

- Hantavirus N protein. IX International Conference on HFRS HPS & Hantaviruses, Beijing International Convention Center, Beijing, CHINA, June 5–7, 2013
- 25) Sanada T, Ozaki Y, Seto T, Nakao M, Saasa N, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I, Kariwa H : Isolation and Characterization of Hokkaido Virus, Genus Hantavirus. IX International Conference on HFRS HPS & Hantaviruses, Beijing International Convention Center, Beijing, CHINA, June 5–7, 2013
  - 26) Sanada T, Ozaki Y, Seto T, Nakao M, Saasa N, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I, Kariwa H : Isolation and Characterization of Hokkaido Virus, Genus Hantavirus. 15th International Negative Strand Virus Meeting, Granada Conference and Exhibition Centre, Granada, Spain, 16 – 21 June 2013
  - 27) 須田遊人, 谷英樹, 下島昌幸, 堀本泰介, 西條政幸. クリミア・コンゴ出血熱ウイルスのシュードタイプを用いた中和抗体価測定系の構築. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 9 月, 岐阜
  - 28) 須田遊人, 谷英樹, 西條政幸, 堀本泰介, 下島昌幸. シュードタイプウイルスのクリミア・コンゴ出血熱ウイルス中和抗体価測定への応用. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸
  - 29) Petsophonsakul W., Khuernrart W., Pornvisedsirikul S., Srichan M., Jaisuda S., Sripanya T., Khaoplod P., Munepo M., Witunrakul C., Anukul W., and Inoue S. Learning about a case of imported rabies to establish a rabies control area. IMED 2013. 15–18 Feb, 2013. Vienna, Austria.
  - 30) Hoang H.T.T., Okutani A., Inoue S., Pham H.T., Dang A.D., Nguyen T.T., Dang H.N., and Nguyen H.T. Anthrax outbreaks and B.anthraxis isolation in Vietnam, issues of public health. Bacillus ACT 2013: The International Conference on Bacillus anthracis, B.cereus, and B.thuringiensis. 1–5 Sep, 2013. Victoria, Canada.
  - 31) Okutani A., Tungalag K., Tserenorov D., Bazartseren B., Hoang H.T.T., Nguyen H.T., and Inoue S. Novel genotyping by SNPS selected from genome-wide analysis of B.anthraxis isolation in Japan and Mongolia. Bacillus ACT 2013: The International Conference on Bacillus anthracis, B.cereus, and B.thuringiensis. 1–5 Sep, 2013. Victoria, Canada.
  - 32) Petsophonsakul W., Jaisuda S., Yodgomleo A., Srijun M., Phornwisedsirikul S., Munepo M., Atuntee T., Noguchi A., and Inoue S. A Chiang Mai model for the humane management of rabies control at borders between the forest and city. The 4th Rabies in Asia conference: RIACON 2013. 11–13 Sep, 2013. Bangkok, Thailand.
  - 33) Nguyen A.T.K., Nguyen T.T., Noguchi A., Nguyen D.V., Ngo G.C., Thong V.D., Olowokure B., and Inoue S. Survey for bat lyssaviruses in northern Vietnam. The 4th Rabies in Asia conference: RIACON 2013. 11–13 Sep, 2013. Bangkok, Thailand.
  - 34) Park, C.H., Yamada, K., Kojima, D., Hassadin, B., Kimitsuki, K., Inoue, S., Nishizono, A. Pathological Study on the Central Nerve System of ddY Mice Intramuscularly Infected with Street Rabies Virus (1088 Strain). 24th the Rabies in the Americas (RITA). 27–31 Oct, 2013. Toronto, Ontario, Canada.
  - 35) W.E. Marissen, C.E. Rupprecht, J. Ellison, T. Taylor, R. Franka, and B. Quiambao. Analysis of CL184 neutralizing capacity against Philippine rabies virus isolates as part of epidemiological surveillance. 24th the Rabies in the Americas (RITA). 27–31 Oct, 2013. Toronto, Ontario, Canada.

- 36) ゲエン トウイズオン、河原 正浩、加来 義浩、井上 智、長棟 輝行。増殖誘導型キメラ受容体を用いた狂犬病ウイルス核タンパク質に対するイントラボディ選択。第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 18 日-20 日、広島国際会議場、広島県
- 37) 小宮拓巳、山田健太郎、君付和範、井上智、西園 晃、朴 天鎬。狂犬病ウイルス(1088-N4#14)に感染後耐過した ddY マウスの中枢神経系に関する病理学的研究。第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県
- 38) 君付和範、小宮拓巳、井上 智、山田健太郎、西園 晃、朴 天鎬。狂犬病ウイルス(1088-NO)を後肢筋肉内に接種したヌードマウスの中枢神経系および末梢組織病変。第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県
- 39) Nguyen Thi Kieu Anh, Nguyen Vinh Dong, Nguyen Tuyet Thu, Satoshi Inoue, Ngo Chau Giang, Nguyen Thi Hong Hanh, Nguyen Tran Hien. Genetic characterization of rabies virus circulated in Vietnam, 2007- 2012.第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県
- 40) 濱本紀子、飛梅実、加来義浩、宇田晶彦、朴天鎬、野口章、森川茂、井上智。狂犬病ウイルス固定毒(CVS-26 株)で見られる G 蛋白質 204 番目の N 型糖鎖付加は固定毒に特徴的な細胞からの出芽に参与している。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-12 日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県
- 41) 飛梅 実、佐藤由子、長谷川秀樹、濱本紀子、井上 智、野口 章。街上毒狂犬病ウイルスの宿主動物内局在の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-12 日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県
- 42) Yamaoka S, Ito N, Nakagawa K, Okada K, Okadera K, Sugiyama M. Rabies virus phosphoprotein gene functions to facilitate viral neuroinvasion by viral replication in muscle. XV International Conference on Negative Strand Viruses, Granada, Spain (2013. 6)
- 43) 山岡理子、伊藤直人、大岡静衣、金田祥平、中村寛子、岡田和真、岡寺康太、藤井輝夫、杉山誠。狂犬病ウイルスの末梢神経感染機序における P 遺伝子の役割。第 61 回日本ウイルス学会、神戸(2013, 11)
- 44) 岡田和真、伊藤直人、山岡理子、岡寺康太、杉山誠。狂犬病ウイルス P 蛋白質アイソフォーム (P3~P5) は病原性に関与する。第 61 回日本ウイルス学会、神戸(2013, 11)
- 45) Koichi Imaoka. Development of diagnostic methods for brucellosis - Sero-epidemiology of *Brucella canis* infection in dogs in Japan. 10th Japan-Taiwan Symposium on Antibiotics resistance and Foodborne Disease, Tokyo, Sep. 12-13, 2013
- 46) 鈴木道雄, 中藤学, 度会雅久, 木村昌伸, 堀内基広, 長谷耕二, 飛梅実, 阿戸学, 森川茂, 山田章雄, 大野博司, 今岡浩一. *Brucella abortus* は腸管パイエル板からの侵入に M 細胞上のプリオン蛋白質(PrPc) を利用する. 第 155 回日本獣医学会学術集会, 東京, 2013
- 47) 今岡浩一. 犬猫から感染する動物由来感染症について~カブノサイトファーガ・カニモルサス感染症、ブルセラ感染症など~. 厚生労働省平成 25 年度動物由来感染症対策(狂犬病予防を含む)技術研修会 東京 2013
- 48) 佐藤真伍, 武野侍那子, 壁谷英則, 大橋正孝, 大竹正剛, 丸山総一, わが国の鹿における *Bartonella* のベクターの検討. 第 156 回日本獣医学会学術集会(岐阜大学, 2013 年 9 月 21 日).
- 49) 有本千波, 根岸あかね, 佐藤真伍, 壁谷

英則, 辻本 元, 遠藤泰之, 坂田義美, 市川康明, 丸山総一. わが国の猫における *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* および *Chlamydia felis* DNA の検出状況. 第 156 回日本獣医学会学術集会(岐阜大学, 2013 年 9 月 21 日).

50) 藤永洋平, 國吉奏慧, 壁谷英則, 佐藤真伍, 市川康明, 丸山総一. 犬, 猫とその外部寄生虫からの *Rickettsia* および *Bartonella* の検出状況について. 第 156 回日本獣医学会学術集会(岐阜大学, 2013 年 9 月 21 日).

51) 佐藤真伍, 壁谷英則, 重松幸典, 宇根有美, 南 正人, 村田浩一, 小倉 剛, 丸山総一. わが国のマングースおよびハクビシンから分離された *Bartonella henselae* の遺伝子性状解析. 第 13 回 人と動物の共通感染症研究会学術集会(感染研, 2013 年 11 月 2 日)

#### 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

## II. 分担研究報告

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究

ダニ媒介性脳炎の疫学と診断法開発

研究分担者 好井 健太郎 北海道大学大学院獣医学研究科 准教授

研究要旨: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。日本では北海道南部において患者が発生し、またユーラシア大陸広域において、ロシアを中心に年間数千人の患者発生が報告されている。TBEV の診断は血清中の TBEV 特異抗体の検出が有用であり、一般に中和試験が確定診断に使用されるが、危険度の高い生ウイルスを用いる必要がある。そこで本研究では、ウイルスエンベロープ膜蛋白 E をウサギ IgG 抗体の Fc 領域と融合させることで、可溶性が高く、簡便に精製可能な分泌型抗原として発現させた。発現させた蛋白を抗原として、ELISA 法による血清中の抗 TBEV 抗体検出系へと応用した所、中和試験の成績と比較して 90%以上の高い相関性を示した。本 ELISA 法は本研究事業における今後の TBEV の疫学調査による流行地域の検出に有用であると考えられる。

A. 研究目的

ダニ媒介性脳炎(Tick-borne encephalitis: TBE)ウイルスは、フラビウイルス科フラビウイルス属に属し、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の原因ウイルスとして知られ、ヒトに致命的な脳炎を引き起こす。

日本では 1993 年北海道上磯町(現北斗市)において初めて TBE 患者が発生し、その後の疫学調査により患者発生地域に TBE ウイルスの流行巣が存在することを明らかにしてきた。

これまでの所、新たな TBE 患者は発生していない。しかし我々は北海道を中心に継続的な血清疫学調査を行うことによって、道南地域には現在まで 10 年以上にわたってウイルスの

流行巣が存続している事を明らかにしてきた。

さらに近隣の北東アジア諸国においては、TBE 患者は依然多数発生が報告されており、ヒトや野生動物の移動により日本に侵入・流行する可能性も存在しているため、今後も日本を含め、近隣諸国において疫学調査を続ける必要性がある。

TBEV の診断は血清中の TBEV 特異抗体の検出が有用であり、一般に中和試験が確定診断に使用されるが、危険度の高い生ウイルスを用いるため BSL-3 の実験施設が必要とされる。またホルマリン不活化ウイルスを用いた市販の ELISA キットもあるがこちらは他のフラビウイルスとの交差反応を示すという欠点がある。

そこで本研究では、抗原性の高い TBEV のエンベロープ膜蛋白 E を、ウサギ IgG 抗体の Fc 領域と融合させることで、可溶性が高く、簡便に精製可能な分泌型抗原 (E-Fc) として発現させることを試みた。さらに E-Fc を ELISA 用抗原として応用することで、簡便かつ信頼性の高い診断法の開発を試みた。

## B. 研究方法

### 1) E-Fc 蛋白の作製

1995 年に犬の血液より分離された TBEV の Oshima 5-10 株の prM 蛋白及び E 蛋白の細胞外領域 (1-449 アミノ酸) をコードする遺伝子領域を pCAGGS プラスミドにクローニングし、さらに発現蛋白の C 末端領域にウサギ IgG 抗体の Fc 領域が融合するように発現プラスミド ( pCAGprME449-Fc ) を構築した。pCAGprME449-Fc を 293T 細胞にトランスフェクトすることにより、E-Fc を発現させ、培養上清へと分泌させ回収した。

### 2) E-Fc を抗原とした ELISA (E-Fc ELISA) の構築

ELISA 用 96 穴プレートに抗ウサギ IgG 抗体をコーティングし、E-Fc を捕捉した。その後、被験血清を反応させ、被験動物種に対応したペルオキシダーゼ標識 2 次抗体を反応させた。酵素活性を OPD 試薬を用いて測定し、陰性対象との測定値との比を基準に抗体価の判定を行った。

## C. 研究結果

pCAGprME449-Fc をトランスフェクトした 293T 細胞では E-Fc 蛋白が発現し、培養上清

へも十分な量が分泌していることが確認された。また細胞内では E 蛋白に対するシャペロン様活性を持つ prM 蛋白との相互作用も確認され、発現・分泌した E-Fc 蛋白は本来の E 蛋白と同様の性状を保持していることが示唆された。

E-Fc 蛋白を抗原として用いた E-Fc ELISA による抗 TBEV 抗体の検出法への応用を試み、TBEV の感染が疑われた野鼠及びヒトの血清を使用して中和試験との成績との比較を行った。

TBEV 流行巣で捕獲された 66 検体の野鼠血清を調べた所、E-Fc ELISA は中和試験の成績と比較して敏感度 90.6%・特異度 91.2% を示した (表 1)。

また 96 検体の TBE を疑われた患者血清を調べた所、中和試験で TBE と診断された 85 検体の内、83 検体 (97.6%) が E-Fc ELISA により陽性と判定された (表 2)。さらに JE 患者血清 10 検体を用いて交差反応性を調べた所、全て TBE 陰性と判定され、交差反応性は示さなかった。

これらの成績より、今回開発した E-Fc ELISA は TBEV 特異抗体を検出する血清診断において非常に有効であることが示された。

## D. 考察

TBEV の迅速かつ正確な診断は、サーベイランスや適切な治療を行う上で重要である。しかし前述のように、中和試験は特異性が高いが危険度の高い生ウイルスを用いなければならないため、実施可能な施設が限定されること、市販のホルマリン不活化ウイルスを用いた ELISA キットは、簡便で安全ではあるが他のフ

ラビウイルス感染との交差反応を示すという欠点があった。

フラビウイルスの E 蛋白は免疫原性が高く、診断用抗原として有用であることは以前の研究からも示されていたが、分泌した E 蛋白を効率よく精製し、使用するにはこれまで煩雑な作業が必要であった。本研究ではこの点を解決するため、E 蛋白の細胞膜貫通領域を IgG 抗体の Fc 領域に置き換えて、シャペロン様活性を持つ prM 蛋白と共に発現させることで、本来の性状を保ったまま E 蛋白を培養上清に分泌させ、簡便に精製できるようにした。

発現・分泌した E-Fc を使用した ELISA は中和試験の成績と非常に高い相関性を示し、かつ他のフラビウイルス感染との交差反応も示さなかった。TBEV 流行地域の一部には同じフラビウイルスである日本脳炎血清型群のウイルスの流行が報告されている地域もあるため、両者の鑑別にも使用できると考えられる。

#### E. 結論

本年度の研究成果により、安全で簡便かつ信頼性の高い TBEV の診断法を開発することに成功した。今後は本診断法を用いて、近隣諸国における TBEV の流行状況調査を行い、日本への侵入・流行の危険性を精査してく事が重要であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

- 1) Chidumayo, N.N., Yoshii, K., Saasa, N., Sakai, M., Kariwa, H.: Development of a tick-borne encephalitis serodiagnostic ELISA using recombinant Fc-antigen fusion proteins. *Diagn Microbiol Infect Dis*, *In press*
- 2) Sakai, M., Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Hirano, M., Kariwa, H.: The variable region of the 3' untranslated region is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. *J Gen Virol*. Epub ahead of print, 2014
- 3) Hirano, M., Yoshii, K., Sakai, M., Hasebe, R., Ichii, O., Kariwa, H.: Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. *J Gen Virol*, Epub ahead of print, 2014
- 4) Chidumayo, N.N., Yoshii, K., Kariwa, H.: Evaluation of the European tick-borne encephalitis vaccine against Omsk hemorrhagic fever virus. *Microbiol Immunol*, Epub ahead of print, 2013
- 5) Kariwa, H., Murata, R., Totani, M., Yoshii, K., Takashima, I.: Increased Pathogenicity of West Nile Virus (WNV) by Glycosylation of Envelope Protein and Seroprevalence of WNV in Wild Birds in Far Eastern Russia. *Int J Environ Res Public Health*, 10: 7144-7164, 2013
- 6) Yoshii, K., Yanagihara, N., Ishizuka, M., Sakai, M., Kariwa, H.: N-linked glycan in tick-borne encephalitis virus envelope protein affects viral secretion in mammalian cells, but not in tick cells. *J Gen Virol*, 94: 2249-2258, 2013

- 7) Kentaro, Y., Yamazaki, S., Mottate, K., Nagata, N., Seto, T., Sanada, T., Sakai, M., Kariwa, H., 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*, 13: 406-414, 2013
- 8) Yoshii, K., Moritoh, K., Nagata, N., Yokozawa, K., Sakai, M., Sasaki, N., Kariwa, H., Agui, T., 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*, 158: 1039-1046, 2013
- 9) 苅和宏明, 尾崎由佳, 真田崇宏, 池中良徳, 石塚真由美, 坪田敏夫, 好井健太郎, 吉松組子, 有川二郎, 高島郁夫: 日本のげっ歯類におけるハンタウイルス感染の血清疫学調査とエゾヤチネズミが保有する Hokkaido ウイルスの分離. *獣医畜産新報*, 66: 262-264, 2013
- 同定. 第 48 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
- 3) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 苅和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定. 第 48 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
- 4) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 日本ウイルス学会北海道支部第 47 回夏季シンポジウム. 北海道奈井江町. (2013, 7).
- 5) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
- 6) 牧雅大, 真田崇弘, 瀬戸隆弘, 永田典代, 好井健太郎, 苅和宏明. Hantaan ウイルス AA57 株感染マウスにおける病態発現機序の解析. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).

## 2.学会発表

- 1) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 第 48 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
- 2) 好井健太郎, 寸田祐嗣, 五十嵐学, 横澤香菜, 境瑞紀, 苅和宏明, Holbrook, M. R., 高島郁夫. ダニ媒介性フラビウイルスによる中枢神経系病態に関わるウイルス因子の
- 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 苅和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
- 8) 好井健太郎, 寸田祐嗣, 五十嵐学, 横澤香菜, 境瑞紀, 苅和宏明, Holbrook, M. R., 高島郁夫. ダニ媒介性フラビウイルスによる中枢神経系病態における NS5 蛋白の影響の解析. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).

- 9) 下田宙, 早坂大輔, 好井健太郎, 米満研三, 寺田豊, 野口慧多, 鎌田龍星, 高野愛, 前田健. 山口県のイノシシからダニ媒介性脳炎ウイルス様遺伝子の検出. 第 20 回 トガ・フラビ・ペステウイルス研究会. 兵庫県神戸市. (2013, 11)
- 10) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 11) 牧雅大, 真田崇弘, 瀬戸隆弘, 永田典代, 好井健太郎, 苅和宏明. Hantaan ウイルス AA57 株感染マウスにおける病態発現機序の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 12) 好井健太郎, 寸田祐嗣, 五十嵐学, 横澤香菜, 境瑞紀, 苅和宏明, Holbrook, M. R., 高島郁夫. ダニ媒介性フラビウイルスによる中枢神経系病態に関わるウイルス因子の同定. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 13) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 苅和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
3. その他  
なし

#### 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

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

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究

マダニ類からのウイルス由来遺伝子の検出

研究分担者:早坂大輔

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野 助教

研究協力者:角田隆

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野 助教

研究要旨:本研究は日本およびインドシナ地域に存在するマダニ媒介性ウイルスの分布を把握することを目的とし、マダニ媒介性ウイルス遺伝子検出法の確立、各地域でのマダニ採集、マダニからのウイルス遺伝子検出およびウイルス分離を試みた。その結果、1) マダニ媒介性ウイルスである SFTSV の定量 real-time PCR 法によるウイルス遺伝子検出法を確立した。2) SFTSV (NagH2013-1 株)の段階希釈液を用いて遺伝子検出およびウイルス分離を検討したところ、real-time PCR では  $2 \times 10^1$  RNA copies 量以上で遺伝子検出が可能であった。また、Vero E6 細胞への接種では  $2 \times 10^1$  RNA copies 量以上の接種でウイルス増殖が確認できた。一方、IFNAR KO マウス脳内接種では  $2 \times 10^{-1}$  RNA copies 量以上の接種で脳からのウイルス分離が確認できた。3) 長崎県、ベトナムにおいて数種類のマダニを採集した。4) 長崎県で採集したマダニからウイルス検出を試みたが陽性例は確認されなかった。以上の結果から、マダニ媒介性ウイルス検出のための有用な方法を確立し、今後の分布調査の準備を整えた。今後、国内およびインドシナ地域において、マダニを採集しマダニ媒介性ウイルスの分布調査を行う予定である。

A. 研究目的

マダニ媒介性ウイルスには、ダニ媒介性脳炎(TBE)や重症熱性白血球減少症候群(SFTS)、クリミア・コンゴ出血熱(CCHF)など、人や動物の重篤な感染症の原因となるウイルスが知られている。

日本においては、1993年に北海道南部でTBE患者が国内ではじめて確認され、患者発生地区で採集されたヤマトマダニからTBEウイルス(TBEV)が分離されたことにより、流行巢の存在が確認さ

れた。また、2013年に山口県でSFTS患者が国内ではじめて確認され、患者血清からSFTSウイルス(SFTSV)が分離された。その後、西日本各地でSFTS患者が確認され、患者に吸着していたマダニからSFTSVが検出されている。このように、近年日本においてあらたにマダニ媒介性ウイルスによる感染症が報告されている。

また、CCHFはアフリカ大陸、東欧、中近東、中央アジア諸国から中国西部にかけて広く分布しており、人や動物の移動に伴う国内への侵入が危惧

されている。さらに、最近世界各地で新しいマダニ由来ウイルス(ブニヤウイルス科フレボウイルス属やフラビウイルス科フラビウイルス属に分類)が報告されている。

そこで本研究では、日本でこれまで未確認および侵入が危惧されるマダニ媒介性ウイルスについて、国内および周辺諸国における分布状況の把握を目的とし、日本およびアジアに分布するマダニを採集してウイルス遺伝子検出・分離を試みる。本研究成果によりマダニ媒介性ウイルス感染症の予防に関して重要な情報を提供することが期待される。

## B. 研究方法

1) 日本で分離された SFTSV の L セグメントゲノムのポリメラーゼ蛋白領域を増幅するようにプライマーを設計した(SFTS\_QPCR\_965:GCR AGG AGC AAC AAR CAA ACA TC、SFTS\_QPCR\_1069R: GCC TGA GTC GGT CTT GAT GTC、プローブ配列: 5'-/56-FAM/CT CCC RCC C/ZEN/T GGC TAC CAAAGC /3IABkFQ/-3')。Real-time RT-PCR 反応は One Step PrimeScript® RT-PCR kit (TAKARA BIO)を用いて行った。定量評価には、SFTSV L セグメント cDNA をクローニングしたプラスミドベクターから T7 RNA ポリメラーゼ反応により得られた RNA を用いた。

2) SFTSV (NagH2013-1 株)を Vero E6 細胞に感染させ回収した上清をウイルスストック液として用いた。ウイルスストック液を  $2 \times 10^5 - 2 \times 10^2$  RNA copies/ $10 \mu$  となるように段階希釈し、12 well および 24 well プレートで培養した Vero E6 細胞に  $10 \mu$ /well、1 希釈につき 3 well ずつ接種して、5-6

日間培養後上清中の SFTSV を確認した。また、同量を生後 2-3 日の IFNAR KO マウス 2 匹ずつに脳内接種し、マウスの発症、生死を確認した。致死マウスについては脳を採取し SFTSV 感染を確認した。

3) 5 月から 11 月にかけて長崎県各地(長崎市、諫早市、島原市、対馬市、五島市)およびベトナム(カッティエン、カットバ島)でマダニを採集し種類を確認した。

4) 採集したマダニ 1-30 匹を 1 プールにして、ビーズ式細胞破碎装置を用いてホモゲナイズ(4°C、4,500rpm, 15sec)し、遠心後上清を回収した。回収液より Isogen-LS を用いて RNA を抽出し遺伝子検出に用いた。

5) また、回収液を Vero E6 細胞に接種し 5-6 日間培養後、上清をさらに別の Vero E6 細胞に接種、培養しウイルス分離を試みた。ウイルス分離の確認は、上清から RNA を抽出し SFTSV 特異的およびフレボウイルス共通プライマー(Matsuno K, et al. JVI 2013. doi: 10.1128/JVI.02845-12)を用いて Real-time RT-PCR および RT-PCR により確認した。

(倫理面への配慮)

ウイルス感染実験は BSL3 実験室で行い、動物実験は長崎大学における動物実験指針に沿って行った。

## C. 研究結果

1) SFTSV L セグメント特異的 Real-time RT-PCR により、 $10^1$  RNA copies 以上の SFTSV RNA 遺伝子の検出が可能であった。

2) SFTSV 段階希釈液  $10 \mu$  中の SFTSV 遺伝子 RNA を上記 Real-time RT-PCR にて検出した結

果、 $2 \times 10^1$  RNA copies 量以上の希釈液で検出が可能であった。

また、Vero E6 細胞への接種によるウイルス分離では、12 well、24 well プレートともに  $2 \times 10^1$  RNA copies 量以上の接種でウイルス増殖が確認された。また、 $2 \times 10^0$  RNA copies 量接種でも 12 well、24 well プレートともに、3 well 中 1 well でウイルス増殖が確認された。

一方、IFNAR KO マウス脳内接種によるウイルス分離では、 $2 \times 10^{-1}$  RNA copies 量以上の接種でマウスが死に、脳から SFTSV が分離された。

3) 長崎県において約 5000 匹のマダニを採集した。そのうち成虫についてはフタゲチマダニ(70.6%)、タカサゴチマダニ(10.2%)、キチマダニ(0.92%)、ヤマアラシチマダニ(2.23%)、オオトゲチマダニ(0.26%)、タカサゴキラマダニ(0.52%)、その他分類未同定のチマダニ属(15%)およびマダニ属(0.13%)、若虫についてはフタゲチマダニ(36.1%)、タカサゴチマダニ(10.4%)、キチマダニ(0.53%)、ヤマアラシチマダニ(0.61%)、オオトゲチマダニ(1.64%)、タカサゴキラマダニ(3.32%)、その他分類未同定のチマダニ属(47.3%)およびマダニ属(0.08%)が採集された。ベトナムにおいてはイノシシカクマダニ成虫、チマダニ属成虫・若虫、ウシに寄生していたオウシマダニ、イヌに寄生していたクリイロコイタマダニが採集された。

4) 長崎県で採集されたマダニのうち、1684 匹を 487 プールにわけて SFTSV およびフレボウイルス遺伝子検出を試みたがすべて陰性であった。また、Vero E6 細胞に接種後回収した上清中からも SFTSV およびフレボウイルス遺伝子は検出されなかった。

#### D. 考察

1) SFTS 遺伝子の特異的に検出できる Real-time PCR 法を確立した。我々は以前、TBEV 遺伝子の特異的に検出できる Real-time PCR 法も確立している。今後、同様の方法で他のフラビウイルス属、フレボウイルス属の遺伝子を検出できる Real-time PCR 法を確立し、マダニ媒介性ウイルスの遺伝子検出法による調査を行う予定である。

2) SFTS Real-time PCR による遺伝子検出、Vero E6 細胞によるウイルス分離では、ともに  $2 \times 10^1$  RNA copies 量以上のサンプル液からウイルス検出が確認され、同程度の感度であった。また、IFNAR KO マウスの脳内接種では、さらに少ないウイルス量でウイルス分離ができることを確認した。

3) 長崎県の各地において数種類のマダニが採集された。長崎県全体ではフタゲチマダニが最も多く採集されたが、マダニ種の割合は地区によって異なっていた。ベトナムにおいては数種類のマダニが採集されたが、マダニの発生ピークは 2-3 月であると考えられるので今後さらに採集を試みる。

4) 長崎県で採集されたマダニから SFTSV およびフレボウイルスは検出されなかった。SFTS 患者の居住周辺地域で採集したマダニからも SFTSV 検出は確認されなかった。この理由として、野外に生息するマダニにおいて、SFTSV 陽性率が低い、もしくはマダニ中の SFTSV 量が低いことが考えられた。また、Real-time PCR およびウイルス分離において、マダニ抽出物が阻害反応を起こしている可能性も考えられた。今後、より感度の高い IFNAR KO マウスの脳内接種によりウイルス分離を試みる予定である。

## E. 結論

本研究成果によりマダニ媒介性ウイルスの遺伝子検出法、培養細胞またはマウスを用いたウイルス分離法を確立し、マダニからのウイルス検出法の準備が整った。今後、国内およびインドシナ地域(ベトナム)において、さらにマダニを採集し、マダニ媒介性ウイルスの分布調査を行うことで、マダニ媒介性ウイルス感染症の予防に関する重要な情報が得られることが期待される。

## H. 健康危険情報

なし

## I. 研究発表

### 1.論文発表

- 1) Takamatsu Y., Okamoto K., Dinh DT., Yu F., Hayasaka D., Uchida L., Nabeshima T., Buerano C.C., Morita K.: NS1' protein expression facilitates production of Japanese encephalitis virus in avian cells and embryonated chicken eggs. *J. Gen. Virol.* 95(2):373-383. 2014.
- 2) Luat L.X., Ngwe Tun M.M., Buerano C.C., Aoki K., Morita K., Hayasaka D.: Pathologic potential of variant clones of the Oshima strain of Far Eastern subtype tick-borne encephalitis virus. *Trop. Med. Health.* In press.
- 3) Hayasaka D., Shirai K., Aoki K., Nagata N., Simantini D.S., Kitaura K., Takamatsu Y., Gould E., Suzuki R., Morita K.: TNF- $\alpha$  Acts as an Immunoregulator in the Mouse Brain by Reducing the Incidence of Severe Disease

Following Japanese Encephalitis Virus Infection. *PLOS ONE.* 8(8):1-18, 2013.

### 2.学会発表

- 1) 早坂大輔、淵上剛志、森田公一:フラビウイルスの分子イメージング:第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会、湯河原(2013, 5)
- 2) 青木康太郎、早坂大輔、Mya Myat Ngwe Tun、嶋田聡、森田公一:日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の解析:第50回ウイルス学会九州支部総会、長崎(2013, 9)
- 3) 早坂大輔、淵上剛志、森田公一:フラビウイルス脳炎の分子イメージング:第156回日本獣医学会学術集会、岐阜(2013,9)
- 4) 早坂大輔、青木康太郎、Mya Myat Ngwe Tun、嶋田聡、森田公一:日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の解析:第54回日本熱帯医学会大会、長崎(2013, 10)
- 5) 高松由基、森田公一、早坂大輔:マウスモデルにおける日本脳炎ウイルスの高病原性に関わる遺伝子を特定する:第20回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、神戸(2013, 11)
- 6) Mya Myat Ngwe Tun, Kyaw Zin Thant, Shingo Inoue, Takeshi Nabeshima, Kotaro Aoki, Aung Kyaw Kyaw, Tin Myint, Thi Tar, Kay Thwe Thwe Maung, Daisuke Hayasaka, Kouichi Morita : Emergence of Chikungunya virus African genotype in Myanmar:第20回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、神戸(2013, 11)
- 7) 早坂大輔、青木康太郎、Mya Myat Ngwe、嶋

- 田聡、森田公一：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の解析：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸（2013, 11）
- 8) 高松由基、岡本健太、Dihn Tuan Duc、余福勲、早坂大輔、内田玲麻、鍋島武、Corazon C Buerano、森田公一：日本脳炎ウイルスの NS1' タンパク質は、鳥細胞でのウイルス産生を増加させる：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸（2013, 11）
- 9) 白井顕治、北浦一孝、早坂大輔、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：日本脳炎感染マウスの予後に関連する脳内浸潤 T 細胞の質的な違い：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸（2013, 11）
- 10) Mya Myat Ngwe Tun, Daisuke Hayasaka, Kotaro Aoki, Masachika Senba, Kenji Shirai, Ryuji Suzuki, and Kouichi Morita: TNF- $\alpha$  and IL-10 reduce the incidence of mortality in mice following tick-borne encephalitis virus infection: 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸（2013, 11）
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし
1. 特許取得
- なし
2. 実用新案登録
- なし
3. その他
- なし

近隣地域からの侵入が危惧される我が国にない感染症の発生予防に関する研究

ハンタウイルス感染症に関する研究

分担研究者 有川 二郎 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨:近隣地域からの感染げっ歯類を介して侵入が危惧されるハンタウイルス感染症について感染げっ歯類を迅速に診断することを目的とした。本研究では人へ病原性を有するハンタウイルスの3血清型いずれに対しても抗体スクリーニングを行うため、多項目同時検出用イムノクロマトグラフィー(Multiplex ICG)による迅速診断を開発した。また、自然宿主げっ歯類の種の違いによる二次抗体の交差反応性の相違を考慮し、抗マウス IgG 抗体と Protein A の有用性を検討した。また、ハンタウイルスの病原性発現責任遺伝子をハンタウイルス KHF 株とマウスの組み合わせを用いて解析した。

A. 研究目的

ハンタウイルスは、げっ歯類媒介性の人獣共通感染症である、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因ウイルスである。ハンタウイルスのうち、Hantaan (HTNV)、Seoul (SEOV)、Dobrava (DOBV)Thailand (THAIV)および Puumala (PUUV)ウイルスは HFRS の原因となる。また SinNombre virus を始めとするアメリカネズミ亜科のげっ歯類によって媒介されるハンタウイルスは HPS の原因となる。HTNV および SEOV および THAIV および DOBV はネズミ亜科のげっ歯類、そして PUUV はハタネズミ亜科のげっ歯類によって媒介される。これらの他に翼種目およびトガリネズミ目に属するほ乳類によって保有されている病原性不明のハンタウイルスがみついている。これらのハンタウイルス群のウイルスは互いに抗原性が大きく相違し交差反応性が低いことから、病原性ハンタウイルス感染症の血清診断を行うためには少なくとも3種類の

血清型の抗原が必要である。我国には SEOV および PUUV が存在することが明かとなっているが、ロシア、中国、韓国、東南アジア諸国には HTNV, SEOV, THAIV があり、また北米・南米諸国からの輸入症例、げっ歯類の積み荷への混入等についても注意を払う必要がる。

本研究では HFRS および HPS の原因ウイルスを保有する宿主げっ歯類が日本に侵入した場合を想定し、これを迅速に診断するための手段を確立することを目的として、げっ歯類を対象とした多項目同時検出用イムノクロマトグラフィー(Multiplex ICG)の開発を試みた。さらに、ウイルス侵入・感染拡大後の発症を防ぐことを目的として、マウスモデルを用いて、病原性発現のメカニズムを明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

1. 病原性ハンタウイルス感染をスクリーニングするために、抗原として HTNV, PUUV, ANDV の3種類を使用することとした。抗原性の強いウイルス構成タンパクとして核タンパク(N)の N 末端部位 103 アミノ酸を抗原として選択した。これを HTNV, PUUV, ANDV の3種類について大腸菌ベクターを用いて作成した。また、これらの抗原に結合する抗体を迅速に診断するために、ストリップ上に複数の抗原ラインを塗布した、Multiplex ICG を選択した。さらに、それぞれの宿主の免疫グロブリンを検出するために、各種二次抗体および Protein A を比較検討し、最適なストリップを作成することを試みた。SEOV をラットあるいはマウスに接種した実験感染抗血清、HTNV あるいは PUUV をマウスに接種した実験感染抗血清を用いて ICG ストリップの作成と評価を行った。

2. HTNV の KHF 株は成熟したマウスへ静脈内接種すると腎臓に出血を起こす病原性の高い株である。本年度はこの株をクローニングし、病原性を評価することによって、薬物スクリーニングを行う準備を行う。病原性サブクローン株、投与量、濃度の決定を行う。

(倫理面への配慮)マウスへの感染実験については北海道大学動物実験委員会の審査・承認を得て実施した。

### C. 研究結果

1.ヨーロッパ、アジアでは SEOV、HTNV 等のネズミ亜科野げっ歯類およびハタネズミ亜科のげっ歯類の媒介する PUUV とその近縁ウイルスが存在するため、これらのウイルスに対する抗体を検出することが必要である。そこで HTNV, PUUV の抗原を塗布

した Multiplex ICG を作成した。コロイドラベル二次抗体としては、ネズミ亜科げっ歯類の免疫グロブリンと強く反応する抗マウス IgG 二次抗体、抗ラット IgG 二次抗体、およびハタネズミ亜科げっ歯類の免疫グロブリンと強く反応する Protein A を使用したものの3種類を作成した。これらはまず、実験感染血清を用いて評価した。抗ラット二次抗体を使用した場合、SEOV 実験感染ラット血清4例は HTNV 抗原のみに反応した。また HTNV 実験感染マウス血清 2例は Protein A でも抗マウス二次同様の反応を示したが、抗マウス二次抗体の方が強い反応を示した。PUUV 実験感染マウス血清 2例は、ProteinA および抗マウス二次抗体を使用した場合に PUUV 抗原のみに反応した。一方、非感染マウス血清ではいずれの場合もラインは観察されなかった。これらのストリップをベトナム、クロアチア、スリランカ、北海道内の野鼠捕獲現場で試用・評価するために、現在準備を進めている。

2.アフリカ大陸の主要なげっ歯類であるマストミスはネズミ亜科であり、二次抗体抗マウスがある程度応用できることが分かっている。一方で Protein A は有効ではないことも明らかとなった。そのためより強い反応を得るために、抗マストミス二次抗体の作成を行う必要があることが明らかとなった。ザンビア等のアフリカ諸国で有効なスクリーニング ICG の作成を来年度以降試みる。

3. 北米南米大陸には SEOV、および ANDV 関連ウイルスが存在する。これらを検出するために、抗原としては ANDV, HTNV 抗原を塗布したものが必要となる。二次抗体としては抗シカネズミ, Prtein A, 抗コットンラットなどが必要となるが、多様な北米、南米

のげっ歯類をカバーできるかどうか明らかにする必要がある。現在、南北アメリカ大陸用ハンタウイルススクリーニング用 ICG ストリップの準備を進めている。

4.HTNV の KHF 株を成熟したマウスへ静脈内接種し、1000 ウイルス/マウス以上の投与で再現性よく腎臓出血を起こすことができた。クローニングされた株のうち1例が病原性を示さなかったので遺伝子配列を比較したところ、おそらくウイルスエンベロープタンパクをコードするウイルスの M ゲノムが病原性責任遺伝子であることが示唆された。薬物スクリーニングを行う準備として病原性サブクローン株およびその投与量が決定された。

#### D. 考察

ヨーロッパおよびアジアで必要とされる宿主げっ歯類摘発用のハンタウイルス multiplex ICG の試作が完了した。今後、使用例を増やして有用性を評価する必要がある。また、アフリカおよび南北アメリカ大陸についても、二次抗体等の検出用試薬の検討を進めてゆくことが必要である。

#### E. 結論

ハンタウイルスの病原性については未だほとんど明らかになっていない。ハンタウイルス感染症を制御するためには、疫学的な解析をより効率よく行い、さらに病原性解析のためのツールをより多く持つことが必要となる。本研究では Multiplex ICG を用いてウイルス宿主のスクリーニング効率を大幅に上昇させ、さらにマウスモデルを用いた病原性の解析を進めることで、近隣諸国から侵入するおそれのあるハンタウイルス感染症対策を進める。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Amada T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Shimizu K, Koma T, Hayashimoto N, Gamage CD, Nishio S, Takakura A, Arikawa J. 2013. Rapid, whole blood diagnostic test for detecting anti-hantavirus antibody in rats. *J Virol Methods* 193:42-49.

##### 2. 学会発表

- (1) Arikawa J, Amada T, Yoshimatsu K, Hayashimoto N, Koma T, Shimizu K, Gamage CD, Shiokawa K, Nishio S, Ahlm C, Takakura A : Development of an Immunochromatography Strip Test for Detecting Anti-hantavirus Antibody in Rodent and Human Sera by Using an N-terminal Common Antigenic Site of Hantavirus N protein. IX International Conference on HFRS HPS & Hantaviruses, Beijing International Convention Center, Beijing, CHINA, June 5-7, 2013
- (2) Sanada T, Ozaki Y, Seto T, Nakao M, Saasa N, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I, Kariwa H : Isolation and Characterization of Hokkaido Virus, Genus Hantavirus. IX International Conference on HFRS HPS & Hantaviruses, Beijing International Convention Center, Beijing, CHINA, June 5-7, 2013
- (3) Sanada T, Ozaki Y, Seto T, Nakao M, Saasa N, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I, Kariwa H : Isolation and Characterization of Hokkaido Virus, Genus Hantavirus. 15th International Negative Strand Virus Meeting,

Granada Conference and Exhibition Centre, Granada,  
Spain, 16 – 21 June 2013

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)

分担者研究報告書

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究

近隣地域からの侵入が危惧される感染症の病理学的検索

—抗ハンタウイルス抗体の免疫組織化学法における有用性の検討—

分担研究者: 永田典代(国立感染症研究所 感染病理部第二室 室長)

**研究要旨:** Saasa らが作出したハンタウイルスのヌクレオカプシドタンパクに対する 6 種類のモノクローナル抗体 (Saasa *et al.*, 2012) と1つの市販抗体の免疫組織化学法における有用性を検討した。ホルマリン固定パラフィン包埋で作製されたハンターウイルスとプーマウイルス感染動物組織標本を用いて検索した結果、このうちの 3 つの抗体で組織上の両種のウイルス抗原の検出が可能なが判明した。

## A. 研究目的

ブニヤウイルス科ハンタウイルス属は急性呼吸器感染症のハンタウイルス肺症候群あるいは熱性・腎性疾患の腎症候性出血熱を引き起こす。これらはいずれも 4 類感染症に分類され、診断が確定した場合には、感染症法に基づき直ちに届出を行わなければならない。感染症死亡例が発生した場合には、病理解剖で得られる組織における病原体の検出によって病理学的診断が可能となる。本研究では、ハンタウイルス感染症の病理学的診断系の確立を目的とする。今年度は、すでに作出されている抗ハンタウイルス抗体の免疫組織化学法における有用性を検討する。

## B. 研究方法

### 1) 抗ハンタウイルス抗体

いずれもハンタウイルスのヌクレオカプシドタンパクに対する抗体で、Saasa らが作出した 6 種類

のモノクローナル抗体(マウス腹水由来の精製 IgG 1 あるいは IgG2a) (Saasa *et al.*, *Virology* 2012 428:48-57) と1つの市販モノクローナル抗体 A1C5、対照としてすでにホルマリン固定パラフィン包埋組織上の抗原検出が可能であることが判明しているハイブリドーマ細胞上清由来のモノクローナル抗体 E5G6 (Okumura *et al.*, *Clin. Vaccine Immunol.* 2007 14:173-181) およびウサギポリクローナル抗体 NP700 を用いた。

### 2) ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本

本研究には、すでに作出してあった次の10%ホルマリン緩衝液固定パラフィン包埋切片を使用した; 病理番号090640、ハムスター正常肺組織; 病理番号090641、プーマウイルス感染ハムスター肺組織 (Sanada T *et al.*, *Virus Res.* 2011. 160:108-119); 病理番号110329、ハンターウイルス感染マウス肺組織 (Seto T *et al.*, *Virus Res.* 2012.

163:284-90)。

### 3) 免疫組織化学法

ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を脱パラフィン後、ポリマー法による免疫組織化学により抗ハンタウイルス抗体の有用性を評価した。一次抗体として用いた抗ハンタウイルスモノクローナルあるいはポリクローナル抗体(苅和代表研究者より分与)は表に示した。抗原賦活化のために、抗原賦活化剤(pH6.0)(ニチレイ マウスステインキット)中で121°C20分オートクレーブ処理を行った。また、過酸化水素水・メタノールによる内因性ペルオキシダーゼの阻止を室温30分で行った。1次抗体(1 µg/mlに調整)の反応は4°Cで一晩インキュベートとした。その後、マウスステインキット(ニチレイ)を用いてプロトコール通り免疫染色を実施し、ペルオキシダーゼ発色基質としてジアミノベンジジン、核染色にはマイヤーのヘマトキシリンを使用した。

### C. 研究結果

ホルマリン固定パラフィン包埋で作製されたハンタウイルスとプーマウイルス感染動物組織標本を用いて検索した結果、このうちの3つの抗体で組織上の両種のウイルス抗原の検出ができることが判明した(表)。なお、いずれのモノクローナル抗体も Western blotting 法による抗原の検出が可能であった(Saasa *et al.*, *Virology* 2012 428:48-57)。

### D. 考察

ホルマリン固定パラフィン包埋で作製されたハンタウイルスとプーマウイルス感染動物組織標本を用いて検索した結果、このうちの3つの抗体

で組織上の両種のウイルス抗原の検出ができることが判明した。今後は、同じブニヤウイルス科に属する病原性ウイルスや、急性呼吸器感染症の原因となるインフルエンザウイルス、コロナウイルス等との交差反応の有無を評価する必要がある。

### E. 結論

Saasa らが作出した3つの抗ハンタウイルス抗体はホルマリン固定パラフィン組織切片を用いた免疫組織化学法においてハンタウイルスとプーマウイルス抗原を検出することが可能である。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Hayasaka D, Shirai K, Aoki K, Nagata N, Simantini DS, Kitaura K, Takamatsu Y, Gould E, Suzuki R, Morita K. TNF- $\alpha$  acts as an immunoregulator in the mouse brain by reducing the incidence of severe disease following Japanese encephalitis virus infection. *PLoS One*. 2013 8:e71643.
2. Kentaro Y, Yamazaki S, Mottate K, Nagata N, Seto T, Sanada T, Sakai M, Kariwa H, 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*. 2013. 13:406-414.
3. Yoneda M, Georges-Courbot MC, Ikeda F, Ishii M, Nagata N, Jacquot F, Raoul H, Sato H, Kai C. Recombinant measles virus vaccine expressing the