

厚生労働科学研究費 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

分担研究課題：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

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)

研究要旨：ハンタウイルスの分子疫学情報の蓄積のため、モンゴル、ベトナム、ミャンマー、日本およびロシアのサンプルについて野生小型哺乳類を入手しハンタウイルス感染を検索した。その結果、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を確認した。これらのウイルスは、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。また、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。このうち、齧歯目 1 株、翼手目 10 株の細胞に CPE 様の像が観察され、何らかのウイルスが感染している可能性が示唆された。CPE 様の像が観察された細胞について電子顕微鏡および次世代シーケンスを用いて解析したところ、ポリオーマウイルス、ヘルペスウイルス、アデノアソシエイトウイルスの感染が疑われる結果が得られた。今後、ハンタウイルスの分子疫学情報をさらに収集するとともに、分離した初代培養細胞を用いてハンタウイルス分離に利用可能か性状解析を進める予定である。

研究協力者：池山優、荒木和子、佐藤 弘、多屋馨子、大石和徳(国立感染症研究所 感染症疫学センター)、川田伸一郎(国立科学博物館)、城ヶ原貴通(岡山理科大)、太田香織(東京都動物園協会)、水谷哲也(東京農工大学)、本川雅治(京都大学)、橋本知幸(日本環境衛生センター)、大館智志、南波興之、鈴木仁(北海道大学)、福井大(和歌山大学)、永田典代(国立感染症研究所 感染病理部)、森

川茂(国立感染症研究所 獣医科学部)

A. 目的：

これまで、小型野生動物を自然宿主とするウイルスによるアウトブレイクが複数報告されている。齧歯目を自然宿主とするハンタウイルスや、翼種目を自然宿主とするニパウイルスは記憶に新しい。近年では、2003 年に大きなアウトブレイクを引き起こ

した SARS コロナウイルスの自然宿主として翼種目の可能性が示唆されており、自然宿主での感染メカニズム解析のため、これら自然宿主の株化細胞が求められている。特にウイルス感染においては、自然宿主の培養細胞は、ウイルスを増殖させるだけでなく、診断用抗原の作成やワクチン開発に必要不可欠なツールである。これまでハンタウイルスでは、げっ歯目が主な自然宿主と考えられてきたが、2007年以降トガリネズミ形目や翼種目に新しいハンタウイルス感染が報告され、これまで考えられてきた以上に多様な生物がハンタウイルスに感染している事実が明らかになってきた。そこでこれら野生小型哺乳類の未知のハンタウイルス感染を明らかにするとともに、分子疫学情報を解析することでワクチンなどの対策ツール開発の可能性を模索してきた。また、効率よくウイルスを分離するため、自然宿主である齧歯目、トガリネズミ形目、翼手目の肺や腎臓から初代細胞を分離し、ウイルスの分離に利用することを計画した。

#### B. 材料と方法：

これまでに入手することのできたモンゴル、ベトナム、ミャンマー、日本およびロシアのサンプルについてハンタウイルス共通領域にデザインしたプライマーを用いて新規ハンタウイルスの検索を行った。スクリーニング用プライマーには、S、M、L-segments のそれぞれに対してデザインし、できる限り多様なウイルスが検出できるよ

うにデザインした。また、生材料が入手できた場合には、肺および腎臓から可能な限り初代培養細胞を分離し、今後の未知のウイルスの分離用として利用を目指すと共に、これらの細胞から未知のウイルスが検出されるかどうか検索した。

初代細胞の分離には、齧歯目の *Myodes rex*、*Myodes rufocanus*、*Myodes rutilus*、*Apodemus argenteus*、*Apodemus speciosus*、トガリネズミ形目の *Crocidura dsinezumi*、*Sorex gracillimus*、*Sorex caecutiens*、*Sorex unguiculatus*、翼種目の *Cynopterus brachyotis*、*Hipposideros laravatus*、*Hipposideros pomona*、*Ia io*、*Kerivoula cf. papillosa*、*Megaerops niphanae*、*Myotis muricola*、*Myotis siligorensis*、*Phoniscus jatorii*、*Rhinolophus acuminatus*、*Rhinolophus luctus*、*Rhinolophus microglobosus*、*Rhinolophus pearsonii*、*Rhinolophus sinicus*、*Rhinolophus thomasi*、*Rhinolophus sp.*、*Tylonycteris pachypus*、*Tylonycteris sp.*の肺および腎臓を用いた。CPE の認められた初代細胞については培養上清を用いて電子顕微鏡による観察を行い、電子顕微鏡でウイルス様粒子が確認されたサンプルについて次世代シーケンスによる感染ウイルスの同定を行った。

#### C. 研究成果：

1) モンゴルのトガリネズミから *Seewis virus*(SWSV)および *Khovsgol Lake virus*(KHLV)、日本のトガリネズミから *Sarufutsu virus*(SRFV)および *Shiretoko*

virus (SHRV)を検出した(図 1)。

- 2) トガリネズミ形目 4 種目、齧歯目 5 種目、翼手目 15 種目の初代培養細胞の分離に成功した。
- 3) 初代培養細胞を分離した細胞のうち、齧歯目の 1 検体、翼種目の 10 検体に CPE が確認され、電子顕微鏡の観察からポリオーマ様ウイルス粒子(図 2A, 1B)とコロナウイルス様粒子(図 2A, 2B)が検出された。
- 4) 培養上性を用いて次世代シーケンサーを実施したところ、ポリオーマウイルス、ヘルペスウイルス、アデノアソシエイト様ウイルスに近似した配列が明らかになったが、コロナウイルス様の配列は検出されなかった。

#### D. 考察：

近年、多数の新しいハンタウイルスが検出されている。しかしながら、実際にウイルスが分離できている例は極めて少数で確認されているだけで 3 種類のウイルスしかない。一方解析手法は、マイクロアレイ、マルチプレックスリアルタイム PCR および次世代シーケンサーの網羅的解析手法を用いた検出法などが開発され未知の感染症の検出方法は飛躍的に向上してきている。しかしながらこれら新しい手法には多くの利点が認められているものの、全くの未知のウイルスの検出に対しては検出感度が低いなどのウィークポイントも報告されている。今回我々は、4 種類のウイルスを検出

することに成功し、そのうちの 3 種類は新規ウイルスと予想される。ウイルス遺伝子の検出には成功したものの、ウイルスは分離できておらず効率よくウイルス分離する方法を開発する必要がある。そこで、トガリネズミ形目、齧歯目および翼種目の腎臓および肺からの初代細胞を分離し、未知の動物由来感染症の病原体分離ツールとしての利用を検討した。多様な生物種の細胞を保管、維持しておくことで、これら小型野生動物を宿主とする動物由来感染症が流行した場合に効率よく病原体を分離するツールとして利用することが可能となる。

今回、初代培養細胞の分離に成功した検体からウイルス様粒子の感染を確認し、初代培養細胞の分離に用いるような健康な野生動物であっても多くの病原体を保有している事実が改めて明らかになった。これら初代分離細胞のうち、少なくとも 11 株に CPE が確認され、電子顕微鏡および次世代シーケンサーを用いた解析でポリオーマウイルス、ヘルペスウイルス、アデノアソシエイト様ウイルスの検出に成功した。初代培養細胞は多くの病原体に対して感受性が高いことが報告されており、初代培養細胞の分離作業に伴い、予期せずに健康な野生動物が保有している不明病原体を分離、検出してしまう可能性が示された。今回の結果を踏まえ、事前に陽性動物を選別して目的とする陽性個体を特定してから分離作業を進めれば効率よく対象病原体を分離できる可能性があり、未知のウイルス分離に

有用であることが推測される。また、今回多くの新しいウイルスを分離できている可能性があり、更に解析を進めることでこれまで明らかになっていない新しい知見が得られる可能性が示唆された。

#### E. 結論

- 1) モンゴルのトガリネズミから Seewis virus(SWSV) および Khovsgol Lake virus (KHLV)、日本のトガリネズミから Sarufutsu virus(SRFV) および Shiretoko virus (SHRV)を検出した
- 2) トガリネズミ形目、齧歯目および翼手目の初代培養細胞の分離に成功した。
- 3) 分離できた初代培養細胞のうち、少なくとも 10 株に CPE が検出され、ポリオマウイルス、ヘルペスウイルス、アデノアソシエイト様ウイルスが検出された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

- 1) Novel Bat-borne Hantavirus, Vietnam. Arai, S., Nguyen, S. T., Boldgiv, B., Fukui, D., Araki, K., Dang, C. N., Ohdachi, S. D., Nguyen, N. X., Pham, T. D., Boldbaatar, B., Satoh, H., Yoshikawa, Y., Morikawa, S., Tanaka-Taya, K., Yanagihara, R., and Oishi, K. *Emerging Infectious Diseases*.

19(7):1159-1161. 2013.

- 2) Molecular phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* based on the *groES* and *groEL* genes. Arai, S., Tabara, K., Yamamoto, N., Fujita, H., Itagaki, A., Kon, M., Satoh, H., Araki, K., Tanaka-Taya, K., Takada, N., Yoshikawa, Y., Ishihara, C., Okabe, N., Oishi, K. *Vector-borne and zoonotic diseases*. 13(11): 825-829. 2013.

##### 2. 学会発表

- 1) Amga Virus, A Newfound Hantavirus Harbored by the Laxmann's shrew (*Sorex caecutiens*) in Russia and Japan. Satoru Arai, Hae Ji Kang, Satoshi D. Ohdachi, Joseph A. Cook, Keiko Tanaka-Taya, Shigeru Morikawa, Nobuhiko Okabe, Richard Yanagihara. IX International Conference on HFRS HPS & Hantaviruses. June 5-7, 2013 in Beijing, China.
- 2) Newfound Hantavirus in the Pomona Roundleaf Bat (*Hipposideros pomona*) in Vietnam. Satoru Arai, Son Truong Nguyen, Dai Fukui, Satoshi D. Ohdachi, Yasuhiro Yoshikawa, Shigeru Morikawa, Keiko Tanaka-Taya, Richard Yanagihara, Kazunori Oishi. IX International Conference on HFRS HPS & Hantaviruses. June 5-7, 2013 in Beijing, China.

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

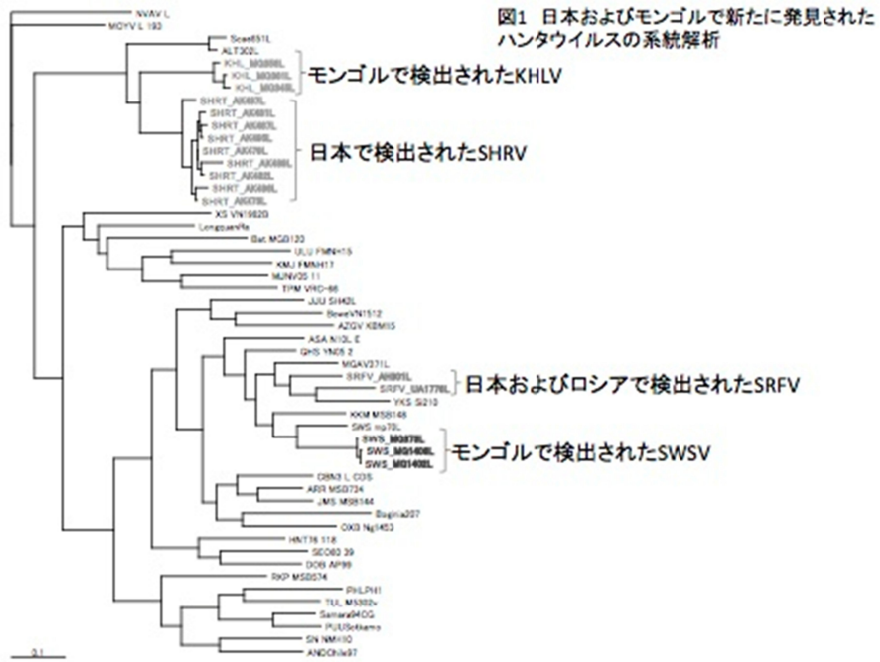


図2 培養細胞に認められたCPEと電子顕微鏡で確認されたポリオーマウイルス様粒子(B21L)

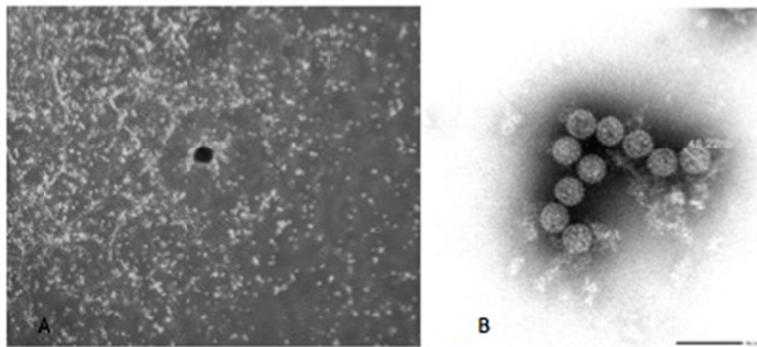


図3 培養細胞に認められたCPEと電子顕微鏡で検出されたコロナウイルス様粒子(B30L)

