

201225009B

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 22 年度～平成 24 年度 総合研究報告書

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 22 年度～平成 24 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告 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 .....	3
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	47
III. 研究成果の刊行物・印刷 .....	53

# I. 総合研究報告

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)

総合研究報告書

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
	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
	川端寛樹	国立感染症研究所	室長
	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
研究協力者	Vischeslav G. Morozov	Medical Company Hepatolog	所長
	Leonid I. Ivanov	ハバロフスク ペスト防疫研究所	所長

研究要旨

野生鳥獣類によって媒介される人獣共通感染症は危険度の高いものが多数含まれる。これらのうち、海外からの侵入が危惧される感染症について、疫学、診断および予防法に関する研究を行った。

北海道の北斗市上磯地区のアカネズミから 2008 年に分離されたダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)について塩基配列の解析を行ったところ、1995年の同地区からの分離株である Oshima 5-10 株と遺伝子性状が非常に近縁であり、10 年以上にわたって同地区でウイルスが安定して維持されている事が示された。Oshima 08-AS 株と Oshima 5-10 株についてマウスにおける病原性を比較したところ、Oshima 08-AS 株は発症率及び死亡率が Oshima 5-10 株よりも高く、病原性が高いことが示された。ダニ媒介性脳炎の重症化には IL-10 や TNF 応答に関連した感染個体の免疫応答が関わっていることが示唆された。また、本ウイルスの感染初期において I 型 IFN 応答が感染防御に重要であることが示された。また、迅速で簡便な TBE 診断法の確立を目指し、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法による TBEV 遺伝子検出法の開発を行った。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ピアカネズミ 1 検体が抗体陽性であることが判明し、両地域において TBEV の流行巢の存在が示唆された。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。

ハンタウイルス感染症の動物モデル開発を目的として、ハンターウイルス AA57 株実験的感染マウスの病理学的検討を行った。これらの動物の半数では胸水の貯留、肺血管周囲の中等度の水腫、好中球、単核系細胞浸潤を認めた。また、病変部の血管内皮細胞にウイルス抗原陽性細胞が存在した。臨床症状と病理所見から、本感染実験系はハンタウイルス肺症候群の動物モデルとして有用であると考えられた。ハンタウイルス肺症候群(HPS)関連のアメリカ大陸由来のウイルスと腎症候性出血熱(HFRS)関連のユーラシア大陸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。

狂犬病ウイルスの遺伝子解析により、モンゴル、ロシアおよび中国では、野生動物等の移動により、国境を越えて狂犬病ウイルスが往来している可能性が示唆された。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を行った。狂犬病ウイルス西ヶ原株と、本株の鶏胚馴化株である Ni-CE 株の各種キメラウイルスの末梢感染性を検討した結果、筋肉内接種における両株の末梢感染性の違いには、P 及び N 遺伝子が関連すること、また、皮下接種における両株の末梢感染性の違いには、P、M および L 遺伝子が関連することが明らかとなった。

新疆ウイグル自治区のクリミア・コンゴ出血熱 (CCHF)ウイルスは、患者やダニから得られたウイルス全てが独立した一つのクラスターを形成していたが、近年報告された新疆ウイグル自治区の CCHFウイルスには、中近東分離株のクラスターに分類されるものが存在することが明らかにされた。

単純ヘルペスウイルス 2 型 (HSV-2) をモデルとして、同じヘルペスウイルスの仲間である B ウイルスのアシクロビル (ACV) 等の  $\alpha$  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開発した

人や家畜の重篤な疾患の病原体であるリフトバレー熱ウイルス (Rift Valley fever virus, RVFV) について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) シュードタイプを用いた中和抗体測定システムを開発した。

わが国の野生鹿は高率に *Bartonella* 属菌を保有していることが初めて明らかとなった。また、わが国の野生のネコ垂目動物から *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) および千葉県のパウビシンの 3.8% (1/26) から分離された *Bartonella* 属菌の 11 株全てが猫ひっつき病の病原菌である *B. henselae* であった。日本に棲息する野生イヌ垂目 1,205 頭の血液から *Bartonella* 属菌の分離を試みたところ、ニホンアナグマおよびテンのそれぞれ 1 頭が *Bartonella* 属菌を保有していることが初めて明らかとなった。

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、ヤモリから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。

ライム病病原体であるボレリア・ガリニについて分子疫学的解析を行ったところ、モスクワ近郊で浸潤しているボレリア・ガリニ株は神経ボレリア症が報告されている国・地域で見出される欧州型ボレリア・ガリニ株と同じ ST 型が高頻度で見出された。感染症法4類に規定される回帰熱について、PCR 法とリアルタイム PCR 法を用いた迅速診断法の開発を行い、臨床現場との協力により海外輸入例の診断に成功した。

#### 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。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ことを目的としている。

ハンタウイルス感染症はこれまで中国、ロシア、ヨーロッパなどで多く報告され、年間の患者発生数が約 10 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。ダニ媒介性脳炎はロシア、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。また、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、国内外においてクリミア・コンゴ出血熱、リフトバレー熱、バルトネラ感染症、サルモネラ感染症、ライム病、および回帰熱の患者が多数報告されている。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、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。本研究を通じ、これらの感染症がわが国に侵入した際や、流行が発生した際に応用が可能な具体的な対応策の確立を目指す。

#### B. 研究方法

##### ダニ媒介性脳炎：

##### 1) ウイルス分離

北海道北斗市で捕獲された 34 匹の野鼠から採取された脾臓を 10% 乳剤とした後、1 プール 3-5 匹として 9 プールの脾臓乳剤を作製した。これを 1-2 日齢の BALB/c 哺乳マウスの脳内に接種した。接種哺乳マウスから脳を採取し、10% 脳乳剤を作成し以降の実験に用いた。

##### 2) 蛍光抗体法によるダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) 抗原の検出

BHK 細胞に脳乳剤を接種し、5 日間培養後細胞を固定した。マウス抗 TBEV 抗体と Alexa555 標識抗マウス IgG 抗体により TBEV 抗原を検出した。

##### 3) TBEV の RNA 検出と塩基配列の決定

脳乳剤を接種した BHK 細胞から ISOGEN を用いて RNA 抽出を行い、RT-PCR により TBEV の遺伝子増幅を試みた。増幅された PCR 産物を精製後、塩基配列を決定した。

##### 4) 分離ウイルスの増殖性

BHK 細胞に MOI=0.01 でウイルスを感染させ、経時的に培養上清を回収した。培養上清中のウイルスカ価は BHK 細胞を用いたプラークアッセイにより測定した。

##### 5) 分離ウイルスの病原性解析

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、1995 年に犬の血液より分離された Oshima 5-10 株、および極東型 TBEV の標準株である Sojin 株を 5 週齢の C57BL/6J マウスに皮下接種し、体重変化や臨床症状を観察した。

##### 6) TBE ウイルスのマウスにおける病原性発現機序の解析

Oshima5-10 株および Sojin 株を、B6 マウス、IL-10 KO B6 マウスにおよび TNFR1 KO B6 マウスにそれぞれ  $10^4$  PFU 皮下接種し、体重減少、症状、致死性を比較した。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。

##### 7) LAMP 法による TBEV 検出法の開発

LAMP プライマー作製は PrimerExplorerV3 (栄研化学) を用いて設計した。TBEV Oshima 5-10 株全長 cDNA を組み込んだプラスミドをテンプレートとし、Loopamp<sup>®</sup> 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)を用いて行い、最終反応後にアガロースゲル電気泳動にてラダーの確認および Loopamp<sup>®</sup>蛍光・目視検出試薬(栄研化学株式会社)の添加により目視で確認することによりウイルス遺伝子の検出を判定した。

#### 8) 野生げっ歯類における TBEV 特異的抗体の検出

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。TBEV のウイルス様粒子(SPs)を用いた ELISA 法により、全例の血清について抗体検出を行い、陽性の疑われる検体についてはさらに中和試験による確定診断を実施した。

#### ハンタウイルス感染症:

##### 1) 抗原および ELISA

各ハンタウイルス組換え核蛋白(NP)の全長(アミノ酸:全長抗原)をバキュロウイルスベクター(AcNPV:BAC-TO-BAC GIBCO BRL)を用いて昆虫細胞(High Five)に発現させた。また、NP の N 末端を削除したトランケート抗原を同様に発現させ、血清型鑑別のための ELISA 抗原とした。また、全長の NP はさらに pET43.1 ベクターを用いて大腸菌に発現させ、精製して ELISA 抗原として用いた。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。また、SNV による HPS 患者血清を用いた。

##### 2) ハンタウイルスに対するモノクローナル抗体の作製

食虫類由来ハンタウイルスであるツツタパラヤンウイルス(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。

##### 3) ハンタウイルス感染症の動物モデルの開発

極東ロシアのセスジアカネズミ (*Apodemus agrarius*) から分離されたハンタウイルス AA57 株は 2 週齢の ICR マウスに肺疾患を引き起こすことが最近明らかになった。そこで、2 週齢の ICR マウスに AA57 株を 30,000 FFU 量皮下接種したところ、接種 7-10 日目に体重が減少し、呼吸困難となった。これらの発症動物を接種 7-11 日目に解剖し、病理学的検索対象とした。また、ウイルス抗原を検出するために、一次抗体としてハンタウイルスのヌクレオキャプシド蛋白質に特異的な E5/G6 モノクローナル抗体を用

いて免疫組織化学染色を実施した。

#### クリミア・コンゴ出血熱 (CCHF):

##### 1) CCHF ウイルス新疆株の S-遺伝子情報

2001 年および 2002 年の新疆ウイグル自治区における CCHF 流行時に、10 人の患者から増幅された S-遺伝子、および、6 匹のダニから増幅された S-遺伝子の塩基配列を決定した。また、2005 年以降に中国の研究者により増幅され、解析された S-遺伝子の塩基配列 29 株については、GenBank から情報を得た。系統樹解析に用いられた部分 S-遺伝子は、増幅された約 240 塩基である。

##### 2) 分子疫学的解析。

世界各国で分離されている CCHF ウイルス、中国新疆ウイグル自治区で分離された CCHF ウイルス、および、RT-PCR 等で増幅された CCHF ウイルスの遺伝子の塩基配列を用いて、NJ 法により系統樹解析を実施した。

#### B ウイルス感染症:

##### 1) 使用ウイルス

単純ヘルペスウイルス 2 型 (HSV-2) UW268 株、および、その vTK 欠損 HSV-2 UWTK 株を、それぞれ ACV 感受性株、ACV 耐性株として用いた。また、vTK 蛋白に一アミノ酸変異で耐性を獲得した HSV-2 CL06 を用いた。さらに vTK 欠損 HSV-1 TAR 株も用いた。尚、HSV-2 CL06 の vTK 遺伝子には、塩基配列に変異が生じ、376 個のアミノ酸配からなる vTK に R217H の一アミノ酸変異が認められる。また、UWTK 株の vTK 遺伝子には、1 塩基欠損が認められ vTK 活性が認められない。

##### 2) 細胞

HSV-2 UW268 および HSV-2 UWTK の薬剤感受性や増殖した HSV-1 TAR の感染価は、Vero 細胞を用いたプラーク減少法で測定した。また、組換え vTK の発現には、293T 細胞を用いた。

##### 3) 新規薬剤感受性試験システム

各 HSV-2 株の vTK 遺伝子全長を適切なプライマーセットを用いて PCR 法により増幅し、pcDNA3.1(-)哺乳細胞発現ベクター (Invitrogen 社) にクローニングした。この哺乳細胞組換え蛋白発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションして一過性に発現させた。その細胞に vTK 欠損高度 ACV 耐性 HSV-1 TAR を MOI が約 1/細胞になるように感染させ、PBS で 1 回洗浄後各濃度の ACV 含有 MEM 培地で 12 時間培養した。その細胞および培養液に含まれる TAR 株の感染価を、Vero 細胞を用いたプラーク法で測定し、



各薬剤の組換え HSV-2 vTK 発現 293T 細胞における TAR 株増殖に対する抑制効果を評価した。

### 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) のエンベロープ蛋白質 (GP) を被らせたシュードタイプウイルス (RVFVpv) を作製した。

#### 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段階希釈し、それぞれ RVFV 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) RVFVpv 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 RVFVpv 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) 検査材料

モンゴルの国立中央獣医学研究所の専門家の協力により、狂犬病を発症した 7 種類の動物 (赤キツネ、イヌ、野生ネコ、ラクダ、ウシ、ヤギ、ヒツジ) から採取した 24 の脳材料について解析を行った。これらの 24 例の脳材料は FITC 標識抗狂犬病ウイルス (RABV) モノクローナル抗体 (Fujirebio) を用いた抗原検出の結果、いずれも RABV 抗原が陽性であった。

#### 2) RABV 遺伝子の塩基配列の決定と系統樹解析

脳検体から RNA の抽出を行い、RT-PCR を行った。増幅された RABV の N 蛋白質遺伝子の全領域についてシーケンシングを行った。系統樹の作成は、Clustal X version 2 で作成した RABV の N 遺伝子配列 (1,353nt) アラインメントを用いて neighbor-joining 法によって行った。

#### 3) コウモリ血清

ベトナム (Bac Giang 地区) で捕獲された 108 匹のコウモリ から採取した血清を利用して中和抗体の測定法を開発した。

#### 4) RABV の病原性発現機序の解析

西ヶ原株及び Ni-GE 株の筋肉内と皮下からの中枢神経侵襲性を検討するため、ddY マウス (4 週齢・雌、3 匹/群) の大腿筋もしくは左下腹部の皮下に  $10^6$  FFU の両株および両株間の各種キメラウイルスを接種した。接種 5 日後に脳、脊髄、坐骨神経および大腿筋を採取し、作製した 10% 乳剤を用いて、感染性ウイルスの存在をフォーカス・アッセイにより検証した。また、症状の推移を 14 日間観察した。

### バルトネラ感染症:

#### 1) 野生動物からの検体採取

##### i) 鹿からの検体

平成 20 年 11 月～平成 22 年 3 月に、北海道・奈良県・和歌山県で捕獲された野生鹿 (エゾシカ 19 頭とホンシュウシカ 26 頭)、宮城県・愛知県の飼養鹿 (ホンシュウシカ 27 頭) から血液を、奈良県の野生鹿からマダニ 33 匹とシラミバエ 10 匹を採取した。

##### ii) 日本の野性イヌ亜目からの検体

2008 年 6 月～2011 年 5 月にかけて、日本の野生イヌ亜目 1,205 頭 (アライグマ 1,008 頭、タヌキ 171 頭、ニホンアナグマ 15 頭、テン 8 頭、ニホンイタチ 2 頭、チョウセンイタチ 1 頭) から血液を採取した。

##### iii) マングースとハクビシンからの検体

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・神奈川県の高クビシン 50 頭から血液を採取した。

#### 2) *Bartonella* 属菌の分離と遺伝子検出

解凍後、溶血した血液の約 100 $\mu$ l を、5%ウサギ血液加 Heart Infusion Agar に塗抹し、35°C、5%CO<sub>2</sub> 下で 4 週間培養した。*Bartonella* 属菌を疑うコロニーから DNA を抽出し、PCR 法により、遺伝子を増幅した。

### サルモネラ感染症:

#### 1) ベトナムのヤモリからの検体採取

2008～2010 年にベトナム南部に位置するメコンデルタの Can Tho 市、Kien Giang 県および Ca Mau 県で捕獲した野生のヤモリ 3 種 465 個体の腸管内容物と、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 個体の腸管内容物を検体として用いた。

## 2) *Salmonella* 属菌の分離、同定および血清型別方法

供試検体は 3ml の滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline, pH7.2, 以下, PBS) に浮遊させ、その 1ml を 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、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。

## ライム病:

欧州型ボレリア・ガリニの分布域を調べるために、極東ロシアから欧州東部に棲息するマダニ、野鼠よりボレリアを分離・検出し、高感度型別法である Multi-locus sequence typing (MLST) 法によりボレリアの型別を行った。今回研究に用いたボレリア・ガリニ 32 菌株は、リシナスマダニ (*Ixodes ricinus*) 由来 25 株、シェルツエマダニ (*I. persulcatus*) 由来 3 株、野鼠 (*Apodemus uralensis*) 由来 4 株であり、これらは共同研究者である千葉科学大学・増澤俊幸博士、福井県衛生環境研究センター・石畝史博士他より分与頂いた。

これらボレリア株を BSK 培地にて 32°C 孵卵器にて静置培養後、常法に従って DNA 抽出した。一部の株については、複数の菌種が混合していたため、Norris らの方法にて clone 化を行った。これら培養株より抽出した DNA を鋳型とし、Margos らの方法に従って PCR を行い、増幅 DNA を得た。得られた増幅 DNA は精製後塩基配列を決定し、データベース上にある配列を含めた上で MLST 解析に供した。

## 回帰熱:

### 1) 患者材料

2010 年 9 月 1 日から 8 日までの 1 週間ウズベキスタンのリシタンでボランティア活動をして帰国し、回帰性の発熱が見られた 20 歳の女性患者から血液を採取した。血液塗末標本を作製す

るとともに、患者血液から DNeasy tissue kit (Qiagen) を用い DNA を抽出した。また、血液を材料としてボレリアの培養を行い、培養液から Promega Wizard Genomic DNA purification kit を用いて DNA の抽出と精製を行った。

### 2) PCR

患者血液もしくは患者血液の培養液からの DNA を検体とし、鞭毛構成遺伝子 (flaB) を標的として、以下の条件で 1st-PCR および 2nd-PCR (Nested-PCR) を行った。

1st-PCR: 95°C, 10sec; 50°C, 30sec; 72°C, 30sec; (ここまでを 35 サイクル); さらに 72°C 2min.

2nd-PCR: 95°C, 10sec; 50°C, 30sec; 72°C, 30sec; (ここまでを 30 サイクル); さらに 72°C 2min.

### 3) 増幅 DNA 断片の塩基配列決定

陽性バンドが見出された検体については塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとに回帰熱ボレリア、ライム病ボレリアの代表的な種との比較を行い、感染種の推定を行った。

## (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。本研究で使用された日本の野性動物は、全て狩猟、管理捕獲、もしくは交通事故死亡した個体である。アライグマおよびマンゲ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) アカネズミからの TBEV ウイルス (TBEV) の分離

アカネズミの脾臓乳剤を脳内接種した哺乳マウスの中で、衰弱個体が 1 匹現れた。このマウスより採取した脳乳剤を BHK 細胞に接種したところ、蛍光抗体法により細胞内において TBEV 抗原が検出され、TBEV が分離された事が確認された。

このウイルスを Oshima 08-AS 株と命名し、以降の実験に使用した。

#### 2) TBEV Oshima 08-AS 株の遺伝子性状の解析

今回、分離された Oshima 08-AS についてウイルスゲノム RNA の全塩基配列を解読した。1995 年に分離された Oshima 5-10 株と比較した所、35 ヶ所に塩基の相違が認められ、そのうち 13 ヶ所がアミノ酸の相違を伴っていた。これらアミノ酸配列の相違は全て非構造蛋白領域に位置して

いた。

E蛋白領域(1,488塩基)について既知のウイルス株との系統樹を作成した。系統樹から、Oshima-08-ASは病原性の高い極東亜型に分類され、中でも以前に北斗市で分離された株達と同じクラスターを形成し、ロシアで分離された Sofjin株やKH98株とは明らかに異なるクラスターに属することが示された。

### 3) Oshima 08-AS株の細胞における増殖性

Oshima 08-AS株のBHK細胞における増殖性をOshima 5-10株と比較した所、同様の増殖性を示した。しかしOshima 08-AS株はOshima 5-10株と比較して、細胞変性効果が弱く、またプラークアッセイにおいて大きなプラークを示し、生物性状に相違がある事が示唆された。

### 4) Oshima 08-AS株の病原性解析

TBEV Oshima 08-AS接種マウスでは、いずれのウイルス接種量においても全マウスが発症し、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接種マウスでは $10^2$  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。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。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。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。

### 5) TBEVの病原性発現機序の解析

Oshima 5-10株をB6マウスおよびIL-10ノックアウト(KO)B6マウスに皮下感染させたところ、致死率がB6マウスでは37%(致死個体の生存日数 $16.5 \pm 2.29$ 日)、IL-10 KOマウスでは60%(致死個体の生存日数 $11.6 \pm 1.45$ 日)となり致死率はIL-10 KOマウスで有意( $p=0.035$ )に高かった。次に、感染9日目の中枢神経組織内のウイルス量を比較したところ、Oshima 5-10株感染B6マウスでは小脳で最もウイルス感染価が高かったが、IL-10 KOマウスでは脊髄と大脳皮質で最も多くのウイルスが認められた。しかしながら、B6マウスとIL-10 KOマウスのあいだには有意な差は認められなかった。一方、Sofjin株感染ではB6マウス、IL-10 KOマウスともに致死率100%

(致死個体の生存日数、B6マウス $10.5 \pm 0.51$ 、IL-10 KOマウス $10.2 \pm 0.36$ 日)となった。

Oshima 5-10株 $10^4$  PFUをTNFR1 KOマウスに感染させたところ、B6マウスでは致死率が37%(致死個体の生存日数 $16.5 \pm 2.29$ 日)だったのに対し、TNFR1 KOでは60%(致死個体の生存日数 $14.3 \pm 2.54$ 日)となった。一方、Sofjin株感染ではB6マウス、IL-10 KOマウスともに致死率100%(致死個体の生存日数、B6マウス $10.5 \pm 0.51$ 、IL-10 KOマウス $9.64 \pm 0.47$ 日)となり生存率に有意な差は認められなかった。

Oshima 5-10株感染24時間後のB6マウス血清中のIFN量はウイルス接種量に依存したIFN産生量の起こっていることが判明した。次に、IFNAR KOマウスにOshima株を皮下感染させると、致死率は $10^0$  PFU感染で20%、 $10^2 \sim 10^6$  PFU感染では100%となった。Sofjin株のIFNAR KO皮下感染においては、致死率は $10^0$  PFU感染で60%、 $10^2 \sim 10^6$  PFU感染では100%となり、接種ウイルス量が多いほど早期に死亡した。

Oshima 5-10株感染後の致死率はB6マウスで38.1% ( $n=21$ )に対してTNF $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\gamma$ 、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 $\alpha$  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 $\alpha$  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, D19Ert386e, 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。

TBEV感染マウスの7日目以降発症個体では胃、小腸の内容物(水、消化物)停滞による腸管膨隆がみられた。接種3, 5, 7, 8日目の病理学的検索の結果、接種5, 7, 8日目の腸管筋層内神経叢の神経細胞と8日目の大脳、小脳、脳幹、脊

髄の神経細胞の細胞質にウイルス抗原が検出された。8日目の動物において、一部の腸管内腔面には壊死物が貯留し腸管上皮の壊死もみられた。

#### 6) 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巣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ビアカネズミで、中和抗体価は320倍であった。

#### 7) 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ニと混合したTBEVのRNAより、いずれも $10^2$  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。

### ハンタウイルス感染症

#### 1) 腎症候性出血熱(HFRS)関連ウイルス保有げっ歯類の血清型鑑別診断

NPのN末端を削除したトランケート抗原を用いることにより、ハンタウイルス感染の血清型鑑別診断が可能であることが確認されている。今回、さらに血清型鑑別診断が可能となる感染後の時期について経時的に調べた。その結果、感染初期のIgG抗体は鑑別しがたく、感染後25日前後より、鑑別が可能であることが明らかとなった。この鑑別はIgG抗体のAvidityが十分に高くなる時期に一致して可能となることが示された。一方、IgM抗体ではこのトランケート抗原を用いても血清型鑑別を行うことが出来ず、代替中和法はIgM抗体では使用できないことも明らかとなった。すなわち感染初期においては本代替中和法が適応外であることが示された。

HFRS 関連ハンタウイルスである、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) 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 の原因となる北米由来の 3 種類のハンタウイルスである、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 蛋白の 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。

#### 3) 食虫類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であるトツタパラヤンウイルス(TPMV)に対する4種類のモノクローナル抗体を確立した。これらのうち、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。

#### 3) ハンタウイルス感染症の動物モデルの開発

ハンターウイルス AA57 株を 2 週齢の ICR に接種し、経過を観察したところ、約 50% の動物が体重減少や呼吸器症状などの症状を示した。発症した動物のさらに約半数が死亡した。発症動物の解剖を行ったところ、いずれの個体も 300-400 $\mu$ l の胸水を貯留しており、これが呼吸困難の原因であることが明らかとなった。病理組織検索の結果、中小の肺血管周囲に軽度の好中球、単核系細胞浸潤を伴う中等度の水腫が認められた。病変部の血管内皮細胞は変性し、好

中球の接着が見られた。さらにこの病変に一致してウイルス抗原陽性細胞が存在した。また、肺胞壁には好中球等の細胞浸潤が見られ、軽度の炎症所見が得られた。肺胞内には変化は見られなかった。

### クリミア・コンゴ出血熱

S-遺伝子の部分的塩基配列に基づく系統樹解析により、新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスは、患者やダニから得られたウイルス全てが独立した一つのクラスターを形成していた。しかし、近年報告された新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスを加えた今回の解析により、中近東分離株のクラスターに分類されるものが、新疆ウイグル自治区に存在することが明らかにされた。

### B ウイルス感染症

HSV-2 vTK 発現 293T 細胞における ACV の HSV-1 TAR 株増殖抑制効果の評価

ACV 感受性株 HSV-2 UW268 の vTK を発現する 293T 細胞では TAR 株は効率よく ACV によりその増殖が抑制されたのに対し、2 つの耐性株の組換え vTK が発現されている細胞では、TAR 株の増殖は ACV によって抑制されなかった。

### 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) モンゴル由来の RABV の分子疫学的解析  
モンゴル由来ウイルスの間で、塩基配列の一

致率は 98.3% 以上であった。モンゴル由来 RABV 株について N 遺伝子配列 (1,353nt) を利用した系統樹解析を行ったところ、モンゴルの RABV は A と B の2つのグループに分かれることが示された。グループ A は、主にモンゴル西部で分離されたウイルスが含まれ、ロシアやカザフスタンで分離された Steppe (草原)-type ウイルス株と分子遺伝学的に近縁であった。一方、モンゴル中央部由来の 1 株 (MGL 22) はグループ B に属しており、Arctic-like ウイルスに分類されるロシア、グリーンランド、韓国由来のウイルスに近縁であった。

モンゴル由来ウイルスのアミノ酸配列を GenBank の他の株と比較すると、N 遺伝子の Ser389 (リン酸化への関与が報告されている) は、モンゴル由来株だけでなく、他の株でも保存されていた。Antigenic site I (アミノ酸 359-366 番目) および site IV (アミノ酸 375-383 番目) も、同様にモンゴル由来株では保存されていた。N 蛋白質の全アミノ酸の配列では、MGL 22 と他のモンゴル由来株の間に 11 アミノ酸の違いが認められた。モンゴル由来株間のアミノ酸配列の一致率は 97.6% 以上であり、全ての株は direct immunofluorescent antibody (DFA) test で検出可能であった。

2) リッサウイルスに対する中和抗体測定法の確立とベトナムのコウモリにおける中和抗体の検出

リッサウイルス属の 5 つの遺伝子型 (GT1、GT2、GT3、GT4、GT5) について中和抗体検出系の確立を試みた。MNA 細胞に感染させたいずれのリッサウイルス株も市販の診断用抗体 (Fujirebio 社製) によって検出可能であった。狂犬病ワクチンを接種して得られた高度免疫血清を被検血清として、各リッサウイルス株に対する MNA 細胞への感染阻止を蛍光顕微鏡下で観察した。高度免疫血清 (国際単位 0.5IU/ml の中和活性を持つ) を段階希釈して各リッサウイルス株に対する中和能を調べたところ、リッサウイルス株間で中和活性が異なることが示された。この違いは、系統樹における各リッサウイルス株の遺伝学的な距離を反映しているものと考えられた。ベトナム (Bac Giang 地区) で捕獲された 108 匹のコウモリ血清 (10 倍希釈) について、各リッサウイルス株の感染阻止像を蛍光顕微鏡下で観察したところ、CVS-11 株と EBLV-1 株に対して 31.6% および Mokola virus 株に対して 3.7% の被検血清が 90% 以上の感染阻止を示した。

3) RABV の病原性発現機序の解析  
西ヶ原株筋肉内接種群では、全ての個体の脳

において、高い感染価のウイルス(>10<sup>8</sup> FFU/g)が検出された。一方、Ni-CE 株筋肉内接種群では、いずれの個体においても感染性ウイルスは検出されなかった(<10<sup>2</sup> FFU/g)。したがって、両株の異なる末梢感染性には、中枢神経侵襲性の違いが関与していることが示唆された。

各キメラウイルスの末梢感染性を検討した結果、CE(NiM)株、CE(NiG)株及び CE(NiL)株接種群では、Ni-CE 株接種群と同様にいずれの個体も発症しなかった。一方、CE(NiP)株及び CE(NiN)株接種群では、それぞれ 5 匹中 4 匹及び 1 匹が西ヶ原株接種マウスと同様の神経症状を示して死亡した。これらのことから、西ヶ原株と Ni-CE 株の筋肉内接種による末梢感染性の違いに P 遺伝子が関連すること、ならびに N 遺伝子が関連する可能性が示された。

西ヶ原株を皮下接種した場合、マウスは平均 4.4 日の潜伏期を経て、全個体(5/5 匹)が発症・死亡した。一方、Ni-CE 株を皮下接種したマウス群では、いずれの個体も発症せず、全個体(5/5 匹)が生存した。以上より、皮下接種の場合でも、西ヶ原株と Ni-CE 株の間に明瞭な末梢感染性の違いが確認された。両株の末梢感染性に関連するウイルス遺伝子を同定する目的で、Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株の各遺伝子を単独で組換えたキメラウイルス [CE(NiN)株、CE(NiP)株、CE(NiM)株、CE(NiG)株及び CE(NiL)株]をマウスに皮下接種し、症状の観察を行った。その結果、これらのキメラウイルス感染マウスに発症するものは確認できなかった。このことは、皮下接種による西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いには複数の遺伝子が関連することを示している。反対に、西ヶ原株のゲノムに Ni-CE 株の各遺伝子を組換えたキメラウイルス [Ni(CEN)株、Ni(CEP)株、Ni(CEM)株、Ni(CEG)株及び Ni(CEL)株]についても同様の実験を行った。その結果、Ni(CEN)株及び Ni(CEG)株を皮下投与したマウスが 100%発症した一方で、Ni(CEP)株、Ni(CEM)株及び Ni(CEL)株を皮下接種したマウスの発症率は、それぞれ 60%(3/5 匹)、60%(3/5 匹)及び 80%(4/5 匹)であった。これらの発症マウスは、いずれも神経症状を示した後に死亡した。以上より、皮下接種による西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いには、P、M 及び L 遺伝子が主要に関連することが明らかとなった。次に、これらの 3 遺伝子のうち、特に強い関連が示唆された P 及び M 遺伝子に着目し、Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株の P 及び M 遺伝子を保有するキメラウイルス CE(NiPM)株を作出した。本株を皮下接種した場合のマウスの発症率を調べた結果、

40%(2/5 匹)のマウスの発症が確認された。以上のことから、皮下接種による西ヶ原株の末梢感染性に P 及び M 遺伝子が重要であることが確認された。

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的大腿筋では、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的大腿筋では、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。

## バルトネラ感染症

野生鹿の 57.8% (26/45 検体)、マダニの 3% (1/33 検体)、シラミバエの 90% (9/10)から *Bartonella* 属菌が分離された。PCR 法による *Bartonella* DNA の保有率は、マダニで 0% (0/33)、シラミバエで 100% (10/10)であった。

*glTA* 領域に基づく系統解析の結果、分離株は *B. capreoli* と同一 (系統 II) または独立した 2 つのクレード (系統 II) を形成した。さらに、マダニ分離株の遺伝子型は寄生していた鹿の株と同一の遺伝子型であったが、シラミバエ分離株では異なっていた。

ニホンアナグマの 1 頭 (1/15) およびテンの 1 頭 (1/8) からそれぞれ *Bartonella* 属菌が初めて分離された。一方、アライグマ、タヌキ、ニホンイタチ、チョウセンイタチからは *Bartonella* 属菌は

分離されなかった。*gltA* および *rpoB* 遺伝子領域の相同性解析では、ニホンアナグマ分離株は *B. clarridgeiae* と最も高い相同性を示し、それぞれ 96.5%、95.6% であった。テン分離株は *B. washoensis* と最も高い相同性を示し、両遺伝子領域の相同性はそれぞれ 97.1%、93.8% であった。また、6 遺伝子領域の連結配列から作成した系統樹では、両分離株は既存種とは異なるクラスターを形成し、各クラスターは高いブートストラップ値 (100%) で支持された。各動物の血液から抽出した DNA を用いた PCR 法では、アライグマの 1 頭 (0.1%; 1/1, 008)、タヌキの 14 頭 (8.2%; 14/171)、ニホンアナグマの 1 頭 (6.7%; 1/15)、テンの 1 頭 (12.5%; 1/8)、から *Bartonella* 属菌の DNA が検出された。系統解析の結果、検出された DNA は、既存の病原性 *Bartonella* と近縁種であった。

沖縄県のマングースの 15.9% (10/63) および千葉県のハクビシンの 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、 $7.0 \times 10^3$  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

ベトナム・メコンデルタで捕獲された野生ヤモリ 465 検体中 95 検体 (14.5%) から *Salmonella* 属菌が分離された。分離状況を季節別にみると、雨季 (5~11 月) では 230 検体中 31 検体 (13.5%)、乾季 (12~4 月) では 186 検体中 32 検体 (17.2%) から *Salmonella* 属菌が分離されたが、季節間では有意差は認められなかった。また、種別にみると、ホオグロヤモリ (*Hemidactylus frenatus*) 358 検体中 58 検体 (16.2%)、ヒラオヤモリ (*Hemidactylus platyurus*) 250 検体中 33 検体 (13.2%) および オンナダケヤモリ (*Gehyra*

*mutilata*) 38 検体中 4 検体 (10.5%) から分離されたが、種間では分離率に有意差は認められなかった。また、地域別に分離率をみると、Can Tho 市では 416 検体中 63 検体 (15.1%)、Kien Giang 県では 122 検体中 19 検体 (15.6%) および Ca Mau 県では 108 検体中 13 検体 (12.0%) から *Salmonella* 属菌が分離されたが、地域間で有意な差は認められなかった。*Salmonella* 陽性のヤモリ 95 検体から、*Salmonella* 95 株が分離された。95 株中 73 株は市販免疫血清で 10 種類の血清型に型別された。*S. Weltevreden* が 39 株で最も多く、次いで *S. Lexington* が 11 株、*S. Newport* が 9 株、*S. Brunei* が 7 株、*S. Vejle* が 2 株、*S. Dabou*、*S. Strathcona*、*S. Agona* および *S. Hindmarsh* がそれぞれ 1 株であった。*S. Weltevreden* は調査した 3 地域いずれにおいても最も高頻度に分離された。捕獲したヤモリのうち 92 検体はメスヤモリで卵を体内に保有していたので、1 検体当たり 2 個の卵を無菌的に採取し *Salmonella* の分離を行ったところ、母ヤモリからは 14 検体 (15.2%) から *Salmonella* 属菌が分離されたにも関わらず、体内の卵からは *Salmonella* 属菌はいずれの検体からも分離されなかった。

ベトナム中部で捕獲されたヤモリの腸管内容物から *Salmonella* 属菌の分離を試みたところ、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、*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ったが、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。

ヤモリの糞便中への *Salmonella* の排菌量の測定を行った。供試されたヤモリの糞便 100 検体



中 11 検体から *Salmonella* が検出された。これら *Salmonella* 陽性のヤモリの糞便 11 検体中の *Salmonella* の菌量は、最も少ないもので  $7.1 \times 10^2/g$ 、最も多いもので  $2.8 \times 10^5/g$  であった。

ヤモリの糞便中でのサルモネラの生残性を実験的に調べた結果、室温 (25–30°C) に保存した場合、*Salmonella* はヤモリの糞便から保存 6 週間後まで検出されたが、その後は検出されなくなった。

## ライム病

分離されたボレリア 32 株について各々 8 loci の塩基配列、約 5kbp を決定し、国際 MLST データベースと照合した。この結果 32 株中 20 株が既報の ST と一致した。1) モスクワ近郊で採取されたリシナスマダニ由来 24 株には、欧州型ボレリア・ガリニの ST である ST86 (5 株)、ST94 (1 株)、ST179 (1 株)、ST180 (2 株)、ST209 (4 株)、ST244 (4 株)、およびこれまで知られていない ST である Untypable STs (5 株) が含まれた。モスクワ近郊では欧州各国と同様に欧州型ボレリア・ガリニが優勢であると考えられた。また Untypable STs の 5 株 (Nr187-cl1, Nr215-cl1, Nr176-cl1, Nr309, Nr180-cl5) についてもその系統解析からは、欧州型ボレリア・ガリニであることが推定された。ドイツでリシナスマダニより分離された ZQ1 株も Untypable ST であったが、ST175 と近縁の欧州型ボレリア・ガリニと推定された。一方、ST82 (2 株) は欧州型ボレリア・ガリニとは異なるクラスターを形成したことから、欧州型かアジア型かは現在のところ不明である。

モスクワ近郊で採取されたシュルツェマダニ由来株 (Np189) は ST86 であり、欧州で見出される欧州型ボレリア・ガリニと一致した。同 Mp7 株はそれぞれのクラスターより独立していた。

極東ロシアで分離されたシュルツェマダニ由来 1 株 (Ip90) はそれぞれのクラスターより独立していた。また、中国国内の野鼠より分離されたボレリア 4 株はこれまで登録された ST とは一致しなかったが、それぞれアジア型ボレリア・ガリニと近縁であると考えられた。

欧州型ボレリア・ガリニの内、最も強毒型と考えられている ST84 および ST85 は今回の調査では見出されなかった。

## 回帰熱

### 1) 回帰熱疑似患者の臨床経過

【症例概略】患者は 20 歳女性で、主訴は周期性の発熱と下肢痛であった。2010 年 9 月 1 日から 8 日までの 1 週間ウズベキスタンのリシタンで

ボランティア活動をしていた。ウズベキスタン滞在中、寝ている間に右大腿を虫に噛まれたという。帰国後の 9 月 12 日に 39°C の発熱と下肢痛を認め近医を受診し、感冒と診断され抗菌薬フロモックス (CFPN-PI) とロキソプロフェンを処方された (1 度目の発熱)。発熱は 3 日程度で解熱したが、その後 9 月 24 日と 10 月 4 日にも同様の発熱と下肢痛が出現した (2 度目、3 度目の発熱)。この際、病院は受診せず残っていた CFPN-PI を内服し 1 日で解熱したという。その後、周期性の発熱の原因精査のため 10 月 8 日に市立奈良病院を受診した。初診時には解熱しており、自覚症状はなかった。身体所見では圧痛を伴う右頸部リンパ節腫大と右大腿内側に痂皮を認めた以外に異常所見はなかった。下肢に関節の腫脹や筋把握痛は認められなかった。血液検査でも特に異常なく、血液培養を採取し経過観察とした。10 月 15 日午後から再度発熱があり市立奈良病院を再受診した (4 度目の発熱)。この際、発熱・全身倦怠感に加え軽度の頭痛と「両足がちぎれそう」という強い下肢痛の訴えがあった。身体所見は前回受診時と特に変わりなく、発熱時の皮疹や関節腫脹もみられなかった。周期性の発熱と海外渡航歴からマラリアを疑い血液塗末標本のギムザ染色を行ったがマラリア原虫は認めず、マラリア迅速検査キットを用いた迅速検査も陰性であった。またウズベキスタンで乳製品を食べていたことからブルセラ症を疑いブルセラ凝集反応検査も行ったが陰性であった。周期性の発熱の原因は依然不明であったが全身状態は良く、患者本人・家族も入院はせず外来でのフォローアップを希望されたため外来で経過観察を行うこととした。10 月 26 日午後から発熱があり市立奈良病院を受診した (5 度目の発熱)。発熱・全身倦怠感・下肢痛の訴えは変わらず、バイタルサインは血圧 112/70mmHg、脈拍数 90bpm、呼吸数 14/min、体温 39.8°C と比較的徐脈であった。CRP 19.45 mg/dl (当院初診時の無熱時は 2mg/dl 程度) WBC 5,450 (Neut 55.7%、Lym 35.8%、Eos 4.4%、Mono 3.7%、異型リンパ球なし) AST 26 IU/l、ALT 69 IU/l、その他 BUN/Cr、電解質、CK など正常。身体所見では前回診られなかった所見として腹部触診上脾臓を触れ、腹部エコー検査上も脾腫 (64mm × 39mm) を認めた。4 度目の発熱時同様、血液塗末標本のギムザ染色を施行しマラリア原虫は認められなかったがスピロヘータ様の菌体を認めため回帰熱を疑い、入院の上ミノマイシン (MINO) 100mg × 2/日の点滴投与を開始した。確定診断のため、PCR 法によるボレリア DNA の検



出を行い、発熱期採血(10月15日、10月27日)の好気および嫌気血液培養液、および無熱期採血(10月8日)の好気血液培養液よりボレリア DNA が検出された。検出された DNA の塩基配列決定により、感染ボレリア種は *Borrelia persica* と同定された。治療開始後に Jarisch-Herxheimer 反応は見られなかった。治療開始後、周期性の発熱は出現せず MINO は 10 日間で投与終了とした。

2) 回帰熱疑似患者からのボレリア遺伝子の検出と感染ボレリア種の同定

患者血液の培養液および血清からボレリア DNA が検出された。発熱期患者血液の培養液からは全ての検体よりボレリア DNA が検出された。また無熱期血液の培養液の一部からもボレリア DNA が検出された。検出されたすべての検体で塩基配列は 100%一致し、系統解析の結果、感染種は *B. persica* と同定された。

3) 各種ボレリア属菌 DNA 検出法の検証

*glpQ*-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 *glvC* 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 *glvC*-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。

4) 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。

## D. 考察

### ダニ媒介性脳炎

現在北海道において流行している TBEV の性状を解析するため、北斗市の野鼠からのウイルス分離を試みた。その結果、アカネズミから TBEV が 1 株分離された。分離株の塩基配列を解析した結果、分離ウイルスは極東亜型に分類され、1990 年代に当教室で北斗市より分離された株達と非常に近縁である事が示された。TBEV の遺伝子は自然界では安定であることが報告されており、それを支持する結果だと考えられる。

培養細胞を用いた実験では、Oshima 08-AS 株は Oshima 5-10 株と同様の増殖性を示したものの、細胞障害性やプラーク形成等において相違を示し、生物性状が異なる事が示唆された。

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。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、両株の病原性に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。よって今後本地域で流行している TBEV 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。

げっ歯類の血清疫学的調査によって、北海道の道東地域において初めて抗 TBEV 抗体を保有する野鼠が存在していることが示された。道東地域では TBEV 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 ウイルスの流行巣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 の流行巣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。

TBEV Oshima 5-10 株は IL-10 KO マウスへの感染で B6 マウスよりも高い致死率を示したことから、IL-10 応答は重症化を抑える働きがあることが示唆された。しかしながら、IL-10 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なかったことから、単純にウイルスの神経感染が重症化の原因ではないことが示唆された。すなわち、感染個体の IL-10 応答が関連した免疫応答が重症化に関わっていることが考えられた。一方、Sofjin 株感染では IL-10 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 IL-10 応答の重症化への影響は小さいものと考えられた。

TNFR1 KO マウスの感染実験により、TBEV Oshima 5-10 株感染では致死性の増加がみられたことから、TNF 応答が重症化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。一方、Sofjin 株感染では TNFR1 KO マウスにおいて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 応答の重症化への影響は小さいものと考えられた。

Oshima 5-10 株感染後の血清中 I 型 IFN 量が接種量に応じて増加していたことから、接種量に応じて I 型 IFN 量の産生が起きていることが示唆された。また、IFNAR KO マウスの生存時間に明確な接種量依存性がみられたことから、I 型 IFN 応答がうまく働かない状態ではウイルス増殖の量の違いが致死性に直接反映されることが示された。

TNF $\alpha$  KO マウスへの TBEV Oshima 5-10 株感染において致死性の増加がみられたことから、TNF $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\gamma$ 、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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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。

TBEV の Sofjin 株を接種した BALB/c マウスはいずれも腹部膨満を示し 8 日目に瀕死となった。病理組織学的には感染 5 日目からの腸管神経叢の神経細胞でのウイルス増殖が特徴的であったが、瀕死期には大脳、小脳、脳幹、脊髄を含む中枢神経系の神経細胞でもウイルス増殖が見られた。これに伴う炎症性反応は無いあるいは非常に弱かった。ヒトにおいて WNV や TBEV の腸管神経叢への感染は不明であるが、ダニ媒介性脳炎ウイルス感染患者には悪心、嘔吐、胃痛、食欲不振など胃腸症状を発症初期から訴えるものも報告されており、感染マウスにおける所見は興味深い。

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、ウォーターストームなどで 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。本 LAMP 法では 10<sup>1</sup> コピー数以上の TBEV 遺伝子を検出できることが明らかになった。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 RT-LAMP 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。

### ハンタウイルス感染症

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。

食虫類由来ハンタウイルスの抗原性について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判明した。トツ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、この領域の免疫原性が高いことが示された。また、日本産食虫類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。

ハンターウイルス AA57 株感染マウスの病理変化は、全体に炎症性細胞浸潤は軽微で、肺水腫と胸水貯留を引き起こす血管透過性亢進が病変の主体であると考えられた。中小の血管内皮の所見から、血管内皮細胞へのウイルス感染と増殖の結果、細胞が傷害されることにより肺水腫と胸水貯留が起こったと考えられた。AA57 株感染後の ICR マウスにおける病変形成は気道系ではなく血管系の肺傷害であることが明らかとなった。発症機序と病態の進行について、今後さらに検討する必要がある。

### クリミア・コンゴ出血熱

2001 年から 2002 年にかけて、中国新疆ウイグル自治区における CCHF の流行について西條らが詳細な研究を実施したが、近年の国際情勢により同地域における CCHF の流行に関する情報の入手は著しく困難になっている。しかし、近年中国の研究者により新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスの塩基配列に関する情報(特に部分 S-遺伝子に関する情報)が GenBank を通じて入手可能になった。

今回の解析で、これまでと同様に新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスの多くは独立した一つのクラスターを形成していることから、同地域で CCHF ウイルスは独自の進化を遂げているこ

とが再確認された。S-遺伝子の塩基配列は、宿主となるダニの種に深い関連があると考えられている。つまり、新疆ウイグル自治区には、CCHF ウイルスの宿主となりうる特異的なダニが生息していることが示唆された。CCHF ウイルス遺伝子が増幅されたダニについて、16S-ribosomal DNA の部分配列を決定して分子系統樹解析でダニの種を同定した。それによると、*Hyalomma* 属と *Dermacentor* 属が CCHF ウイルスの宿主となっていることが明らかにされた。

今回の解析により中近東(特に UAE)に存在する CCHF ウイルスと同じクラスターに分類される CCHF ウイルスが新疆ウイグル自治区にも存在することが明らかにされた。隣国、パキスタンに存在する CCHF ウイルスは、系統樹解析上中近東の CCHF ウイルスに近縁である。以上の成績は、新疆ウイグル自治区における CCHF ウイルスは、同地域において進化をとげているものと、中近東から動物(特にヒツジなどの家畜)の移動、ダニを有する渡り鳥の移動により中近東の CCHF ウイルスが混在していることが示唆された。さらに、同地域に存在する CCHF ウイルスの宿主となり得るダニの種が多様であることをも示していると考えられる。

### B ウイルス感染症

マカク属霊長類が保有する B ウイルス(BV)は、霊長類の輸入によって我が国においても患者が発生する可能性がある。また、日本ザルも BV を保有していると報告されている。BV は ACV や GCV により増殖が抑えられることから、BV 感染症には ACV や GCV が投与される。しかし、BV は BSL-4 病原体(感染研では少量培養に限り BSL-3 病原体)に指定されている。そのため BSL-4 研究施設が稼働していない我が国では、BV を用いた薬剤感受性試験を実施することが困難な状況にある。そこで、本研究では、感染性 BV の ACV 等の vTK 関連薬剤に対する感受性を、感染性 BV を用いることなく解析するためのモデルシステムを開発した。被検 BV の vTK 遺伝子を増幅して、その組換え vTK を 293T 細胞に発現させ、その細胞における ACV の TAR 株の増殖抑制効果を評価することで、感受性を評価できる可能性がある。現在、BV の vTK を用いて、さらに詳細に検討している。

### リフトバレー熱

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。

### 狂犬病

2005年から2008年に西部・中央モンゴルに生息している狂犬病抗原陽性の7種類の家畜および野生動物について脳材料を採材し、検体中の狂犬病ウイルスN遺伝子の塩基配列を決定した。これらの塩基配列を利用して分子疫学系統樹を作成したところ、モンゴルで流行している RABV は2つの遺伝子グループに分けられ、ロシアで分離される Steppe 型と Arctic 型の RABV に近縁であることが明らかになった。

モンゴルは、ロシア・中国(ともに狂犬病流行国)と国境を接しており、国境を移動する野生動物等を介して狂犬病ウイルスが行き来する可能性が十分あり、伝搬経路等を理解することは国境を越えた狂犬病のコントロールの確立が重要である。

また、近年ではモンゴルとの国境に近いイルクーツクに生息するコウモリ(*Murina leucogaster*)から新種のリッサウイルス(Irkut virus)が分離されており、国境を越えて野生動物等を介した流行の拡大リスク等について関心がもたれている。現在までモンゴルではコウモリに由来する狂犬病の報告はないが、新種のリッサウイルスが分離されたコウモリはシベリア南部、モンゴル西部、中国北東部でも生息が確認されており、モンゴルのコウモリ類がこれらリッサウイルスの感染宿主となりうる可能性は十分にある。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、これまでに報告されている事例から、そのほとんどがコウモリを自然宿主にしていると考えられている。現在、リッサウイルスは遺伝学的に大きく2系統に分類され、狂犬病を含めて7種類の遺伝子型(genotype)が報告されている。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がまだ未分類である。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フィリピン、タイ、カンボジアに生息するコウモリの血清にみられるといった報告がある。本研究では、抗-リッサウイルス中和抗体検出法を確立して、ベトナムに生息するコウモリについて中和抗体の保有率を調べた。本中和抗体検出系の課題として、使用した狂犬病ウイルス(CVS-11株)以外のリッサウイルス株は、MNA細胞でのウイルス増殖性が悪く、安定した検査系の確立にはMNA細胞への順化が必要であると考えられた。また、狂犬病ウイルスの中和抗体が、他のリッサウイルスに対してもある程度交差することを明らかにした。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行うためには、中央アジア(Kyrgyzstan, Tajikistan, Krasnodar region)、シベリア(Irkutsk)のコウモリから分離された、新種のリッサウイルスに対する中和抗体の検出系について検討が必要であり、今回確立した検査系の検証とともに、場合によってはウイルス株の入手や人工的に当該ウイルスの抗原性を持たせたVSV シュードウイルス等を利用した中和抗体の検出系を確立する必要もあると考えられた。

今後、モンゴルで流行しているリッサウイルスの野生動物等における流行形態を明らかにするとともに、隣国のロシアや中国等の患者発生状況や感染源動物における流行様式、分離 RABV 株の分子疫学等についての解析を進めることによって、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)の流行形態を明らかにしていく。

狂犬病ウイルスの感染において、西ヶ原株が Ni-CE 株より効率的にインターフェロンの作用及び産生を阻害し、それぞれに P 及び N 蛋白質が関与することが最近明らかになった。(Ito et al. J. Virol., 2010., Masatani et al., J. Virol., 2010) したがって、今回のマウスの筋肉内接種における西ヶ原株及び Ni-CE 株の異なる末梢感染性に、P 及び N 蛋白質の自然免疫回避能の違いが関与する可能性が考えられた。

狂犬病ウイルス西ヶ原株は、筋肉内接種と同様に皮下接種によっても末梢感染性があることが確認された。西ヶ原株を筋肉内接種されたマウスの潜伏期が平均で3.0日であったのに対し、皮下接種では4.4日と1日以上潜伏期の延長が認められた。筋肉には多数の神経繊維が密に分布しているため、筋肉内接種では皮下接種よりもウイルスが神経に侵入しやすいと考えられる。このことが皮下接種時の潜伏期の延長に関与していると考えられた。筋肉内接種によって