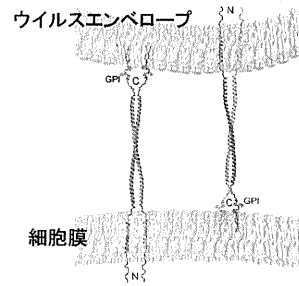
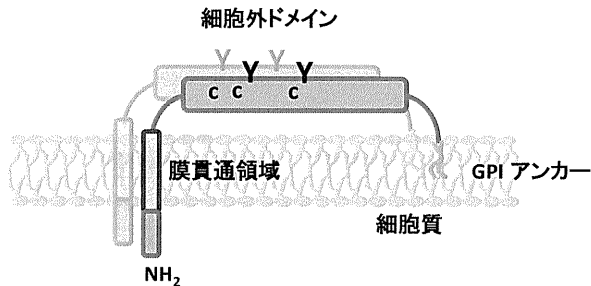


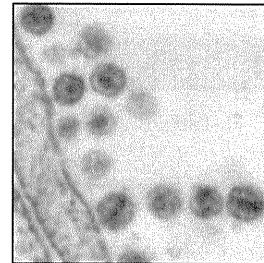
- IFN誘導性 II 型膜タンパク質
- HIV-1を始め、広範なエンベロープウイルスに対し、抗ウイルス作用を示す宿主因子
- 二量体(もしくは多量体)を形成し、細胞膜とウイルス粒子を架橋することで、細胞からの子孫ウイルスの産生を抑制



Yang, H. et al. PNAS, 2010

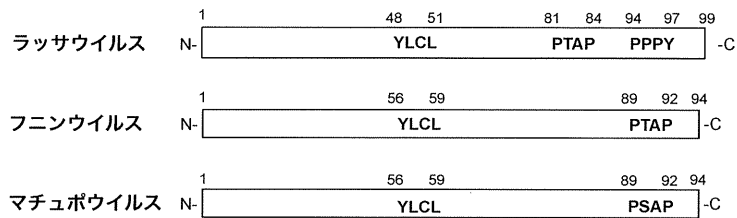


C;システイン残基
Y;N-結合型糖鎖修飾



Neil, S. et al. Nature, 2008, 451, 425-30

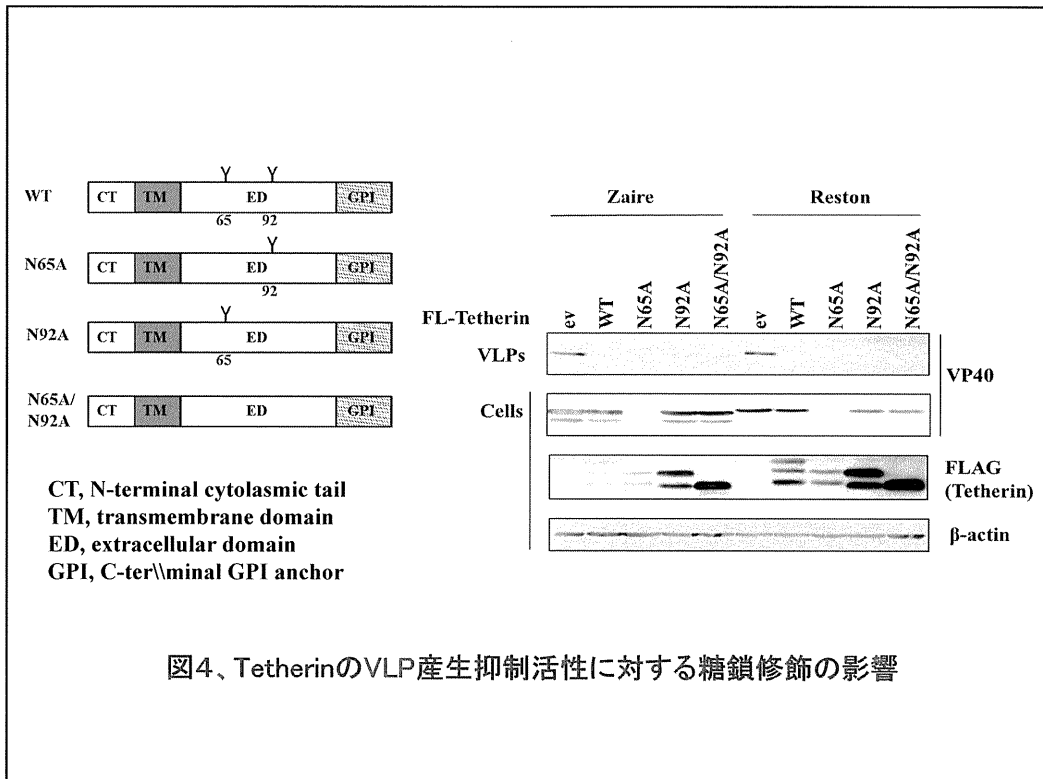
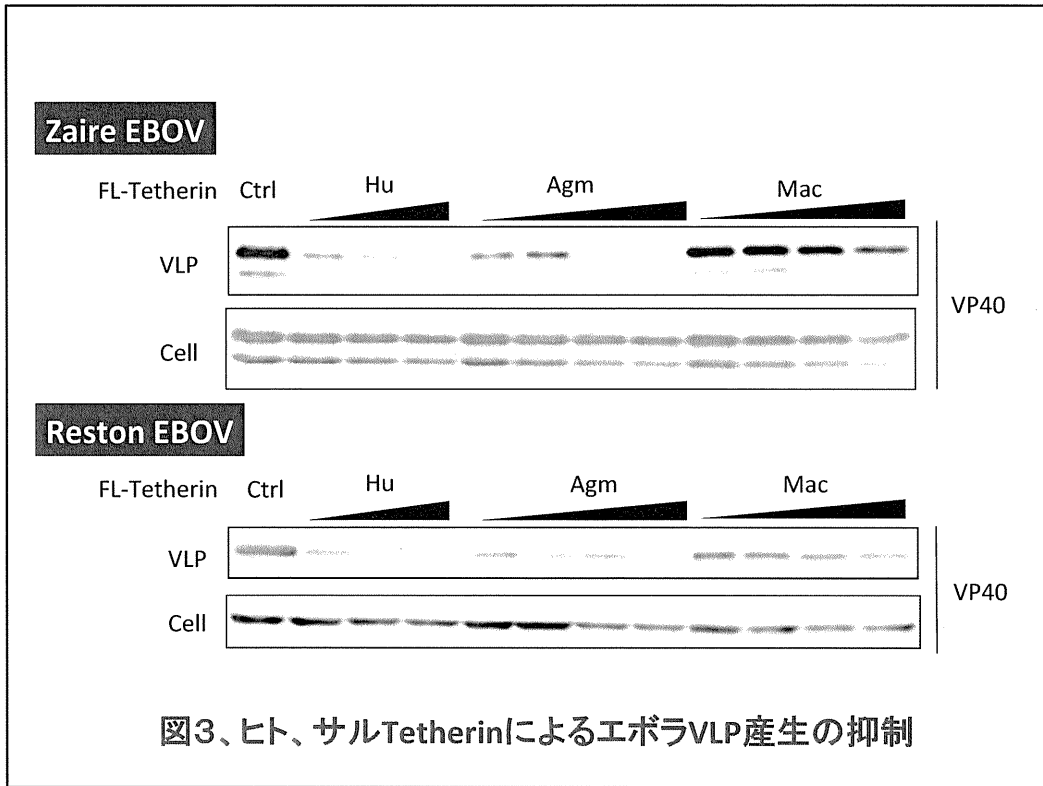
図1、Tetherin(BST-2/CD317/HM1.24)

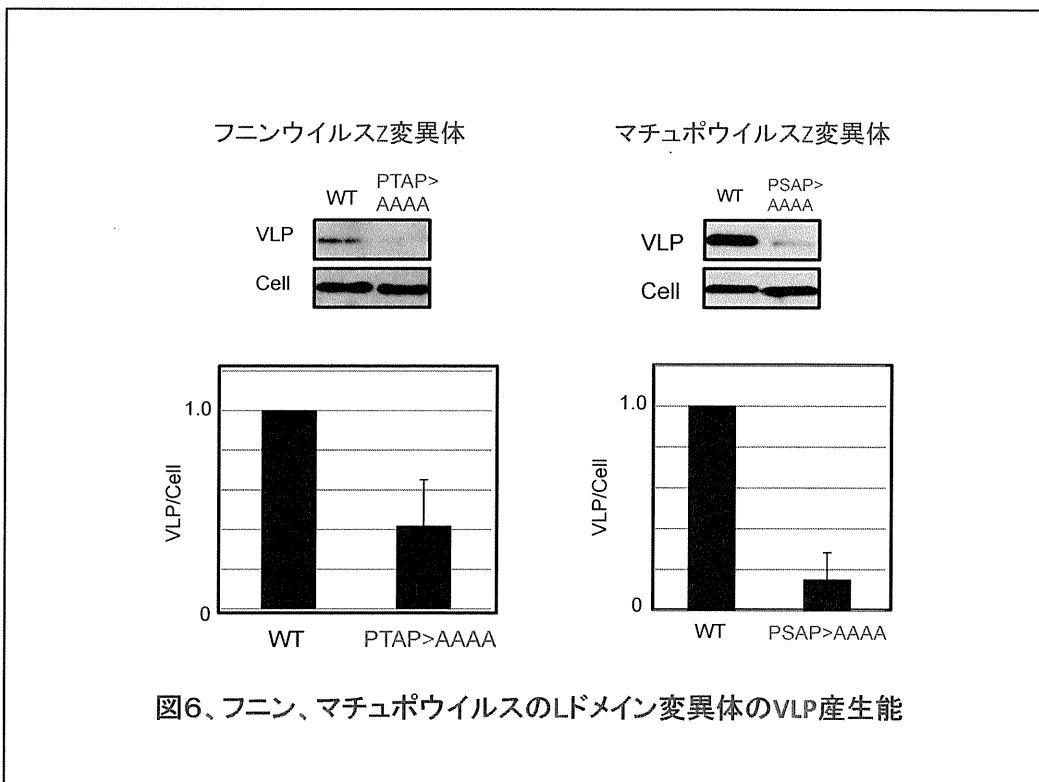
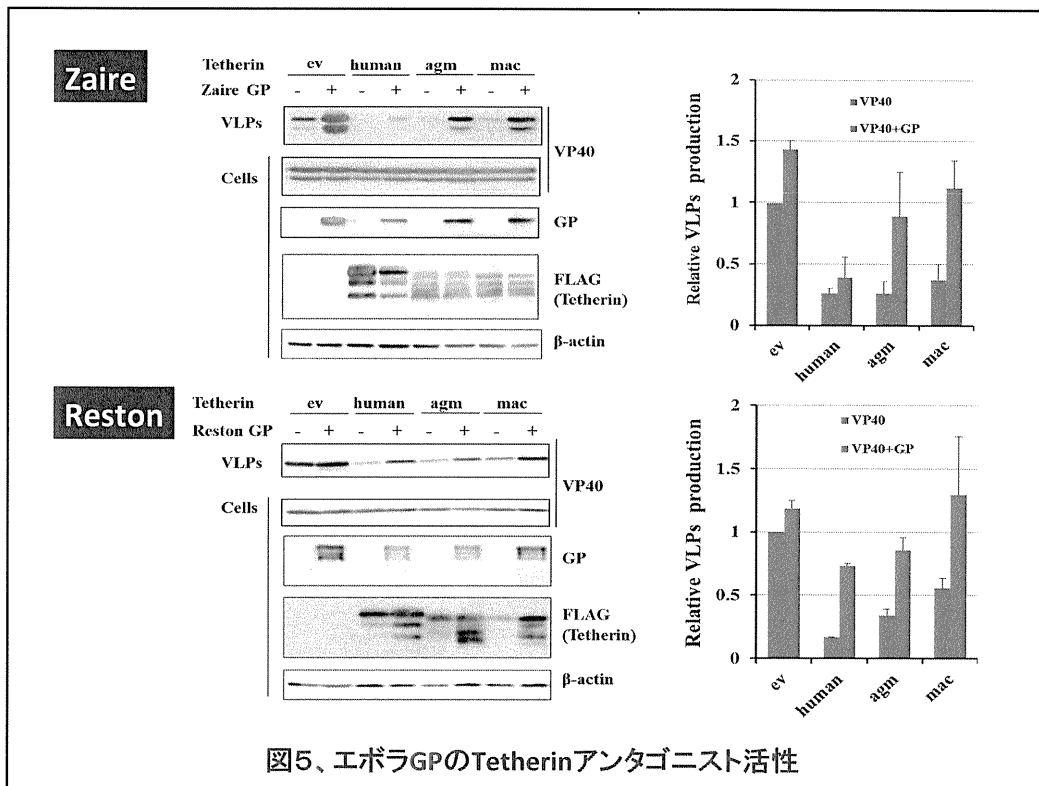


Lドメイン配列

PT/SAP
PPXY
YXXL
FPIV

図2、アレナウイルス zタンパク質のLドメイン配列





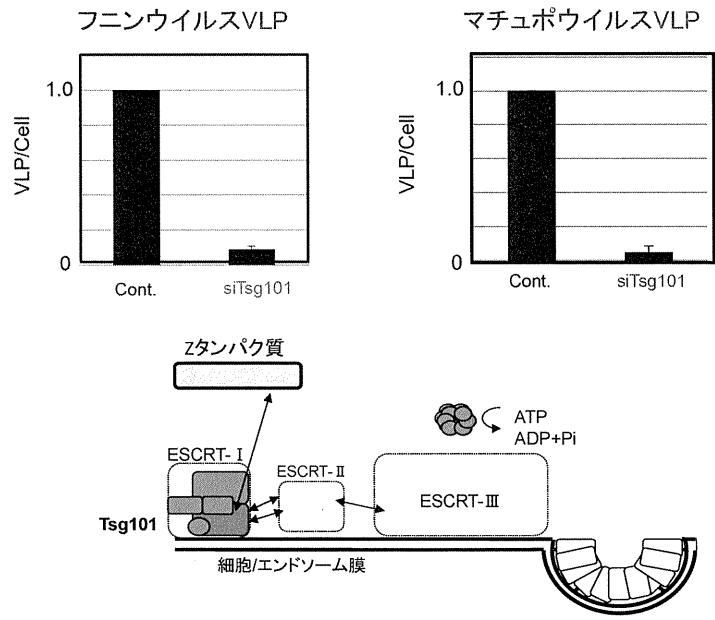


図7、フニン、マチュポVLP産生におけるTsg101の関与

厚生労働科学研究費補助金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：南米 HPS ウイルスと齧歯類ポ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、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、HFRS の血清診断では、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の HPS 診断への応用拡大と、これを用いた疫学的解析の実施を目的としている。本年は、南米 HPS ウイルス感染診断法を対象として、血清型鑑別 ELISA 法、シュードタイプウイルスを利用した代替え中和試験法およびイムノクロマト法の確立を目指した。また、マウスを用いた HPS 病態モデルについても解析を加えた。

研究協力者：吉松組子（北海道大学大学院
医学研究科）

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)をはじ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(図 1)。
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いえない。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。これら、ネズミ亜科げっ歯類由来、ハタネズミ亜科げっ歯類由来およびアメリカネズミ亜科げっ歯類由来の3つのグループのハンタウイルスはグループ間で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それぞれのグループを代表する、合計少なくとも3種類の抗原が必要であると考えられる。また、これに加えてトガリネズミ目（旧食虫目）に分類される動物由来のハンタウイルスが近年続々と報告されてきている。これらは大きくトガリネズミ属由来ウイルスとジネズミ属由来ウイルスに大別されるようである。近年さらにアフリカ大陸の翼手目（コウモリ）由来ウイルスが報告された。コウモリ由来ウイルスはトガリネズミ属由来ウイルスの中に含まれる形ではあるがかなりの多様性を持つ。このように、ハンタウイルスが大きな多様性を持つことから、その診断、検出については細心の注意が必要であると考えられる。

これまでの研究成績から、現在、ハンタウイルス抗体の網羅的な検出には、これら4つのグループのそれぞれの代表ウイルスを用いることが必要で、また、罹患ウイル

スを迅速に鑑別することは、媒介げっ歯類等を特定し、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、感染性のある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。我々はこれまで、HFRS の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 およびシュードタイプウイルスを利用した代替え中和試験法を、HFRS ウイルスを対象に開発してきた。本研究ではそれらの診断法を南北アメリカ大陸由来ハンタウイルスの血清診断および鑑別診断系システムに応用する。さらに、より簡便、迅速かつ安全な抗体測定法として知られている、イムノクロマト法の確立をも目的とした。

南北アメリカ大陸由来ハンタウイルスの病原性は肺に急激な水腫を起こすことにより、呼吸不全から高い死亡率へとつながる。一方、ユーラシア大陸由来のハンタウイルスは熱性疾患および重症例では腎臓での症状、出血傾向が特徴である。しかしながらこの二つのハンタウイルスの差がどのような性質に由来しているのかは明らかではない。本研究では診断法に加え、一般的な実験動物を用いた HPS 動物モデルの開発も試みた。

B. 研究方法

1. 診断法の開発

1) 南北アメリカ大陸由来ハンタウイルスでHPSの原因となっているウイルスおよび病原性の知られていないウイルスについて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。実験に先立ち、Nタンパクの可変領域(血清型特異的エピトープの責任領域と考えられる部位(230-302)のアミノ酸配列の比較を行った。その結果5つのグループに分かれることが分かったため、この5種類についてトランケートNタンパクを用いた代替中和試験の確立を試みた。

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。また、メキシコで捕獲されたげっ歯類の血清とハンタウイルス遺伝子は北海道大学大学院獣医学研究科の荻和宏明博士より分与された。

2) 一般に中和試験の抗原性を担うのは外被タンパクであるエンベロープ蛋白である。そこで組換えエンベロープ蛋白を外套した水泡性口炎ウイルス(VSV)粒子による代替中和試験を構築するために、HPS関連ウイルスのエンベロープ糖タンパク(GP)の発現をSin Nombre virus (SNV), Andes virus (ANDV), Laguna Negra virus (LNV)等について試みた。

3) 組換え抗原をストリップに添付し、金コロイド標識二次抗体あるいはProtein A

を用いた抗体検出用イムノクロマトストリップを作成した。75倍希釈の患者血清あるいはげっ歯類血清150μLを吸着部に添加、展開の後、抗原塗布部でのバンドの形成を確認した。

2. HPS マウスモデルの開発

HPS関連ウイルスは移動の制限から日本で使用することは困難である。また、その宿主動物であるげっ歯類も輸入が困難なものが多い。また、HPS関連ウイルスのマウスへの感染性が低いとの報告もあり、動物モデルの研究は進んでいない。これまでの研究で、ユーラシア大陸由来のプロトタイプハンタウイルスであるHantaan virus (HTNV)がマウスへの高い感染性を持ち、その感染ターゲット臓器が腎臓よりもむしろ肺であることが知られている。そこで本研究では、獲得免疫を欠くSCIDマウスへHTNVを感染させ、肺への病原性を確認したところ、肺水腫が出現することが明らかとなった。そこで、この肺水腫の原因を明らかにするために、肺への滲出細胞を解析し、それらを減じることによって肺水腫の出現が影響を受けるかどうかを検討した。

(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。動物実験

は北海道大学の実験動物委員会より倫理面および科学面において審査を受け承認されたものである。

C. 研究結果

1. 血清型鑑別 ELISA 法の開発：

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、病原性が不明な多くのウイルスが報告されている。それらの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 蛋白を抗原とする、通常の ELISA が十分な感度を持つことが分かっている。しかしながら、この抗原ではウイルスの鑑別をすることはできない。今回の解析から南北アメリカ大陸のウイルスは N タンパクの多様性からは以下の 5 つのグループに分けることができた。G1: SNV (北米北部), G2: ANDV and LNV (南米), G3: BCCV and Bayou virus (北米南部、中米), G4: Carizal virus (CARV) and El Molo Canyonvirus (北米南部、中米), G5: Cano Delgatito virus (中米)。それぞれのグループから代表として、G1: SNV, G2: ANDV and LNV, G3: BCCV, G4: CARV を選び、抗原を作成することを試みた。しかしながら、G5 は Cano Delgatito Virus の 1 ウイルスのみであり、このウイルスの cDNA の入手が困難であり実施しなかった。また、病原性不明ウイルスである、CARV, BCCV では病原巢

動物であるげっ歯類の血清を入手することを試みた。これらのウイルスに感染したことが明らかな患者は報告がないため試験に供試することは困難である。これらの抗血清を用いて、作成した組換え抗原の鑑別抗原としての有用性を ELISA で確認した。その結果 HPS の原因ウイルスであることが明らかである、ANDV, SVN, LAGNV について、それぞれのウイルスによる感染を本方法によって鑑別できることが、自然宿主血清および患者血清を用いて明らかとなった (図 2)。

2. イムノクロマト法の開発：

イムノクロマト法においても免疫ラット血清やソウル型ハンタウイルス自然感ドブネズミ血清で良好なバンドを多くの検体で得ることができた。HTN、PUUV および ANDV の核蛋白を抗原とすることでそれらの血清型を鑑別することができた。また、患者血清 (HTN、PUUV および ANDV) についても限られた数の検体を用いた解析ではあるが抗体の検出が可能であった (図 3)。今後、感度および特異性を詳細に評価することが必要である。

3. 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た。

ANDV, SNV, LNV, CARV, BCCV, MAPV ウイルスについてクローニングを進めている。変異の確認および修正を終了した ANDV, SNV, LNV については発現の成功を確認した。CARV 他については現在作業を進めている。これらの組換えエンベロープ糖タンパクが VSV に外套されるかどうかの確認も進めている。

4: ハンタウイルス肺症候群 (HPS) モデルマウスの作成

SCID マウスへのプロトタイプウイルスの接種により、接種後約 2 週で肺水腫が起こることが分かった。肺の湿重量が上がり、肺胞への滲出液の貯留が起こった。機能的な T および B リンパ球を欠く SCID マウスでの現象であることから、これらの細胞の肺水腫への関与を排除できる。そこで、気管支洗浄液(BAL)に滲出している細胞を特定したところ、明らかに好中球が増加していることが明らかとなった。そこで、好中球の表面マーカーである GR-1 抗体を SCID マウスへ投与して好中球を減じる処置を行ったところ、肺水腫を起こす肺胞の率が低下し、好中球の肺水腫に関する病原性発現への関与が示された。病的にこの肺水腫は炎症像を欠く点等が HPS 患者と共通しており、この実験系が HPS の動物モデルとなりうる可能性が示された (図 4)。

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。本研究の研究成果から、N 末端削除 N 抗原は、新世界ハンタウイルス血清型鑑別抗原として有用であることが示された。また、イムノクロマト法による血清診断がげっ歯類と人血清のいずれにおいても応用可能と考えられたので、更なる開発を進めたい。シュードタイプウイルスを利用した代替え中和試験法の開発はいまだ途上であるが、中和抗体価の測定は、防御免疫のレベルをはかるために不可欠であることから、本法についても安全な中和抗体測定法としてされに開発を継続したい。以上の結果、本研究では急務を要する HPS 関連ウイルスの診断システムについて、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と考えられる。

しかしながらこのグループの新世界ハンタウイルスは現在も種類を増やしつつある。現在知られているウイルスの病原性との関連が明らかではない HPS 関連ウイルスのための鑑別法の確立を進めている。また、新しいウイルスが出現した際には迅速に分類し、準備を行う必要があると考えられるので、今回示したような遺伝子解析からグループ分けを行うことは診断/検査の実施上重要である。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。

さらに今年度はプロトタイプハンタウイルスが SCID マウスに肺水腫を起こすことを示し、この肺水腫が HPS の患者と共通点

があることから、HPS の動物モデルとなりうる可能性を示した。また、この肺水腫に好中球が関与している可能性を示した。このモデルの有用性を明らかにすることは、HPS の発症予防／治療法の開発につながると思われる。

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

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Gamage CD, Yasuda SP, Nishio S, Kularatne SA, Weerakoon K, Rajapakse J, Nwafor-Okoli C, Lee RB, Obayashi Y, Yoshimatsu K, Arikawa J, Tamashiro H (2011) Serological evidence of Thailand virus-related hantavirus infection among suspected leptospirosis patients in Kandy, Sri Lanka. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 64: 72-75

2) Yasuda SP, Yoshimatsu K, Koma T, Shimizu K, Endo R, Isozumi R, Arikawa J (2012) Application of Truncated Nucleocapsid Protein (N) for Serotyping ELISA of Murinae-Associated Hantavirus Infection in Rats. *Journal of Veterinary Medical Science* 74: 215-219

3) Kariwa H, Yoshida H, Sanchez-Hernandez C, Romero-Almaraz MD, Almazan-Catalan JA, Ramos C, Miyashita D, Seto T, Takano A, Totani M, Murata R, Saasa N, Ishizuka M, Sanada T, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I (2012) Genetic diversity of hantaviruses in Mexico: Identification of three novel hantaviruses from Neotominae rodents. *Virus Research* 163: 486-494

4) Seto T, Tkachenko EA, Morozov VG, Tanikawa Y, Kolominov SI, Belov SN, Nakamura I, Hashimoto N, Kon Y, Balakiev AE, Dzagurnova TK, Medvedkina OA, Nakauchi M, Ishizuka M, Yoshii K, Yoshimatsu K, Ivanov LV, Arikawa J, Takashima I, Kariwa H (2011) An efficient in vivo method for the isolation of Puumala virus in Syrian hamsters and the characterization of the isolates from Russia. *Journal of Virological Methods* 173: 17-23

5) Sanada T, Kariwa H, Nagata N, Tanikawa Y, Seto T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I (2011) Puumala virus infection in Syrian hamsters

- (*Mesocricetus auratus*) resembling hantavirus infection in natural rodent hosts. *Virus Research* 160: 108-119
- 6) Li TC, Yoshimatsu K, Yasuda PS, Arikawa J, Koma T, Kataoko M, Ami Y, Suzaki Y, Le Thi Quynh M, Nguyen Thuy H, Yamashiro T, Hasebe F, Takeda N, Wakita T (2011) Characterization of self-assembled virus-like particles of rat hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *Journal of General Virology* *in press*
2. 学会発表
- 1) Yasuda PS, Yoshimatsu K, Endo R, Shimizu K, Koma T, Isozumi R, Arikawa J Development of the method for monitoring cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to hantavirus in laboratory rats. In: XV International Congress of Virology, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011 Sep 11-16)
- 2) Shimizu K, Yoshimatsu K, Koma T, Yasuda PS, Arikawa J. Role of hantavirus nucleocapsid protein in intracellular traffic of glycoproteins. In: XV International Congress of Virology, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011 Sep 11-16)
- 3) Saasa N, Sanchez-Hernandez C, Yoshida H, Sanada T, Seto T, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Kariwa H. The identification of the rodent reservoir of Montano virus, a novel hantavirus in Mexico. In: XV International Congress of Virology, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011 Sep 11-16)
- 4) Nakamura I, Hang'Ombe BM, Sawa H, Takada A, Yoshimatsu K, Arikawa J, Sugimoto C. Sero-surveillance of hantavirus in rodents captured in zambia, in 2010. In: XV International Congress of Virology, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011 Sep 11-16)
- 5) Li TC, Yoshimatsu K, Yasuda PS, Arikawa J, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Wakita T. Characterization of virus-like particles of rat hepatitis E virus generated by recombinant baculovirus. In: XV International Congress of Virology, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011 Sep 11-16)
- 6) Koma T, Yoshimatsu K, Shimizu K, Yasuda PS, Isozumi R, Arikawa J. Analysis of pulmonary edema in hantavirus- infected SCID mouse. In: XV International Congress of Virology, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011 Sep 11-16)
- 7) Isozumi R, Yoshimatsu K, Pattamadilok S, Kumperasart S, Arikawa J. Seroprevalence of anti-leptospira antibodies among patients with acute febrile illness with renal dysfunction in spite of negative result with several laboratorial leptospira

tests in thailand. . In: XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011 Sep 6-10)

- 8) Arikawa J, Yoshimatsu K, Kariwa H. Truncated hantavirus nucleocapsid proteins as useful diagnostic antigen for serotyping old and new world hantavirus infections in humans and rodents. . In: 46th European Meeting on Viral Zoonoses, St Raphael, France, (

- 9) Arikawa J, Yoshimatsu K, Kariwa H Truncated Hantavirus Nucleocapsid Proteins for Serotyping Old and New World Hantavirus Infections in Humans and Rodents. In: 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Li Ka Shing Center for Learning and Knowledge, Stanford University, CA, USA (2011)

- 10) 清水健太、吉松組子、駒貴明、安田俊平、有川二郎：ハンタウイルス糖蛋白質の細胞内輸送に関与するウイルス蛋白質とその機能領域. 第152回日本獣医学会学術集会, 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス (堺市), 2011.9.19～20)

- 11) 天田 貴子、駒 貴明、安田 俊平、清水 健太、五十棲 理恵、高倉 彰、吉松組子、有川二郎: イムノクロマト法によるハンタウイルス感染ラットの迅速抗体検出の開発に関する研究 第8

回 北海道実験動物研究会学術集会 (HALAS) (北海道) 2011.7

H 知的財産権の出願・登録状況
現在出願予定はない。

図1. ハンタウイルス感染症

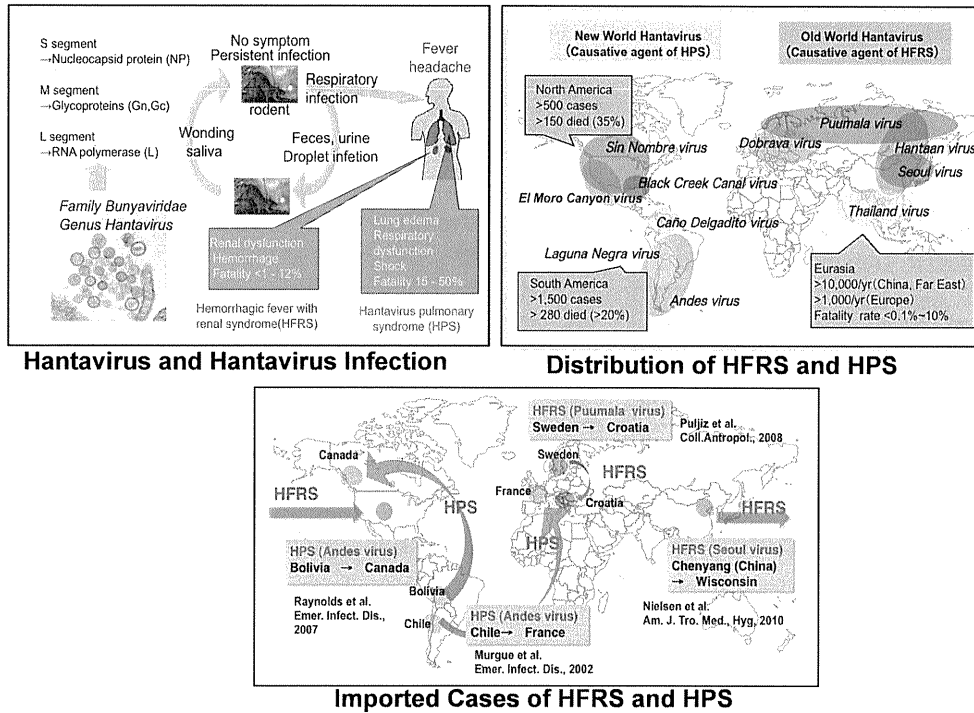
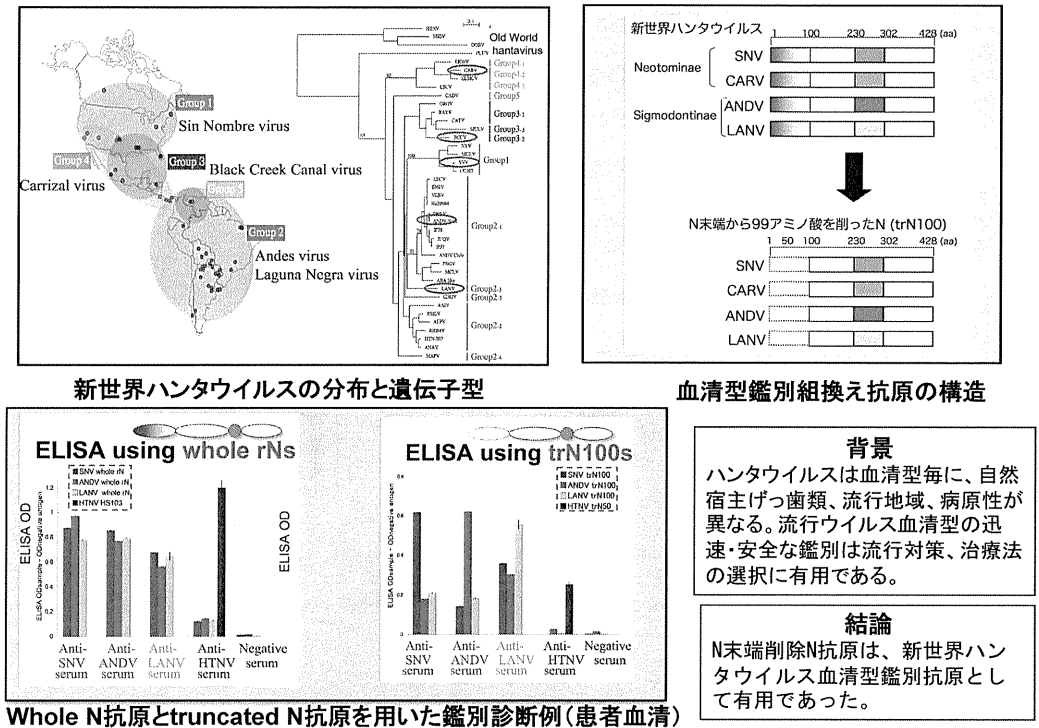


図2. 新世界ハンタウイルス血清型鑑別組換え抗原の作成と ELISA 法への応用



Whole N抗原とtruncated N抗原を用いた鑑別診断例 (患者血清)

図 3. イムノクロマト法と ELISA による患者血清中の抗体検出

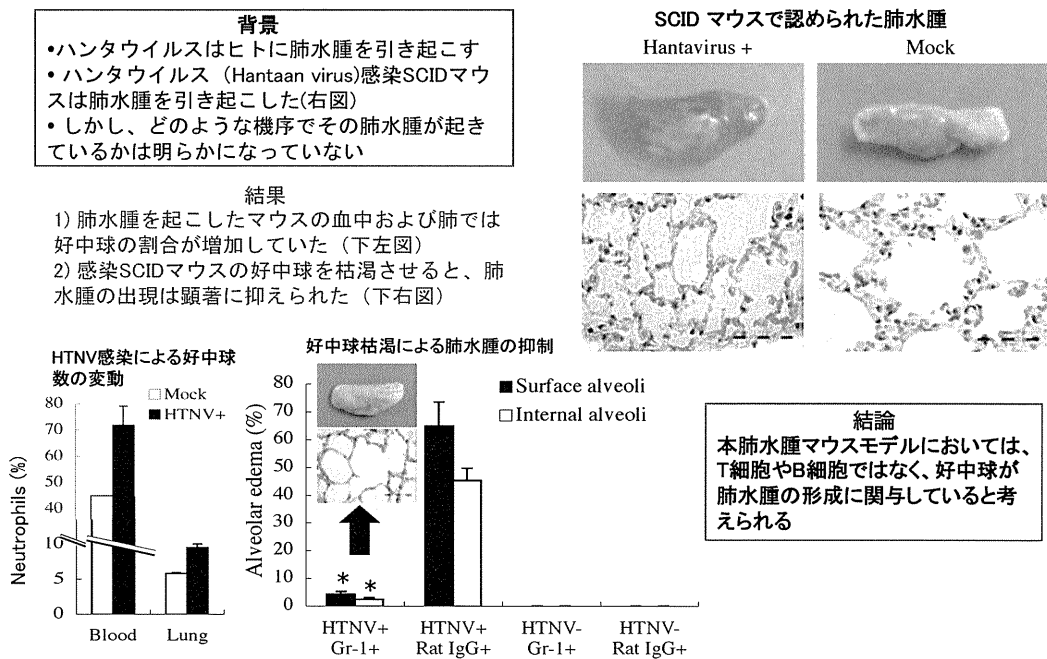
Sensitivity of ICG compared with ELISA

Results of anti-hantavirus antibody detection by one antigen ICG and ELISA for patient serum.

	Antibody rNPs	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	ELISA titers
HANTV patient serum	HS103	+	+	+	-	X25,600
SEOV patient serum	HS103	+	+	+	-	X12,800
ANDV patient serum	AS103	+	+	+	-	X10,000
PUUV patient serum	PUU103	+	+	-	-	X1,000
control	each	-	-	-	-	<200

The results showed the ICG had similar sensitivity to ELISA.

図 4. ハンタウイルス感染 SCID マウスで認められた HPS 様肺水腫と好中球の役割について



厚生労働科学研究費補助金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：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主任研究官）

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*)にトガリネズミ形目(旧食虫目)由来の新しいハンタウイルスが報告されてから、世界各地でトガリネズミ形目を宿主とするハンタウイルスが相次いで明らかになった。更に2011年にはアフリカ大陸の翼手目にも新しいハンタウイルスが明らかになり、これまで自然宿主と認識されていなかった生物種にもハンタウイルスが感染している事実が明らかになった。そこで、日本および近隣諸国で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。国内では、北海道や九州、沖縄地域に生息するトガリネズミ形目小動物で調査を行った。また、近隣国では、中国および韓国の齧歯目、モンゴルの齧歯目、トガリネズミ形目及び翼手目、フィリピンの翼手目を用いて調査を行った。その結果、北海道およびモンゴルのトガリネズミ形目と中国の齧歯目小動物にハンタウイルス遺伝子断片の検出に成功した。検出した遺伝子断片は極めて短いため、更に長い遺伝子配列の増幅を進めている。

研究協力者：浜田雅史、多屋馨子、岡部信彦(国立感染症研究所感染症情報センター)、Kyle Taylor、西澤次訓、坪田敏男(北海道大学獣医学部)、大館智志(北海道大学低温科学研究所)、森川茂(国立感染症研究所ウイルス第一部)

A. 研究目的

2007年に韓国のチョウセンジネズミに新しいハンタウイルスが報告されて以来、世

界各国のトガリネズミ形目小型哺乳類が調査され、各地のトガリネズミ形目小型哺乳類を宿主とする新しいハンタウイルスが報告されている。更に2011年には、アフリカ大陸の翼手目にも新たなハンタウイルスが確認され、これまで宿主と考えられてこなかった生物にもハンタウイルスが感染する事実が明らかになった。日本においては、1998年12月に感染症法施行以降ハンタウイルス感染症の患者サーベイランスが実施

されているものの、これまでのところ患者は報告されていない。一方、近隣国では中国で毎年数万人規模、韓国でも数百人規模の患者発生が確認されており、継続した対策を立てる必要のある感染症の一つである。

本年の調査では、まだ確認されていない新しいハンタウイルスを発見し、その感染リスクや患者発生の可能性を明らかにすることを目的として以下の研究を進めた。(1) 日本や近隣国で調査を行っていない生物種を対象とした疫学調査。(2) 診断法の確立やヒト病原性評価のための基礎データ収集である。

B. 研究方法

調査動物：

国内の調査は群馬県立自然史博物館の木村博士、岡山県の山田勝氏からトガリネズミ形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坪田博士らのグループと共に野外調査を実施しトガリネズミや野鼠を捕獲して調査を行った。モンゴルの小型哺乳類のサンプルは、モンゴル大学の Bazartseren 博士から分与を受けた。中国のサンプルは、福井大学の高田博士を介して入手した（図 1，表 1）。

ハンタウイルス遺伝子の検出：

新規ハンタウイルスの検出は、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。

C. 研究結果

ヒミズからのハンタウイルス遺伝子検出：

これまでに群馬県、岡山県、沖縄県、鹿児島県、北海道で捕獲もしくは拾得した個体の臓器の分与を受け調査を進めてきた。ヒミズ (*Talpidae*；モグラ科、*Urotrichus talpoides*) では、群馬県 4 検体、和歌山県 1 検体、岡山県 12 検体を調査した。そのうち、群馬県と岡山県のサンプルに 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、東日本および西日本タイプのヒミズであった。

ジネズミからのハンタウイルス遺伝子検出：

Crocidurinae (ジネズミ亜科) に属するジネズミでは、鹿児島県屋久島のニホンジネズミ (*Crocidura dsinezumi*) 9 検体、沖縄県与那国島および宮古島の 24 検体について調査を行ったが、陽性検体は確認できなかった。

トガリネズミからのハンタウイルス遺伝子検出：

Soricinae (トガリネズミ亜科) のトガリネズミでは、北海道に生息している *Sorex* 種について調査を行った。ヒメトガリネズミ (*S. gracillimus*) 14 検体、オオアシトガリネズミ (*S. unguiculatus*) 78 検体および未同

定 66 検体を捕獲もしくは分与を受け調査を行った。その結果、複数の検体に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。

モンゴルと中国の疫学調査：

近隣諸国の疫学調査として、モンゴル、フスグル湖 (Khovsgol Lake) 周辺の小型哺乳類のサンプル 136 頭(齧歯目 50 頭、トガリネズミ形目 68 頭、翼手目 18 頭)をモンゴル大学の Bazartseren 博士から、また、中国磐安県のラットサンプル 26 頭を高田博士らから分与いただき調査を行った。その結果、モンゴルの *Sorex* および中国のラットから特異的な遺伝子増幅が確認され、ハンタウイルスの検出に成功した。

コウモリからのハンタウイルス遺伝子検出：

翼手目としては、研究代表者である森川らと共に、フィリピンの翼手目について調査を行った。*Rhinolophus rufus* 4 頭、*Rhinolophus* sp. 2 頭、*Emballonura alecto* 9 頭、*Haplonycteris fischeri* 6 頭、*Macroglossus minimus* 2 頭、*Ptenochirus jagori* 46 頭、*Rousettus amplexicaudatus* 6 頭、*Cynopterus brachyotis* 81 頭の 156 頭について調査を行ったが現在までのところハンタウイルス感染は確認できていない。

D. 考察

日本ではこれまで、北海道のエゾヤチネズミおよび三重県のヒミズにハンタウイルス感染が確認されている。今年度の調査では、昨年度に続き東日本タイプのヒミズに ASAV 感染を検出した。またこれに加え、岡山県の西日本タイプのヒミズにも新たに ASAV 遺伝子を検出した。これらの結果から、ASAV は三重県、新潟県、群馬県、岡山県のヒミズに感染が確認され、日本全国のヒミズに広く感染している可能性が示唆された。日本に生息している哺乳類は、遺伝子性状から東日本タイプと西日本タイプに分類可能で、氷河期の海面の低下による生物大移動による移動時期の違いにより両者の違いが現れていると推測されている。今回確認された西日本タイプと東日本タイプの ASAV も完全に両者が異なるクラスターを形成していることが明らかになったことから、ASAV は、ヒミズが日本に移動してくる前から感染しており、日本に移動してきた時期が異なっていたために遺伝的に異なるクラスターを形成している可能性が示唆された。

今年度、北海道において複数回の捕獲調査を実施し、100 頭を超える数のトガリネズミを用いてハンタウイルス感染の有無を調査した。その結果、複数のトガリネズミに新しいハンタウイルス感染を確認した。検出した遺伝子断片が短く、詳細は不明であるがヒミズ以外のトガリネズミにも ASAV とは異なるハンタウイルスが感染している可能性が示唆されている。今後全長配列を決定すると共に、ウイルス分離や血

清抗体測定法など複数の診断系の確立もすすめる必要がある。

特筆すべき情報として 2011 年に初めて翼手目にハンタウイルス感染が確認された。報告によれば、その遺伝子性状は系統樹解析においてトガリネズミ形目を宿主とする Thottapalayam virus、Imjin virus および Nova virus と近縁の位置に来ることが示されている。今後新たな翼手目ハンタウイルスや異なる生物種のハンタウイルスの検索のためにユニバーサルなプライマーセットの検索も同時に進めていく必要がある。今年度の調査では、トガリネズミ形目に加え、齧歯目ハンタウイルスについても我々のプライマーセットが十分有効であることが明らかになった。今後更にデータを蓄積し、よりマルチプルなユニバーサルプライマーのセットを明らかにしていく予定である。

E. 結論

1. 新たに東日本タイプと西日本タイプのヒミズから Asama virus(ASAV)の検出に成功し、ASAV に感染したヒミズが太古に日本に移動してきた可能性が改めて明らかになった。
2. 北海道のトガリネズミ形目について複数回の捕獲調査を実施したところ、複数のトガリネズミに新しいハンタウイルス感染を確認した。
3. モンゴルの齧歯目、トガリネズミ形目および翼手目についてハンタウイルス感染を検索したところ、トガリネズミ形目に新しいハンタウイルス感染

を証明し、モンゴルのトガリネズミ形目にもハンタウイルスが感染していることが明らかになった。

4. 既知のハンタウイルスを基にデザインしたユニバーサルプライマーを用いることで中国の齧歯目に Da Bie Shan virus (DBSV)を検出した。今後翼手目ハンタウイルスも含めたユニバーサルプライマーのデザインを進め、多様なハンタウイルス検出に使用できる診断用プライマーの開発を目指す必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea. Satoru Arai, Se Hun Gu, Luck Ju Baek, Kenji Tabara, Shannon N. Bennett, Hong-Shik Oh, Nobuhiro Takada, Hae Ji Kang, Keiko Tanaka-Taya, Shigeru Morikawa, Nobuhiko Okabe, Richard Yanagihara, Jin-Won Song. 2012. *Virology*. *in press*.

2. 学会発表

1. S. Arai, S. H. Gu, L. J. Baek, K. Tabara, H.-S. Oh, N. Takada, H. J. Kang, K. Tanaka-Taya, S. Morikawa, N. Okabe, R. Yanagihara, J.-W.

Song. Expanded evolutionary insights from Jeju virus, a newfound hantavirus harbored by the Asian lesser white-toothed shrew (*Crocidura shantungensis*). XV International Congress of Virology. Sapporo, Hokkaido Japan. 11-16 September 2011

2. 新井 智, H. J. Kang, 大館智志, J. A. Cook, 多屋馨子, 森川茂, 岡部信彦, R. Yanagihara. A Newfound Hantavirus Harbored by *Sorex caecutiens* in Russia and Japan. 日本哺乳類学会 2011 年度大会. 宮崎県宮崎市. 2011 年 9 月 8 日-11 日
3. H. J. Kang, 新井智, J.-W. Song, J. A. Cook, R. Yanagihara. Evolutionary Insights from Newfound Soricomorph-Borne Hantaviruses. 日本哺乳類学会 2011 年度大会. 宮崎県宮崎市. 2011 年 9 月 8 日-11 日

H 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

図 1. 調査国、地域

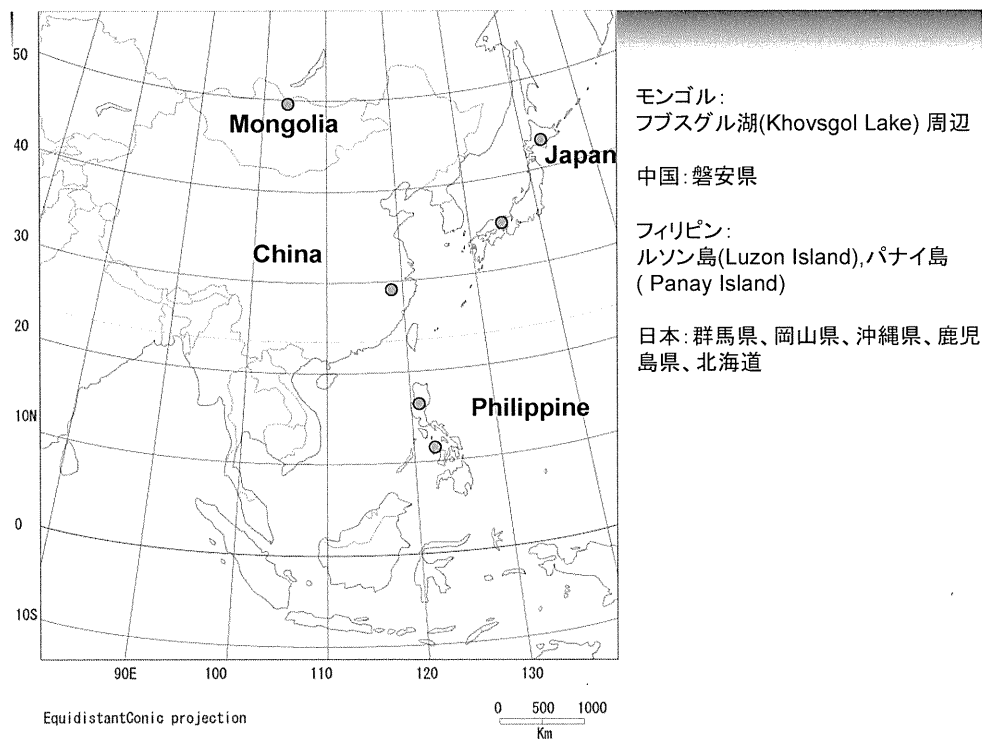


表 1. 2010-2011 年に調査した動物

	Genus species	Year	Japan	Mongolia	Philippines	総計
Soricomorpha (トガリネズミ形目)	<i>Mogera wogura</i>	2010	3			3
		2011	4			4
	<i>Chimarrogale platycephala</i>	2010	1			1
	<i>Crocidura dsinezumi</i>	2010	3			3
		2011	16			16
	<i>Sorex</i>	2011	70			70
	<i>Sorex caecutiens</i>	2010	4	10		14
		2011	3	11		14
	<i>Sorex gracillimus</i>	2011	14			14
	<i>Sorex minutissimus</i>	2010		5		5
		2011		1		1
	<i>Sorex roboratus</i>	2011		1		1
	<i>Sorex tundrensis</i>	2010		11		11
		2011		29		29
	<i>Sorex unguiculatus</i>	2010	6			6
		2011	78			78
	<i>Suncus murinus</i>	2011	24			24
<i>Urotrichus talpoides</i>	2010	4			4	
	2011	11			11	
Rodentia (齧歯目)	<i>Cricetulus barabensis</i>	2010		1		1
	<i>Microtus gregalis</i>	2010		1		1
		2011		11		11
	<i>Microtus middendorffi</i>	2010		12		12
		2011		19		19
	<i>Microtus oeconomus</i>	2010		3		3
	2011		2		2	
<i>Myopus schisticolor</i>	2011		1		1	
Chiroptera (翼手目)	<i>Plecotus auritus</i>	2011		18		18
	<i>Ptenochirus jagori</i>	2010			32	32
	<i>Rhinolophus rufus</i>	2010			4	4
	<i>Rouseffus amplexicaudatus</i>	2010			1	1
	<i>Cynopterus brachyotis</i>	2010			73	73
	総計		241	136	110	487