

- 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. XIV 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. XIV 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. XIV 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
22. 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)
23. 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)
 24. 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)
 25. 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)
 26. 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)
 27. 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)
 28. 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)
 29. 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, (2011 Oct 1-4)
 30. 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 Jun 20-22)

31. 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
32. 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) 2011.7.9
33. 有川二郎、天田貴子、林元展人、吉松組子、安田俊平、清水健太、駒貴明、五十棲理恵、高倉彰：イムノクロマト法によるラットとヒト血清のハンタウイルス抗体迅速検出法の開発. 日本実験動物科学・技術九州2012、別府国際コンベンションセンター、別府市、2012.5.24-26
34. Takako Amada, Kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Takaaki Koma, Kenta Shimizu, Rie Isozumi, Nobuhito Hayashimoto, Akira Takakura, Jiro Arikawa : Development of immunochromatographic test strips for the detection of HFRS and HPS hantavirus antibody in the human and rodent serum. The 9th Japan-China International Conference of Virology, Sapporo, Japan, June 12-13, 2012
35. Takako Amada, Nobuhito Hayashimoto, Kumiko Yoshimatsu, Shumpei Yasuda, Kenta Shimizu, Takaaki Koma, Rie Isozumi, Akira Takakura, Jiro Arikawa : Development of Immunochromatographic Rapid Test for the Detection of IgG Antibodies Specific to HFRS and HPS Hantaviruses in Human and Rodent Serum. Mini-symposium on Emerging and Re-emerging Viral Diseases in Asia, 46th Joint Working Conference on Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Beppu, Japan, June 19-20, 2012
36. Amada T, Hayashimoto N, Yoshimatsu K, Yasuda S, Shimizu K, Koma T, Isozumi R, Takakura A, Arikawa J : Development of immunochromatographic test for the detection of HFRS and HPS Hantavirus antibody in the human and rodent serum. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012 (poster)
37. Amada T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Koma T, Shimizu K, Nishio S, Hayashimoto N, Takakura A, Arikawa J : Rapid and whole blood diagnostic test for detecting anti-hantavirus antibody in human and rodent. The 5th Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations Congress, Bangkok, Thailand, October 10 – 12, 2012

38. 駒 貴明、永田 典代、吉松 組子、佐藤 由子、清水 健太、天田 貴子、西尾 佐奈恵、長谷川 秀樹、有川 二郎：肺水腫を呈すハンタウイルス感染SCIDマウスに於ける好中球の役割. 第60回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、大阪市、2012.11.13～15
39. Saasa Ngonda、吉田 喜香、清水 健太、Sanchez-Hernandez Cornelio、Romero-Almaraz Maria de Lourdes、駒 貴明、真田 崇弘、瀬戸 隆弘、好井 健太郎、Ramos Celso、吉松 組子、有川 二郎、高島 郁夫、荻和 宏明：The N-terminus of the Montano hantavirus nucleocapsid protein possesses broadly cross-reactive conformation-dependent epitopes. 第60回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、大阪市、2012.11.13～15
40. 天田 貴子、吉松 組子、安田 俊平、清水 健太、駒 貴明、林元 展人、高倉 彰、有川 二郎：イムノクロマト法による抗ハンタウイルス抗体の迅速抗体検出法の開発. 第60回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、大阪市、2012.11.13～15

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

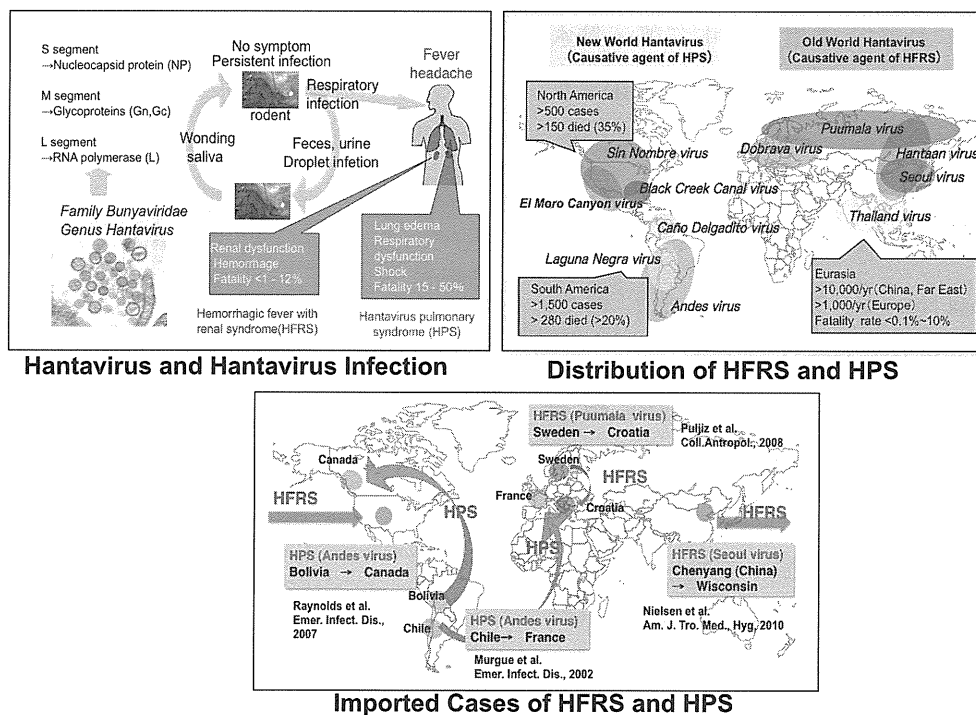


図2. 新世界ハンタウイルス血清型鑑別組換え抗原の作成と ELISA 法への応用

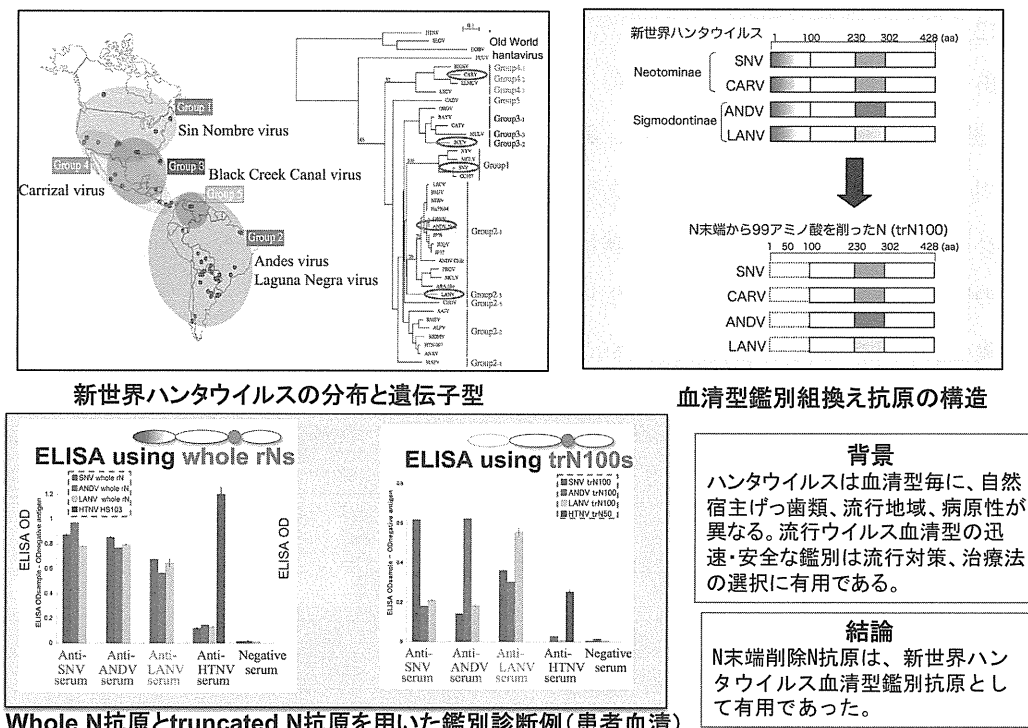


図 3. イムノクロマト法と ELISA による患者血清中の抗体検出

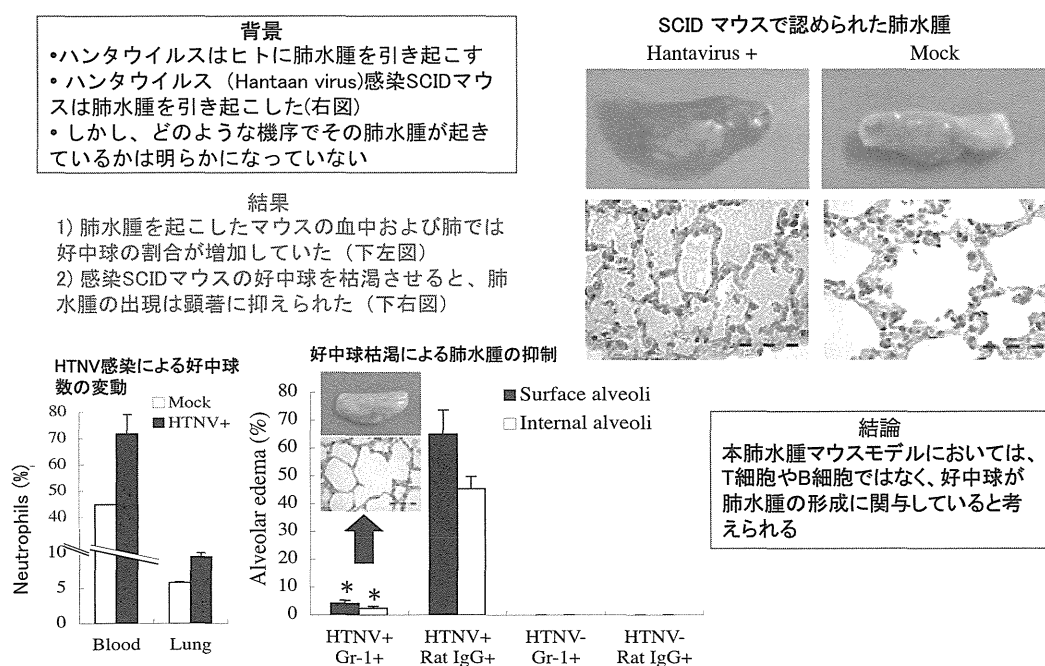
Sensitivity of ICG compared with ELISA

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 年以来、世界各地のトガリネズミ型目小型野生動物に新しいハンタウイルスが発見され、トガリネズミ型目も重要な自然宿主であることが明らかになった。加えて、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、ハンタウイルスの自然宿主はこれまで考えられてきた以上に多様な宿主が存在していることが明らかになっている。日本では、本研究班の中で北海道に生息するオオアシトガリネズミやエゾトガリネズミに新しいハンタウイルスを検出するのに成功した。2002 年から 2011 年のサンプルを基にウイルス陽性トガリネズミの検出時期を検索したところ、繁殖時期に連動して陽性個体の割合が上昇していた。ヒト症例は確認されていないが、これらの結果は、トガリネズミの繁殖時期に感染リスクが上昇する可能性を示唆していた。

研究協力者：荒木和子、佐藤 弘、多屋馨子、岡部信彦、大石和徳(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)、Bazartseren Boldgiv(モンゴル国立大学)、田原研司(島根県保健環境研究所)、高田伸弘(福井大学)、有川二郎(北海道大学医学部)、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 獣医科学部)

A. 研究目的

2007 年以来、世界各地でトガリネズミ形目や翼種目を宿主とする新しいハンタウイ

ルスが明らかになってきた。新しいハンタウイルスによるヒト症例は報告されていないが、齧歯目由来ハンタウイルスでは腎症候性出血熱やハンタウイルス肺症候群など重篤な感染症を引き起こすことが明らかになっている。日本においては、1980 年代に実験動物を介した実験室感染が報告されているものの、それ以降患者報告はなく、1998 年 12 月の感染症法施行以降もハンタウイルス感染患者の報告はない。しかしながら、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、継続した対策の必要な感染症の一つである。

本研究班では、日本にもトガリネズミ形目や翼手目由来ハンタウイルスが存在するのか、また、もし存在していた場合には、どのような動物がウイルスを保有しているのか、また、感染リスクは存在するのかについて検討を進めた。感染リスクの検討では、季節性の変動も明らかにし、感染リスクの高い時期の特定も試みた。これらのデータを蓄積することにより効果的な予防法につながる基礎資料の収集を進めた。

B. 研究方法

調査に使用した小型野生動物は、研究協力者の北海道大学のグループ、モンゴル大学のグループ、島根県および福井大学のグループと共に捕獲した検体および研究協力者のグループが収集した検体の提供を受けて調査を進めた。ハンタウイルスの検出は、組織サンプルから total 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。種の同定は、形態学的な同定に加え、宿主 Cytochrome-*b* (Cyt-*b*) 遺伝子配列を基に決定した。

C. 研究結果

① Asama virus 保有ヒミズの国内での疫学：

日本で初めて確認されたトガリネズミ形目由来ハンタウイルスである Asama virus (ASAV) の感染状況について新潟県、群馬県、岡山県、埼玉県、愛媛県、東京都のヒミズについて感染の有無を調査した結果、新潟

県、群馬県、岡山県の個体に ASAV 遺伝子を検出した。

② Asama virus 以外のトガリネズミ由来ハンタウイルスの検出：

北海道に生息する Sorex 種のトガリネズミを対象に未検出のハンタウイルス感染を検索した。日本では、Sorex 種小型野生動物は主に北海道に生息している。2008 年から 2011 年の 9 検体のバイカルトガリネズミを検索したところ、2010 年に捕獲した個体に Asama virus とは異なる新しいトガリネズミ由来ハンタウイルスを発見した。本ウイルスは、捕獲地域から暫定的に Mukawa virus と名付けた。

③ 齧歯目およびトガリネズミ形目からの未知のハンタウイルスの検出：

Asama virus に加え、Mukawa virus の感染が確認されたため、更に多くのハンタウイルスが存在している可能性が疑われた。そこで未知のハンタウイルス感染の可能性を明らかにするために、齧歯目およびトガリネズミ形目の小型野生動物を幅広く捕獲し、ウイルス検出を試みた。2002 年から 2012 年に捕獲した、ヒメネズミ、アカネズミ、タイリクヤチネズミ、ムクゲネズミ、オオアシトガリネズミ、バイカルトガリネズミ、ヒメトガリネズミを対象にハンタウイルス保有状況を調査した。ヒメネズミ、アカネズミ、タイリクヤチネズミおよびムクゲネズミについては、2011 年に美唄町周辺で捕獲した 78 頭を用いた。トガリネズミについ

ては、2002 年から 2012 年に江別市周辺、知床地方、富良野地方および美唄町周辺などを含む北海道の複数個所で捕獲した個体を用いた。その結果、齧歯目では、美唄町周辺で捕獲したアカネズミに Hokkaido virus の感染を確認した。一方トガリネズミでは、知床地方および富良野地方で捕獲したオオアシトガリネズミに Asama virus および Mukawa virus とは異なる新しいハンタウイルスの感染を確認した(表 1)。

④ 北海道におけるオオアシトガリネズミにおけるハンタウイルス陽性個体の季節的推移とその他のトガリネズミのハンタウイルス保有状況：

北海道のトガリネズミに Mukawa virus とは異なる新しいハンタウイルスの感染を確認したため、潜在的な感染リスクを明らかにするために捕獲時期によるハンタウイルス陽性率の変化を検討した。調査には、捕獲数が最も多かったオオアシトガリネズミを対象に実施した。その結果、Cyt-b 遺伝子配列でオオアシトガリネズミと同定された 95 頭のうち、ウイルス陽性個体は 5 月、6 月および 10 月の個体にのみ認められ、その他の時期の個体ではウイルス陽性個体は確認できなかった(図 1)。また、北海道に生息するオオアシトガリネズミ、バイカルトガリネズミ、ヒメトガリネズミのうちヒメトガリネズミ(0/52 個体)のみウイルス感染個体は認められなかった。この結果は、トガリネズミ形目および齧歯目野生動物がハンタウイルスに感染するものの、ウイルスの

哺乳類宿主に対する親和性(宿主特異性)に違いが存在している可能性が示唆された。

⑤ 近隣諸国におけるハンタウイルスの疫学調査：

モンゴル、フブスグル湖 (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。

⑥ フィリピンの翼手目におけるハンタウイルスの調査：

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フィリピンの翼種目にはハンタウイルスの感染は確認できなかった。

D. 考察

これまで日本では、北海道のエゾヤチネズミに Hokkaido virus (HKDV) および三重県のヒミズに ASAV が確認されている。これまでの調査で、三重県のヒミズに加え新潟

県、群馬県、岡山県のヒミズに ASAV 感染が新たに検出した。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 ASAV が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 4 地域の ASAV も西日本タイプと東日本タイプに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。

これまでの野外調査でオオアシトガリネズミを複数回の捕獲し、100 頭を超える数のトガリネズミを捕獲した。これらのトガリネズミを用いてハンタウイルス感染の季節性変化を調査した。その結果、トガリネズミの繁殖時期に相当する春ごろと秋ごろの季節に陽性個体が認められることが明らかになった。これは、トガリネズミの繁殖に伴いナイーブな個体が新たに供給され、新規感染によるウイルス感染が顕在化したと推測される。感染個体の確認により、もしヒトへの病原性が存在した場合には春ごろもしくは秋ごろに感染リスクの上昇が予想された。

特筆すべき情報として、2011 年に初めてア

フリカ大陸の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. トガリネズミ形目由来ハンタウイルスの感染リスクを検討したところ、春と秋に感染リスクが上昇する可能性が明らかになった。
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、齧歯目、トガリネズミ形目の双方のハンタウイルスを検出することに成功した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kang, H. J., Arai, S., Hope, A. G., Cook, J. A., Yanagihara, R. Novel Hantavirus in the Flat-Skulled Shrew (*Sorex roboratus*). Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2010. 10(6): 593-597.
2. Schlegel M, Tegshduuren E, Yoshimatsu K, Petraityte R, Sasnauskas K, Hammerschmidt B, Friedrich R, Mertens M, Groschup M H, Arai S, Endo R, Shimizu K, Koma T, Yasuda S, Ishihara C, Ulrich R G, Arikawa J, and Ko"llner B. Novel serological tools for detection of Thottapalayam virus, a Soricomorpha-borne hantavirus. Archives Virology, DOI 10.1007/s00705-012-1405-9. 2012
3. Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea. Arai, S., Gu, S. H., Baek, L. J., Tabara, K., Bennett, S. N., Hong-Shik Oh, Takada, N., Kang, H. J. Tanaka-Taya, K., Morikawa, S., Okabe, N., Yanagihara, R., Song. J.-W. 2012. Virology.

2. 学会発表

1. S. Arai, M. Asakawa, T. Kimura, M. Kon, M. Nagano, K. Tanaka-Taya, N. Okabe, R. Yanagihara. Genetic diversity of Asama virus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). VIII International conference on HFRS, HPS & Hantaviruses. International Society for Hantaviruses and Hantaviral Diseases. Athens, Greece. May 20-22, 2010.
2. H. J. Kang, S. N. Bennett, S. Arai, A. Hope, J. -W. Song, L. Dizney, L. A. Ruedas, J. A. Cook, R. Yanagihara. Evolutionary insights from newly identified hantaviruses harbored by moles (Family Talpidae). VIII International conference on HFRS, HPS & Hantaviruses. International Society for Hantaviruses and Hantaviral Diseases. Athens, Greece. May 20-22, 2010.
3. 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. Evolutionary insights from The Genetic Diversity of Asama virus in the Japanese Shrew Mole (*Urotrichus talpoides*). 第58回日本ウイルス学会学術集会. 徳島県徳島市. 2010年11月7日—9日.
4. 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

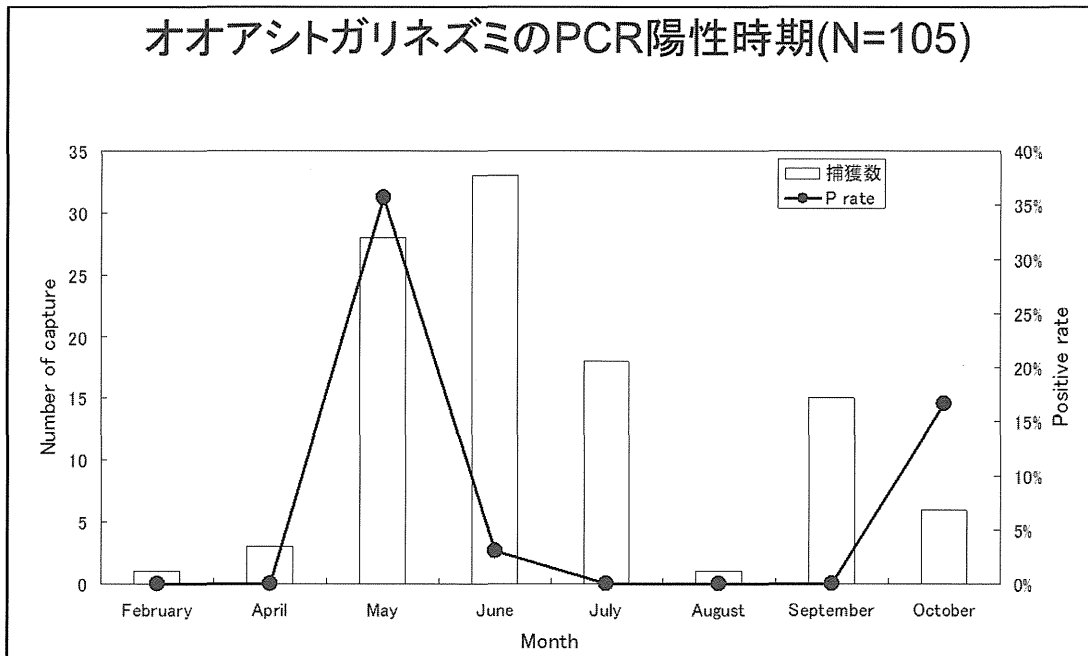
newfound hantavirus harbored by the Asian lesser white-toothed shrew (*Crocidura shantungensis*). XV International Congress of Virology. Sapporo, Hokkaido Japan. 11-16 September 2011

5. 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
6. 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
7. S. Arai, T. Kimura, M. Asakawa, S. D. Ohdachi, K. Tanaka-Taya, S. Morikawa, N. Okabe, R. Yanagihara. Genetic Diversity and Phylogeography of Asama virus in the Japanese shrew Mole (*Urotrichus talpoides*). The 12th International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM). Rio de Janeiro, Brazil. 23-27 September 2012.
8. 新井 智. ウイルスの宿主転換と哺乳類との共進化. 神奈川県相模原市. 2012年9月20日～23日

H 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

オオアシトガリネズミのPCR陽性時期(N=105)



Genus species	1998	1999	2002	2007	2008	2009	2010	2011	2012	総計	%
<i>Apodemus argenteus</i>				1		1	1	101		104	0.6%
<i>Apodemus speciosus</i>					2			169		171	
<i>Chimarrogale platycephala</i>							1			1	
<i>Crocidura dsinezumi</i>				4	7	2	3	16		32	
<i>Mogera imaizumii</i>				1	1	2				4	
<i>Mogera wogura</i>				1	2		3	4		10	
<i>Mus musculus</i>					1					1	
<i>Mus musculus castaneus</i>								1		1	
<i>Myodes rex</i>								12		12	
<i>Myodes rufocanus</i>				1				101		102	
<i>Myodes rutilus</i>								56		56	
<i>Rattus norvegicus</i>							2	27		29	
<i>Rattus rattus</i>								1		1	
<i>Sorex</i>								57		57	
<i>Sorex caecutiens</i>				1	4		4	3		12	8.3%
<i>Sorex gracillimus</i>					2			27		29	
<i>Sorex minutissimus</i>					1	2				3	
<i>Sorex unguiculatus</i>			3	7	9	3	6	74	4	106	11.3%
<i>Suncus murinus</i>								24		24	
<i>Urotrichus talpoides</i>	2	2		7	10	6	5	11		43	14.0%
総計	2	2	3	23	39	16	25	684	4	798	

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 (H22-新興-一般-006)

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：ウイルス性出血熱の実験室診断法の改良に関する研究

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）

研究要旨： ナイジェリア国におけるウイルス性出血熱，特にその中でもクリミア・コンゴ出血熱ウイルス（Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV），ラッサウイルス（LASV）およびリフトバレー熱ウイルス（Rift Valley fever virus, RVFV）感染症の血清疫学および同地域における住民の関連リスクについて調査した．CCHFV の地域における感染リスクを評価するには，家畜における抗体保有状況について調査するのが望ましい．ナイジェリア北部のヒツジ血清 121 検体中 1 検体が明らかに CCHFV 抗体陽性であった．しかし，マダニサンプル 48 プールから CCHFV 遺伝子が検出された例はなかった．一方，住民血清約 300 検体の LASV, CCHFV, および, RVFV に対する抗体陽性率は，それぞれ 7.4%, 14.1%, および, 2.4%であった．RVFV に対する中和抗体保有率は 12.6%（34 検体が陽性）であった．CCHFV 抗体陽性血清の中でも 1 検体は高力価の抗体陽性を呈していた．ナイジェリア国北部においては，住民はこれら 3 種類の出血熱ウイルス感染症に罹患するリスクがあることが明らかにされた．クリミア・コンゴ出血熱（CCHF），リフトバレー熱が流行していることが明らかにされた．今後，それぞれの感染症の特徴を踏まえた感染症対策が重要であると考えられる．また，日本における輸入感染症対策に資するデータと考えられる．

研究協力者：福士秀悦、吉河智城、谷英樹、森川茂（国立感染症研究所）、高田礼人（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター）、David Nadeva Bukbuk（マイドゥーグリ大学科学学部微生物学教室・准教授）

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（Lassa fever, LF）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．また，リフトバレー熱（Rift Valley fever, RVF）も広い意味でウイルス性出血熱に含まれる．中でも LF はアフリカ中央部から西アフリカに広く分

A 研究目的

ウイルス性出血熱には，エボラ出血熱，

布するウイルス性出血熱である。また、西
アフリカで CCHF 患者が報告され、ナイジ
ェリア国ではクリミア・コンゴ出血熱ウイ
ルスが分離されている。ナイジェリア国北
部における RVF の流行状況については分か
っていない。そこで、本研究では CCHF の
感染リスク評価のために、ナイジェリア北
部のヒツジにおける CCHFV 抗体保有状況
を明らかにするとともに、マダニからの
CCHFV 遺伝子増幅を試みた。また、RVFV
の組換え核蛋白 (RVFV-rNP) を抗原とした
IgG-ELISA による抗体検出システムの感度
と精度について、感染性 RVFV を用いた中
和抗体測定法に比較して評価した。さらに
ナイジェリア国北部のマイドゥーグリ市お
よびその周辺の住民のラッサウイルス、ク
リミア・コンゴ出血熱ウイルス、リフトバ
レーウイルスに対する抗体保有状況を調査
した。

B 研究方法

1. ウイルスおよび細胞。

RVFV ワクチン株 (MP-12 株) を用いた。
RVFV に対する中和抗体測定においては
Vero 細胞を用いた。

2. IgG-ELISA.

LASV, CCHFV, および, RVFV の組換え
核蛋白 (それぞれ, LASV-rNP, CCHFV-rNP,
RVFV-rNP) をそれぞれ抗原とした
IgG-ELISA 法によった。LASV-rNP を抗原
とした IgG-ELISA 法と CCHFV-rNP を抗原
とした IgG-ELISA 法のそれぞれのウイルス
に対する抗体検出における感度と精度は十

分に高いことはこれまでに報告されている
(*J Med Virol* 75:295-299, 2005, *J Clin
Microbiol* 40:1587-1591, 2002, *Clin Vaccine
Immunol* 14:1182-1189, 2007) 。しかし,
RVFV-rNP を抗原とした IgG-ELISA の感度
と精度については評価されていなかった。

によった。ヒツジ血清中の CCHFV 抗体
は, CCHFV-rNP を抗原とした IgG-ELISA
(Tang Q, et al. *J Virol Methods* 108:111-6,
2003) によった。

3. 感染性 RVFV を用いた中和抗体測定

RVFV に対する中和抗体価の測定は, 96
ウェルマイクロプレート上に培養した Vero
細胞に, 非働化された血清を階段希釈し,
それぞれ RVFV と 37°C 1 時間中和反応させ,
それを Vero 細胞に感染させた。CPE を抑制
する血清の希釈倍率の逆数を抗体価とした。

4. 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
砕し, 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。

5. 血清.

ナイジェリア北部在住の方から、発熱等の診断目的に採取された血清約 300 検体を用いた。また、マイドゥーグリ市の屠殺場の協力で得られた 121 検体のヒツジ血清も用いた。

(倫理面からの配慮について)

本研究に使用された血清はマイドゥーグリ大学医学教育病院の倫理委員会での承認と患者からのインフォームドコンセントを得た上で採取された。この研究については、国立感染症研究所の「ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会」による承認のもとに実施された。

C 結果

1. クリミア・コンゴ出血熱に関する研究.

- 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
- 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
- 3) ヒトにおける抗体保有状況. 住民血清約 300 検体の CCHFV に対する抗体

陽性率は、2.4%であった。CCHFV 抗体陽性血清の中でも 1 検体は高力価の抗体陽性を呈した。

2. リフトバレー熱に関する研究

- 1) RVFV-rNP を抗原とした IgG-ELISA の抗体検出における有用性の検討. 中和抗体を測定できた血清 271 検体を用いた。中和抗体陽性 34 検体中 RVFV-rNP-IgG-ELISA で陽性を呈したものは 31 検体 (91.2%) , 中和抗体陰性 237 検体中 RVFV-rNP-IgG-ELISA で陰性を呈したものは 229 検体 (96.6%) であった。RVFV-rNP-IgG-ELISA の抗体検出における感度と精度はそれぞれ 90% を超えることが確認された (表 1) .
- 2) ヒトにおける抗体保有状況. 中和抗体測定による成績では、RVFV 抗体陽性率は 12.6% であった。

3. ラッサ熱に関する研究

- 1) ヒトにおける抗体保有状況. 血清 297 検体中陽性を呈したのが 22 検体 (7.4%) であった。

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。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 CCHFV 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、6400倍希釈においても陽性を呈した(図1)。この成績は、抗体陽性率は低いものの、この地域にはCCHFV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CCHFV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CCHFV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、CCHFV抗体陽性ヒツジやヒトが存在することから、同地域においてはCCHF患者が発生していることを示している。CCHFに関するさらなる疫学調査が必要である。

RVFV-rNPを抗原としたIgG-ELISAの抗体検出における有用性が示された。その方法や中和抗体測定法によりマイドゥーグリ地域住民の約13%がRVFV抗体陽性であり、この地域においてRVFVが確実に存在することが確認された。しかし、ウイルス学的にRVFと診断された患者はない。同地域におけるRVF患者の流行状況、臨床的経過、ウイルス分離による分子疫学等、まだまだ解明されなければならないことが多い。

マイドゥーグリ地域住民のLASVに対す

る抗体陽性率は7.4%であった。ProMed等を通じて、ナイジェリアにおけるLFの流行、院内感染等の報告がなされている。また、これまでLA患者報告がなかった隣国ガーナからも2名の患者が報告された。流行国における迅速診断システムの整備と疫学情報の収集、院内感染対策のための計画等、これからもなされなければならない課題がある。

E 結論

ナイジェリア北部にはラッサ熱に加えリフトバレー熱も流行していることが示唆された。クリミア・コンゴ出血熱は抗体陽性率は低いものの存在することがわかった。

F. 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
 - 5) 西條政幸：バイオテロリズムに用いられる可能性のある病原体と国立感染症研究所における対応：出血熱ウイルスと痘瘡ワクチン。日本犯罪学会雑誌 77:63-66, 2011
 - 6) Taniguchi, S., Watanabe, S., Masangkay, J.S., Omatsu, T., Ikegami, T., Alviola, P., Ueda, N., Iha, K., Fujii, H., Ishii, Y., Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Kurane, I., Kyuwa, S., Akashi, H., Yoshikawa, Y., Morikawa, S.: Reston ebolavirus antibodies in Bats, the Philippines. *Emerging Infectious Diseases* 17:1559-1560, 2011
 - 7) Kennedy, J.S., Gurwith, M., Kenner, J., Morikawa, S., Saijo, M., Yokote, H., Edwards, K., Dekker, C.L., Frey, S, Rogge, PT, Damon, I, Greenberg, R.N.: LC16m8, an attenuated smallpox vaccine, demonstrates comparable and vaccinia variola immune response to Dryvax in a Phase I/II vaccinia-naive adult trial. *Journal of Infectious Diseases* 204:1395-1402, 2011
 - 8) Fukushi, S., Nakauchi, M., Mizutani, T., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S.: Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *Journal of Virological Methods* 180:68-74, 2012
 - 9) Fukushi, S., Tani, H., Yoshikawa, T., Saijo, M., Morikawa, S.: Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Viruses* 4(10):2097-2114, 2012
 - 10) Taniguchi, S., Sayama, Y., Nagata, N., Ikegami, T., Miranda, M.E., Watanabe, S., Iizuka, I., Fukushi, S., Mizutani, T., Ishii, Y., Saijo, M., Akashi, H., Yoshikawa, Y., Kyuwa, S., Morikawa, S.: Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. *BMC Veterinary Medicine* 8(1):189, 2012
 - 11) Sayama, Y., Demetria, C., Saito, M., Azul, R.R., Taniguchi, S., Fukushi, S., Yoshikawa, T., Iizuka, I., Mizutani, T., Kurane, I., Malbas, F.F. Jr, Lupisan, S., Catbagan, D.P., Animas, S.B., Morales, R.G., Lopez, E.L., Dazo, K.R., Cruz, M.S., Olveda, R., Saijo, M., Oshitani, H., Morikawa, S.: A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. *BMC Veterinary Medicine* 18:8:82, 2012
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)
 - 6) 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)
 - 7) Lim, C.K., Ami, Y., Fujii, Y., Moi, M.L., Kitaura, K., Kotaki, A., Morikawa, S., Saijo, M., Suzuki, R., Kurane, I., Takasaki, T.: Pathogenesis of epidemic chikungunya virus in nonhuman primates. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
 - 8) 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)
 - 9) 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)
 - 10) Saijo, M.: Crimean-Congo hemorrhagic fever in three locations: Xinjiang-China, Turkey, and Nigeria. Mini-symposium on Emerging and Re-emerging Viral Diseases in Asia, 46th Joint Working Conference