

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）
分担研究総括報告書

六甲山系で採取されたマダニにおけるウイルス保有調査

分担研究者	林 昌宏	国立感染症研究所ウイルス第一部第3室長
協力研究者	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
	鍬田龍星	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

マダニ類はウイルス、細菌、リケッチア等の病原体を媒介することが知られている。またこれまでに多くのダニ媒介性アルボウイルスが報告されている。我が国においても重症熱性血小板減少症候群ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスが常在することが明らかになっているが、その他のダニによって媒介されるウイルスの分布状況は明らかにされていない。そこで兵庫県六甲山系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オルビウイルス属 Great Island virus group に属するウイルス（Ix-7V）およびブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される Uukuniemi 様 virus（T-32V）をダニサンプルより分離した。これらのウイルスを乳のみマウスの脳内接種により継代したところ、乳のみマウスに病原性を示す株がそれぞれ分離された。

A. 研究目的

古くからダニ類のうちマダニ類はウイルス、細菌、リケッチア、原虫等の病原体を媒介することが知られている。我が国においてもこれまでにダニ媒介性脳炎ウイルス、ライム病ボレリア、紅斑熱群リケッチア、バベシア原虫等の病原体がマダニ類から分離されている。マダニ類は幼虫、若虫、成虫の各発育期のすべてが吸血寄生性で、主に山林内のササ類に生息し、ネズミやイノシシ等の野生動物に寄生する。ヒトにも寄生し、吸血されると吸血部位にわずかな痒み、痛み、違和

感等を生じる場合がある。しかしながらマダニ類の吸血には数日から1週間を要するにもかかわらず多くの場合、全く自覚症状がない。近年ダニに関連するウイルス感染症が国内外を問わず、新興・再興感染症として注目されている。我が国においても2013年2月には重症熱性血小板減少症候群（severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS）の発症例が報告された。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。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経ていることが報告されている。その他に国内外においてはダニによって媒介されるウイルスとしてブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類されるクリミア・コンゴ出血熱, オルトミクソウイルス科トゴトウイルス属に分類されるトゴトウイルスおよびドーリウイルス, フラビウイルス科フラビウイルス属に分類されるロシア春夏脳炎ウイルス, 中央ヨーロッパダニ脳炎ウイルス, オムスク出血熱ウイルス, キャサヌール出血熱ウイルス, ランガットウイルスおよびポワッサンウイルス, レオウイルス科オルビウイルス属に分類されるケメロボウイルス, 同じくレオウイルス科コルチウイルス属に分類されるコロラドダニ熱ウイルス等の多くのウイルスが知られている。しかしながらこれらウイルスの国内における分布は明らかにされていない。そこで我々は兵庫県六甲山系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ので報告する。

B. 研究方法

1. ダニ

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より 10% 乳剤を作製し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。得られたダニは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, 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。

3. 培養細胞を用いたウイルス分離

10%ダニ乳剤を作製し, Vero 細胞および BHK-21 細胞に接種し 7 日間観察した。

4. 乳飲みマウスを用いたウイルス分離

10%ダニ乳剤を作製し, 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。

5. ウイルス遺伝子の検索

採取したサンプルよりウイルス遺伝子を抽出し, 逆転写(RT)-PCR 法によりフラビウイルス属およびブニヤウイルス属の検索を行った。また次世代シーケンサーを用いてダニから得られたウイルスの遺伝子配列を決定した。

C. 研究結果

1. ダニ類の採取

兵庫県六甲山系でダニ類の採取を行った。兵庫県六甲山系におけるイノシシの被毛より採取されたマダニ類はキチマダニ 54%, タカサゴチマダニ 16%, タカサゴキラマダニ 13%, ヤマアラシチマダニ 9%, タイワンカクマダニ 8%であった。

2. 培養細胞を用いたウイルス分離

マダニサンプルより 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 ウイルス (Ix-7V) とブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類されるウイルス T-32 ウイルス (T-32V) がそれぞれ分離された。Ix-7V の遺伝子配列を系統樹解析した結果、Ix-7V は Great Island virus group のウイルスの中でも特に Tribec ウイルス (TRBV) に近縁であることが示唆された。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。

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、シック 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。

6. フラビウイルスおよびフレボウイルス遺伝子の探索

培養細胞上清より拡散を抽出し、RT-PCR 法を用いてフラビウイルス属共通プライマーおよびブニヤウイルス属の内 SFTSV および CCHFV 遺伝子の検出をターゲットとしたプライマーによる探索を行ったところ目的増幅産物は得られなかった。

D. 考察

兵庫県六甲山系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 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に分類される T-32V をそれぞれ分離した。またこれらの分離ウイルスをそれぞれ乳飲みマウスを用いて継代した結果、乳のみマウスに病原性を示すそれぞれの株を分離した。次世代シーケンサーを用いて Ix-7V および T-32V の遺伝子配列を系統的に解析した結果、Ix-7V は TRBV に、T-32V は UUKV に近縁であるこ

とが示された。

Great Island virus group のウイルスのうち、TRBV、Kemerovo ウイルス (KEMV)、Lipovnik ウイルス (LIPV) はヒトに感染し特に KEMV はヒトにまれに脳炎を起こすことがこれまでに知られている。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ことが報告されている。また TRBV および KEMV はヨーロッパからロシアにかけてユーラシア大陸にその存在が知られていたが、これまでに日本におけるダニ媒介性オルビウイルスの報告はなかった。したがって今後、本研究において分離された Ix-7V の性状解析あるいはマウスに対する毒性を解析する必要がある。フレボウイルスのうち UUKV はヒトに対する病原性を示さないが近縁の 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マウスに対する毒性を解析する必要がある。

この他にもトゴトウイルス属、オルトブニヤウイルス属等のウイルスは日本にも生息するダニによって媒介されるアルボウイルスであるため、今後も引き続きダニにおけるウイルス保有調査を行う必要が考えられる。各ウイルスはゲノム構造、感染様式、臨床症状、毒性がそれぞれ異なるため検出方法の多様化も必要であると考えられた。

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。また我が国および周辺国においても SFTSV、ダニ媒介性脳炎ウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス等の重篤な疾患の原因となるダニ媒介性のウイルス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オルビウイルス属に属するウイルスおよびフレボウイルス属に属するウイルス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.* Apr; 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.* Jan; 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. Jul; 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 M.L., 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關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 ML, 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

山口幸恵, 林昌宏, 伊藤(高山)睦代, 垣内五月, 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を決定する宿主側因子の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月, 神戸市

田島茂, 小滝徹, 谷ヶ崎和美, 林昌宏, 西條政幸, 高崎智彦. 製造株と異なる遺伝子型のウイルスに対する日本脳炎ワクチンの中和能の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月, 神戸市

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. ラッサウイルスなどのアレナウイルスに対

する非増殖型組換え狂犬病ウイルスワクチンの開発．第 61 回日本ウイルス学会学術集会，2013 年 11 月，神戸市

垣内五月，王麗欣，伊藤（高山）睦代，林昌宏，西村秀一，辻正徳，谷口修一，水口雅，岡 明，西條政幸．造血幹細胞移植におけるアシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス 1 型感染症の臨床的意義に関する研究．第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月，神戸市

佐藤正明，垣内五月，木下（山口）一美，伊藤（高山）睦代，林昌宏，西條政幸．ウイルス分離が不可能なヘルペス脳炎病原ウイルスの薬剤感受性試験法の開発と臨床応用．第 61 回日本ウイルス学会学術集会，2013 年 11 月，神戸市

中道一生，田島茂，林昌宏，西條政幸．JC ウイルスゲノムの転写調節領域に生じるランダムな変異をスキャンするための高解像度融解曲線分析法の確立．第 61 回日本ウイルス学会学術集会，2013 年 11 月，神戸市

齋藤悠香，モイメンリン，林昌宏，司馬肇，細野邦昭，西條政幸，倉根一郎，高崎智彦．日本脳炎ワクチン接種により誘導された抗体のデングウイルスに対する免疫反応の検討．第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月，神戸市

伊藤（高山）睦代，中道一生，山口（木下）一美，王麗欣，林昌宏，西條政幸．Establishment of the in vitro test for residual virulent rabies virus in inactivated rabies vaccines．第 11 回狂犬病研究会，2012 年 4 月，東京都

Lim C.K., Moi M.L., Kotaki A., Saijo M., Kurane I., Takasaki T. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2011. The 9th Japan-China Inter-

national Conference of Virology, June 12-13, 2012, Sapporo, Japan.

Lim C.K., Kotaki A., Omatu T., Moi M.L., Kurane I., Saijo M., Takasaki T. A Rapid Non-nested Reverse Transcriptase-PCR Assay for Vertebrate Flavivirus Subgroups Using a Novel Universal Single Primer Pair Based on a Conserved Region of NS5 Gene Sequences. The XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM). September 23-27, 2012, Rio de Janeiro, Brazil.

中道一生，井上直樹，倉根一郎，林昌宏，西條政幸．進行性多巣性白質脳症が疑われた患者の脳脊髄液におけるヘルペスウイルスの出現プロファイルの解析．第 17 回日本神経感染症学会総会，2012 年 10 月，京都市

林昌宏，網康至，藤井克樹，北浦一孝，モイメンリン，白井顕治，小滝 徹，須崎百合子，森川茂，西條政幸，鈴木隆二，倉根一郎，高崎智彦．マーモセットを用いたチクングニアウイルスの霊長類モデルの検討．第 60 回日本ウイルス学会学術集会，2012 年 11 月，大阪市

垣内五月，木下（山口）一美，伊藤（高山）睦代，西村秀一，林昌宏，西條政幸．造血幹細胞移植病棟にみられたパラインフルエンザウイルス 3 型感染症流行の分子疫学的解析．第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月，大阪市

伊藤（高山）睦代，中道一生，林昌宏，山口（木下）一美，垣内五月，王麗欣，倉根一郎，西條政幸．乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン国家検定法における 3Rs の導入．第 60 回日本ウイルス学会学術集会，2012 年 11 月，大阪市

山口（木下）一美，中道一生，伊藤（高山）睦代，林昌宏，倉根一郎，西條政幸．LAMP 法を用いた PML 患者の脳脊髄液中の JC ウ

イルスの検出および定量試験．第 60 回日本ウイルス学会学術集会，2012 年 11 月，大阪市

中道一生，林昌宏，西條政幸．進行性多巣性白質脳症患者の脳脊髄液中に検出された JC ポリオーマウイルスの経時的なゲノム変異パターンの解析．第 60 回日本ウイルス学会学術集会，2012 年 11 月，大阪市

Moi M.L., Lim C.K., Saijo M., Takasaki T., Kurane I. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using FcγR-expressing cells. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) 61st Annual Meeting. November 11-15, 2012, Atlanta, Georgia USA.

H. 知的財産権の出願・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