

201318044A

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

動物由来感染症の対応に関する研究

(H25-新興-一般-008)

平成25年度 総括・分担研究報告書

平成26年3月

研究代表者 森 川 茂

(国立感染症研究所)

目 次

I. 総括研究報告書	
動物由来感染症の対応に関する研究	1
研究代表者：森川茂（国立感染症研究所獣医科学部）	
II. 分担研究報告書	
1. 新興モルビリウイルスの病原性と動物由来新興ブニヤウイルスの 国内疫学と総括	9
研究分担者：森川茂（国立感染症研究所 獣医科学部）	
2. 食虫目、翼手目等のハンタウイルスの分子疫学情報の蓄積	23
研究分担者：新井智（国立感染症研究所 感染症疫学センター）	
3. 狂犬病ウイルスの街上毒と固定毒の病原性の差を規定すると考えられる G 蛋白等の 細胞内局在を決定する蛋白部位の解明	31
研究分担者：井上智（国立感染症研究所 獣医科学部）	
4. 動物由来新興ウイルスの血清診断法と感染初期過程に関する研究	39
研究分担者：福士秀悦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
5. 野兎病菌の病原性に関わる遺伝子の同定	49
研究分担者：宇田晶彦（国立感染症研究所 獣医科学部）	
6. ニホンザル血小板減少症の原因となる SRV のウイルス学的解析	61
研究分担者：三浦智行（京都大学ウイルス研究所附属 感染症モデル研究 センター 霊長類モデル研究領域）	
7. 野生動物の動物由来感染症病原体の保有状況の網羅的調査	67
研究分担者：前田健（山口大学共同獣医学部獣医微生物学）	
8. 病原体媒介マダニの遺伝種同定法の確立	85
研究分担者：川端寛樹（国立感染症研究所 細菌第一部）	
9. 動物由来細菌性腸管感染症の再興に向けた感染制御に関する研究 研究分担者：山田章雄（東京大学大学院 農学生命科学研究科）	97
10. コリネバクテリウムに関する研究	101
研究分担者：山本明彦（国立感染症研究所 細菌第二部）	
11. ヒトの狂犬病の診断・治療法に関する調査研究	115
研究分担者：菅沼明彦（東京都立駒込病院感染症科）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	121

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

動物由来感染症の対応に関する研究

(H25－新興－一般－008)

平成25年度 総括・分担研究報告書

平成26年 3 月

研究代表者 森 川 茂

(国立感染症研究所)

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

動物由来感染症の対応に関する研究

国立感染症研究所獣医科学部長 森川 茂

研究要旨：新興・再興感染症の大部分が動物由来感染症である。これらのうち国内で稀にしか発生していない動物由来感染症について、疫学的知見を集積しヒトへの感染リスクを評価する。また、これらの感染症が国内で発生した場合の診断・迅速検査法を確立する。重要な動物由来感染症の病原性発現機構に関する研究を行い、霊長類等に発生した新興感染症に関してヒトへのリスクを科学的に評価する。動物の常在細菌や環境中の菌等から病原性腸内細菌に対し抗菌作用を示す菌種を探索する。これらにより総合的に動物由来感染症対策の体制整備を目指す。本計画は、3年間にわたる研究であるが、初年度は、(1)サル CDV 感染症の原因ウイルスの RG に必要なプラスミドを全て作製した。また、新規モルビリウイルスであるネコモルビリウイルスの国内ネコでの感染実態を調査した結果、本ウイルスがネコに持続感染すること、2種のウイルス株間での recombination が起こり得ることが明らかになった。(2)ニホンザルから分離された SRV4 を RG で作製し、ニホンザルの中性アミノ酸トランスポーター ASCT2 が機能的受容体であることを明らかにした。(3)狂犬病の固定毒と街上毒の病原性に関係すると考えられる G 蛋白質の性状の違い、特に細胞内での局在に関して、糖鎖結合の違いが大きな要因の一つであることを明らかにした。(4) MERS コロナウイルスの血清学的診断法確立のため N、S 蛋白質を組換えバキュロウイルスにより発現・精製し、モノクローナル抗体を作製した。(5) 野兎病菌弱毒株から得た病原性復帰株では *pdpC* 遺伝子の欠失の有無のみが異なる。両者の遺伝子発現プロファイルの異なる遺伝子のうち、*pulB* の KO 菌を作製した結果、マクロファージ増殖性に参与することが示唆された。(6) イノシシ肝臓や血液からダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)に近縁なウイルス遺伝子が検出され、北海道以外に TBEV が本土にも存在することが示唆された。unksから新規コロナウイルスを検出し、フェレットに2種のコロナウイルス感染が蔓延していることを明らかにした。イルカから新規ヘルペスウイルスを分離した。(7)モンゴル、ベトナム、ミャンマー、日本およびロシアの野生小型哺乳類を調査した結果、モンゴル、日本でそれぞれ2種類のハンタウイルスの感染が確認された。ハンタウイルスがトガ

リネズミ、コウモリから検出されたことから、これら 24 種 65 株の初代細胞培養を行った。それに伴い、新規ヘルペス、アデノアソシエイト、ポリオーマ近縁ウイルスが分離・同定された。(8) 哺乳類由来菌株 1184 株から 21 株でバクテリオシンの産生を確認した。これらのうち *L. lactis subsp. Cremoris*, *L. lactis subsp. Lactis*, *Enterococcus faecalis*, *E. hirae* の 4 菌種が同定された。(9) コリネバクテリウム属菌から *Corynebacterium ulcerans* 感染症、*C. diphtheriae* 感染症 (ジフテリア) 等を鑑別するマルチプレックス PCR 法を開発した。国内のネコが *C. ulcerans* のキャリアであることが分かった。*C. ulcerans* 感染マウスモデルを作成した。(10) 新興マダニ媒介性感染症 3 疾患 (新興回帰熱、アナプラズマ症、SFTS) に関して、マダニの疫学において重要なマダニの簡易同定法確立、16S rRNA 遺伝子 (*mt-rrs*) 配列の遺伝子データベースを構築し塩基配列アーカイブを整備し、形態同定が困難な場合のマダニ種の同定を可能とした。(11) ヒト狂犬病の暴露後免疫におけるザグレブ方式による接種の効果を後方視的に検討した結果、接種完遂後 2 週間の時点で防御抗体価 (0.5IU/mL) レベルを上回り、国産ワクチンによる接種スケジュールの継続が可能と考えられた。

研究分担者：

新井智 (国立感染症研究所 感染症疫学センター)、井上智、宇田晶彦 (同 獣医科学部)、福士秀悦 (同 ウイルス第一部)、川端寛樹 (同 細菌第一部)、山本明彦 (同 細菌第二部) 三浦智行 (京都大学ウイルス研究所附属感染症モデル研究センター霊長類モデル研究領域)、前田健 (山口大学共同獣医学部獣医微生物学)、山田章雄 (東京大学大学院農学生命科学研究科)、菅沼明彦 (東京都立駒込病院感染症科)

A. 目的：

新興・再興感染症の大部分が動物由来感染症である。これらのうち国内で稀にしか発生していない、あるいは現在発生のない動物由来感染症について、ヒトへの感染リスクを評価するために必要な知見を集積する必要がある。また、新興動物感染症病原体のうち霊長類に致死的感染症を起すもの、全く新規に動物で同定されたウイルス感染症などは、科学的にヒトへのリスク

を評価するための知見を集積する。動物由来感染症には、ウイルス感染症、細菌感染症など多くの感染症があるが、これらのうち重要と思われる感染症に関して以下の項目を目的とした。

- (1)重要な動物由来感染症の疫学的知見は不十分であることから、知見の集積を目的とする。
- (2)患者発生時に必要な動物由来感染症の診断・迅速検査法の確立を目的とする。
- (3)動物由来感染症の病原性発現機構に関わる遺伝子とその機能を解明することを目的とする。
- (4)霊長類などの新興感染症の発生機序の解明を目的とする。
- (5)病原性細菌に対し抗菌作用を示す細菌群の同定と作用機構の解明を目的とする。

これらにより、国内で発生がないか稀にしか発生のない重篤な動物由来感染症、あるいは今後発生する可能性のある動物由来感染症のリスクを明確にし、事前対策を可能とすることを目的とする。

B. 研究方法：

各分担研究者の研究報告書の研究方法に詳細を記載した。

C. 結果：

1) 新興モルビリウイルス感染症の研究：

サルの新興モルビリウイルス感染症の原因病原体であるイヌディステンパーウイルス(CDV)のリバースジェネティクスに必要なプラスミドをすべて作製した。また、感受性マウスモデル作製のため、マカク属サル SLAM/nectin4 TG マウス作出を試みている。一方、一昨年に初めて分離同定されたネコモルビリウイルスの国内のネコにおける疫学調査を行った結果、抗体陽性率は 25%、ウイルス遺伝子陽性率は 29%で、香港と同様日本でもネコモルビリウイルス感染率は比較的高かった。ネコモルビリウイルス感染ネコのほとんどが腎炎陽性であることから、ネコモルビリウイルスと腎疾患の関連が疑われた(森川)。

2) ニホンザル血小板減少症の原因となる SRV のウイルス学的解析：

近年、京都大学霊長類研究所にてニホンザルが血小板減少症により大量死しサルレトロウイルス 4 型(SRV-4)との関連が示唆されたが、実験的に証明されていない。そこで、発症個体から分離した SRV-4 及び新たに作製した感染性遺伝子クローン由来の SRV-4 をニホンザルに実験感染したところ、血小板減少症が誘導された。また、SRV-4 がニホンザルに感染する際は、中性アミノ酸トランスポーターの一種である ASCT2 を利用することを明らかにし、この分子が多く発現している部位(肺や消化管)で SRV-4 が特に増殖していることを確認した。本研究により、ニホンザル血小板減少症の原因

ウイルスが SRV-4 であることを証明した(三浦)。

3) 狂犬病の病原性解析：

狂犬病ウイルス(RV)の自然感染では潜伏期間中に RV に対する抗体は産生されずウイルスも検出できないが、実験室内継代等で弱毒化させた固定毒は潜伏期間の短縮と一定化、免疫誘導能の増強といった特徴を示す。RV の G 蛋白質糖鎖修飾が街上毒と固定毒で異なることに注目して Kyoto 株(街上毒)と CVS-26 株(固定毒)の G 蛋白質の細胞内発現とその局在を *in vitro* で比較解析したところ、MNA 細胞内に感染した Kyoto 株(街上毒)と CVS-26 株(固定毒)で見られた G 蛋白質局在の違いが G 蛋白質のみを MNA 細胞に発現させた場合でも見られたことから、固定毒に特徴的な細胞膜からの RV 出芽は固定毒化で獲得された RV の G 蛋白質のアミノ酸 204 位への N 型糖鎖付加が大きく関与していた(井上)。

4) ヒトの狂犬病の診断・治療法に関する調査研究：

狂犬病は、発症すると有効な治療法がなく、ほぼ全例が死亡することから、狂犬病曝露後発症予防が極めて重要である。曝露後発症予防のうち、ザグレブ方式による接種の効果を検討した。海外産ワクチンを用いたザグレブ方式による曝露後発症予防が行われ、帰国後国産ワクチンにて接種を完遂した 3 例について、接種完遂後 2 週間での抗体価は防御抗体価(0.5IU/mL)を上回っていた。海外にてザグレブ方式が導入された症例について、国産ワクチンによる接種スケジュールの継続が可能であることが示唆された(菅沼)。

5) 野兎病の病原性発現機構の解析：

野兎病菌はマクロファージに感染・増殖する細胞内寄生菌である。これまで、マウス継代により、弱毒な野兎病菌株(SCHU P0 および P5) から強毒な野兎病菌株 (SCHU P9) を作出し、両者のゲノム比較解析から *pdpC* 遺伝子がマクロファージ内での増殖およびマウスに対する病原性に極めて重要である事を明らかにした。この弱毒株と強毒株の野兎病菌の 1604 遺伝子発現マイクロアレイ解析から、強毒株で発現上昇した 19 遺伝子、発現減少した 2 遺伝子が同定された。qRT-PCR 解析で同様に有意な発現変動が確認された Pullulanase (*pulB*) 遺伝子の病原性発現への関与を明らかにするため、強毒株の *pulB* 遺伝子を破壊した株 (*ΔpulB*) を作出し解析した結果、*pulB* 遺伝子はマクロファージ中での効率的な生育に必要不可欠であるが、マウスに対する病原性には関与しない事が明らかとなった (宇田)。

6) 動物由来細菌性腸管感染症の感染制御に関する研究：

動物園で飼養されている哺乳類 106 種から分離した菌株 1184 株を対象にし、*Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157、*Bacillus coagulans* JCM 2257、*Staphylococcus aureus* JCM 2413、*Escherichia coli* JCM 5491 に対して抗菌活性を示す菌株を探索したところ、*L. lactis* subsp. *cremoris*、*L. lactis* subsp. *lactis*、*Enterococcus faecalis*、*E. hirae* の 4 菌種に属する 21 菌株を得た。これらの菌株は培養上清を用いた試験においても抗菌活性を示したことから、新規バクテリオシンである可能性が高い。中には *Listeria monocytogenes* に対して抗菌活性を有する菌株が存在していた (山田)。

7) 食虫目、翼手目等のハンタウイルスの分子疫学情報の蓄積：

モンゴル、ベトナム、ミャンマー、日本およびロシアの野生小型哺乳類を調べた結果、モンゴルおよび日本のサンプルにそれぞれ 2 種類の異なるハンタウイルスの感染が確認され、同一地域に異なるハンタウイルスが共存していることを示しており、ハンタウイルスの進化を考える上で極めて重要な情報である。新しいハンタウイルスを分離するツールとしてトガリネズミ形目、齧歯目、翼種目の初代培養細胞の分離を広く行い、日本の齧歯目およびトガリネズミ目から 9 種 33 株、ベトナムの翼種目から 15 種 32 株の初代細胞の分離に成功した (新井)。

8) 中東呼吸器症候群 (MERS) の血清診断法：

MERS は 2012 年にサウジアラビアで新興した新型のコロナウイルスによる感染症でヒトコブラクダがヒトへの感染源と疑われている。しかし、MERS コロナウイルス (MERS-CoV) の自然宿主動物は未だ未同定であり、ヒトの血清診断や動物の血清疫学に必要なハイスループットかつ特異性の高い抗体検出法を確立するために、MERS-CoV の N および S タンパク質を組換えバキュロウイルスにより発現・精製した。また、MERS-CoV の N および S タンパク質に対するモノクローナル抗体を作製した。これらを用いて血清診断法を開発した (福士)。

9) コリネバクテリウムに関する研究：

ジフテリア様の症状を示すジフテリア毒素産生性の *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans*) による感染症について、呼吸器症

状を示す新規 2 症例が報告され、同感染症の感染状況によってはジフテリア毒素に対する免疫が成立しないことが示唆された。また、*C. ulcerans* のキャリアーとなる動物の検索からネコが *C. ulcerans* のキャリアーの一つになっていることが示唆された。感染症法の位置づけが異なる *C. ulcerans*、*Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) および *C. pseudotuberculosis* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から迅速簡易に鑑別診断できるマルチプレックス PCR 法を開発した。また、マウスを用いた *C. ulcerans* 感染モデルを作成した (山本)。

1 0) 野生動物の動物由来感染症病原体の保有状況の網羅的調査：

野生動物を中心とした動物由来感染症病原体の保有状況を把握するためにウイルス分離・遺伝子検出・抗体検査を実施した。また、これらの抗原・抗体の簡便な検出系を確立した。その結果、1) イノシシからダニ媒介性脳炎ウイルスに近縁なウイルス遺伝子が検出され、周辺のマダニの 4.6% から遺伝子が検出された。2) フラビウイルスに様々な反応性を示す単クローナル抗体を用いて、フラビウイルス抗原を検出可能な診断系および様々な動物種において応用可能な抗体検出系を確立した。3) 国内のフェレットに 2 種類のコロナウイルスが蔓延していることを証明した。4) スンクスから新規コロナウイルス遺伝子を検出した。5) イルカから新規ヘルペスウイルスを分離した (前田)。

1 1) 病原体媒介マダニの遺伝種同定法の確立：

日本国内に生息するとされる既知のマダニ 47 種中 39 種について、*mt-rrs* の遺伝

子配列を決定し系統解析を行った。その結果、39 種中 36 種 (92.3%) のマダニは DNA 配列により区別できる。他方、ダグラスチマダニ、ヤマトチマダニ、オオトゲチマダニの 3 種は、*mt-rrs* の遺伝子配列では区別できなかった。*mt-rrs* による遺伝学的同定法は形態学的同定法に対して、90% 以上の感度を示したことから、マダニ形態同定が困難な場合でもその迅速同定が可能になった (川端)。

D. 考察：

新興・再興感染症の大部分が動物由来感染症である。これらのうち国内で稀にしか発生していない動物由来感染症について、疫学的知見を集積しヒトへの感染リスクを評価する。また、これらの感染症が国内で発生した場合の診断・迅速検査法を確立する。重要な動物由来感染症の病原性発現機構に関する研究を行い、霊長類等に発生した新興感染症に関してヒトへのリスクを科学的に評価する。動物の常在細菌や環境中の菌等から病原性腸内細菌に対し抗菌作用を示す菌種を探索する。これらにより総合的に動物由来感染症対策の体制整備を目指すことを目的とする。本研究計画は 3 年間にわたる研究で、今年度は初年度にあたる。結果に記載したように、対象とするモルビリウイルス、サルレトロウイルス、狂犬病ウイルス、新興コロナウイルス、ハンタウイルス、野兎病菌、コリネバクテリウムに関しては、ほぼ当初の研究計画の予定の結果を得ている。また、哺乳類由来菌株から抗菌活性を示す 21 菌株が選択された。今後、バクテリオシン産生の有無に関して解析される予定である。さらに、国

内の野生動物から動物由来感染症病原体の保有状況の網羅的調査を行い、ダニ媒介性脳炎ウイルスに近縁なウイルス、新規コロナウイルス、新規ヘルペスウイルスを検出・同定した。今後これらの検出系を確立し、より詳細な疫学調査を行う予定である。

近年、SFTS、ライム病、日本紅斑熱などマダニ媒介性感染症が問題となっている。さらにイノシシからダニ媒介性脳炎ウイルスに近縁なウイルスが同定されている。マダニの病原体保有調査でボトルネックとなるのはマダニ種の同定である。このため、マダニの形態学的同定法以外の迅速同定法開発が急務である。そこで、国内のマダニのミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子 (*mt-rrs*) 配列情報のデータベースを構築し、国内のマダニ 39 種中 36 種を迅速鑑別可能な遺伝的同定法を確立した。今後、国内に生息する 47 種の遺伝的同定法へと拡大する予定である。

E. 結論

新規モルビリウイルスであるネコモルビリウイルスがネコに持続感染すること、2 種のウイルス株間での recombination が起こり得ることが明らかになった。ニホンザルから分離された SRV4 のレセプターが ASCT2 であり、致命的な血小板減少症の原因であることを明らかにした。狂犬病の固定毒と街上毒の G 蛋白質の性状・細胞内局在が、N 型糖鎖結合の違いによることを明らかにした。ヒトの狂犬病の暴露後免疫におけるザグレブ方式を海外で受けた場合に、接種完遂後 2 週間の時点で防御抗体価レベルを上回り、国産ワクチンによる接種スケジュールの継続が可能と考えられた。MERS コロナウイルスの血清学的診断法、血清疫学に必

要な方法を開発した。野兎病菌の新規病原性遺伝子である *pdpC* 遺伝子の病原性機構には *pulB* が部分的に関与することが示唆された。コリネバクテリウム属菌から *Corynebacterium ulcerans* 感染症、*C. diphtheriae* 感染症 (ジフテリア) 等を鑑別するマルチプレックス PCR 法を開発した。国内のネコが *C. ulcerans* のキャリアであることが分かった。イノシシやマダニからダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) に近縁なウイルス遺伝子を検出した。スunksから新規コロナウイルスを検出し、フェレットに 2 種のコロナウイルス感染が蔓延していることを明らかにした。イルカから新規ヘルペスウイルスを分離した。モンゴルおよび日本の野生小型哺乳類にそれぞれ 2 種類の異なるハンタウイルスの感染が確認され、同一地域に異なるハンタウイルスが共存していることが示された。哺乳類由来菌株 1184 株から 21 株でバクテリオシンの産生を確認した。新興マダニ媒介性感染症 (新興回帰熱、アナプラズマ症、SFTS 等) に関するマダニの疫学において重要なマダニの同定法として形態学的同定法以外の遺伝的鑑別法を開発した。

F. 健康危険情報

サルでの CDV 感染症の流行は 2008 年以降報告されていない。また、SRV4 によるニホンザルの致命的血小板減少症も京都大学霊長類研究所では制御されている。これらのヒトへの感染例は未だ報告されていない。狂犬病は、これまで日本と同様清浄国とされていた台湾で、野生動物のイタチアナグマで流行していることがわかった。イヌへの感染は 1 例にとどまっている。

G. 研究発表

各研究分担者及び「III. 研究成果の刊行
に関する一覧表」に記載した。

II. 分担研究報告書

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：新興モルビリウイルスの病原性と動物由来新興ブニヤウイルスの
国内疫学と総括

研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所獣医科学部部長）

研究要旨：新興・再興感染症のほとんどが動物由来感染症である。サルの新興モルビリウイルス感染症の原因病原体であるイヌディステンパーウイルス(CDV)のリバースジェネティクスに必要なプラスミドをすべて作製した。また、感受性マウスモデル作製のため、マカク属サル SLAM/nectin4 TG マウス作出を試みている。一方、一昨年に初めて分離同定されたネコモルビリウイルスの国内のネコにおける抗体陽性率は 25%、ウイルス遺伝子陽性率は 29%で、香港と同様日本でもネコモルビリウイルス感染率は比較的高かった。ネコモルビリウイルス感染ネコのほとんどが腎炎陽性であることから、ネコモルビリウイルスと腎疾患の関連が疑われた。ネコモルビリウイルスに近縁なウイルスが他種動物やヒトに存在するかは全く不明であり、今後の調査が必要である。

研究協力者：吉河智城、谷口怜、福士秀悦、西條政幸（同、ウイルス第一部）、酒井宏治、竹田誠（同、ウイルス第三部）、河合康洋、山田靖子（同、実験動物管理室）、朴ウンシル、鈴木道雄、木村昌伸、今岡 浩一（同、獣医科学部）、久保田菜美、齊藤隆一、水谷浩志、丸山啓二（東京都動物愛護センター）、古谷哲也、水谷哲也（東京農工大）

A. 目的と意義：

ほとんどの新興・再興感染症は、動物由来感染症である。パラミクソウイルス科の

モルビリウイルスは宿主域を比較的拡大しやすいウイルスと考えられている。遺伝的解析から、麻疹ウイルスは牛疫の原因ウイルスであるリンダーペストウイルスがヒトへ馴化したものと考えられている。一方、イヌ類を自然宿主とするイヌディステンパーウイルス (Canine Distemper Virus, CDV) は、自然界で宿主域を拡大し、多くの野生動物に致死感染を引き起こしている。CDV は中国、日本などでマカク属サルにまで感染宿主域を拡大し、大規模な致死感染の流行を引き起こした。これまでの研究で、イヌなどから分離された CDV と比較

して保存された 19 箇所のアミノ酸がサルから分離された CDV では変異していること、これらの変異は、中国および日本のサルから分離されたウイルスで共通していることが明らかになっている。また、モルビリウイルスのレセプターである SLAM がマカク属サルでは ectodomain の V domain の N 末端の 2 アミノ酸 (28 H, 49 H) がヒトや他の霊長類(28R, 49Y)と異なり、このためマカク属サルでは CDV に感受性があることも明らかになった。サルから分離された CDV は、イヌでも高病原性を示すことから、マカク属サルでの CDV による致死的感染症は、CDV がマカク属の SLAM を効率よく利用できるように馴化したためではなく、遺伝子全般に認められる 19 アミノ酸の変異により病原性が高くなっている可能性が示唆された。一方、サルから分離された CDV は H 蛋白の 1 アミノ酸の変異により容易にヒト SLAM を効率よく利用できるようになる。そこで、本研究では、サルから分離された CDV の遺伝子改変を可能にするためリバーシジェネティクスにより感染性ウイルスを作製し、強毒化に関わる変異を同定する。また、病原性解析には小動物モデル系が必須であるため、マカク属サル SLAM と Nectin4 を knock in/knock out した B6 マウスを作製する。これらを用いて CDV の宿主域拡大に関わる遺伝的変異を明らかにし、将来ヒトへの感染域拡大に繋がる可能性を明らかにすることを目的とする。

一方、一昨年に香港でネコモルビリウイ

ルス (feline morbillivirus; FMoV) が分離同定された。本ウイルスは、これまで全く未定のウイルスであったため、近縁なウイルスが他種動物やヒトに感染しているのか否かも不明で、感染症との関連も不明である。そこで、国内のネコへのネコモルビリウイルスの浸淫状況を調査し、感染症との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 材料と方法：

1) サルから分離された CDV のリバーシジェネティクス用プラスミドの作製：

T7promoter-CDV-CYN07-dV-cDNA-delta ribozyme のコンストラクトを作製した。また、pKS336-CDV-CYN07-dV-NP, pKS336-CDV-CYN07-dV-P, pKS336-CDV-CYN07-dV-L を作製した。

2) マカク属 SLAM knock-in マウス作製用ベクターの作製：

大野らがヒト SLAM knock-in マウス作製に用いたベクター pTK2-5 (JVI 81:1650-59, 2007) をベースに V domain をコードする exon 2 をマカク属 SLAM に入れ替えた。

3) マカク属 nectin4 トランスジェニックマウス作製用ベクターの作製：

CAG promoter-stop-cassette-mNectin4-cDNA ベクターを作製する。マウス nectin4 KO-ES 細胞にベクターを導入し TG マウスを作製する。本 TG マウスでは、Tamoxifen 投与により Keratin14-CreERT2 が上皮細胞特異的に核内移行し、stop-cassette 除去。その結果、macNectin4 を発現するマウスとな

ると予想される。

4) FMoV 抗体検出系の確立：

FMoV の NP cDNA を化学合成し、pKS336 にクローニングした。これを HeLa 細胞に導入し FMoV NP 発現 HeLa 細胞を樹立し、塗抹標本を作製して間接蛍光抗体法用抗原とした。本抗原により国内のネコの血清抗体を調べた。

5) FMoV 感染ネコからのウイルス遺伝子検出：

FMoV 抗体陽性、抗体陰性ネコの尿から RT-PCR によりウイルス遺伝子を検出した。

6) 国内の感染ネコの FMoV の遺伝子配列の決定：PCR 陽性動物の尿から重複する RT-PCR により全長をカバーする cDNA を増幅しウイルスの遺伝子配列を決定した。

(倫理面からの配慮について)

遺伝子組換え実験では機関承認及び大臣確認実験として承認を受け、動物実験にあたっては国立感染症研究所動物実験委員会に申請し承認されている。

C. 結果：

1) サルから分離された CDV のリバーシジェネティクス用プラスミドの作製：

T7promoter-CDV-CYN07-dV-cDNA-delta ribozyme のコンストラクトを作製した。全塩基配列を決定し、変異がないことを確認した。

T7promoter-CDV-CYN07-dV-cDNA-delta ribozyme から NP, P, L 遺伝子領域を PCR に

より増幅し、pKS336-CDV-CYN07-dV-NP, pKS336-CDV-CYN07-dV-P, pKS336-CDV-CYN07-dV-L を作製した。これらの遺伝子配列を決定し、変異がないことを確認した。

これらのプラスミドを用いて T7-polymerase 発現細胞へ導入して感染性ウイルスを回収する実験を開始している。

2) サルから分離された CDV 等の病原性解析可能な小動物モデル系の開発：

これまでにカニクイザルを用いて、サルから分離された CDV CYN07-dV 株が全身感染を起すことを明らかにしている。しかし、CDV CYN07-dV 株の病原性に関する遺伝子変異を解析するにはリバーシジェネティクスにより種々のキメラ CDV や変異導入 CDV を作製して病原性を比較する必要がある。これらの解析には小動物モデルが必須である。モルビリウイルスは、免疫系細胞 (T 細胞、B 細胞、dendric 細胞等) では SLAM を、上皮系細胞等では nectin4 を介して感染する。そこで、小動物モデル作製のため、マカク属サル SLAM 及び nectin4 発現マウスを作製する。マカク属サル SLAM に関しては、大野らがヒト SLAM knock-in マウス作製に用いたベクター pTK2-5 (JVI 81:1650-59, 2007) をベースに V domain をコードする exon 2 をマカク属 SLAM に入れ替えた。V domain の N 末端の 2 アミノ酸をヒトや他の霊長類 (28R, 49Y) 型からマカク属サルの 28 H, 49 H に置換するため、部位特異変異により pTK2-5 のヒト SLAM exon2 に C273T, A339G の変異

を導入した。これをベースに targeting vector を作製し、今後、マカク属 SLAMF7 ES 細胞を樹立するため IDG26.10-3ES 細胞に transfection し G418 選択後に相同組換えを PCR で確認する。Neo 耐性遺伝子を除去するため Cre リコンビナーゼ発現プラスミド pCAG-Cre を transfection して loxP-Neo-loxP 欠損 macSLAM^{KI/+}IDG26.10-3ES 細胞を選抜する (図 1)。マカク属 nectin4-TG マウス作製には、conditional expression vector である pEx-CAG-stop-bpA に macNectin4 cDNA を挿入する。IDG26.10-3ES 細胞の Rosa26 遺伝子座のアクセプターアレルの hygromycin 耐性遺伝子部位を DNA 組換え配列 (att 配列) による組み換えを行う。macSLAM^{KI/+}IDG26.10-3ES 細胞に pEx-CAG-stop-bpA-macNectin4 と BP クローニング発現 pCAG-C31 Int と cotransfection し、G418 選択後にマカク属 nectin4 が相同組換えされた細胞 (macSLAM^{KI/+},macNectin4^{+/+}-IDG26.10-3ES 細胞) を選択する (図 2)。これを用いてキメラマウスを作製し最終的には I 型インターフェロンレセプター KO を導入する予定である。

3) FMOV 感染ネコの調査 :

FMOV の NP cDNA を合成し pKS336 にクローニングした。これを HeLa 細胞に導入後 FMOV NP 発現 HeLa 細胞を樹立し、塗抹標本を作製して間接蛍光抗体法用抗原とした。組換え NP の発現は、ウサギで作製した FMOV-NP のペプチド抗体 3 種類 (FMOV の NP のアミノ酸 421-440 位、478-497 位、

500-519 位のペプチド) を用いて確認した (図 3)。いずれの抗体も FMOV NP 発現 HeLa 細胞の細胞質内の NP 抗原の顆粒状に集積している部位を特異的に染色した (図 3)。いずれの抗体も CDV とは反応しなかった。間接蛍光抗体法用抗原を用いて、動物愛護センターで採取されたネコ血清 24 検体を調べた結果、6 検体が抗体陽性であった (表 1)。一方、これらの尿からの FMOV 遺伝子検出を RT-PCR あるいは nested RT-PCR で行った結果、7 検体が陽性であった (表 1)。これらの腎組織の病理組織学的解析から腎炎と診断されたのは 15 検体であった (表 1)。ウイルス遺伝子陽性 7 検体のうち 5 検体が抗体陽性、6 検体が軽度から重度の腎炎であった。抗体陽性の 6 検体の全てが腎炎陽性であった。

4) 国内の FMOV の分子系統樹解析 :

上記のネコ検体以外に 1 検体 (抗体陰性) の尿から遺伝子が検出された。これらの部分 NP 遺伝子の配列データから、香港で分離された FMOV と分子系統樹解析を行うと図 4 に示すように香港 M252A 株に遺伝的に近縁なウイルス、香港 776U/761U 株に近縁なウイルス、いずれとも遺伝的に距離のあるウイルスに分類された (図 4)。この領域の遺伝子配列とアミノ酸配列は株間で 96~98%、92% 一致した。

5) 異なるグループ間の遺伝子組み換えと考えられる FMOV :

比較的尿中のウイルス遺伝子量の多い N001, N003, N073 株の全塩基配列を決定し

た。遺伝子配列は重複する複数の RT-PCR 産物を dideoxy 法により決定した。その結果、N003 株は、F 遺伝子の 3'側半分から H 遺伝子の 5'側半分程度の領域は香港 776U 株に遺伝的に近縁で、この領域以外は N073 株と極めて遺伝的に近かった（図 5）。BOOTSCAN algorithm による解析でも N003 株は major parent が N073 株で minor parent が香港 776U 株であるとの結果が得られたことから、2 種のウイルスの組み換えによるキメラであると考えられた（図 6）。

D. 考察：

マカク属のサルで流行した CDV 感染症は、CDV が宿主域を霊長類まで広げたことからヒトへの感染リスクが危惧される。これまでの解析から、1) サルから分離された CDV は、イヌ、サルの SLAM を介して感染するが、ヒト SLAM は利用できない。イヌ、サル、ヒトの Nectin4 を介して感染できる、2) H 蛋白の 541 位の近傍の 1 アミノ酸変異でヒトの SLAM を介して感染できるようになる、3) イヌから分離された CDV も同様の感染スペクトラムを持つ、4) モルビリウイルスの H 蛋白が結合する SLAM の V-domain は類人猿とマカク属で高度に保存されている（2 アミノ酸のみ異なる）ため、マカク属サルは麻疹ウイルスに感受性である。マカク属サルが CDV に感受性なのは、V-domain の 2 アミノ酸の相違による、5) サルから分離された CDV は、イヌにも非常に強い病原性を示す、6) サル

での流行後期には、初期の CDV の遺伝子配列に 11 塩基の変異が蓄積したことが分かっている。これらのことから、本来 CDV はマカク属サルの SLAM を介して感染できるが、サルでの流行を起こした CDV は強毒であると考えられる。麻疹排除後に定期ワクチン接種が中止されると、このような強毒 H 蛋白の 1 アミノ酸変異により人 SLAM へ馴化した強毒な CDV がヒトの新興感染症を起すようになるリスクがある。そこで、どのような遺伝的な変異が CDV の病原性強化に関与しているかを明らかにするため、感受性マウスの作製を試みている。マカク属 SLAM knock-in、マカク属 nectin4 TG、I 型 interferon-Receptor KO マウスを作製する予定である。このマウスが発症モデルになれば、RG によりサルから分離された CDV とイヌ由来 CDV の種々のキメラを作製し病原性に関与する変異を同定する予定である。

一方、一昨年に初めて分離同定されたネコモルビリウイルスの国内のネコにおける抗体陽性率、ウイルス遺伝子陽性率を調査した結果、抗体陽性率は 25%、ウイルス遺伝子陽性率は 29%で、香港と同様日本でもネコモルビリウイルス感染率は比較的高かった。また、ウイルス遺伝子陽性 7 検体のうち 5 検体が抗体陽性と高率にウイルスが持続感染していることがわかった。感染ネコのほとんどが腎炎陽性であることから、ネコモルビリウイルスと腎疾患の関連が疑われる。また、日本のウイルスは香港分離

株の 2 グループにそれぞれ遺伝的に近縁なもの、いずれとも遺伝的に距離のあるグループに分類された。さらに、異なるグループのウイルス間の組み換えによるキメラであると考えられる株が 1 株認められた。今後、ウイルス分離してレセプター等の同定を行い、病気との関連を明らかにしたい。また、近縁なウイルスがヒトや他の動物に感染しているかを明らかにしたい。

E. 結論

サルに致死性感染症の流行の原因となった CDV は病原性が高いことから、その原因となる変異等を解析する RG 系の作製がほぼできた。病原性を解析するために小動物モデルが必要であることからマカク属サル SLAM/nectin4 TG マウスの作出を行っている。

ネコモルビリウイルスの国内のネコにおける抗体陽性率は 25%、ウイルス遺伝子陽性率は 29%で、香港と同様日本でも比較的高かった。ネコモルビリウイルス感染ネコのほとんどが腎炎陽性であることから、腎疾患の関連が疑われた。

F. 健康危険情報

中国では 2006 年から数回アカゲザルに致死性 CDV 感染症が発生し、日本では 2008 年にカニクイザルで流行した。その後、マカク属サルでの CDV 感染症の発生は報告されていない。

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Uda A, Sekizuka T, Tanabayashi K, Fujita O, Kuroda M, Hotta A, Sugiura N, Sharma N, Morikawa S, Yamada A. Role of Pathogenicity Determinant Protein C (PdpC) in Determining the Virulence of the *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* SCHU. PLoS One. 2014 Feb 18;9(2):e89075.
- 2) Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, et al. , Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. J Inf Dis., 2014 Mar;209(6):816-27.
- 3) Hotta A, Fujita O, Uda A, Sharma N, Tanabayashi K, Yamamoto Y, Yamada A. and Morikawa S. In vitro Antibiotic Susceptibility of *Francisella tularensis* isolates from Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 2013;66(6):534-6.
- 4) Fujita O, Hotta A, Uda A, Yamamoto Y, Fujita H, Shinya F, Asano S, Morikawa S, Tanabayashi K, Yamada A. Identification of the source of *Francisella tularensis* infection by a multi-locus variable-number tandem repeat analysis. Jpn. J. Infect. Dis. 2013;66(6):543-5.
- 5) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akihiko Uda, Osamu Fujita,

- Toshio Mizoguchi, Junji Shindo, Chun-Ho Park, Noboru Kudo, Hitoshi Hatai, Toshifumi Oyamada, Akio Yamada, Shigeru Morikawa, and Kiyoshi Tanabayashi. Serosurveillance for *Francisella tularensis* among wild animals in Japan using a newly developed competitive ELISA. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, in press
- 6) Arai S, Nguyen ST, Boldgiv B, Fukui D, Araki K, Dang CN, Ohdachi SD, Nguyen NX, Pham TD, Boldbaatar B, Satoh H, Yoshikawa Y, Morikawa S, Tanaka-Taya K, Yanagihara R, Oishi K. Novel Bat-borne Hantavirus, Vietnam. Emerg Infect Dis. 2013 Jul;19(7):1159-61.
- 7) Sunohara M, Morikawa S, Fuse A, Sato I. Role of promoter element in c-mpl gene expression induced by TPO. Okajimas Folia Anat Jpn. 2013;89(4):131-5.
- 8) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, and Takeda M. Canine Distemper Virus Associated with a Lethal Outbreak in Monkeys Readily Adapted to Use Human Receptors. J Virol. 2013, 2013 Jun;87(12):7170-5.
- 9) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. J Virol. 2013, 87(2): 1105-1114
- 10) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Shigeru Morikawa, Akio Yamada, Kiyoshi Tanabayashia . Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia using a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Clinical and Vaccine Immunology, 2013 20(1): 9-16
- (和文)
- 11) 下島昌幸、福士秀悦、谷 英樹、吉河智城、森川 茂、西條政幸：日本における重症熱性血小板減少症候群、ウイルス 63: 7-12, 2013.
- 12) 森川 茂：重症熱性血小板減少症候群、獣医学雑誌 17(2)142-143, 2014.
- 13) 森川 茂：重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の概要、Journal of Veterinary Medicine (獣医畜産新報) 67(3):167-170, 2014
2. 学会発表
- 1) 前田健、高橋徹、奥田優、水谷哲也、山岸拓也、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスの分離・同定 第 156 回日本獣医学会学術集会

- 2013.9.20～22 岐阜大学
- 2) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、井上智、今岡浩一、柳井徳麿、下島昌幸、西條政幸、前田健 動物の SFTS ウイルス抗体調査 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20～22 岐阜大学
 - 3) Nguyen Dung、下田宙、濱崎千菜美、寺田農、野口慧多、鋤田流星、高野愛、森川茂、前田健 飼育犬から重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスと交差する抗体の検出 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20～22 岐阜大学
 - 4) 谷口怜、福士秀悦、Joseph Masangkay、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからの SFTS ウイルスと交差する抗体の検出 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20～22 岐阜大学
 - 5) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、安藤秀二、川端寛樹、高野愛、前田健、藤田博己、澤邊京子、西條政幸、森川茂 マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20～22 岐阜大学
 - 6) 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、宇田晶彦、谷口怜、福間藍子、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の確定診断に使用されているコンベンショナルPCR の評価、及びリアルタイム定量 PCR との比較 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 7) 福間藍子、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、下島昌幸、森川茂、前田健、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の血清学的診断法の開発 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 8) 西條政幸、高橋徹、前田健、水谷哲也、大松勉、吉河智城、谷英樹、福士秀悦、下島昌幸、福間藍子、緒方もも子、鈴木忠樹、中島典子、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、山岸拓也、倉根一郎、森川茂 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された 11 名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 9) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、福間藍子、加来義浩、朴ウンシル、谷英樹、吉河智城、井上智、今岡浩一、下島昌幸、西條政幸、前田健 SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 10) 谷口怜、福士秀悦、Joseph Masangkay、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌