

201104003A

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業
(国際医学協力研究事業)

ウイルス感染症の診断、疫学および 予防に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24年（2012）年3月

研究代表者 中 込 治

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業
(国際医学協力研究事業)

ウイルス感染症の診断、疫学および 予防に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24年（2012）年3月

研究代表者 中 込 治
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

目 次

I. 総括研究報告	(ページ)
ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究	1
研究代表者：中込治（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）	
II. 分担研究報告	
1 フラビウイルス感染症の診断、疫学及び予防に関する研究： FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞を用いた抗体依存性感染増強及び 中和試験法に関する研究	39
研究分担者：倉根一郎（国立感染症研究所副所長）	
2 フラビウイルスの疫学に関する研究： ウマを対象とした 2009 年及び 2010 年における ウエストナイルウイルス国内侵入の監視	42
研究分担者：小西英二（大阪大学微生物病研究所）	
3 フラビウイルス感染の治療法に関する研究： フラビウイルスによる細胞障害機構の解析	47
研究分担者：竹上勉（金沢医科大学総合医学研究所）	
4 アルボウイルスの病原性に関する研究： 日本脳炎重症化のウイルス側因子に関する研究	50
研究分担者：森田公一（長崎大学熱帯医学研究所）	
5 ハンタウイルス感染症の診断法に関する研究	58
研究分担者：有川二郎（北海道大学大学院医学研究科）	
6 ハンタウイルス感染症の疫学に関する研究	63
研究分担者：荻和宏明（北海道大学大学院獣医学研究科）	
7 ウイルス性出血熱の診断法の開発に関する研究： ナイジェリアの霊長類におけるエボラウイルスに対する 抗体保有状況に関する調査	75
研究分担者：西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）	

8	ノロウイルス性下痢症の疫学およびその病原性に関する研究： 下痢症ウイルスの病原性解析	78
	研究分担者：片山和彦（国立感染症研究所ウイルス第二部）	
9	ロタウイルスの分子疫学に関する研究： 全遺伝子配列にもとづく G2 ヒトロタウイルスの系統遺伝学的 解析	85
	研究分担者：小林宣道（札幌医科大学医学部）	
10	ウイルス性下痢症の疫学、ワクチンと疾病負担に関する研究： わが国におけるロタウイルス胃腸炎入院に起因する疾病負担と その評価	89
	研究代表者：中込治（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）	
11	ロタウイルス感染症の病態機序に関する研究： マウスモデルを用いた狂犬病ウイルスの体内病態の解析と その病態形成に関する考察	94
	研究分担者：中根明夫（弘前大学大学院医学研究科）	
12	狂犬病の疫学と神経病原性に関する研究： 狂犬病野外株接種マウスの中樞神経系に関する病理学的研究 並びに免疫組織化学的診断法の確立	95
	研究分担者：伊藤直人（岐阜大学応用生物科学部）	
13	狂犬病の診断法確立に関する研究	102
	研究分担者：井上智（国立感染症研究所獣医科学部）	
14	狂犬病の病原性と治療法開発に関する研究： 狂犬病ウイルス街上毒の弱毒化機構に関する研究	112
	研究分担者：西園晃（大分大学医学部）	
Ⅲ.	研究成果の刊行に関する一覧表	119

I. 総括研究報告

総括研究報告書

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

研究代表者：中込 治（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学講座 教授）

研究要旨：

アルボウイルス感染症、ウイルス性下痢症、ウイルス性出血熱、狂犬病を中心に、特にアジアにおいて問題となるウイルス感染症に関し、（１）精度の高い診断法を確立すること、（２）疫学調査を実施し、国内外における汚染地の特定とヒトにおける感染状況の解明に努めること、（３）病原体を分離し性状を明らかにするとともにワクチン開発のための基盤的研究を行うこと、（４）アジアや米国の研究者との協同研究を推進することにより、国際的な視点からの感染症研究体制を確立すること、を目的として研究を進めた。

アルボウイルス感染症においてウエストナイルウイルスに関しては、今回創出したブロッキングELISA法は極めて高い特異性でウイルス特異的抗体を検出できることが分かった。この手法を用いて、日本のウマ血清、1600検体を調査したところ12検体がウエストナイルウイルスに対する特異抗体を有していた。そして12頭すべてが米国からの輸入馬であり、輸入前にウイルスに感染した、あるいはワクチン接種を受けたと判断できた。このことから、今回創出した手法はウイルス特異的血清診断に有効で、特に、日本・アジアでウエストナイルウイルスと鑑別診断が必要な日本脳炎との鑑別を可能にする手法であり、アジアのウエストナイル警戒事業に有用であると期待された。

日本脳炎については、現在でも夏季には媒介蚊とウイルスの活動が依然として見られることが確認された。しかし遺伝子解析では分離株により変異が認められた。代表的な分離株2つについて感染性クローンを構築して細胞での増殖性を検証したところ、NS2a遺伝子の1アミノ酸の変異で、細胞レベルでの増殖性に10倍以上の変化を及ぼし、マウス、ひいてはヒトにおいて重症化を左右する可能性が示唆された。この結果は、我が国において現在、日本脳炎患者発生は少ないものの、今後も自然界の媒介蚊とウイルスの変異や自然界での流行状況を注意深くモニターしておく必要があると思われた。

デングウイルスに関しては、一次感染、二次感染患者における抗体依存

性感染増強の保有状況が明らかになってきた。デングウイルスの重症化にはこの抗体依存性感染増強抗体が重要な役割をするとの説があり、今後は検査症例を増やして、増強抗体保有の有無と実際の病態（重症化）との関連を詳細に解析し、一次感染患者の将来的な重症化の予測が可能か否かについて検討する必要がある。これが可能であれば、今後のワクチン開発と予防対策に極めて有用であると考えられる。

ウイルス性出血熱については、HFRS と HPS 流行血清型を全て検出するスクリーニング用抗原と各々の血清型を鑑別する鑑別用 ELISA 抗原が確立できた。ハンタウイルスでは、血清型毎に特定のげっ歯類種が自然宿主となるため、生息地域に一致して流行が起き、また、血清型毎に人への病原性が異なる。このため、本抗原システムにより、感染ウイルスの血清型の鑑別が迅速に可能となり、アジアの流行国全域で、流行地域の特定による封じ込め対策や初期の治療方針の選択に有用な情報を得ることが出来ると考えられる。免疫クロマトグラフ法も基礎条件を確立でき今後さらに応用を進めたい。

我が国のげっ歯類では、北海道のエゾヤチネズミにのみ陽性例が認められるがその他の地域のドブネズミや野ネズミには陽性例は認められず、現状での流行は低率であることが判明した。

エボラ出血熱ウイルス血清診断法のための組換えエボラ NP 抗原の有用性が確認出来た。輸入症例の血清診断にも有用であると考えられた。ナイジェリアで捕獲された霊長類由来血清 34 例中 3 例が陽性限界カットオフ値をわずかに上回る吸光度を ELISA で示したのみであった。

ウイルス性出血熱はその重篤度の高さから流行国での発生防止ならびに我が国への侵入防止や万が一侵入した場合の迅速診断・対応が強く求められる疾患で、その予防対策は本日米医学協力計画の中で重点対応分野の一つであり、上記研究はその目指すところを同じくしている。

ウイルス性下痢症については、ロタウイルス胃腸炎入院発生率は 5.3/1000 人・年となり、5 歳までに 37 人に 1 人はロタウイルス胃腸炎で入院したことが示された。また、ロタウイルス胃腸炎入院にかかる直接医療費が平均 221,000 円ことを踏まえると、わが国では、年間 3 万人の 5 歳未満の入院患者が発生し、その直接医療費は約 66 億円と推定される。したがって、わが国には、ワクチンを定期接種に導入している諸外国と同等の疾病負担があると考えられた。ロタウイルス胃腸炎による疾病負担の大きいこと、昨年度の本研究によって行ったブラジルでのワクチンのワクチン有効性調査などの経験は、ワクチンに関して世界に遅れをとっているわが国の医療関係者に還元するため、臨床医に向けた解説記事や小児科医会での講演を行っている。

病態解明のマウスモデル実験では、病理学的所見は観察されなかったもの

の RRV の脳内での増殖が示唆された。さらにアジア地域の分子疫学調査では、バングラデッシュの分離株 MMC6、MMC88 株の各遺伝子は、G2 ヒトロタウイルスのプロトタイプ DS-1 株の遺伝子型に属していた。しかし系統解析により、MMC88 株の VP3 遺伝子が、同じ地域内でヤギロタウイルスからのリアソートメント（遺伝子再集合）によりヒトロタウイルスに入ってきた遺伝子分節であることが推定された。ヒトロタウイルスと動物ロタウイルスとの間で遺伝子分節のリアソートメントが起こり、ロタウイルスの生態・病原性獲得に関与している可能性が示された。

一方、ノロウイルスの構造解析からは、GII ノロウイルスでは、組織血液型抗原のフコースがノロウイルスの P 領域上部に存在する結合ポケットにはまり込むことで、結合することが明らかになった。さらに、結合ポケットには多数の合成物が結合できることを明らかにした。特にクエン酸塩分子は、フコースと構造が異なるにもかかわらず、液相反応系において、非常に効率よくフコースの結合を競合阻害できることが明らかになった。

狂犬病については、末梢から中枢への遡上能力の低下した 1088 変異株では、ウイルス外表のエンベロープ蛋白に新たな糖鎖付加が生じており、このことが感染早期からウイルスが宿主の免疫反応から認知され、脳内で強力な抗体誘導が起こりやすくなり、ひいてはウイルスの排除から個体の生残にもつながることが推察された。つまり抗体産生細胞が脳内に早期に浸潤すれば、ウイルスの広がりを早期に抑制することが期待され、治療法の開発の糸口になることも期待される。一方鶏卵で作成した抗体は、ウイルスの接種経路や動物種に関わらず感染脳組織での染色感度が高く、非特異反応も低いため侵淫国での病理学的診断に利用が可能であると考えられる。一方、これらの研究の過程で開発された狂犬病に対する中和抗体価を迅速・簡便に定性的、半定量的に測定できるイムノクロマト法（RAPINA 法）は、ワクチン接種後の抗体価のフォローや追加ワクチン接種の必要性を推し量るのに重要な情報を安価に提供できる優れた方法であり、今後アジア地域を中心に狂犬病の侵淫地域での活用が期待される。

研究分担者：

有川二郎：北海道大学大学院医学研究科
教授

伊藤直人：岐阜大学応用生物科学部
准教授

井上 智：国立感染症研究所獣医科学部
室長

片山和彦：国立感染症研究所
ウイルス第二部 室長

荻和宏明：北海道大学大学院獣医学研究科
准教授

倉根一郎：国立感染症研究所 副所長

小西英二：大阪大学微生物病研究所
寄附研究部門教授

小林宣道：札幌医科大学医学部 教授

西條政幸：国立感染症研究所
ウイルス第一部 部長

竹上 勉：金沢医科大学総合医学研究科
教授

中根明夫：弘前大学大学院医学研究所
教授

西園 晃：大分大学医学部 教授

森田公一：長崎大学熱帯医学研究所
教授

A. 研究目的

近年、世界各地で新興・再興感染症が流行し人類に対する脅威となっている。これらの中にはウイルス性感染症が多く含まれている。重篤な脳炎や出血を特徴とするアルボウイルス感染症、急性腸管感染症のウイルス性下痢症、致死率 100% の狂犬病および重篤なウイルス性出血熱などが、アジア各地で流行し、多数の患者と死者をもたらしている。しかしこれらの感染症の流行地では、診断体制が未

整備なため正確な患者数や流行地の特定などの疫学情報が欠如している。

またこれらの感染症に対するワクチンの改良と開発を早急に実施する必要にせまられている。そこで本研究においては、特にアジアにおいて問題となるウイルス感染症を対象として、診断法の開発、アジアにおける疫学状況を明らかにすること、病態形成機序の解明及び予防、診断法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

1) アルボウイルス感染症

ウエストナイルウイルスに関しては日本を含むアジアへの侵入を、ヒトや動物血清の抗体検査から早期に検出するための手法確立をめざして、特異的 NS1 抗体検出系を確立する。具体的には特異的モノクローナル抗体を利用したブロッキング ELISA 法を用いた診断手法を創出する。これを用いて、日本のウマの血清検体の分与を受け、診断法の特異性・特性を検証して実際に血清疫学解析を実施する。

日本脳炎ウイルスについては、夏季に野外蚊を採取してウイルスを分離しその遺伝子解析や生物学的性状を解析するとともに、分子疫学解析を実施することによりウイルスの移動や変異を明らかにする。さらに、一部のウイルスに関しては感染性クローンを構築して、マウスでの病原性などで差異を示すウイルス株間における遺伝子上の差異と病原性との関連を分子レベルで解明する。

デングウイルスに関しては、前年度に確立した抗体依存性感染増強を簡便に測定できる Fc γ RIIA 発現 BHK 細胞を用いて、

輸入感染患者、アジアのデング流行地域の患者血液を倫理委員会での承認手続きを経て、感染増強抗体保有の有無を定量的に測定し、デング一次感染、二次感染前後における感染増強抗体保有状況を明らかにして、重症度との相関を評価する。

2) ウイルス性出血熱

HFRS 原因ウイルス（6 種血清型）と HPS 原因ウイルス（3 種血清型）について、ヌクレオキャプシッド蛋白(NP)をバキュロウイルス若しくは大腸菌発現ベクターによって発現させた組換え蛋白（全長抗原：スクリーニング用、N 末端部分欠失抗原：鑑別用）を診断用抗原として ELISA、IFA およびイムノクロマト(ICG)法に用いた。それぞれのウイルスに対する免疫血清、HPS 患者血清（アルゼンチン国立ウイルス研究所、Delia Enria 博士より分与）および、北海道、東京、神戸、名古屋で捕獲したげっ歯類由来の血清合計 1,658 例を用いた。エボラ出血熱ウイルスとしてザイルエボラウイルスの組換え NP を作成し、ELISA 抗原とした。ナイジェリアで捕獲された霊長類（種類不明）血清、34 例を用いた。

3) ウイルス性下痢症

京都府にある公立南丹病院小児科において、2008 年 9 月からの 2 年間に急性胃腸炎の診断で入院した患児を後方視的に調査した。ロタウイルス抗原は入院時採取の便検体を ELISA 法で測定した。ロタウイルス感染症の病態解明のマウスモデル実験では、脳内にロタウイルスを直接接種しウイルスの挙動ならびに病理組織

学的所見を解析した。さらにアジア地域の分子疫学調査では、2005 年にマイメンシン医科大学病院小児科で分離された G2P[4]株 2 株（MMC6、MMC88）の 11 本の遺伝子分節の配列を決定し、既知のロタウイルス遺伝子配列とともに MEGA ver. 4.1 を用いて系統解析を行った。

4) 狂犬病

狂犬病の発症メカニズムの解明とそれに対する治療法確立のためには、本来の狂犬病を再現させた動物モデルが必須である。今回の研究では野外で採取された狂犬病ウイルス 1088 株やコウモリからの分離ウイルス、またはそれに性状が近似しており末梢神経から中枢神経系へ遡上する能力のあるウイルス（西ヶ原株）などを、マウスの末梢筋肉組織から実験的に接種することで、本来の狂犬病感染を模した病態を作り出し、経時的な中枢・末梢組織でのウイルス抗原の分布や、中枢神経系への侵入に関わるウイルス学的特徴を解析した。また培養神経細胞で継代を繰り返して、致死性の低下したウイルスと親株を比較することで、ウイルスゲノム変異や抗原性変化の面から病原性に関わる因子を解析した。さらにはより安定的な病理学的確定診断法確立をするために、従来 of 診断用抗体に比べ安価に生産できる鶏卵黄抗体を作成し、侵淫地域である途上国での利用に叶うか否かを検討した。

C. 研究結果

1) アルボウイルス感染症

ウエストナイルウイルスに関しては、

今回創出したブロッキング ELISA 法は極めて高い特異性でウイルス特異的抗体を検出できることが分かった。この手法を用いて、日本のウマ血清、1600 検体を調査したところ 12 検体がウエストナイルウイルスに対する特異抗体を有していた。そして 12 頭すべてが米国からの輸入馬であり、輸入前にウイルスに感染した、あるいはワクチン接種を受けたと判断できた。このことから、今回創出した手法はウイルス特異的血清診断に有効で、特に、日本・アジアでウエストナイルウイルスと鑑別診断が必要な日本脳炎との鑑別を可能にする手法であり、アジアのウエストナイル警戒事業に有用であることが期待された。

日本脳炎については、現在でも夏季には媒介蚊とウイルスの活動が依然として見られることが確認された。しかし遺伝子解析では分離株により変異が認められた。代表的な分離株 2 つについて感染性クローンを構築して細胞での増殖性を検証したところ、NS2a 遺伝子の 1 アミノ酸の変異で、細胞レベルでの増殖性に 10 倍以上の変化を及ぼし、マウス、ひいてはヒトにおいて重症化を左右する可能性が示唆された。この結果は、我が国において現在、日本脳炎患者発生は少ないものの、今後も自然界の媒介蚊とウイルスの変異や自然界での流行状況を注意深くモニターしておく必要性を示すと思われた。

デングウイルスに関しては、一次感染、二次感染患者においての抗体依存性感染増強の保有状況が明らかになってきた。デングウイルスの重症化にはこの抗体依存性感染増強抗体が重要な役割をすると

の説があり、今後は検査症例を増やして、増強抗体保有の有無と実際の病態（重症化）との関連を詳細に解析し、一次感染患者の将来的な重症化の予測が可能か否かについて検討する必要がある。これが可能であれば、今後のワクチン開発と予防対策に極めて有用であると考えられる。

2) ウイルス性出血熱

HFRS と HPS 流行血清型を全て検出するスクリーニング用抗原と各々の血清型を鑑別する鑑別用 ELISA 抗原が確立できた。ハンタウイルスでは、血清型毎に特定のげっ歯類種が自然宿主となるため、生息地域に一致して流行が起き、また、血清型毎に人への病原性が異なる。このため、本抗原システムにより、感染ウイルスの血清型の鑑別が迅速に可能となり、アジアの流行国全域で、流行地域の特定による封じ込め対策や初期の治療方針の選択に有用な情報を得ることが出来ると考えられる。ICG 法も基礎条件を確立でき今後さらに応用を進めたい。

我が国のげっ歯類では、北海道のエゾヤチネズミにのみ陽性例が認められるがその他の地域のドブネズミや野ネズミには陽性例は認められず、現状での流行は低率であることが判明した。

エボラ出血熱ウイルス血清診断法のための組換えエボラ NP 抗原の有用性が確認出来た。輸入症例の血清診断にも有用であると考えられた。ナイジェリアで捕獲された霊長類由来血清 34 例中 3 例が陽性限界カットオフ値をわずかに上回る吸光度を ELISA で示したのみであった。

ウイルス性出血熱はその重篤度の高さ

から流行国での発生防止ならびに我が国への侵入防止や万が一侵入した場合の迅速診断・対応が強く求められる疾患で、その予防対策は本日米医学協力計画の中で重点対応分野の一つであり、上記研究はその目指すところを同じくしている。

3) ウイルス性下痢症

ロタウイルス胃腸炎入院発生率は5.3/1000人・年となり、5歳までに37人に1人はロタウイルス胃腸炎で入院したことが示された。また、ロタウイルス胃腸炎入院にかかる直接医療費が平均221,000円ことを踏まえると、わが国では、年間3万人の5歳未満の入院患者が発生し、その直接医療費は約66億円と推定される。したがって、わが国には、ワクチンを定期接種に導入している諸外国と同等の疾病負担があると考えられた。ロタウイルス胃腸炎による疾病負担の大きいこと、昨年度の本研究によって行ったブラジルでのワクチンのワクチン有効性調査などの経験は、ワクチンに関して世界に後れをとっているわが国の医療関係者に還元するため、臨床医に向けた解説記事や小児科医会での講演を行っている。

病態解明のマウスモデル実験では、病理学的所見は観察されなかったもののRRVの脳内での増殖が示唆された。さらにアジア地域の分子疫学調査では、バン格拉デッシュの分離株MMC6、MMC88株の各遺伝子は、G2ヒトロタウイルスのプロトタイプDS-1株の遺伝子型に属していた。しかし、系統解析により、MMC88株のVP3遺伝子が、同じ地域内でヤギロタウイルスからのリアソートメント（遺伝子再集

合）によりヒトロタウイルスに入ってきた遺伝子分節であることが推定された。ヒトロタウイルスと動物ロタウイルスとの間で遺伝子分節のリアソートメントが起これ、ロタウイルスの生態・病原性獲得に関与している可能性が示された。

一方、ノロウイルスの構造解析からは、GIIノロウイルスでは、組織血液型抗原のフコースがノロウイルスのP領域上部に存在する結合ポケットにはまり込むことで結合することが明らかになった。さらに、結合ポケットには多数の合成物が結合できることを明らかにした。特にクエン酸塩分子は、フコースと構造が異なるにもかかわらず、液相反応系において、非常に効率よくフコースの結合を競合阻害できることが明らかになった。

4) 狂犬病

末梢から中枢への遡上能力の低下した1088変異株では、ウイルス外表のエンベロープ蛋白に新たな糖鎖付加が生じており、このことが感染早期からウイルスが宿主の免疫反応から認知され、脳内で強力な抗体誘導が起これやすくなり、ひいてはウイルスの排除から個体の生残にもつながることが推察された。つまり抗体産生細胞が脳内に早期に浸潤すれば、ウイルスの広がりを早期に抑制することが期待され、治療法の開発の糸口になることも期待される。一方鶏卵で作成した抗体は、ウイルスの接種経路や動物種に関わらず感染脳組織での染色感度が高く、非特異反応も低いため侵淫国での病理学的診断に利用が可能であると考えられる。一方、これらの研究の過程で開発された

狂犬病に対する中和抗体価を迅速・簡便に定性的、半定量的に測定できるイムノクロマト法（RAPINA 法）は、ワクチン接種後の抗体価のフォローや追加ワクチン接種の必要性を推し量るのに重要な情報を安価に提供できる優れた方法であり、今後アジア地域を中心に狂犬病の侵淫地域での活用が期待される。

D. 考察

1) アルボウイルス感染症

マウスで高病原性を示す日本脳炎ウイルスの細胞レベルでの高増殖性の分子基盤が明らかとなった。しかし実際に細胞内で NS2a タンパクがどのようにウイルス増殖性の増加に寄与しているのかは今後の研究課題といえる。また、今回構築した種々のキメラウイルスのマウス個体レベルでの病原性の差異については今後の研究で検討する必要がある。今のところ、NS2a タンパクの機能は不明である。今回の研究成果により、今まで抗ウイルス薬開発において、あまり顧みられなかった NS2a タンパクを薬開発の標的分子とする可能性が示唆された。今回の成果はヒトにおける JEV 感染の制御にも応用できるものと期待される。

ウイルス感染の一般的な診断法として、急性期ではウイルス核酸と抗原及び IgM クラスの抗体、一方回復期では IgG クラスの抗体の検出が用いられている。この中で最も信頼性が高いのは、核酸検出法である。ウイルス血症の期間とほぼ一致して検出可能であり、感度が高く、WNV 感染と JEV 感染を正確に識別できる。しかし、発症時点はウイルス血症のピーク

の時期であり、それ以降の検査でウイルス分離や核酸検出はあまり成功しないことが報告されている。一方で、WNV の非構造蛋白の 1 種である NS1 (WNV-NS1) 抗原の診断的価値がハムスターの WNV 感染モデルで示されている。抗体検出は、ウイルス核酸や抗原が血中から消失した後、長期間利用できる診断法である。しかし、従来の赤血球凝集抑制試験や中和試験などの抗体検査法では確実に WNV 感染を証明することが困難と考えられる。それは、わが国のウマの多くは、WNV と血清学的交差性が高い JEV に対する免疫をすでに有するためである。すなわち、自然感染やワクチンによって JEV に対する免疫をもった個体が WNV に感染した場合、交差性の JEV 抗体レベルが二次免疫応答のため高く上昇し、一次免疫応答として誘導される特異的な WNV 抗体レベルと量的比較が困難となることが予想される。そこで本研究では、新しい方法である CDC 法とブロッキング ELISA 法を用いた。両方の試験で陽性となった 12 頭は、WNV に対する特異抗体を保有すると考えられる。しかし、これらのウマはすべて外国産であり、外国で感染を受けたことが示唆された。

これまでの Vero 細胞を用いた分離法で採集コガタアカイエカから少なくとも 2 株ウイルス (JEV) 分離に成功した。JEV が北陸地域に広く分布していることは他のデータも含めてみると明らかと言える。分離株 Ishikawa10(C6) と Ishikawa-K05 株について生物活性等を調査しているが、比較として用いている JaGA01 株に比べ、病原性は必ずしも低くはないが、2010 年

分離の Ishikawa10(C6)株で若干の病原性低下がみられた。細胞(Vero)への障害作用についても両遺伝子タイプの JEV 株に差は見られず、またウイルス感染に伴う細胞における IFN 経路遺伝子発現誘導への影響に大きな差異はみられなかった。しかし、その性状においては、Ishikawa10(C6)株では感染細胞が異なると増殖性に低下があり、これらの性状はマウスに対する毒性において同じ遺伝子タイプの JEV 株での差異に通じる現象と推定される。しかし、ここに示した結果は、現在の日本国内において多数派として分布しているウイルス(遺伝子タイプ1型)の毒性が低下していることを必ずしも意味しない。2007 年には日本脳炎患者が石川県において発生している。近い将来起こる可能性のある日本脳炎の感染、流行を防ぐためにはウイルスの遺伝子解析と共に、ウイルス複製制御、病原性の要因解析を行っていく必要があり、引き続き北陸地域分布ウイルスの分離の試み、遺伝子・細胞レベルからの解析を継続していくことが重要といえる。低年齢児における JEV ワクチン接種率の低下による抗体陽性者数の減少がある現在、ウイルス病原性解析はウイルス感染防御の目標につながるものと考えらる。

渡航者およびデング熱流行地の住民の血清を用いて、これまでに確立した $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ 発現 BHK-21 細胞を用いて樹立した ADE アッセイおよび中和法の有用性を検討した。現在広く用いられている、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ 非発現細胞によって測定された中和抗体価は感染増強活性が考慮されない状態で測定されていることから、生体

におけるデングウイルス抗体の機能を十分に反映していない可能性がある。

2) ウイルス性出血熱

実験感染ラット血清を用いた経時的解析から、感染後 25 日以上経過した後の IgG 抗体で血清型特異抗体が増加すると考えられた。感染初期においては中和試験の結果の信頼度が低いことが既に報告されていることから、感染初期の型鑑別には、遺伝子配列情報の解析が必要であることが確認された。一般に、げっ歯類はハンタウイルスに持続感染することから、感染初期の検体を鑑別診断する割合は低いと考えられ、実際の使用には大きな支障はないと考えられる。むしろ、鑑別不能な場合、新規血清型ウイルスへの感染も示唆されるため、PCR 法等による遺伝子解析と併用することが必要であることが確認された。

HPS ウイルスに関しては、5 つの遺伝子グループのうち 3 グループについて鑑別が可能であった。残りの 2 グループのうちの一つに分類される BCCV については、抗原が作成されていないが、抗 BCCV 血清は鑑別することが可能であったため、本 ELISA は、全ての血清型の HPS ウイルスに対する感染を鑑別出来ることが示唆される。また、ANDV と LANV は同一グループに属するが ANDV の病原性が LANV に比べて明らかに強い。両ウイルスは、地域的に共通したエリアで流行しているため、両者の鑑別診断は治療法の選択等のために必要である。本鑑別 ELISA では、ANDV と LANV 感染を鑑別することが可能であったことから、両ウイルスが流行している、アル

ゼンチンでの疫学的研究への応用が期待出来る。

ハンタウイルス抗体検出のための、イムノクロマト法が大腸菌発現組み替え NP (N 末端 103 アミノ酸抗原) を用いて確立された。未だ、基礎的条件の検討段階であるが、SEOV、PUUV および ANDV 感染患者血清はそれぞれホモの抗原に対してのみ反応したことから、3 種類のイムノクロマト試験によって、全てのハンタウイルス感染をスクリーニング、かつ、HFRS もしくは HPS 症例の区別も可能であることが示唆された。特に、HFRS と HPS 双方の侵入が危惧海外からの輸入症例等の検査に有用と考えられた。

ハンタウイルス感染症は野生げっ歯類が病原巣動物となること、ウイルスごとに固有のげっ歯類を宿主とすることなどから、げっ歯類と人における疫学調査を行うことにより、HFRS および HPS の予防対策に有用な情報を得ることができる。

かつて我が国で流行した HFRS の感染源となったドブネズミやクマネズミなどの *Rattus* 属げっ歯類について、全国規模の血清疫学調査を実施した。2005 年から 2011 年までの 6 年間で 20 の都道府県から合計 840 例の野生の *Rattus* 属げっ歯類を収集し、ELISA により血清中の抗ハンタウイルス抗体の検出を試みたが、840 例全てが抗体陰性と診断された。したがって、近年の我が国における *Rattus* 属げっ歯類のハンタウイルス感染率は極めて低いことが明らかになった。わずか 20 年前までは日本でも、小樽、横浜、神戸など 10 以上の港湾地域や、函館に近い旧上磯町のゴミ埋め立て地、さらに、名古屋の市街

地でも抗 SEOV 抗体陽性のドブネズミが捕獲されており、実際にウイルスが分離されている地域もある。今回の疫学調査では、我が国の *Rattus* 属げっ歯類において SEOV の感染が全く検出されなかった。なぜ、日本から SEOV 感染ネズミ集団がいなくなったのか正確な理由は不明であるが、土地利用の変化やごみ処理法の変化、ネズミの駆除などによってハンタウイルス陽性集団が縮小した、あるいは排除されたのかもしれない。いずれにしても、今回の疫学調査の成績は、近年我が国において HFRS の発生が見られないことをよく裏付けていると言えるだろう。

次に、*Rattus* 属以外の野生げっ歯類およびトガリネズミ類についても同様の調査を実施したところ、本州で捕獲された 113 例は全て抗体陰性であった。一方、北海道ではエゾヤチネズミの 7.67% (27/352) とアカネズミの 1.19% (2/168) がハンタウイルスに対する抗体を保有しており、その全例が HOKV の感染であることが判明した。エゾヤチネズミは HOKV の宿主として自然界で安定して本ウイルスを保持していることが再確認された。一方、アカネズミはエゾヤチネズミから偶発的に HOKV の感染をうけたものと考えられた。今回の調査では北海道内の殆どの調査地点で抗体陽性野鼠が捕獲されており、本ウイルスが道内でかなり広域に亘って分布していることが示唆された。

また、S および M 遺伝子の部分的配列に基づく系統樹解析により、サハリンと北海道由来の HOKV は共通の系統から分化していたのに対し、ハバロフスクの HOKV は PUUV と他の HOKV の共通祖先から分化し

た可能性が示された（図 2）。

これまで北海道、サハリンおよびハバロフスクのタイリクヤチネズミ由来のハンタウイルスは宿主が同じであることから、全て HOKV に属していると考えられてきた。しかし、系統樹解析の結果から HOKV-Kha は他の 2 地域のウイルスとは系統の異なるウイルスであり、今後別のハンタウイルスとして分類される可能性もある。現在のところ、人での HOKV 感染は報告されていないが、PUUV の構造タンパク質中のアミノ酸の一致率は 90%を超えることから、今後も本ウイルスのげっ歯類における継続的な疫学調査を行うとともに、一般住民における抗体調査も実施する必要があると考えられる。

エボラ出血熱の原因ウイルスとして、アフリカにおいては 4 亜種（ザイールエボラウイルス、スーダンエボラウイルス、ブンディブギョエボラウイルス、アイボリーコーストエボラウイルス）が知られている。エボラ出血熱患者は、コンゴ民主共和国、スーダン、ウガンダ、ガボン、コンゴ、アイボリーコーストで報告されている。アフリカの一部の地域（コンゴ民主共和国やガボンの国立公園）では、エボラ出血熱の流行により生息するゴリラやチンパンジーが絶滅する危険性が指摘されている。このことはエボラウイルス感染症の疫学を調査する上で、霊長類におけるエボラウイルス感染症の実態を明らかにすることの重要性を示している。ガボンやカメルーン（カメルーンではエボラ出血熱の流行は確認されていない）に地理的に近いナイジェリア西部の国立公園に生息するサル血清 34 検体について、

エボラウイルスに対する抗体保有状況について検討した。3 検体（約 9%）が陽性と判定されたが、陽性を呈した血清が 400 倍希釈された時の OD 値が、基準を若干上回る程度であり、真にエボラウイルス抗体が陽性とは言い切れない。しかし、1 検体（ID No. 25）は、比較的高い OD 値を示しており、エボラウイルス抗体陽性である可能性がある。用いた血清は 34 検体と少なく、この研究成績からは結論を導くことはできない。今後、検体数を増やしたり、他の地域に生息する霊長類の個体について検討したりして、エボラ出血熱の流行についてより詳細に検討することが重要であると考えられた。

3) ウイルス性下痢症

本研究の結果をわが国のバースコホート約110万人に外挿すると、年間3万人のロタウイルス胃腸炎入院患者(5歳未満)が発生し、その直接医療費は約66億円と推定された。このバースコホートを5歳まで追跡したときどれだけの児がロタウイルス胃腸炎を発症し、医療機関を受診するかという推定値が、ロタウイルスワクチンを取りまく公衆衛生政策上必要な情報である。ここでは、これが5歳未満の小児約550万人を母集団とする年間の患者数と一致すると前提して議論を進める。本研究で得られたデータをふまえると、ロタウイルス下痢症による外来受診者数は年間約80万人、入院患者数は年間30,000～78,000人、死亡例は年間約10人と推定される。ロタウイルスワクチンの目的はロタウイルス胃腸炎による入院患者数の減少であるので、もっとも重要なのは年

間入院患者数をできるだけ正確に推定することである。このために、全国規模での研究が必要である。また、5歳未満のロタウイルス胃腸炎入院例は諸報告と同様6～35ヶ月児が主体だが、全年齢では3歳以上の症例が1/3以上で、ロタウイルスワクチンによる免疫の持続の問題を含め今後の予防戦略策定上の課題と考えられた。

本研究ではバングラデシュにおける主流株である G2 ロタウイルス株の全遺伝子配列を決定し、系統遺伝学的・分子疫学的解析を行った。解析された 2 株はいずれも G2 のプロトタイプ DS-1 株と同じ遺伝子型 (全遺伝子分節) を示したが、遺伝子配列の一致率および系統解析では G2 ヒトロタウイルスの中で特徴的な所見が得られた。すなわち、DS-1 株 (1976)、KUN 株 (1982)、TB-Chen 株 (1996) のような古い G2 ロタウイルス株に比し、MMC6、MMC88 株は 2000 年以降に検出された新しい G2 ロタウイルスに遺伝的に近いということであった。このことは時間の経過とともにロタウイルスの全遺伝子分節にわたり点変異が蓄積し、遺伝子学的に多様な集団へと変化してゆくことを意味している。現行のロタウイルスワクチンは抗原、遺伝子配列とも固定されたものとなっているため、野外株の遺伝子進化については注意深く観察する必要があると思われる。そのためには主流株の全遺伝子配列の解析は継続的に行う必要があるであろう。

G2 ロタウイルスの VP7 遺伝子は、系統遺伝学的には 5 つの系統に分けられ、DS-1、RotaTeq の G2 成分はそれぞれ lineage 1, 2 に分類される。ところが 2000

年以降に報告された G2 ロタウイルスの多くは、MMC6、MMC88 株も含め lineage 5 に属していた。しかも主要中和抗原部位では、2 ヵ所で古い株とは異なるアミノ酸の置換が見られた。このことはロタウイルス野外株が、生体における中和抗体の作用を回避しながら変異を起こし、そのような変異株が野外で選択されてきたことを示唆する。従ってロタウイルスワクチンの有効性を予測する上でも、特に VP7 の変異に関しては特に留意して解析を進める必要があるだろう。

興味深かった点は、MMC88 株の VP3 が、この株が検出された場所と同じマイメンシン市で分離報告されたヤギロタウイルス GO34 株のそれにきわめて近かったことである。MMC6 株の VP3 遺伝子はヒト G2 株のそれと近かったことから、MMC88 株の VP3 遺伝子は MMC6 株とは由来を異にすると考えられた。すなわち MMC88 株の VP3 遺伝子はヤギロタウイルスに由来することが示唆され、G2 ヒトロタウイルスとヤギロタウイルスの混合感染により起きたリアソートメントにより生じたことが推測された。VP7、VP4 遺伝子の動物・ヒトロタウイルス間におけるリアソートメントについては多くの報告があるが、それ以外の遺伝子分節についてはあまりよく調べられていない。今回は全遺伝子配列の解析により、そのようなリアソートメントの生起が示唆されたものであり、今後全遺伝子配列のデータの蓄積により、ロタウイルス遺伝子分節の自然界での動態がさらに明らかになるものと期待される。リアソートメントによる動物ロタウイルス遺伝子のヒトロ

タウイルスへの導入は、病原性の変化やワクチンの有効性にも影響を与える可能性があるため、主流株を対象とした継続的な解析が重要であると思われる。

ロタウイルスの脳内接種モデルにおいて、接種 RRV 量を 1×10^4 PFU/mouse とし残存ウイルスを検出する可能性を抑え、また、UV 不活化ウイルスと SA11 株を対照としても、RRV 接種の脳内には、単純な残存ウイルスでは説明がつかないウイルスゲノムが存在したことから RRV 株が脳内で増殖する可能性が示唆された。また、脾臓での増殖が見られたことから、マクロファージ系の細胞に取り込まれ増殖する可能性が示唆された。病理組織学的所見は得られなかったことからウイルスがどの細胞で増殖するかさらに検索する必要がある。

4) 狂犬病

狂犬病の治療法確立のためには本来の狂犬病を再現させた動物モデルが必須である。昨年度、街上毒 1088 株をマウスに感染させて狂犬病モデルとしての評価を行ったところ、末梢感染において低用量でも致死感染が成立し、潜伏期間および発症から死亡までの期間も長く、神経症状の進行も緩徐で、さらに低用量の接種では潜伏期間の延長とバラツキが認められ、個体によっては攻撃行動も観察されたことから、1088 株感染マウスは本来の狂犬病を再現していると考えている。さらに、この 1088 株を NA 細胞で連続継代することで確立された 1088-N30 株は、末梢感染においてマウスを発症させることができるが、ほとんどのマウスは死亡

することなく耐過する。したがって、このメカニズムを解明すれば狂犬病発症後の治療法確立のための糸口になると考えられた。

マウスに高病原性を示すコウモリ由来街上毒と固定毒弱毒株の比較より、弱毒株は感染マウスに防御免疫反応を強く誘導することが報告されている (Wang ら、J. Virol. 2005)。このことから 1088 株と 1088-N30 株の病原性の違いは、感染マウスにおける免疫誘導能違いによることが考えられた。そこで今回、1088 株と 1088-N30 株の間で、末梢感染時の成熟マウスにおける中和抗体誘導能と脳内におけるウイルス抗原の拡がりについて比較を行った。

1088-N30 株感染マウスでは、1088 株感染の場合と比べて、脳におけるウイルス抗原の拡がり著しく制限されており、一方で、感染早期から高い中和抗体の誘導が認められた。また、感染 5 日目の時点で、両接種群ともに大脳皮質でウイルス抗原が認められ、抗原の分布の程度は両接種群間で差は認められなかったことから、1088-N30 株は末梢部位から中枢神経系へ侵入する能力は 1088 株と遜色ないことが示唆された。1088-N30 株は脳内接種ではマウスに致死感染を起こせることから、神経病原性も損なわれていない。以上より、末梢より感染した 1088-N30 株がマウスに致死感染を起こせないのは、脳内に侵入する過程で宿主の防御免疫反応を強く誘導し、そのため脳内に侵入後その拡がり抑制されるためであると考えられた。Hooper ら (PLoS Neglect. Trop. Dis. 2009) は狂犬病ウイルスが脳内から

排除されるためには、血液脳関門の透過性が亢進し抗体産生 B 細胞が脳内に侵入することが重要であることを報告している。今回の結果と併せて考えると、狂犬病を発症しても、非常に高い免疫を早く誘導し、かつ抗体産生細胞が脳内に侵入できるよう血液脳関門の透過性を亢進させるような処置ができれば、治癒させることが出来るかもしれない。潜伏期である接種後 3 日目のマウスの脳において少数のウイルス抗原陽性細胞が確認されたのに対し、発症後の 5 日目のマウスの脳では、より多くの抗原陽性細胞が広範囲に確認された。すなわち、発症の有無と脳におけるウイルス感染細胞数の間に関連性が認められた。中枢神経系における感染の拡大が狂犬病の病態形成に重要であることは既に報告されているものの (Dietzschold et al., J. Virol., 1985)、本研究では改めてその重要性を確認することができた。発症時の接種後 5 日目の中枢神経系において、軽度の神経細胞の壊死および囲管性細胞浸潤が認められた。このような病理組織学的変化は、街上毒 (野外株) に感染した脳においても観察されることから、これらの病変が何らかの機序で狂犬病の病態に関与する可能性がある。しかし一方で、これらの脳病変は非常に軽微なため、狂犬病の多様な症状およびその死因の全てに関連するとは考えにくい。

RT-PCR 法を用いて、接種後 5 日目の狂犬病発症マウスにおいて、肺、腎臓、心臓などの様々な臓器にウイルス遺伝子が存在することを明らかにした。潜伏期の個体では、このようなウイルスの分布は

確認されていないことから、諸臓器へのウイルス分布の拡大が病態形成に関与する可能性が考えられた。興味深いことに、集中治療を受けた狂犬病の患者は、最終的に多臓器不全によって死亡することが報告されている (Jackson. Rabies 2nd edition, 2007)。上記のような諸臓器へのウイルス分布と多臓器不全の関連性は、今後、検討されるべき重要な課題と考えられる。

ブラジルの吸血コウモリ、食虫コウモリ由来の狂犬病野外株をマウスに接種し、組織病変の違いを比較検討した。また、マウスとサルの中枢神経系を用いて、ニワトリ卵黄抗体の染色性についてウサギ血清と比較検討した。その結果、吸血コウモリ由来ウシ分離株、ヒツジ分離株および食虫コウモリ由来野外株間では、マウスに形成される組織病変が異なることが明らかになった。さらに、ニワトリ卵黄抗体をホルマリン固定後のパラフィンブロックに適用した場合、ウサギ抗体同様の染色感度を得られており、本抗体を用いた免疫組織化学的診断法の有用性が再確認された。

CVS 株をマウスやサルに接種した場合、接種経路に関係なく CNS のほぼ全域から検出される。しかし本実験では、P-17 株接種マウスの IC 群で、海馬錐体細胞、大脳において陽性細胞数は少なく、P-18 株および P-17 株接種マウスの IC 群においては小脳および小脳脚に陽性細胞が少ない傾向を示した。自然発生例のイヌでは、大脳や脳幹に比較して小脳では抗原陽性細胞が少ない。本実験に用いた翼手目由来の狂犬病ウイルスの体内移行様式や病

原性については不明な点が多いが、動物種によって CNS におけるウイルス抗原の局在が多様であることを考慮すると、従来の海馬、脳幹、小脳を中心とした CNS の検索部位を再評価する必要があると思われる。CVS 株をマウスやサルに接種した場合、自然発症例とは異なり光学顕微鏡レベルにおいてネグリ小体を見つけることは困難である。本研究では P-18 株および MP 株接種マウスにおいて、神経細胞の細胞質内にネグリ小体が観察された。自然発生例におけるネグリ小体の検出率は約 40～80%であり、株によっては観察されないこともある。本実験では、P-18 株を接種したマウスで 60% (9/15 例)、MP 株接種マウスでは 25% (4/16 例) の検出率であり、また P-17 株を接種したマウスの神経細胞では観察されなかった。P-18 株および P-17 株は同じく吸血コウモリ由来の分離株であるが、ネグリ小体の検出率に明らかな違いがみられることは興味深い所見である。その理由は不明であるが、吸血コウモリ由来のウイルスが次の宿主の体内で何回も継代される間にウイルスの増殖性や宿主に対する病原性が変化した可能性は否定できない。

頭蓋の PNS では、P-18 株接種マウスにおいて最も検出頻度が高く、嗅神経、視神経、鼻粘膜上皮、鼻腺、小唾液腺、味蕾、三叉神経、下顎腺から抗原陽性像が検出されたが、脳・脊髄と異なり明瞭なネグリ小体は観察されなかった（三叉神経節を除く）。また、いずれの株においても涙腺からウイルス抗原陽性像は検出されなかった。このことから、CNS と頭蓋 PNS との間では狂犬病ウイルスの複製・増

殖様式が異なる可能性が示唆された。

ニワトリ P および N 抗体を用いた免疫組織化学的検索では、ウサギ抗体とほぼ同様の染色感度が得られた。特に、ニワトリ P 抗体はその他の抗体に比較して非特異反応がほとんど見られず、今後の病理診断に有効と思われた。抗体陽性像は P-18 株および MP 株を接種した一部のマウスでは、ネグリ小体の中～大型のスポット状を呈したのに対し、P-17 株および CVS 株を接種したマウスでは比較的小型なスポット状の陽性像を示した。一般的にウイルス抗原の組織学的検出には、凍結生材料かホルマリン固定パラフィン材料を利用している。凍結生材料と比較してホルマリン固定パラフィン材料は感染性がなく、長期保存が可能であり、特別な装置を必要としないため安全かつ安価で確定診断が可能である。本実験に用いたウサギ抗体を 1.4g 作製するためには、成ウサギ 1 羽が必要なのに対し、ニワトリ抗体は卵 14 個で十分である。従って、ニワトリ抗体を用いた免疫組織化学的診断は安全で安価な確定診断が期待できる。今後は今回確立した免疫染色の手法を自然感染例に応用し、各種抗体の染色感度について更に比較検討すべきであると思われる。

E. 結論

1) アルボウイルス感染症

JaTH160 株はマウスにおいて高い中枢神経病原性を示す株であり、Ja0ArS982 株はこれまでに報告された日本脳炎ウイルスのような中程度の病原性を示す株であった。上記 2 つのウイルスは培養マウ