

イヌでの様々なインフルエンザウイルスの感染は新たなインフルエンザ出現の可能性も否定できない。血清型の特異性も含めて、今後注視が必要である。

5) インフルエンザウイルス分離を目的としてコウモリの口腔スワブからウイルス分離を試みた結果、人獣共通感染症として注目されているオルトレオウイルスに近縁なウイルスが分離された。本ウイルスのヒトへの病原性などは今後解明する必要がある。

#### E. 結論

インフルエンザの感染環における野生動物や飼育動物の重要性が示唆された。

#### F. 健康危機情報

国内のイノシシに A 型インフルエンザウイルスが蔓延している可能性がある。

国外のオオコウモリには未知のインフルエンザウイルスが感染している可能性がある。

国内外のイヌもインフルエンザウイルス感染動物として注視する必要がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Horimoto T, Gen F, Murakami S, Iwatsuki-Horimoto K, Kato K, Akashi H, Hisasue M, Sakaguchi M, Kawaoka Y, Maeda K. Serological evidence of infection of dogs with human influenza viruses in Japan. *Veterinary Record* (2013) doi: 10.1136/vr.101929

##### 2. 学会発表

下田 宙、Hassan Mahmoud、野口慧多、寺田 豊、谷口 怜、久和 茂一、吉川泰弘、Joseph Masangkay、鈴木和男、本道栄一、前田 健「コウモリ由来感染症の調査について」第 28 回中国四国ウイルス研究会、広島、2013 年 6 月 22 日

下田 宙、Hassan Y. A. H. Mahmoud、野口慧多、寺田 豊、Joseph Massangkay、谷口 怜、久和 茂、吉川泰弘、前田 健「フィリピンのコウモリにおける各種ウイルス感染症の血清疫学調査」第 155 回日本獣医学会学術集会（東京）東京大学駒場キャンパス 2013 年 3 月 28 日 - 30 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

表1 イノシシにおけるインフルエンザAウイルスに対する抗体保有状況の調査

(IDEXX, INFLUENZA A VIRUS ANTIBODY TEST KIT)

	関東	九州	中国				計
	2011-2012	2012	2010	2011	2012	2013	
検査頭数	153	40	57	48	49	38	385
陽性頭数	9	0	0	1	2	1	13
陽性率	5.9%	0.0%	0.0%	2.1%	4.1%	2.6%	3.4%

※S/N比が0.6未満の個体を陽性とした

表2 インフルエンザA抗体陽性イノシシの詳細

年度	個体番号	捕獲場所(地方)	性別	体重	捕獲日	S/N
13	62	中国	♀	52	2013/9/14	0.21
12	99	中国	-	15	2013/2/3	0.58
12	25	中国	♀	38kg	2012/10/7	0.35
11	94	中国	♀	35kg	2011/12/25	0.21
11	13	関東	♀	24kg	2011/5/13	0.38
11	28	関東	♂	44kg	2011/6/11	0.10
11	32	関東	♀	31kg	2011/6/21	0.44
11	56	関東	♂	35kg	2011/8/17	0.59
11	72	関東	♂	43kg	2011/9/14	0.30
11	76	関東	♀	44kg	2011/9/22	0.20
11	80	関東	♂	58kg	2011/9/30	0.52
11	87	関東	-	-	-	0.17
11	123	関東	-	-	-	0.20

表3 ウイルス中和試験による感染ウイルスの推定

Sample ID	Seasonal H1N1	2009 H1N1 pdm	Swine H1N1	Swine H1N2	Swine H3N2	Avian H5N1
中国94	<8	1024	16	256	<8	<8
中国525	ND	2048	256	256	<8	<8
関東32	ND	128	256	64	<8	<8
関東80	<8	512	1024	128	<8	<8
関東87	<8	128	256	64	<8	<8
関東123	<8	1024	4096	512	<8	<8

Seasonal H1N1: A/Kawasaki/UTK4/2009

Swine H1N1: A/swine/Hokkaido/2/81

Swine H3N2: A/swine/Obihiro/10/85

2009 H1N1pdm:

Swine H1N2:

Avian H5N1:

A/Osaka/364/2009

A/swine/Miyagi/5/2003

A/chicken/Yamaguchi/8/2004

表4 インフルエンザウイルス抗原検査  
(中国地方、2012-2013年度)

	2012年度	2014年度	計
検査頭数	49	57	106
陽性頭数	0	0	0
陽性率	0	0	0

株式会社タウンズ; イムノエースFlu

表5 コウモリにおける抗インフルエンザウイルス抗体  
の検出

フィリピンのオオコウモリ							近畿地方のユビナガコウモリ			
	'08	'09	'10	'11	'12	'13	計	2012	2013	計
検査頭数	32	24	95	18	47	62	278	検査頭数 39	96	135
陽性頭数	1	0	0	0	4	10	15	陽性頭数 0	0	0
陽性率	3.1%	0.0%	0.0%	0.0%	8.5%	16.1%	5.4%	陽性率 0.0%	0.0%	0.0%

表6 抗インフルエンザウイルス抗体陽性コウモリ

ID	Date	Species	Sex	Stage	S/N
1546	2008/7/29	Scotophilus kuhlii	F	16.7	0.52
MNMQ363	2012/8/8	Rousettus amplexicaudatus	F	young adult	0.50
MNMQ375	2012/8/8	Rousettus amplexicaudatus	M	young adult	0.25
MNMQ401	2012/8/9	Rousettus amplexicaudatus	M	adult	0.49
MNMQ409	2012/8/9	Rousettus amplexicaudatus	M	sub adult	0.20
JDVA0002	2013/8/15	Rousettus amplexicaudatus	M	adult	0.54
JDVA0006	2013/8/15	Rousettus amplexicaudatus	M	adult	0.28
JDVA0011	2013/8/15	Rousettus amplexicaudatus	M	adult	0.43
JDVA0030	2013/8/16	Rousettus amplexicaudatus	F	adult	0.47
JDVA0043	2013/8/16	Rousettus amplexicaudatus	M	adult	0.42
JDVA0044	2013/8/16	Rousettus amplexicaudatus	M	adult	0.58
JDVA0048	2013/8/16	Rousettus amplexicaudatus	M	adult	0.43
JDVA0054	2013/8/17	Rousettus amplexicaudatus	M	adult	0.31
JDVA0067	2013/8/17	Rousettus amplexicaudatus	F	adult	0.59
JDVA0069	2013/8/17	Eonycteris spelaea	M	adult	0.33

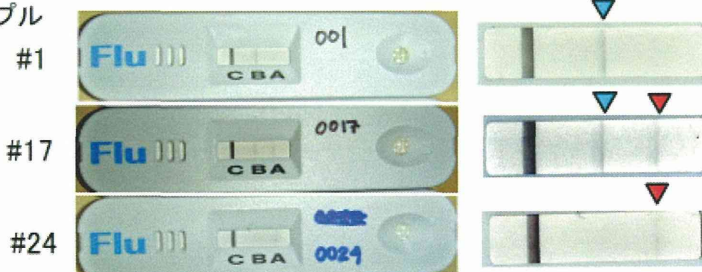
表7 中和試験による型別の試み(H17N10???)

Sample ID	IDEEX Ab test	H1N1pdm	Avian H5N1
MNMQ363	+ (0.50)	<8	<8
MNMQ364	- (1.49)	<8	<8
MNMQ375	+ (0.25)	<8	<8
MNMQ382	- (1.35)	<8	<8
MNMQ401	+ (0.49)	<8	<8
MNMQ406	- (1.24)	<8	<8
中国イノシシ94	+ (0.26)	1024	<8
中国イノシシ525	+ (0.35)	2048	<8

Seasonal H1N1: A/Kawasaki/UTK4/2009

Avian H5N1: A/chicken/Yamaguchi/8/2004

口腔スワブ  
サンプル



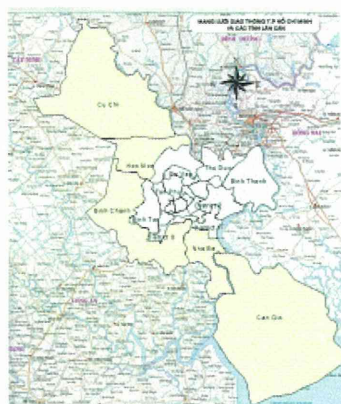
その他、#53, #67, #70はA/Bに、#59:はBに極めて弱い反応あり



これら7個体からウイルス分離、ウイルス遺伝子の検出を試みる。

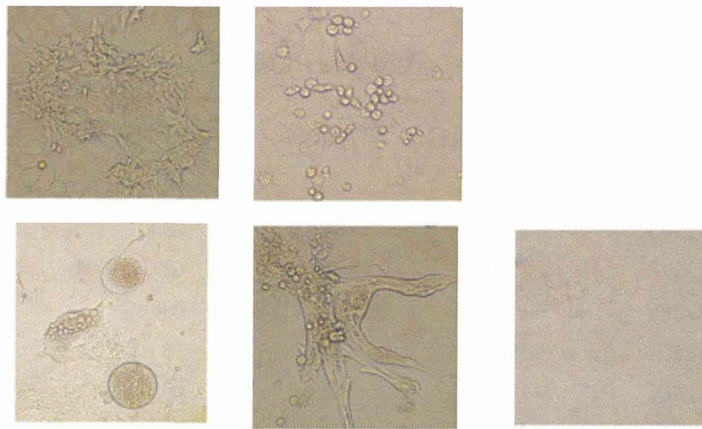
図1 コウモリからインフルエンザウイルス抗原検出の試み

表8 ベトナムの犬における抗インフルエンザウイルス抗体の検出(N=92)



ID	Age (y)	Sex	Breed	District	S/N
3	3	♂	Mixed Breed	7	0.49
8	4	♀	Mixed Breed	4	0.06
13	3	♂	Japanese Breed	3	0.51
66	8	♀	Mixed Breed	12	0.54
72	5	♂	Mixed Breed	12	0.53
95	3	♀	Mixed Breed	Cu Chi	0.48
104	6	♀	Mixed Breed	12	0.11
118	3	♀	Japanese Breed	2	0.59





24ウイルス感染MDCK細胞      mock感染MDCK細胞 ●

図2 新規ウイルスの分離に成功？

## 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分離と同定

分担研究者 前田 健（山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室）  
研究協力者 高橋 徹（山口県立総合医療センター）  
石堂 亜季（山口県立総合医療センター）  
奥田 優（山口大学共同獣医学部獣医内科学教室）  
水谷 哲也（東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター）

### 研究要旨

動物由来感染症を調査している過程で、国内で死亡した患者から 2011 年に中国から初めて報告された重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスの分離同定に成功した。

#### A. 研究目的

本研究は、未知の動物由来感染症の分離・同定を目的としている。

#### B. 研究方法

##### 1) 被検血清

2012 年 11 月に山口県で死亡した 50 代女性の血清を用いた。

##### 2) ウイルス分離

Vero 細胞と猫単球系細胞 fcwf-4 細胞に血清を接種し、細胞変性効果を指標に観察を行った。

##### 3) 次世代シーケンサーによる解析

ウイルスを含む培養上清から RNA は High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics) を使って精製され、cDNA は SuperScript III (Invitrogen) を用いて転写され、illumina GenomiPhi V2 Kit (GE Healthcare Life Sciences) を用いて増幅された。cDNA ライブラリーは Nextera DNA Sample Prep Kit (Illumina) を用いて調整され、MiSeq (Illumina) を用いて解析した。

#### C. 研究結果

##### 1) 新規ウイルスの分離

原因不明でなくなった患者の血清を接種した Vero 細胞は 4 日目、fcwf-4 細胞は 5 日目に細胞変性効果が認められた。その上清をフィルトレーション後、再度 Vero 細胞に接種したところ細胞変性効果確認された (表 1)。

##### 2) 次世代シーケンサーを用いた塩基配列の解析

危険なウイルスである可能性もあるため、ウイルスを直接取り扱うことなく塩基配列の決定が可

能な、次世代シーケンサーによる解析を行った。その結果、中国で報告されている SFTS ウイルスに最も近縁であったが、山口株 YG1 は別のクラスターにあることが示された (図 1)。

#### D. 考察

国内にも SFTS ウイルスの存在が証明された。今後、疫学調査や予防法の試みなどが必要である。

#### E. 結論

国内で初めて重症血小板減少症候群ウイルスを分離・同定した。

#### F. 健康危機情報

国内に重症血小板減少症候群ウイルスが存在する。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takahashi T †, Maeda K †, Suzuki T †, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *Journal of Infectious Diseases* (In press) († Equally contributed)

前田 健:「重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスの分離から最新の知見まで」化学療法の領域(医薬ジャーナル) 2014. 30(2):75-88.

## 2. 学会発表

前田 健、高橋 徹、奥田 優、水谷哲也、山岸拓也、森川 茂、下島昌幸、西條政幸「重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスの分離・同定」第156回日本獣医学会学術集会、岐阜、2013年9月20日

Nguyen Dung, 下田 宙、濱崎千菜美、寺田 豊、野口慧多、鍬田龍星、高野 愛、森川 茂、前田健「飼育犬から重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスと交差する抗体の検出」第156回日本獣医学会学術集会、岐阜、2013年9月20日

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

### 1. 特許取得

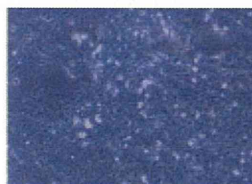
なし

### 2. 実用新案登録

なし

表1 SFTSウイルスの分離までの経緯

- 担当医の先生が感染症を疑い様々な検査を実施
- しかし、原因不明
- 巡り巡って、山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室へ依頼(血清のみ)
- Vero細胞と猫由来培養細胞fcwf-4細胞に接種
- 4-5日後に細胞変性効果(CPE)が出現



Vero細胞におけるCPE

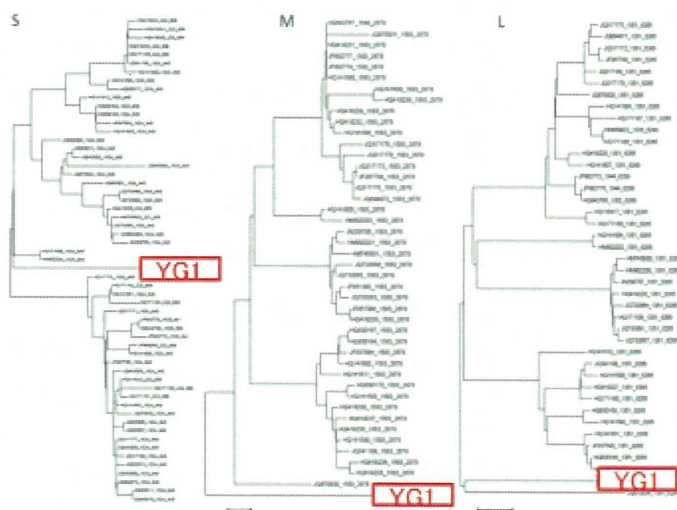


図1 次世代シーケンスでSFTSV遺伝子の検出  
(2012年12月26日)



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

フィリピン蝙蝠からの新規レオウイルスの分離

研究要旨

2013年8月にフィリピンミンダナオ諸島群で捕獲したコウモリの咽頭スワブからウイルス分離を試みた結果、サマル島 Sion Bat Cave において捕獲したヨアケオオコウモリ由来の咽頭スワブ感染 MDCK 細胞に巨細胞の出現が認められた。原因ウイルスの同定を行った結果、本ウイルスはレオウイルス科オルソレオウイルス属のネルソンベイレオウイルスグループに属する新規レオウイルスであった。

研究代表者；吉川泰弘(千葉科学大学)

分担研究者；前田健(山口大学)

研究協力者：谷口怜(東京大学大学院農学生命科学研究科)

堀本泰介(東京大学大学院農学生命科学研究科)

下島昌幸(国立感染症研究所)

ルス抗原検出キットを用いた結果、7検体(ジュフロアルーセットオオコウモリ4検体(#1, #17, #53, #59), ヨアケオオコウモリ3検体(#24, #67, #70))が陽性を呈した。

この7検体を対象に口腔スワブを用いたインフルエンザウイルス分離が試みられた。MDCK細胞を用いウイルス分離を試みCPEが検出された検体の感染細胞上清を対象に各種ウイルスに対する特異的プライマーを用いた遺伝子検出、次世代シーケンサーを用いた解析及び透過型電子顕微鏡を用いた解析を行った。

A. 研究目的

本研究は、翼手目由来感染症に対するリスクアセスメントとして、野生コウモリからの新規ウイルス分離及び分離したウイルスの同定を目的とした。

C. 研究結果

#24のコウモリ検体(ヨアケオオコウモリ、雄、若齢個体、サマル島 Sion Bat Cave で捕獲)由来の咽頭スワブを接種した MDCK 細胞で巨細胞を形成する CPE が観察された(図1)。MDCK細胞の他 Vero細胞、CRFK細胞も感受性を示し巨細胞形成が確認された。ウイルス力価は MDCK 細胞感染上清で最も

B. 研究方法

2013年8月にミンダナオ島 Davao Oriental、サマル島 Sion Bat Cave、Vito Cave、Talicud 島 Datatan Cave、ダバオ周辺の5カ所でオオコウモリ4種88匹、コウモリ1種3匹計91匹(#1-#91)を捕獲した。

口腔スワブを対象にインフルエンザウイ

高く、 $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml であった。また、インフルエンザウイルスを対象とした RT-PCR 陰性、HA、インフルエンザウイルス抗原検出キット陰性であることからインフルエンザウイルス以外のウイルスであると考えられた。

ウイルス力価が低いため、次世代シーケンサーを用いた解析ではウイルス遺伝子を同定することはできなかった。感染細胞上清をネガティブ染色し透過型電子顕微鏡を用いた解析を行った結果、直径 70nm、正二十面体構造のエンベロープなしのウイルス粒子が確認された(図 2)。

本ウイルスをレオウイルス科に属するウイルスと推定しインドネシア、オーストラリアでヒトへの感染が報告されているネルソンバイレオウイルスグループの S2 セグメントに保存されている塩基配列特異的プライマーを作製、RT-PCR を行ったところ、ネルソンバイレオウイルスグループのネルソンバイレオウイルスに最も近縁な遺伝子配列が得られた(図 3)。

#### D. 考察

本研究によりフィリピンのオオコウモリにおいてネルソンバイレオウイルスグループに属する新規レオウイルスが感染していることが明らかになった。

ネルソンバイレオウイルスグループはオーストラリア、インドネシア、マレーシア、中国で過去にコウモリから分離されており、マレーシア、中国では急性呼吸器症状を呈

した患者から原因ウイルスとして分離されている。また日本国内においてもインドネシアからの帰国者で急性呼吸器症状が報告されている。今回分離されたウイルスのヒトへの病原性は不明であるが、フィリピンのコウモリで分離・同定されたことは意義深い。

インドネシアやマレーシアだけではなくフィリピンにおいても本ウイルスが今まで原因不明であった急性呼吸器症状の原因のひとつであった可能性が示唆され、今後検証が必要であると考えられる。また、本ウイルスのコウモリにおける感染実態の解明、ヒトへの感染の可能性、病原性の解明は翼手目由来感染症に対するリスクアセスメントの一環として今後更なる調査解析を行っていく必要があると考えられる。

#### E. 結論

フィリピンのオオコウモリへのネルソンバイレオウイルスグループのウイルスの感染が解明された。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

省略

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

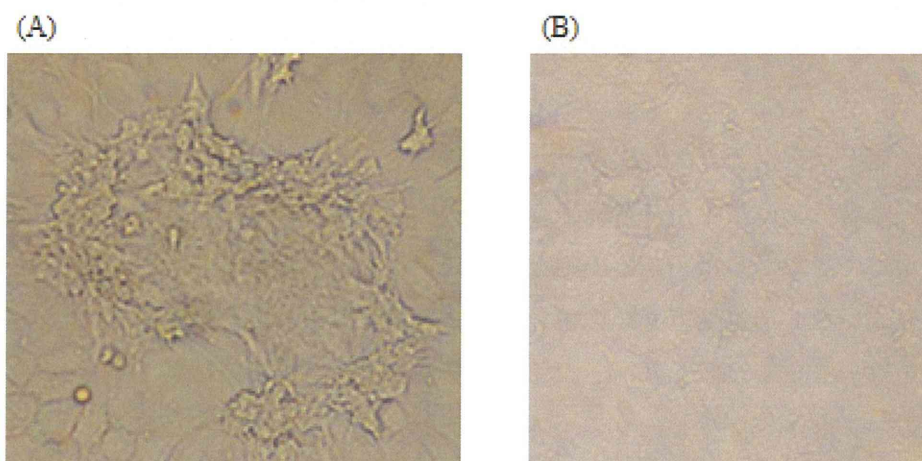


図1 #24のヨアケオオコウモリ咽頭スワブ接種MDCK細胞でみられた巨細胞形成  
 (A) 接種MDCK細胞でみられた巨細胞 (B) 非接種MDCK細胞

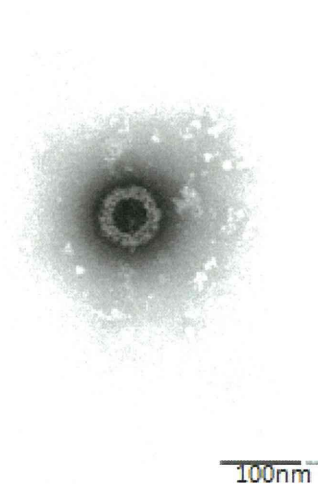


図2 電子顕微鏡観察下のウイルス粒子  
 ウイルス培養上清へネガティブ染色を行い透過型電子顕微鏡で観察した結果、直径70nm 正二十面体構造のウイルス粒子が観察された。

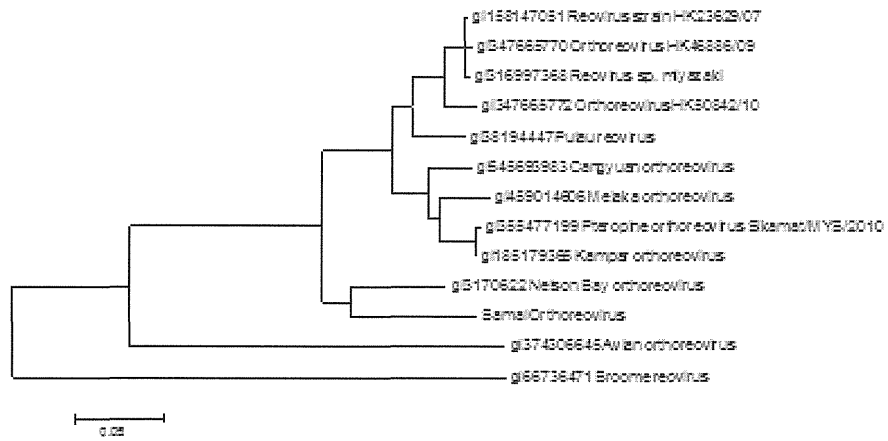


図3 本研究により同定された新規レオウイルス (*Samal Orthoreovirus*)及び近縁なレオウイルスの系統樹解析

32セグメントで解読された遺伝子配列をもとに近隣結合法により系統樹解析を行った結果、ネルソンベイオルソレオウイルスグループの中ではネルソンベイオルソレオウイルスと最も近縁な遺伝子配列であった。

## + 2013年採材コウモリ(JDVA0024)からの新規レオウイルス検出

- コウモリ個体情報: Eonycteris splanchea (ヨアケオコウモリ) 雄 juvenile
- 採材時期: 2013年8月16日
- 採材場所: ミンダナオ諸島サマル島シオンバットケープ (N6 56' 59.7" E125 45' 41.5")
- コウモリ咽頭スワブを東大堀本先生がインフルエンザウイルスの分離用を目的としてMDCK細胞に接種した結果、巨細胞出現。
- MDCK上清を用いインフルエンザキット、アデノウイルスキットを用い検査を行ったがいずれも陰性
- パラミクソウイルスコンセンサスプライマーを用いたPCRも陰性

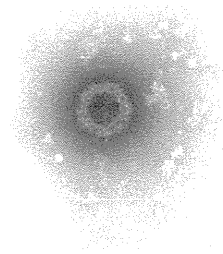
## + 2013年採材コウモリ(JDVA0024)からの新規レオウイルス検出

- 次世代シーケンサーを用いた解析を依頼され454 GS junior (Roche)を用いMDCK感染細胞上清を対象に解析を試みた結果、わずかながらレトロウイルス、サーコウイルスの遺伝子断片が検出された。
- しかしながらウイルス量が $10^4$ 程度と多くないこと、検出されたウイルス遺伝子の領域から目的としたウイルスのゲノムは検出していないと考察。
- 次世代シーケンサーを用いた解析の改良を目的としたより感受性の高い細胞への感染によるウイルス量増加、従来法によるウイルス同定も実施



## + 2013年採材コウモリ (JDVA0024)からの新規レオウイルス検出

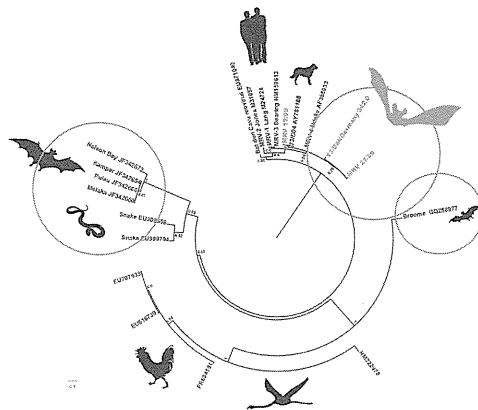
- Vero細胞へ感染させた後、上清をGOD法によりnegative stainしTEMにより解析。
- わずかながら直径70nm、エンベロープなしのウイルス粒子を確認。
- ウイルス粒子、巨細胞形成の性状からレオウイルスを疑う。



100nm

## + 2013年採材コウモリ (JDVA0024)からの新規レオウイルス検出

- レオウイルスをターゲットとした場合、大きく分けて3グループのレオウイルスが過去の検出されている。
  - Nelson Bay, Pulau, Melaka, Kampar, Sikamat
  - Broome virus
  - MRV, T3/Bat/Germany/342/0



PLOS ONE Claudia et al. 2012

+ 2013年採材コウモリ (JDVA0024) からの新規レオウイルス検出

■ Bat associated reovirus

■ Nelson Bay, Pulau, Melaka, Kampar, Sikamat

■ Broome virus

■ MRV, T3/Bat/Germany/342/0

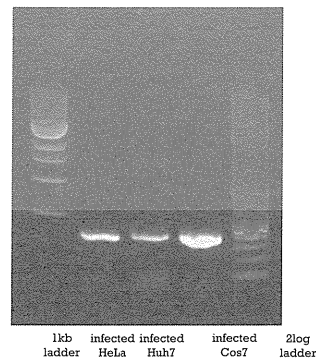
■ ネルソンバイレオウイルスグループを最初のターゲットとしてS2 segmentでコンセンサスプライマーを作製しRT-PCRを実施

+ 2013年採材コウモリ (JDVA0024) からの新規レオウイルス検出

■ NelsonBay-Reo-S2-35-Fw  
CCACGATGGCGCGTGCCGTGTTCTGA

■ NelsonBay-Reo-S2-339-Rv  
ACGTAGGGAGGCGCACGAGGTGGA

300bp付近に  
遺伝子増幅がみられた



## + 2013年採材コウモリ (JDVA0024)からの新規レオウイルス検出

- 遺伝子配列を解析した結果、オルソレオウイルス属のネルソンベイレオウイルスグループに属する新規レオウイルスであることが判明。

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBanks Statistics Database of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Nelson Bay virus segment S2 major inner capsid protein sigma 1 gene, complete cds	414	414	100%	2e-112	90%	AF059718.1
<input type="checkbox"/> Kampar orthoreovirus segment S2, complete sequence	370	370	100%	5e-99	87%	EU448335.1
<input type="checkbox"/> Pteropine orthoreovirus Sikamat/MYS/2010 segment S2, complete sequence	359	359	100%	1e-95	87%	JF811581.1
<input type="checkbox"/> Putauv reovirus segment S2, complete sequence	359	359	100%	1e-95	87%	AY357731.1
<input type="checkbox"/> Melaka orthoreovirus segment S2, complete sequence	353	353	100%	5e-94	86%	EF026044.1
<input type="checkbox"/> Reovirus sp. miyazaki gene for sigma 1, partial cds	329	329	99%	8e-87	85%	AB521794.1

## + 2013年採材コウモリ (JDVA0024)からの新規レオウイルス検出

- 過去にネルソンベイレオウイルスによる急性呼吸器症状がいくつか報告されており、日本でも一例のみ報告されている。  
(<http://idsc.nih.gov/iasr/29/345/dj3454.html>)
- 症状として“喉の痛みと激しい咳”だそうで、そういえば私も今年度のサンプリング後、喉の痛みと激しい咳で体調をくずしました。

東南アジアからの帰国時に急性呼吸器症状を呈した患者から分離されたオルソレオウイルス

(Vol. 29 p. 310-312:2008年11月号)はじめに

2007(平成19)年11月22日、東南アジアからの帰国者が高病原性鳥インフルエンザの要観察例と判断され、インフルエンザH5N1の検査が依頼された。検査の結果、インフルエンザH5N1の感染は否定され、過去に国内で報告のないオルソレオウイルスが分離された。オルソレオウイルスのヒト感染の報告は極めて稀で、感染した場合は高熱を伴う呼吸器症状を呈することが知られているが、ヒト-ヒト感染の有無や病態の詳細についてはよくわかっていない。今回、原因ウイルスの同定とともに、患者との接触者等の感染の可能性について、日南保健所、宮崎市保健所、県立宮崎病院、健康増進課および国立感染症研究所(感染研)と共同で調査を行ったので、その概要を報告する。

症 例

男性、38歳、11月8日～21日にインドネシアに妻と旅行。11月19日22時頃から発熱、関節痛等の症状があった。11月21日朝帰国し、当日、関西空港経由で帰省。宮崎への機内では風邪薬を服用した。宮崎着後、直接、夜間救急センター病院を受診し、発熱39℃、咳症状、咽頭痛あるも、胸部X線検査で肺炎所見は見られず帰宅。同日夜中1:00に意識が朦朧とし県立宮崎病院の救急外来を受診し、インフルエンザの迅速診断キットでは陰性であったが、聞き取り調査で、帰国2,3日前に接触した現地ガイドは咳が持続しており、11月10日にこのガイドの自宅で放し飼いの鶏を捕まえて料理したことが判明した。高病原性鳥インフルエンザの要観察例として対応したが、検査の結果陰性。23日午前2時50分、検査の結果陰性が判明。その後、26日まで発熱継続し不明熱の診断で入院継続、29日に症状改善し退院した。

ウイルス学的検査

インフルエンザウイルス検査：衛生環境研究所(衛環研)では、高病原性鳥インフルエンザ検査マニュアル(2006年6月改定)に従い、インフルエンザType A、H5亜型、H1亜型、H3亜型、H7亜型およびType B遺伝子の検査を行ったが、すべて陰性であった。同時に感染研に検体を搬送し、感染研では、リアルタイムRT-PCR法により、Type A、Type B、H5亜型、H1亜型、H3亜型、H5N1のNA遺伝子の検査を実施し、すべて陰性であった。また、LAMP法によるSARSコロナウイルス遺伝子検出、LAMP法とRT-PCR法によるRSウイルス遺伝子検出結果も陰性であった。これにより、2つの検査機関で同一の結果が出たことから、11月23日午前2時50分にインフルエンザウイルスH5N1による感染は否定され、高病原性鳥インフルエンザ要観察例に対する危機管理体制が解除された。

その他のウイルス検査：インフルエンザウイルスの遺伝子検査に続き、RD-18S、HEp-2、Vero、およびCaCo-2細胞等を用いて原因ウイルスの分離を試みたところ、培養1日後にVero細胞に特徴的な合胞体(syncytium)形成(図1)を示すウイルスが分離された。呼吸器感染症を引き起こし、Vero細胞にsyncytium形成を誘発する病原体として、パラインフルエンザウイルス2型・3型、ムンプスウイルス、ヘルペスウイルス等を疑って同定を試みたが否定された。そこで、分離ウイルスのVero細胞培養上清から抽出したRNAとDNAを感染研に送付し、ウイルス同定を行政検査依頼した。感染研では、新興ウイルス感染症の網羅的検出方法として、Rapid determination system of viral DNA/RNA sequences 1,2) (RDV法)によるウイルス遺伝子同定検査を実施し、オルソレオウイルス属のネルソンベイウイルスグループに分類されるウイルス(Reovirus strain HK23629/07, Melaka orthoreovirus)と極めて類似した遺伝子を検出した。

また、S4セグメントについて、得られた塩基配列情報とネルソンペイウイルスグループで保存されている両末端の配列情報から本分離ウイルス検出用プライマーをデザインし、RT-PCRを行った結果、Reovirus strain HK23629/07とほぼ同配列の遺伝子が検出された。さらに、感染研に送付した分離ウイルスが、電子顕微鏡学的検査（[図2](#)）でレオウイルス様の形態を示すことから、本分離ウイルスは、レオウイルス科、オルソレオウイルス属のネルソンペイオルソレオウイルスグループに分類される新型レオウイルスと同定された。

#### 疫学的調査と血清学的検査

これまでに本ウイルスに日本人が感染した報告はなく、国内への進入も初めてと考えられたため、本ウイルスの水平感染の有無の確認のため、健康増進課および日南と宮崎市保健所により、患者とその家族、患者の入院時に接触した医療関係者および衛環研職員等、計46名の疫学調査を実施した。その結果、患者の家族1名と医療関係者3名が、患者と接触後5日以内に発熱や咽頭痛等の症状を呈していたことが判明した。併せて同意を得て採取された血清について、感染研で中和試験と蛍光抗体法による血清学的検査が行われた結果、患者血清では、回復期中に中和試験、蛍光抗体法により（本ウイルスに対する特異的中和）抗体が検出されたが、他の検体はすべて陰性（検出限界値以下）であった。このことから患者以外の感染は認められなかった。

#### 考 察

今回分離されたウイルスは通常オオコウモリなどに存在し、ヒトへの感染例は過去に2例の報告（論文報告は1例のみ）しかない。Chua KB, *et al.* の報告<sup>3)</sup>では、患者はマレーシアの39歳の男性で、発熱39℃、咳、咽頭痛を呈し、医療機関を受診後しだいに咳症状が強くなり高熱が4日間持続したが、呼吸困難はみられていない。これらの所見は、今回の症例と類似している。報告では、患者が高熱を発症した6日後に子供2人も高熱を示し、ヒト-ヒト感染が強く示唆され、患者と妻と子供2人は血清学的検査でオルソレオウイルスに感染したことが証明されている。遺伝子解析の結果では、患者から分離されたウイルスはオオコウモリから分離されたオルソレオウイルスと極めて類似しており、発症する約1週間前に患者の家にコウモリが侵入していたこと、近隣地域で行った血清疫学調査で、約13%の成人住民にこのウイルスに対する特異的抗体陽性所見が確認されたこと等から、コウモリ由来のレオウイルスがヒトに感染し発症させた事例であると報告している。今回の事例では、コウモリとの接触は確認されておらず、現地ガイドの咳症状の原因や感染源は不明であった。

東南アジア地域から帰国後に急性呼吸器感染症を呈した患者の病原体診断にあたっては、今後の急性呼吸器感染症の診断や治療に役立てるために、高病原性鳥インフルエンザの鑑別診断とともに原因ウイルスを正確に決定し、保健所や医療機関との連携、情報還元・提供することが必要である。



文 献

- 1) Mizutani T, *et al.*, *Emerg Infect Dis* 13(2): 322-324, 2007
- 2) Sakai K, *et al.*, *Arch Virol* 152: 1763-1765, 2007
- 3) Chua KB, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 104(27): 11424-11429, 2007

宮崎県衛生環境研究所

岩切 章 山本正悟 三浦美穂 塩山陽子 河野喜美子 井料田一徳 若松英雄

日南保健所

永石朗子 齊藤皆子 蓑毛真寿美 中村久子 岩本直安

宮崎市保健所

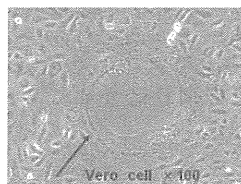
長友大三 園田千草 山田典子 寺園 裕 日高良雄

県立宮崎病院

山中篤志 河野徳明 菊池郁夫 上田 章

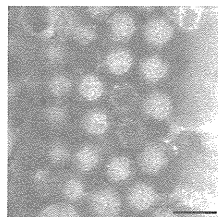
宮崎県健康増進課

図1. 原因ウイルスの分離



特徴的な合胞体 (syncytia) 形成

図2. 電子顕微鏡によるウイルス検査



表面にスパイクを有する直径72~80nmの球状のレオウイルス様粒子を認めた

### Ⅲ. 委託研究報告書