

- T., Ikenaka, Y., Ishizuka, M., Arikawa, J. and Kariwa, H.: EPIZOOTIOLOGICAL INVESTIGATION OF HANTAVIRUS INFECTION IN JAPAN AND GENETIC VARIATION OF HOKKAIDO VIRUS IN MYODES RUFOCANUS: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 10) Saasa, N., Sánchez-Hernández, C., Romero-Almaraz, M. de L., Yoshida, H., Sanada, T., Seto, T., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. Takashima, I. and Kariwa, H.: THE IDENTIFICATION OF THE RODENT RESERVOIR OF MONTANO VIRUS, A NOVEL HANTAVIRUS IN MEXICO: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 11) Kariwa, H., Seto, T., Yoshikawa, K., Tkachenko, TE.A., Morozov, V.G., Ivanov, L. I., Slonova, R., Zakharycheva, T. A., Yoshii, K. and Takashima I: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HANTAVIRUSES FROM WILD RODENTS AND EPIDEMIOLOGY OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME IN RUSSIA: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 12) Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Kariwa, H., Holbrook, M.R. and Takashima, I.: CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF CHIMERIC VIRUS BETWEEN TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS AND OMSK HEMORRHAGIC FEVER VIRUS: The 3rd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2011. Sapporo (2011, 9)
- 13) Seto, T., Nagata, N., Yoshikawa, K., Ichii, O., Sanada, T., Saasa, N., Kon, Y., Yoshii, K., and Kariwa, H.: DEVELOPMENT OF THE LETHAL ANIMAL MODEL OF HUMAN HANTAVIRUS INFECTION: The 3rd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2011. Sapporo (2011, 9)
- 14) Sanada, T., Seto, T., Ozaki, Y., Saasa, N., Yoshii, K., and Kariwa, H.: HIGH SUSCEPTIBILITY OF CULTURED CELLS DERIVED FROM THE KIDNEY OF GRAY RED-BACKED VOLE (MYODES RUFOCANUS) TO PUUMALA VIRUS AND OTHER HANTAVIRUSES: The 3rd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2011. Sapporo (2011, 9)
- 15) Saasa, N., Sánchez-Hernández, C., Romero-Almaraz, M. de L., Yoshida, H., Sanada, T., Seto, T., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. Takashima, I. and Kariwa, H.: THE IDENTIFICATION OF THE RODENT RESERVOIR OF MONTANO VIRUS, A NOVEL HANTAVIRUS IN MEXICO: The 3rd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2011. Sapporo (2011, 9)
- 16) 山崎翔子、好井健太郎、真田崇弘、苺和宏明、高島郁夫: 2008年北海道で分離されたダニ媒介性脳炎ウイルス Oshima 08-AS 株の病原性解析: 第152回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
- 17) 好井健太郎、森藤可南子、永田典代、佐々木宣哉、苺和宏明、安居院高志、高島郁夫: 野生マウス由来 *Oas* 遺伝子座導入コンジェニックマウスにおけるダニ媒介性脳炎ウイルスの神経病原性の解析: 第152回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
- 18) 柳原なつみ、好井健太郎、石塚万里子、苺和宏明、高島郁夫: ダニ媒介性脳炎ウイルスの E 蛋白糖鎖は哺乳動物細胞におけるウイルス粒子分泌に影響する: 第

- 152 回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
- 19) 尾崎由佳、萩谷友洋、真田崇弘、瀬戸隆弘、Taylor Kyle、吉川佳佑、Ivanov Leonid、好井健太郎、坪田敏男、池中良徳、石塚真由美、吉松組子、有川二郎、苺和宏明：日本のげっ歯類のハンタウイルス感染状況に関する血清疫学調査とエゾヤチネズミが保有する Hokkaido ウイルスの遺伝的多様性：第 152 回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
 - 20) 真田崇弘、瀬戸隆弘、尾崎由佳、Saasa Ngonda、好井健太郎、苺和宏明：エゾヤチネズミ (*Myodes rufocanus*) の腎臓由来細胞系の確立と Hokkaido ウイルス分離への応用：第 152 回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
 - 21) 川岸崇裕、日向亮輔、加藤文博、好井健太郎、高島郁夫、三浦智行、五十嵐樹彦、小林剛：新規相同組換え技術による組換えダニ媒介性脳炎ウイルスの構築：第 152 回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
 - 22) 好井健太郎、山崎翔子、持館景太、苺和宏明、高島郁夫：2008 年北海道におけるダニ媒介性脳炎ウイルスの分離と性状解析：第 11 回人と動物の共通感染症研究会学術集会、東京(2011, 11)
 - 23) 境瑞紀、好井健太郎、高野絢子、大森優紀、横澤香菜、苺和宏明、高島郁夫：リバーズジェネティクスを用いた極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの病原性決定因子の解析：第 18 回トガ・フラビ・ペステウイルス研究会(2011, 11)
 - 24) 日向亮輔、川岸崇裕、加藤文博、好井健太郎、高島郁夫、三浦智行、五十嵐樹彦、小林剛：フラビウイルスにおける宿主 DNA 修復機構を用いた新規リバーズジェネティクス系の開発：第 18 回トガ・フラビ・ペステウイルス研究会(2011, 11)
 - 25) 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. XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo2011.
 - 26) Shimizu K, Yoshimatsu K, Koma T, Yasuda PS, Arikawa J. Role of hantavirus nucleocapsid protein in intracellular traffic of glycoproteins. XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo2011.
 - 27) 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. XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo2011.
 - 28) 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. XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo2011.
 - 29) Koma T, Yoshimatsu K, Shimizu K, Yasuda PS, Isozumi R, Arikawa J. Analysis of pulmonary edema in hantavirus-infected SCID mouse. XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo2011.
 - 30) 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. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology.

- Sapporo Convention Center,
Sapporo2011.
- 31) 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. . 46th European Meeting on Viral Zoonoses. St Raphael, France, 2011.
 - 32) Arikawa J, Yoshimatsu K, Kariwa H. Truncated Hantavirus Nucleocapsid Proteins for Serotyping Old and New World Hantavirus Infections in Humans and Rodents. 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, USA2011.
 - 33) Arikawa J. Prevalence of Hantavirus Infection among Humans and Animals in Vietnam. . The Scientific Conference: “Pasteur Institute in Ho Chi Minh City–120 Years for Control and Prevention of Communicable Diseases”, Ho Chi Minh City, Vietnam, 17–18 November 2011. Ho Chi Minh City, Vietnam2011.
 - 34) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Yoshikawa–(Iwata), N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Immune responses against EEV and IMV in non–human primates infected with monkeypox virus or vaccinated with a highly attenuated smallpox vaccine LC16m8 and protection from lethal monkeypox. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
 - 35) Sayama, Y, Fukushi, S, Saito, M, Taniguchi, S., Iizuka, I., Mizutani, T., Kurane, I., Saijo, M.: A serological survey of *reston ebolavirus* infection in swine during epizootic in 2008 in the Philippines. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
 - 36) Taniguchi, S., Watanabe, S., Iha, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Saijo, M., Kurane, I., Kyuwa, S., Akashi, H., Yoshikawa, Y., Morikawa, S.: The detection of reston ebolavirus antibodies in wild bats in the Philippines. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
 - 37) Nishizono A., Yamada K., Ito N., Inoue S., and Park C.–H. Pathogenesis and immune evasion of rabies virus in the mouse. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases. US–Japan Cooperative Medical Science Program. 20–22 June, 2011. Stanford University, California, USA.
 - 38) Park C.–H. and Inoue S. Neuropathological studies of the mouse experimentally inoculated three bat rabies viruses isolated in Brazil. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases. US–Japan Cooperative Medical Science Program. 20–22 June, 2011. Stanford University, California, USA.
 - 39) Park C.–H., Ishida M., Kojima D., Sato G., Ito F.H. and Inoue S. Neuropathological studies of the mouse experimentally inoculated three bat rabies viruses isolated in Brazil. Global Conference o Rabies Control. 7–9 Sep, 2011. Incheon, Republic of Korea.
 - 40) Inoue S., Bazartseren B., Tuya N., Dulam P., Batchuluun D, Sugiura N, Okutani A., Kaku Y., Noguchi A., Kotaki A. Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Mongolia, 2005–2008. Current Issues on Zoonotic Diseases. International Scientific Congerence, 80th anniversary of

- establishment of the national center for infectious diseases with natural foci in Mongolia. 15 Sep, 2011. Ulaanbaatar, Mongolia.
- 41) Marissen W.E., Ellison J., Niezgodna M., Kuzmin I., Kuzmina N., Franka R., Weverling G., Meijer J., Rasuli A., Sodoyer R., Laffly L., Quiambo B., Kamigaki T., Oshitani H., Saito M., Inoue S., Tang Q., Rahman S.A., Rupprecht C.E., Goudsmit J. Global evaluation of neutralizing activity of CL184, a monoclonal antibody combination against rabies. 22nd International Conference on Rabies in the America. 16-21 Oct, 2011. Puerto Rico.
- 42) Orbina J.R., Saito M., Inoue S., de Guzman A., Kamigaki T., Demetria C., Sugiura N., Noguchi A., Sekizuka T., Kuroda M., Bajaro J.D., Manalo D., Quiambao B.P., Segubre-Mercado E., Olveda R., Oshitani H. Molecular epidemiology of rabies in the Philippines. Rabies in Asia Conference (RIACon). 28-29 Nov, 2011. Sri Lanka.
- 43) 杉浦尚子、宇田晶彦、小嶋大亮、野口章、奥谷晶子、加来義浩、朴 天鎬、山田章雄、井上 智。狂犬病ウイルス (CVS-11 株) を末梢感染させた C57BL/6J マウスの脳脊髄における免疫関連遺伝子のマイクロアレイ解析。第 58 回 日本ウイルス学会学術集会、2010、11 月、徳島県郷土文化会館、徳島県
- 44) 杉浦尚子、宇田晶彦、小嶋大亮、野口章、奥谷晶子、加来義浩、朴 天鎬、山田章雄、井上 智。狂犬病ウイルス (CVS-11 株) を末梢感染させた C57BL/6J マウスの脳脊髄における宿主遺伝子のマイクロアレイ解析。第 10 回 狂犬病研究会、2011、3 月、ホテル湯布院倶楽部、大分県
- 45) 小嶋大亮、朴 天鎬、石田 誠、佐藤 豪、野口 章、小宮尚之、久保達也、畑井 仁、小山田敏文、井上 智。狂犬病野外株接種マウスの中枢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。第 10 回 狂犬病研究会、2011、3 月、ホテル湯布院倶楽部、大分県
- 46) Nakagawa, K., Ito, N., Masatani, T., Abe, M., Yamaoka, S., Sugiyama, M. Generation of rabies virus strain attenuated by multiple mechanisms. XV International Congress of Virology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (2011, 9).
- 47) Yamaoka, S., Ito, N., Masatani, T., Abe, M., Nakagawa, K., Okadera, K., Sugiyama, M. All viral genes contribute to different pathogenicities of rabies virus Nishigahara and Ni-CE strains. XV International Congress of Virology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (2011, 9).
- 48) 忽那賢志、笠原敬、高野 愛、大西真、川端寛樹。ウズベキスタンからの輸入回帰熱の 1 例。第 63 回日本衛生動物学会大会。2011 年 4 月。東京。
- 49) 忽那賢志、笠原敬、三笠桂一、高野 愛、川端寛樹。本邦初の回帰熱症例。第 85 回日本感染症学会総会。2011 年 4 月。東京。
- 50) 尾田真也、壁谷英則、横山栄二、平井晋一郎、黒木俊郎、小林信一、相馬幸作、増子孝義、丸山総一：わが国の鹿における志賀毒素産生大腸菌の保有状況について：第 152 回日本獣医学会学術集会、大阪 (2011, 9)
- 51) 白川 唯、壁谷英則、佐藤真伍、尾田真也、小林信一、相馬幸作、増子孝義、藤田博己、丸山総一：わが国の鹿科動物とその外部寄生虫におけるリケッチア DNA 保有状況：第 152 回日本獣医学会学術集会、大阪 (2011, 9)
- 52) 壁谷英則、田中麻菜世、丸山総一。猫、犬

- に寄生した猫ノミからの *Rickettsia felis* および *Bartonella* 属菌の検出状況: 第 152 回日本獣医学会学術集会, 大阪 (2011, 9)
- 53) 佐藤真伍, 壁谷英則, 三浦達弥, 鈴木和男, 泉對博, 苺和宏明, 丸山総一: わが国の野生犬亜目から分離された *Bartonella* 属菌の遺伝子性状: 第 152 回日本獣医学会学術集会, 大阪 (2011, 9)
- 54) 佐藤真伍, 壁谷英則, 山崎真梨, 三浦達弥, 武野侍那子, 鈴木和男, 泉對博, 相馬幸作, 増子孝義, 小林信一, 苺和宏明, Michael Kosoy, Ying Bai, 丸山総一: わが国の野生動物に分布する *Bartonella* 属菌について: 第 11 回 人と動物の共通感染症研究会学術集会, 東京 (2011, 11)
- 55) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Sato Y, Morikawa S, Sata T. Interferon gamma protects adult BALB/c mice from lethal respiratory illness after mouse-adapted SARS-CoV infection. International union of microbiological societies 2011 Congress. Sapporo. Japan. 2011.9
- 56) 早坂大輔、藤井克樹、永田典代、堀朋子¹⁾、辻百衣璃、北浦一孝、田中香苗、佐多徹太郎、鈴木隆二、森田公一: 日本脳炎ウイルス感染後の重症化に関わる IL-10 応答、第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、金沢 (2011, 5)
- 57) 早坂大輔、藤井克樹、永田典、青木康太郎、堀朋子、辻百衣璃、北浦一孝、田中香苗、佐多徹太郎、鈴木隆二、森田公一: 日本脳炎ウイルス感染後の immunopathogenesis(免疫病原性)による重症化: 第 48 回ウイルス学会九州支部総会、門司 (2011, 8)
- 58) 日本脳炎ウイルス感染性 cDNA クローンの作製および性状解析: 高松 由基、ディン ティアン デュク、早坂 大輔、森田公一: 第 48 回ウイルス学会九州支部総会、門司 (2011, 8)
- 59) Daisuke Hayasaka, Yoshiki Fujii, Noriyo Nagata, Kazuki Kitaura, Kanae Tanaka, Tetsutaro Sata, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita: Multiple mechanisms for severe form following Japanese encephalitis virus infection: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo (2011, 9)
- 60) 日本脳炎ウイルス感染後の重症化に関わる IL-10 応答: 早坂大輔、藤井克樹、永田典代、堀朋子、辻百衣璃、北浦一孝、田中香苗、佐多徹太郎、鈴木隆二、森田公一: 第 152 回日本獣医学会学術集会、堺 (2011, 9)
- 61) 日本脳炎ウイルス感染後の免疫病原性による重症化: 早坂大輔、北浦一孝、永田典代、青木康太郎、藤井克樹、鈴木隆二、森田公一: 第 52 回日本熱帯医学会大会、東京 (2011, 11)
- 62) The Pathogenic mechanisms of Tick-Borne Encephalitis Virus by using IL-10 knock-out mice: Mya Myat Ngwe Tun, Daisuke Hayasaka, Kouichi Morita: 第 52 回日本熱帯医学会大会、東京 (2011, 11)
- 63) 日本脳炎ウイルス感染での TNF α 応答の役割: 早坂大輔、青木康太郎、Dash Sima Simanti, 田中香苗、森田公一: 第 17 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京 (2011, 11)
- 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

II. 研究分担者報告

海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究

ダニ媒介性脳炎の疫学

研究分担者 好井 健太郎 北海道大学大学院獣医学研究科 助教

研究協力者 永田 典代 国立感染症研究所 感染病理部第二室 室長

研究要旨:ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)はヒトに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。これまでの継続的な血清疫学調査により、道南地域には現在まで 10 年以上にわたってウイルスの流行巣が存続している事を明らかになっており、前年度の研究では北斗市のアカネズミより TBEV Oshima 08-AS 株を分離した。本年度ではマウスモデルを用いてこの株の病原性の解析を行った。1995 年分離の Oshima 5-10 株と比較したところ、Oshima 08-AS 株は発症率及び死亡率が高く病原性が高いことが示された。さらに脳内におけるウイルス増殖量にも差があり、組織病変もより顕著に認められた。Oshima 08-AS 株と Oshima 5-10 株との間のアミノ酸の相異はわずか 12 個であり、これが両者の病原性の差をもたらしていると考えられる。今後は同地域に存続している TBEV の疫学的危険度を予測していくためにも、このようなアミノ酸の変化にも注視しつつ TBEV の疫学調査を継続して行う必要があると考えられる。

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。

日本では 1993 年北海道上磯町(現北斗市)において初めて TBE 患者が発生し、その後の疫学調査により患者発生地域に TBE ウイルスの流行巣が存在することを明らかにしてきた。

これまでの所、新たな TBE 患者は発生していない。しかし我々は北海道を中心に継続的な血清疫学調査を行うことによって、道南地域には現

在まで 10 年以上にわたってウイルスの流行巣が存続している事を明らかにしてきた。さらに前年度の研究において北斗市で捕獲されたアカネズミから新たに TBEV Oshima 08-AS 株を分離した。

Oshima 08-AS 株は病原性の高い極東亜型に分類され、1995 年に分離された Oshima 5-10 株とは 35 ヶ所に塩基の相違が認められ、そのうち 12 ヶ所がアミノ酸の相違を伴うものだった。また培養細胞を用いた実験において、Oshima 08-AS 株は Oshima 5-10 株と生物性状に相違があることが示唆されたことから、今年度においては現在流行巣に存続している TBEV の疫学的危険度を評価していくために、Oshima 08-AS 株の動物モデルにお

ける病原性を解析した。

B. 研究方法

1) 使用ウイルス

2008年に捕獲した北斗市のアカネズミの脾臓より分離された TBEV Oshima 08-AS 株、及び 1995年に犬の血液より分離された Oshima 5-10 株を実験に使用した。

2) マウス感染実験

5週令の C57BL/6J マウスに各 TBEV を $10^2 \sim 10^6$ PFU 皮下接種し、体重変化や臨床症状を観察した。

また TBEV を 10^3 PFU 接種したマウスから、ウイルス接種後 3、6、9、12 日に血清、脾臓及び脳を採取し、各臓器のウイルスカ価を測定した。さらにウイルス接種後 10-11 日に臓器を採取し、HE 染色による病理組織像の観察及び免疫組織化学染色による組織中のウイルス抗原の検出を行った。

(倫理面からの配慮について)

本実験は北海道大学の動物実験委員会の承認を受けたものであり、動物福祉の観点からも問題ないと判断されている。

C. 研究結果

表 1 に示したように、Oshima 08-AS では全てのウイルス接種量において全てのマウスが発症し、死亡率は 60~100%となった。発症個体において 20%以上の体重減少や、後肢麻痺や平衡感覚消失といった神経症状を示したものが多く見受けられた。一方 Oshima 5-10 では 10^2 pfu 接種では発症せず、 $10^3 \sim 10^6$ pfu 接種では 40~100%の発症率および 0~60%の死亡率となった。発症個体は

神経症状を示した場合もあるが、重篤な症状を示さないまま回復する個体も多く見られた。どちらのウイルスも発症率および死亡率にウイルスの濃度依存性は認められなかったものの、ほとんどのウイルス接種量において Oshima 08-AS の方が Oshima 5-10 より発症率および死亡率が高くなった。

マウス体内でのウイルス動態を比較したところ、血清中のウイルスカ価は、接種 3 日後の個体からそれぞれ 1 匹ずつ検出された以外はすべて検出限界以下となった。脾臓では、両ウイルスともに接種 6 日後にウイルスカ価がピークとなり、その後減少していった(図 1)。脳では、両ウイルスともに接種 6 日後に初めてウイルスが検出され、ウイルスカ価は接種 12 日後まで上昇を続けた。有意差は認められなかったものの、すべての時点において Oshima 08-AS の方が比較的高いウイルスカ価を示した。

病理解析において、髄膜と脳血管周囲への炎症性細胞浸潤は、Oshima 08-AS 接種群では全てのマウスにおいて認められたのに対し、Oshima 5-10 接種群では 1 匹で認められたのみであった(表 2)。これら脳病変の認められた個体の脳からは神経細胞を中心にウイルス抗原が検出された。また、Oshima 08-AS 接種マウスでは胃の筋層神経叢でも炎症反応およびウイルス抗原が検出された。Oshima 5-10 接種マウスにおいては、ほとんどの個体においてウイルス抗原および炎症反応ともに認められなかった。

D. 考察

本研究の実験結果より、マウスモデルにおいて Oshima 08-AS 株は Oshima 5-10 株より高い病原

性を示すことが明らかになった。マウス体内でのウイルス動態を比較したところ、末梢でのウイルス増殖性に両株で差は認められなかった。これは、以前の培養細胞でのウイルス増殖性に両株で差が認められなかった結果と一致しており、末梢におけるウイルス複製効率の差が病原性の差に違いをもたらしているのではないことが示唆される。

しかしながら、脳においては Oshima 08-AS の方が比較的高いウイルス力価を示した。また病理組織像では、Oshima 08-AS 感染マウスの脳でウイルス抗原が検出される時期では、Oshima 5-10 感染マウスではまだウイルス抗原が検出されていない個体が多く認められた。従って脳内でのウイルス増殖量の差によって、病態にも差が生じていると考えられる。

Oshima 08-AS 株と Oshima 5-10 株との間のアミノ酸の相異はわずか 12 個であることから、両者の病原性をはじめとする生物性状の差は、自然界で生じた数個のアミノ酸の変異によってもたらされていると考えられる。よって今後はこの要因を明らかにしていくとともに、本地域で流行している TBE ウイルスについて、その危険度を予測していくためにもアミノ酸の変化を含めたモニタリングを継続して行っていく必要がある。

また我々はこれまでの研究で、北海道の他の地域や本州においても TBE ウイルスの流行巣が存在している可能性を指摘している。今後はこれらの地域における人への感染リスクを評価するため、住民を対象とした血清疫学調査も行うべきであると考えられる。さらに本研究と同様にウイルスの分離を試み病原性等を解析する事は今後の疫学的危険度を評価する上で重要な課題である

と考えられる。

E. 結論

前年度及び今年度の研究結果より、北海道北斗市の流行巣に存続している TBEV は、自然界で生じる数個のアミノ酸の変異によりウイルスの生物性状が変化し、病原性を上昇させる可能性があることが示唆された。今後は TBEV の疫学的危険度を予測していくためにも、このようなアミノ酸の変化にも注視しつつ TBEV の疫学調査を継続して行う必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1.論文発表

- 38) Kariwa, H., Yoshida, H., Sanchez-Hernandez, C., Romero-Almaraz, M.D., Almazan-Catalan, J.A., Ramos, C., Miyashita, D., Seto, T., Takano, A., Totani, M., Murata, R., Saasa, N., Ishizuka, M., Sanada, T., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I.: Genetic diversity of hantaviruses in Mexico: Identification of three novel hantaviruses from Neotominae rodents. *Virus Res.* epub ahead of print, 2011
- 39) Seto, T., Nagata, N., Yoshikawa, K., Ichii, O., Sanada, T., Saasa, N., Ozaki, Y., Kon, Y., Yoshii, K., Takashima, I. and Kariwa, H.: Infection of Hantaan virus strain AA57 leading to pulmonary disease in laboratory mice. epub ahead of print, 2011

- 40) Omori-Urabe, Y., Yoshii, K., Ikawa-Yoshida, A., Kariwa, H. and Takashima, I.: Needle-free jet injection of DNA and protein vaccine of the Far-Eastern subtype of Tick-borne encephalitis virus induced protective immunity in mice. *Microbiol. Immunol.* epub ahead of print, 2011
- 41) Totani, M., Yoshii, K., Kariwa, H. and Takashima, I.: Glycosylation of the Envelope Protein of West Nile Virus Affects Its Replication in Chicks. *Avian Diseases.* 55: 561-568, 2011
- 42) Takano, A., Yoshii, K., Omori-Urabe, Y., Yokozawa, K., Kariwa, H. and Takashima, I.: Construction of a replicon and an infectious cDNA clone of the Sofjin strain of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. *Arch. Virol.* 156: 1931-1941, 2011
- 43) Sanada, T., Kariwa, H., Nagata, N., Tanikawa, Y., Seto, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K. and Takashima, I.: Puumala virus infection in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) resembling hantavirus infection in natural rodent hosts. *Virus Res.* 160: 108-119, 2011
- 44) Murata, R., Hashiguchi, K., Yoshii, K., Kariwa, H., Nakajima, K., Ivanov, L.I., Leonova, G.N. and Takashima, I.: Seroprevalence of West Nile Virus in Wild Birds in Far Eastern Russia Using a Focus Reduction Neutralization Test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84: 461-465, 2011
- 45) Ikawa-Yoshida, A., Yoshii, K., Kuwahara, K., Obara, M., Kariwa, H. and Takashima, I.: Development of ELISA system for tick-borne encephalitis virus infection in rodents. *Microbiol. Immunol.* 55: 100-107, 2011
- 46) Seto, T., Tkachenko, E.A., Morozov, V.G., Tanikawa, Y., Kolominov, S.I., Belov, S.N., Nakamura, I., Hashimoto, N., Kon, Y., Balakiev, A.E., Dzagurnova, T.K., Medvedkina, O.A., Nakauchi, M., Ishizuka, M., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Ivanov, L.V., Arikawa, J., Takashima, I. and Kariwa, H.: An Efficient in vivo Method for THE Isolation OF PUUMALA VIRUS IN SYRIAN Hamsters and the Characterization of the isolates from russia. *J. Virol. Methods.* 173: 17-23, 2011
- 47) Yoshii, K., Mottate, K., Omori-Urabe, Y., Chiba, Y., Seto, T., Sanada, T., Maeda, J., Obara, M., Ando, S., Ito, N., Sugiyama, M., Sato, H., Fukushima, H., Kariwa, H. and Takashima, I.: Epizootiological Study of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 73: 409-412, 2011
- 48) Yoshii, K., Igarashi, M., Ito, K., Kariwa, H., Holbrook, M.R. and Takashima, I.: Construction of an infectious cDNA clone for Omsk hemorrhagic fever virus, and characterization of mutations in NS2A and NS5. *Virus Res.* 155: 61-68, 2011
- 49) 好井健太郎、持館景太、苺和弘明、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、*獣医畜産新報*、64: 801-803, 2011
- 50) 苺和宏明、好井健太郎、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎、*公衆衛生*、75: 36-38, 2011

2.学会発表

- 1) 瀬戸隆弘、吉川佳佑、真田崇弘、Ngonda Saasa、尾崎由佳、市居修、好井健太朗、昆泰寛、苅和宏明:腎症候性出血熱の致死感染モデルの開発とその病態解析:第151回の本獣医学会、東京(2011,3)
- 2) 好井健太朗、寸田祐嗣、横澤香菜、苅和宏明、Michael R. Holbrook、高島郁夫:ダニ媒介性脳炎/オムスク出血熱のキメラウイルスを用いた病態発現機序の解析:第15回日本神経ウイルス研究会、金沢(2011,5)
- 3) 好井健太朗、森藤可南子、永田典代、浅野淳、佐々木宣哉、苅和宏明、安居院高志、高島郁夫:野生マウス由来 *Oas* 遺伝子座導入コンジェニックマウスの作製とフラビウイルス抵抗性の解析:第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会、金沢(2011,5)
- 4) Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Kariwa, H., Holbrook, M.R. and Takashima, I.: CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF CHIMERIC VIRUS BETWEEN TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS AND OMSK HEMORRHAGIC FEVER VIRUS: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 5) Yamazaki, S., Yoshii, K., Mottate, K., Murata, R., Sanada, T., Kariwa, H. and Takashima, I.: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN HOKKAIDO, JAPAN IN 2008: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 6) Yanagihara, N., Yoshii, K., Goto, A., Ikawa, A., Ishizuka, M., Kariwa, H. and Takashima I.: ROLE OF THE N-LINKED GLYCAN OF ENVELOPE PROTEIN OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN THE VIRUS REPLICATION AND PATHOGENICITY: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 7) Seto, T., Nagata, N., Yoshikawa, K., Ichii, O., Sanada, T., Saasa, N., Kon, Y., Yoshii, K., and Kariwa, H.: DEVELOPMENT OF THE LETHAL ANIMAL MODEL OF HUMAN HANTAVIRUS INFECTION: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 8) Sanada, T., Seto, T., Ozaki, Y., Saasa, N., Yoshii, K., and Kariwa, H.: HIGH SUSCEPTIBILITY OF CULTURED CELLS DERIVED FROM THE KIDNEY OF GRAY RED-BACKED VOLE (*MYODES RUFOCANUS*) TO PUUMALA VIRUS AND OTHER HANTAVIRUSES: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 9) Ozaki, Y., Sanada, T., Seto, T., Taylor, K., Saasa, N., Ivanov, L.I., Yoshii, K., Tubota, T., Ikenaka, Y., Ishizuka, M., Arikawa, J. and Kariwa, H.: EPIZOOTIOLOGICAL INVESTIGATION OF HANTAVIRUS INFECTION IN JAPAN AND GENETIC VARIATION OF HOKKAIDO VIRUS IN *MYODES RUFOCANUS*: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)

- 10) Saasa, N., Sánchez-Hernández, C., Romero-Almaraz, M. de L., Yoshida, H., Sanada, T., Seto, T., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. Takashima, I. and Kariwa, H.: THE IDENTIFICATION OF THE RODENT RESERVOIR OF MONTANO VIRUS, A NOVEL HANTAVIRUS IN MEXICO: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 11) Kariwa, H., Seto, T., Yoshikawa, K., Tkachenko, T.E.A., Morozov, V.G., Ivanov, L. I., Slonova, R., Zakharycheva, T. A., Yoshii, K. and Takashima I: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HANTAVIRUSES FROM WILD RODENTS AND EPIDEMIOLOGY OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME IN RUSSIA: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 12) Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Kariwa, H., Holbrook, M.R. and Takashima, I.: CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF CHIMERIC VIRUS BETWEEN TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS AND OMSK HEMORRHAGIC FEVER VIRUS: The 3rd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2011. Sapporo (2011, 9)
- 13) Seto, T., Nagata, N., Yoshikawa, K., Ichii, O., Sanada, T., Saasa, N., Kon, Y., Yoshii, K., and Kariwa, H.: DEVELOPMENT OF THE LETHAL ANIMAL MODEL OF HUMAN HANTAVIRUS INFECTION: The 3rd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2011. Sapporo (2011, 9)
- 14) 8) Sanada, T., Seto, T., Ozaki, Y., Saasa, N., Yoshii, K., and Kariwa, H.: HIGH SUSCEPTIBILITY OF CULTURED CELLS DERIVED FROM THE KIDNEY OF GRAY RED-BACKED VOLE (MYODES RUFOCANUS) TO PUUMALA VIRUS AND OTHER HANTAVIRUSES: The 3rd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2011. Sapporo (2011, 9)
- 15) Saasa, N., Sánchez-Hernández, C., Romero-Almaraz, M. de L., Yoshida, H., Sanada, T., Seto, T., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. Takashima, I. and Kariwa, H.: THE IDENTIFICATION OF THE RODENT RESERVOIR OF MONTANO VIRUS, A NOVEL HANTAVIRUS IN MEXICO: The 3rd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2011. Sapporo (2011, 9)
- 16) 山崎翔子、好井健太郎、真田崇弘、苅和宏明、高島郁夫:2008年北海道で分離されたダニ媒介性脳炎ウイルス Oshima 08-AS 株の病原性解析:第152回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
- 17) 好井健太郎、森藤可南子、永田典代、佐々木宣哉、苅和宏明、安居院高志、高島郁夫:野生マウス由来 *Oas* 遺伝子座導入コンジェニックマウスにおけるダニ媒介性脳炎ウイルスの神経病原性の解析:第152回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
- 18) 柳原なつみ、好井健太郎、石塚万里子、苅和宏明、高島郁夫:ダニ媒介性脳炎ウイルスのE蛋白糖鎖は哺乳動物細胞におけるウイルス粒子分泌に影響する:第152回日本獣医学会、大阪(2011, 9)

- 19) 尾崎由佳、萩谷友洋、真田崇弘、瀬戸隆弘、Taylor Kyle、吉川佳佑、Ivanov Leonid、好井健太郎、坪田敏男、池中良徳、石塚真由美、吉松組子、有川二郎、苺和宏明:日本のげっ歯類のハンタウイルス感染状況に関する血清疫学調査とエゾヤチネズミが保有するHokkaido ウイルスの遺伝的多様性:第152回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
- 20) 真田崇弘、瀬戸隆弘、尾崎由佳、Saasa Ngonda、好井健太郎、苺和宏明:エゾヤチネズミ(*Myodes rufocanus*)の腎臓由来細胞系の確立とHokkaido ウイルス分離への応用:第152回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
- 21) 川岸崇裕、日向亮輔、加藤文博、好井健太郎、高島郁夫、三浦智行、五十嵐樹彦、小林剛:新規相同組換え技術による組換えダニ媒介性脳炎ウイルスの構築:第152回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
- 22) 好井健太郎、山崎翔子、持舘景太、苺和宏明、高島郁夫:2008年北海道におけるダニ媒介性脳炎ウイルスの分離と性状解析:第11回人と動物の共通感染症研究会学術集会、東京(2011, 11)
- 23) 境瑞紀、好井健太郎、高野絢子、大森優紀、横澤香菜、苺和宏明、高島郁夫:リバースジェネティクスを用いた極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの病原性決定因子の解析:第18回トガ・フラビ・ペステウイルス研究会(2011, 11)
- 24) 日向亮輔、川岸崇裕、加藤文博、好井健太郎、高島郁夫、三浦智行、五十嵐樹彦、小林剛:フラビウイルスにおける宿主DNA修復機構を用いた新規リバースジェネティクス系の開発:第18回トガ・フラビ・ペステウイルス研究会(2011, 11)

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

表 1. Oshima 08-AS および Oshima 5-10 のマウスにおける病原性の比較

接種量	Oshima 08-AS		Oshima 5-10	
	発症率*	死亡率	発症率	死亡率
	(%)	(%)	(%)	(%)
10 ² pfu	100 (5/5)	100 (5/5)	0 (0/5)	0 (0/5)
10 ³ pfu	100 (5/5)	60 (3/5)	40 (2/5)	0 (0/5)
10 ⁴ pfu	100 (5/5)	60 (3/5)	100 (5/5)	60 (3/5)
10 ⁵ pfu	100 (5/5)	60 (3/5)	60 (3/5)	40 (2/5)
10 ⁶ pfu	100 (5/5)	100 (5/5)	80 (4/5)	20 (1/5)

* ()内は発症個体数 or 死亡個体数/全個体数

図 1. Oshima 08-AS と Oshima 5-10 感染マウス臓器中のウイルスカ価

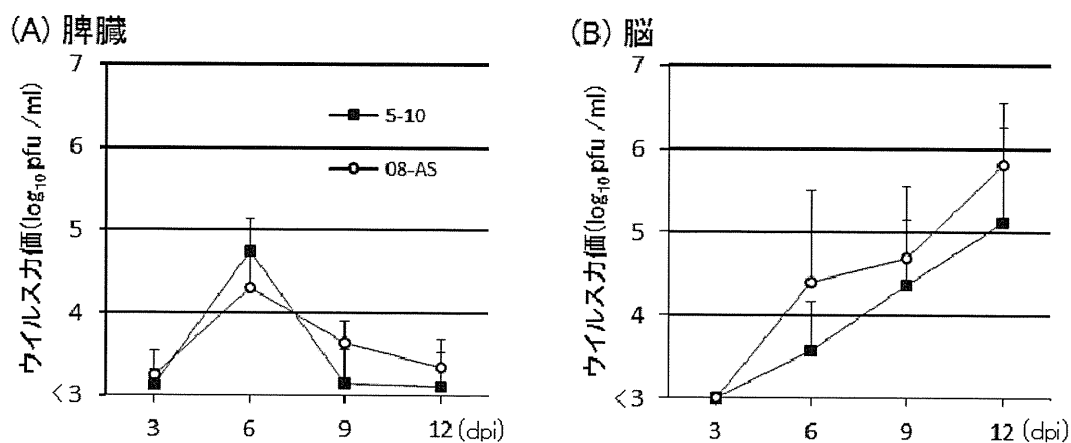


表 2. Oshima 08-AS および Oshima 5-10 感染マウスにおいて組織病変とウイルス抗原の認められた個体数の比較

	組織病変(炎症性細胞浸潤)			ウイルス抗原				
	髄膜	脳血管周囲	腸管神経叢	大脳皮質	視床	小脳	延髄	腸管神経叢
Oshima 08-AS	4/4*	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Oshima 5-10	1/5	1/5	0/5	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5

* 陽性個体数/全個体数

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
分担研究報告書

海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究
ハンタウイルス感染症に関する研究

分担研究者 有川二郎 北海道大学大学院医学研究科・教授

研究要旨 ハンタウイルス肺症候群(HPS)関連ウイルスの血清学的鑑別診断法の開発を行った。生きたウイルスを使用せずに中和試験の代替となりうる方法を確立した。また、同様の中和試験代替法を腎症候性出血熱(HFRS)関連ハンタウイルスのラット血清に応用した。さらに、近年続々と発見される食虫目由来ハンタウイルスの抗原性を、モノクローナル抗体を用いて解析した。

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。全世界に広く分布する、多様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、一種類の抗原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。一方では類似の抗原性を持ち、血清型の鑑別に中和試験を必要とするウイルスもある。本研究では、ハ

ンタウイルス感染症全般を検出および鑑別する診断システムの構築を最終的な目的とする。さらに近年、続々と新規の食虫目由来ハンタウイルスが発見されている。しかしながら、遺伝子断片のみが回収される例も多く、ヒトへの病原性、抗原性の多様性、血清型などについてはほとんど報告がない。本研究では食虫目由来ハンタウイルスの抗原性を明らかにすることを目的とし、代表株であるトッタパラヤンウイルスに対するモノクローナル抗体を作成し、抗原性の解析を行った。

B. 研究方法

(1) ハンタウイルス(HPS)関連ウイルスの鑑別診断法の開発
HPSの原因ウイルスである北米由来の3種

類のハンタウイルス、シンノンブレ(SNV)、ブラッククリークカナル(BCCV)、エルモロキヤニオン様ウイルスで新規にメキシコから検出されたカリザールウイルス(CARV)の核蛋白(N)のN末端99アミノ酸を欠失させた組換えN抗原をバキュロウイルスベクターを用いて発現させた。対照として全長の核タンパクを大腸菌ベクターpET43.1システム(Novagen)を用いてNusタンパクとの融合タンパクとして発現させ、ヒスチジタグを利用して精製したものを、全長N抗原とした。また、抗原性の比較にはそれぞれの自然宿主である野生げっ歯類(*Peromyscus maniculatus*, *Reithrodontomys sumichrasti*, *R. megaloti*)の血清を用いた。BCCVの自然宿主はコットンラット(*Sigmodon hispidus*)であるが、これの陽性血清のみ入手することができなかった。また、SNVによるHPS患者血清を用いた。HFRS関連ウイルスであるハンターンウイルス(HTNV)、ソウルウイルス(SEOV)、タイランドウイルス(THAIV)、ドブラバウイルス(DOBV)の同様の抗原はすでに報告したものを用いた(Araki K, et al J. Clin. Microbiol. 2001;39:2397-404, Nakamura I, et al Development of a serotyping ELISA system for Thailand virus infection. Arch Virol 2008;153:1537-42)。HTNV, SEOV, THAIV, DOBVはそれぞれラット(WKAH/hkm, 5Wメス)に接種し、その後経時的に採血を行い、全長抗原および鑑別用抗原に対する免疫応答を比較した。

(2) トッタパラヤンウイルス(TPMV)に対す

るモノクローナル抗体作成および抗原性の解析

TPMVの組換えN抗原の作製についてはすでに報告した(Okumura M, and others. Development of serological assays for Thottapalayam virus, an insectivore-borne Hantavirus. Clin Vaccine Immunol 2007;14:173-81)。報告した方法で発現/精製したN抗原をBALB/cマウスに免疫し、常法に従ってモノクローナル抗体を作製した。スクリーニングはTPMV感染Vero細胞を抗原等する間接蛍光抗体法で行った。その結果IgMクラスのEB5, ED5およびIgGクラスのB5H9, 1A3の合計4クローンを得た。これらの抗体のエピトープを解析するために、N抗原の全長(1-433アミノ酸)の他に1-80, 1-177, 1-331アミノ酸をそれぞれNusタンパクとの融合タンパクとして発現させた。また、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N抗原も用意した。さらに、ソウル大学のJ-W Song博士に送付し、韓国産食虫類由来ハンタウイルスのイムジンウイルス(MJNV)抗原との交差反応を調べた。

(倫理面への配慮)

患者血清は米国ニューメキシコ大学のBrian Helle博士より分与された。血清は番号で提供され、個人の特定はできない。各種げっ歯類血清の採血は、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものである。マウスモノクローナル抗体の作製については北海道大学の動物実験委員会の承認を受けたものであり、動物福祉の観点からも問題は

ないと判断された

C. 研究結果

(1) ハンタウイルス (HPS) 関連ウイルスの鑑別診断法の開発

HPSの原因ウイルスである北米由来の3種類のハンタウイルス、シンノンブレ、ブラッククリークカナル、エルモロキヤニオンウイルスの鑑別ができるかどうか、抗血清を用いて検討した。自然宿主である野生げっ歯類血清を用いたが、N抗原のN末端の共通抗原領域を持つ全長抗原では強い交差反応のためにすべての抗体が強く結合し、罹患ウイルスを鑑別することは不可能であった。しかしながら、N末端を欠くバリアブル領域の抗原性を保ったN抗原を使用してELISAを行った場合、鑑別することが可能であった。また、ラットの血清診断においても同様に、HFRS関連ウイルスのN末端を欠くN抗原は、それぞれの罹患ウイルスを鑑別することが可能であることが、実験感染ラット血清を用いて明らかとなった。

(2) 食虫目由来ハンタウイルスの抗原性解析

確立した4種類のモノクローナル抗体のうち、ED5、1A3の2種類がリニアエピトープを認識する抗体であった。これらの抗体はN抗原のN末端の80アミノ酸以内に結合し、競合阻害試験で部分的に競合することが分かった。これらの結果から、この二つの抗体はN末端を認識する抗体であることが分か

った。EB5およびB5H9の二つの抗体はリニアエピトープを認識しなかったため、この方法では抗原部位を明らかにすることができなかった。これらの抗体はすべてげっ歯類由来のハンタウイルス抗原とは反応しなかった。また、ASAV、MJNVのN抗原とも反応しなかった。

D. 考察

(1) 北アメリカ大陸由来ハンタウイルス感染症の鑑別診断法を開発した。HPS患者の輸入例に対し、迅速に罹患ウイルスを特定し、罹患地域を推定することが可能となった。また、患者のみならず、病原巣動物のラットやその他のげっ歯類においても、複数のウイルスの混在する地域での疫学的研究への応用が期待される。本法はELISAであるため、標準法である中和試験と異なり生き残ったウイルスやBSL4の施設を必要としない安全・迅速・簡便な代替法である。

(2) 食虫類由来ハンタウイルスの抗原性をモノクローナル抗体を用いて解析した。その結果、核蛋白に結合する6種類の抗体を用いて解析したところ、その抗原性はげっ歯類由来ハンタウイルスと大きく異なることが分かった。トッタパラヤンウイルスに対するモノクローナル抗体のほとんどが核蛋白のN末端に結合したことから、この領域がイムノドミナントであることが示された。このことから、げっ歯類由来ハンタウイルスと同様にN抗原のN末端にリニアエピトープを有する類似した抗原構造をもつこ

とが示唆された。また、日本産食虫目由来ウイルスであるアサマウイルスの核蛋白を発現させて交差反応性を確認したが、交差反応は見られず、食虫類由来ハンタウイルスの中でも抗原性が多様であることが示された。

E. 結論

北アメリカ大陸由来ハンタウイルス感染症の鑑別診断法を開発した。食虫類由来ハンタウイルスの抗原性はげっ歯類由来ハンタウイルスと全く異なるばかりでなく、食虫類由来ウイルスの中でも多様性が大きいと考えられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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., Arikawa J. : Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Sin Nombre, Andes, and Laguna Negra hantavirus infections in humans and rodents. *J Clin Microbiol.* 2010. 48, 1635-42.
 - (2) Tegshduuren E., Yoshimatsu K., Taruishi M., Endo R., Shimizu K., Koma T., Yasuda P. S., Kariwa H., Arikawa J., Ishihara C. : Studies on the susceptibility of the Japanese grass vole, *Microtus montebelli*, to Tula virus and Puumala virus of the hantaviruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010. 33, e67-73.
 - (3) Yasuda SP, Yoshimatsu K., Koma T., Shimizu K., Endo R., Isozumi R., Arikawa J. Application of truncated nucleocapsid protein (N) for serotyping ELISA of Murinae-associated hantavirus infection in rats. *J Vet Med Sci* 2012;74:215-19.
- #### 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. XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo2011.
 - (2) Shimizu K, Yoshimatsu K, Koma T, Yasuda P S, Arikawa J. Role of hantavirus nucleocapsid protein in intracellular traffic of glycoproteins. XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo2011.
 - (3) 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. XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo2011.
 - (4) 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. XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo2011.

(5) Koma T, Yoshimatsu K, Shimizu K, Yasuda P S, Isozumi R, Arikawa J. Analysis of pulmonary edema in hantavirus-infected SCID mouse. XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo 2011.

(6) 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 laboratory leptospira tests in Thailand. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Sapporo Convention Center, Sapporo 2011.

(7) 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. 46th European Meeting on Viral Zoonoses. St Raphael, France, 2011.

(8) Arikawa J, Yoshimatsu K, Kariwa H. Truncated Hantavirus Nucleocapsid Proteins for Serotyping Old and New World Hantavirus Infections in Humans and Rodents. 45th Joint Worki

ng 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.

(9) Arikawa J. Prevalence of Hantavirus Infection among Humans and Animals in Vietnam. The Scientific Conference: "Pasteur Institute in Ho Chi Minh City- 120 Years for Control and Prevention of Communicable Diseases", Ho Chi Minh City, Vietnam, 17-18 November 2011. Ho Chi Minh City, Vietnam 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

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）

研究分担者報告書

海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究

B ウイルスの薬剤感受性を解析するためのシステム開発に関する研究：

単純ヘルペスウイルス 2 型をモデルとしたシステム開発

研究分担者

西條政幸

国立感染症研究所ウイルス第一部長

研究要旨： B ウイルス (B virus, BV, *Cercopithecine herpesvirus 1*) は、アカゲザル等のマカク属霊長類が有するヘルペスウイルス科 α ヘルペスウイルス亜科シンプレックスウイルス属に分類される。ヒトが BV に感染すると、脳炎等の中枢神経感染症を発症し、致死的なことが多い。BV は BSL-3 または BSL-4 病原体に分類されるため、感染性 BV を扱うことができないことが多い。本研究では、BV のアシクロビル (ACV) 等の α ヘルペスウイルスの発現するウイルス性チミジンリン酸化酵素 (vTK, UL23 遺伝子) 関連薬剤の感受性を調べるためのシステムを、単純ヘルペスウイルス 2 型 (HSV-2) をモデルとして開発した。HSV-2 組換え vTK を発現する 293T 細胞における抗ウイルス薬の vTK 欠損高度 ACV 耐性単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) の増殖に対する抑制効果を、HSV-2 の組換え vTK 発現細胞における増殖抑制効果と比較検討することで、薬剤に対する感受性を評価できことが明らかにされた。また、この方法を用いると、臨床検体や分離された BV から vTK 遺伝子を増幅することで、薬剤に対する感受性が評価でき、治療上においても有用である。今回は HSV-2 を BV のモデルとして薬剤感受性試験法を開発・評価したが、BV の vTK 遺伝子を用いて、本研究で開発されたシステムの有用性を評価する必要がある。

A. 研究目的

B ウイルス (B virus, BV, *Cercopithecine herpesvirus 1*) は、アカゲザル等のマカク属サルが有するヘルペスウイルス科 α ヘルペスウイルス属に分類される。特に東南アジア産のマカク属霊長類 (アカゲザルやカニクイザルなど) が有するウイルスで、ニホンザル、台湾ザルも BV に感染していると考えられている。ヒトの発病例は少な

く、全世界で 50 例程度とされている。しかし、アジア産マカク属サルに咬まれたり、引っかかれたりして BV に感染すると、発熱、頭痛、肺炎、神経症状が出現する。時に傷口に水疱などの皮膚症状が見られることもある。適切な抗ウイルス薬で治療されなければ、発症から 1 日から 3 週間で、8 割が脳炎症状により死亡する。また、死亡しなくても重篤な後遺症が残ることが多い。