

II. 分担研究報告

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

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、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., Sundén, 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).
- 7) 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).

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
- 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・ペスチウイルス研究会. 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 ウィルス 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).
- 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

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 2×10^1 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 2×10^1 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 2×10^{-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、流行帯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 (SFTSV_QPCR_965:GCR AGG AGC AAC AAR CAA ACA TC、SFTSV_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 2×10^5 - 2×10^2 RNA copies/10 μ l 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 μ l/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、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 μ l 中の SFTSV 遺伝子 RNA を上記 Real-time RT-PCR にて検出した結果、 2×10^1 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 2×10^1 RNA copies 量以上の接種でウイルス増殖が確認された。また、 2×10^0 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、 2×10^{-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トゲチマダニ(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トゲチマダニ(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 2×10^1 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ト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- α 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- 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

厚生科学研究費補助金(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揮責任遺伝子をハンターウイルス 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ことが判明した。

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(荻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 20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 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- 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 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 正常組織	ハムスター Puumala virus 感染	マウス 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。

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

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)は感染症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

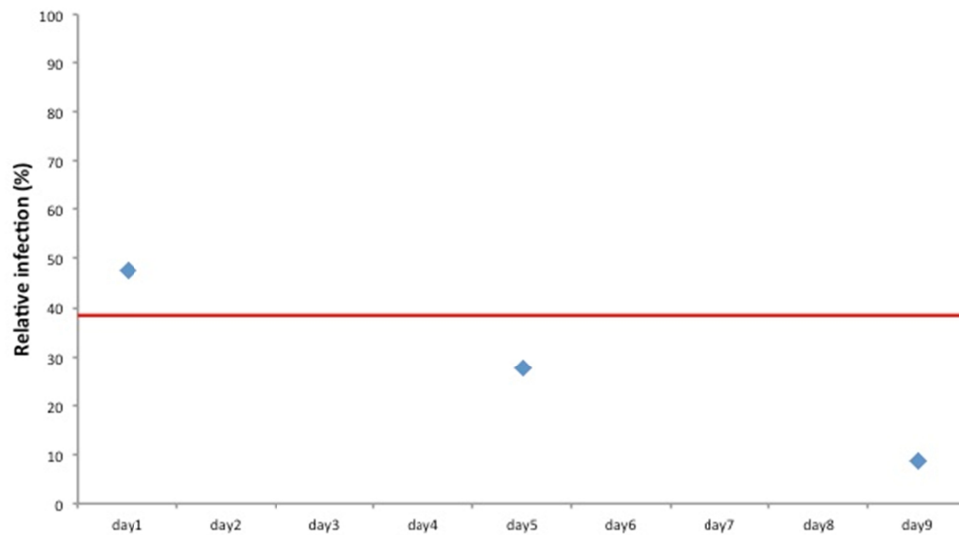


図 1. 患者血清存在下(希釈 1:20)における CCHFV シュードタイプの感染相対値. 血清無添加時を 100%として算出した. 感染相対値が 39%以下になった場合を中和抗体陽性と判定した.

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

（ H 2 5 - 新 興 - 一 般 - 0 0 7 ）

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こす狂犬病ウイルス(ラブドウイルス科リッサウイルス属)を原因とするウイルス性疾病である。

わが国では、1970年と2006年に経験したヒトの輸入狂犬病3症例を除いて50年以上に渡って狂犬病は国内で発生していないが、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(BLAST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秒間破碎処理を行った。破碎したサンプルは、SepaGene (SankoJunyaku Co., Tokyo, Japan)を用いてDNA及びRNAを含む核酸溶液を抽出した。抽出したサンプルから核酸10 µgを新しいチューブへ移し、超音波破碎機(Bioraptor UCD-250, Cosmobio,)で断片化処理(4 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 18時間ハイブリさせ、50 0.5%SDSを含む 6× SSC 5分間、50 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アクセッション毎の蛍光強度中央値が、3条件(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、 p値が0.001以下、 z値が3.5以上)を満たした場合、該当するGenBankアクセッション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出す方法を図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; Symplus, Tokyo, Japan) に読み込み各種解析を行った。以下に簡単な解析手順を記す。データテキストファイルに含まれる 38,986 病原体検出プローブ由来スポットの 62 項目に及ぶデータ中からアクセス 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ス No. 毎にまとめ、さらにセンズ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 (α) = 0.001【0.1%の確率で偶然有意差があると判定される水準】で p 値を算出した。算出された p 値は帰無仮説【母集団の分散状態に差は無いと言う仮説】が棄却可能か、つまり対立

仮説【母集団の分散状態に差は有ると言う仮説】が成立するかを検証した。同時に z 値も、同様の水準である限界値 = 3.09 に設定し帰無仮説【母集団の平均値が等しい】が棄却できるか、つまり対立仮説【母集団の平均値が等しくない】が成立するか検証した。p 値は 0.001 よりも小さい値であるとき、Z 値は 3.09 より大きい値であったとき帰無仮説が棄却できるした。

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關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., Phornvisedsirikul 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

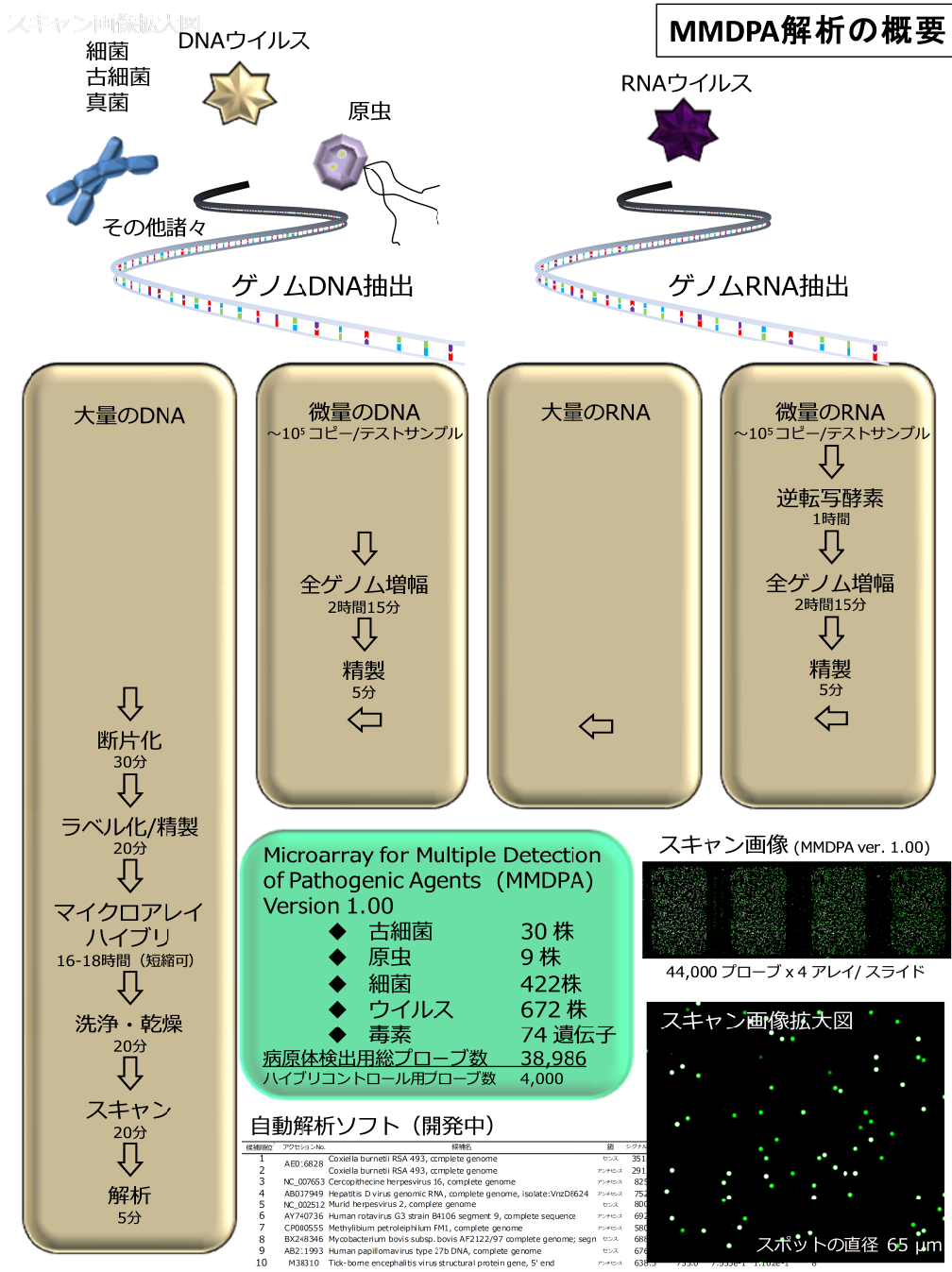


図.1 MPDA の概要

図2 頭骸骨を破壊しないで脳組

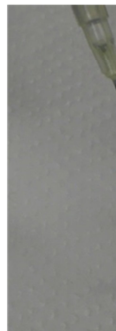
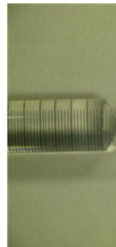
準備する物

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



手順

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



※ PBSを注入する時に、頭部をビニール袋等に
組織の飛散を止める(安全キャビネット中での注

表1. 北海道斜里郡斜里町で捕獲されたモモジロコ

チューブ 番号	標識番号	種名	性別	齢	前腕長(mm)	体重 (g)
1	HK01501	Myotis macrodactylus	M	A	37.36	5.7
2	HK01502	Myotis macrodactylus	M	A	37.50	7.0
3	HK01503	Myotis macrodactylus	M	A	38.02	6.5
4	HK01504	Myotis macrodactylus	M	A	36.96	6.4
5	HK01505	Myotis macrodactylus	M	A	36.55	6.6
6	HK01506	Myotis macrodactylus	M	A	37.41	6.8
7	HK01507	Myotis macrodactylus	M	A	38.06	6.8
8	HK01508	Myotis macrodactylus	M	A	36.40	6.2
9	HK01509	Myotis macrodactylus	M	A	37.91	6.6
10	HK01510	Myotis macrodactylus	M	A	38.47	6.4

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
毒素	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	8	Mycobacterium sp. JLS, complete genome	219.0	219.0	1.776e-15	7.358e+0
菌類	8	Hanseniaspora uvarum mitochondrion, complete genome	219.0	219.0	4.441e-16	7.357e+0
	8	Borrelia burgdorferi B31, complete genome	219.0	219.0	8.882e-16	7.358e+0
細菌	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
	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
ウイルス	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(H16N3)) hemagglutinin (HA) gene, complete cds	213.0	213.0	8.882e-16	7.021e+0
	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
細菌	8	Herminiimonas arsenicoxydans chromosome, complete sequence	211.5	211.5	1.998e-15	6.934e+0
	8	Rhodopirellula baltica SH1 complete genome; segment 10/24	211.0	211.0	1.332e-15	6.91e+0
ウイルス	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
	8	Bat SARS coronavirus Rf1, complete genome	210.0	210.0	8.882e-16	6.852e+0
細菌	8	Bordetella parapertussis strain 12822, complete genome; segment 4/14	209.5	209.5	1.998e-15	6.828e+0
ウイルス	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
	8	Human rhinovirus 55, complete genome	202.5	202.5	3.109e-15	6.438e+0
細菌	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

原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いに主にウイルス P 遺伝子が関連することが判明した(図 1)。さらに、マウスを用いた検討により、筋肉内接種後、西ヶ原株及び CE(NiP)株が Ni-CE 株よりも効率よく末梢神経に感染することが判明した。さらに、*in vivo* 及び *in vitro* 実験系の両者において、西ヶ原株及び CE(NiP)株が Ni-CE 株よりも効率よく筋肉細胞で増殖することが確認された。すなわち、西ヶ原株の 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が強く示唆された。

そこで本年度は、より詳細な機序の解明を目的として、マウス運動神経細胞の分離培養系(細胞体と軸索末端を別々の区画で培養した初代神経細胞)を用いて、神経軸索末端からの CE(NiP)株及び Ni-CE 株の感染能を比較した。さらに、IFN 拮抗蛋白質として知られる P 蛋白質の機能(Brzózka et al. J Virol. 2005 他)に着目し、西ヶ原株、CE(NiP)株及び Ni-CE 株の感染筋肉細胞における IFN 関連遺伝子の発現量を比較した。

B. 研究方法

マウス運動神経細胞の分離培養系は、以下のように作製した。まず、ICR マウスの子宮より摘出した 13 日目胚から脊髄を採取し、背根部を除去したものをトリプシン処理することで運動神経細胞を得た。これらの神経細胞を、ポリジメチルシロキサンを用いて作製したマイクロ流体プラットフォーム(図 2)の細胞体側の太流路内に播種した。細胞体側のウェルには 120 μ l/ウェル、軸索末端側のウェルには 140 μ l/ウェルの培養液を満たし(軸索末端側の培養液が細胞体側に逆流

しないことを予め確認)、CO₂ インキュベーター内で細胞を培養した。培養 5 日目に細流路に入り込んだ軸索が、その末端を反対側の太流路内に伸長していることを確認した後に、以下の実験に使用した。

CE(NiP)株及び Ni-CE 株の軸索末端からの感染能を比較する目的で、上記の方法で作製した分離培養系の軸索末端側のウェルに 1×10^6 FFU の GFP 遺伝子組換え CE(NiP)株あるいは Ni-CE 株 [それぞれ CE(NiP)-GFP 株、Ni-CE-GFP 株] を接種した。ウイルス接種 24、36 および 48 時間後に、蛍光顕微鏡下で神経細胞体における GFP シグナルを観察し、撮影した。撮影された画像に基づき、細胞体側の太流路における GFP 陽性細胞の割合を算出した。

西ヶ原株、CE(NiP)株及び Ni-CE 株に感染した筋肉細胞における IFN 関連遺伝子の発現量を比較する目的で、マウス骨格筋由来 G-8 細胞及び C2C12 細胞に各株を moi=1 にて接種した。接種 24 時間後に、感染細胞から RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いた逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型として、リアルタイム PCR 法 (TaqMan 法)により各種 IFN 関連遺伝子 (*Irf1*、*Mx1* 及び *Oas1*) の定量を行った。なお、*Gapdh* 遺伝子についても定量を行い、内在性コントロールとして使用した。1 条件あたり 3 ウェルの細胞を用いて実施し、*Gapdh* 遺伝子に対する各々の遺伝子の相対発現量の平均値及び標準誤差を算出した。

(倫理面からの配慮について)

マウス運動神経分離培養系の作出のための動物実験は岐阜大学動物実験委員会によって承

認められた。(動物実験承認番号:12090)。GFP 遺伝子組換えウイルスを用いた実験は、文部科学大臣の確認後に実施している(22 受文科振第 2170 号)。また、本実験は、岐阜大学組換え DNA 安全委員会の承認を得ている(22 岐大術産 第 7 号の 30)。

C. 研究結果

軸索末端からの神経細胞へのウイルス感染能を検討する目的で、Ni-CE-GFP 株または CE(NiP)-GFP 株を神経細胞の軸索末端に接種し、GFP シグナルを観察した。その結果、いずれの株を接種した神経細胞においても、その細胞体で明瞭な GFP シグナルが観察された(図 3A)。GFP 陽性細胞の割合は、いずれの株においても、最初に GFP シグナルが確認された接種後 24 時間以降、経時的に増加した(図 3B)。以上より、Ni-CE 株は CE(NiP)株と同様、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示され、その能力に顕著な差がないことが示唆された。

西ヶ原株及び CE(NiP)株感染 G-8 細胞における *lfn-* 遺伝子の発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低く($p<0.05$)、それぞれ約 1/47 及び 1/10 であった(図 4A)。また、各株感染 C2C12 細胞における *lfn-* 遺伝子の発現量についても同様に、西ヶ原株及び CE(NiP)株感染細胞における発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低かった($p<0.05$) (図 4B)。以上より、西ヶ原株及び CE(NiP)株は、感染筋肉細胞において、Ni-CE 株よりも効率良く IFN 産生を抑制することが示された。

西ヶ原株及び CE(NiP)株を感染させた G-8 細胞における *Mx1* 遺伝子の発現量は、Ni-CE 株感

染細胞に比べて有意に低く($p<0.05$)、それぞれ約 1/74 及び 1/14 であった(図 5A)。また、各株感染 G-8 細胞における *Oas1* 遺伝子発現量についても同様に、西ヶ原株及び CE(NiP)株感染細胞における発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低かった($p<0.05$) (図 5B)。以上より、西ヶ原株及び CE(NiP)株は、感染筋肉細胞において、Ni-CE 株よりも効率良く IFN 誘導遺伝子の発現を抑制することが示された。

D. 考察

以前、強い末梢感染性を有する西ヶ原株及び CE(NiP)株が、弱い末梢感染性を有する Ni-CE 株よりも効率よく筋肉細胞で増殖することを示した。このことは、西ヶ原株 P 蛋白質が筋肉細胞におけるウイルス増殖に重要であることを示すと同時に、そのウイルス増殖が末梢神経の感染を成立させる上で重要な役割を担っていることを示唆している。

一方で、西ヶ原株 P 蛋白質が軸索末端からのウイルス感染を直接的に促進している可能性も挙げられる。しかし、狂犬病ウイルスの粒子構造、ならびに末梢神経への本ウイルスの侵入及び軸索輸送の機序を考慮した場合、この可能性は極めて低いことが予想された。すなわち、狂犬病ウイルス P 蛋白質は、ヌクレオカプシドの構成要素としてウイルス粒子の内部に位置している。一方、狂犬病ウイルスはヌクレオカプシドではなくウイルス粒子として軸索輸送される(Klingen et al., J. Virol. 2008)。理論上、軸索末端からのウイルスの侵入及び軸索輸送の過程で、P 蛋白質がウイルス粒子の外側に露出されることはないと考えられるため、上記の過程において P 蛋白質が末梢

神経の感染に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

この点を実験的に検証するため、本研究では、マウス運動神経細胞の分離培養系を用いて、CE(NiP)株及び Ni-CE 株の軸索末端からの感染能力を比較した。その結果、上記の予想と一致して、両株とも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確認された(図 3)。以上より、西ヶ原株 P 蛋白質が軸索末端からの神経細胞の感染を直接的に促進しているのではなく、筋肉におけるウイルス増殖を促進した結果、間接的に末梢神経の感染効率を高めていることが強く示唆された。

本研究により、西ヶ原株及び CE(NiP)株に感染した培養筋肉細胞では、Ni-CE 株感染細胞よりも *Ifn-* 遺伝子の発現量が低いことが明らかとなった(図 4)。これと一致して、IFN によって発現誘導されることが知られる *Mx1* 及び *Oas1* 遺伝子でも同様の結果が得られた(図 5)。狂犬病ウイルスの P 蛋白質は、IRF-3 のリン酸化を阻害することにより IFN の誘導を阻害することが知られていることから(Brzózka et al. J Virol. 2005)、西ヶ原株 P 蛋白質とは対照的に、Ni-CE 株 P 蛋白質が筋肉における IRF-3 阻害能を欠落している可能性が考えられた。

E. 結論

以上の成績により、狂犬病ウイルス(西ヶ原株)の P 蛋白質は、その IFN 拮抗作用を介して、筋肉細胞でのウイルス増殖を支持し、結果として末梢神経の感染効率を高めていることが強く示唆された。

L. 健康危険情報
該当なし

M. 研究発表

1.論文発表

Yamaoka S, Ito N, Ohka S, Kaneda S, Nakamura H, Agari T, Masatani T, Nakagawa K, Okada K, Okadera K, Mitake H, Fujii T, Sugiyama M. Involvement of the rabies virus phosphoprotein gene in neuroinvasiveness. J. Virol. 2013. 87:12327-12338.

2.学会発表

11) 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)

12) 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)

13) 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)

2. 実用新案登録
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. その他

1. 特許取得
なし

なし

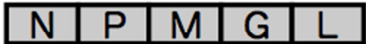


ウイルス株	ゲノム構成	末梢感染性
西ヶ原		++
Ni-CE		-
CE(NiP)		+

図1. 本研究で使用したウイルス株

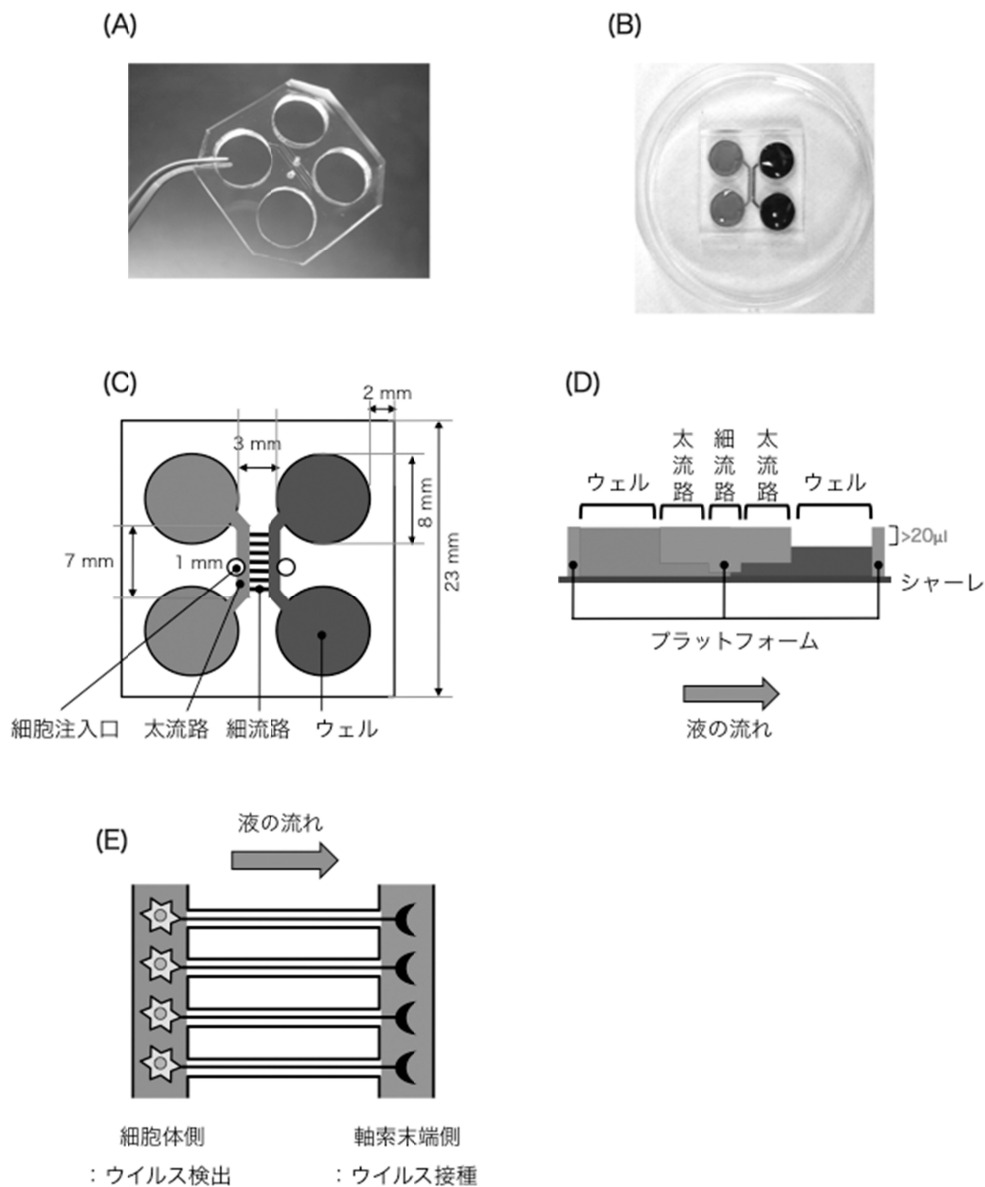


図2 神経細胞分離培養系マイクロ流体システムの外観及び模式図

(A) マイクロ流体システムに用いたプラットフォーム。(B) マイクロ流体システムの上からの外観。ウェルには、赤色または青色の色素液を満した。(C) プラットフォームの模式図。(D) マイクロ流体システムの断面の模式図。両側ウェル間において $20\mu\text{l}$ 以上の液量差が存在すれば、液の移動は静水圧により厳密に制御可能であることを確認した。(E) プラットフォームに播種された神経細胞の模式図。左側の太流路内に播種された細胞は、その軸索末端を反対側の太流路内へと伸長する。

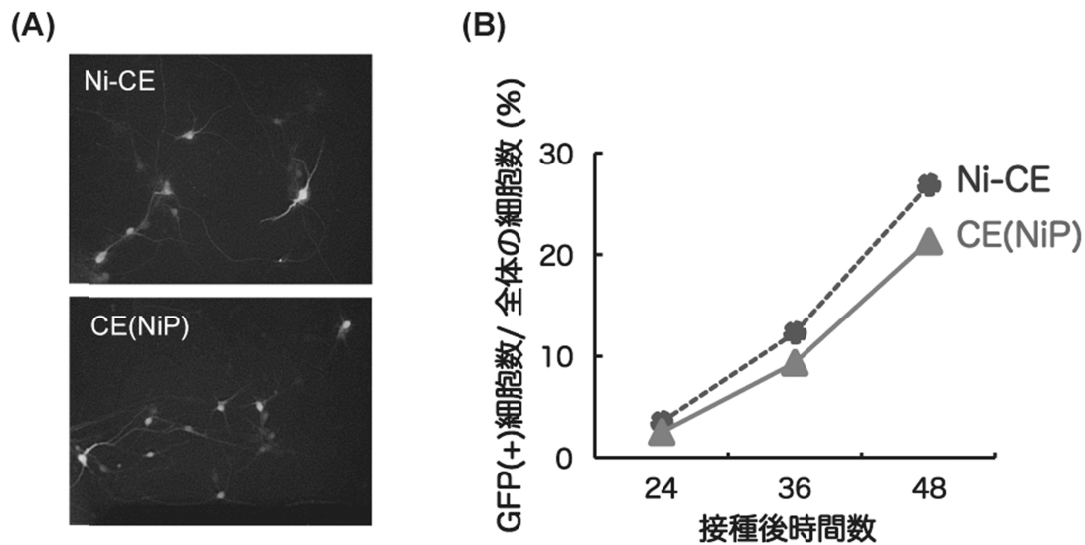


図 3. マウス運動神経細胞の分離培養系を用いた軸索末端からの感染能の比較

(A) 接種後 48 時間において細胞体に確認された GFP シグナル
 (B) GFP 陽性細胞の割合の経時的変化

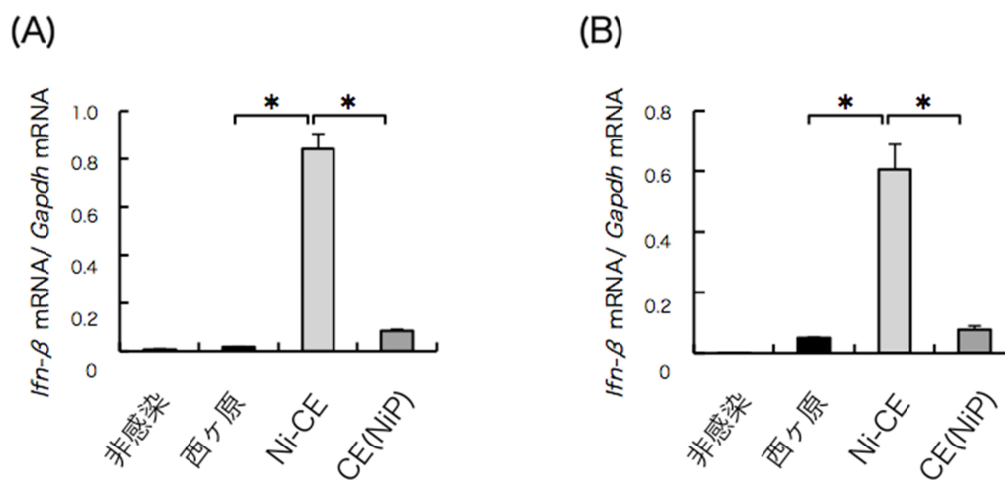
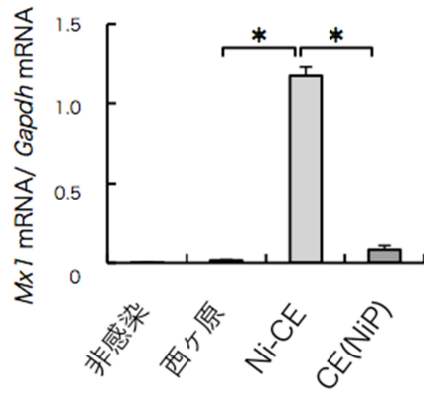


図4 各株を接種した培養筋肉細胞における *Ifn-β* 遺伝子の発現量

(A) G-8細胞、(B) C2C12細胞に西ヶ原株、Ni-CE株またはCE(NiP)株をMOI=1で接種し、接種24時間後に感染細胞における *Ifn-β* 遺伝子発現量をリアルタイムPCRにて定量した。ウイルス希釈液のみを接種したものを非感染とした。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。*:p<0.05

(A)



(B)

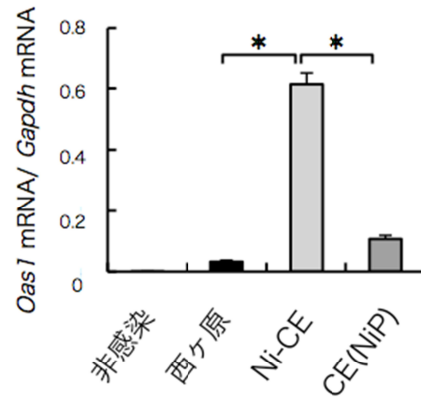


図5 各株を接種した培養筋肉細胞におけるIFN誘導遺伝子の発現量

G-8細胞に西ヶ原株、Ni-CE株またはCE(NiP)株をMOI=1で接種し、接種24時間後に感染細胞における (A) *Mx1*、(B) *Oas1* 遺伝子発現量をリアルタイムPCRにて定量した。ウイルス希釈液のみを接種したものを非感染とした。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。*: $p < 0.05$

ブルセラ症の診断法の開発
(無尾類からの新規ブルセラ属菌の分離と解析)

研究分担者 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室長
研究協力者 鈴木 道雄 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官
研究協力者 木村 昌伸 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官
研究協力者 宇根 有美 麻布大学 獣医学部 獣医学科 教授

研究要旨: 外国産および在来種の無尾類 5 種 14 個体について、ブルセラ属菌の遺伝子検出と菌分離を実施したところ、イエアマガエル、デニスフログからのそれぞれ 1 株、計 2 株が分離された。これら、分離株 2 株は、Combinatorial-PCR、多座遺伝子解析 (MLSA9) の結果、いずれも新規のブルセラ属菌であった。また、9 座連結による系統樹解析により、家畜ブルセラ菌、イヌブルセラ菌、Marine Brucella のクレードとは異なり、*B. inopinata*、既報の無尾類分離株 2 株と共に単系統クレードを構成することが明らかとなった。今回の分離菌株は、*B. inopinata* 近縁の新規ブルセラ属菌である可能性が示された。

最近縁である *B. inopinata* は患者より分離されたことがあり、ヒトに感染しうる考えられている。今回分離された新規のブルセラ属菌については、ヒトや家畜等の動物への感染リスクを明らかにするためにも、その抗原性、薬剤耐性、生化学性状等、さらに詳細な分析が必要である。

A. 研究目的

ブルセラ属菌を起炎菌とするブルセラ症は、世界中の多くの国と地域で未だ主要な人獣共通感染症である。近年では、海棲哺乳類由来のブルセラ菌 (Marine Brucella) や、novel ブルセラと称される新種のブルセラ属菌が、齧歯類、食肉類、霊長類、さらにヒト患者からも分離されている (表 1)。

一昨年後半には、無尾類に由来する新たなブルセラ属菌が独、米の異なるグループにより相次いで報告され、ヒトと家畜への感染の可能性が示唆された (Eisenberg et al 2012、Fischer et

al. 2012)。我が国にも種々の外国産無尾類がペットトレードを通じ毎年、多数輸入販売されている。また、実験用の *Xenopus* とは別種の外国産無尾類の国内商業ブリーダーが複数存在し、相当数の生産個体がペット市場に供給されているものと思われる。

そこで、外国産および在来種の無尾類の生体サンプルについて、ブルセラ属菌の遺伝子検出と菌分離を実施し、それら無尾類のブルセラ属菌保有の有無およびヒトと他の動物への伝播の可能性を検討した。

B. 研究方法

国内2カ所の両生類飼育施設で発生した、黒色真菌症のアウトブレイク時に採取された外国産および在来種の無尾類5種14個体の臓器サンプル32検体を用いた(表2)。

検体は、ビードビーターで粉碎後、一部を菌分離に使用し、残りのサンプルからDNAを抽出した。

ブルセラ特異的遺伝子検出は、当室で実施している、ブルセラ症の原因となる家畜ブルセラ菌3種とイヌブルセラ菌、計4種を簡易的に識別可能なCombinatorial-PCR法(4プライマーセット: bcsp31 1セット、omp2 2セット、omp31 1セット)を実施した(表2)。

菌分離は、粉碎後の検体をブルセラ選択サプリメント(関東化学 SR83)添加20%ウマ血清入りATCC488ブロスで培養、適宜、BHIプレートにサブカルチャーし、発育してきたコロニーを釣菌し、分離株については、Combinatorial-PCR法により確認した。さらに分離株については多座遺伝子解析(MLSA 9, Whatmore et al. 2007)による同定を行った。MLSA 9に用いたDNAマーカーおよびプライマー配列は表3に示す。MLSA9は、4種の家畜ブルセラ菌、*B. canis*、*B. neotomae*、およびMarine Brucellaを1~27のシーケンスタイプ(ST)に識別し菌種と生物型を決定することができる。また、これら9座合計4396bpの配列を用いて系統樹解析を行い、分離株のブルセラ属中での系統発生上の位置を確認した。

C. 研究結果

Combinatorial-PCRの結果、検体番号10-4、10-5(イエアメガエル)、14-1(デニスフロッグ)が複数のプライマーセットで、検体番号11-5(種不明)が、BCSP31プライマーのみで、それぞれ陽性を示した(図1)。

菌は、検体番号10-5(イエアメガエル、大腿骨・骨髄)、14-1(デニスフロッグ、肝臓)から、各

1株、計2株が分離された。分離株のコロニーは、どちらも白から乳白色を呈するスムーズ型であった。分離株はブルセラ特異的PCR陽性であり、2株ともに*B. suis*、*B. neotomae*と同様の陽性パターンを示した(図2)。これらのことから、分離された株は、ブルセラ属菌であると判断された。

次に、今回、無尾類より分離された2株、にEisenbergらの無尾類分離株2株(2012)の配列データを加えMLSA9によるタイピングを行った。その結果、今回の無尾類分離株2株は、互いに全く同じパターンを示し、既知のSTのいずれとも異なっており、*B. inopinata*、*B. microti*およびEisenbergらの無尾類分離株2株に近縁の新規のブルセラ属菌であると考えられた(表4)。

9遺伝子座のシーケンス(計4396bp)による系統樹解析でも同様に、今回の無尾類分離株2株は、家畜ブルセラ菌、イヌブルセラ菌、Marine Brucellaのクレードと離れて*B. inopinata*、Eisenbergらの無尾類分離株2株と共に単系統クレードを構成することが明らかとなった(図3)。

D. 考察

外国産および在来種の無尾類5種14個体の生体サンプル32検体について、ブルセラ属菌の遺伝子検出と菌分離を実施したところ、イエアメガエル、デニスフロッグからのそれぞれ1株、計2株が分離され、特異的PCRによりブルセラ属菌と判定された。

さらに、多座遺伝子解析(MLSA9)の結果、分離株2株は互いに全く同じパターンを示したものの、既に知られている1-27のシーケンスタイプ(ST)のいずれとも一致しなかった。その中で、最も近いシーケンスタイプを有していたのは、2012年に報告されたEisenbergらの無尾類分離株2株と2005年に米国でヒト患者から分離された*B. inopinata* BO1の3株であり、9座連結(4396bp)による系統樹解析でもこれらとともに単系統クレードを形成した。以上のことより、今回の分離菌株は、*B. inopinata*近縁の新規ブル

セラ属菌である可能性が示された。

これら2菌種に対するウサギ抗血清を作成し、それぞれに対する反応性をELISAで検討した。その結果、いずれもホモでは強い反応性を示すのに対し、ヘテロでは反応性の明らかな減弱が認められたことから(データは示さず)、これら2菌種には明らかな抗原性の違いがあると推測された。これについては、今後、さらに検討を加えていく予定である。

分離株 10-5 が分離されたイエアマガエル (*Litoria caerulea*) は、オセアニア原産、樹上棲種で、日本では、主に野生捕獲個体とごく少数の飼育下で繁殖された個体が輸入、流通している。分離株 14-1 の宿主であったデニスフロッグ (*Polypedates dennysii*) は、東南アジア原産、樹上棲である。野生捕獲個体が輸入、流通する。

遺伝子解析の結果、今回のブルセラ分離株に、*B. inopinata* とともに最近縁であった Eisenberg らの無尾類分離株 2 株は、いずれもアフリカ大陸南部に広く分布する地上性の大型種、アフリカウシガエル (*Pyxicephalus adspersus*) に由来する。

イエアマガエルとデニスフロッグ(どちらもアマガエル科)とアフリカウシガエル(アフリカウシガエル科)は無尾類中で系統上の位置が隔たっており、地理的にも東南アジア、オセアニアとアフリカに隔たった分布域をもっている。さらに、それら無尾類分離株と同じクレードの *B. inopinata* (宿主不明) は、北アメリカ大陸で分離されている。よって、これらのブルセラ属菌の共通祖先は、無尾類を宿主として共進化を遂げ分布を広げたと考えることもできる。

B. inopinata は、患者から分離され、ヒトに感染しうることが知られている。今回の系統解析の結果から、*B. inopinata* に、きわめて近縁であった我々の無尾類分離株 2 株と Eisenberg らの無尾類分離株 2 株についても、ヒトと他の動物に対し病原性をもつ可能性がある。

E. 結論

本研究において、2種の無尾類からの分離株 2 株は、いずれも新規のブルセラ属菌であった。

ブルセラ属菌が分離された2種の無尾類、さらに独、米のグループがブルセラ属菌を分離したそれぞれ別種の無尾類(ムシクイオオクサガエル・アフリカウシガエル)は、いずれも日本に輸入され、国内のペット市場を通じて販売され、広く飼育されている。今回の分離株はいずれも、ヒトに感染しうる *B. inopinata* にブルセラ属菌中で最近縁であった。未だ無尾類由来のブルセラ属菌によるヒト症例の報告は、ないものの、飼育者への感染も起こりえるのではないかと懸念される。これら感染リスクを明らかにするためにも、無尾類分離株の抗原性、薬剤耐性、生化学性状等、さらに詳細な分析が必要である。

また、今回、遺伝子解析に用いた MLSA9 では、我々と Eisenberg らの無尾類分離株を含む *B. inopinata* 類におけるクレード内での種の境界を決定するには、遺伝子データが不足している。新たな DNA マーカーを用いることも考えられるが、フルゲノムでの比較が必要かつ有効かもしれない。

* 参考文献

1. De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, Hesel LO, Steigerwalt AG, Vega R, Clark TA, Daneshvar MI, Wilkins PP, Whatmore AM. 2008. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol.* 46, 43-9.
2. Eisenberg T, Hamann HP, Kaim U, Schlez K, Seeger H, Schauerte N, Melzer F, Tomaso H, Scholz HC, Koylass MS, Whatmore AM, Zschöck M. 2012. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl Environ Microbiol.* 78, 3753-5.
3. Fischer D, Lorenz N, Heuser W, Kämpfer P, Scholz HC, Lierz M. 2012. Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like

bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *J Zoo Wildl Med.* 43, 625-8.

4. Whatmore AM, Perrett LL, MacMillan AP. 2007. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol.* 20, 7-34.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表等

1. 論文発表等

- (1) 今岡浩一. 犬ブルセラ症 - 特集・診断シリーズ・感染症. in: *SA Medicine, インターズー*, pp.53-56, 2013

2. 学会発表等

- (1) 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

(2) 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

(3) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1 : ブルセラ属菌と主なホスト

Brucella sp.	Main Host	
B. melitensis	caprine, ovine	
B. abortus	Bovine	
B. suis	porcine, wild boar, hare, caribou, reindeer	Classic Brucella
B. canis	canine	
B. ovis	ovine	
B. neotomae	desert wood rat (Neotoma lepida)	
B. pinnipedialis	Seal	Marine Brucella
B. ceti	Dolphin, Porpoise, Whale	
B. microti	common vole (Microtus arvalis)	
B. inopinata	unknown	Novel Brucella
NVSL 07-0026	baboon (Papio sp.)	
F965	Red fox (Vulpes vulpes)	

表 2 : 無尾類検体のプロファイルとブルセラ特異的 PCR と菌分離の結果

+ : PCR 陽性、 : ブルセラ属菌分離

サンプル No.	動物種	原産地	体重	頭胴長	性別	臓器	PCR sample No.	PCR result				菌分離
								Brucella primer				
								BCSP31	Omp2ab	Omp2ca	Omp31	
1-5	ヒキガエル (Bufo japonicus)	Japan	55.33	8.7		大腿骨 (骨髄)	1					
2-5	ヒキガエル (Bufo japonicus)	Japan	70.64	9.3		大腿骨 (骨髄)	2					
3-5	サビトマトガエル (Dyscophus guineti)	Madagascar	92.98	9.7		大腿骨 (骨髄)	3					
4-5	ヒキガエル (Bufo japonicus)	Japan	65.03	10.3		大腿骨 (骨髄)	4					
5-5	イエアメガエル (Litoria caerulea)	New Guinea, Australia, New Zealand	74.75	9.5		大腿骨 (骨髄)	5					
6-5	サビトマトガエル (Dyscophus guineti)	Madagascar	96.5	9.6		大腿骨 (骨髄)	6					
7-1	サビトマトガエル (Dyscophus guineti)	Madagascar	37.81	6.2		肝	7					
7-2						腎	8					
7-4						心	9					
7-5						大腿骨 (骨髄)	10					
8-1	ヒキガエル (Bufo japonicus)	Japan	24.83	7		肝	11					
8-2						腎	12					
8-3						脾	13					
8-4						心	14					
8-5						大腿骨 (骨髄)	15					
9-1	サビトマトガエル (Dyscophus guineti)	Madagascar	21.69	6.3		肝	16					
9-2						腎	17					
9-4						心	18					
9-5						大腿骨 (骨髄)	19					
10-3	イエアメガエル (Litoria caerulea)	New Guinea, Australia, New Zealand	9.81	6		脾	20					
10-4						心	21	+		+		
10-5						大腿骨 (骨髄)	22	+	+	+	+	
11-5	種不明	不明	2.18	4.4		大腿骨 (骨髄)	23	+				
12-1	サビトマトガエル (Dyscophus guineti)	Madagascar	66.58	8.3		肝	24					
12-2						腎	25					
12-4						心	26					
12-5						大腿骨 (骨髄)	27					
13-5	サビトマトガエル (Dyscophus guineti)	Madagascar	35.96	6.8		大腿骨 (骨髄)	28					
14-1	デニスフロッグ (Polypedates dennysii)	China, Laos, Burma, Vietnam.	72.22	8.8		肝	29		+	+	+	
14-2						腎	30					
14-4						心	31					
14-5						大腿骨 (骨髄)	32					

表 3 : ブルセラ分離株の多座遺伝子解析 (MLSA9) に用いた DNA マーカーとブ

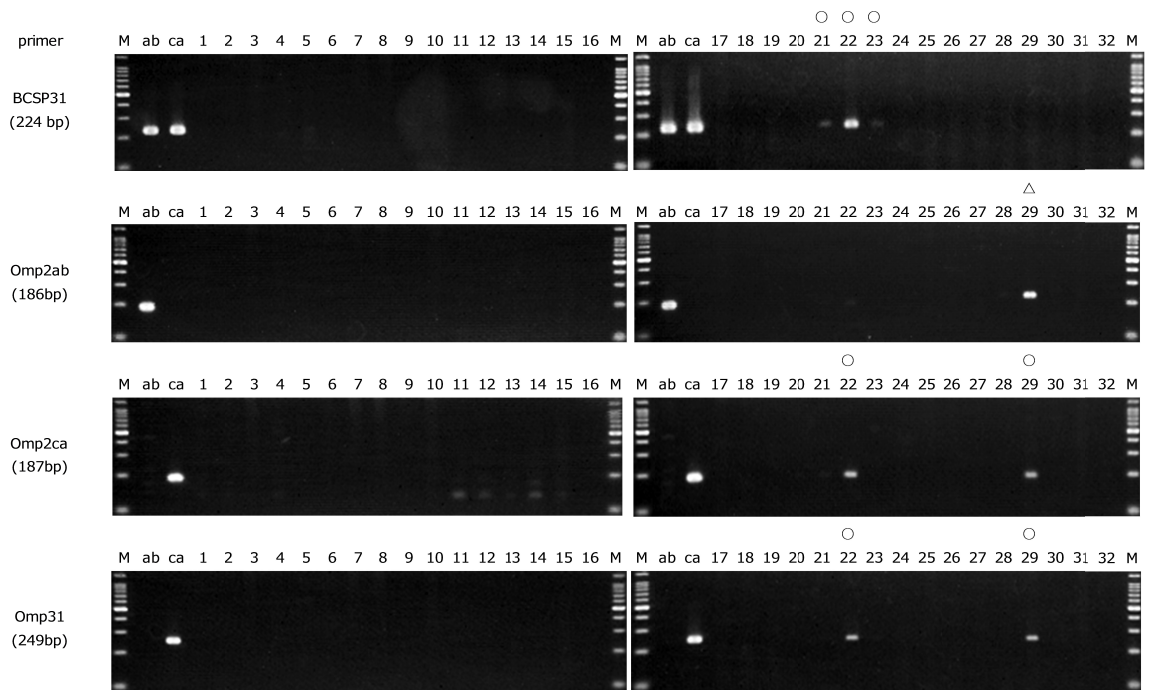


図1:無尾類32検体のブルセラ属特異的PCR(4プライマーセットによるコンビネーション)ab: *B. abortus*、ca: *B. canis*、○: 陽性、△: 非特異

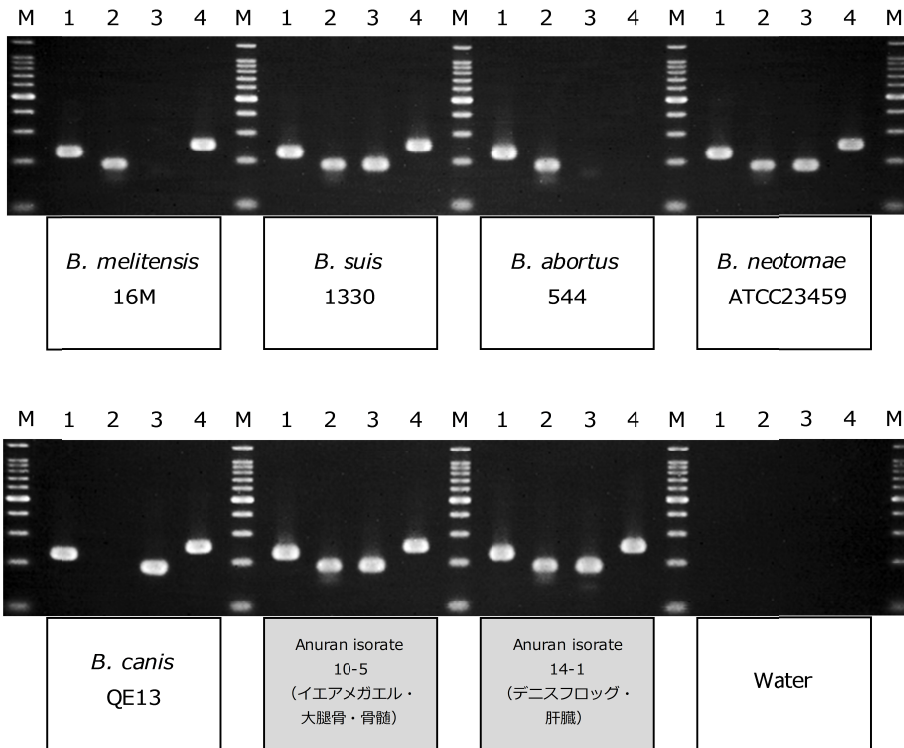


図2: 分離株、2株のブルセラ特異的PCR

M. Marker、1. BCSP31(224 bp)、2. Omp2ab (186bp)、3. Omp2ca (187bp)、4. Omp31 (249bp)

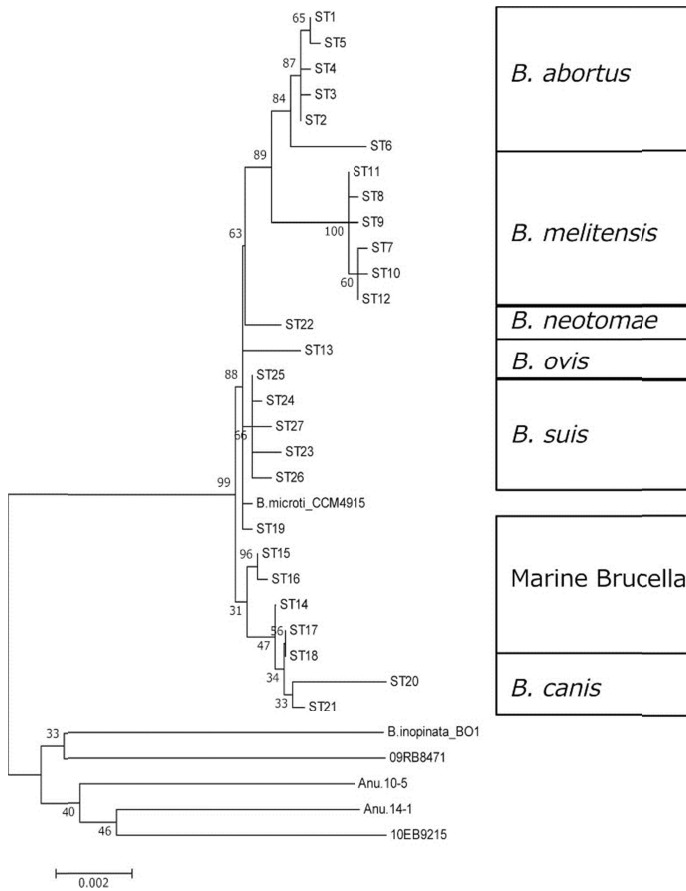


図 3:9 遺伝子座(4396bp) による連結系統樹

10-5: イエアマメガエル分離株、14-1: デニスフロッグ分離株、09PB8471, 10EB9215: アフリカウシガエル分離株 (Eisenberg et al. 2012)

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

- バルトネラ感染症の疫学 -

研究分担者 丸山 総一 日本大学生物資源科学部・教授

研究要旨: 捕獲した 15 頭の野生のニホンザルの 4 頭(26.7%) から 塹壕熱の病原体である *Bartonella quintana* が分離された。各個体の血中菌数は 50 ~ 12,000CFU/ml(平均 525CFU/ml)と、高い菌血症状態であったにもかかわらず、無症状であったことから、ニホンザルは本菌の自然病原巣の一つである可能性が示唆された。また、分離株の遺伝子解析の結果、ヒトおよびサルの種類ごとに独自の遺伝子性状を有する *B. quintana* が分布することやニホンザルには固有の *B. quintana* が存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

第一次世界大戦時に流行した塹壕熱の起原菌である *Bartonella quintana* は、ヒトに発熱、心内膜炎、細菌性血管腫症などを引き起こすことが知られている。本菌はヒトが自然宿主であると考えられていたが、近年、米国に輸入されたアジア産の飼育カニクイザルと中国の飼育アカゲザルから、それぞれ *B. quintana* が分離されたことから、サルも本菌の自然宿主である可能性が示唆された。しかしながら、野生のサルならびにわが国に棲息するニホンザルが *B. quintana* を保有しているかについては、全く不明の状態である。そこで本研究では、捕獲した野生のニホンザルにおける *B. quintana* の保有状況について検討するとともに、ヒト分離株とサル分離株の遺伝子性状を比較し、サルが *B. quintana* の自然宿主であるかについて検討した。

B. 研究方法

2012年6月～2013年7月の間に、和歌山県で

捕獲された野生ニホンザル 15 頭から血液を採取した。サルの血液 100 μ l を 5% 兔血液加チヨコロート寒天培地に塗抹し、35 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で 1 カ月間培養した。培地上に発育した *Bartonella* を疑うコロニー数から血中菌数を測定した。分離株は、コロニー形態、発育日数ならびにグラム染色性(陰性)から *Bartonella* 属菌と推定した。分離された *Bartonella* 属菌から無作為に 3 株を選択し、2 つのハウスキーピング遺伝子領域 (*gltA* および *rpoB*) と 16S-23S rRNA 遺伝子間領域 (ITS) の塩基配列に基づいて分離株の菌種を同定した。さらに、菌種同定された 3 株から代表の 1 株を選択し、9 つのハウスキーピング遺伝子領域 (*atpF*, *bqtR*, *ftsZ*, *gap*, *gltA*, *groE*, *nlpD*, *ribE*, *rpoB*) を用いた Multi-Locus Sequence Typing (MLST) 法によって得られた配列から遺伝子型 (Sequence Type: ST) を決定した。さらに、ニホンザル分離株 (4 株) と既報のアカゲザル (37 株)、カニクイザル (16 株) およびヒト分離株 (16 株) の塩基配

列から、各STタイプの9遺伝子領域の連結塩基配列に基づく系統解析を行った。

(倫理面からの配慮について)

研究対象のニホンザルは、全て管理捕獲された個体であり、捕獲した個体は適切な麻酔下のもと、安楽殺した後に血液を採取した。

C. 研究結果

今回捕獲したニホンザルの 26.7%(4/15) から *Bartonella* 属菌が分離され、分離株の細菌学的性状ならびに遺伝子性状から全て *B. quintana* と同定された。また、各個体の血中菌数は 50 ~ 12,000CFU/ml(平均 525CFU/ml)であった(表 1)。

ニホンザル分離株の *gltA*, *rpoB* ならびに ITS の塩基配列は、中国の飼育アカゲザルを由来とする *B. quintana* RM-11 株と同一であるか、または非常に高い相同性(99.0%)を示した(表 2)。

MLST 法では、分離株はいずれも新規の ST22 に型別され、連結塩基配列に基づく系統解析では、ニホンザル、アカゲザル、カニクイザルおよびヒト分離株はそれぞれ独立した4つのクラスターを形成した(図 1)。

D. 考察

本研究により、野生のニホンザルは 26.7%(4/15)と高率に *Bartonella* 属菌を保有していることが初めて明らかとなった。さらに、ニホンザルの *Bartonella* 属菌の平均血中菌数は 525CFU/ml($0.5 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^4$ CFU/ml)であった。*gltA*, *rpoB* および ITS 領域の相同性解析の結果、ニホンザル分離株はヒト由来の *B. quintana* Fuller^T 株や中国のアカゲザルを由来とする *B. quintana* RM-11 株と一致もしくは非常に高い相同性値(97.0%)を示したことから、これ

ら分離株はいずれも *B. quintana* であることが明らかとなった。さらに、ニホンザル分離株は解析した3領域において、*B. quintana* Fuller^T 株に比べ、*B. quintana* RM-11 株により高い相同性を示したことから、他のマカク属のサル由来の *B. quintana* に非常に近縁であることも明らかとなった。

今回 *B. quintana* が分離されたニホンザルは高い菌血症状態であったにもかかわらず、無症状であったこと、ニホンザル分離株はサルを由来とする *B. quintana* に近縁であったことから、サルも *B. quintana* の自然宿主である可能性が示唆された。

MLST 法を用いて、ニホンザル分離株の ST を決定したところ、各ニホンザルから無作為に選択した4株は、全て同一の ST であり、新規の ST22 であることが明らかとなった。さらに、MLST 法に基づいて22タイプの ST を系統解析したところ、ST1 ~ 22 は4つの独立したクラスターを形成し、それぞれ分離されたヒトあるいはサルの種類ごとに ST が分類された。今回、ニホンザルから分離された *B. quintana* 株はこれまでに報告のない新規の ST であり、また系統解析でもニホンザル独自のクラスターを形成したことから、ヒトおよびサルの種ごとに固有の遺伝子性状を有する *B. quintana* を保有している可能性が示唆された。しかしながら、本研究に用いたニホンザル由来の *B. quintana* は4株と非常に少なかったこと、ニホンザルの採材地域が和歌山県のみであったことから、今後、より広い地域のニホンザルから *B. quintana* の分離を試み、ST を決定し、系統解析を行う必要があると考えられた。

E. 結論

野生のニホンザルは 26.7%と壱塚熱の病原体

である *B. quintana* を高率に保有していることが初めて明らかとなった。*B. quintana* を保有していたニホンザルは高い菌血症状態であったにもかかわらず、無症状であったことから、本菌の自然病原巣である可能性が示唆された。

N. 健康危険情報

今後、わが国でその生息数がさらに増加し、有害鳥獣駆除事業等でヒトとの接触が増加すると考えられるニホンザルを原因とする *B. quintana* の感染にも注意を払う必要があると思われる。

O. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato, S., Kabeya, H., Shigematsu Y., Sentsui, H., Une, Y., Minami, M., Murata, K., Ogura, G., and Maruyama, S. 2013. Small Indian mongooses and masked palm civets serve as new reservoirs of *Bartonella henselae* and potential sources of infection for humans. Clin. Microb. Infect. 19:1181-1187.
- 2) Tateno, M., Nishio, T., Sakuma, M., Nakanishi, N., Izawa, M., Asari, Y., Okamura, M., Maruyama, S., Miyama, T. S., Setoguchi, A. and Endo, Y. 2013. Molecular epidemiological survey of *Bartonella*, *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections in Japanese Iriomote and Tsushima leopard cats. J. Wildl. Dis. 49(3): 646-652.
- 3) Bai, Y., Malania, L., Alvarez Castillo, D., Moran, D., Boonmar, S., Chanlun, A., Suksawat, F., Maruyama, S., Knobel, D., and Kosoy, M. 2013. Global distribution of *Bartonella* infections in domestic bovine and characterization of *Bartonella bovis*

strains using multi-locus sequence typing. Plos One. 8(11): e80894.

2. 学会発表

- 14) 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).
- 15) 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).
- 16) 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).
- 17) 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)

P. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. ニホンザルの *Bartonella* 陽性数と血中菌数

捕獲地域	検体数	陽性数 (%)	血中菌数 (CFU/ml)
湯浅町	11	2 (18.1)	No.10 1.2×10^4
			No.11 6.0×10^3
白浜市	3	1 (33.3)	No.3 0.5×10^2
田辺市	1	1 (100)	No.1 3.4×10^2

表 2. ニホンザル分離株と *B. quintana* Fuller^T 株および RM-11 株の *gltA*, *rpoB* および ITS 領域における塩基配列の相同性

ニホンザル分離株 *	<i>B. quintana</i> Fuller ^T 株 (ヒト由来)			<i>B. quintana</i> RM-11 株 (飼育アカゲザル由来)		
	<i>gltA</i>	<i>rpoB</i>	ITS	<i>gltA</i>	<i>rpoB</i>	ITS
MF1.1	98.0	99.0	98.0	100	100	100
MF3.1	98.0	97.0	98.0	100	98.0	99.0
MF10.1	98.0	99.0	98.0	100	100	99.0
MF11.1	98.0	99.0	98.0	100	100	99.0

* 同一個体から選択した 3 株は, 3 領域全てにおいて同一配列であった。

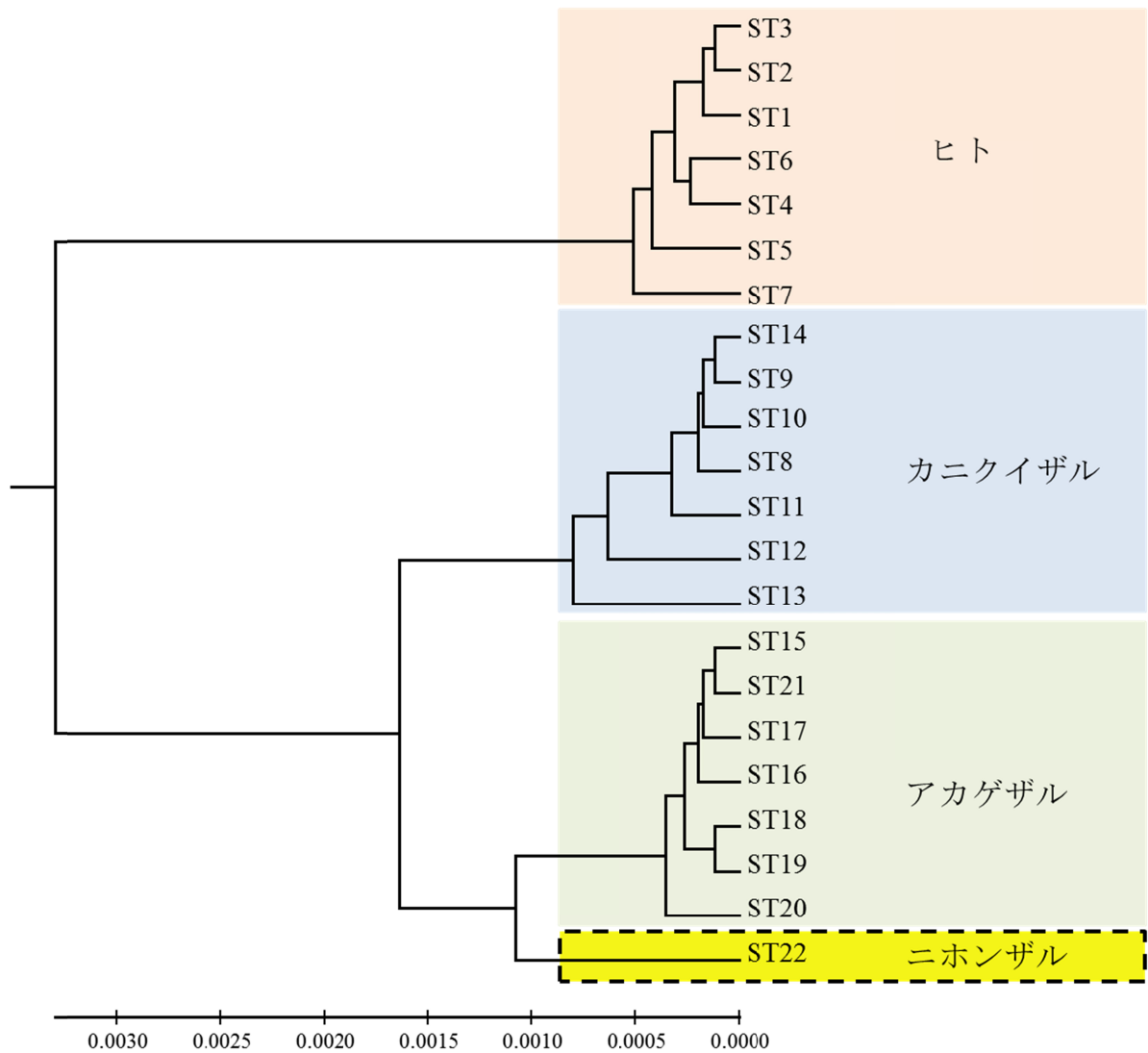


図1. MLST法に用いた9遺伝子領域の連結配列に基づく系統解析

各STの9つのハウスキーピング遺伝子領域の塩基配列を連結させ、UPGMA、Kimura 2-parameterモデルを用いて系統解析を行った。

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 ベトナムならびに日本の土壌における類鼻疽菌の分布ならびに *Salmonella Weltevreden* の Multilocus sequence typing (MLST)法と Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) 法による分子遺伝子型別

分担研究者 林谷秀樹

東京農工大学大学院・准教授

研究要旨: 東南アジアの環境に広く分布し、人獣共通感染症の原因菌の一つとして知られ、近年、海外感染症として我が国に持ち込まれる事例が報告されている類鼻疽 (*Melioidosis*) について、ベトナムならびに沖縄の土壌から類鼻疽菌 (*Burkholderia mallei*) の分離を試みた。その結果、培養法では類鼻疽菌は分離されなかった。また、東南アジアで分離頻度の高い *Salmonella Weltevreden* に分子遺伝子型別法である Multilocus sequence typing (MLST)法と Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) 法を応用したところ、供試したベトナム由来 26 株は MLVA 法では 13 パターンに型別されたが、MLST 法では 1 パターンにしか型別できなかった。

A. 研究目的

類鼻疽菌 (*Burkholderia mallei*) は、東南アジアやオーストラリア北部の環境に広く分布し、人獣共通感染症の原因菌の一つとして知られており、我が国では 4 類感染症に指定されている。国内感染例は報告されていないが、近年、主に東南アジアで感染し帰国後発症した患者が、2010 年に 2 例、2012 年に 3 例、2013 年に 4 例報告されている。本研究では日本に侵入・定着することが危惧される類鼻疽の基礎研究の一環として、まず、我が国の本菌感染患者の渡航先として報告事例の多いベトナムならびに亜熱帯に属し、本菌の侵入

が危惧される沖縄県において、土壌から本菌の分離を試みた。また、東南アジアに広く分布し、これらの地域の人のサルモネラ感染症の大きな割合を占めており、近年、我が国の沖縄県に侵入し、その定着・拡大が問題となっている *Salmonella Weltevreden* について、病原微生物の菌株間の遺伝的異同を識別して、その感染源および感染経路を明らかにするための手法として開発されたシーケンス解析法である Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) 法ならびに Multilocus sequence typing (MLST) 法を用いて分子遺伝子型別を行い、その有

用性をフラグメント解析法である PFGE 法と比較しながら検討した。なお、MLVA 法は、ゲノム中の単純反復配列 (Tandem Repeat、以下 TR) を含む複数の遺伝子座を PCR で増幅し、各座位における TR の繰り返し数 (Repeat Number、以下 RN) の違いによって菌株の型別を行う手法である。また、MLST 法は 菌株ごとの複数遺伝子の配列の差異をパターン化し、それらを統合的に解析することにより株の型別を行う手法である。

B. 材料と方法

1. ベトナムならびに沖縄の土壌からの類鼻疽菌の分離

1) 供試検体

供試検体として、2013 年 5 月と 11 月にベトナム・メコンデルタで採取した水田の表土 40 検体ならびに 11 月に沖縄中部で採取した畑の表土 20 検体、計 60 検体を用いた。

2) 類鼻疽菌の分離・同定

供試検体 10 g を、5 倍量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.2) とよく混和し、その上清を Ashdown 's Medium 寒天培地に接種し、37 °C で 48 時間培養した。培養後、培地上に発育してきた類鼻疽菌が疑われるコロニーを釣菌し、純培養後、生化学的検査を行い、類鼻疽菌を同定した。

2. *S. weltevreden* の MLVA ならびに MLST による遺伝子型別

1) 供試菌株

供試菌株として、これまでにベトナム・メコンデルタにおいてさまざまな検体から分離された *S. Weltevreden* 26 株を用いた。これらの供試菌株 26 株は、これまでの研究で、19 の PFGE パターンならびに 7 のリボタイプに型別され、さらに PFGE とリボタイピングの解析結果を組み合わせ、26 の遺伝子タイプに分類されることが明らかになっている。供試菌株からは、ボイル法により DNA を抽出し供試検体とした。

2) MLVA 法

MLVA は、Lindstedt らの方法に準じて、以下のように行った。使用する TR 領域は、過去に *Salmonella enterica* の MLVA で用いられた領域から 8 領域 (Sa102, Sa116, Sa120, TR1, TR2, STTR8, SE-4, SE-8) を選択した。供試検体を鋳型 DNA として、それぞれの領域ごとに所定の条件のもとに PCR を行い、得られた PCR 産物を鋳型として Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (ABI) を用いて DNA シーケンシングを行い、各フラグメントに含まれる反復配列の RN を求めた。得られた配列データは、遺伝子解析ソフトウェア SeqScanner 2 (ABI) ならびに Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5.2 を用いて解析した。

3) MLST

MLST による解析では、ハウスキーピン

グ遺伝子 7 種と病原性遺伝子 2 種の計 9 種を用いた。ハウスキーピング遺伝子としては、コリスミ酸シンターゼをコードしている *aroC*、DNA ポリメラーゼ サブユニットをコードしている *dnaN*、ウロポルフィリノーゲン III シンターゼをコードしている *hemD*、ヒスチジノールデヒドロゲナーゼをコードしている *hisD*、ホスホリボシルアミノイミダゾールカルボキシラーゼをコードしている *purE*、ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼをコードしている *sucA*、ならびにアスパルトキナーゼおよびホロセリンデヒドロゲナーゼをコードしている *thrA* の計 7 種を、病原性遺伝子としては 宿主細胞の認識に関わる繊毛抗原をコードしている *fimH*、炎症反応などに関わるデユピキチナーゼをコードしている *sseL*、ならびにファージやプラスミド由来のスペーサー配列が挿入されたタンデムリピート配列であり、細菌自身の獲得免疫として機能する Cluster regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)2 領域を選んだ。PCR は、ハウスキーピング遺伝子については遺伝子増幅条件として、いずれも 94 で 2 分維持した後、94 1 分、55 1 分および 72 1 分のサイクルを 34 回反復し、最後に 72 で 2 分伸長反応を行った。病原性遺伝子については、遺伝子増幅条件として、94 で 10 分維持した後、94 1 分、55 1 分および 72 1 分のサイクルを 28 回反復し、最後に 72 で 10 分伸長反応を行った。増幅反応終了後、増幅産物を電気泳動で確認した。

認した後、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) および Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer(ABI) を用いてシーケンシングを行った。シーケンシングにより得られた配列データは Sequence scanner v1.0 (ABI) および MEGA5(27)を用いて解析し、それぞれの菌株における各ハウスキーピング遺伝子の塩基配列を決定した。決定されたそれぞれの菌株における各ハウスキーピング遺伝子の塩基配列を MLST データベースに提出し、MLST データベースにおいて定められた、それぞれの塩基配列に対応する番号を得た後、得られた各株の 7 種のハウスキーピング遺伝子全ての番号を用いて、MLST データベースにおいて Sequence type(ST)の検索を行った。なお、本研究における ST とは、*aroC*、*dnaN*、*hemD*、*hisD*、*purE*、*sucA*、および *thrA* の 7 つのハウスキーピング遺伝子の塩基配列を統合的に解析して得られる MLST データベースにおいて定められた番号である。得られた ST について、eBurst v3 を用い、MLST データベースに登録されている全 *S. enterica* 株の ST との比較を行った。また、病原性遺伝子については、遺伝子増幅条件として、いずれも 94 で 10 分維持した後、94 1 分、55 1 分および 72 1 分のサイクルを 28 回反復し、最後に 72 で 10 分伸長反応を行った。増幅反応終了後、増幅産物を電気泳動で確認した。なお、*fimH* および *sseL* については増幅が確認されたが、CRISPR1 および CRISPR2 について

は増幅が確認されなかったため、*fimH* および *sseL* の PCR 産物についてのみハウスキーピング遺伝子と同様にシーケンシングおよび配列解析に供した。

C. 研究結果

1. ベトナムならびに沖縄の土壌からの類鼻疽菌の分離結果

今回、ベトナム・メコンデルタで採取した水田の土 40 検体ならびに沖縄で採取した畑の土 20 検体から、培養法により類鼻疽菌の分離を行ったが、いずれの検体からも分離されなかった。

2. *S. weltevreden* の MVLVA と MLST による遺伝子型別結果

1) MLVA 法

供試された *S. Weltevreden* 26 株について MVLVA を実施した結果、13 の MLVA タイプに分類された。しかし、解析を行った 7 つの RN 領域においてが菌株間で異なっていた領域は、Sal16 と SE4 の 2 領域のみであり、特に Sal16 領域において RN のばらつきが顕著であった。MST をみると、*S. Weltevreden* の MLVA タイプ間の遺伝的差異は 1 遺伝子座であることが示された。

2) MLST 法

供試された *S. Weltevreden* 26 株について MLST を実施した結果、ハウスキーピング遺伝子は 26 株すべてで一致し、すべての株が ST365 に型別された。また、病原

性遺伝子 *fimH* と *sseL* については、いずれの遺伝子も供試した 26 株全ての配列が一致した。

D. 考察

1. ベトナムならびに沖縄の土壌からの類鼻疽菌の分離

今回、我が国の類鼻疽の海外での感染国として報告の多いベトナムならびに我が国で亜熱帯に属する沖縄で、水田ならびに畑の土を採取し、類鼻疽菌の分離を試みたが、培養法では分離されなかった。今回、土の中の類鼻疽菌の定量をする意味もあり、検体から選択培地に直接塗抹する方法で分離を試みたが、分離されなかった。ベトナム南部での類鼻疽菌の分布を明らかにした報告はみられないが、東南アジアや北オーストラリアなどで、土や河川水から PCR 法により類鼻疽菌の分離を行った報告では、比較的高率に本菌が分離されており、ベトナム・メコンデルタでも汚染菌量は少ないながらも土に本菌が分布している可能性は高いと思われる、次は増菌または PCR 法による検出を試みる予定である。

2. *S. weltevreden* の MLVA ならびに MLST による遺伝子型別

MLVA 法ならびに MLST 法のような遺伝子のシーケンス解析法は、PFGE 法などの遺伝子のフラグメント解析法に比べ、データベースを構築しやすく、他の研究施設との

間でデータの共有や比較がしやすい。

本研究で供試した *S. Weltevreden* 26 菌株は、過去の研究で 19 の PFGE パターンならびに 7 のリボタイプに型別され、それらの結果の組み合わせによって 26 の遺伝子タイプに分類されることが明らかになっている。本研究により、供試菌株 26 株は 13 の MLVA タイプに型別された。これらの成績から、今回用いた MLVA の *S. Weltevreden* についての菌株型別は、リボタイピングよりは高いものの、PFGEよりは低かった。しかしながら、Chiou らは、*S. Typhimurium* を PFGE ならびに MLVA で解析した結果、PFGE では 8 パターン、MLVA では 108 パターンに型別され、菌株型別能は MLVA のほうが高かったことを報告しているように、MLVA のほうが PFGE より高い識別能を示すことを指摘する研究者は多い。今回、RN のばらつきが確認された領域は、8 領域中、Sal16 領域と SE4 領域の 2 領域だけであったが、MLVA においては、RN のばらつきが多いほど、その領域の多型性が高いことになるので、今回使用した TR 領域のうち、多型性がみられたのは 2 領域だけであったことになる。したがって、今後 Sal16 領域と SE4 領域以外にも多型性がみられる領域をより多く含むプライマーセットを見いだして MLVA を行うことができれば、PFGE と同等かそれ以上の識別能力を発揮する可能性も考えられる。今回使用したプライマーは、*S. Typhi*、*S. Typhimurium* および *S. Enteritidis* を基に設計されたものであるため、今後は、

Boxrud らの研究でおこなわれているように、Tandem Repeat Finder software を用いて、*S. Weltevreden* のシーケンスデータから MLVA マーカーになりうる領域を探し出し、*S. Weltevreden* においてより菌株識別能の高いプライマーセットの開発を試みる必要があるだろう。また、MLST ではハウスキーピング遺伝子および病原性遺伝子を用いて MLST 解析を行った結果、いずれの場合も 1 種類に型別された。これらの結果より、*S. Weltevreden* において、ハウスキーピング遺伝子 *aroC*、*dnaN*、*hemD*、*hisD*、*purE*、*sucA*、および *thrA* を用いた MLST 法ならびに病原遺伝子 *fimH* および *sseL* を用いた MLST 法は、PFGE 法およびリボタイピング法と比較して菌株型別能が低いことが明らかとなった。

E. 結論

1. ベトナム・メコンデルタならびに沖縄では、培養法では土から類鼻祖菌は検出されなかった。
2. *S. weltevreden* 26 株は MLVA 法では 13 パターンに型別されたが、MLST 法では 1 パターンにしか型別できなかった。

F 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

