

201225009A

厚生労働科学研究費

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

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

平成 24 年度 総括研究報告書

研究代表者 荻和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

平成 25 (2013) 年 3 月

厚生労働科学研究費

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

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

平成 24 年度 総括研究報告書

研究代表者 荻和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

平成 25 (2013) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告	1
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 荻和宏明.....	3
II. 分担研究報告	27
ダニ媒介性脳炎の疫学 好井健太郎	29
ハンタウイルス感染症に関する研究 有川二郎	37
ブニヤウイルス科フレボウイルス属リフトバレー熱ウイルスに対する組換え VSV シュードタイプ を用いた中和抗体測定法の開発: 重症熱性血小板減少症候群ウイルス感染症への応用にむ けた研究 西條政幸	43
狂犬病の疫学に関する研究 井上智	49
狂犬病の発症機序の解析と診断法開発 伊藤直人	59
リアルタイム PCR 法による回帰熱実験室診断法に関する研究 川端寛樹	65
バルトネラ感染症の疫学 丸山総一	71
東南アジアにおける <i>Salmonella</i> の保菌動物としてのヤモリの重要性に関する研究 林谷秀樹	77
野生鳥獣類媒介性感染症の病理学的検索 永田典代	81
ダニ媒介性脳炎の重症化機構の解析および迅速診断法の確立 早坂大輔	85
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	93
IV. 研究成果の刊行物・印刷	95

I. 総括研究報告

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

研究代表者 苅和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

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)

総括研究報告書

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

研究代表者	苅和宏明	北海道大学大学院獣医学研究科	准教授
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
	有川二郎	北海道大学大学院医学研究科	教授
	西條政幸	国立感染症研究所	部長
	井上智	国立感染症研究所	室長
	伊藤直人	岐阜大学応用生物科学部	准教授
	川端寛樹	国立感染症研究所	室長
	丸山総一	日本大学生物資源科学部	教授
	林谷秀樹	東京農工大学農学研究院	准教授
	永田典代	国立感染症研究所	室長
	早坂大輔	長崎大学 熱帯医学研究所	助教

研究要旨

ハンタウイルス肺症候群(HPS)関連の北米および南米由来ウイルスについて、ハンタウイルス感染症の中和試験の代替となりうる、血清学的鑑別診断法を開発した。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。北海道と山形県、及びロシアのサマラでの TBEV の分布状況を調査することを目的とし、野鼠における血清疫学調査を行った。北海道の斜里町のエゾヤチネズミ1検体とサマラのキクビアカネズミ1検体が抗体陽性であることが判明し、両地域において初めて野鼠検体血清から TBEV の流行巢の存在が示唆された。ダニ媒介性脳炎(TBE)の病態解析および迅速診断法の確立を目指して、TBEV 感染マウスモデルにおける重症化機序の解析、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法による TBEV 遺伝子検出法の確立、日本脳炎ウイルス(JEV)感染マウスモデルによる脳炎病態の分子イメージング解析を行い、ダニ媒介性脳炎およびフラビウイルス脳炎の特異的な予防・治療法の確立に重要な知見が得られた。TBEV 感染後の脳炎発症機序の解明と新規ワクチン評価系の確立を目的として、BALB/c マウスを用いた TBEV 感染モデルにおける神経病原性を解析した。その結果、TBEV Sofjin 株感染早期(3, 5 日)から腸管、胸腺、脾臓、脳に感染性ウイルスが存在し、非常に強い神経親和性を示すことが判明した。リフトバレー熱ウイルス(Rift Valley fever virus, RVFV)は人や家畜に感染すると重篤な疾患を引き起こす。リフトバレー熱の安全な診断法を確立するため、RVFV の膜蛋白を表面にまとった水疱性口内炎ウイルス(VSV)シュールドタイプを用いた安全な中和抗体測定システムを開発した。狂犬病ウイルス固定毒の西

ヶ原株は、高用量をマウスに筋肉内接種した場合、致死的な感染を引き起こすが、その鶏胚馴化株の Ni-CE 株は末梢感染性が減弱しており、同接種によりマウスに全く症状を起こさない。西ヶ原株と Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株由来の P 遺伝子を保有するキメラウイルス [CE(NiP)株] を用いて P 遺伝子が関連する末梢感染機序の解明を試みた。その結果、Ni-CE 株の末梢神経侵襲性が西ヶ原株および CE(NiP)株よりも減弱していることが判明した。近年、新種のリッサウイルスがシベリアに生息しているコウモリから発見されている。そこで、病原体検出用マイクロアレイを利用してコウモリから標的病原体遺伝子を検出する方法の確立を試み、モンゴルに生息するコウモリがリッサウイルス(狂犬病ウイルスを含む)の感染宿主であるかを調べた。その結果、今回調査したコウモリからはリッサウイルスの遺伝子は検出されなかった。感染症法4類に規定される回帰熱について、リアルタイム PCR 法を用いた迅速診断法の開発とその性能試験を行った。わが国の野生のネコ亜目動物から *Bartonella* 属菌の分離を試みたところ、沖縄県のマングースの 15.9%(10/63)および千葉県のパクビシンの 3.8%(1/26)から *Bartonella* 属菌が分離された。マングースとパクビシン分離株の遺伝子解析の結果、各陽性個体から分離した 11 株全てが猫ひっかき病の病原菌である *B. henselae* と同定された(相同性 99.6~100%)。ベトナム中部の Hue 市ならびにカンボジア北西部の Siem Reap 市において、野生ヤモリを捕獲し、*Salmonella* の保菌状況ならびにその血清型分布を検討した。その結果、ベトナム中部ならびにカンボジア北西部に生息するヤモリから *Salmonella* 属菌は、それぞれ 19.5%ならびに 17.3%の割合で分離された。また、分離された血清型は、両地域とも東南アジアでヒト患者からの分離頻度の高い *S. Weltevreden* の分離割合が最も高かった。これらのことから東南アジアにおいて、ヤモリは自然界における *Salmonella* 属菌の主要な保菌動物であり、人の *Salmonella* 感染症の感染源となっている可能性が高いことが明らかになった。

A. 研究目的

野生鳥獣類によって媒介される人獣共通感染症は人に感染すると重篤化するものが多く、世界各国で公衆衛生上の大きな問題となっている。これらの人獣共通感染症は病原体の分布域や宿主動物などが不明な場合が多く、発生予防が難しい。本研究では、日本において患者数は少なくとも、日本の周辺国では大きな問題となっている人獣共通感染症について、疫学的な解析、診断法や予防法などの開発を行うとともに、動物モデルの開発とそれを用いた病態発現機序の解明を目指している。

ダニ媒介性脳炎は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として知ら

れ、ヒトに致命的な脳炎を引き起こす。ロシア、東欧各国を中心に年間 8,000 名以上の患者が報告されている。ハンタウイルス感染症は腎症候性出血熱とハンタウイルス肺症候群の 2 つの病型が知られ、いずれもげっ歯類によって媒介される。これまで中国、ロシア、ヨーロッパ、南北アメリカ大陸などで多く報告され、年間の患者発生数が 5 万人ほどとされているが、世界的に調査が不十分な地域が多く存在する。また、狂犬病は一旦発症すれば 100%の致死率を示す致死的な脳炎で、WHO の報告によれば、世界中で毎年 5 万人以上が狂犬病によって死亡している。その他にも、国内外において回帰熱、バルトネラ感染症、およびサルモネラ

感染症などの患者が報告されている。上記の感染症はいずれも野生鳥獣によって媒介される重篤な人獣共通感染症であり、国内外における汚染地やヒトにおける感染状況に関する情報が不足している。そこで、本研究では野生鳥獣類を対象とした疫学調査を実施して、上記感染症の分布域や病原巣動物といった基礎的な疫学情報を得る。また、これらの感染症に対する有効な診断法を開発して調査に応用する。さらに、感染動物モデルを用いて、発症機序や重症化の機序を解析する。

B. 研究方法

ダニ媒介性脳炎

1) 被験検体

北海道、山形県各地、及びロシアのサマラにおいて捕獲された野鼠より採集された血清を、56°Cで30分加熱し非働化した後、使用時まで-40°Cで保存した。

2) TBEV 特異的抗体の検出

(1) ウイルス様粒子 (SPs) を用いた ELISA 法

293T 細胞に TBEV の prM/E 蛋白領域を発現するように設計したプラスミドをトランスフェクトし、蛋白を発現させることで、培養上清中に SPs を分泌させ回収し、ELISA 用抗原として使用した。

96 穴 ELISA プレートに抗 TBEV-E 蛋白ウサギ抗体を吸着し、SPs を捕捉させた後、被験血清を反応させ、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体により検出した。基質として p-nitrophenyl phosphate を反応させた後、405nm の吸光度を測定し、陰性抗原 (無処置 293T 細胞上清) との吸光度の差が 0.045 を越える検体を中和試験による確定診断に使用した

(2) 中和試験

TBEV Oshima 5-10 株のウイルス溶液と、適宜希釈した被験血清を 37°C で 1 時間反応させた後、BHK 細胞に感染させて 1.5% カルボキシメチルセルロース含有培地で 4 日間培養した。0.1% クリスタルバイオレット加 10% ホルマリン

溶液で固定・染色を行い、プラーク数の測定を行い、50% 以上のプラーク減少を示した最高血清希釈倍率の逆数を中和抗体価として算出した。

3) TBEV の病態発現機序の解析

(1) B6 マウスおよび TNF α KO B6 マウスに極東型 TBEV 株の Oshima 株、Sofjin 株をそれぞれ 10^4 PFU 皮下感染させ、体重減少、症状、致死性を比較した。さらに、感染 5、9 日目における中枢神経組織中のウイルス量をプラークアッセイ、炎症性サイトカイン量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。

(2) B6 マウスに Oshima 株 10^3 PFU 皮下感染後 13 日目に体重変化率により重症個体と軽症個体を区別し (n=3)、それぞれの脳から RNA を抽出しマイクロアレイ法 (mouse 2.0 GeneChip microarray system, Affymetrix) にて遺伝子発現量を測定、比較した。

4) TBEV 検出用の RT-LAMP 法の開発

E 蛋白領域を基に極東型、シベリア型、ヨーロッパ型 TBEV に対してそれぞれの特異的な LAMP プライマーを PrimerExplorerV3 (栄研化学) により設計した。極東型 Oshima 株、Sofjin 株、シベリア型 IR98 株、ヨーロッパ型 Hochosterwitz 株 (オーストリア、ウイーン大学 Dr. Heinz より分与) の RNA 10ng を反応液 25 μ l 中に加え、Loopamp[®] DNA 増幅試薬キット (栄研化学株式会社) を用いて 62.5°C、1 時間の反応を行った。反応の確認はリアルタイム濁度測定装置 LA320C (栄研化学株式会社) を用いて行った。また、TBEV Oshima 株を 10^{-1} - 10^6 PFU ずつ健康ヒト血液 200 μ l またはマダニ 10mg と混合した後 RNA を抽出、RNA 10ng を用いて NS1 蛋白領域を基に作製した TBEV 共通プライマーにより LAMP 反応を行った。

5) フラビウイルス性脳炎の脳内イメージングの検討

JEV JaTH160 株を 10^4 PFU 皮下感染させ、13 日目にポジトロン断層法 (PET) 用のトレーサー試薬である F-18 FDG (FDG スキャン[®] 注、日本メジフィジックス) を 10~20MBq 腹腔内投与

し、投与後 10 分後からイソフルラン吸入麻酔下で 30 分間 FX3000 プレクリニカルイメージングシステム(SII)にて頭部の PET および CT 撮像を行った。

ハンタウイルス感染症

1) ハンタウイルス肺症候群 (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、ヒスチジンタグを利用して精製したものを、全長N抗原とした。

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の作成および抗原性の解析
TPMVの組換え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。得られたモノクローナル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組換え蛋白、ならびに、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抗原の全長抗原を用い、Western blott法によって、結合性を解析した。

リフトバレー熱

1) ウイルスおよび細胞

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

2) VSV シュードタイプウイルスの作製

水疱性口内炎ウイルス(vesicular stomatitis virus, VSV)に RVFV(MP-12 株)のエンペロー

プ蛋白質(GP)を被らせたシュードタイプウイルス(RVFPV)を作製した。RVFPV は VSV 遺伝子のエンペロープ蛋白質遺伝子を欠損させ、その部分にルシフェラーゼ遺伝子が挿入されているため、感染力価をルシフェラーゼ活性を測定することで定量的に評価することが可能である。

3) 感染性 RVFPV を用いた中和抗体測定

RVFPV に対する中和抗体価の測定は、96 ウエ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段階希釈し、それぞれ RVFPV と 37°C で 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) RVFPV の中和活性測定

非働化された血清を段階希釈し、それぞれの血清希釈と RVFPV を 37°C 1 時間中和反応させ、それを 96 ウエルマイクロプレート上に培養した Huh-7 細胞に感染させた。感染後 20 時間後に各ウエルのルシフェラーゼ活性を測定し、コントロール(100%)に比較したルシフェラーゼ活性抑制率を算出した。

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 270 検体を用いた。

狂犬病

1) コウモリ検体からの病原体遺伝子検出

コウモリの捕獲と検体採取

モンゴルのフブスグルにおいてコウモリ(Plecotus ognevi)を捕獲し、性別、体重、頭胴長、尾長、耳介幅を測定した後に、モンゴル獣医学研究所で臓器の採材を行った。臓器は、サンプルチューブに入れて RNAlater (Life technologies)によって保存した。また、コウモリの頭部はモンゴルのコウモリ専門家に譲渡して種の同定に使用した。

病原体検出用マイクロアレイ

本研究では、ゲノムプロジェクトが終了又は途中のウイルス 147 種、細菌 276 種、真菌 49 種、古細菌 30 種、その他 7 種の全長ゲノム配

列とタンパク毒素等 74 遺伝子を標的とした病原体検出用マイクロアレイ (MMDPA ver.1 ; 38,986 種類のプローブ) を使用した。このマイクロアレイはアジレント社 (Agilent Technologies, Santa. Clara, CA) に製造委託した。

核酸抽出

サンプルは、1/4 inch Ceramic Sphere (MP Biomedicals, LLC, Irvine, CA) および Garnet Matrix A Bulk (MP Biomedicals, LLC, Irvine, CA) を入れた 2.0 ml チューブに移した後、SepaGene (SankoJunyaku Co. , Tokyo, Japan) 付属の I 液 0.2ml と II 液 0.2ml を添加し、mini bead-beater (Biospec Products, Bartlesville, OK) を用いて 2,500 rpm、20 秒間破碎処理を行った。破碎したサンプルは、SepaGene (SankoJunyaku Co. , Tokyo, Japan) を用いて DNA 及び RNA を含む核酸溶液を抽出した。抽出したサンプルから核酸 10 µg を新しいチューブへ移し、超音波破碎機 (Bioraptor UCD-250, Cosmobio,) で断片化処理 (4°C 冷却水循環下、30 秒-30 秒オン・オフ インターバル設定) を 5 分間行った。

核酸蛍光標識とハイブリダイゼーション

断片化処理済サンプルは、ULYSIS® Alexa Fluor® 546 Nucleic Acid Labeling Kit (Molecular Probes Inc. Eugene, OR) で蛍光標識後、エタノール沈澱し水に溶解し NanoDrop で核酸濃度を測定した。3 µg の蛍光標識済核酸を 100 µl のハイブリ緩衝液 (6× SSC, 5× Denhardt's solution, 50 mM sodium phosphate, 0.5% SDS, 20% formamide, 5% Skim milk, 50 µg/ml Yeast tRNA) に溶解した。これらのサンプルは、病原体検出用マイクロアレイと 50°C で 18 時間反応させ、50°C 0.5% SDS を含む 6× SSC 5 分間、50°C 1× SSC 5 分間を 2 回、室温 ミリ Q 水で 10 秒間洗浄した。マイクロアレイは、DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies, Santa. Clara, CA) でスキャンし、各病原体スポットの蛍光強度は Feature Extraction Software で取得した。蛍光強度情報はテキストファイルにて保管した。

シグナルの統計解析

Feature Extraction によって出力されたデータテキストファイルは、Gene Array Utility version 080131 (GAU; Symplus, Tokyo, Japan) に読み込み各種解析を行った。

2) 狂犬病ウイルス接種マウスにおける病原性発現機序の解析

筋肉内接種後のマウスにおける西ヶ原株、Ni-CE 株および CE(NiP) 株の体内分布を比較するため、ddY マウス (4 週齢・雌、3 または 5 匹/群) の大腿筋に 10⁶ FFU の各株を接種した。接種 5 日後に脳、脊髄、坐骨神経および大腿筋を採取し、これらの臓器からの RNA 抽出を行った後、ゲノム N 遺伝子領域を標的とした Nested-RT-PCR により、ウイルス遺伝子の検出を行った。

マウス大腿筋における各ウイルスの増殖性を検討する目的で、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を G-L 遺伝子間非コード領域に組換えた各株 [Ni-luc, Ni-CE-luc 及び CE(NiP)-luc] を作出し、上記と同様の条件で、マウスに筋肉内接種した。接種直後、ならびに 12、24、および 72 時間後に大腿筋を採取し、同筋に発現されたルシフェラーゼの活性を測定した。

さらに、培養筋肉細胞における各株の増殖性を比較するため、マウス骨格筋由来 G-8 細胞に西ヶ原株、Ni-CE 株および CE(NiP) 株を感染多重度 0.001 で接種した。その後、1、3、5 及び 7 日目に回収された培養上清中のウイルス力価をマウス神経芽細胞腫由来 NA 細胞を用いたフォーカス・アッセイにより測定した。

回帰熱

1) PCR

通常の PCR には Veriti® Thermal Cycler (Life technologies) を用い、リアルタイム PCR には Applied Biosystems 7000 リアルタイム PCR システム (Life technologies) を用いた。

2) 参照コントロールプラスミドの作成

それぞれの PCR 法による DNA 検出感度を定量するために、ボレリアゲノム DNA より鞭毛

遺伝子等の全長、もしくは一部を pGEM®-T vector (Promega)にクローニングし参照コントロールプラスミドとした。

3) 血液培養レズンボトルからのリアルタイム PCR を用いた回帰熱ボレリア DNA の検出

医療機関で体液中の細菌培養に用いられている BACTEC™ レズンボトルからボレリアを検出する方法を確立するために、レズンボトルに模擬的に回帰熱ボレリアを接種し、その検出感度を調べた。回帰熱ボレリアである *Borrelia miyamotoi* の培養液を 10 倍階段希釈し、これらを 2×10^5 cells/ml から 0.2 cells/ml となるよう小児用 BACTEC™ レズンボトル (BD 94F, 40ml 入り) に接種し、試験材料とした。陰性コントロールとしてボレリア株未接種のレズンボトル培養液を用いた。これらの模擬培養液 1ml を分取し、遠心 ($200 \times g$, 60 sec) によりレズンを除去した上澄液を得た。この上澄液に含まれるボレリアを遠心 ($15,000 \times g$, 10 min) により沈殿後、DNeasy Tissue&Blood kit (Qiagen) により DNA 抽出した。DNA 溶液 5ul を用い、*rrs*-TaqMan® probe (RF) 法によりボレリア DNA を検出した。

バルトネラ感染症

2001 年 3 月～2012 年 2 月にかけて、管理捕獲された沖縄県のマングース 63 頭と千葉・神奈川県の高ビシン 50 頭から血液を採取した。血液は EDTA 管に入れ凝固防止した後、検査まで -80°C で保存した。解凍後、溶血した血液を 5%ウサギ血液加 Heart Infusion Agar に塗抹し、 35°C 、5% CO_2 下で 4 週間 *Bartonella* 属菌の定量培養を行った。*Bartonella* 属菌を疑うコロニーから分離株と既存種のハウスキーピング遺伝子 (16S rRNA, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *ribC*, *rpoB*) の塩基配列を解析して BLAST 検索を行い、最も近縁な *Bartonella* 属菌種との相同性から菌種を同定した。さらに、9 つの遺伝子間領域を用いた Multispacer typing (MST) 法によって分離株、猫ひっかき病 (GSD) 患者由来株、ならびに沖縄、千葉、神奈川、東京のネコ由来

株を型別し、その病原的意義の解明を試みた。

サルモネラ感染症

1) 供試材料

供試検体として、2011～2012 年にベトナム中部の Hue 市周辺ならびにカンボジア北西部の Siem Reap 市周辺で捕獲した野生のヤモリ 3 種 411 検体の腸管内容物を用いた。なお、ベトナム中部では乾期 (3～8 月) と雨期 (9～2 月) に検体採取を行った。

2) *Salmonella* 属菌の分離、同定および血清型別方法

供試検体は 10ml の EEM 培地 (栄研化学 (株): 栄研) に接種した後、 37°C で 24 時間前増菌培養した。その培養液 1ml を 10ml のハーナ・テトラチオン酸塩培地 (栄研) に接種し、 37°C で 24 時間増菌培養後、その 1 白金耳を DHL 寒天培地 (日水製薬 (株): 日水)、brilliant green Agar (OXOID) ならびに MLCB 寒天培地 (日水) に画線塗抹し、 37°C で 24 時間培養した。各分離培地上に発育してきた *Salmonella* 属菌を疑う典型的なコロニーから 1～3 個を釣菌し、それぞれを trypticase soy agar (BD) を用いて純培養後、TSI 寒天培地 (日水)、LIM 培地 (日水) および VP 半流動培地 (栄研) を用いて生化学性状試験を行った。*Salmonella* 属菌と同定された菌株については、生物型別を行うとともに、市販のサルモネラ免疫血清 (デンカ生研 (株)) を用い、血清型を決定した。

(倫理面からの配慮について)

患者からの検体は番号によって管理され、個人が特定できないような配慮がされている。また、動物実験は研究代表者および研究分担者の研究機関における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。本研究で研究対象となった日本固有のネコ亜目動物は、全て管理捕獲された個体である。また、マングースは特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律に

より捕獲し、獣医師が適切な麻酔下のもと、不動化し、血液等を採取した後、安楽殺を行った。

C. 研究結果

ダニ媒介性脳炎

1) ダニ媒介性脳炎の血清疫学的調査

北海道道東地域の斜里と道央地域の富良野および山形県において計 307 検体の野鼠検体が集められ、SP-ELISA 法によりそれら全ての野鼠血清中の抗 TBEV 抗体を検査した。その結果、SP-ELISA では 35 検体が陽性と判定された。これら血清について中和試験により確定診断を行った結果、35 検体中 1 検体(斜里の 2010 年のエゾヤチネズミ)で中和抗体価が 80 倍を示し、抗 TBEV 抗体陽性と判定された。

ロシアのサマラでは、これまで TBEV 感染者の発生の報告はあるが、野鼠検体を用いた血清疫学調査などの流行巢の調査は行われていない。計 151 検体の野鼠検体が集められ、SP-ELISA 法によりそれら全ての野鼠血清中の抗 TBEV 抗体を検査した。17 検体が陽性と判定された。それら検体について中和試験により確定診断を行ったところ、17 検体中 1 検体が抗体陽性と判定された。抗体陽性検体はキクピアカネズミで、中和抗体価は 320 倍であった。

2) TBE の病態発現機序の解析

Oshima 株感染後の致死率は B6 マウスで 38.1% (n=21)に対して TNF α KO B6 マウスでは 100%(n=14)となった。また、致死個体の生存日数は B6 マウスで 14.1 \pm 2.3 日に対して TNF α KO B6 マウスでは 12.6 \pm 0.74 と 2 日程度短くなった。しかしながら、WT マウスと TNF α KO の脳内ウイルス量を比較したところ有意な差が確認されなかった。また、脳および脾臓中の IFN γ 、IL-2、IL-4、IL-6 の発現量も比較したがマウス群のあいだで有意な差は確認されなかった。

一方、Sofjin 株感染では B6 マウス、TNF α KO マウスともに致死率は 100%、致死個体の

生存日数は B6 マウスで 9.4 \pm 0.19 日、TNF α KO マウスで 8.83 \pm 0.11 となり両マウス間で有意差が見られなかった。TBEV Oshima 株感染マウス脳の遺伝子発現比較の結果、軽症個体にくらべ重症個体で発現上昇していた遺伝子として Sulfotransferase family, Protein kinase inhibitor, D19Erttd386e, BB541617, Nucleolar prot Nol 7, BB476293, BB747838, Ribonuclease A family がみられた。一方、低下していた遺伝子として Calpain 3, LSM7homo,U6 snRNA, 160586(RIKEN), Olfactomedin like 3, DNA methyltransferase, 116018(RIKEN), Smad 7, 53BP1, Parc がみられた。

3) TBEV 検出用の RT-LAMP 法の開発

RT-LAMP 法において TBEV 各サブタイプ特異的プライマーを用いると、各サブタイプのウイルス株遺伝子のみを検出でき他の株との交差反応性は確認されなかった。また、健康ヒト血液またはマダコと混合した TBEV の RNA より、いずれも 10² PFU 以上のウイルスを含む混検体からウイルス遺伝子が検出された。

4) フラビウイルス性脳炎の PET による脳内イメージングの検討

F-18 FDGを投与した JEV JaTH160 株感染マウスでは大脳皮質域における FDG 集積の著しい低下がみられた。一方、非感染コントロールマウスでは脳全体に FDG 集積がみられた。

5) TBEV 感染マウスの病理学的検索

TBEV を BALB/c マウスに静脈内接種すると、ウイルスは腸管神経叢と中枢神経系に侵入し、神経細胞に感染、増殖し、神経症状を引き起こした。

ハンタウイルス感染症

1) ハンタウイルス感染症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 2 種類のハンタウイルス、SNV および BCCV、ならびに、ヒトへの感染は不明であるがメキシコでげっ歯類の間に存在している CARV との鑑別診断が可能であるか検討した。N 蛋白全長を

発現させたものを抗原として用いた場合、自然感染した野生げっ歯類の罹患ウイルスを鑑別することは不可能であった。これは、N 抗原の N 末端の共通抗原領域を持つ全長抗原では、その強い交差反応のためにすべての抗体が強く結合したためと考えられる。しかし、N 末端領域を除いた N 抗原を用いて ELISA を行った場合、それらのウイルスに対する血清型を鑑別することが可能であった。これは、N 末端領域の共通抗原領域が除かれたため、残された部位に存在するウイルス特異的なバリエーション領域に対する反応性が相対的に高まったためと考えられる。

HFRS 関連ウイルスである、HTNV, SEOV, THAIV, および DOBV についても、N 末端を除いた N 抗原がげっ歯類血清においても、血清型鑑別診断が可能であるかを解析した。すなわち、それぞれのウイルスに対する実験感染ラット血清ならびに SEOV 自然感染ドブネズミ血清を用いて、ELISA 法で反応性の相違について比較・検討した。その結果、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血清学的に鑑別可能であることが明らかとなった。

2) 食虫目由来ハンタウイルスの抗原性解析

確立した6種類のモノクローナル抗体のうち、ED5, 1A3, 2H6 の3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3種の抗体は N 末端近傍に位置するエピトープを認識する抗体であることが分かった。一方、EB5, B5H9 および 1F1 の3種の抗体は、げっ歯類由来ハンタウイルス抗原および日本産食虫類由来ハンタウイルスである ASAV の N 抗原のいずれとも反応せず、TPMV に特異的なエピトープを認識すると考えられた。ASAV とも反応しなかったことから、食虫類由来ハンタウイルスにも抗原性に相違があることも判明した。しかし、これらの抗体は

リニアエピトープを認識しなかったため、Western blott 法によって、この特異エピトープの存在領域について明らかにすることができなかった。

リフトバレー熱

1) 被検血清のRVFVに対する中和抗体およびRVFVpvに対する中和活性陽性率

270 検体中 34 検体(12.6%)が RVFV に対する中和抗体陽性を呈した。RVFVpv に対する中和活性測定において、ルシフェラーゼ活性が 50%以上の抑制を呈した場合に陽性と判定した場合、RVFVpv に対する中和活性陽性率は 270 検体中 59 検体(21.9%)であった。

2) 感染性 RVFV に対する中和抗体測定法に比較した、RVFVpv に対する中和活性測定による抗体測定法の精度と感度

中和抗体陽性検体 34 検体全てが RVFVpv に対する中和活性陽性を呈した(感度:100%)。一方、中和抗体陰性の 238 検体中 211 検体が RVFVpv に対する中和活性陰性を呈した(特異度:89%)。感染性 RVFV に対する中和抗体測定法で陽性を呈した血清中の中和抗体価と RVFVpv に対する中和活性レベルは、正の相関を示した。

狂犬病

1) コウモリ検体からの病原体遺伝子検出

モンゴルで解剖、採材、保存されたコウモリの肺と肝臓について、核酸抽出を行った。これらの核酸サンプルは、蛍光ラベル化後、病原体検出用マイクロアレイを用いて網羅的病原体検出を行った。この結果、統計学的有意水準($p < 0.001$, $Z > 3.09$)を満たす病原体は12種類見つかった。病原体の蛍光シグナル強度は Human herpesvirus 6B (NC_000898; シグナル強度 2377) が最も高く、次いで Meleagrid herpesvirus 1 (NC_002641; シグナル強度 770) だった。この2つのヘルペスウイルス由来のシグナルおよび Z 値は、他の病原体シグナルと比較してはるかに高く、本サンプルにヘルペスウ

ウイルスまたは類似する塩基配列を有する病原体が多く含まれていた可能性が強く示唆された。しかし、狂犬病ウイルス検出用マイクロアレイプローブによるウイルス遺伝子の検出では、最も高いシグナルが検出された検体でもバックグラウンドと同レベルだった。

2) 狂犬病ウイルス接種マウスにおける病原性発現機序の解析

西ヶ原株を筋肉内接種したマウス3匹中3匹において、脳、脊髄及び坐骨神経からウイルス遺伝子が検出された。また、CE(NiP)株を接種したマウス5匹中2匹において、上記のすべての組織におけるウイルス遺伝子の存在が確認された。一方、Ni-CE株を接種したマウス3匹のうち、これらの組織においてウイルス遺伝子が検出された個体は認められなかった。これに対し、大腿筋では、いずれのウイルス株接種群のすべてのマウス個体においてウイルス遺伝子が検出された。以上より、Ni-CE株の末梢神経侵襲性が極めて低いこと、ならびに西ヶ原株のP遺伝子が末梢神経侵襲性を高める機能を有することが明らかとなった。

Ni-luc株及びCE(NiP)-luc株を接種したマウスの大腿筋では、経時的にルシフェラーゼの活性が上昇する傾向が確認された。一方、Ni-CE株を接種したマウスの大腿筋では、このような明瞭なルシフェラーゼ活性の上昇は確認されなかった。

マウス骨格筋由来G-8細胞における西ヶ原株、Ni-CE株およびCE(NiP)株の多段階増殖を検討した結果、西ヶ原株およびCE(NiP)株のウイルス力価が緩やかに上昇したのに対し、Ni-CE株の力価は経時的に著しく減少した。以上より、*in vivo*および*in vitro*の実験系の両者によって、西ヶ原株のP遺伝子が筋肉細胞におけるウイルスの増殖性に重要な役割を果たすことが判明した。

回帰熱

1) 各種ボレリア属菌DNA検出法の検証

gfpQ-nested PCRでは使用した回帰熱ボレリア株(含むゲノム配列データ)および爬虫類型ボレリア株すべてで増幅DNAが確認もしくは*in silico*解析で増幅可能であることが明らかとなった。他方、リアルタイムPCR系では、すべての系でその特異性は100%であったが、*flaB*-TaqMan® probeでは、回帰熱ボレリア群検出における感度は50%であった。これまでに、ライム病ボレリアを伝播する*Ixodes*属ダニのいくつかは、回帰熱群ボレリアも保有することが知られてきている。このことからBarbourらによって報告された*rrs*遺伝子を標的とするリアルタイムPCR系も試行し、試験を行った範囲では、ライム病ボレリアでは感度が100%であること、また回帰熱ボレリアでも95%の感度が得られることが明らかとなった。これに加え、Takanoらによって開発された新型ボレリアである爬虫類型ボレリアに特異的な*gIVC*を標的としたリアルタイムPCR法の感度が94.7%であることも明らかにした。また*rrs*-TaqMan® probe(RF)、*rrs*-TaqMan® probe(LD)、および*gIVC*-TaqMan® probeのいずれのリアルタイムPCR系においても、検体中に含まれるDNAコピー数が 10^8 - 10 コピーであれば定量可能であることも確認された。

2) 細菌検査材料を用いた模擬試験

回帰熱の発熱は一過的であり、必ずしもすべての症例で適切な検査材料(発熱期の血液など)が得られる訳ではない。そこで本研究では、細菌検査用のカルチャーボトルを検査材料とするDNA検出法について標準化作業を行った。本試験では、細菌培養培地1ml中に細菌数が20以上の場合に検出可能であった。これは、40mlの培地中に菌数が800個あれば検出可能であることを示している。

バルトネラ感染症

沖縄県のマングースの15.9%(10/63)および千葉県のパクビシンの3.8%(1/26)から*Bartonella*属菌が分離されたが、2種のヤマネコからは*Bartonella*属菌は分離されなかった。

マングース・ハクビシンの血中菌数はそれぞれ $3.0 \times 10^1 \sim 8.9 \times 10^3$ CFU/ml, 7.0×10^3 CFU/ml であったにもかかわらず、無症状であった。マングース・ハクビシンから分離された 11 株について、6 つのハウスキーピング遺伝子の BLAST 検索を行ったところ、各分離株は *Bartonella henselae* と最も高い相同性(相同性値; 99.6~100%)を示し、*B. henselae* と同定された。

MST 法の結果、マングース由来の 10 株およびハクビシン由来の 1 株は 5 つの MST 型 (MST 8, 14, 37, 58, 59) に分類され、全てが CSD 患者株と同じ系統に属した。マングース由来の 10 株のうち、2 株 (MST58) は沖縄のネコ由来の 2 株と、2 株 (MST14) は CSD 患者由来の 8 株とそれぞれ同じ MST 型であった。ハクビシン由来の 1 株は新規の MST 型 (MST59) であった。

サルモネラ感染症

ヤモリの腸管内容物から *Salmonella* 属菌の分離を試みたところ、ベトナム中部では 313 検体中 61 検体 (19.5%) から、カンボジア北西部では 98 検体中 17 検体 (17.3%) から分離された。また、ベトナム中部でのヤモリの *Salmonella* 属菌の保菌率を季節別にみると、乾期では 160 検体中 29 検体 (18.1%) が、雨期では 153 検体中 32 検体 (20.9%) が *Salmonella* 陽性であったが、季節間で保菌率に有意な差は認められなかった。また、ベトナム中部ならびにカンボジア北西部の両地域とも、ヤモリの種間で *Salmonella* 属菌の保菌率に有意な差は認められなかった。

ベトナム中部では *Salmonella* 陽性のヤモリ 61 検体からは、*Salmonella* 属菌 61 株が分離された。61 株中 29 株 (47.5%) は市販免疫血清で 3 種類の血清型に型別された。*S.Weltevreden* が 19 株 (31.1%) で最も多く、次いで *S.Brunei* が 8 株 (13.1%) ならびに *S.Lexington* が 2 株 (3.3%) であった。残りの 32 株 (52.5%) は血清型別できなかつたが、20 株

が生物群 IV、10 株が IIIa、1 株が V に生物型別され、1 株が型別不能であった。カンボジア北西部では、*Salmonella* 陽性のヤモリ 17 検体からは、*Salmonella* 属菌 17 株が分離された。17 株中 16 株 (94.1%) は 1 種類の血清型に型別され、*S.Weltevreden* に同定された。

D. 考察

ダニ媒介性脳炎

1) TBE の血清疫学的調査

北海道の道東地域において初めて抗 TBE ウイルス抗体を保有する野鼠が存在していることが示された。道東地域では TBE ウイルス極東型の本来の媒介マダニであるシュルツェマダニが優占種であること及び、今回斜里町において捕獲された主な野鼠種が道南地方の TBE ウイルスの感染環の一翼を担っていると考えられるアカネズミ、エゾヤチネズミ、ヒメネズミであることから、今回の結果は道東地域において TBE ウイルスの流行巢が存在する可能性を示唆するものである。

また、ロシアのサマラにおいて初めて抗 TBEV 抗体を保有する野鼠が存在していることが示された。ロシアのサマラでは、TBE 患者の発生が報告されており、TBEV の流行巢の存在が示唆される。中和抗体陽性検体の野鼠種はキクビアカネズミであったが、これは日本における TBEV の宿主動物と考えられているアカネズミと同じ *Apodemus* 属に属しており、サマラ周辺における主な TBEV の宿主小型げっ歯類の一つと考えられる。

2) TBEV の病態発現機序の解析

TNF α KO マウスへの TBEV Oshima 株感染において致死性の増加がみられたことから、TNF α 応答は重症化抑制に働くことが示唆された。しかしながら、TNF α KO マウスにおいて中枢神経組織におけるウイルス量には有意な増加が認められず、また、IFN γ 、IL-2、IL-4、IL-6 の発現量に有意な差がみられなかったことから、TNF α が重症化をどのように抑制するかの機序については今後の課題である。一方、

Sofjin 株感染では TNF α KO でも致死性に違いがみられなかったことから、Sofjin 株感染の場合は TNF α 応答の重症化への影響は小さいものと考えられた。

TBEV 感染マウス脳内遺伝子発現において、重症個体と軽症個体で差がみられた遺伝子はこれまでにウイルス性脳炎との関連が報告されていないものが多く、また機能が必ずしも明らかになっていない遺伝子がみられる。これらの遺伝子がフラビウイルス感染にどのように関与しているかを調べるのが今後の課題である。

3) TBE の RT-LAMP 法の開発

TBEV 共通および各サブタイプ特異的に TBEV 遺伝子を検出できる RT-LAMP 法を確立した。LAMP 法は特別な装置を必要とせず、ウォーターバスなどで 62.5°C、1 時間の反応で検出できる点が大きなメリットである。また、ヒト血液およびマダニ材料が LAMP 法による TBEV 遺伝子検出を阻害しないことが確認された。したがって、本研究で確立した方法は、TBEV 患者臨床サンプルからの簡便迅速診断、また、マダニ中の TBEV 保有状況を調べるための野外調査への応用に期待がもてる。

4) フラビウイルス性脳炎の PET による脳内イメージングの検討

F-18 FDG を用いた PET イメージングは臨床検査や薬剤開発研究での応用性が高い。F-18 FDG は代謝活性の高い細胞に取り込まれるため、炎症部位や癌細胞、中枢神経組織での集積がみられる。しかしながら、ウイルス感染、特に急性脳炎において F-18 FDG の集積が上昇するのか低下するのかのデータはこれまでに報告がなかった。本研究で、脳炎部位では FDG 集積が低下することがはじめて確認された。したがって、この PET イメージングを応用することにより、フラビウイルス脳炎患者において重症化の程度、中枢神経組織のダメージが高い部位などを特定して患者の予後判定、治療方針決定への重要な診断法への確立が期待される。

ハンタウイルス感染症

1) ハンタウイルス感染症の鑑別診断法の開発

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。この診断法を用いることにより、HPS患者の輸入症例に対し、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、ユーラシア大陸全域で流行している、HFRSについても、患者と病原巣動物のラットやその他のげっ歯類血清について鑑別が可能であった。これによって、HFRS輸入症例についても迅速な鑑別診断が可能と考えられる。さらに、東アジア諸国では、*Rattus*属のネズミが主な自然宿主となって、複数のハンタウイルスが存在していると考えられる。このため、本法は、それら地域での疫学的研究への応用に有効と考えられた。本法は組換え抗原を用いたELISAであるため、標準法である中和試験と異なり生きたウイルスやBSL3などの施設を必要としない安全・迅速・簡便な代替法である。

2) 食虫目由来ハンタウイルスの抗原性解析

食虫類由来ハンタウイルスの抗原性をN蛋白に結合する6種類の抗体を用いて解析した。その結果、それらウイルスのN蛋白の抗原性は、げっ歯類由来ハンタウイルスとは大きく異なることが分かった。TPMV1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。今後、分離されたウイルスについて、これらのモノクローナル抗体を用いた抗原性のパネルアッセイを行うことが可能となると考えられる。

リフトバレー熱

RVFV_{pv}に対する中和活性を50%以上抑制する場合を陽性とした場合、感度と特異度はそれぞれ100%と89%であった。RVFVに対する中和抗体陽性検体は、すべてRVFV_{pv}に対する中和活性陽性を示したが、RVFV_{pv}に対する中和活性陽性検体の42%が感染性ウイルスに対する中和抗体陰性を呈し、RVFV_{pv}に対する中和活性陽性血清であっても、40%の確率(陰性予想値, negative predictive value)で中和抗体陰性である可能性がある。今回、50%以上のルシフェラーゼ活性を抑制する場合を陽性としたが、60%という値をカットオフにすると感度と特異度を変えることなく、陰性予想値を下げるができる(データ未表示)。さらなる検討が必要である。

狂犬病

既存のリッサウイルス等病原体は塩基配列等が明らかであり特異的なプライマーで高感度な検出が可能であるが、調査が行われていない地域や宿主から病原微生物を検出する場合は塩基配列の変異が予想される。したがって、ウイルス株間でみられる標的遺伝子の変異を区別せず検出可能なマイクロアレイ法の有用性を検討することにした。捕獲されたコウモリから採材した臓器を利用して、モンゴルに生息するコウモリが保有しているリッサウイルス等の病原微生物の遺伝子をマイクロアレイによってモニタリングする方法を構築して、有意な検出シグナル($p < 0.001$ が Zスコア 3.09 以上)を示す12病原体を得た。

自然界におけるリッサウイルスの分布については不明な点が多く、感染したコウモリにおける潜伏期間も明らかでない。狂犬病を除くリッサウイルスは、主にヨーロッパ、オーストラリア、アフリカに分布しており、そのほとんどがコウモリを自然宿主にしているが、近年、中央アジア(Kyrgyzstan, Tajikistan, Krasnodar region)、シベリア(Irkutsk)のコウモリからもリッサウイル

スが分類されている。東南アジアではリッサウイルスの分離報告はまだないが、リッサウイルスに対する中和抗体が陽性のコウモリ血清がフィリピン、タイ、カンボジアで報告されている。そこで、モンゴルの獣医科学研究所との共同研究によって、モンゴルに生息するコウモリに関する生息状況を調べ、調査可能な地域と捕獲可能なコウモリ(*Plecotus ognevi*)を選択してその捕獲、臓器採材、検体の移送等を可能にした。病原体検出用マイクロアレイによってウイルスのみでなく、細菌、真菌類を含めて多くの標的遺伝子が検出できることを明らかにした。現在、有意と判定した病原体についてより詳細な検索を行っており、当宿主(コウモリ)との因果関係を解析する方法や分離方法等について検討を行っている。

西ヶ原株のP遺伝子が末梢神経侵襲性を高める機能を有することが明らかとなった。P遺伝子の翻訳産物(P蛋白質)は、ウイルス粒子内部に存在するヌクレオカプシドを構成する。神経細胞に侵入後、狂犬病ウイルスがヌクレオカプシドではなく、ウイルス粒子の形態で軸索輸送されるという既報の知見(Klingen *et al.*, J. Virol., 2007)を考慮すると、ウイルス粒子内部のP蛋白質が神経細胞へのウイルス吸着・侵入過程に直接関与するとは考えにくい。むしろ、P蛋白質が筋肉におけるウイルスの増殖効率に関与していることが推測された。

そこで、筋肉細胞における各ウイルスの増殖を比較したところ、*in vivo*および*in vitro*の実験系の両者によって、P遺伝子が筋肉におけるウイルス増殖性を決定することが明らかになった。P蛋白質は、ウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼ(L蛋白質)の共因子として、ウイルスRNAの転写・複製に必須な役割を果たす。また、ウイルスのインターフェロン(IFN)競合蛋白質としての機能も有しており、感染細胞におけるIFN誘導(Brzózka *et al.*, J. Virol., 2005)およびIFN応答(Vidy *et al.*, J. Virol., 2005)の両者を阻害することが知られている。したがって、筋肉細胞における西ヶ原株およびNi-CE株の

増殖性の違いに、これらの P 蛋白質機能が関与している可能性が考えられた。

回帰熱

回帰熱はスピロヘータの一種、ボレリア属細菌による感染症で、マダニ媒介性の *B. turicatae*, *B. duttonii* などの他、およびシラミ媒介性の *B. recurrentis* が病原体として知られている。回帰熱は、高いレベルでの菌血症による発熱期、および感染は持続しているものの菌血症を起こしていない、もしくは低レベルでの菌血症状態(無熱期)を交互に数回繰り返す、いわゆる周期性の熱発を主訴とする。これまでの報告では、菌血症を起こした患者の血液中には、通常 10^5 個以上の細菌が含まれることから、発熱期の患者材料から病原体を検出することは難しい作業ではない。一方、発熱期から無熱期へ移行した患者材料より病原体を検出することは、血液中の細菌数が極めて少ないことから難しいとされる。このため、高感度かつ特異的な検査法の確立と、その方法を医療機関から入手可能な様々な検査材料へ適用するための応用法の検証が必要である。回帰熱感染における抗体検査法が未確立であることから、本研究では、まずは高感度の病原体 DNA 検出法、および臨床現場に保存されている患者材料を含む検査検体からの病原体検出法の確立を行った。本研究では新規および既報の試験法についてその感度、特異性および検出限界の検証を行い、Barbour らによって報告された *rrs*-TaqMan® probe(RF) 法、*rrs*-TaqMan® probe(LD)法および Takano らによって報告された *glvC*-TaqMan® probe 法の組み合わせにより、既知のボレリア属全般について、100%の確率でそのグループを特定でき、また、94.7%以上の感度で、細菌 DNA が 10 コピーでも検出できることを明らかにした。*rrs*-TaqMan® probe 法は同一 tube 内で回帰熱ボレリアとライム病ボレリアを同時に検出できる点で、検査の迅速化が図れることもメリットである。また本研究で検出限界測定に使用した参照コントロー

ルプラスミドは、地方衛生研究所等で検査を行うための陽性コントロールとして使用可能である。加えて、医療機関で血液や血清が保存されていない場合に、細菌試験用に使用した血液培養ボトルも検査材料として使用できることも示された。本方法では、患者血液 1ml 中に 800 コピーの病原体 DNA が存在する場合、培養液の 1ml を用いることで試験判定できることから、通常回帰熱では、本法は十分な検出感度を備えていると考えられる。

バルトネラ感染症

本研究で検討した野生のネコ亜目動物のうち、沖縄県で捕獲したマンガースの 15.9% (10/63)と千葉県で捕獲したハクビシンの 3.8% (1/26)から *Bartonella* 属菌が初めて分離された。マンガース・ハクビシンから分離された 11 株の 6 つのハウスキーピング遺伝子の塩基配列は、いずれも CSD の起 因 菌 である *Bartonella henselae* と最も高い相同性(相同性値; 99.6~100%)を示したことから、マンガースとハクビシンは *B. henselae* を保菌していることが初めて明らかとなった。今回検討した沖縄県のマンガースの *B. henselae* 保菌率(15.9%)は、同県のネコと同等であり、また、血液の保存方法の不備により、ハクビシンの *B. henselae* 保菌率(3.8%; 1/26)は低く見積られた可能性があるものの、千葉県のネコと同等の保菌率であった。

B. henselae を保菌していたマンガースとハクビシンの最大血中菌数はそれぞれ 8.9×10^3 CFU/ml, 7.0×10^3 CFU/ml であったが、各動物の臨床症状は確認されなかった。マンガースとハクビシンの *B. henselae* の保菌率や血中菌数の成績、さらに陽性個体はいずれも臨床症状を示していなかったことなどから、これらの動物は *B. henselae* の自然宿主である可能性が示唆された。

MST 解析では、マンガース・ハクビシン分離株と今回解析した日本のネコ由来株は 8 つの MST 型に分類され、全て系統 1 に分類された。

また、マンガース分離株の 2 株は沖縄のネコ由来の 2 株と、他の 2 株は CSD 患者由来の 8 株と同じ MST 型であった。既報では、ほとんどの日本のネコおよび全ての CSD 患者株は系統 1 に分類されたことから、マンガースが保菌する *B. henselae* 株は、いずれもヒトに対して病原性を有している可能性が考えられた。

ハクビシン分離株と同じ MST 型の *B. henselae* 株は、日本を含め欧米諸国の CSD 患者株およびネコ分離株においても検出されていない。しかしながら、2001 年に高知県において、ペットのハクビシンによる引っ掻き傷が原因となって CSD に罹患した患者が 1 例報告されていることから、ハクビシンはヒトに対し CSD を起こしうる *B. henselae* 株を保菌している可能性が考えられる。

サルモネラ感染症

ベトナム中部ならびにカンボジア北西部に生息するヤモリから *Salmonella* 属菌はそれぞれ 19.5%ならびに 17.3%と高率に分離された。ベトナム中部ならびにカンボジア北西部はベトナム・メコンデルタから、直線でそれぞれ約 800km ならびに約 450km 離れているが、いずれの地域においてもヤモリからは *Salmonella* 属菌がメコンデルタ(14.5%)とほぼ同ような割合で分離されたことから、ベトナム、カンボジアを含む東南アジアでは、ヤモリは普遍的に *Salmonella* 属菌の主要なレゼルポアになっている可能性が高いものと推測された。

ヤモリから分離された *Salmonella* 属菌の血清型は、ベトナム中部では *S.Weltevreden*、*S.Brunei* ならびに *S.Lexington* で、カンボジア北西部では *S.Weltevreden* であった。いずれの地域でも *S.Weltevreden* の割合が最も高く、特にカンボジア北西部では、分離株のほとんどが *S. Weltevreden* であった。*S. Weltevreden* はベトナムを含む東南アジアではヒトの *Salmonella* 感染患者から高頻度に検出される主要な血清型として知られており、家畜、食品、環境などから広く分離されるが、その自然界におけるレゼル

ポアは明らかになっていない。本血清型は、ベトナムに生息するヤモリが分布している沖縄県以外では、我が国ではほとんど検出されないが、近年東南アジアから輸入されたコショウから本血清型菌が分離されたことが報告されている。また、フィンランド、ノルウェーおよびデンマークでは、*S.Weltevreden* に汚染されたアルファルファによる集団食中毒の発生が報告されている。ヤモリはベトナムを含む東南アジアでは、人の生活環境周辺に高密度で生息しており、しばしば人の生活環境はヤモリの糞便に汚染されている。これらのことから、ヤモリは東南アジアでは広く人の *Salmonella* 感染症、特に *S.Weltevreden* の主たる感染源になっている可能性が高いものと思われる。現在までのところ、東南アジアにおいて *Salmonella* 属菌の保菌動物や汚染源としてのヤモリの重要性についてまだ注目されていないが、今後、これらの地域において、食品の安全を担保するためには、食品の加工場や処理場において、ヤモリを侵入させないなどの対策を講じる必要がある。また、我が国の沖縄県や鹿児島県南部の島々には、東南アジアに広く分布するホオグロヤモリが生息しており、近年その分布域を北へと拡大している。我々は沖縄県のホオグロヤモリから *S.Weltevreden* を分離しており、ホオグロヤモリの分布域の拡大に伴い、本血清型菌が日本本土に持ち込まれる可能性があるため、今後、継続的な調査・監視が必要であろう。

E. 結論

今回、血清疫学調査により、北海道の斜里町とロシアのサマラにおいて初めて TBEV の流行巣が存在することが示唆された。

TBE の重症化には TNF α 応答による抑制機構が関連した病態機序が働くことが示唆された。フラビウイルス脳炎イメージングによる病態診断の確立に関する重要な基礎情報が得られた。

組換え N 蛋白抗原を用いて、北アメリカ大陸由来ハンタウイルス感染症とラット由来ハンタウ

ウイルス感染症の鑑別診断法を開発した。これにより、今後、海外から侵入の可能性のある全てのハンタウイルス感染症を安全かつ簡便に診断出来ると考えられる。また、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。

マイクロアレイ法は人獣共通感染症の病原体検出に有用であることが明らかになった。

狂犬病ウイルス(西ヶ原株)は、そのP遺伝子の機能により、筋肉において効率よく増殖し、結果として、高い効率で末梢神経に感染すると考えられた。

リアルタイムPCR法が回帰熱の診断に極めて有用であることが明らかになった。

野生マングースやハクビシンが猫ひっかき病の病原体である *B. henselae* を保菌していたことから、ネコ科以外の野生ネコ亜目動物がCSDの新たな感染源となることが示唆された。

東南アジアにおいて、ヤモリは自然界における *Salmonella* 属菌の主要な保菌動物であり、人の *Salmonella* 症の感染源となっている可能性が高いことが判明した。

F. 健康危険情報

アルジェリアで回帰熱と診断された日本人男性の一例:IASR

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshii, K., Yamazaki, S., Mottate, K., Nagata, N., Seto, T., Sannada, T., Sakai, M., Kariwa, H., and Takashima, I.: Genetic and biological characterization of tick-borne encephalitis virus isolated from wild rodents in southern Hokkaido, Japan in 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis*, *in press*.
- 2) Yoshii, K., Moritoh, K., Nagata, N., Yokozawa, K., Sakai, M., Sasaki, N., Kariwa, H., Agui, T., and Takashima, I.: Susceptibility to flavivirus-specific antiviral response of Oas1b affects the neurovirulence of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. *Arch Virol*, *in press*.
- 3) 好井健太郎, 山崎翔子, 持館景太, 荻和宏明, 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. *獣医畜産新報*, 65:377-378, 2012
- 4) Sanada, T., Seto, T., Ozaki, Y., Saasa, N., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., and Kariwa, H.: Isolation of Hokkaido virus, genus Hantavirus, using a newly established cell line derived from the kidney of the grey red-backed vole (*Myodes rufocanus bedfordiae*). *J Gen Virol*, 93, 2237-2246, 2012
- 5) Sanada, T., Kariwa, H., Saasa, N., Yoshikawa, K., Seto, T., Morozov, V.G., Tkachenko, E.A., Ivanov, L.I., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., and Takashima, I.: Development of a diagnostic method applicable to various serotypes of hantavirus infection in rodents. *J Vet Med Sci*, 74: 1237-1242, 2012
- 6) Saasa, N., Sanchez-Hernandez, C., de Lourdes, Romero-Almaraz, M., Guerrero-Ibarra, E., Almazan-Catalan, A., Yoshida, H., Miyashita, D., Ishizuka, M., Sanada, T., Seto, T., Yoshii, K., Ramos, C., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., and Kariwa, H.: Ecology of hantaviruses in Mexico: Genetic identification of rodent host species and spillover infection. *Virus Res*, 168:88-96, 2012
- 7) Saasa, N., Yoshida, H., Shimizu, K., Sanchez-Hernandez, C., Romero-Almaraz, Mde, L., Koma, T., Sanada, T., Seto, T., Yoshii, K., Ramos, C., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., and Kariwa, H.: The N-terminus of the

- Montano virus nucleocapsid protein possesses broadly cross-reactive conformation-dependent epitopes conserved in rodent-borne hantaviruses. *Virology*, 428:48–57, 2012
- 8) Yoshii, K., Igarashi, M., Ichii, O., Yokozawa, K., Ito, K., Kariwa, H., and Takashima, I.: The Conserved Region in the PrM Protein Is a Critical Determinant in the Assembly of Flavivirus Particles. *J Gen Virol*, 93:27–38, 2012
 - 9) Kariwa, H., Yoshikawa, K., Tanikawa, Y., Seto, T., Sanada, T., Saasa, N., Ivanov, L.I., Slonova, R., Zakharycheva, T.A., Nakamura, I., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., and Takashima, I.: Isolation and characterization of hantaviruses in far East Russia and etiology of hemorrhagic Fever with renal syndrome in the region. *Am J Trop Med Hyg*, 86:545–553, 2012
 - 10) 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.* 163: 486–494, 2012
 - 11) 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. *Virus Res.* 163: 284–290, 2012
 - 12) Koma T, Yoshimatsu K, Taruishi M, Miyashita D, Endo R, Shimizu K, Yasuda PS, Amada T, Seto T, Murata R, Yoshida H, Kariwa H, Takashima I, Arikawa J, 2012. Development of a serotyping enzyme-linked immunosorbent assay system based on recombinant truncated hantavirus nucleocapsid proteins for New World Hantavirus infection. *J. Virol. Methods* 185: 74–81.
 - 13) Schlegel M, Tegshduuren E, Yoshimatsu K, Petraityte R, Sasnauskas K, Hammerschmidt B, Friedrich R, Mertens M, Groschup MH, Arai S, Endo R, Shimizu K, Koma T, Yasuda S, Ishihara C, Ulrich RG, Arikawa J, Kollner B, 2012. Novel serological tools for detection of Thottapalayam virus, a Soricomorpha-borne hantavirus. *Arch Virol* 157: 2179–87.
 - 14) 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.
 - 15) 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
 - 16) 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
 - 17) 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