

図 5. $\Delta pulB$ 株のマウスに対する病原性

1 群 4 匹の C57BL/6J マウスに 10^3 CFU の各野兔病菌株を腹腔内接種し、体重および生残を確認した。

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：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

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 准教授）

研究要旨：最近、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た。これまでの次世代シーケンサーなどの研究からサルレトロウイルス 4 型(SRV-4)との関連が示唆されたが、確定的ではなかった。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 がとく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。

研究協力者：宮沢 孝幸(京都大学ウイルス
研究所 細胞生物学研究部門信号伝達学研
究分野准教授)

免疫不全を引き起こす一方、このような急性感染がみられるのは珍しい。そこで本研究において、感染実験により、ニホンザルにおける SRV-4 感染による病態を調べることにした。

A. 研究目的：

2001 年から 2010 年の間に 2 度、京都大学霊長類研究所にてニホンザルが急性血小板減少症を呈して大量死する事例があった。次世代シーケンサーによる解析により、サルレトロウイルス 4 型(SRV-4)との関連が強く示唆された。SRV-4 はレトロウイルス科ベータレトロウイルス属であり、近縁なウイルスとして SRV-1、SRV-2 や SRV-3 が挙げられる。多くの SRV は慢性感染による

B. 研究方法：

SRV-4 のウイルス学的、遺伝学的性状を解析するにあたって、感染性分子クローンの作製を試みた。上記の目的を達成するために、発症死亡個体の血漿より SRV-4 を分離し、SRV-4 持続感染細胞を作製した。その後、ゲノム DNA を抽出し、SRV-4 特異的プライマーを用いて PCR を行い、SRV-4 全

長をクローニングした。作製したクローンの感染性を LacZ マーカーレスキューアッセイを用いて確認した。

SRV-4 はヒト細胞に感染する際に受容体として中性アミノ酸トランスポーターの一つである ASCT2 を利用することがわかっている。そこで、ニホンザルの ASCT2 が SRV-4 の機能的受容体となりうるか確認するために、ニホンザルより分離した末梢血単核球(PBMC)由来の RNA よりニホンザル ASCT2 をクローニングした。受容体の機能を確認するために、ニホンザル ASCT2 を、SRV-4 非感受性細胞であるマウス線維芽細胞(MDTF 細胞)に発現させ、SRV-4 を接種した。また、ニホンザル各組織での ASCT2 発現量をリアルタイム RT-PCR で確認した。さらに SRV-4 が実際にニホンザルに血小板減少症を引き起こすか確認するために、感染実験を行った。雌 2 頭(JM1、JM2)、雄 2 頭(JM3、JM4)のニホンザルに SRV-4 持続感染細胞由来の SRV-4 を 10^7 TCID₅₀ 以上、雄 2 頭(JM5、JM6)に SRV-4 感染性遺伝子クローン由来の SRV-4 を 10^7 TCID₅₀ 以上、腹腔及び静脈内に接種した。接種後、継時的に血液を回収し、血小板数等の一般血液性状を解析した。また、血液細胞への感染を PCR で確認し、血漿中のウイルス RNA をリアルタイム RT-PCR で確認した。血小板数が $5000/\mu\text{l}$ より減少したのちに実験殺を実施し、全身組織を回収し、PCR で SRV-4 の感染部位を特定した。また、各組織間での SRV-4 複製状況をリアルタイム RT-PCR 及

び免疫組織染色で確認した。

C. 研究成果：

ニホンザルより分離された SRV-4 は既存の SRV-4(NC_014474)と塩基配列で 99%相同であった。また、作製したクローンは感染性であることが確認できた。SRV-4 は MDTF 細胞には感染しないが、ニホンザル ASCT2 を MDTF 細胞に発現させると感染した。このことから、ニホンザル ASCT2 は SRV-4 の受容体であることが明らかとなった。また、ニホンザル ASCT2 は肺や消化管等で高く発現していた(図 1)。

実験感染を行ったところ、SRV-4 は感染後約 1 ヶ月でニホンザルに血小板減少症を誘導した(図 2)。すべての接種個体において、接種後約 1 週間で血液細胞への感染を PCR によって確認できた。また、血漿中の SRV-4RNA 量は接種後約 1 週間から解剖時まで約 $10^4\sim 10^7$ コピー/ml を維持し続けた。剖検時、頭部や腹部に点状出血が確認でき、死亡個体(JM3)において肝臓付近に血腫が確認できた。また、全身の臓器よりゲノム DNA を抽出し、感染部位を PCR で解析したところ、ほぼすべての臓器への感染が確認された。JM6 及び JM7 の各組織での SRV-4 の SRV-4 複製状況をリアルタイム RT-PCR 及び免疫組織化染色により検索したところ、SRV-4 は肺や消化管、脾臓、胸腺および各リンパ節で多く増殖していた(図 3、図 4)。加えて、すべての接種個体の血漿、PBMC 及び骨髄より SRV-4 の再分離

に成功した。

D. 考察：

SRV-4 は、感染末期個体において、肺や消化管などの組織で選択的に増殖するのは機能的受容体である ASCT2 が多く発現しているためだと考えられる。また、SRV-4 はリンパ球でもよく増殖することから、これらが集まるリンパ系組織でも多く検出されたと推察される。

E. 結論

本研究により、霊長類研究所で起こったニホンザル血小板減少症は SRV-4 感染によるものであることが確定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

なし

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

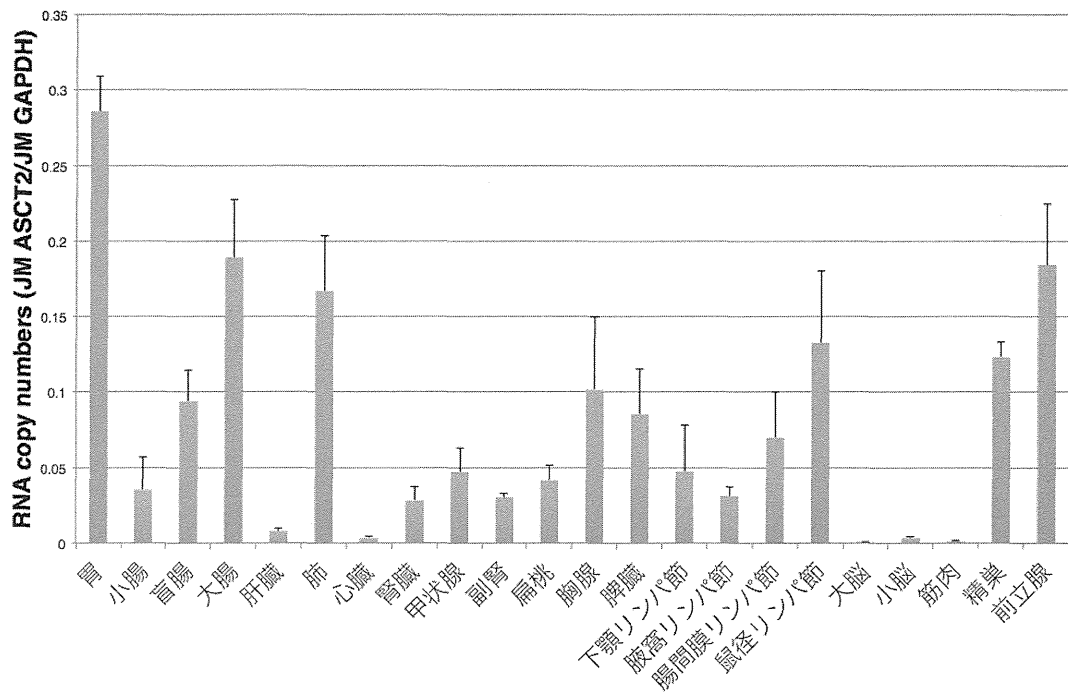


図1: 各組織でのニホンザルASCT2RNA発現量

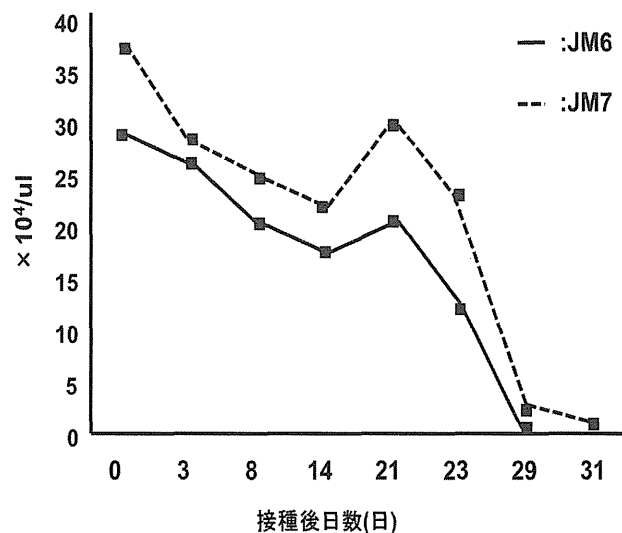


図2: 感染性分子クローン由来SRV-4接種実験におけるニホンザルの血小板数の推移

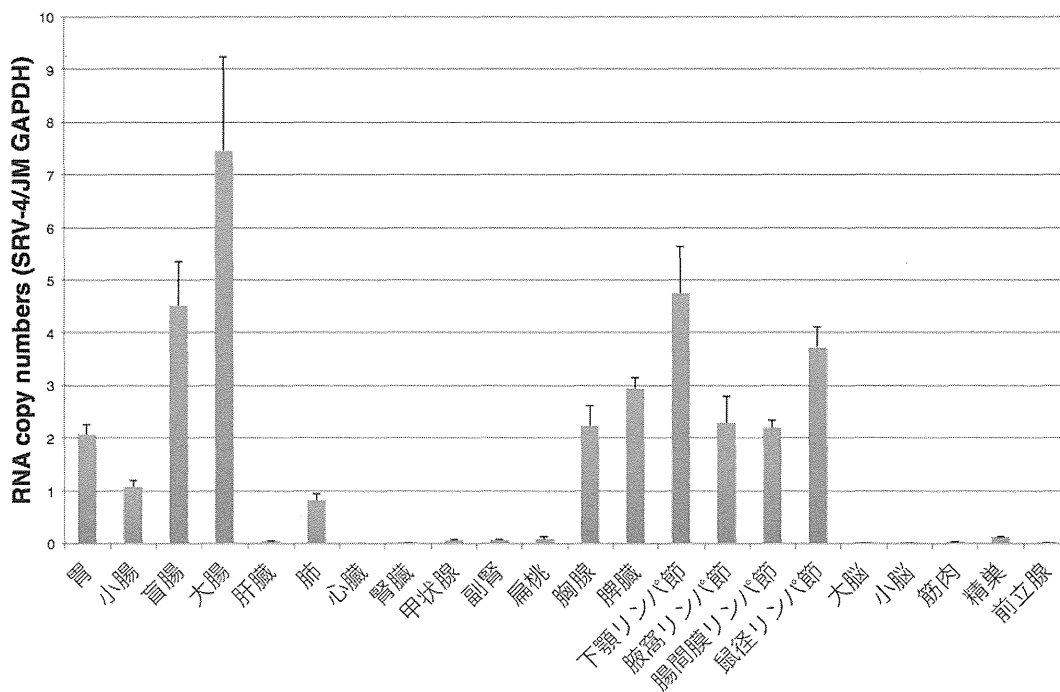


図3: 各組織でのSRV-4RNA発現量

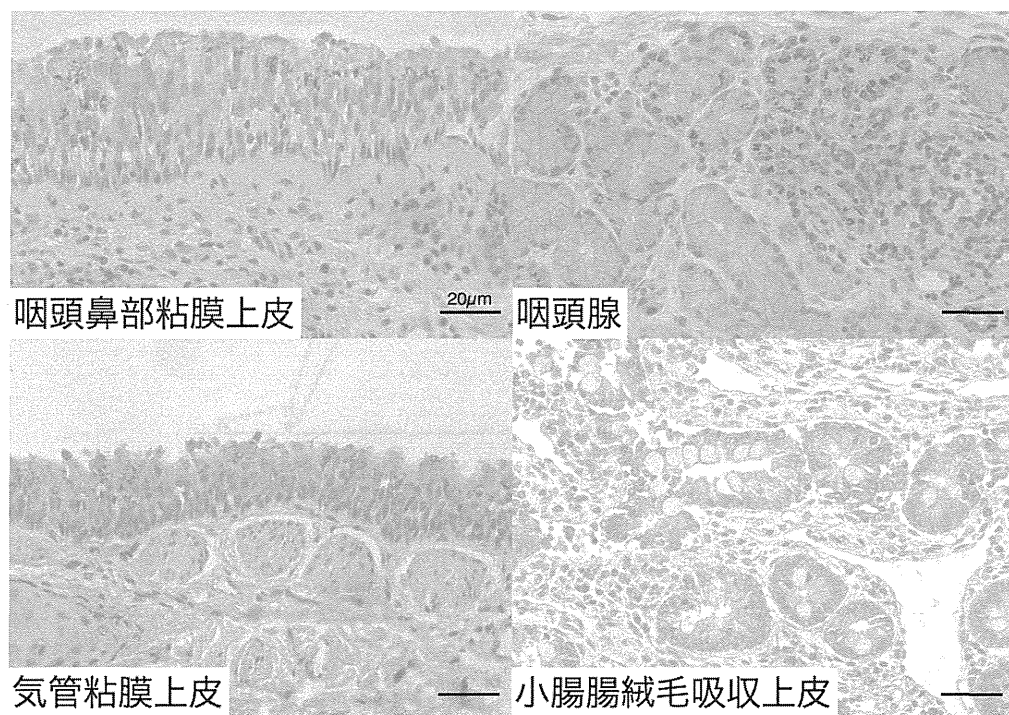


図4: 抗SRV-4カプシド抗体による組織免疫染色

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：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

研究分担者：前田 健（山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室）

研究要旨：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、更には抗原・抗体の簡便な検出系を確立した。その結果、1) 山口県で捕獲されたイノシシの肝臓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た。周辺のダニを調査した結果、4.6%のダニから同様の遺伝子が検出された。2) フラビウイルス科フラビウイルス属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) トガリネズミ目のスunksから新規コロナウイルス遺伝子を検出した。これまでの属に分類されないウイルスの可能性がある。5) 海棲哺乳類のイルカから新規ヘルペスウイルスの分離に成功した。

研究協力者：下田 宙、野口慧多、寺田豊、鈴木絢子、米満研三（山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室）

A. 研究目的：

本研究は野生動物の保有する動物由来ウイルスの探索を目的として、1)人獣共通感染症として重要であるフラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスについて、山口県下関市のイノシシおよびシカからフラビウイルス共通のプライマーを用いて遺伝子検出を試みた。2) 多くの動物種において応用可能なフラビウイルス共通および日

本脳炎ウイルス特異的な抗体・抗原検出系の確立を試みた。3) フェレットに猫伝染性腹膜炎様の症状を引き起こすことがあるフェレットコロナウイルスの国内における蔓延状況を調査した。4) スunksからコロナウイルス共通プライマーを用いて遺伝子検出を試みた。5) ウイルス感染症の知見が乏しい鯨類や鰭脚類などの海棲哺乳類からウイルスの遺伝子検出・ウイルス分離・培養細胞の樹立を試みた。

B. 研究方法：

1) イノシシおよびシカからフラビウイル

ス遺伝子の検出：

サンプル：2012年に山口県で捕獲されたイノシシ46頭、シカ14頭の肝臓および2013年に山口県で捕獲されたイノシシ37頭、シカ70頭の血清を供試した。

フラビウイルス遺伝子検出：マルチピーズショッカーを用いて破碎した肝臓からRNAeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用してRNAを抽出した。また、血清からQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用してRNAを抽出した。得られたRNAをもとにOne Step RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いてRT-PCRを実施し、TaKaRa Ex Taqを用いてnested PCRを実施した。プライマーはFirst PCRではMAMD (5'-AAC ATG ATG GGR AAR AGR GAR AA-3')とcFD2 (5'-GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA G-3')、Second PCRではFS778 (5'-AAR GGH AGY MCD GCH ATH TGG T-3')とcFD2を使用した。陽性が疑われたサンプルは塩基配列を決定し、最終的に判断した。また、得られた塩基配列をもとに系統樹を作成した。

2) フラビウイルス抗原および抗体検出系の確立：

単クローナル抗体：当研究室で作製した日本脳炎ウイルスに対する単クローナル抗体(表1)、3-2D6(フラビウイルスすべてに反応)、3-3B10(ダニ媒介性脳炎ウイルス以外のフラビウイルスに反応)、3-1D7(日本脳炎ウイルス血清群特異的に反応)、3-1C2(日本脳炎ウイルス特異的に反応)に

加えて、市販されている抗フラビウイルス単クローナル抗体4G2を用いた。単クローナル抗体はすべてProtein G Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia Biotech AB)を用いて精製した。単クローナル抗体のペルオキシダーゼ標識には Peroxidase Labeling Kit-NH₂ (Dojindo) を用いた。

ウイルス：JEV/sw/Chiba/88/2002(遺伝子型1)(国立感染症研究所より分与)を用いた。

血清：日本脳炎ウイルス実験感染犬の感染後0, 4, 7, 14, 28, 35日目の血清を抗体検出系の条件設定に用いた。また、九州地方の犬100頭、山口県で捕獲されたイノシシ50頭の血清を供試した。

フラビウイルス抗原検出系の確立：抗フラビウイルス単クローナル抗体である4G2を0.5μg/mlに希釈した後、捕捉抗体として96ウェルプレートに100μlを各ウェルに加えた。ブロッキング液および抗原希釈液にはBlock Ace (DSファーマバイオメディカル)を用いた。ブロッキング後、JEV/sw/Chiba/88/2002感染C6/36細胞の培養上清を原液から2倍階段希釈した後、各ウェルに100μlずつ加えた。検出抗体としてペルオキシダーゼ標識した単クローナル抗体を0.5μg/mlに希釈したものをを用いた。発色にはペルオキシダーゼ基質キット(Bio-Rad)を用いた。

抗フラビウイルス抗体検出系の確立：単クローナル抗体4G2を0.5μg/mlに希釈した後、捕捉抗体として96ウェルプレートに

100 μ l を各ウェルに加えた。ブロッキング液および抗原希釈液には Block Ace (DS ファーマバイオメディカル)を用いた。ブロッキング後、JEV/sw/Chiba/88/2002 感染 C6/36 細胞の培養上清の希釈液を各ウェルに 100 μ l ずつ接種した。被検血清は 1:50 に希釈し、検出抗体はペルオキシダーゼ標識した単クローナル抗体を 0.5 μ g/ml に希釈したものをを用いた。発色にはペルオキシダーゼ基質キット(Bio-Rad)を用いた。

3) 国内のフェレットにおけるフェレットコロナウイルスの蔓延状況の調査:

サンプル: 全国 5 都道府県 10 動物病院に来院したフェレット 79 頭の糞便を供試した。

フェレットコロナウイルス遺伝子検出: フェレットの糞便を DMEM に懸濁、遠心後、上清から Viral RNA Mini Kit を用いて RNA を抽出した。得られた RNA をもとに One Step RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて RT-PCR を実施した。プライマーはコロナウイルス共通の検出系では IN-6 (5'-GGT TGG GAC TAT CCT AAG TGT GA-3') と IN-7 (5'-CCA TCA TCA GAT AGA ATC ATC AT-3')、フェレットコロナウイルス特異的な検出系では FRCoV RdRp-F1 (5'-GTT GGT TGC TGC ACA CAT AG-3') と FRCoV RdRp-R1 (5'-GGA GAA GTG CTT ACG CAA ATA-3')、フェレットコロナウイルスの型別診断系では 1 型は FRSCVF (5'-CTG GTG TTT GTG CAA CAT

CTA C-3') と FRSCVR (5'-TCT ATT TGC ACA AAA TCA GAC A-3')、2 型は FRECVF (5'-GGC ATT TGT TTT GAT AAC GTT G-3') と FRECVR (5'-CTA TTA ATT CGC ACG AAA TCT GC-3') を用いた。陽性が疑われたサンプルは塩基配列を決定し、最終的に判断した。また、得られた塩基配列から系統樹を作成した。

4) スンクスから新規コロナウイルスの検出:

サンプル: 実験動物として飼育されていたスンクスの糞便および各種臓器を供試した。

コロナウイルス遺伝子検出: スンクスの糞便は DMEM に懸濁、遠心後、上清から Viral RNA Mini Kit を用いて RNA を抽出した。また、スンクスの臓器はマルチビーズ ショッカーで破碎後、RNAeasy Mini Kit を使用して RNA を抽出した。得られた RNA をもとに One Step RT-PCR Kit を用いて RT-PCR を実施した。プライマーはコロナウイルス共通の検出系では IN-6 (5'-GGT TGG GAC TAT CCT AAG TGT GA-3') と IN-7 (5'-CCA TCA TCA GAT AGA ATC ATC AT-3')、スンクス由来新規コロナウイルスの検出には SuCoV RdRp-F (5'-TAG TGC TAT GGT GTT AGG TTC-3') と SuCoV RdRp-R (5'-TAA CAA CAT ACA CCA TCA TCA C-3') を用いた。陽性が疑われたサンプルは塩基配列を決定し、最終的に判断した。また、得られた塩基配列から系統樹を

作成した。

5) 鯨類からヘルペスウイルスの検出：

サンプル：国内で死亡した 1 頭のカマイルカの腎臓、皮膚症状が認められたバンドウイルカ 1 頭およびオキゴンドウクジラ 1 頭の病変部位を供試した。

初代培養細胞の作製：破砕したカマイルカの腎臓を 10%のウシ胎児血清を添加した RPMI-1640 (GIBCO) を用いて培養した。

ヘルペスウイルス遺伝子検出：カマイルカの腎臓の初代培養細胞、バンドウイルカおよびオキゴンドウクジラの病変部位から DNAeasy tissue kit (QIAGEN)を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA をもとにヘルペスウイルス検出用のコンセンサスプライマー-DFA (5'-GAY TTY GCN AGY YTN TAY CC-3')、ILK (5'-TCC TGG ACA AGC AGC ARN YSG CNM TNA A-3')、KG1 (5'-GTC TTG CTC ACC AGN TCN CAN CCY TT-3') で First PCR を実施し、プライマー TGV (5'-TGT AAC TCG GTG TAY GGN TTY CAN GGN GT-3') と IYG (5'-CAC AGA GTC CGT RTC NCC RTA DAT-3') で Second PCR を実施した。PCR には KOD-Plus- Ver.2 (TOYOBO) を用いた。陽性が疑われたサンプルは塩基配列を決定し、最終的に判断した。また、得られた塩基配列から系統樹を作成した。

6) 海棲哺乳類由来培養細胞株の樹立：

サンプル：国内で死亡したバンドウイル

カの腎臓およびゴマフアザラシの大動脈を実験に供試した。

初代培養細胞の作製：バンドウイルカの腎臓は細切後、10%のウシ胎児血清を添加した DMEM0 (GIBCO) を用いて、ゴマフアザラシの大動脈は細切後、10%のウシ胎児血清を添加した RPMI-1640 (GIBCO) を用いて培養した。

SV40 ラージ T 抗原のトランスフェクション：SV40 ラージ T 抗原発現プラスミド (pLNCLT) を Lipofectamine 2000 Transfection Reagent(Life Technologies)を用いて製品のプロトコールに従ってそれぞれの培養細胞にトランスフェクションした。

C. 研究成果：

1) イノシシおよびシカからフラビウイルス遺伝子の検出：

2012 年から 2013 年にかけて捕獲されたイノシシ 83 頭、シカ 84 頭の血清または肝臓からフラビウイルスの遺伝子検出を試みた結果、1 頭のイノシシの肝臓、1 頭のシカの血清からフラビウイルスの遺伝子が検出された。系統解析の結果、イノシシの肝臓から検出されたフラビウイルス (WB1267) はダニ媒介性脳炎ウイルス群に属する新規のフラビウイルスでアミノ酸配列では Langat virus (91%) に近縁であることが明らかとなった (図 1)。また、シカの血清から検出されたフラビウイルス (sika51) は黄熱病ウイルスに (73%) に近縁な全く新しいフラビウイルスであった (図 1)。

イノシシから検出された新規フラビウウイルスについて特異的なプライマーを作製し、同個体の血清から遺伝子検出を試みた結果、Second PCR で同じ遺伝子が検出された。また、同ウイルスの蔓延状況を周辺のマダニにおいて調査した結果、46 プール (559 匹) 中 20 プールで同様のウイルス遺伝子が検出された。Chiang and Reeves の式(1962)に当てはめてマダニの個体ごとの陽性率を算出したところ、4.6%となった。マダニのステージごとに分けると、幼ダニで2.6%、若ダニで22.5%、メスの成ダニで17.8%と、若ダニで最も陽性率が高く、すべてのステージで遺伝子が検出された(表2)。また、遺伝子が検出されたマダニの種類はヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*)、アカコッコマダニ (*Ixodes turudus*)、イエンチマダニ (*Haemaphysalis yeni*)、キチマダニ (*Haemaphysalis flava*)、ヒゲナガチマダニ (*Haemaphysalis kitaokaii*)、オオトゲチマダニ (*Haemaphysalis megaspinosa*)、フタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*)、タカサゴキラマダニ (*Amblyomma testudinarium*) の3属8種であった(表3)。

2) フラビウイルス抗原および抗体検出系の確立:

フラビウイルス抗原検出系の確立: Sandwich ELISA の手法を応用してフラビウイルス抗原検出系の確立を試みた。その結果、フラビウイルスすべてに交差反応性を示す 3-2D6 という抗体を用いた際の検出感

度が最も高く、 10^6 PFU/ml のウイルスを検出することが可能であった(図2)。しかし、感染後12、24時間後の培養上清中のウイルスはほとんど検出できなかった。

抗フラビウイルス抗体検出系の確立: Blocking ELISA の手法を応用して抗フラビウイルス抗体検出系の確立を試みた。まず、日本脳炎ウイルス実験感染犬の経過血清を被検血清として実施したところ、フラビウイルスに対する反応性の異なるなどの単クローナル抗体 (3-2D6、3-3B10、3-1D7、3-1C2) を検出抗体として用いても抗体の上昇を検出できた(図3)。また、感染後4日目の血清で抗体の上昇が認められたことから、今回確立した系では感染初期のIgMも検出可能であることが示唆された。九州地方のイヌや中国地方のイノシシで確立した抗体検出系を実施したところ、イヌでは中和抗体価との相関が認められ、イノシシでは間接ELISAとの相関が認められた(図4)。

3) 国内のフェレットにおけるフェレットコロナウイルスの蔓延状況の調査:

国内のフェレットにおけるフェレットコロナウイルス遺伝子検出: 全国5都道府県10動物病院から送付されたフェレット糞便サンプルを用いて、コロナウイルス共通のプライマーを用いて遺伝子検出を試みた結果、42% (79頭中33頭) でコロナウイルス遺伝子陽性となった(表4)。また、フェレットコロナウイルスの配列を元に作製した特異的プライマーを用いると、58% (79

頭中 44 頭) がフェレットコロナウイルス遺伝子陽性となった(図 5、表 4)。さらに、以前の報告でフェレットコロナウイルスが S 遺伝子の配列を元に 2 つの遺伝子型に区別されているが、国内のフェレットにおいても同様に 2 つの遺伝子型に区分された(図 6)。また、遺伝子型と症状の相関性を比較検討したが、それぞれに有意な相関は認められなかった(表 5)。

4) スンクスから新規コロナウイルスの検出:

実験動物として飼育されていたスンクスの糞便からコロナウイルス共通プライマーを用いて遺伝子検出を試みた結果、8 ケージ中 1 ケージから新規のコロナウイルスが検出された(図 7)。検出された配列を元に特異的なプライマーを作製し、共通プライマーでは陰性であった 7 ケージについて遺伝子検出を試みたところ、6 ケージで陽性が認められた(図 8)。また、臓器別にみると食道、胃、小腸、大腸、腸管リンパ節、直腸スワブからのみ検出された(表 6)。

5) 海棲哺乳類におけるウイルス感染症の調査:

国内の鯨類からヘルペスウイルスの検出: 国内で皮膚症状が認められ死亡したカマイルカから初代腎臓細胞を作製したところ、CPE が認められ(図 9)、遺伝子解析の結果ヘルペスウイルスであることが明らかとなった(図 10)。また、全身に皮膚

症状が認められたオキゴンドウクジラ、バンドウイルカの病変部位からヘルペスウイルス遺伝子が検出された。これら分離・検出されたヘルペスウイルスについて DNA ポリメラーゼ領域について系統解析を実施したところ、分離されたカマイルカのヘルペスウイルスはこれまで報告のない新規アルファヘルペスウイルスであることが明らかとなった。オキゴンドウクジラ、バンドウイルカから検出されたウイルスはそれぞれ同種で過去に遺伝子検出の報告されたウイルスと 100%の相同性を示していた(図 10)。

6) 海棲哺乳類由来培養細胞の樹立:

バンドウイルカの腎臓およびアザラシの大動脈を用いて培養細胞を樹立し、現在までにそれぞれ 44 代、31 代目まで継代が進んでいる。

D. 考察:

1) イノシシおよびシカからフラビウイルス遺伝子の検出:

今回、イノシシおよびシカから新規フラビウイルスが検出された。イノシシから検出されたダニ媒介性脳炎ウイルス様ウイルスは血清中からも検出されたためイノシシでウイルス血症を起こしている可能性が示唆された。同様のウイルスが周辺のダニから検出されたことから、同ウイルスがダニを媒介し、イノシシに感染していることが示唆された。また、3 属 8 種と多種のダニ

から検出されていることから、国内でこれまで唯一北海道で報告のあったダニ媒介性脳炎ウイルスとは異なる感染環を持つことが示唆された。以上のことから、本研究において国内において北海道以外では初となるダニ媒介性脳炎ウイルス群のウイルス遺伝子が検出された。今後、シカで検出された新規フラビウイルスとともにウイルス分離を試み、人や動物における抗体保有率の調査やヒトや動物における病原性を探求していく必要があると考えられる。

2) フラビウイルス抗原および抗体検出系の確立:

フラビウイルス抗原検出系の確立:すべてのフラビウイルスを検出可能な抗原検出系の確立に成功した。特異性の異なる単クローナル抗体を用いることで、抗原の識別も可能になると考えられる。今後は、増幅動物の血中濃度として媒介蚊を感染させるのに必要な濃度である 10^4 PFU/ml を検出できる検出系を目指して検出感度の向上を試みていく必要がある。

抗フラビウイルス抗体検出系の確立:確立した抗フラビウイルス抗体検出系はイヌとイノシシでは有用であることが示された。今後、鳥類を含む他種の動物で適用可能か調べる必要がある。また、特異性の異なる単クローナル抗体を用いて、様々なフラビウイルス感染を血清学的に識別することが出来る診断系の確立を試みる予定である。

3) 国内のフェレットにおけるフェレットコロナウイルスの蔓延状況の調査:

国内において半数以上のフェレットでフェレットコロナウイルスの遺伝子が検出され、56%のフェレットで抗体陽性となった。遺伝子型別でみると国内で既に2種類のフェレットコロナウイルスが蔓延していることが明らかとなった。フェレットコロナウイルスは型別で病原性が異なるとの報告があり、1型フェレットコロナウイルスが猫伝染性腹膜炎のような全身症状を引き起こすとされている。本研究では遺伝子型と症状に相関は認められなかったが、ウイルスを分離し、型別に性状を比較検討していく必要がある。

4) スンクスから新規コロナウイルスの検出:

スンクスから検出されたコロナウイルスはこれまでに知られているものとは明らかに異なる新規コロナウイルスであった。特異的な検出系を用いて遺伝子検出を試みた結果、8ケージ中7ケージで同ウイルスが検出されており、実験動物として飼育されているスンクス間で蔓延していることが示された。また、臓器別にみると消化器系にのみ分布しており、消化器系で増殖するウイルスであることが示された。同ウイルスのスンクスにおける病原性について詳細な性状解析が必要である。

5) 海棲哺乳類におけるウイルス感染症の調査:

鯨類におけるウイルス感染症の知見は乏しく、ヘルペスウイルスの分離例は過去に1例のみである。今回カマイルカから分離されたヘルペスウイルスは過去に報告のあるものとは遺伝的に異なり、新規ウイルスであることが確認された。遺伝的に近縁なウイルスは全身症状を示した個体から検出されており、本ウイルスのイルカにおける病原性について詳細な解析が必要である。また、海棲哺乳類に皮膚症状が認められた際に、ヘルペスウイルス以外に人獣共通感染症であるポックスウイルス感染症も疑う必要がある。これらのウイルスの類症鑑別のために、今回分離されたウイルスや樹立した細胞を用いて詳細な解析を行い、簡便な診断系の構築が必要であると考えられる(まとめ5)。

E. 結論

- 国内で初めて北海道以外でダニ媒介性脳炎ウイルス群のウイルスをイノシシおよびダニから検出
- シカから新規フラビウイルスを検出
- すべてのフラビウイルスを検出可能な抗原検出系の確立に成功
- 多種の動物において適用可能なフラビウイルス抗体検出系の確立に成功
- 国内のフェレットにおいて2種類のフェレットコロナウイルスが蔓延
- スンクスから新規コロナウイルスを検

出

- 新規イルカヘルペスウイルスの分離に成功
- 海棲哺乳類においてヘルペスウイルスとポックスウイルスの鑑別診断が必要

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Terada Y, Minami S, Noguchi K, Mahmoud H.Y.A.H., Shimoda H, Mochizuki M, Une Y, Maeda K*. Genetic characterization of coronaviruses from domestic ferrets in Japan. *Emerging Infectious Diseases* (In press)
- 2) Noguchi K, Shimoda H, Terada Y, Shimojima M, Kohyama K, Inoshima Y, Maeda K*. Isolation of a novel herpesvirus from a Pacific white-sided dolphin. *Archives of Virology* 2013 158(3): 695-699.

2 和文発表

- 1) 鉢田龍星, 高野愛, 下田宙, 前田健*: 「マダニ類が保有・媒介するウイルス感染症」(総説)*Japanese Journal of Veterinary Parasitology*. 2013. 12(1): 32-43.
- 2) 寺田豊, 前田健*: 「フェレットコロナウイルス感染症」*The Japanese Society of Exotic Pet Medicine (JSEPM)* (寄稿)

2013: 15:1-10.

3 学会発表

- 1) 寺田 豊、南 昌平、下田 宙、野口 慧多、Hassan Y.A.H. Mahmoud、 鋏田龍星、望月雅美、宇根有美、前田 健「2種類のエレットコロナウイルスの国内での蔓延とその体内動態」第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10 日[ポスター]
- 2) 下田 宙、早坂大輔、好井健太郎、米満研三、寺田 豊、野口慧多、鋏田龍星、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、神戸、2013 年 11 月 9 日
- 3) 下田 宙、竹之内惇、濱崎千菜美、寺田 豊、野口慧多、Hassan Mahmoud, 高崎智彦、前田 健「簡便で有用なフラビウイルス抗原および抗体検出系の確立」第 156 回日本獣医学会学術集会、岐阜、2013 年 9 月 20 日
- 4) 寺田 豊、南 昌平、下田 宙、野口 慧多、Y.A.H. Mahmoud Hassan、鋏田龍星、望月雅美、宇根有美、前田 健「エレットコロナウイルス自然感染例の継時的観察」第 156 回日本獣医学会学術集会、岐阜、2013 年 9 月 21 日
- 5) 野口慧多、下田 宙、Hassan Youssef、鋏田龍星、香山 薫、猪島康雄、前田 健「海棲動物におけるヘルペスウイルスの解析」第 28 回中国四国ウイルス研究会、広島、2013 年 6 月 22 日
- 6) 下田 宙、竹之内惇、濱崎千菜美、寺田 豊、野口慧多、Hassan Mahmoud、高崎智彦、前田 健「様々な動物に適用可能なフラビウイルス抗原および抗体検出系の確立」第 28 回中国四国ウイルス研究会、広島、2013 年 6 月 22 日
- 7) 寺田 豊、下田 宙、野口慧多、Hassan YAH Mahmoud、望月雅美、宇根有美、前田 健「エレットコロナウイルスの国内における蔓延状況」第 28 回中国四国ウイルス研究会、広島、2013 年 6 月 23 日

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

表1 各種フラビウイルスに対するモノクローナル抗体の反応性

	JEV G1			JEV G3		JEV G5	MVE	WNV	DENV				YF	TBEV
	Chiba	Tottori	Kagawa	JaOH	JaGAR				1	2	3	4		
3-1A1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-1A5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-2A1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-2D6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-4B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-3B10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1-1A7	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
3-1D7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3-3D1	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
4-4E9	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3-2D1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3-1A2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4-4A8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3-1C2	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3-1B5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7E5	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-3H8	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-3E8	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

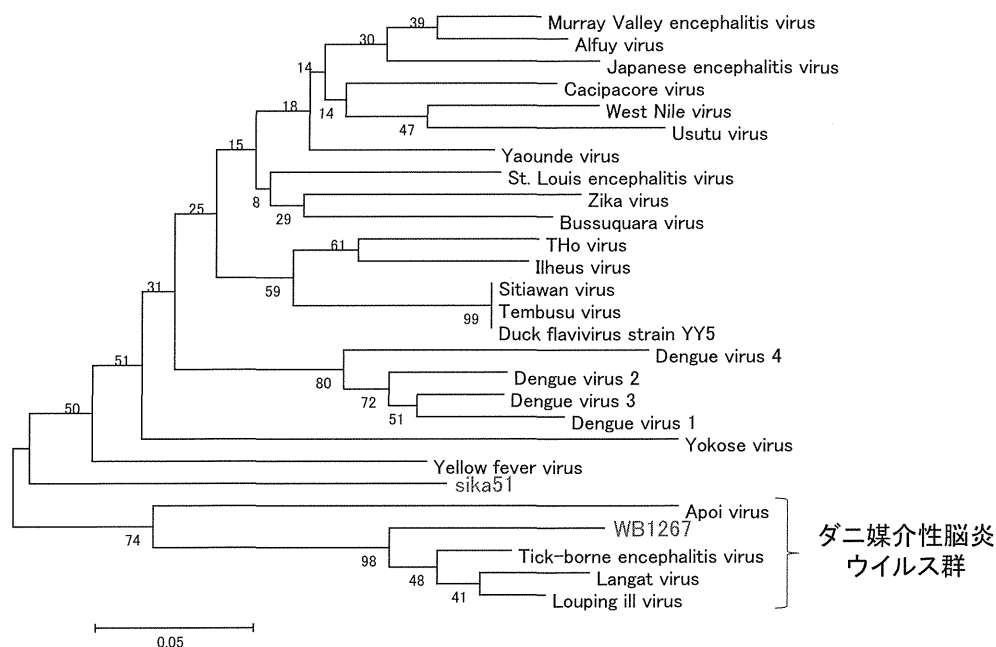


図1 新規フラビウイルスの系統解析

赤字が本研究で検出された新規フラビウイルス

表2 周辺のダニからイノシシ由来TBEV様ウイルスの検出

	幼ダニ	若ダニ	成ダニ(雌)	計
検査プール数	24	5	17	46
検査匹数	495	18	46	559
陽性プール数	10	3	7	20
陽性率(%)※	2.6%	22.5%	17.8%	4.6%

※Chiang and Reevesの式(1962)より算出

表3 周辺のダニからTBEV様ウイルスの検出

ダニ種	検査プール数	検査匹数	陽性数	陽性率(%)※
<i>Ixodes ovatus</i> ヤマトマダニ	2	4	1	29.3
<i>Ixodes turudus</i> アカコッコマダニ	1	2	1	100
<i>Haemaphysalis yeni</i> イエンチマダニ	12	210	6	3.9
<i>Haemaphysalis flava</i> キチマダニ	13	178	5	3.5
<i>Haemaphysalis kitaokaii</i> ヒゲナガチマダニ	4	47	2	5.7
<i>Haemaphysalis megaspinosa</i> オオトゲチマダニ	3	25	1	4.7
<i>Haemaphysalis longicornis</i> フタトゲチマダニ	4	62	1	1.8
<i>Haemaphysalis hystrix</i> ヤマアラシチマダニ	1	1	0	0
<i>Amblyomma testudinarium</i> タカサゴキラマダニ	5	29	3	14.6
<i>Dermacentor taiwanensis</i> タイワンカクマダニ	1	1	0	0

※Chiang and Reevesの式(1962)より算出

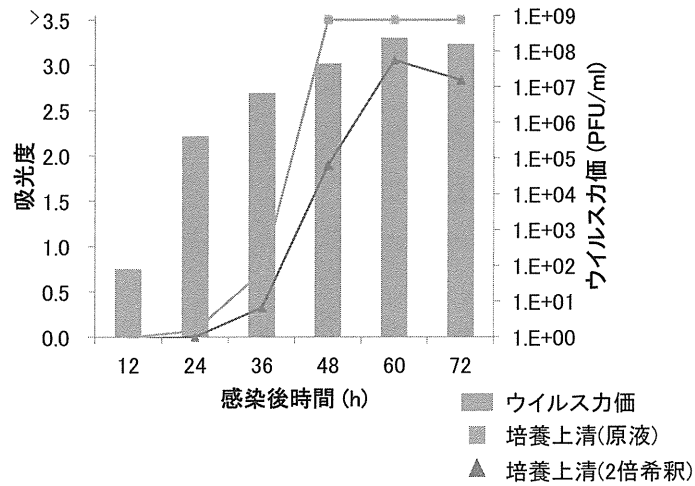


図2 フラビウイルス抗原検出系の確立

JEV/sw/Chiba/88/2002をC6/36細胞に感染後、12、24、36、48、60、72時間後に上清を回収し、本実験に供した。棒グラフはプラークアッセイによるウイルスカ価、折れ線グラフはELISAの吸光度を示している。

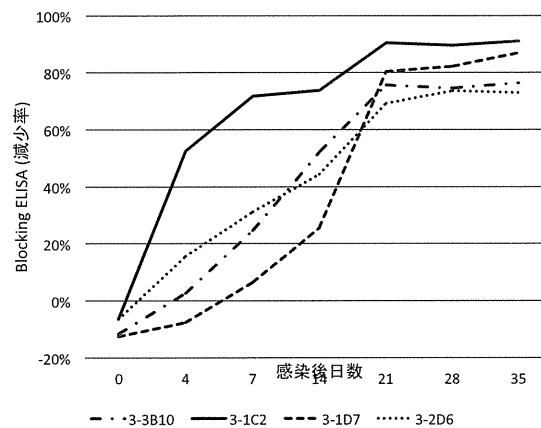


図3 JEV実験感染犬の経過血清を用いた抗フラビウイルス抗体検出系の確立

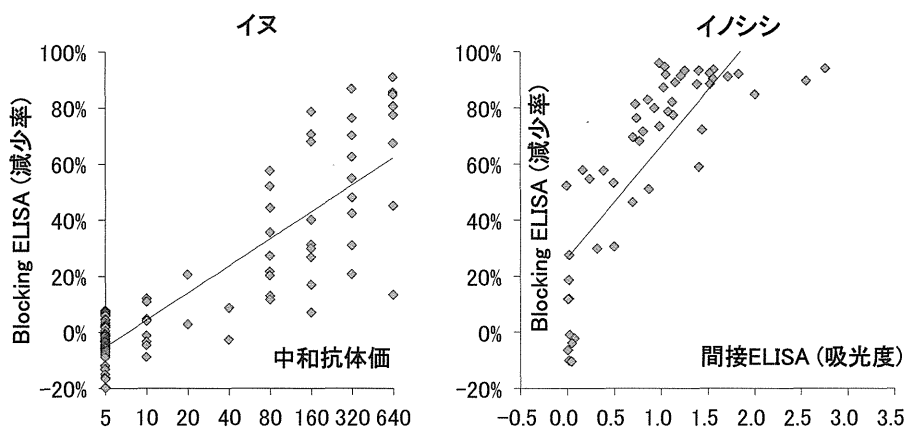


図4 九州地方のイヌ、中国地方のイノシシの血清を用いてBlocking ELISAの有用性の検討

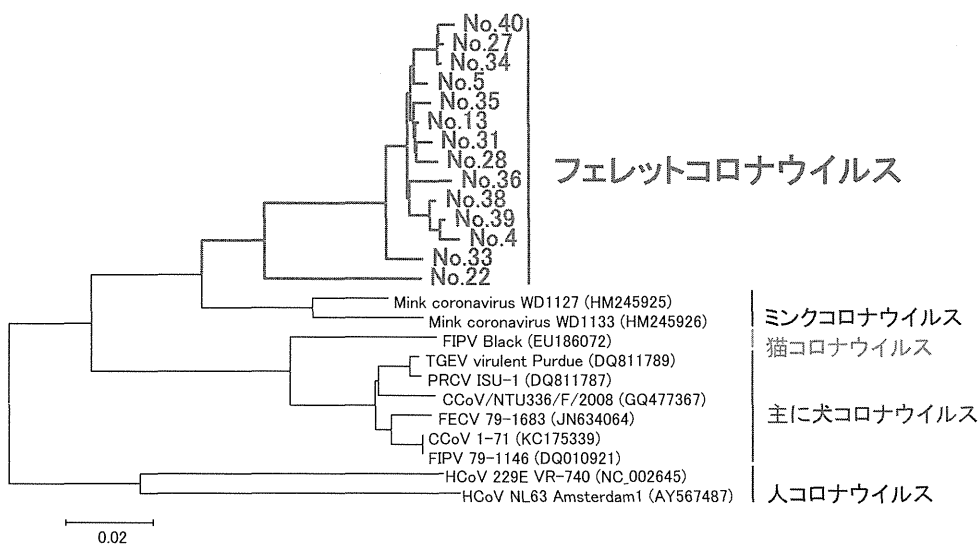


図5 フェレットより検出されたコロナウイルスの系統樹

RdRp領域を元に系統樹を作成した。