

Nipah virus glycoprotein protects against lethal Nipah virus challenge. PLoS One. 2013. 8:e58414.

4. 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. 2013. 158:1039-1046.

## 2. 学会発表

H. 知的財産権の出願、登録状況  
なし。

表 免疫組織化学法による抗体の有用性の検討結果

整理番号	動物種	一次抗体	使用標本		
			ハムスター	ハムスター	マウス
			正常組織	Puumala virus 感染	Hantaan virus 感染
1	マウス	E5/G6	-	+	+
2	マウス	A1C5 (市販抗体)	-	+	-
3	マウス	G884	-	-	-
4	マウス	7E6	-	+	+
5	マウス	2F11	*	*	*
6	マウス	10G5	-	-	-
7	マウス	9E5	-	-	-
8	マウス	2H10	-	+	+
9	ウサギ	NP700	*	*	*

\*抗原は検出可能だが、非特異反応が強く、判定が困難な場合がある。

CCHF ウイルスの膜蛋白をまとった VSV シュードタイプの作製と  
血清診断への応用に関する研究

研究分担者 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部・部長  
研究協力者 須田遊人 国立感染症研究所ウイルス第一部・協力研究員  
谷英樹 国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官  
下島昌幸 国立感染症研究所ウイルス第一部・第一室長  
唐青 中国 CDC・教授

研究要旨

感染症における抗体疫学調査では、中和抗体測定は診断法の1つに位置付けられている。日本ではクリミア・コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)は感染法により一種病原体に指定されているため、中和抗体測定にはBSL4高度封じ込め施設が必要である。最近私たちはCCHFVの代替としてBSL2施設で取扱い可能なCCHFVシュードタイプを開発した。今年度は本シュードタイプを血清診断に応用できるか否かを、CCHF患者の急性期および回復期の血清を用いて血清中和抗体価の経時変化を調べることにより評価した。CCHF患者の急性期および回復期における中和抗体価の有意な上昇が認められ、本シュードタイプが中和抗体価測定における感染性CCHFVの代替として有用であることが証明された。

A. 研究目的

感染症の実験室診断法の1つに抗体価の測定があるが、抗体測定の方法も酵素抗体法(IgG-ELISA, IgM-capture ELISA), 間接蛍光抗体法(IFA), 中和抗体測定法(NT)など複数ある。この中でNTはウイルス種に対する特異性が高く、また、感度も高いことから血清診断における信頼度の高い検査法の1つである。

クリミア・コンゴ出血熱(Crimean-Congo hemorrhagic fever, CCHF)はCCHFウイルス(CCHFV)による感染症で、アフリカ～中

東～ロシア・中国西部(新疆ウイグル自治区)を含むアジアに幅広く発生が認められる。現在日本においてこの感染症の発生は認められていないが、発生の危険度を予測する方法として国内や近隣国における抗体疫学調査は重要と考えられる。CCHFVの抗体測定法として、私たちはこれまで組換え蛋白質(核蛋白質N)を抗原としたIgG ELISA, IgM-capture ELISA, IFAを確立し中国のCCHF発生の調査に用いてきた(Saijo et al., J Med Virol, 2005; Saijo et al., J Clin Microbiol, 2002)。一方、NTは感染性のあ

るウイルスを必要とし CCHFV は一種病原体であり BSL4 施設でのみ取扱いが可能であることから、日本では BSL4 施設が国立感染症研究所に設置されているにもかかわらず BSL4 施設として稼働されていないので、CCHFV に対する中和抗体測定は不可能である。

私たちは CCHFV の細胞侵入を担う糖蛋白質 GP (CCHFV-GP) を組換え蛋白質として細胞表面に発現させ、CCHFV-GP をウイルス粒子表面にまとった増殖能欠損型の水疱性口炎ウイルス (vesicular stomatitis virus, VSV) のシュードタイプを作製し、CCHFV の感染を BSL2 で定量的に測定できる手法を確立した。GP 蛋白質は CCHFV の唯一のウイルス表面糖蛋白質であることから、回復した CCHF 患者の血清中に存在する中和抗体は本シュードタイプの感染も中和するものと考えられる。

今年度は同一患者の経時血清 (急性期から回復期まで) を用い、確立した CCHFV シュードタイプ (pVSV-CCHFV-GP) に対する中和活性を調べ、CCHFV の中和抗体価測定法に使用される感染性 CCHFV の代替となりうるか否かを検討した。

## B. 研究方法

CCHFV-GP は、IbAr10200 株由来の GP 遺伝子の相補的 DNA (cDNA) を蛋白質発現用プラスミドに挿入し、293T 細胞に形質導入することにより発現させた。

pVSV-CCHFV-GP はレポーターとしてルシフェラーゼを有し、水疱性口炎ウイルス VSV をベースとした増殖能欠損型を用いて作製した (Takada et al., PNAS, 1997)。

患者血清として、中国新疆ウイグル自治

区の CCHF 患者の経時血清 (発熱日を Day 0 とし Day 1, Day 5, Day 9 に採取されたもの) を用いた。組換え N 蛋白質を用いた ELISA により、CCHFV に対する IgG および IgM の上昇が既に確認された血清である (Tang et al., Clin Diagn Lab Immunol, 2003)。

患者血清を最終希釈 1:20 で pVSV-CCHFV-GP と混合し、一定時間後 VeroE6 細胞に接種した。20 時間後、基質を加えて発光度をルミノメーターで測定した。先行研究の成績から、患者血清を加えなかった場合の 39% 以下に発光度が低下した場合を中和抗体陽性と判定した。中和抗体が陽性であった場合は、血清を更に 2 倍階段希釈し中和抗体価を求めた。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントは得られている (Saijo et al., J Med Virol, 2005)。

## C. 研究結果

血清無添加時の pVSV-CCHFV-GP の感染を 100% とした場合、血清添加時 (希釈は 1:20) の感染相対値は経時的に低下しのようになり、Day 5 および Day 9 の血清で中和抗体陽性を示した (図 1)。各血清を更に 2 倍階段希釈し再度抗体価をした結果、中和抗体価も経時的に上昇し、急性期陰性であったものが Day 9 には 160 倍まで上昇した (表 1)。

## D. 考察

本研究に用いられた患者血清 (発症後 Day 1, Day 5, Day 9) は CCHF の急性期から回復期にかけるもので、この間に CCHFV 遺伝子が消滅し組換え N 蛋白質に対する IgG および IgM 抗体価が

上昇することが確かめられているものである (Tang et al., Clin Diagn Lab Immunol, 2003). 回復に伴い, CCHFV に対する中和抗体価も上昇しているであろうことは十分考えられる血清である.

本年度の研究でこの一連の経時血清の pVSV-CCHFV-GP に対する中和抗体価は上昇 (検出限界以下から陽転, 更に上昇) していることが判明した (図 1, 表 1). 感染性 CCHFV を用いて中和抗体を解析していないものの, CCHFV に対する中和抗体価を反映したものであろうことは間違いない. pVSV-CCHFV-GP を用いた中和抗体 (価) 測定法は CCHFV に対する中和抗体 (価) 測定の代替法となりうることが証明された. 本法は CCHF の診断に有用である. また, 血清疫学調査にも有用と考えられる. 本法は“中和抗体”の測定を行うものであるため, 既に確立されている IgG-ELISA, IgM-capture ELISA, IFA に加え, BSL2 で遂行可能な精度の高い実験室診断を可能とし, 日本近隣からの CCHFV の侵入を検出するための特異性の高い優れた検出手法であると考えられる.

#### E. 結論

BSL2 で取り扱い可能な

pVSV-CCHFV-GP が中和抗体価測定の代替法として有用であることが証明された.

#### F. 健康危険情報

特になし

(分担研究報告書には記入せずに, 総括研究報告書にまとめて記入)

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし
2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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

#### 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

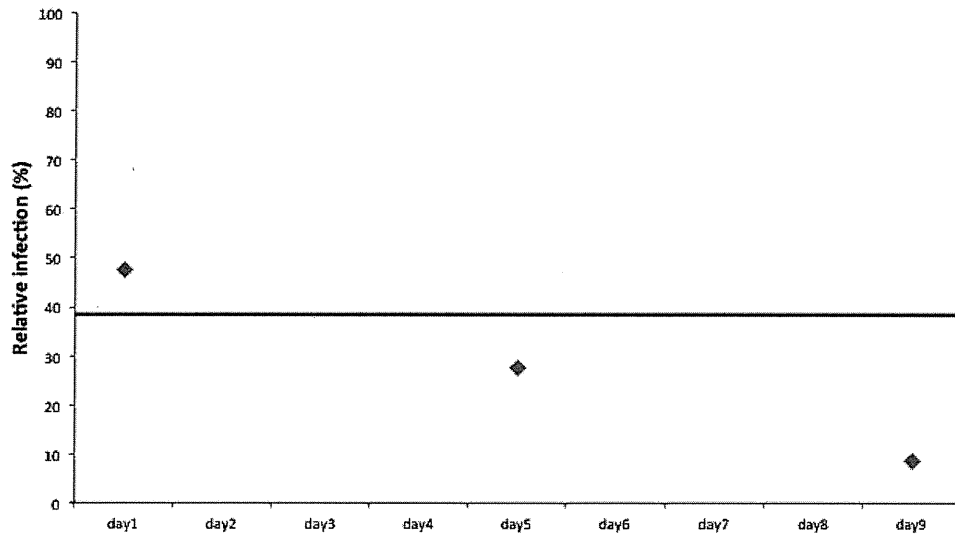


図 1. 患者血清存在下(希釈 1:20)における CCHFV シュードタイプ<sup>1</sup>の感染相対値. 血清無添加時を 100%として算出した. 感染相対値が 39%以下になった場合を中和抗体陽性と判定した.

表 1. 患者血清の CCHFV シュードタイプに対する中和抗体価の推移.

発症後の日数	Day 1	Day 5	Day 9
中和抗体価	<20	80	160

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

（H25-新興一般-007）

狂犬病等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
	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
	加来義浩	国立感染症研究所・獣医科学部
	奥谷晶子	国立感染症研究所・獣医科学部

研究要旨：本研究は、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）等について疫学に関する情報の収集、調査、流行様式の解明、新規検出法開発等を行うことによって、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が目的である。近年、シベリアに生息しているコウモリから新種のリッサウイルスが発見されており北海道に生息しているコウモリの病原体保有状況についても関心が高まっている。今年度は、補殺許可を得ることのできた北海道に生息するモモジロコウモリ (*Myotis macrodactylus*) の脳検体について、38,986種類の病原体検出用プローブを搭載した病原体検出用マイクロアレイによるウイルス由来遺伝子の探索を行った。リッサウイルスの遺伝子は検出されなかったが、Human herpesvirus、Influenza A virus、Bat SARS coronavirus等の遺伝子が検出された。現在、その意義等について検索中である。

A. 研究目的

本研究は、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）等について疫学に関する情報の収集、調査、流行様式の解明、新規検出法開発等を行うことによって、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が目

的である。

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おり、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

コウモリ狂犬病ウイルス(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、近年、シベリアに生息しているコウモリから新種のリッサウイルスが発見されて北海道に生息しているコウモリの病原体保有状況について関心が高まっている。

そこで、今年度は北海道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、補殺許可を得ることのできた北海道に生息するモモジロコウモリ(*Myotis macrodactylus*)について、38,986種類の病原体検出用プローブを搭載した病原体検出用マイクロアレイによるウイルス由来遺伝子の探索を行った。

## 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:北海道オホーツク総合振興局から管内斜里郡斜里町に生息しているモモジロコウモリ(*Myotis macrodactylus*)について学術研究目的での捕獲・補殺許可(鳥獣の捕獲等又は鳥類の卵の採取等許可通知書)を得て許可10頭について補殺を行った。コウモリは安楽殺後に性別、体重、頭胴長、尾長、耳介幅等を記録(表1)して、頭骨を切開しない方法によって採取した脳組織をRNAlater(Life technologies)

の入ったサンプルチューブで保存した。

なお、本研究は捕獲区域で道コウモリの調査を長年行っている専門家を加えた共同研究の一環として行っており、捕獲したモモジロコウモリは普通種であり10頭を捕獲しても生態系に影響が無いことを確認している。

病原体検出用マイクロアレイ:本研究では、ウイルス80属 147種672株、細菌151属276種422株、真菌25属49種59株、古細菌23属30種30株、その他7属7種9株、毒素74遺伝子を標的とした病原体検出用マイクロアレイ(38,986種類のプローブ)を使用しており、このマイクロアレイスライドをMMPDAと呼んでいる(図1)。

ゲノムプロジェクトが終了している又は進行中を含む古細菌30株、原虫9株、細菌422株、ウイルス672株の合計1133株の全長ゲノム配列又は一部の塩基配列は、DDBJ(DNA Data Bank of Japan)又はNCBI(National Center for Biotechnology Information)からダウンロードして、得られた塩基配列をArray Designer 3.01(Premier Biosoft International, Palo Alto, CA)に読み込んでアクセッション No. ごとに10~500種類のセンス鎖マイクロアレイプローブを設計している。プローブの設計時の条件は、60 mer、 $T_m$   $75^\circ\text{C} \pm 5.0^\circ\text{C}$ 、ヘアピンループ( $< -3.0$  kcal/mol)及びセルフダイマー( $< -3.0$  kcal/mol)、そしてクロスホモロジーは極力避けた。総計5万を超える全てのセンス鎖プローブ候補は ProbeMower (Symplus, Tokyo, Japan)を用いてホモロジー検索(B



LAST検索) および結果取得を行い、十分な特異性を持つ19,493種類のセンス鎖プローブを選定し、そのアンチセンス鎖プローブとの合計38,986種類のプローブをマイクロアレイに搭載させている。

また、ハイブリダイゼーションの外部評価用に別途400種類のコントロールスポットを10連でマイクロアレイスライドにプリントした。全てのマイクロアレイスライドはAgilentに生産委託し、44,000プローブ×4アレイ/スライドのレイアウトで作成されている。

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、mini bead-beater (Biospec Products, Bartlesville, OK) を用いて2,500 rpm、20秒間破砕処理を行った。破砕したサンプルは、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、超音波破砕機 (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。

病原体検出用マイクロアレイ解析: 各病原体の蛍光強度が記されたテキストファイルは、Gene Array Utilityソフトウェア (Symplus, Tokyo, Japan) で読み込んだ後、同ソフトで病原体検出解析を行った。本研究において、GenBankアクセスions毎の蛍光強度中央値が、3条件 (①マイクロアレイ全体のバックグラウンド蛍光強度の 2.5倍以上、②p値が 0.001以下、③z値が3.5以上) を満たした場合、該当するGenBankアクセスionsの病原体が陽性と判定した

#### ●コウモリの脳組織採取法

コウモリの専門家の協力を得て開発した頭

骸骨を切開しないで脳を取りだす方法を図2に示した。

## C. 研究結果

### ●コウモリ検体からの病原体遺伝子検出

#### 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; Sympius, 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 62 項目に及ぶデータ中からアクセッション 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ッション 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『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 ( $\alpha$ ) = 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した。

#### MMDPA の解析結果

シグナル平均値が 200 を越えた遺伝子プローブを持つ個体は 10 頭中 7 頭であったが、リッサウイルス属に関係する遺伝子は検出されなかった。

個体 1 : シグナル平均値が 200 を越えた遺伝子プローブは 8 つあり、その 4 つがウイルス遺伝子に対するものであった。シグナル平均値の第 1 位は Human herpesvirus 6B の遺伝子であった。

個体 2 : シグナル平均値が 200 を越えた遺伝子プローブは 2 つあり、いずれもウイルス遺伝子に対するものであった。シグナル平均値の第 1 位は Human herpesvirus 6B の遺伝子であり、第 2 位は Human echovirus 16 strain の遺伝子であった。

個体 3 : シグナル平均値が 200 を越えた遺伝子プローブは 6 つあり、その 2 つがウイルス遺伝子に対するものであった。シグナル平均値の第 1 位は Human herpesvirus 6B の遺伝子であった。

個体 4-6 : シグナル平均値が 200 を越える

遺伝子プローブはなかった。

個体 7 : シグナル平均値が 200 を越えた遺伝子プローブは 2 つあり、いずれもウイルス遺伝子に対するものであった。シグナル平均値の第 1 位は Influenza A virus の遺伝子であり、第 2 位が Human herpesvirus 6B の遺伝子であった。

個体 8 : シグナル平均値が 200 を越えた遺伝子プローブは 55 あり、その 32 つがウイルス遺伝子に対するものであった。シグナル平均値の第 1 位が Human herpesvirus 6B の遺伝子であった。下位ではあるが、第 15 位に Influenza A virus、第 36 位に Reston Ebola virus、第 43 位に Influenza A virus、第 48 位に Influenza A virus、第 49 位に Bat SARS coronavirus、第 51 位に Bat coronavirus が検出された。

個体 9 : シグナル平均値が 200 を越えた遺伝子プローブは 2 つあり、シグナル平均値の第 1 位が Staphylococcus epidermidis の遺伝子であり、第 2 位が Human herpesvirus 6B の遺伝子であった。

個体 10 : シグナル平均値が 200 を越えた遺伝子プローブは 3 つあり、シグナル平均値の第 1 位が Human herpesvirus 6B の遺伝子であり、第 2 位が Bat coronavirus の遺伝子であった。

#### D. 考察

病原体検出用マイクロアレイによってリッサウイルスの遺伝子は検出されなかったが、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ため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は大変有用であると考えられた。

また、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は想定されていない病原体についても検出が可能になるためより網羅的な発生予測・被害推計を行えると考えられた。

今回、捕獲された 10 個体から検出された病原体の遺伝子プローブについては、ウイルス分離等を念頭に置いた詳細な調査が必要ではあるが、異なる個体から頻度高く検出された Human herpesvirus 6B と Influenza A virus がモモジロコウモリに特異的なものであるのか大変に興味深い。特に、個体 8 と 10 で検出された Bat coronavirus についてはコウモリが SARS の感染源宿主であることを示唆する海外論文を考えると大変興味深い成績であった。

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

(Irkutsk) のコウモリからもリッサウイルスが分類されている。

ロシア極東地域におけるコウモリ類は、ロシアの哺乳類動物相の中で最も研究の進んでいない分類群の一つとは言われているが、極東ロシア周辺地域で行われている各種コウモリ捕獲調査の成績を見ると極東に分布するコウモリ類の分布域が北海道にまで広がっている可能性が十分に考えられる(資料1)。また、長距離の季節移動を行うヒメヒナコウモリ (*Vespertilio murinus*) の飛翔距離はヨーロッパでは 1000km を越えており、極東ロシアや北海道周辺でも長距離の移動をしている可能性が示唆されている(資料2)。

## E. 結論

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を明らかにすることは公衆衛生上大変有意義である。

特に、生態が十分に明らかでなく新興感染症(SARS、エボラ出血熱等)の感染源宿主として注目を浴びているコウモリ類に対して病原微生物調査を網羅的に行うことは、わが国に生息するコウモリ類を介した新興感染症の侵入や発生予測・被害推計などを可能にする基礎データ収集の基盤整備につながる

ため、公衆衛生行政における感染症の危機管理対策に大きな波及効果がある。

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考慮するとロシア極東地区と北海道の間で行き来する野生鳥獣等に関する調査はわが国の公衆衛生行政における感染症対策に対して大変に重要であると考えられた。

## J. 健康危険情報

なし

## K. 研究発表

### 1. 論文等発表

- 1) Saito, M., Oshitani, H., Orbina, J.R.C., Tohma, T., de Guzman A.S., Kamigaki, T., Demetria, C.S., Manalo, D.L., Noguchi, A., Inoue, S., Quiambao, B.P. (2013) Genetic Diversity and Geographic Distribution of Genetically Distinct Rabies Viruses in the Philippines. PLoS Ne.Trop.Dis., 7 e2144
- 2) Nguyen, A.T.K., Nguyen, T.T., Noguchi, A., Nguyen, D.V., Ngo, G.C., Thong, V.D., Olowokure, B., Inoue, S. (2014) Bat Lyssaviruses, Northern Vietnam. EID, 20:161-163.
- 3) 佐藤 克、井上 智。狂犬病。特集：ペットからの感染症 13。小児科 (Pediatrics of Japan)。54:89-95、2013

## 2. 学会発表等

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Okutani A., Tungalag K., Tserennorov 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) グエン 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
- 9) 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 マウスの中樞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
- 10) 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樞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
- 11) 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
- 12) 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関与している。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
- 13) 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
- 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

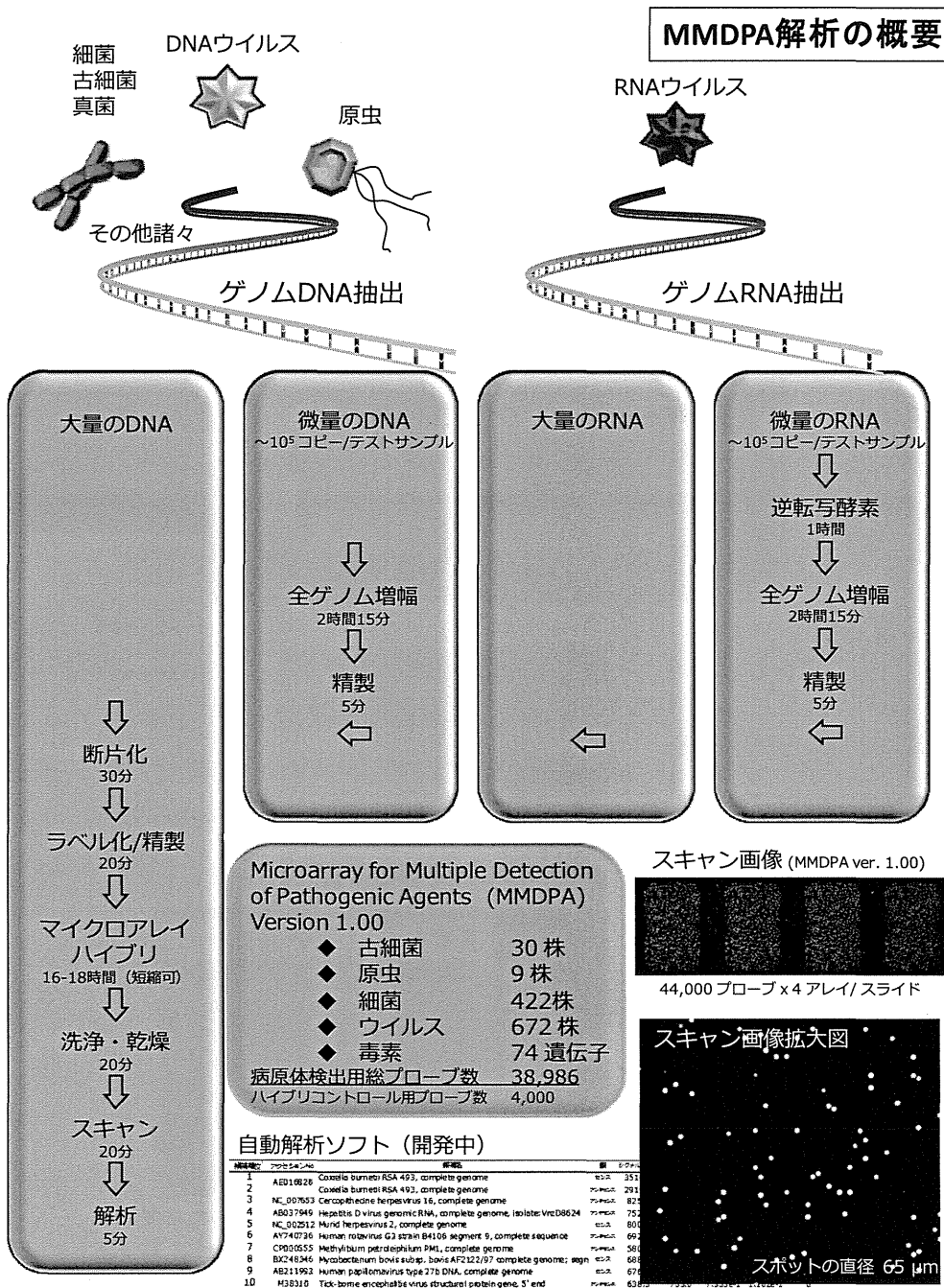
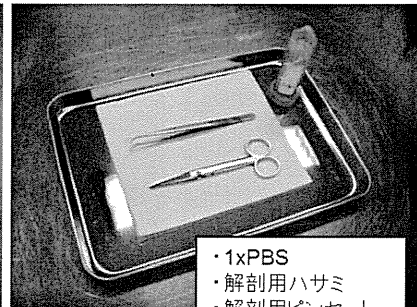


図. 1 MPDA の概要

## 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

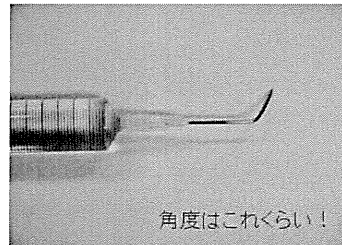


### 手順

① 注射筒に注射針を取り付ける。

② 注射針を折り曲げる。

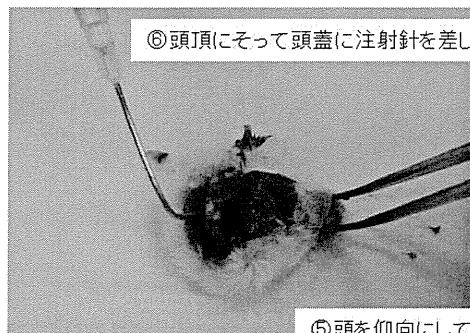
③ 注射筒にPBSを入れる。



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。

⑤ 頭を仰向にして置く

※ 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)。



表1. 北海道斜里郡斜里町で捕獲されたモモジロコウモリ (*Myotis macrodactylus*)

チューブ 番号	標識番号	種名	性別	年齢	前腕長(mm)	体重 (g)	全長	尾長	耳長	耳珠	後足長 (爪有)	後足長 (爪無)	下腿長
1	HK01501	<i>Myotis macrodactylus</i>	M	A	37.36	5.7	88.0	41.0	13.5	8.0	10.0	9.0	16.80
2	HK01502	<i>Myotis macrodactylus</i>	M	A	37.50	7.0	92.0	49.0	16.0	7.0	11.0	10.0	17.39
3	HK01503	<i>Myotis macrodactylus</i>	M	A	38.02	6.5	91.0	39.0	15.0	7.0	11.0	10.0	17.05
4	HK01504	<i>Myotis macrodactylus</i>	M	A	36.96	6.4	89.0	42.0	17.0	7.0	10.0	9.0	17.23
5	HK01505	<i>Myotis macrodactylus</i>	M	A	36.55	6.6	90.0	40.0	17.0	7.0	11.0	10.0	16.32
6	HK01506	<i>Myotis macrodactylus</i>	M	A	37.41	6.8							
7	HK01507	<i>Myotis macrodactylus</i>	M	A	38.06	6.8	92.0	43.0	16.0	7.0	11.0	10.0	17.22
8	HK01508	<i>Myotis macrodactylus</i>	M	A	36.40	6.2	88.0	41.0	14.0	6.0	11.0	10.0	15.47
9	HK01509	<i>Myotis macrodactylus</i>	M	A	37.91	6.6	89.0	42.0	15.0	7.0	11.0	10.0	17.36
10	HK01510	<i>Myotis macrodactylus</i>	M	A	38.47	6.4	87.0	42.0	16.0	7.0	10.0	9.0	17.00

表2a. 病原体検出用マイクロアレイの成績

上界/界	コウモリ検体	定義	シグナル平均値	中央値	p	Z
ウイルス	1	Human herpesvirus 6B, complete genome	6296.0	6296.0	0.e+0	1.373e+2
細菌	1	Salinibacter ruber DSM 13855, complete genome	1387.5	1387.5	0.e+0	3.488e+1
	1	Cupriavidus metallidurans CH34, complete genome	604.0	604.0	0.e+0	1.329e+1
菌類	1	Saccharomyces cerevisiae S288c mitochondrion, complete genome	489.0	489.0	2.22e-16	1.009e+1
細菌	1	Marinobacter aquaeolei VT8, complete genome	421.0	421.0	4.441e-16	8.194e+0
ウイルス	1	Human coxsackievirus A9 genomic RNA, complete genome, strain: Griggs	322.0	322.0	4.441e-16	5.444e+0
ウイルス	1	Meleagrid herpesvirus 1, complete genome	293.0	293.0	2.665e-15	4.637e+0
ウイルス	1	Hepatitis delta virus complete virion genome, strain dFr2627	247.0	247.0	7.994e-15	3.36e+0
ウイルス	2	Human herpesvirus 6B, complete genome	530.0	530.0	0.e+0	5.94e+1
ウイルス	2	Human echovirus 16 strain Harrington complete genome	209.0	209.0	4.441e-16	1.919e+1
ウイルス	3	Human herpesvirus 6B, complete genome	1271.0	1271.0	0.e+0	8.244e+1
菌類	3	Kluyveromyces lactis mitochondrion, complete genome	411.0	411.0	0.e+0	2.521e+1
ウイルス	3	Human papillomavirus type 31 (HPV-31) complete genome	292.0	292.0	0.e+0	1.634e+1
細菌	3	Roseiflexus sp. RS-1, complete genome	236.5	236.5	2.22e-16	1.214e+1
	3	Clostridium perfringens cpe gene	228.0	228.0	0.e+0	1.152e+1
菌類	3	Paracoccidioides brasiliensis mitochondrion, complete genome	209.0	209.0	-8.882e-16	1.006e+1
ウイルス	7	Influenza A virus (A/chicken/Germany/n/1949(H10N7)) segment 4, complete sequence	4248.0	4248.0	0.e+0	1.883e+2
	7	Human herpesvirus 6B, complete genome	210.0	210.0	0.e+0	1.879e+1
ウイルス	8	Human herpesvirus 6B, complete genome	798.0	798.0	0.e+0	3.932e+1
	8	Deer tick virus strain ctb30 polyprotein gene, complete cds	325.0	325.0	2.22e-16	1.331e+1
細菌	8	Apoi virus, genome	319.5	319.5	2.22e-16	1.3e+1
	8	Paracoccus denitrificans PD1222 chromosome 1, complete sequence	317.0	317.0	4.441e-16	1.285e+1
ウイルス	8	Human enterovirus B strain EV11-18744-02 from Moldova polyprotein gene, complete cds	311.0	311.0	-8.882e-16	1.252e+1
細菌	8	Lactobacillus reuteri DSM 20016, complete genome	304.0	304.0	0.e+0	1.213e+1
ウイルス	8	Human rhinovirus 73, complete genome	302.0	302.0	2.22e-16	1.202e+1
細菌	8	Psychromonas ingrahamii 37, complete genome	296.0	296.0	2.22e-16	1.168e+1
毒素	8	Staphylococcus aureus (Wood 46) gene for alpha-toxin	281.0	281.0	0.e+0	1.084e+1
	8	Escherichia coli str. K-12 substr. W3110 strain K-12	263.0	263.0	2.22e-16	9.827e+0
細菌	8	Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome; segment 5/13	261.0	261.0	6.661e-16	9.716e+0
	8	Geobacter uraniireducens Rf4, complete genome	257.0	257.0	4.441e-16	9.488e+0
毒素	8	Vibrio parahaemolyticus tdh gene encoding thermostable direct hemolysin gene, complete cds	256.0	256.0	4.441e-16	9.435e+0
細菌	8	Escherichia coli UT189, complete genome	254.0	254.0	4.441e-16	9.323e+0
ウイルス	8	Influenza A virus (A/Hanoi/1863/2001(H1N1)) genomic RNA, segment 6, complete sequence	249.0	249.0	4.441e-16	9.043e+0
	8	Human astrovirus, complete genome	244.0	244.0	8.882e-16	8.762e+0
細菌	8	Nitrobacter hamburgensis X14, complete genome	242.0	242.0	4.441e-16	8.651e+0
毒素	8	Y.pestis toxin gene	238.0	238.0	4.441e-16	8.424e+0
	8	Classical swine fever virus strain 94.4/IL/94/TWN, complete genome	237.0	237.0	1.11e-15	8.37e+0
菌類	8	Saccharomyces cerevisiae S288c mitochondrion, complete genome	234.0	234.0	4.441e-16	8.2e+0
	8	Black Creek Canal virus M segment	234.0	234.0	1.11e-15	8.2e+0
ウイルス	8	Guanarito virus segment L, complete genome	231.0	231.0	4.441e-16	8.03e+0
	8	Rocio virus strain SPH 34675, complete genome	229.0	229.0	8.882e-16	7.919e+0
	8	Human rhinovirus 6, complete genome	227.0	227.0	1.11e-15	7.807e+0
	8	Human papillomavirus type 28, complete genome	226.0	226.0	6.661e-16	7.754e+0
	8	Enterovirus 5666/sin/002209, complete genome	225.0	225.0	4.441e-16	7.695e+0

表2b. 病原体検出用マイクロアレイの成績

上界/界	コウモリ 検体	定義	シグナル平 均值	中央値	p	Z
細菌	8	Burkholderia xenovorans LB400 chromosome 2, complete sequence	224.0	224.0	1.776e-15	7.641e+0
	8	Campylobacter hominis ATCC BAA-381, complete genome	223.0	223.0	8.882e-16	7.586e+0
ウイルス	8	Foot-and-mouth disease virus - type O strain UKG/128/2001, complete genome	223.0	223.0	4.441e-16	7.582e+0
	8	Semliki forest virus, complete genome	223.0	223.0	1.332e-15	7.585e+0
細菌 菌類	8	Mycobacterium sp. JLS, complete genome	219.0	219.0	1.776e-15	7.358e+0
	8	Hanseniaspora uvarum mitochondrion, complete genome	219.0	219.0	4.441e-16	7.357e+0
細菌	8	Borrelia burgdorferi B31, complete genome	219.0	219.0	8.882e-16	7.358e+0
	8	Ralstonia eutropha JMP134 chromosome 2, complete sequence	218.0	218.0	2.22e-15	7.301e+0
ウイルス	8	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus, complete genome	217.0	217.0	1.332e-15	7.247e+0
	8	Reston Ebola virus glycoprotein (GP) gene, complete cds	216.0	216.0	8.882e-16	7.189e+0
細菌	8	Desulfovibrio vulgaris DP4, complete genome	216.0	216.0	8.882e-16	7.19e+0
	8	Human parainfluenza virus 3, complete genome	215.0	215.0	2.887e-15	7.131e+0
ウイルス	8	Ovine adenovirus D, complete genome	215.0	215.0	1.998e-15	7.134e+0
	8	Human coxsackievirus A20 strain IH Pool 35, complete genome	215.0	215.0	2.22e-15	7.133e+0
	8	Human enterovirus 85 strain BAN00-10353, complete genome	215.0	215.0	2.887e-15	7.134e+0
	8	Dengue virus 1, complete genome	214.5	214.5	2.22e-15	7.107e+0
	8	Influenza A virus (A/black-headed gull/Sweden/5/99(H1 6N3)) hemagglutinin (HA) gene, complete cds	213.0	213.0	8.882e-16	7.021e+0
細菌	8	Human papillomavirus type 7, complete genome	212.5	212.5	1.332e-15	6.993e+0
	8	Echovirus 5, complete genome	212.0	212.0	6.661e-16	6.964e+0
	8	Herminiimonas arsenicoxydans chromosome, complete sequence	211.5	211.5	1.998e-15	6.934e+0
	8	Rhodospirillum rubrum SH1 complete genome; segment 10/24	211.0	211.0	1.332e-15	6.91e+0
	8	Influenza A virus (A/chicken/Yokohama/ac55/2001(H9N2)) HA gene for hemagglutinin, complete cds	211.0	211.0	6.661e-16	6.909e+0
ウイルス	8	Bat SARS coronavirus Rf1, complete genome	210.0	210.0	8.882e-16	6.852e+0
	8	Bordetella parapertussis strain 12822, complete genome; segment 4/14	209.5	209.5	1.998e-15	6.828e+0
細菌	8	Bat coronavirus (BtCoV/512/2005) ORF1, spike protein, putative ORF3, envelope protein, matrix protein, and nucleocapsid protein genes, complete cds	208.0	208.0	1.332e-15	6.739e+0
	8	Human papillomavirus type 34, complete genome	203.5	203.5	1.332e-15	6.487e+0
	8	Human herpesvirus 2, complete genome	203.5	203.5	1.776e-15	6.489e+0
ウイルス	8	Human rhinovirus 55, complete genome	202.5	202.5	3.109e-15	6.438e+0
	8	Acidiphilium cryptum JF-5, complete genome	202.0	202.0	1.776e-15	6.404e+0
細菌	9	Staphylococcus epidermidis ATCC 12228, complete genome	450.0	450.0	4.441e-16	3.146e+1
ウイルス	9	Human herpesvirus 6B, complete genome	234.0	234.0	4.441e-16	1.295e+1
ウイルス	10	Human herpesvirus 6B, complete genome	1713.0	1713.0	0.e+0	2.08e+1
	10	Bat coronavirus HKU5-1, complete genome	626.0	626.0	1.554e-15	3.925e+0
細菌	10	Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482, complete genome	581.0	581.0	3.331e-15	3.23e+0

狂犬病ウイルスの末梢感染性における P 遺伝子機能に関する研究

分担研究者: 伊藤直人 岐阜大学応用生物科学部・准教授

研究要旨: 以前、末梢感染性の異なる狂犬病ウイルス固定毒 2 株(西ヶ原株及び Ni-CE 株)とこれらのキメラウイルスを解析し、ウイルス P 遺伝子が末梢感染性の決定に重要な役割を果たすことを明らかにした。その後、P 蛋白質が筋肉細胞におけるウイルスの増殖を支持し、結果として末梢神経のウイルス感染を促進する機能を有していることを強く示唆するデータを得た。そこで本年度は、その詳細な機序の解明をめざし、さらなる検討を行った。マウス運動神経細胞の分離培養系を用いた解析により、いずれの株も、その末梢感染性の違いにかかわらず、軸索末端から神経細胞に感染する能力を有していることが判明した。すなわち、末梢神経への感染効率ではなく、むしろ筋肉細胞におけるウイルス増殖が上記ウイルス株の末梢感染性の違いに関与することが示唆された。さらに、インターフェロン(IFN)拮抗蛋白質として知られる P 蛋白質の機能に着目し、感染筋肉細胞における IFN 関連遺伝子の発現量を調べた。その結果、末梢感染性の高い西ヶ原株の P 遺伝子が IFN 関連遺伝子の発現を抑制する機能を有しているのに対し、末梢感染性の低い Ni-CE 株の P 遺伝子ではこの機能が減弱していることが確認された。以上より、狂犬病ウイルスの末梢感染性には、筋肉細胞における IFN 系の回避が重要であることが示唆された。

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侵入は狂犬病の病態発現に必須の過程である。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とは対照的に、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。

以前、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