

図7、ハザラウイルス産生に対するTetherinの効果

Genus	Species	Strain	Quantity	Real-time RT-PCR	RT-LAMP Tt (min) ^a	
					Northeastern	Sierra Leone
Lassa virus	Pinneo		10 ng	+	18.2	-
			1 ng	+	23.9	-
	Josiah		100 pg	+	-	ND
			10 pg	-	-	ND
			10 ng	+	-	11.6
			1 ng	+	-	13.0
			100 pg	+	ND	14.7
			10 pg	+	ND	18.2
		1 pg	+	ND	-	
		100 fg	-	-	-	
Ebola virus	Zaire ebolavirus	Mayinga	600 pg	-	-	
		Zaire95	600 pg	-	-	
	Reston ebolavirus	Pennsylvania	600 pg	-	-	
			600 pg	-	-	
			600 pg	-	-	
		Cote d'Ivoire ebolavirus	600 pg	-	-	
Marburg virus		Musoke	600 pg	-	-	
		Ozolin	600 pg	-	-	
		Ravn	600 pg	-	-	
		Angola	600 pg	-	-	

図8、ラッサウイルス検出用RT-LAMPの特異性と検出限界

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の診断等の
対応方法に関する研究

分担研究課題：南米 HPS ウイルスと齧歯類ボックスウイルスの診断法と分子疫学

研究分担者：有川二郎（北海道大学大学院医学研究科教授）

研究要旨：ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類され、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因ウイルスである。この重篤で高い致死率を呈する感染症（ハンタウイルス肺症候群等）は日本では発生の報告がない。特に HPS の原因ウイルスの多くは入手が困難であり、ウイルスを用いた診断や治療法、予防法の開発できない。そこで、PCR 法や LAMP 法によるウイルス遺伝子検出、抗原検出法、遺伝子組換えで作製した抗原による血清診断法等を整備し、国内での患者等の発生に備える必要がある。これまでに、血清診断では、ELISA 法や蛍光抗体法に加え、シュードタイプウイルスを利用した代替え中和試験法や核蛋白の血清型特異的エピトープを利用した血清型鑑別診断法を確立してきている。また、遺伝子変異の多いハンタウイルスの PCR 法に用いるプライマーの設定を試み、ウイルス遺伝子検出法を改良しつつある。本研究ではこれらの手法を改良するとともに、これらの手法を用いて疫学的解析を実施して検証する。

研究協力者：吉松組子（北海道大学）

A. 研究目的

ハンタウイルスのうち、Hantaan (HTNV)、Seoul (SEOV)、Dobrava (DOBV) および Puumala (PUUV) の 4 つの血清型およびおそらく Thailand 型ウイルス (THAIV) が HFRS の原因となる。また Sin Nombre virus (SNV)、Andes virus (ANDV)、Laguna Negra virus (LANV) を始めとするアメリカネズミ亜科のげっ歯類によって媒介されるハンタウイルスは HPS の原因ウイルスである。南北アメリカ大陸からは他にも多様なウイルスが報告されており、病原性との関連が明らかではないウイルスも多く、分類についても共通の基準が確立されているとは言い難い。また、HTNV、SEOV および DOBV はネズミ亜科のげっ歯類、そして PUUV はハタネズ

ミ亜科のげっ歯類によって媒介される。このようにウイルス型と媒介げっ歯類の対応が明確であることから、ハンタウイルスは宿主動物とともに共進化したと考えられている。この 3 つのグループのウイルスは互いに抗原性が大きく相違し交差反応性が低いことから、ハンタウイルス感染症の血清診断を行うためには少なくとも 3 種類の抗原が必要であると考えられる。また、これに加えて食虫目動物由来ハンタウイルスが近年続々と報告されてきている。食虫目由来ウイルス間の多様性は、げっ歯類由来ウイルス間以上に大きく、多くの場合、抗原性の交差反応は認められない。現在までに準備されている Thottapalayam ウイルス抗原 (TPMV) 抗原で抗体を検出できる範囲は

大変限られたものであると考えられる。このような制限はあるものの、現在 4 種類の抗原が網羅的な抗体検出に使用されている。また、それぞれの 4 つのグループのウイルスの中で罹患ウイルスを迅速に鑑別することは、媒介げっ歯類を特定し、対策を取る上で重要である。一般に中和試験が鑑別に用いられるが、生きたウイルスを入手する必要があること（HPS 原因ウイルスの多くは遺伝子配列のみが知られており、ウイルスが分離されていない）、BSL3 以上の施設が必要で、費用も時間もかかることが問題である。我々は迅速な鑑別診断のため、中和試験代替法として、組換え核蛋白抗原を用いた ELISA を開発してきた。また、血清診断のみではなく PCR 法のためにそれぞれのグループ内で有効なワイドレンジのプライマーセットを設定することも試みたが、未だ感度やレンジの問題などが解決していない。本研究ではネズミ亜科・ハタネズミ亜科由来・アメリカネズミ亜科由来ハンタウイルスおよび食虫類由来ハンタウイルスの血清診断および鑑別診断系および遺伝子診断システムの確立を目的とする。

B. 研究方法

1. 南北アメリカ大陸で主に HPS の原因となっている 3 種類のウイルス、ANDV, SNV, LANV の 3 種類について N 末端トランケート核蛋白抗原を用いた鑑別診断システムを構築し、患者および病原巣動物であるげっ歯類の鑑別診断システムの検討を行った。血清は PCR により罹患ウイルス型がすでに確定している検体をアルゼンチン国立ウイルス研究所の Deria Enria 博士から分与された。同じ血清をアルゼンチンでも用いて担当者の Carina

Sen に実施してもらい結果を比較した。また、Carina Sen 分担研究者の研究室に 1 週間滞在し、アルゼンチンで実施されている診断法の各種条件を分担研究者の用いている方法と比較・検討を行うことによって、現地での疫学調査継続のための各種条件の統一と技術的確認を行った。また、HPS 関連ウイルスの代替中和法の確立を目指して、まずエンベロープ糖タンパク(GP)の発現を試みた。

2. げっ歯類由来ハンタウイルスの遺伝子検出用プライマーセットの開発：

これまでに S ゲノム遺伝子の遺伝子配列を基に選定したプライマー増幅効率を比較した。ネズミ亜科由来の HTNV, SEOV, DOBV, THAIV について cDNA を鋳型にした場合と感染 VERO 細胞由来の RNA をスタートとする RT-PCR での増幅効率を比較した。鋳型中の cDNA のコピー数はリアルタイム PCR を用いて定量した。

3. 食虫類由来ハンタウイルスに対するモノクローナル抗体のエピトープの探索：

食虫類由来ハンタウイルスの代表株であるトッタパラヤンウイルス(TPMV)の組換え N 蛋白をマウスに免疫し、その脾臓細胞を用いて常法に従ってミエローマ細胞と融合し、単クローン抗体を作成した。また、TPMV および日本産食虫類由来ハンタウイルスであるアサマウイルス(ASAV)の抗原を数種類のトランケート N 蛋白を抗原として準備し、エピトープの探索をおこなった。

4. ANDV の主要な宿主である *Origorizomys flaviscen* の血清(ハンタウイルス陰性)は Deria Enria 博士から分与された。ここから免疫グロブリン分画を精

製し、ウサギに免疫し2次抗体の作成を行った。

(倫理面からの配慮について)

各種免疫血清の採血は、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものであり、動物福祉の観点からも問題はないと判断された。患者血清は各国研究機関にて診断済みのものであり、番号のみにて提供され、倫理的に問題ないと判断された。

C. 研究結果：

1. HPS 原因ウイルスの血清診断法の応用：

南北アメリカ大陸で発生する HPS 関連ウイルスの原因ウイルスはそのほとんどが、ANDV, SNV, LANV によるものと考えられている。また、それらウイルスに対する抗体を広く検出するスクリーニング抗原としては大腸菌ベクターで発現させた組換え N 蛋白による通常の ELISA が十分な感度を持つことが分かっている。しかし、アルゼンチンの共同研究者の研究室で実施されたスクリーニング ELISA および鑑別 ELISA の結果と分担研究者の実施した成績との間に一致しない点があるため、現地担当者が来日の際に条件の確認を行った。その結果、現地での抗原コート濃度の間違いおよびプレートの種類の二点に原因があることが明らかとなり、修正することができた。さらに非特異反応の低下のためにインキュベーション温度を室温 (20℃-23℃) とする点も有効であった。

HPS 代替中和法開発：エンベロープ糖タンパクの抗原性に基づく代替中和法を確立するため、HPS 原因ウイルスのエンベロープ糖タンパクの発現をこころみた。PCR で増幅されたフラグメントを一本の

ORF として CAG プロモーターによる発現プラスミドへの構築を進めている。ANDV, SNV ウイルスについてクローニングは終了したものの発現の確認がされておらず、現在エラーの修正を続けている。

2. 診断用プライマーセットの開発：

ネズミ亜科げっ歯類由来ハンタウイルスのグループについて有望なプライマーセットを絞り検定を行った。すべてプラスミド cDNA を鋳型にした場合には良好な増幅が見られたが検出感度としては 10^2 から 10^4 程度であった。細胞および組織から抽出した RNA から逆転写した cDNA を用いたところ、HTNV と SEOV などでは良好な増幅が得られたが、THAIV や Gou3 では非特異増幅が多くなり、Dabishan virus では増幅が見られないなどの感度の低下が認められた。さらなる検討が必要となったため、本研究班の分担研究者である、遠藤大二班員と連携して、新しく開発されたシステムを使用し、アレナウイルスの例に習って新しいプライマー選定と検証を開始した。

HPS 関連、アメリカネズミ亜科げっ歯類由来のグループについても検定を行った。プラスミド cDNA を鋳型にした場合には 10^1 /reaction から 10^2 /reaction まで増幅する高感度のプライマーセットが設定できた。理由は不明であるが、このグループについてはワイドレンジかつ高感度のプライマーが設定できた。これらのウイルスについては RT-PCR に使用する RNA が不十分であるため、現在、米国・アルゼンチンの研究者に問い合わせ RNA 分画の分与を受けられるように準備を進めている。

食虫類由来ハンタウイルスのグループについては遠藤大二班員と共同でプラ

イマーセットを設定し、代表株である TPMV の増幅を検証した。TPMV 以外のウイルスの多くは分離されておらず、部分的なシーケンスしか発表されていないものも多い。そこで、さらに多様なウイルスについて検討をすすめるため、11種類の食虫類由来ウイルスの S セグメント約 500 b の人工的な鋳型を準備した。この連結作業はほぼ終了し、今後検定を行う。

3. 単クローン抗体の作成：これまでに TPMV の核蛋白に対して 4 クローンが確立された。IFA パターン、Western blot での反応性は様々であることから、独立したクローンと考えられたが、トランケート抗原への反応性によるエピトープマッピングの結果、N 末端の 100 アミノ酸の内部にエピトープを持つクローンであることが明らかとなった。ドイツの Rainer Ulrich 博士らによって確立されたクロンの分与を受け、我々のクローンとの比較を行ったところ、やはり、N 末端の同じ部分がエピトープであることが明らかとなった。以上の結果から、TPMV においてもげっ歯類由来ウイルスと同様に N 蛋白の N 末端にイムノドミナント領域があることが明らかとなった。また、ASAV の抗原への反応性を比較したところ、どのクローンも反応を示さず、交差反応性を欠くことが示唆された。

4. 南米げっ歯類の抗体検出のための二次抗体の作成：これまで既存の二次抗体の反応性の低い南米由来げっ歯類 *O. flaviscen* について抗コットンラット抗体が抗 *peromyscus* 抗体よりも有効であることを示してきた。今回、十分な量の安全な *O. flaviscen* 血清を得ることができたので、ウサギを用いて二次抗体の作成を行

った。*Origoryzomys* 属は ANDV の宿主として重要なげっ歯類であるため、この動物の抗体検出感度を改良することは疾病のコントロールに重要である。

D. 考察

本研究では血清診断法および遺伝子診断法を各種ハンタウイルス感染症について準備することを目的としている。急務を要する HPS 関連ウイルスの診断法を筆頭に最終的に 4 グループのハンタウイルスについてそれぞれを開発することを目的としている。さらに新規にグループを形成しつつある、食虫類由来ウイルスについても診断法を確立することも必要である。HPS 関連ウイルスの診断システムについてはヒトの血清学的方法についてはほぼ手順を示すことができた。しかしながらこのグループのウイルスは現在も種類を増やしつつあり、新しいウイルスが出現した際には迅速に準備を行う必要があると考えられる。また、遺伝子診断法については未だその診断法の検証は充分とは言えない。評価するためには継続して検体の収集を進めて行く必要がある。また今後は RNA 分画を入手し、これまでに設定したプライマーの検討を行う必要があると考えられる。また、新しいシステムで選定するプライマーの検定も進めて行く必要がある。

食虫類由来ウイルスについては、有望なモノクローナル抗体を作出することができたが、その抗原性および遺伝子配列の多様性が問題となっている。現在のところ、このグループのウイルスのヒトへの病原性は不明である。しかしながら、最近になってヒトへの感染を血清学的に疑わせる例が少数例ながら得られており、警戒を怠らないことが必要である。

E. 結論

ハンタウイルスはその病原巣動物によって、ネズミ亜科由来、ハタネズミ亜科由来、アメリカネズミ亜科由来、および食虫類由来ウイルスの4つのグループに分けられ、その多様性から血清診断法および遺伝子診断法はそれぞれについて必要である。病原性・多様性および抗原性に関する情報が混乱しており、これを整理して診断・鑑別法を準備することが防疫上重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Tegshduuren, E., Yoshimatsu, K., Taruishi, M., Endo, R., Shimizu, K., Koma, T., Yasuda, S. P., Kariwa, H., Arikawa, J., and Ishihara, C. 2010. Different cross-reactivity of human and rodent sera to Tula virus and Puumala virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **33**:e67-73.
- 2) Schmidt-Chanasit, J., Essbauer, S. S., Petraityte, R., Yoshimatsu, K., Tackman, K., Contraths, F. J., Sasnauskas, K., Arikawa, J., Thomas, A., Pfeffer, M., Scharninghausen, J. J., Spletstoesser, W., Wenk, M., Heckel, G., and Ulrich, R. G. 2010. Extensive host sharing of Central European Tula virus. *J. Virol.* **84**:459-474
- 3) Koma, T., Yoshimatsu, K., Pini, N., Safronetz, D., Taruishi, M., Levis, S., Endo, R., Shimizu, K., Yasuda, S. P., Ebihara, H., Feldmann, H., Enria, D., and Arikawa, J. 2010. Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Sin

Nombre, Andes, and Laguna Negra hantavirus infections in humans and rodents. *J Clin Microbiol* **48**:1635-1642.

- 4) Huong, V. T., Yoshimatsu, K., Luan, V. D., Tuan le, V., Nhi, L., Arikawa, J., and Nguyen, T. M. 2010. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Vietnam. *Emerg Infect Dis* **16**:363-365.
- 5) Gamage, D. C., Yasuda, P. S., Nishio, S., Kularatne, S. A., Weerakoon, K., Rajapakse, J., Nwafor-Okoli, C., Lee, R. B., Obayasi, Y., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Tamashiro, H. 2010. Serological evidence of Thailand virus-related hantavirus infection among leptospirosis suspected patients in Kandy, Sri Lanka. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **in press**.

2.学会発表

- 1) Arikawa, J. Hantavirus infection as a rodent-borne zoonoses How we learn from nature. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22.2010
- 2) Kariwa H, Yoshikawa K, Tanikawa Y, Seto T, Sanada T, Ngonda S, Ivanov LI, Slonova R, Zakharycheva TZ, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I. Isolation of amur and Hantaan viruses from wild rodents and the epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in far east Russia. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22.2010
- 3) Yoshimatsu K, Shimizu K, Yasuda S,

- Endo R, Koma T, Ibrahim IN, Perwitasari D, Yuniyanto A, Pattamadilok S, Kumperasart S, Luan VD, Huong VTQ, Chandy S, Sridharan G, Ninh T, Kularante S, Rajapakse J, Gamage C, Tamashiro H and Arikawa J. Prevalence of Hantaviruses in Humans and Rodents in Southeast and South Asia. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES. Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22.2010
- 4) Koma T, Yoshimatsu K, Pini N, Safronetz D, Taruishi M, Levis S, Endo R, Shimizu K, Yasuda SP, Ebihara H, Feldmann H, Enria D and Arikawa J. Development of serotyping ELISAs for new world hantavirus infection. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22.2010
- 5) Endo R, Yoshimatsu K, Koma T, Taruishi M, Shimizu K, Yasuda S, Tegshduuren E, Safronetz D, Ebihara H, Feldmann H and Arikawa J. Establishment and evaluation of universal consensus primers for the detection of hantaviruses from all known genetic lineages. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES. Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22.2010
- 6) Ibrahim IN, Yoshimatsu K, Perwitasari D, Ariati Y, Shimizu K, Yuniyanto A, Yasuda S, Arikawa J. Bio-Ecological study on hantaviruses infection among rodents, insectivores and human in thousand islands district and serang district of Indonesia. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES. Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22.2010
- 7) Shimakawa Y, Assawasanti K, Pattamadilok S, Ariyoshi K, Yoshimatsu K, Arikawa J. A family cluster of thottapalayam virus or a closely related hantavirus infection in northern Thailand. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES. Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22.2010
- 8) Sanada T, Kariwa H, Tanikawa Y, Seto T, Miyashita D, Ngnda S, Yoshikawa K, Sanchez-Hernandez C, Romero-Almaraz MdL, Ramos C, Ivanov LI, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I. Development of diagnostic methods applicable to various hantavirus infections. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22.2010
- 9) Schlegel M, Hammerschmidt B, Yoshimatsu K, Groschup MH, Arikawa J, Friedrich R, Petraitye R, Sasnauskas K, Heidemanns K, Siniza S, Giere P, Ulrich RG, Koellner B. Novel tools for hantavirus diagnostics in shrews. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES. Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22.2010
- 10) Yasuda SP, Endo R, Shimizu K, Koma T, Tegshduuren E, Luan VD, Yoshimatsu K, Huong VTQ, Arikawa J. Comparison of the pathogenesis of Seoul virus infection in experimentally infected laboratory rats and naturally infected wild rats. VIII

International conference on HFRS,HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel,Athens, Greece May 20-22.2010

- 11) Shimizu K., Yoshimatsu K., Koma T., Endo R., Yasuda S., and Arikawa J. HANTAVIRUS NUCLEOCAPSID PROTEIN PROMOTES CIS-GOLGI TARGETING OF GLYCOPROTEIN GC X IV International conference on Negative Strand Viruses, June 20-25, 2010, Brugge-Belgium
- 12) Yoshimatsu K., Shimizu K. and Arikawa J. STUDIES ON SECRETION OF GP OF HANTAAN VIRUS X IV International conference on Negative Strand Viruses, June 20-25, 2010, Brugge-Belgium
- 13) Koma T, Yoshimatsu K, Pini N., Safronetz D., Taruishi M., Levis S., Endo R., Shimizu K., Yasuda S., Ebihara H., Feldmann H., Enria D. and Arikawa J. TRUNCATED HANTAVIRUS NUCLEOCAPSID PROTEINS FOR SEROTYPING ANTIGEN X IV International conference on Negative Strand Viruses, June 20-25, 2010, Brugge-Belgium
- 14) 清水健太、吉松組子、駒貴明、遠藤理香、安田俊平、Erdenesaikhan Tegshduuren、有川二郎：ハンタウイルス Nucleocapsid protein は Glycoprotein Gc のシスゴルジへの局在を促進する 第 150 回日本獣医学会学術集会、帯広畜産大学、2010.9.16～18
- 15) 吉田喜香、荻和宏明、真田崇弘、Ngonda Saasa, 瀬戸隆弘, 吉松組子, 有川二郎, 好井健太郎, 高島郁夫：メキシコ由来のハンタウイルスに対するモノクローナル抗体の作出と各種ハンタウイルスに対する反応性の検討 第 150 回日本獣医学会学術集会、帯広畜産大学、2010.9.16～18
- 16) 真田崇弘, 荻和宏明, 谷川洋一, Abu Daud Nur Hardy, 瀬戸隆弘, 永田典代, 吉松組子, 有川二郎, 好井健太郎, 高島郁夫：Puumala ウイルスを感染させたシリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*) の感染動態の解析 第 150 回日本獣医学会学術集会、帯広畜産大学、2010.9.16～18
- 17) 清水健太, 吉松組子, 駒貴明, 安田俊平, 有川二郎：ハンタウイルス Glycoprotein の細胞内動態に及ぼす Nucleocapsid protein の影響 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、あわぎんホール (徳島県郷土文化会館), 2010.11.7～9
- 18) 真田崇弘, 荻和宏明, 永田典代, 谷川洋一, Nur Hardy Abu Daud, 瀬戸隆弘, 吉松組子, 有川二郎, 好井健太郎, 高島郁夫：Puumala ウイルスを感染させたシリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*) の感染動態の解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、あわぎんホール (徳島県郷土文化会館), 2010.11.7～9
- 19) 安田俊平, 吉松組子, 遠藤理香, 清水健太, 駒貴明, 有川二郎：ハンタウイルス持続感染メカニズム解明のための実験感染ラットを用いた細胞性免疫測定系の確立 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、あわぎんホール (徳島県郷土文化会館), 2010.11.7～9
- 20) 吉田喜香, 荻和宏明, 真田崇弘, Saasa Ngonda, 瀬戸隆弘, 吉松組子, 有川二郎, 好井健太郎, 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抗原性解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、あわぎんホール

(徳島県郷土文化会館) , 2010.11.7～

9

- 21) 駒貴明, 吉松組子, 永田典代, 清水健太, 安田俊平, 有川二郎: 免疫不全マウスを用いたハンタウイルス感染症病態モデルの検討 第58回日本ウイルス学会学術集会, あわぎんホール (徳島県郷土文化会館) , 2010.11.7～

9

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

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の診断等の
対応方法に関する研究

分担研究課題：トガリネズミ目のハンタウイルスの診断系確立と
国内の感染状況の把握

研究分担者：新井 智（国立感染症研究所 感染症情報センター）

研究協力者：浜田雅史、多屋馨子（国立感染症研究所 感染症情報センター）
大館智志（北海道大学低温科学研究所）

研究要旨：2007年に韓国のイムジン川流域に生息するチョウセンジネズミ(*Crocidura lasiura*)に新しいトガリネズミ目(旧食虫目)由来ハンタウイルスが報告されてから、ヨーロッパ、米国、ベトナム、ロシア、日本でトガリネズミ目を宿主とするハンタウイルスが相次いで明らかになり、トガリネズミ目小型野生動物もハンタウイルスの宿主として重要であることが明らかになってきた。そこで、日本におけるトガリネズミ目野生動物のハンタウイルス感染状況を調査すると共に、効果的な診断方法の開発を進めた。疫学調査は、三重県、新潟県、埼玉県、群馬県、北海道で実施した。その結果、新潟県および北海道のトガリネズミ目小型小動物にハンタウイルス遺伝子断片を発見し、国内にも広くトガリネズミ目ハンタウイルスが存在している可能性が示唆された。また、2008年に日本で初めて明らかになった *Asama virus* の組み換え抗原の発現に成功した。今後実際に血清診断に使用可能か検討を進める予定である。

A. 研究目的

2007年に韓国のイムジン川流域に生息するチョウセンジネズミに新しいトガリネズミ目(旧食虫目)由来ハンタウイルスが報告されてから、世界各国のトガリネズミ目小型哺乳類が調査され、ヨーロッパ、米国、ベトナム、ロシア、日本のトガリネズミ目小型哺乳類に新しいハンタウイルスが確認された。それ故、トガリネズミ目野生動物もハンタウイルスの宿主として重要であることが明らかになってきた。しかしながら、これらトガリネズミ目由来ハンタウイルスのヒトへの病原性や疾患との関連は依然として不明であり、これに加え、

これまでに分離されているトガリネズミ目由来ハンタウイルス株が極めて少ないなど、研究が進んでいない。

そこで、日本におけるトガリネズミ目野生動物のハンタウイルスの感染状況を調査すると共に、効果的な診断方法の開発、疾病との関連性を明らかにするため、次の研究を進めている。(1)日本や近隣国での感染状況の把握および疫学調査。(2)診断法の確立やヒト病原性への関連の評価である。

B. 研究方法

① 国内の調査は、新潟県十日町市立里山科学館の永野博士、酪農学園大学獣医学

部の浅川博士、群馬県立自然史博物館の木村博士、埼玉県衛生研究所の近氏、福井大学の高田博士、島根県環境科学研究所の田原氏、北海道大学獣医学部の荻和博士からトガリネズミ目小動物の組織サンプルの分与を受けて実施した。また、北海道では研究協力者の大舘博士らと共に野外調査を実施しトガリネズミも小動物を捕獲して検査サンプルを採取して調査を行った。新規ハンタウイルスの検出は、血清サンプルが収集できていないため、組織サンプルから RNA を抽出し、Reverse transcription を行い、ハンタウイルス共通領域に PCR プライマーをデザインして行った。陽性検体が検出できた場合には、全長配列の決定を試みた。

- ② 一方これまでに報告されているトガリネズミ目ハンタウイルスの遺伝子配列からウイルス遺伝子をクローニングし発現プラスミド作成を試みた。

C. 研究成果

- ① これまでに群馬県、埼玉県、新潟県、北海道で捕獲もしくは拾得した個体の臓器を分与いただき調査を進めてきた。ヒミズでは、新潟県4検体、埼玉県3検体、群馬県7検体を調査した。そのうち、新潟県のサンプルに Asama virus (ASAV) 遺伝子を検出した。宿主ミトコンドリアの Cytochrome *b* 遺伝子を用いて宿主同定を実施したところ、感染の確認されたヒミズは、東日本タイプのヒミズ (*Talpidae*; モグラ科、*Urotrichus*; ヒミズ属)であることが明らかになった。2008年に我々のグループが感染を確認した ASAV は西日本タイプのヒミズであった為、日本に生息しているヒミズに広く ASAV 感染が広がっている可能性が示唆

された。

- ② 一方、*Crocidura* に属するニホンジネズミでは、北海道の8検体、新潟県の2検体、埼玉県の1検体、兵庫県の1検体、和歌山県の1検体、長野県の1検体、鳥取県の1検体の合計15検体について調査を行った。しかしながら、陽性検体は確認できなかった。

- ③ 日本において *Sorex* は北海道にのみ生息している。8検体のエゾトガリネズミ、26検体のオオアシトガリネズミ、2検体のヒメトガリネズミを調査したところ、1検体から陽性と思われる遺伝子の増幅が確認された。検出された遺伝子断片はきわめて短い断片であるため、現在更に長い配列の増幅を試みている。

- ④ 近隣諸国の疫学調査として、韓国済州島のコジネズミ (*Crocidura shantungensis*) サンプルを高田博士、田原氏らから分与いただき調査を行った。その結果、コジネズミにこれまで報告のなかった新しいトガリネズミ目ハンタウイルスを検出し、Jeju virus (JJUV) と命名した。JJUV は、*Crocidurinae* (ジネズミ亜科) から検出されたウイルスであるが *Soricinae* (トガリネズミ亜科) のウイルスと同じクラスターを形成し、トガリネズミ目由来ハンタウイルスの世界への拡大に貴重な情報を提供する結果と推測された。

- ⑤ 組み換えタンパク質を用いた血清診断法の開発は、ASAV で nucleocapside protein (NP) の組み換えタンパク質を発現することに成功した。大腸菌での発現プラスミドは、北海道大学の有川博士から分与いただいた。我々は哺乳類細胞での発現プラスミドを作成した。組み換え

タンパク質は GFP とのフュージョンタンパク質として発現するように構築した。既に報告のある海外のトガリネズミ目ハンタウイルスについては現在クローニングを進めている。今後 ASAV と同様の方法で発現プラスミドを作成し、血清診断法の開発を目指す。

D. 考察

これまでの ASAV の検討から、ASAV は *Sorex* 属トガリネズミのハンタウイルスが宿主変異でヒミズ (*Talpidae*; モグラ科、*Urotrichus*; ヒミズ属) に広がったウイルスであると推測されている。今回、これまでに感染が確認されていた西日本タイプのヒミズに加え、東日本タイプのヒミズにも感染が確認されたことから、ASAV は、ヒミズが日本に広がってくる前から感染しており、ASAV に感染したヒミズが日本で生息域を拡大することで ASAV も同時に広がったと予想された。

2007 年に韓国イムジン川流域の *C. lasiura* に感染が確認された *Imjin virus* (MJNV) は、日本に生息するジネズミ (*C. dsinezumi*) に極めて近縁な種である。そのため、日本のジネズミにも近縁なウイルスが感染している可能性が示唆されている。今年度の調査では、ハンタウイルスに感染したジネズミは証明されなかった。しかしながら今年度の調査検体が 15 検体と少数であった点を考慮するとハンタウイルスが存在していないのか、それとも陽性検体を検出できなかっただけなのか不明である。今後更に検体数を増やして調査を進めると共に、血清抗体測定法の確立も同時に進める必要がある。一方韓国では、済州島で捕獲されたコジネズミから新しいハンタウイルス (JJUV) を検出することに成功した。コジネズミは韓国から中国、モンゴルなど

ユーラシア大陸に広く生息するジネズミ亜科動物であるため、中国やモンゴルのサンプルについても調査を進めることでハンタウイルスの世界への拡大メカニズムが明らかになる。

次年度からは、ウイルスの分岐年代推定などを行いハンタウイルスの変異率などを推定するとともに、血清抗体測定法を確立し不明疾患などとの関連性を検索する予定である。

E. 結論

- ① 東日本タイプのヒミズからも *Asama virus* (ASAV) の検出に成功し、日本に生息するヒミズに ASAV が広く感染していることが推測された。
- ② 韓国、済州島のコジネズミ (*Crocidura shantungensis*) に新しいトガリネズミ目ハンタウイルス *Jeju virus* (JJUV) を発見した。JJUV は、ジネズミ亜科小動物から検出された新しいハンタウイルスであり、これまでに報告されているジネズミ亜科由来ウイルスよりもトガリネズミ亜科由来ウイルスに近縁したウイルスであった。

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Novel Hantavirus in the Flat-Skulled Shrew (*Sorex roboratus*). Kang, H. J., Arai, S., Hope, A. G., Cook, J. A., Yanagihara, R. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2010. 10(6): 593-597

2. 学会発表

EVOLUTIONARY INSIGHTS FROM THE
GENETIC DIVERSITY OF ASAMA VIRUS
IN THE JAPANESE SHREW MOLE
(UROTRICHUS TALPOIDES)

新井 智、永野 昌博、浅川 満彦、木村 敏
之、近 真理奈、多屋 馨子、森川 茂、岡部
信彦、Richard Yanagihara

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

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

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の診断等の
対応方法に関する研究

分担研究課題：ナイジェリア等でのウイルス性出血熱の血清疫学調査
—ナイジェリア北部におけるクリミア・コンゴ出血熱—

研究分担者：西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部・部長）

研究協力者：森川茂（国立感染症研究所ウイルス第一部第一室・室長）

David Nadeba Bukbuk（マイドゥーグリ大学科学学部微生物学教室・准教授）

研究要旨：クリミア・コンゴ出血熱（Crimean-Congo hemorrhagic fever, CCHF）は、比較的致死率の高いウイルス性出血熱のひとつである。ナイジェリア国では過去に CCHF ウイルスが分離されたこともあり、同国では CCHF の流行のリスクがある。本研究では、ナイジェリア国北部のクリミア・コンゴ出血熱流行発生リスクを評価するために、同地域の畜殺場に集められるヒツジにおけるクリミア・コンゴ出血熱の血清疫学について検討した。また、その際ヒツジやヤギに付着しているダニを採取し、その中に CCHF ウイルス遺伝子の有無について検討した。ヒツジ血清 121 検体中、CCHF ウイルス抗体陽性を呈したのは 1 検体のみであった。しかし、この検体は抗体検出 ELISA 法において陽性コントロール血清よりも高い抗体価を示したことから、高い確率で CCHF ウイルス抗体陽性と考えられた。採取されたダニプール 48 検体の全てが、CCHF ウイルス遺伝子検出のための nested RT-PCR で陰性を呈した。ナイジェリア国北部の住民のクリミア・コンゴ出血熱ウイルス抗体保有率は約 3% と低い。これらの成績は、同地域で CCHF ウイルスは確かに存在するものの、ナイジェリア国北部の都市部において CCHF が流行するリスクは比較的低いものと考えられた。

A. 研究目的

ウイルス性出血熱には、エボラ出血熱、マールブルグ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱（Crimean-Congo hemorrhagic fever, CCHF）、ラッサ熱が含まれ、これらのウイルス感染症の多くはアフリカで流行している。CCHF は、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される CCHF ウイルスによる感染症で、致死

率も 5-40% ととても高い。CCHF ウイルスはダニ（Hyalomma 属や Demarcenter 属）を宿主とするウイルスで、ヒトは感染ダニに咬まれたり、ダニから CCHF ウイルス感染してウイルス血症を引き起こしているヒツジ等の家畜に直接接触したりして感染する（図 1）。中でも、西アフリカで CCHF の流行が報告され、かつ、ナイジェリア国では CCHF ウイル

スがダニから分離されている。そこで、本研究ではナイジェリア国北部のマイドゥーグリ市およびその周辺における CCHF 流行発生リスクを評価するために、同地域の畜殺場にあつめられるヒツジにおける CCHF ウイルス抗体の保有状況について調査した。また、ヒツジに付着しているダニにおける CCHF ウイルスゲノムの有無を nested RT-PCR 法で検討した。

B. 研究方法

- 1) 抗体検出システム. CCHF ウイルスの組換え核蛋白 (CCHFV-rNP) を抗原とした IgG-ELISA 法によった。ヒツジ血清中の CCHF ウイルス抗体を検出する方法は先の報告 (Tang Q, et al. J Virol Methods 108:111-6, 2003) によった。
- 2) ダニからの CCHF ウイルスゲノム検出. ダニからの CCHF ウイルスゲノム検出は、nested RT-PCR 法によった (Tang Q, et al. Clin Diagn Lab Immunol 10:489-91, 2003) 。ナイジェリア国マイドゥーグリ市の畜殺場に集められたヒツジから採取されたダニを冷凍庫 (-20 度) に保管しておき、そのサンプルを 48 プールに調整した。滅菌 PBS を加え、さらに滅菌砂を加えて用手的に破碎し、上精を採取した。上精から Viral RNA Purification Kit (Roche Diagnostics) を用いて精製し、ランダムプライマーおよび逆転写酵素 (Ready-to-Go RT-PCR, GE ヘルスケア・ジャパン) を用いて作製した。これらをテンプレート

として CCHF ウイルスの部分遺伝子増幅を試みた。尚、本方法は、CCHF の S-遺伝子を標的とした nested RT-PCR 法である。

(倫理面からの配慮について)

特記事項なし。

C. 研究結果

- 1) ヒツジにおける CCHF ウイルス抗体保有状況：
121 検体のヒツジ血清中の CCHF ウイルス抗体保有状況を調べた。121 検体中 1 検体が CCHFV-rNP を抗原とした IgG-ELISA 法で強陽性を呈した (図 2)。
- 2) ダニからの CCHF ウイルスゲノムの検出：
ダニの 48 プールサンプルからは、CCHF ウイルスゲノムは増幅されなかった (図 3)

D. 考察

ナイジェリア国においては過去にダニから CCHF ウイルスが分離されたことがある。ただし、CCHF 患者報告はない。本研究では、ナイジェリア北部のマイドゥーグリ市における CCHF の流行リスクを調査した。

この研究で明らかにされたことは、マイドゥーグリ市の家畜集積場に集められたヒツジにおける CCHF ウイルス抗体保有率は、1%以下 (121 検体中 1 検体のみ) であった。しかし、この陽性の 1 検体はコントロール血

清 (CCHFV-rNP で免疫され抗体誘導されたウサギ血清で、極めて高い抗体価を有している) よりも高い値を示し、6,400 倍希釈においても陽性を呈した (図 2)。この成績は、抗体陽性率は低いものの、この地域には CCHF ウイルスが存在していることを示唆している。

ヒツジに付着しているダニからの CCHF ウイルスゲノム増幅を試みたが、すべて陰性を呈した。本研究で対象として検査したダニ検体は、マイドゥーグリ市の家畜集積場に集められたヒツジに付着しているダニである。

ヒツジ血清中の CCHF ウイルス抗体保有率が低いこと、ダニから CCHF ウイルス遺伝子が増幅されなかったことは、同地域 (マイドゥーグリ市街地) においては、CCHF が流行するリスクは低い者と考えられる。しかし、CCHF ウイルス抗体陽性ヒツジが存在することから、同地域における CCHF の流行を予測するためには、CCHF に関するさらなる疫学調査が必要である。

E. 結論

本研究では、ナイジェリア北部のマイドゥーグリ市で CCHF 流行のリスクを評価するため、ヒツジ及びダニの調査をした結果、ウイルスは存在するものの同地域においては、CCHF が流行するリスクは低い者と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I.: Recent progress in the treatment for Crimean- Congo hemorrhagic fever and future perspectives. *Future Virology* 5:801-809, 2010
- 2) Nakayama, E., Yokoyama, A., Miyamoto, H., Igarashi, M., Kishida, N., Matuno, K., Marzi, A., Feldmann, H., Ito, K., Saijo, M., Takada, A.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of filovirus species-specific antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology* 17:1723-1728, 2010
- 3) 西條政幸: アレナウイルス. *日本臨床* 68 (増刊号): 431-434, 2010
- 4) 西條政幸: 南米出血熱の診断法の概要. *日本医事新報* 4495: 83-84, 2010

2. 学会発表

- 1) 木下一美, 酒井宏治, 永田典代, 王麗欣, 伊藤 (高山) 睦代, 中道一生, 森川茂, 倉根一郎, 西條政幸. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス核蛋白の単クローン抗体を用いた診断法の開発. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010.11)
- 2) 伊波興一朗, 中内美奈, 谷口怜, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. アルゼンチン出血熱の実験室診断法の患者血清を用いた評価. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010.11)

- 3) 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方も子, 倉根一郎, 森川茂. 3分節RNAの塩基配列に基づく中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの分子疫学と進化. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010.11)
- 4) Saijo, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Morikawa, S. Evolutional events of Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses in Xinjinag, China, assessed with 3 segmented RNA genes. 44th US-Japan Cooperative Medical Science, Viral Diseases Panel Meeting, Sapporo, Japan (2010.06)
- 5) Saijo, M. Molecular epidemiology on Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections based on the 3 segmented RNA genes. BIT's 1st World Congress of Virus and Infections-2010, Busan, Korea (2010.07)

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

図 1. CCHF ウイルスの生活環とヒトへの感染経路.

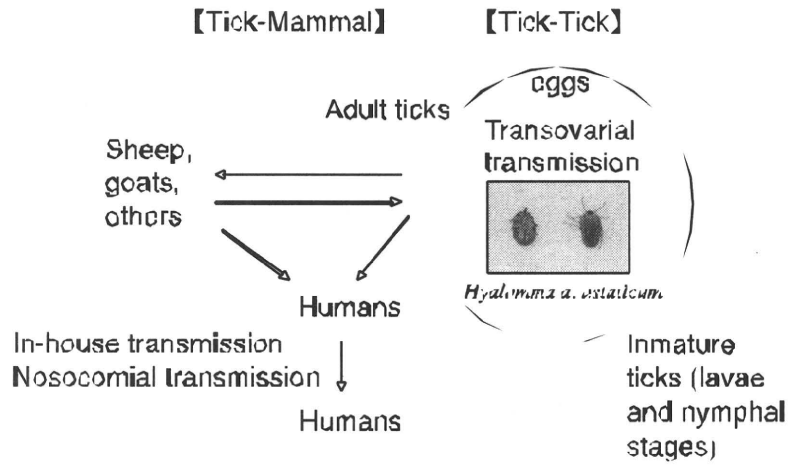


図 2. ヒツジ血清 121 検体の CCHFV-rNP を抗原とした IgG-ELISA における OD 値 (100 倍希釈, 400 倍希釈, 1600 倍希釈, および, 6400 倍希釈).

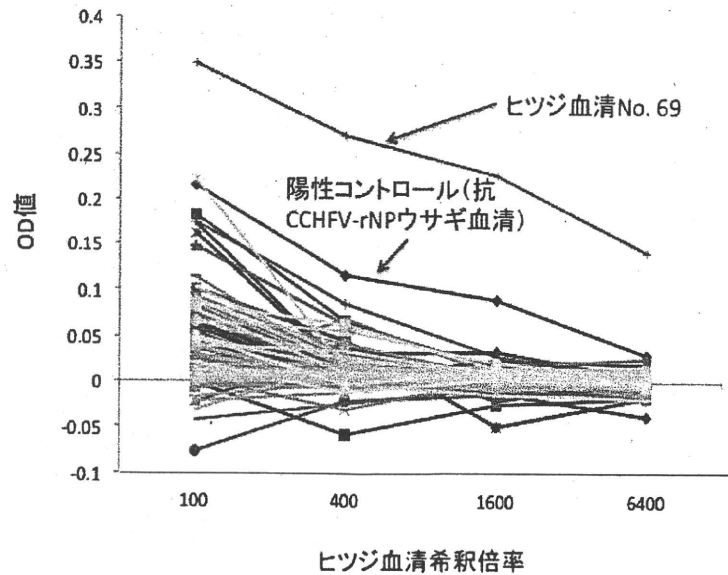
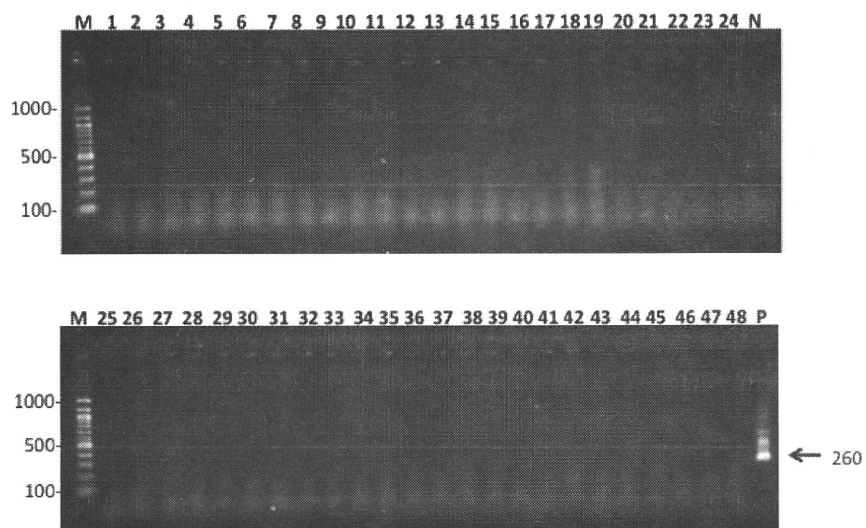


図 3. Nested RT-PCR の法によるダニのプールサンプル(48 検体)からの CCHF ウイルスゲノム検出.



陽性コントロールのみ陽性を呈し, 48 検体全て陰性を呈した.

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の診断等の
対応方法に関する研究

分担研究課題：変異や新型のウイルス出現に対応可能なウイルス遺伝子検出法の開発

研究分担者：水谷哲也（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：国内で分離・同定できないウイルスを網羅的に検出するために、ウイルスの網羅的検出法（Rapid Determination system of Viral nucleic acid sequences; RDV 法）の改良をおこなった。本研究では、野生のコウモリから新規ヘルペスウイルスと、野生のイノシシから新規ラブドウイルスを検出した。また、ウイルス感染臓器からウイルスを網羅的に検出することを目的として、RDV 法とサブトラクション法を組み合わせた方法を開発した。

研究協力者：

前田健（山口大学農学部）、鈴木和男（田辺市ふるさと自然観察センター）、渡辺俊平、明石博臣（東京大学農学部）、酒井宏治、森川茂（国立感染症研究所）、落合秀治（麻布大学獣医学部）、舟場正幸（京都大学農学部）

A. 研究目的

国内で分離・同定できないウイルスの中には、既知のウイルスであっても国内で検出手法が確立されていない場合の他に、未知のウイルスであるために検出方法がない場合が想定される。後者の場合には、ウイルスゲノムの情報が無いので PCR などの迅速診断法を確立できない。

近年、我々は未知のウイルスの迅速・簡便な検出方法として、Rapid Determination system of Viral nucleic acid sequences (RDV 法)を開発し、ヒトや動物、昆虫などから様々な新規・希少ウイルスを検出してきた。RDV 法は特殊な機器を必要とせず、アガロース

ゲル電気泳動や PCR をおこなえる研究室で実施可能である。RDV 法はウイルスの簡易精製と新しいダイレクトシーケンス法を特徴として、2 日間で新規ウイルスのゲノム塩基配列の一部が判明する。

これまで、RDV 法は培養上清などウイルス分離された検体を主に対象としていたので、細胞や臓器など宿主の遺伝子が大量に混入している場合には解析不可能であった。しかし、昨年度から、血清を超遠心した後に RDV 法に移行する手法や、培養細胞中で複製している RNA ウイルスのゲノムをアガロース電気泳動の過程で分取するなどの工夫をおこない、ウイルス分離の培養上清以外にも RDV 法で解析できる検体の対象を広げてきた。後者の方法（RDV-SF）は比較的感度良く検出できるが、対象が RNA ウイルスに限られるので、改良の余地を残している。

本研究では、細胞や臓器など想定されるどのような検体であっても、RNA