

- nucleocapsid proteins for New World Hantavirus infection. *J. Virol. Methods* 185: 74–81.
- (2) 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.
- (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) 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（口頭）
- (2) 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 (Oral)
- (3) Kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Kenta Shimizu, Takaaki Koma, Takako Amada, Tetsu Yamashiro, Futoshi Hasebe, Nguyen Thuy Hoa, Le Thi Quynh Mai, Jiro Arikawa : Persistence of Seoul virus in natural host (*Rattus norvegicus*). The 9th Japan-China International Conference of Virology, Sapporo, Japan, June 12-13, 2012 (Oral)
- (4) Takaaki Koma, Kumiko Yoshimatsu, Kenta Shimizu, Shumpei P. Yasuda, Rie Isozumi, Takako Amada, Jiro Arikawa : The role of neutrophils in the induction of pulmonary edema during hantavirus infection in C.B-17 Scid mice, 31st Annual Meeting of American Society of Virology, Madison, USA, July 21-25, 2012
- (5) 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 (Oral)
- (6) 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)

(7) 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 (oral)

(8) 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 (一般演題・口頭)

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
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

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
研究協力者	福士秀悦	同・ウイルス第一部主任研究官
研究協力者	谷英樹	同・ウイルス第一部主任研究官
研究協力者	吉河智城	同・ウイルス第一部主任研究官
研究協力者	森川茂	同・獣医科学部長
研究協力者	David Nadeva Bukbuk	マイドゥーグリ大学（ナイジェリア）

研究要旨： リフトバレー熱ウイルス（Rift Valley fever virus, RVFV）は1930年にケニアのリフトバレー地域で発生したヒツジの死亡や流産の流行時の患畜（ヒツジ）から初めて分離された。家畜や野生動物に感染すると、発熱、肝炎、流産を引き起こし、さらに、ヒトにおいても重篤な疾患を引き起こす。RVFVによるヒトにおける感染症をリフトバレー熱（Rift Valley fever, RVF）と呼ぶ。RVFは日本には存在しない。しかし、ヒトにおいて致死性感染症を引き起こすばかりでなく、蚊や感染畜産動物を介してRVFVが本来存在しない地域に輸入され、そこでRVFが流行するようになると（感染地域の拡大）、酪農産業に壊滅的な影響を与えることから輸入感染症対策上重要な感染症である。また、近年RVFVと同じくブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類され、しかも、致死率が極めて高い重症熱性血小板減少症候群（Severe fever and thrombocytopenic syndrome, SFTS）の原因ウイルスとして、ダニ媒介性フレボウイルスである新規ウイルス（SFTS virus, SFTSV）が同定された。本研究では、中国に存在することの確認されているSFTSVの安全な抗体測定システム開発に資するために、RVFVを用いて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。感染性RVFVを用いた中和抗体測定法による結果とシュードタイプを用いた測定法による結果とは高い相関があることが明らかにされた。このシステムは、SFTSVに対する中和抗体測定システム開発に応用することが期待される。

A. 研究目的

近年、中国中央部から北東部にかけて発熱、多臓器不全を引き起こす致死率が比較的高い疾患重症熱性血小板減少症候群 (Severe fever and thrombocytopenic syndrome, SFTS) の存在が確認され、それがブニヤウイルス科フレボウイルス属の新規ウイルス (SFTS ウイルス, SFTSV) によることが報告された。SFTSV はダニ媒介性ウイルスで、フタトゲチマダニ等に維持されていると考えられ、それらのダニは日本にも存在する。そのため、SFTSV は、中国等の流行地域から輸入感染症として日本に輸入される可能性がある。そのため、SFTS ウイルス感染症の診断システムを開発することが重要であるが、SFTSV の入手には時間を要する。さらに SFTSV は国立感染症研究所においては BSL-3 病原体に指定されていること、また、致死率が高い感染症を引き起こすことから、安全に実施できる診断システム開発が望まれる。

そこで本研究では、SFTSV と同様にブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類され、ヒトにも重篤な感染症を引き起こすことが知られているリフトバレー熱ウイルス (Rift Valley fever virus, RVFV) をモデルとして、安全に感染性ウイルスを用いることなく、ブニヤウイルス科フレボウイルスに対する中和抗体測定システムを開発した。

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. 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) のエンベロップ蛋白質 (GP) を被らせたシュードタイプウイルス (RVFVpv) を作製した。この VSV 遺伝子のエンベロッ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。シュードタイプ VSV の感染力価を、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 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階段希釈し、それぞれ RVFV と 37°C1 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. RVFVpv の中和活性測定

RVFVpv を非働化された血清を階段希釈し、それぞれ RVFVpv と 37°C1 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 (図 1)。

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。

(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. 研究結果

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 (表 1)。

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%)。

3. 感染性 RVFV に対する中和抗体測定法による抗体価と RVFVpv に対する中和活性レベルとの関連

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 (図 2)。

D. 考察

SFTS と命名された疾患患者は、輸入感染症患者として日本において発生する可能性がある。また、その病原体 SFTSV は、ダニが媒介することが中国における調査により明らかにされ、その媒介ダニ (フタトゲチマダニ等) は日本においても広く生息していることから、日本にも存在するウイルスである可能性もある。そのため、日本においてもその診断システムを開発する必要がある。

私たちの研究室では、現在、SFTSV 感染症に対する診断システム整備に関する研究を実施しているが、患者血清や感染動物血清がないことから、整備されている診断システムの有用性を評価することができない。そこで、SFTS ウイルスと同様にブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類され、しかも、動物だけでなく、ヒトにおいても致死性感染症を発症させることのある RVFV をモデルとした。

RVFVpv 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 RVFVpv に対する中和活性陽性を示したが、RVFVpv 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、RVFVpv 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ことができる (データ未表示)。さらなる検討が必要である。

本研究では、SFTSV 感染症対策の一環として、RVFV をモデルとして、安全かつ迅速な抗体測定法を開発し、その抗体測定における有用性を評価したが、RVFV 自体が家畜伝染病予防法でその所持が厳しく規制されていることから、感染性ウイルスを用いた中和抗体測定法は限られた研究機関でなければ実施できない。そのため、本抗体測定システムは感染性ウイルスを用いることなく、安全にしかも迅速に実施できることから、中和抗体測定法の代用として用いられることができる。

結論として、SFTSV に対する抗体測定システム開発において、VSV シュードタイプを用いた方法は有用である可能性が高い。

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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

- 3) 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
 - 4) 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) 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 on Viral Diseases, The Japan-US Cooperative Medical Science Program, Beppu, Oita, Japan June 19-20, 2012

- 2) Tani, H., Iha, K., Fukushi, S., Taniguchi, S., Yoshikawa, T., Saijo, M., Morikawa S.: Characterization of pseudotype VSV possessing New and Old World arenavirus envelope proteins. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, September 11-14, 2012
- 3) Yamamoto, K., Iha, K., Bruce, C., Stuart, D., Taniguchi, S., Fukushi, S., Tani, H., Yoshikawa, T., Ishii, Y., Kyuwa, S., Hewson, R., Saijo, M., Morikawa, S.: Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of viral hemorrhagic fevers caused by arenaviruses. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012.
- 4) Tani, H., Iha, K., Fukushi, S., Taniguchi, S., Yoshikawa, T., Saijo, M., Morikawa, S.: Analysis of cell entry of New and Old World arenaviruses using pseudotyped viruses bearing their envelope proteins. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012
- 5) 谷英樹, 伊波興一朗, 谷口怜, 吉河智城, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂: シュードタイプ VSV を用いたルジヨウウイルスの細胞侵入機構の解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月
- 6) 谷口怜, 佐山勇輔, 永田典代, 飯塚愛恵, 谷英樹, 吉河智城, 福士秀悦, 西條政幸, 久和茂, 森川茂: レストンエボラウイルス自然感染カニクイザルにおける免疫応答の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2012 年 11 月
- 7) 福士秀悦, 新倉綾, 谷英樹, 吉河智城, 伊波興一朗, 谷口怜, 緒方もも子, 西條政幸, 森川茂: 日本のマダニ類における新種のブニヤウイルス (SFTSV) 保有調査と SFTSV 血清学的診断法の開発. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月
- 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
- 5) 谷英樹, 伊波興一朗, 谷口怜, 吉河智城,

表 1. ナイジェリア住民 270 人を用いた RVFV を用いた中和抗体測定法と RVFV_{pv} に対する中和活性測定法による抗体陽性・陰性の関係

		RVFV 中和抗体測定法		計
		陽性	陰性	
RVFV _{pv} に対する 中和活性測定法	陽性	34	25	59
	陰性	0	211	211
計		34	236	270

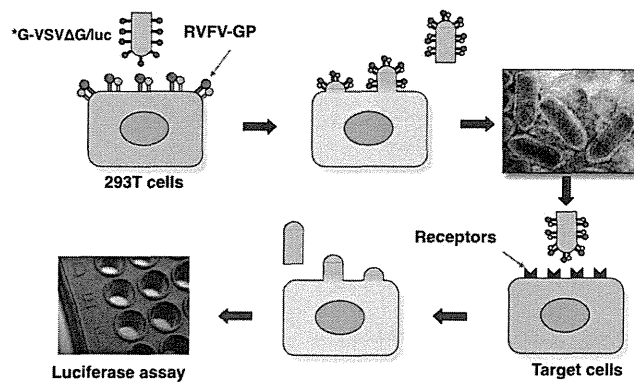


図 1. ルシフェラーゼ活性を発現する RVFV_{pv} に対する中和活性測定法の概略.

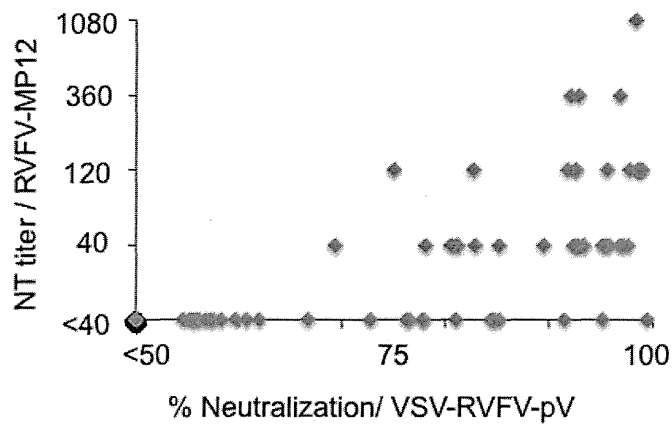


図 2. 感染性 RVFV に対する中和抗体測定法による抗体価と RVFV_{pv} に対する中和活性レベルとの関連

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）
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
分担研究報告書

狂犬病の疫学に関する研究

研究分担者	井上 智	国立感染症研究所・獣医科学部
研究協力者	宇田晶彦	国立感染症研究所・獣医科学部
	Bazartseren Boldbaatar	モンゴル・獣医学研究所
	河合久仁子	北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター
	野口 章	国立感染症研究所・獣医科学部

研究要旨：本研究では、海外の研究協力者と共同してユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病（リッサウイルス感染症を含む）について流行状況に関する情報の収集、疫学調査、流行様式の解明、新規診断法開発等を行ってわが国への侵入可能性や発生予測・被害推計などを可能にすることを目的としている。昨年度、コウモリ類を宿主とするリッサウイルスの血清疫学を明らかにするために必要な検査法の開発とシベリア地域での患者と野生動物の流行状況等について現地の狂犬病専門家から最新かつ正確な疫学情報等を入手した。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。そこで今年度は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るために、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をゲノムベースで検出する方法の確立を試みた。また、コウモリの宿主同定に必要となる頭骸骨を破壊しないで脳組織を取り出す方法も検討した。また、多くの新興感染症がコウモリから分離されていることに着目して、同マイクロアレイ法を利用したコウモリを宿主とする病原微生物のモニタリングも検討した。

A. 研究目的

狂犬病はニュージーランド、オーストラリア、ハワイ、英国、日本などを除く世界のほぼ全域で流行している。アジア、アフリカを中心に年間で少なくとも5万～7万

人を超える死亡例があると推計されており、ヒトを含むほぼすべての哺乳類に致死的な脳炎を起こす狂犬病ウイルス（ラブドウイルス科リッサウイルス属）を原因とするウイルス性疾病である。

わが国では、1970年と2006年に経験したヒトの輸入狂犬病3症例を除いて50年以上に渡って狂犬病は国内で発生していないが、アジア諸国ではヒトの感染源となるイヌ等の動物で流行が継続しており、ヒトの公衆衛生において大きな脅威となっている。

本研究では海外の研究協力者と共同してユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病（リッサウイルス感染症を含む）について流行状況に関する情報の収集、疫学調査、流行様式の解明、新規診断法開発等を行ってわが国への侵入可能性や発生予測・被害推計を可能にすることが目的である。

昨年度、ユーロアジアに生息するコウモリ類を宿主とするリッサウイルスの血清疫学を明らかにするために、ベトナムで捕獲されたコウモリから採取した血清を利用してリッサウイルスに対する中和抗体の検出法を開発し、また、ユーロアジアで流行している野生動物の狂犬病を明らかにするためにシベリア地域での患者と野生動物の流行状況等について現地の狂犬病専門家から最新かつ正確な疫学情報等を入手した。

今年度は、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明らかにするために、国立感染症研究所・獣医科学部で確立された病原体検出用マイクロアレイを利用してコウモリからの病原体遺伝子の検出方法の開発を行った。また、コウモリ

の宿主同定に必要となる頭骸骨を破壊しないで脳組織を取り出す方法を検討した。

B. 研究方法

●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: 獣医学研究所の協力によって、モンゴルのフスグル（図1）に生息しているコウモリ（*Plecotus ognevi*）を捕獲して性別、体重、頭胴長、尾長、耳介幅、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 (Sankojunyak 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 (Sankojunyak 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: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 18時間ハイブリさせ、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。以下に簡単な解析手順を記す。データテキストファイルに含まれる 38,986 病原体検出プローブ由来スポットの GenBank アクセション No. 、プローブ名、遺伝子名、およびシグナル蛍光強度の 4 項目を抽出した。抽出したデータはアクセション No. 毎にまとめ、さらにセンスまたはアンチセンス鎖に細分し『群』とした。群内のシグナル平均値および中央値を算出し、シグナル蛍光強度中央値の高い順に該当候補として順位を付けた。

『標的スポット群』と『その他全スポットから標的スポットを除いた群』を形成するシグナル蛍光強度の分散状態が、統計学的有意差が観察されるか見極めるため、有意水準 (α) = 0.001 【0.1%の確率で偶然有意差があると判定される水準】で p 値を算出した。算出された p 値は帰無仮説【母集団の分散状態に差は無いと言う仮説】が棄却可能か、つまり対立仮説【母集団の分散状態に差は有ると言う仮説】が成立するかを検証した。同時に z 値も、同様の水準である限界値 = 3.09 に設定し帰無仮説【母

集団の平均値が等しい】が棄却できるか、つまり対立仮説【母集団の平均値が等しくない】が成立するか検証した。p 値は 0.001 よりも小さい値であるとき、Z 値は 3.09 より大きい値であったとき帰無仮説が棄却できると考えた。

●コウモリの脳組織採取法

コウモリの種を同定するためには、頭骸骨を解剖学的に計測する必要がある。しかしながら、狂犬病のウイルス学的検査を脳組織で行うため、検体となるコウモリの頭骸骨を切開する必要がある。そこで、頭骸骨を切開しないで捕獲したコウモリの脳組織を取りだす解剖方法をマウスの頭部を利用して検討した。

C. 研究結果

●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(表 1)。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。

また、本研究に使用した病原体検出用アレイは、複数の病原体を同時に検出する事が可能である。このことから、有意水準を満たしたヘルペスウイルス以外の病原体についても、サンプル核酸に含まれている可能性が考えられた。今後、有意なシグナル強度をもつ病原体の有無について PCR を用いて検証していく必要があると考えられた。

本研究の目的である狂犬病ウイルスについても検討を行った。狂犬病ウイルス検出用マイクロアレイプローブは、最も高いシグナルでもバックグラウンドと同レベルだった。

●コウモリの脳組織採取法

国内でコウモリを捕獲して解剖手技を検討するための検体を入手することは困難であることから、コウモリの専門家の協力を得て頭骸骨を切開しないで脳を取りだす方法の手順書を作成した(図 2)。

D. 考察

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を選択することにした。

今回、捕獲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サウイルスが分類されている。東南アジアではリサウイルスの分離報告はまだないが、リ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。

次に、既存のリ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を選択することにした。

今回、捕獲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 -value が Z スコア 3.05 以上) を示す 13 病原体を得た。

準備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。

また、捕獲コウモリの頭骨を切開しないで脳組織を取り出す方法(図2)を実験室で考案することができた。現在、モンゴルの野外調査でその有用性を検証しており、特に、バイオセーフティを考慮した脳組織の採材法として有効であるかについて検討している。

E. 結論

今年度、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を利用して、調査がまだ行われていない地域や宿主から病原微生物を検

出できることを明らかにした。

新種のリッサウイルスが、シベリア南部、モンゴル西部、中国北東部のコウモリから新たに分離されていることから、シベリアから極東ないしアジア地域、さらにはわが国を含めた包括的なコウモリ類に関する生態学的調査をリンクさせたリッサウイルスの疫学的サーベイランスを進めることは公衆衛生上大変有意義であり、また、シベリア地域ではヒトの狂犬病発生リスクが高く、野生動物での流行拡大が見られるという現地専門家からの情報を勘案して、ロシア極東地区と北海道の間の野生鳥獣等を介した狂犬病の侵入リスク調査はわが国の公衆衛生行政に対しても大変意義があるものと考えます。

J. 健康危険情報

K. 研究発表

1. 学会発表

- 1) Inoue S., Boldbaatar B., Sugiura N., Noguchi A., and Park C.-H. (2010) 10 Rabies. In: Animal Viruses (Maeda A., ed.). Transworld Research Network. p143-153.
- 2) Manalo D. L., Tuason L., Jarilla B., Avenido E., Demetria C., Quiambao B.P., Acosta L. P., Noguchi A., Bazartseren B., Sugiura N., Kaku Y. and Inoue S.

Optimization Procedures of the Production of Rabies Polyclonal Antibodies as Reagent for Direct Rapid Immunohistochemical Test (DRIT). Conference for Laboratory Animal Sciences and Technologies 2012. 24-26 May, 2012. . Beppu international convention center, Japan.

- 3) Inoue S., Shigematsu, M., Sato M., Muranaka S., Masukawa H., Sugiyama K., Kobayashi M., Imabayashi A., Watanabe T., Suzuki A., Minami, H. Surveillance: Encompassing public health to your animal companion! 15th International Congress on Infectious Diseases. Organized by the International Society for Infectious Diseases. 13-16 June, 2012. Bangkok, Thailand.
- 4) Inoue S., Uda A., Sugiura N., and Park C.-H. Microarray analysis of central nervous system in CVS-11 infected mice showing signs of paralysis. 46th Joint Working Conference on Viral Diseases. The Japna-US Cooperative Medical Science Program. 19-20 June, 2012. Beppu, Japan.
- 5) Inoue S., Uda A., Sugiura N., and Park C.-H. Microarray analysis of CNS in

- mice showing signs of paralysis after the intramuscular inoculation of RV (CVS-11 strain). The 16th Annual Meeting of Japanese Society for Neurovirology. Symposium "Current Progress in Enterovirus 71 Research in The Asia-Pacific Region". 30-31 Aug, 2012. NIID, Tokyo, Japan.
- 6) Petsophonrakul W., Khuernrart W., Pornvisedsirikul S., Srichan M., Jaisuda S., Sripanya T., Khaoplod P., Munepo M., Witunrakul G., Anukul W., and Inoue S. Learning about a case of imported rabies to establish a rabies control area. 15-18 Feb, 2012. IMED 2013, Vienna, Austria.
- 7) Inoue, S. Zoonosis: Rabies. Conference and workshop on "From zoonosis to the Chiang Mai model towards rabies free zone", 26-27 April 2012, Chiang Mai University, Thailand.
- 8) Inoue, S. "The prevention of rabies in Japan". A Contingency Plan of Rabies in Japan. 2012 Rabies Conference in China, 17-18 May 2012, Beijing, China.
- 9) Inoue, S. Clinical signs and symptoms of rabies in animals (Theory and vide on dog rabies, the notes of clinical diagnosis). Enhancement of quality of rabies control and prevention. National program for rabies control and prevention - NIHE and JICA project on enhancement of communicable disease control and prevention for PMS with NIID and WHO experts. 4-6 July 2012, Thai Nguyen Province, Vietnam.
- 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. 病原体検出用マイクロアレイの成績(抜粋)

ランキング	GenBank ID	名称	鎖	中央値	p	Z
1	NC_000898	Human herpesvirus 6B, complete genome	-	2377	0	122.05
2	NC_002641	Meleagrid herpesvirus 1, complete genome	-	770	0	45.18
3	CP000110	Synechococcus sp. CC9605, complete genome	-	484	0	27.22
4	NC_001224	Saccharomyces cerevisiae S288c mitochondrion, con	-	365	2.22E-16	19.49
5	NC_007935	Paracoccidioides brasiliensis mitochondrion, complet	-	353	0	18.75
6	AE000657	Aquifex aeolicus VF5, complete genome	-	343	0	18.09
7	CP000159	Salinibacter ruber DSM 13855, complete genome	-	294	2.22E-16	14.89
8	AP009044	Corynebacterium glutamicum R DNA, complete genor	-	256	0	12.40
9	CP000352	Cupriavidus metallidurans CH34, complete genome	-	181	1.33E-15	7.47
10	D00627	Human coxsackievirus A9 genomic RNA, complete ge	-	158	2.00E-15	5.95
11	AY057438	Human papillomavirus type 90, complete genome	-	127	7.99E-15	3.91
12	DQ837642	Sepik virus strain MK7148, complete genome	-	116	1.69E-14	3.15
13	D14033	Human rotavirus A gene for VP7 protein, complete cds,	-	114	2.00E-14	3.05
14	AJ889918	Human parechovirus 3 genomic RNA, complete genome,	-	100	4.04E-14	2.13
15	E03962	The VT2 gene of Verotoxin-producing Escherichia coli	-	93	7.44E-14	1.63
16	AF075256	Venezuelan equine encephalitis virus strain Pixuna BeA	-	91	8.08E-14	1.54
17	NC_001650	Equid herpesvirus 2, complete genome	-	90	9.59E-14	1.44
18	NC_004317	Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 14, complete g	+	86	6.66E-16	15.78
19	NC_001414	Bovine leukemia virus, complete genome	-	85	1.74E-13	1.14
20	NC_003676	Apoi virus, genome	-	83	1.90E-13	1.01
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
1281	NC_001542	Rabies virus, complete genome	+	67	6.56E-01	-0.08
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
1890	NC_001542	Rabies virus, complete genome	-	66	8.66E-05	-0.51
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
2553	U28006	Cote d'Ivoire Ebola virus virion spike glycoprotein (SP) g	-	49	2.42E-13	-1.26
2554	NC_001959	Norwalk virus, complete genome	-	48	1.99E-13	-1.33

図1. コウモリ (Plecotus ognevi) の捕獲地

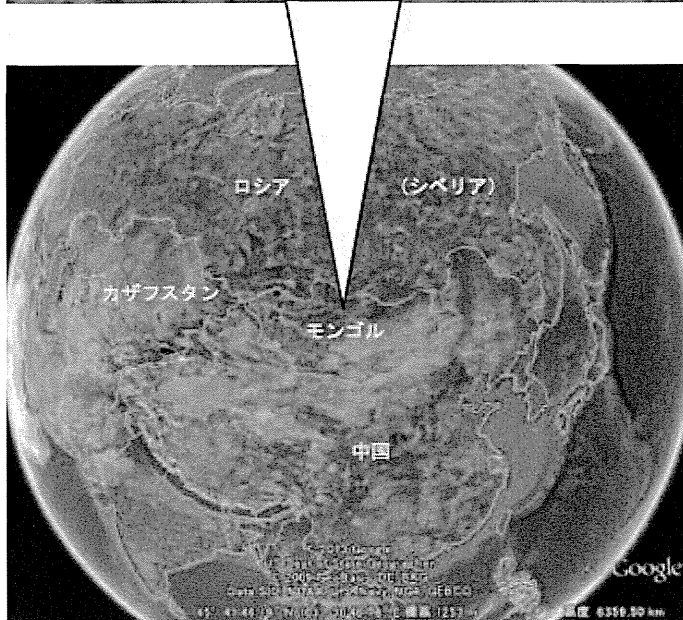
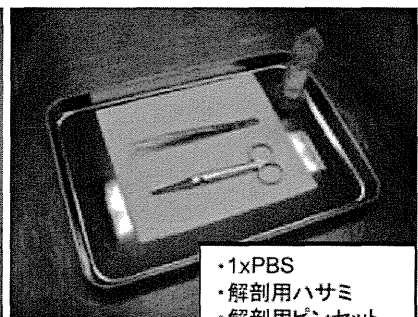
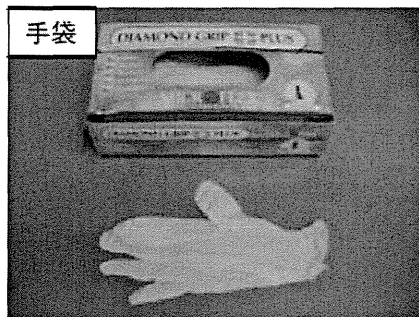
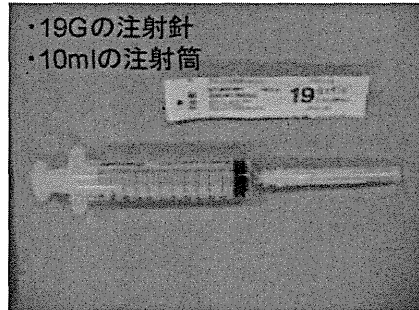


図2 頭骸骨を破壊しないで脳組織を取り出す方法

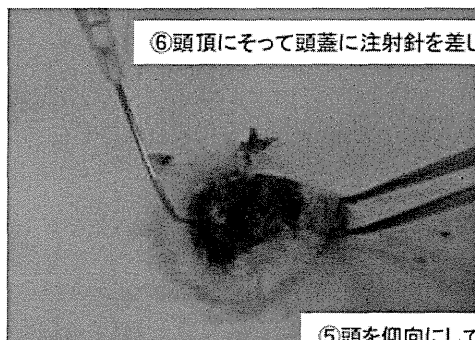
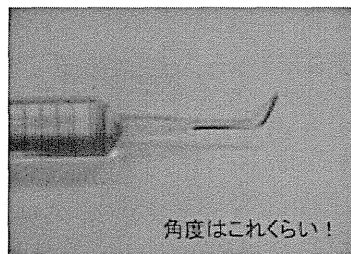
準備する物

- ・19Gの注射針
- ・10mlの注射筒
- ・1xPBS
- ・解剖用ハサミ
- ・解剖用ピンセット
- ・キムタオル
- ・ステンレスのトレイ
- ・手袋
- ・帽子
- ・マスク
- ・白衣



手順

- ① 注射筒に注射針を取り付ける。
- ② 注射針を折り曲げる。
- ③ 注射筒にPBSを入れる。
- ④ マウスの頭を脊椎から切り離す
頸椎をハサミで切る。
- ⑤ 頭は仰向にして置く。
- ⑥ 頭頂にそって頭蓋に注射針を
差し込む。
- ⑦ PBSを勢いよく注入すると脳が
頭骸骨から押し出される。



※ PBSを注入する時に、頭部をビニール袋等に入れる、もしくは、ペーパータオル等で覆って、組織の飛散を止める(安全キャビネット中での操作が望まれる)。

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)

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
狂犬病の発症機序の解析と診断法開発

狂犬病ウイルス P 遺伝子が関連する末梢感染機序の解明

研究分担者:伊藤直人 岐阜大学応用生物科学部・准教授

研究要旨: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。対照的に、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。以前、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] が高い末梢感染性を示した成績が得られたことから、西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いに主にウイルス P 遺伝子が関連することが明らかになった。そこで本年度は、P 遺伝子が関連する末梢感染機序の解明を試みた。まず、西ヶ原株、Ni-CE 株および CE(NiP)株をマウス大腿筋に接種し、5 日後におけるウイルスの体内分布を RT-PCR 法により検証した。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。さらに、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を組換えた各株を用いて、筋肉におけるウイルス増殖効率を比較したところ、*in vivo* および *in vitro* の実験系の両者において、西ヶ原株および CE(NiP)株が Ni-CE 株よりも効率よく増殖することが示された。以上より、狂犬病ウイルス西ヶ原株の P 遺伝子が、筋肉におけるウイルス増殖を促し、結果として、末梢神経侵襲性を増強する機能を有する可能性を示すことができた。

A. 研究目的

狂犬病ウイルスは、感染動物の唾液を介して創傷感染し、致死的な脳炎を引き起こす。すなわち、末梢組織から中枢神経系へのウイルスの侵入は狂犬病の病態発現に必須のプロセスである。しかし、本ウイルスの末梢感染機序はこれまで不明のままである。このことは、狂犬病の早期診断法や、暴露後免疫法に代わる新たな予防法を開発する上で、大きな障害となっている。

狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株とその継代株の Ni-CE 株は低用量(10^3 フォーカス形成単位 [FFU])のウイルスの脳内接種により、いずれもマウスを発症させる。一方、高用量(10^6 FFU)のウイルスを筋肉内接種した場合、西ヶ原株接種マウスが神経症状を示して死亡するのは対照的に、Ni-CE 株接種マウスは全く症状を示さない。このことは、西ヶ原株及び Ni-CE 株の末梢感染性が顕著に異なることを示している。

H22 年度は、両株の末梢感染性の違いに関連するウイルス遺伝子の同定を目的として、Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株由来の各遺伝子を組換えたキメラウイルスの末梢感染性を検証した。その結果、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] が高い末梢感染性を示し、西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いに主にウイルス P 遺伝子に関連することが判明した(図 1)。そこで本年度は、狂犬病ウイルス P 遺伝子が関連する末梢感染機序の解明する目的で、マウスへの筋肉接種後の西ヶ原株、Ni-CE 株および CE(NiP)株の体内分布を比較・検討した。また、筋肉における各株の増殖についても比較した。

B. 研究方法

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 10^6 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。

(倫理面からの配慮について)

本動物実験は岐阜大学動物実験委員会によって承認された。(動物実験承認番号:08119)。ルシフェラーゼ遺伝子組換えウイルスを用いた実験は、文部科学大臣の確認後に実施している(22 受文科振第 2170 号)。また、本実験は、岐阜大学組換え DNA 安全委員会の承認を得ている(22 岐大術産 第 7 号の 30)。

C. 研究結果

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(図 2)。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(図 3)。一方、