

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関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)、福土秀悦 (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性感染症を起すもの、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) 野兔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 ($\Delta pulB$) 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な不可欠であるが、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)。

10) 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)。

11) 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、致死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 (新興回歸熱、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死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。