

六甲山系で採取されたダニにおけるウイルス保有調査

研究分担者 林 昌宏	（国立感染症研究所ウイルス第一部第3室長）
研究協力者 伊澤 晴彦	（国立感染症研究所昆虫科学部第2室長）
江尻 寛子	（国立感染症研究所昆虫科学部）
伊藤（高山）睦代	（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）
山口（木下）一美	（国立感染症研究所ウイルス第一部）
鋤田 龍星	（国立感染症研究所昆虫科学部）
垣内 五月	（国立感染症研究所ウイルス第一部）
堀谷 まどか	（国立感染症研究所ウイルス第一部）
高崎 智彦	（国立感染症研究所ウイルス第一部第2室長）
澤邊 京子	（国立感染症研究所昆虫医科学部長）
西條 政幸	（国立感染症研究所ウイルス第一部長）

研究要旨

近年ダニによって媒介されるウイルス性感染症が日本においても問題となっている。しかしながら我が国におけるダニ媒介性アルボウイルスの分布状況は未だ明らかにされていない。そこで国内で捕獲されたイノシシおよびイノシシの生息域周辺から採取されたダニにおけるウイルス保有状況の調査を行った。その結果、細胞培養を用いたウイルス分離においてこれまで日本においてその存在が知られていなかったレオウイルス科、Great Island virus group に属するウイルス(Ix-7V)および Uukuniemi 様 virus (T-32V)をダニサンプルより分離した。またこれらのウイルスを乳飲みマウスを用いて継代し、乳のみマウスに病原性を示すウイルスをそれぞれ分離した。

A. 研究目的

近年我が国においてダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV)、重症熱性血小板減少症候群ウイルス(severe fever with thrombo-cytopenia syndrome, SFTSV) 等のダニによって媒介されるウイルスが問題となっている。TBEV はフラビウイルス科フラビウイルス属に分類される1本鎖(+)RNAウイルスであり、マダニ類のダニによって媒介される。これまでに北海道でその存在が確認されているが、本州以南でのその分布域は不明である。SFTSV はブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される3分節の1本鎖(-)RNAウイルスであり、マダニ類のダニによって媒介される。2013年に日本での存在が明らかにされたが、

疫学解析の結果日本で流行している SFTSV は中国で流行している SFTSV とは独立したクラスターを形成し独自の進化を遂げたことが示されている。したがって我が国においてはTBEやSFTSV等の既知のダニ媒介性ウイルスの分布について不明な点が多く、且つ未だ確認されていないダニ媒介性のウイルスが他にも存在する可能性も考えられた。そこで我々は国内で捕獲されたイノシシおよびイノシシの生息域周辺から採取されたダニにおけるウイルス保有状況の調査を行った。その結果細胞培養を用いたウイルス分離試験において細胞変性効果(CPE)を伴いつつ乳飲みマウスに毒性を示す2種のウイルスを分離したので報告する。

B. 研究方法

1. ダニ

国内で捕獲されたイノシシの被毛から採取されたマダニ類およびイノシシ生息域周辺の地点において旗ずり法により採取されたマダニ類よりウイルス分離を行った。用いたダニはフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*), キチマダニ (*H. flava*), タカサゴチマダニ (*H. formosensis*), ヤマアラシチマダニ (*H. hystricis*), オオトゲチマダニ (*H. megaspinosa*), タネガタマダニ (*Ixodes nipponensis*), アカコッコマダニ (*I. turdus*), ヤマトマダニ (*I. ovatus*), タカサゴキラマダニ (*Amblyomma testudinarium*), タイワンカクマダニ (*Dermacentor taiwanensis*)であった(表1)。得られたダニは1~52頭を1プールとし, 630プールを作製した。次に作製したダニプールを用いて10%ダニ乳剤を作製した。ダニ乳剤を0.45 μmのフィルターでろ過し, ウイルス分離に供試した。

2. 培養細胞と動物

ウイルス分離にはサル腎由来 Vero 細胞 (American Type Culture Collection) およびシリアンハムスター腎由来細胞である BHK-21 細胞 (American Type Culture Collection) を用いた。また, 2日齢の乳飲みマウス(ddY)をウイルス分離に供試した(図1)。

3. 培養細胞を用いたウイルス分離

兵庫県六甲山系で捕獲されたイノシシの被毛から採取されたマダニ類およびイノシシ生息域周辺の地点において旗ずり法により採取されたマダニ類を1~52頭を1プールとし, 192プールを作製した。次に作製したダニプールを用いて10%ダニ乳剤を作製した。ダニ乳剤を0.22 μmあるいは0.45 μmのフィルターでろ過し, Vero 細胞, BHK-21 細胞に接種した(図1)。

4. 乳飲みマウスを用いたウイルス分離

培養細胞への接種を行ったと同じ10%ダニ乳剤を, 1腹8匹の乳飲みマウスの脳内に20 μl接種した。接種後14日間観察し採脳した(図1)。

C. 研究結果

1. 培養細胞を用いたウイルス分離

ダニサンプルより10%ダニ乳剤を作製し, Vero 細胞および BHK-21 細胞に接種した結果いくつかのサンプルにおいてCPEが観察された。CPEを呈した培養上清を採取し大量培養後, 核酸を抽出し次世代シーケンサーによって解析した結果レオウイルス科オルビウイルス属のウイルスである Great Island virus group に属するウイルス (Ix-7 virus) とブニヤウイルス科フレボウイルス属 Uukuniemi virus (UUKV) に近縁のウイルス (T-32 virus) がそれぞれ分離された。

2. 分離ウイルスの遺伝子配列による系統学的解析

Ix-7Vよりウイルスゲノムを抽出し, 次世代シーケンサーを用いて各セグメントの遺伝子配列を解析した。その結果 Ix-7V は Tribec ウイルス(TRBV)に近縁であることが示唆された(図2)。また T-32V の遺伝子配列を系統樹解析した結果, T-32V はフレボウイルスの中でも Uukuniemi ウイルス(UUKV) に近縁であることが示された (data not shown)。

3. 乳飲みマウスを用いた Great Island virus group 分離株 Ix-7V の病原性の検討

2日齢の乳飲みマウス脳内に Ix-7V 培養上清を接種し14日間観察した。Ix-7V を接種した乳飲みマウス(初代培養)では感染13日後に接種16匹中2匹のマウスに発育不良と異常行動が認められた。分離ウイルスを1継代した結果接種12日後に8匹中1匹のマウスに発育不良と行動異常がみとめられた。さらに2継代目では接種9日後にすべてのマ

ウスが発症し、6匹中死亡2、麻痺3、シクク1であり翌日には死亡率100% (6/6匹)であった。臨床症状として発育不良、異常行動、麻痺を示し、剖検所見では点状出血が観察された。さらに1継代を行うことにより発症日接種7日後となり、8日後には死亡率100%であった(図3A)。以上のことより乳飲みマウスに対して強毒性を示すIx-7Vが分離されたことが示唆された。

4. Ix-7V 接種乳のみマウス脳からの Ix-7 遺伝子の検出

乳のみマウス脳にIx-7を接種し、10%マウス乳剤を作製。乳のみマウス脳にて計5継代を行った。各継代における乳のみマウスより採脳を行い、RNAを抽出した。抽出したRNAを鋳型としてIx-7V segment 5に対するプライマーを用いてRT-PCRを実施した。その結果、初代培養から5継代のすべての脳においてIx-7Vが検出された(図3B)。このことからIx-7は乳のみマウス脳内において増殖していることが示唆された。

5. 乳飲みマウスを用いた Uukuniemi 様 virus 分離株 T-32V の病原性の検討

次に2日齢の乳飲みマウス脳内にT-32Vの培養上清を接種し14日間観察した。T-32V接種群においては接種16匹中1匹に発育不良が認められた。そこで、さらに1継代して観察した結果、接種した8匹のマウスのうち2匹のマウスが死亡した。以上のことより乳飲みマウスに対して強毒性を示すT-32Vが分離されたことが示唆された。

D. 考察

兵庫県内において採取されたマダニ類におけるウイルス保有状況を検討した。その結果培養細胞を用いたウイルス分離によりレオウイルス科オルビウイルス属のウイルスであるGreat Island virus groupに属するIx-7Vとブニヤウイルス科フレボウイルス属UUKVに近縁のT-32Vがそれぞれ分離され

た。また乳のみマウスを用いてこれらの分離ウイルスをそれぞれ継代し、乳飲みマウスに対して病原性を示すウイルスを得た。

TRBVは1963年にスロバキアのトリベック山の*I. ricinus*とげっ歯類から初めて分離されたダニ媒介性オルビウイルスである。TRBV、KEMV、Lipovnikウイルス(LIPV)はケメロボ血清型群を形成する。LIPVはヒトに感染しKEMVはヒトにまれに脳炎を起こすことが知られている。またTRBVおよびLIPVは実験的にアカゲザルに髄膜炎を起こす。したがってKEMV血清型群のウイルスはヒトの脳炎の原因ウイルスと考えられている。今後、本研究において分離されたIx-7Vの性状解析および病原性について解析する必要がある。

ブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類されるUUKVに近縁のBhanjaウイルス(BHAV)はダニによって媒介される神経系ウイルスとして知られている。BHAVは1954年にインドのダニから分離されたウイルスで、中欧からアフリカ、中東、インドにかけて分布するヒトにまれに熱性疾患および脳炎を起こすウイルスである。したがって今後分離されたT-32Vの性状解析あるいは成マウスに対する毒性を解析する必要がある。

E. 結論

急速な都市化と森林部への人口拡張により今後もアルボウイルス感染症が問題となることが予想される。また近年我が国においてもSFTSVが常在することが明らかとなり、ダニによって媒介されるウイルスの詳細な調査が求められている。本研究において我々はこれまで日本においてその存在が知られていなかったGreat Island virus groupに属するウイルスおよびUukuniemi様virusをダニサンプルより分離した。今後さらなる詳細を解析するとともに、今後もダニにおけるウイルス保有調査を引き続き行っていく必要性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Moi M.L., Ami Y., Shirai K., Lim C.K., Suzaki Y., Saito Y., Kitaura K., Saijo M., Suzuki R., Kurane I., Takasaki T. Formation of infectious dengue virus-antibody immune complex in Vivo in Marmosets (*Callithrix jacchus*) after passive transfer of antidengue virus monoclonal antibodies and infection with dengue virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (In press)

Takeshita N., Lim C.K., Mizuno Y., Shimbo T., Kotaki A., Ujiie M., Hayakawa K., Kato Y., Kanagawa S., Kaku M., Takasaki T. 2014. Immunogenicity of single-dose Vero cell-derived Japanese encephalitis vaccine in Japanese adults. *J. Infect. Chemother.*, 20(4): 238-242.

Takayama-Ito M., Nakamichi K., Kinoshita H., Kakiuchi S., Kurane I., Saijo M., Lim C.K. 2014. A sensitive in vitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines. *Biologicals*. 42(1): 42-47.

Nakamichi K., Lim C.K., Saijo M. 2014. Stability of JC virus DNA in cerebrospinal fluid specimens preserved with guanidine lysis buffer for quantitative PCR testing. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 67(4): 307-310.

Nakamichi K., Tajima S., Lim C.K., Saijo M. 2014. High-resolution melting analysis for mutation scanning in the non-coding control region of JC polyomavirus from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch. Virol.* 159(7): 1687-1696.

2. 学会発表

西條政幸, 伊藤(高山)睦代, 森本金次郎, 垣内五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, 林昌宏. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染症に対する非増殖型組換え狂犬病ワクチンの開発.

第19回日本神経感染症学会総会, 2014年9月, 金沢市

中道一生, 林昌宏, 西條政幸. 日本における進行性多巣性白質脳症の実験室サーベイランスおよびその発生動向の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 2014年11月, 横浜市

伊藤(高山)睦代, 林昌宏, 森本金次郎, 垣内五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, 西條政幸. 非増殖型組換え狂犬病ウイルスを用いたアレナウイルスに対するワクチンの開発. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 2014年11月, 横浜市

Moi M.L., 白石健二, 網康至, 宮田幸長, 林昌宏, 須崎百合子, 北浦孝一, 西條政幸, 鈴木隆二, 倉根一郎, 高崎智彦. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 2014年11月, 横浜市

齋藤悠香, Moi ML, 竹下望, 林昌宏, 司馬肇, 細野邦明, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦. FcγR 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン被接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強能の検討. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 2014年11月, 横浜市

山口幸恵, 林昌宏, 伊藤(高山)睦代, 垣内五月, 堀谷まどか, 田島茂, 高崎智彦, 倉根一郎, 渡邊治雄, 西條政幸. 日本脳炎ウイルスの神経侵襲性決定に関与する炎症性サイトカインの解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 2014年11月, 横浜市

林昌宏, van den Braak W, 堀谷まどか, 伊藤(高山)睦代, 山口幸恵, 垣内五月, 西條政幸. Expression of rabies virus glycoprotein G by

using recombinant baculovirus .第 62 回日本ウイルス学会学術集会，2014 年 11 月，横浜市

中山絵里，小滝徹，谷ヶ崎和美，林昌宏，西條政幸，高崎智彦 .チクングニア熱の輸入症例の報告および血清学的診断法の開発 . 第 62 回日本ウイルス学会学術集会，2014 年 11 月，横浜市

田島茂，谷ヶ崎和美，小滝徹，中山絵里，Moi M.L.，林昌宏，西條政幸，倉根一郎，高崎智彦 .第 62 回日本ウイルス学会学術集会，2014 年 11 月，横浜市

H. 私的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

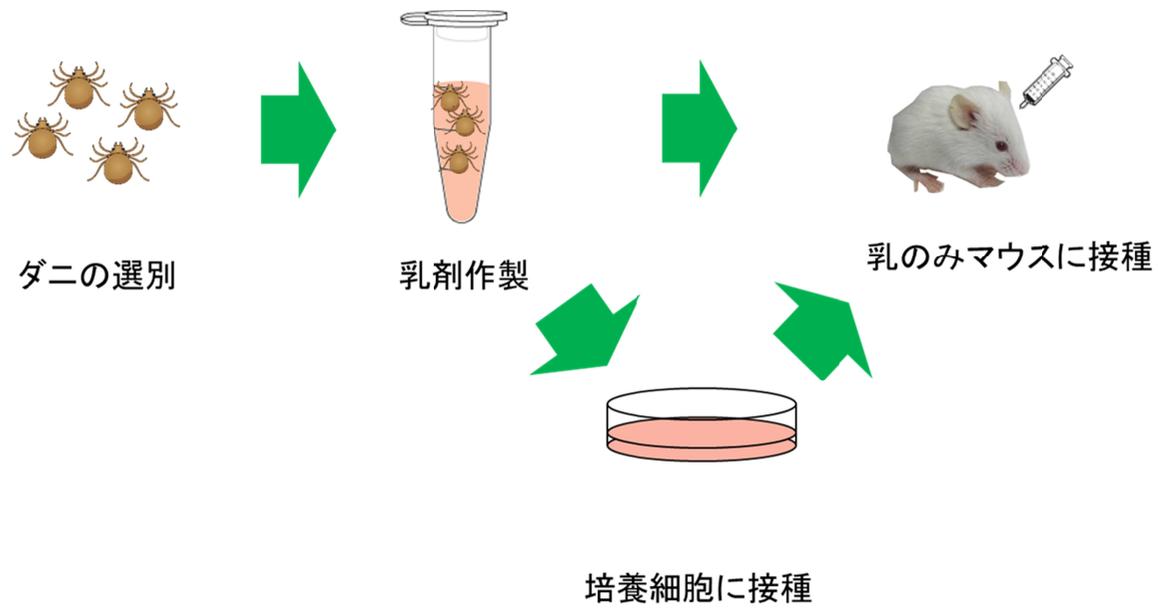


図 1 ダニからのウイルス分離の概要

Ix-7: Segment 7 (T13)

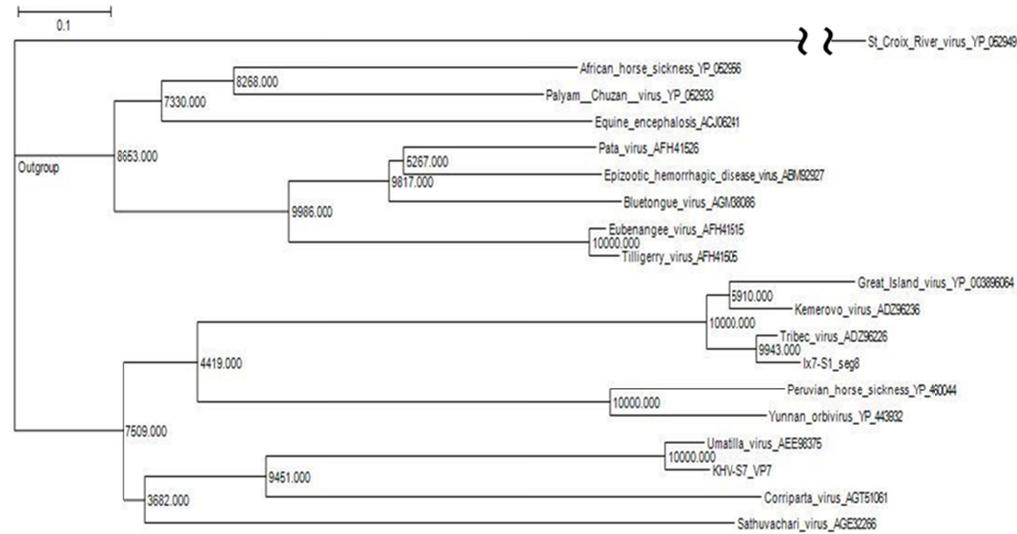
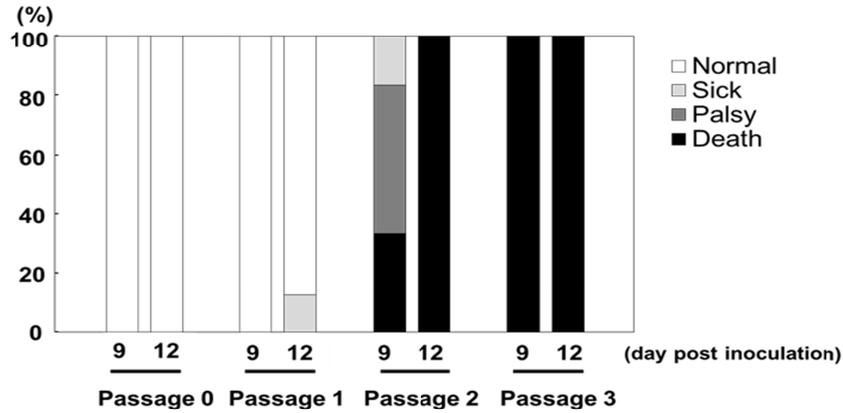


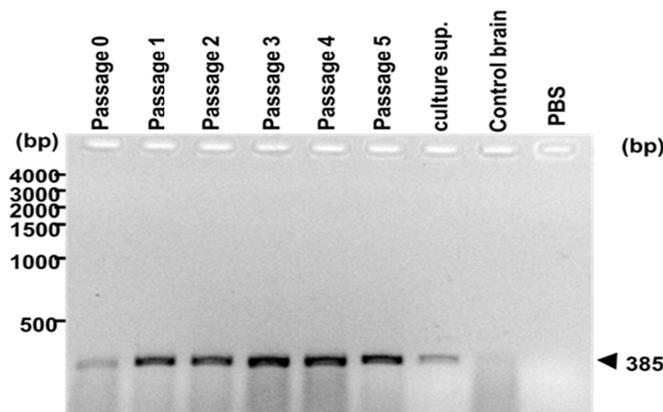
図 2. Ix-7V 遺伝子セグメント7 (T13) の系統学的解析 .

Ix-7V と主なオルビウイルスのセグメント7の遺伝子配列情報を用いて系統学的解析を行った . 解析に用いたウイルスの配列は Saint Croix River virus, African horse sickness virus (AHSV), Palyam Chuzan virus, equine encephalosis virus (EEV), Pata virus, Epizootic hemorrhagic disease virus, Blue tongue virus, Eubenangee virus, Tilligerry virus, Great Island virus, Kemerovo virus, Tribec virus, Peruvian horse sickness virus, Yunnan orbivirus, Umatilla virus, Koyama Hill virus, Corripata virus, Sathuvachari virus であった .

A.



B.



図．3. 国内で採取されたダニより分離されたウイルス Ix-7Vの乳のみマウスに対する病原性解析．

Ix-7V脳内接種後9日後と12日後のマウスの症状(A)：培養細胞への接種により分離されたIx-7Vを乳のみマウスに脳内接種し，14日間観察した．初回接種のマウス脳から得られたウイルスをPassage 0とした．マウスの発病後あるいは接種14日後に採脳し，継代を5回続けて行った．その結果初回接種9日後および12日後には症状は観察されなかったが，接種13日後にマウス個体16匹中2匹において行動異常と発育不全が観察された．発症マウス脳をさらに2継代したマウスにおいては接種9日後に6匹中6匹が発症し，接種10日後にはすべて死亡した．3継代したマウス群においては接種7日後に8匹中8匹が発症し，接種8日後にはすべて死亡した．Ix-7V脳内接種マウスの脳内におけるIx-7Vの増殖(B)：初回接種および1継代から5継代の発症マウスの脳からウイルスRNAを抽出し，Ix-7Vセグメント5に特異的なプライマーを用いてRT-PCRを実施した．その結果，ウイルス特異的な増殖産物が385bp付近に観察され，Ix-7が乳のみマウス脳内で増殖していることが示された．