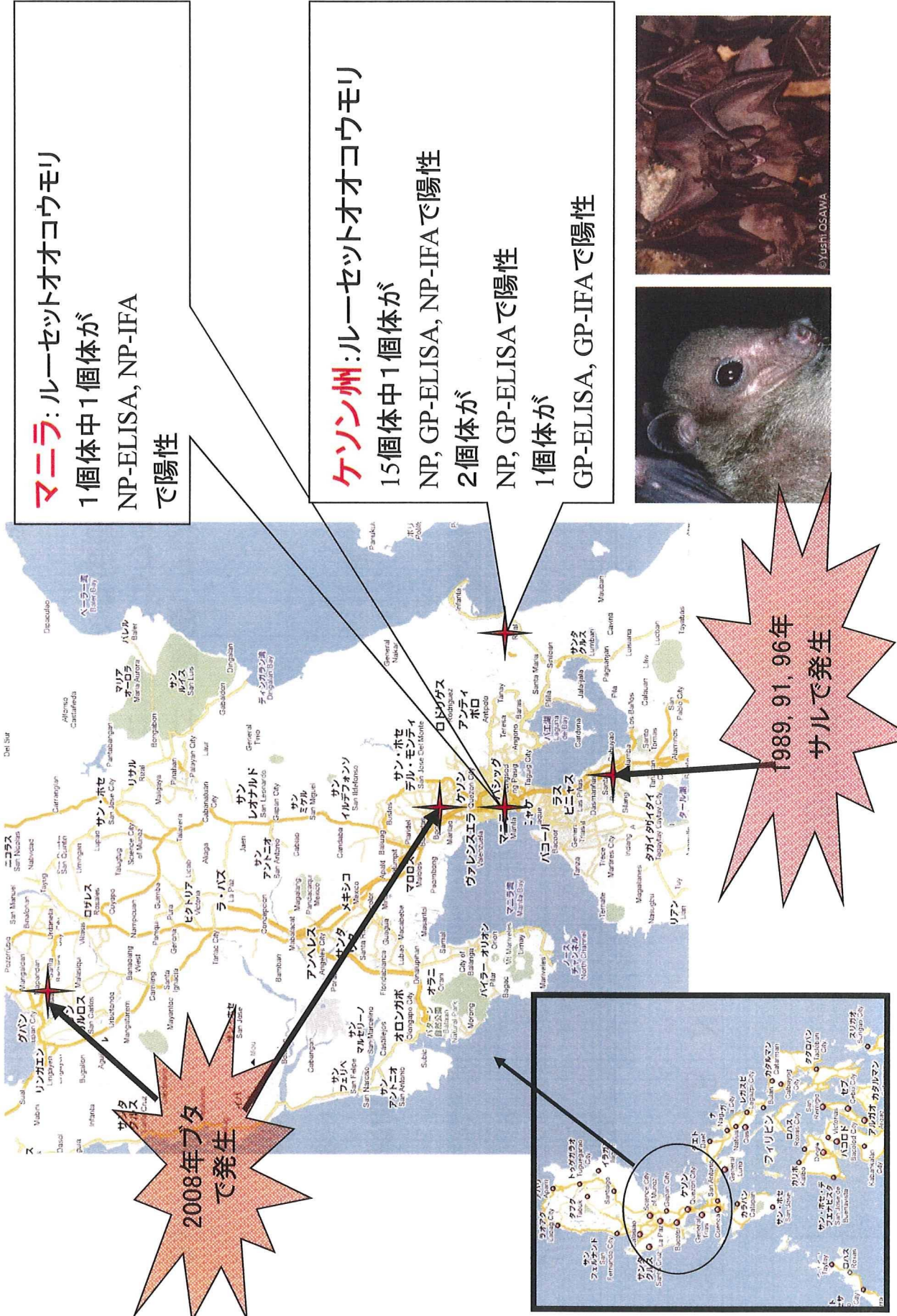
Res-NP1 / NP2 : 1,000 copies / reaction

Res-NP1 / NP2A : 100 copies / reaction

- 2) コウモリ: フイリピンソン島マニラ周辺、ケソン州及びロスバノスで捕獲したコウモリ62検体の脾臓(ルーセットオコウモリ16体, その他オコウモリ45検体, ココウモリ1検体) からウイルス遺伝子検出を試みた。

→ 全てのコウモリの脾臓からREBOV 遺伝子は**検出できなかった**。

# REBOV感染症の流行と抗体陽性コウモリの分布



**マニラ:**ルーセットオオコウモリ  
1個体中1個体が  
NP-ELISA, NP-IFA  
で陽性

**ケンオン州:**ルーセットオオコウモリ  
15個体中1個体が  
NP, GP-ELISA, NP-IFAで陽性  
2個体が  
NP, GP-ELISAで陽性  
1個体が  
GP-ELISA, GP-IFAで陽性

2008年ブタ  
で発生

1989, 91, 96年  
サルで発生



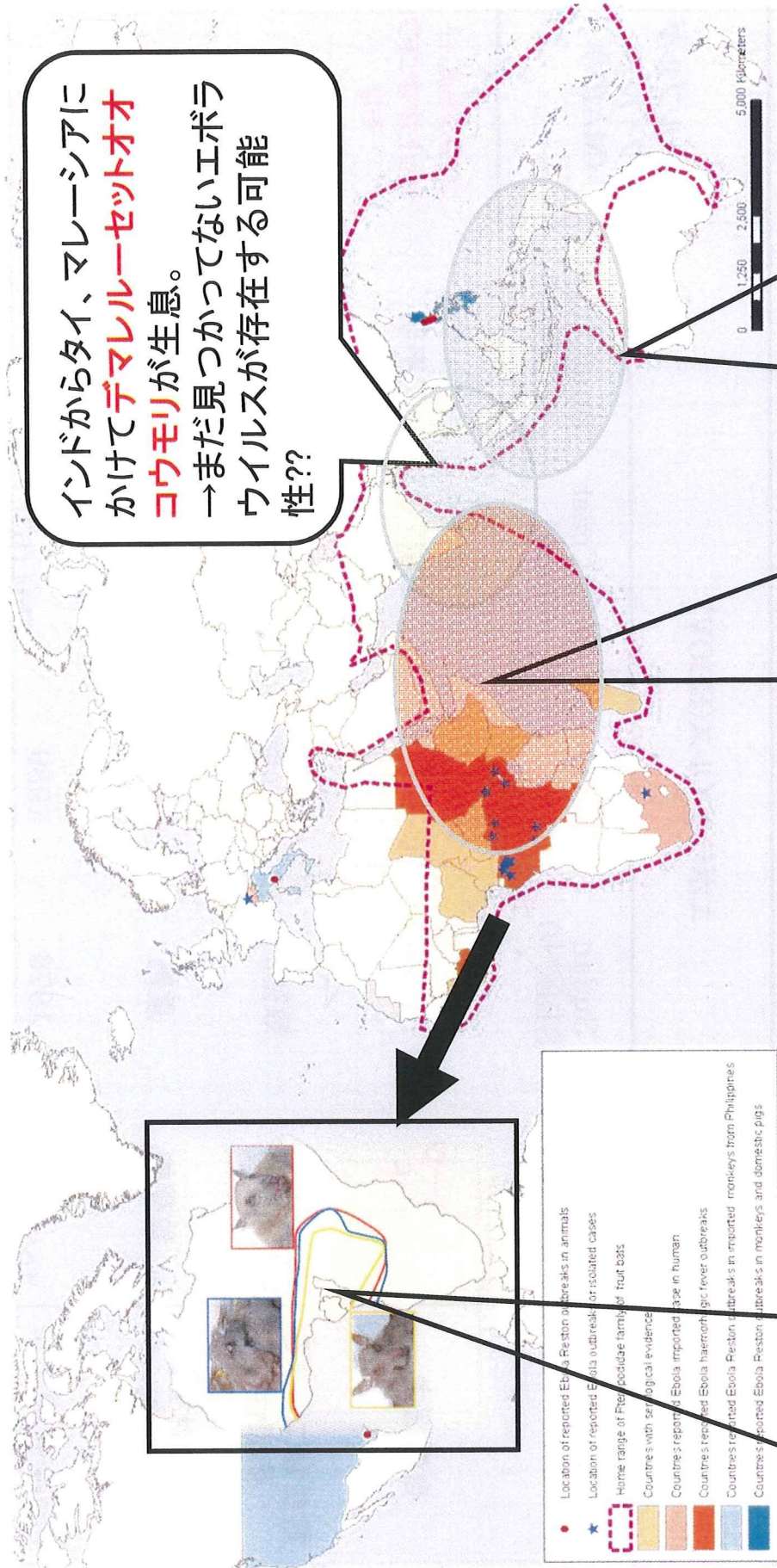
©Yushi OSAWA

# フィロウイルス科レストンエボラウイルス

## フィロウイルス科の特徴

		エボラウイルス(EBOV)				マールブルグ ウイルス (MARV)
		Zaire (ZEBOV)	Sudan (SEBOV)	Reston (REBOV)	Ivory Coast (IBOV)	Bundibugyo (BEBOV)
自然宿主		フルーツ バット	不明	ジュフロウ ルーセツトオ オコウモリか!?	不明	不明
霊長類に対する 病原性		致死性的	致死性的	致死性的	致死性的	致死性的
ヒトに対する 病原性		致死性的	重篤	無症状	不明	重篤
初回発生報告年 (国)		1976 (DRC)	1976 (Sudan)	1989 (Virginia)	1994 (IC)	2007 (Uganda)
						1967 (Germany)

# フィロウイルスの宿主コウモリ種とウイルス種の分布



インドからタイ、マレーシアにかけて**デマレルーセットオオコウモリ**が生息。  
→まだ見つかってないエボラウイルスが存在する可能性??

**アフリカザイールエボラウイルスの宿主**  
ウマヅラコウモリ  
フランケンオンナシケンシヨウコウモリ  
コクビワフルーツコウモリ  
エジプトルーセットオオコウモリ

**マールブルグウイルスの宿主**  
エジプトルーセットオオコウモリ

**ジュロワルーセットオオコウモリ**  
ビルマ南部からソロモン諸島、フィリピン、ニューギニアに分布