

- 1) Moi ML, Ami Y, Shirai K, Lim CK, 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)
 - 2) Takeshita N, Lim CK, Mizuno Y, Shimbo T, Kotaki A, Ujiie M, Hayakawa K, Kato Y, Kanagawa S, Kaku M, Takasaki T. Immunogenicity of single-dose Vero cell-derived Japanese encephalitis vaccine in Japanese adults. *J Infect Chemother.* 2014 Apr;20(4):238–42.
 - 3) Takayama–Ito M, Nakamichi K, Kinoshita H, Kakiuchi S, Kurane I, Saijo M, Lim CK. A sensitive in vitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines. *Biologicals.* 2014 Jan;42(1):42–7.
 - 4) Nakamichi K, Lim CK, Saijo M. Stability of JC virus DNA in cerebrospinal fluid specimens preserved with guanidine lysis buffer for quantitative PCR testing. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(4):307–10.
 - 5) Nakamichi K, Tajima S, Lim CK, Saijo M. High-resolution melting analysis for mutation scanning in the non-coding control region of JC polyomavirus from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Virol.* 2014 Jul;159(7):1687–96.
2. 学会等
- 1) 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. 金沢, 2014 年 9 月 4–6 日.
 - 2) 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. 横浜, 2014 年 11 月 10–12 日.
 - 3) 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. 横浜, 2014 年 11 月 10–12 日.
 - 4) Moi ML, 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. 横浜, 2014 年 11 月 10–12 日.
 - 5) 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. Fc γ R 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. 横浜, 2014 年 11 月 10–12 日.
 - 6) 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. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日.

- 7) 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. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日.

- 8) 中山絵里, 小滝徹, 谷ヶ崎和美, 林昌宏,

西條政幸, 高崎智彦. チ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. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日.

- 9) 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. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日.

3. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
分担研究報告書

病原体及び毒素の管理システムおよび評価に関する総括的な研究(H24-新興-一般-013)
ダニ媒介性の病原ウイルスのリスク解析

研究分担者 福士秀悦 国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
研究協力者 福間藍子 国立感染症研究所ウイルス第一部・研究員

研究要旨:2011 年以降,ダニ媒介性のウイルスによる新興感染症が次々と報告されている。本研究では,ダニ媒介性のフレボウイルスでヒトに熱性疾患を起こすウイルスに関するウイルス学,血清学,分子系統学的な特徴に関する情報収集を行い,これらのウイルスのリスク解析を行ってきた。平成 26 年度は,日本における重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の疫学,流行状況等に関する特徴についてまとめた。SFTS ウイルスは日本国内の広い地域に分布していると考えられ,保有するダニは複数種確認されている。ほとんどの SFTS 患者は 50 歳以上であることから,高齢がリスク因子と考えられた。また,SFTS とは近縁ではないが,ヒトに熱性疾患を起こすウーケニエミウイルスに関するリスク解析を行った。本研究により,ダニ媒介性の病原ウイルスのリスク管理システムの確立に有用な知見を提供できると考えられる。

A. 研究目的

2011 年以降,ダニ媒介性のウイルスによる新興感染症が次々と報告されている。ダニ媒介性ウイルスの性状,ヒトへの感染経路,臨床症状等について情報を収集し,ウイルスの侵入に対するバイオセーフティ,バイオセキュリティシステムを整備しておく必要がある。本研究では,ダニ媒介性のフレボウイルスでヒトに熱性疾患を起こすウイルスに関するウイルス学,血清学,分子系統学的な特徴に関する情報収集を行い,これらのウイルスのリスク解析

を行ってきた。平成26年度は,日本における重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の疫学,流行状況等に関する特徴についてまとめた。さらに,SFTS ウイルス(SFTSV)とは近縁ではないが,ヒトに熱性疾患を起こすウーケニエミウイルスのヒトへの感染性,感染経路,臨床像,自然宿主の解明の有無などについて情報収集を行った。

B. 研究方法

文献検索,学会,国際会議等に参加し,

SFTSV および、ウークニエミウイルスに関しウイルスの性状と感染リスクに関する情報収集を行った。

(倫理面からの配慮について)

C. 研究結果

1) 日本における SFTS の疫学, 流行状況について

患者の発生状況

後方視的研究から日本ではすくなくとも 2005 年から SFTS が存在していたことが明らかになっている。2014 年 12 月 9 日現在, 111 例の SFTS 患者(うち, 死亡 37 例)が報告されている。すべて西日本で発生している。中国の報告と同様, ほとんどの患者は 50 歳以上であることから, 高齢がリスク因子と考えられる。これまで, 国内で SFTSV の二次感染例の報告はない。

ダニ, 野生動物の調査

九州から北海道の 26 自治体で捕獲された植生マダニおよびシカに付着しているマダニ(18 種 4,000 匹以上)について検査を行われ, 複数種の植生マダニ(タカサゴキララマダニ, キチマダニ, オオトゲチマダニ, ヒゲナガチマダニ等)から SFTSV が検出されている。ウイルス保有率は 5-20%程度と, マダニの種類により違いがある。シカ等に付着しているマダニでは, 植生ダニよりも陽性率が高い。日本では SFTS 患者は西日本のみで報告されているが, SFTSV 陽性マダニは西日本以外の患者が報告されていない地域でも見ついている。シカ, イノシシ, イヌ等の血清を用いた抗体保有調査

では, 東北から九州まで広い地域で抗体陽性動物が見ついている。これらのことから SFTSV は日本国内の広い地域に分布していると考えられる。

ヒトへの感染経路

SFTSV が流行している地域ではマダニとマダニに吸血される動物との間で SFTSV が循環・保持されるサイクルが成立し, ヒトは SFTSV を有するマダニにかまれることにより SFTSV に感染する。また, SFTS 患者の血液と接触することによるヒト-ヒト感染事例が中国で報告されている。

2) ウークニエミウイルスの性状と感染リスクについて

最初の報告

ウークニエミウイルスは 1959 年にフィンランド南東部でマダニ *Ixodes ricinus* から最初に分離された。1961 年から 1970 年にかけて, フィンランド南部の野鳥 774 羽の血液, 臓器について調査したところ, 6種のウークニエミウイルスがサックリングマウスへの接種により, 分離された。それらはすべて6-7月にスズメ目から分離された。

その後, スカンジナビア, ヨーロッパ中西部, 中央アジアでもウイルスが分離されている。

ウイルスの性状

ウークニエミウイルスは他のフレボウイルスと同様, S,M,L の3分節ゲノム RNA を有する。ウイルスは有機溶媒(エーテル, デオキシコール酸ナトリウム)に感受性であるが, RNA 合成阻害剤フルオロデオキシウリジンには抵抗性を示す。56°C1 時間でウイルスタイターは 0.8 log

減少する。BHK21 細胞がウイルスの感染価測定に適している。

血清疫学

1960 年代にフィンランドで行われた血清疫学の報告によると、ウシ 2,566 頭中 373 頭がウークニエミウイルス中和抗体陽性で、そのほとんどがマダニの生息地で飼われていた。一方、トナカイ(648 頭)及びヒト(282 人)の血清はすべて中和抗体陰性であった。ハンガリー、ノルウェイで行われたヒト血清調査では、ウークニエミウイルス抗体陽性がいくつか確認されている。南ロシアではウークニエミウイルス感染によると考えられる熱性の疾患が3例報告されているが、いずれも軽症である。

ウークニエミウイルスに関する参考文献

- Palacios G. et al, J. Virol. 87 (6) 3187-3195, 2013.
- Saikku P. Arboviruses in Finland. Am. J. Trop. Med. Hygiene 22 (3) 400-403, 1973.
- Saikku P., Brummer-Korvenkontio M. Am. J. Trop. Med. Hygiene 22 (3) 390-399, 1973.
- Hubalek Z, Halouzka J. Acta Sci. Nat. Brno 30:1-95. 1996.
- Molnar E, et al, J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 17: 1-10. 1973.
- Traavik T, Mehl R. Arch. Virol. 54:317-331, 1977.

D. 考察

日本における SFTSV の疫学研究は 2013 年以降、前方視的および、後方視的に行われてきた。また、ベクターとなるダニの調査も全国

的におこなわれるようになり、SFTSV を有するダニの生息域、保有率、野生動物との相互関係等、実態が明らかにされつつある。SFTSV を保有するダニの種類は複数種あることが明らかとなり、SFTSV は日本全国に分布する可能性が指摘されている。日本国内の幅広い地域においてマダニの媒介による SFTSV 感染のリスクがあると考えられる。

ウークニエミウイルスは 1960 年代分離された当初はヒトに感染しないと考えられていたが、その後の調査でヒトから抗体が検出されていること、症例数は少ないがウークニエミウイルス感染による熱性疾患が報告されている。マダニを介した感染症には病原体不明のものが依然として少なくない。ウークニエミウイルス感染症の実態は不明であるが、ダニのウイルス保有調査等により、感染リスクを明らかにする必要がある。

E. 結論

- 1) SFTSV, ウークニエミウイルスの疫学調査に関する情報を収集した。
- 2) 日本国内の幅広い地域においてマダニの媒介による SFTSV 感染のリスクがある。
- 3) ウークニエミウイルス感染症の実態は不明であるが、ダニのウイルス保有調査等により、感染リスクを明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報

日本に生息しているマダニから、ヒトに病原性があるウークニエミウイルスが分離された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. Analysis of Lujo Virus Cell Entry using Pseudotype Vesicular Stomatitis Virus. *J Virol.* 88(13):7317-7330,2014.
- 2) Bukbuk DN, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Iha K, Fukuma A, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M, Kasolo F, Baba SS. Development and validation of serological assays for viral hemorrhagic fevers and determination of the prevalence of Rift Valley fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 108(12):768-773, 2014.
- 3) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J Clin Microbiol.* 52(9):3325-3333, 2014.

2. 学会発表

- 1) 福士秀悦, 永田典代, 岩田奈織子, 谷英樹, 吉河智城, 谷口怜, 福間藍子, 下島昌幸, 西條政幸. 高齢マウスにおける重症熱性血小板減少症候群ウイルスの感染感受性の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 2) 福間藍子, 福士秀悦, 吉河智城, 鈴木忠樹, 谷英樹, 谷口怜, 下島昌幸, 西條政幸. SFTSウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出ELISAへの応用. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 3) 西條政幸, 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 4) 下島昌幸, 福士秀悦, 谷英樹, 谷口怜, 西條政幸. プラークを形成するSFTSウイルスによる中和抗体価測定. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 5) 谷英樹, 谷口怜, 福間藍子, 福士秀悦, 森川茂, 下島昌幸, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスGPの細胞融合能と25-hydroxycholesterolによる細胞阻害効果. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 6) 谷口怜, 堀本泰介, Joseph Masangkay, Puentepina Roberto Jr., 大松勉, 永田典代, 江川和孝, 福間藍子, Harpal Singh, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 下島昌幸, 吉河泰弘, 西條政幸, 久和茂, 前田健. フィリピンのコウモリ

- からのプテロパインオルソレオウイルスの分離.
第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜,
(2014. 11).
- 7) 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 江川和孝, 下島昌幸, 森川茂, 西條政幸. ワクシニアウイルスLC16m8株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 8) 岩田奈織子, 福士秀悦, 福間藍子, 鈴木忠樹, 竹田誠, 田代真人, 長谷川秀樹, 永田典代. 中東呼吸器症候群コロナウイルスに対するマウスおよびラットの感受性について. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 9) Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Tani H, Yoshikawa T, Suzuki T, Hasegawa H, Saijo M, Shimojima M. Development of antigen-capture ELISA for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).
- 10) Taniguchi S, Fukushi S, Masangkay JS, Puentespina RP, Omatsu T, Maeda K, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Shimojima M, Kyuwa S, Saijo M, Morikawa S. Seroepidemiological study of SFTS in wild bats in the Philippines. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
分担研究報告書

病原体及び毒素の管理システムおよび評価に関する総括的な研究(H24-新興-一般-013)
身近に潜む病原微生物(特にマダニ媒介性病原体)に関する研究

研究分担者	前田 秋彦	京都産業大学総合生命科学部動物生命医科学科・教授
研究協力者	染谷 梓	京都産業大学総合生命科学部動物生命医科学科
	岡本 奈津実	京都産業大学総合生命科学部動物生命医科学科
	藪 智子	京都産業大学総合生命科学部動物生命医科学科
	益本 大輝	京都産業大学総合生命科学部動物生命医科学科
	好井 健太郎	北海道大学大学院獣医学研究科・准教授

研究要旨:昨年度の本課題研究において、京都市北部の山間部で採取されたフタトゲチマダニ(*Haemophysalis longicornis*)から、未知のウイルス種を分離した。マダニから伝播される既知のウイルス種やリケッチアの遺伝子検査は陰性であったため、次世代シーケンス反応により RNA の網羅的な解析を行ったところ、オルソミクソウイルス科に属するトゴトウイルス(THOV)に近似する遺伝子配列が検出された。本ウイルスの THOV 核蛋白質(NP)に対するペプチド抗体を作製し、ウイルス感染細胞を免疫染色したところ特異的な反応が認められた。さらに、本抗体を用いて、ウイルス感染細胞の抽出液をウエスタンブロット解析したところ、約 40kDa の蛋白質が特異的に反応した。THOV は、アフリカでは人獣共通感染症であることが報告されており、日本における本ウイルス感染症への対策を検討する必要がある。

A. 研究目的

マダニは種々の感染症を伝達することが知られている。日本では、1980 年代に日本紅斑熱が、2013 年には重症熱性血小板減少症(SFTS)がダニ媒介性の新興感染症として報告された。私たちが生活する環境中に生息す

るマダニは、未知の感染症を引き起こす病原微生物を有する可能性がある。昨年度の本研究課題で、私たちは京都の北区の山間部で採取したフタトゲチマダニ(*Haemophysalis (H.) longicornis*)から、未知のウイルスを分離した。本年度は、このウイルスの種を同定することを

目的とした。

B. 研究方法

1) 分離した微生物の同定

分離微生物について、ダニ媒介性脳炎ウイルスや SFTS ウイルス、リケッチア等のマダニ媒介性感染症を引き起こす病原体の遺伝子検出を試みたが、全て陰性であった。そこで、培養上清中に存在する分離微生物の RNA を抽出し、次世代シーケンスにより分離微生物遺伝子の網羅的な解析を行った。

2) 分離した微生物に対するペプチド抗体の作製と、それを用いた分離微生物抗原の解析

次世代シーケンスにより同定した分離微生物の構造蛋白質のアミノ酸配列を有するペプチドを作製し、ウサギに投与し抗分離微生物抗体を作製した。作製した抗ペプチド抗体を用いて、感染 VeroE6 細胞の当該微生物蛋白質の発現を免疫染色法 (IFA) により確認した。さらに、感染細胞中の当該微生物蛋白質をウエスタンブロット解析した。

3) マダニの当該微生物保有状況の調査

当該微生物が分離された京都市北区の山間部において、春から秋にかけて優占する *H. longicolnis* と秋から冬にかけて優占する *H. flava* を採取し、逆転写ポリメラーゼ増幅反応 (RT-PCR) により当該微生物の遺伝子の検出を行った。

(倫理面からの配慮について)

該当しない。

C. 研究結果

1) 次世代シーケンスによる網羅的解析の結果、オルソウイルス科のトゴトウイルス (THOV) の 6 つのセグメント RNA が検出された (HI-Kamigamo-25 株)。THOV HI-Kamigamo-25 株とアフリカ分離株 (DakAry189, 2A, IbAn39048, UGV-70 および DakArB85/10E 株) およびヨーロッパ分離株 (193.174 Poti503 および SiAr126 株) の分子系統樹解析を行ったところ、京都で分離された本株はアフリカ株やヨーロッパ株とは異なるクラスターを形成していた (図 1)。

2) 図 2 に THOV HI-Kamigamo-25 株のヌクレオキャプシド蛋白質 (NP) のアミノ酸配列を示す。N 末端の 17 アミノ酸からなるペプチドを合成し、ウサギに接種して抗 THOV NP ペプチド抗体を作製した。作製した抗 THOV NP ペプチド抗体を用いて、THOV HI-Kamigamo-25 株の非感染 Vero E6 細胞 (図 3A) と感染細胞 (図 3B) を抗原として IFA を行った。図 3B で観察されるように、感染細胞の細胞質に THOV NP が検出された。次に、ウエスタンブロット解析を行い、THOV NP を検出したところ、感染細胞の溶解液中にのみ約 40kDa の THOV NP が検出された (図 4, レーン 2)。

3) 京都市北部の山間部で採取した 2 種のマダニ種において、THOV の遺伝子保有状況を RT-PCR により調査した (表 1)。*H. longicolnis* では 104 個体中 2 個体 (1.92%)、*H. flava* では 259 個体中 1 個体 (0.38%) が THOV の遺伝子を

保有していた。

D. 考察

以上の結果から、昨年度、京都市北区の山間部で採取された *H. longicolnis* から分離された微生物は THOV であることが明らかとなった。THOV は、ウシやヒツジ等の家畜や野生動物に感染し、流産を引き起こす。また、アフリカでは2例のヒト感染例が報告され、内1例が死亡例であった。したがって、THOV はマダニ媒介性の人獣共通ウイルス感染症である。しかし、日本における THOV 感染の実態は不明である。今後、ヒトを含めた各種動物での感染状況を調査するとともに、その病原性について検討する必要がある。京都の北部の山間部で生息するマダニは、春から夏にかけて *H. longicolnis* が優占種であり、秋から冬にかけて *H. flava* が優占種となる。THOV の遺伝子は、両種において検出されており、一年を通してマダニから感染する可能性がある。

THOV を含め、病原体分類表に記載のない病原微生物についての取り扱いについて、早期の対応が必要である。

E. 結論

京都市に生息するマダニから、これまで分離報告のなかった THOV を分離した。したがって、日本の自然界に生息するマダニは、ヒトに感染症を引き起こす、未同定の病原体を保有する可能性がある。

F. 健康危険情報

THOV の動物やヒトへの病原性は不明であ

る。しかし、日本の自然界に生息するマダニは、THOV を保有することが明らかとなったため、今後、注意を喚起する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Someya, A, Ito, R, Maeda, A, Ikenaga, M.
Detection of rickettsial DNA in ticks and wild boars in Kyoto City, Japan. Journal of Veterinary Medical Science, In press, 2015
- 2) Velado Fernández, I, Okamoto, N., Ito A., Fukuda, M., Someya, A., Nishino, Y., Sasaki, N., Maeda, A. Development of a novel protocol for generating flavivirus reporter particles. Journal of Virological Methods 208:96–101, 2014
- 3) Makino, Y., Suzuki, T., Hasebe, R., Kimura, T., Maeda, A., Takahashi, H., Sawa, H.
Establishment of tracking system for West Nile virus entry and evidence of microtubule involvement in particle transport. Journal of Virological Methods 195:250–257, 2014
- 4) 伊藤亜希, 岡本奈津実, 米島万有子, 染谷梓, 前田秋彦. 京都市市街地における蚊の調査. 京都産業大学総合学術研究所所報 9:95–107, 2014

2. 学会発表

- 1) 岡本奈津実, 好井健太郎, 中尾亮, Robert Klaus Hofstetter, 藪智子, 益本大輝, 染谷梓, 前田秋彦. Thogoto virus 様ウイルスのダニからの分離. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014.11)

- 2) 伊藤亜希, イゴール ベラド フェルナンデス, 岡本奈津実, 染谷梓, 西野佳以, 佐々木宣哉, 前田秋彦. フラビウイルス レポーターウイルス粒子の簡便作出法の開発. 第 21 回 トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 横浜, (2014.11) M., Velado Fernandez, I., Nishino, Y., Maeda, A.: Detection of spotted fever group rickettsiae in Kyoto city, Japan. The 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology (XII-JKISM)), Tokyo, Japan (2014.3)
- 3) Someya, A., Kozono, S., Ito, A., Okamoto, N., Ikenaga, M., Maeda, A.: Tick prevalence and detection of spotted fever group rickettsiae in Kyoto city, Japan. International Union of Microbiological Societies Congress 2014 (XIVth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology), Montreal, Canada (2014.7-8) H. 知的財産権の出願・登録状況
該当しない.
1. 特許取得
該当しない.
2. 実用新案登録
該当しない.
3. その他
特になし.
- 4) Someya, A., Ikenaga, M., Ohonishi, O., Konno,

表 1. 京都市北部の調査地に生息するマダニの THOV 保有状況

マダニ種	RT-PCR 陽性数 [*] / 検体数 (陽性率 (%))	
<i>Haemophysalis (H.) longicornis</i>	2 / 104	(1.92)
<i>H. flava</i>	1 / 259	(0.38)

* THOVの第6セグメントを標的としたRT-PCRにより調査した。

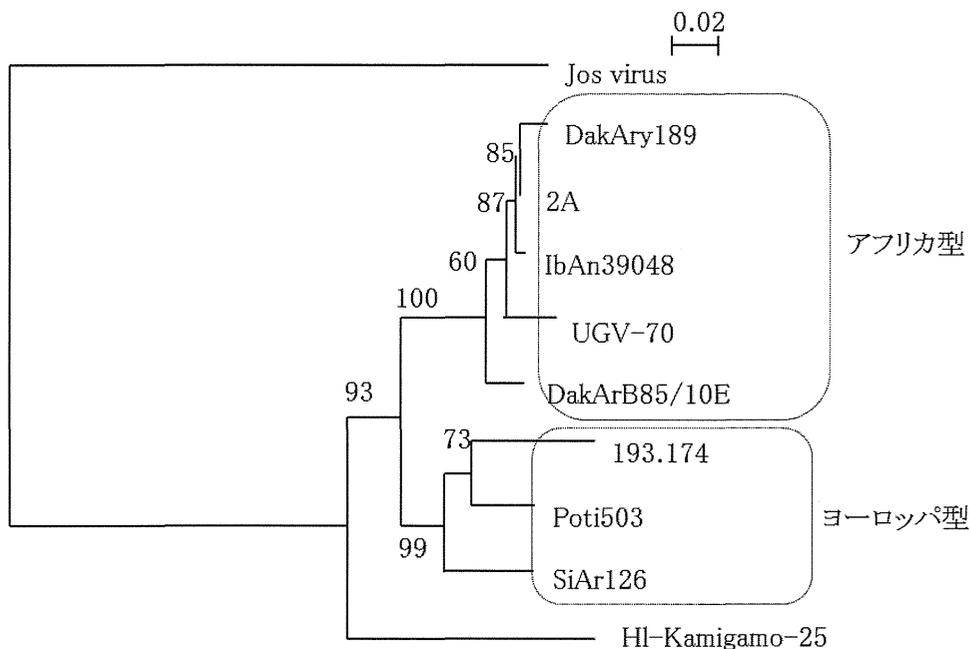


図1. THOVの系統樹解析

これまでに分離されたTHOVの膜蛋白質遺伝子配列を基にした系統樹解析を示す。本調査において、*H. longicornis*から分離されたTHOV HI-Kamigamo-25株はアフリカ分離株(DakAry189, 2A, IbAn39048, UGV-70およびDakArB85/10E株)やヨーロッパ分離株(193.174, Poti503およびSiAr126株)とは異なるクラスターを形成していた。またTHOVと近縁のJos virusとともに解析した。

NH2-

MATDQMDLSGPPTKKPHVENESQIPKMYEMIRDQMKTLASTHNIPLTIDHNCE
 VLGSIIAACTNNRDLRPVDKYWFFMGQPGAEMTEVEIDIQPQMOWAKGAV
 HDPKYKGQWYPFLALLQLSNKTKDTILWQKYPVTQELELNNLEIYANGHGK
 DRLKNSRPRSVGPLVHLLHLKRLQENPPKNPKTKKHLESNAVNGIRKSIVSHLKR
 QCIGETQKAMINQFEMGRWESLSTFAASLLAIKPRIENHFVLTYPVANCEDFA
 GATLSDEWVFKTMEKIARKGTLRICGPDEKWASFINQITIHCVFQTAGEDLGVL
 EWVFGGRFNQRKEFGRYCKKSQTKVIGLFAFQYVHWSKPLKAAPRSIEGAKRG
 QISCRPSFKGKRPSYNNFTSIDAIQSASSSQATNFYDQVREECQKYMDLRVEGT
 TCFYKKGTTTEIEFPGSLSCNTYLFG
 - COOH

図2. THOV HI-Kamigamo-25株の核蛋白質(NP)のアミノ酸配列

遺伝子配列解析の結果、予想されるTHOV HI-Kamigamo-25株NPのアミノ酸配列を示す。四角で囲んだN末端17アミノ酸は、ウサギ抗THOV NPペプチド抗体作製のためのペプチドとした。

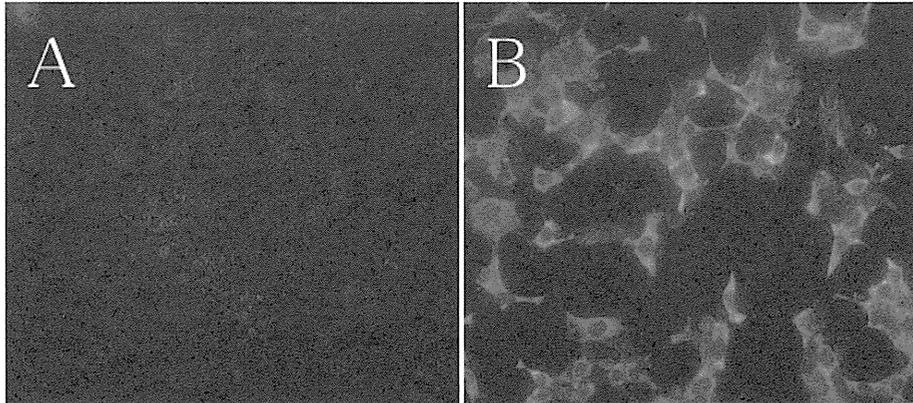


図3. ウサギ抗THOV NPペプチド抗体を用いた免疫抗体法によるTHOV NP蛋白質の検出

THOV HI-Kamigamo-25株非感染VeroE6細胞 (A) と感染VeroE6細胞 (B) への抗THOV NPペプチド抗体の反応性を比較解析した。

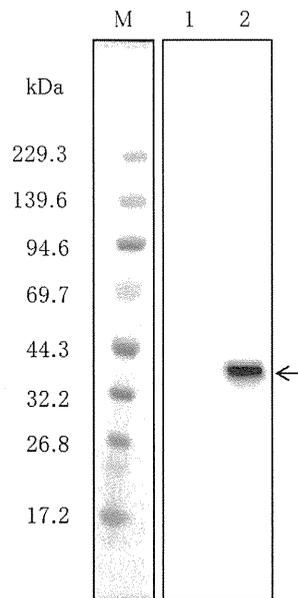


図4. ウサギ抗THOV NPペプチド抗体を用いたウエスタンブロット解析
THOV HI-Kamigamo-25株非感染VeroE6細胞 (レーン1) と感染VeroE6細胞 (レーン2) を、4-12% SDS-PAGE 上に展開し、PVDF膜にブロットした。次に、PVDF膜に展開させた蛋白質に抗THOV NPペプチド抗体を反応させ、THOV NPを検出した。矢印はTHOV NPを示す。レーンMは蛋白質のサイズマーカーを泳動した。

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
分担研究報告書

病原体及び毒素の管理システムおよび評価に関する総括的な研究(H24-新興-一般-013)
ヒトに病原性のある呼吸器感染症起因病原体の解析とリスク分類

研究分担者 西村秀一 (独)国立病院機構仙台医療センター臨床研究部ウイルス疾患研究室・室長

研究要旨:呼吸器系ウイルス感染症についてリスク管理に必要な情報を得て、それらを病原体の管理指針の中に組み込むことを目的に、本年度は SARS コロナウイルス(重症急性呼吸器症候群コロナウイルス), MERS コロナウイルス(中東呼吸器症候群コロナウイルス), A/H5N1インフルエンザウイルス, A/H7N9 インフルエンザウイルスに関する, 疫学・臨床情報の収集を行った. さらにはウイルスのリスク管理の中で不足している, ウイルスの不活化に関する知見の取得のための方法論の確立を目的に, 独自の実験により, 情報収集対象の中での主要な位置を占めるインフルエンザウイルスを対象に, 空中浮遊時ならびに環境表面付着時における気温・湿度と活性保持時間の関係を調べた. また特殊装置あるいは特殊化合物の空中への拡散によるウイルス不活化や殺菌作用を謳う市販製品があるが, 果たしてそれが実生活環境で効果があるのか, 何らかの効果があるとすれば, その効果発揮に必要な条件は何かといった観点で, 実際のウイルス/細菌の不活化/殺菌作用を検証した.

A. 研究目的

ウイルスの病原性やヒトにおける伝染性等の情報はウイルスの管理上必要な情報であり, それをコンパクトにまとめられれば, ウイルスを保存する各施設における保存や取り扱いの上で, 使い勝手の良い有用な情報集となる. よって, その作成に参加する.

また, 環境汚染を病原体による空気や環境汚染が起きてしまった際に, 1)それらがどれだけ活性を保っているか 2)現在, 広く一般に使われている特殊装置あるいは特殊化合

物の空中への拡散によるウイルス不活化や殺菌作用をもつとされる電気製品や揮発剤が, 除染の意味で使用に耐えるのか, 使用可能としてどのような条件下であるかといったリスク管理上役立つ可能性のある情報を得るための方法論の構築をめざした.

B. 研究方法

1) 情報の収集と整理: 文献収集とその内容の分析ならびに, WHO, CDC の発信する情報およびインターネットでの海外情報の定期

的チェック

2) インフルエンザウイルスをモデルとした、環境中に排出されたウイルスの活性に対する温度・湿度や特殊物質による不活化の真偽についての独自の検討システムの構築

2-1) 温度と相対湿度を自由に変えられる環境試験室ならびに関連デバイスの作成

2-2) 上記の実験系を用いて、特殊イオン等を標榜する何らかの物質を空中に放出することで、ウイルス不活化や殺菌作用を謳う家電製品について検証し、それらが、感染制御が求められる場合はもとより、一般生活上そうした効果がないことを明らかにしてきたが、今年度もいくつかの機器で検討した。また、二酸化塩素を空間に放出することで空中浮遊あるいは環境表面のウイルスの不活化あるいは殺菌を謳う製品が市販されているが、二酸化塩素のウイルスや細菌に対する効果を種々の濃度・温度・湿度条件下で、検証した。

(倫理面からの配慮について)

特に倫理面で問題になるようなことはない。

C. 研究結果

1) SARSコロナウイルス（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス）に関する疫学や臨床の情報は、これまで知られてきた以上の知見は特になく、従来の知識を、簡潔にまとめることができた。中東地域で新たに出現したコロナウイルス感染症(MERS)につい

ては、社会におけるウイルスのリザーブがほぼラクダに特定されつつあること、市中での感染の連鎖はほとんどなく、欧米での症例もほとんどが輸入感染の形をとっていること、一方で感染管理が徹底されない医療施設の中での伝染が、起きていることなどがわかった。また、これらのウイルスに対しては、特異的治療法やワクチンもまだ存在していない状態であることが確認された。

2) A/H5N1 インフルエンザについても、臨床的知見においては、これまでの知見に追加すべきところはなく、従来の知識を簡潔にまとめることができた。疫学的には、未だエジプトやインドネシア等の従来の患者出現地域での患者の散発が続いていることがわかった。

3) A/H7N9 インフルエンザウイルスに関しても、出現以来、臨床情動的には、発見される患者の中の肺炎による重症化率が高いという従来の知識以上のことはなかった。疫学の上では、生きた鳥を扱う市場への訪問との関連が強く示唆されているものの、その一方で、中国南部に最近患者発生が多いものの、それでも中国各地に散発している上、地域の鳥のファームでの検出がほとんどないことから、自然界における伝播様式がいまだ特定できていない現状がわかった。

4) ある特定の温度・相対湿度条件下でウイルスを含む液滴をネブライザーで飛沫核状態に散布或いは大飛沫中のウイルスの環境表面への付着を想定しガラス等の対象となる板に1 μ l程度の小液滴を滴下し一定に

保たれた目的とする温度湿度条件下に目的の時間晒すことが可能となった。これによって、インフルエンザウイルスの活性は、環境表面に液滴中に入った状態で存在するときにも、温度湿度の影響を受けやすいこと、さらにはその液滴が液滴のままであるときと、スミア状に伸びたときでは、環境条件による影響の受け方が異なることが示唆された。現在、その確認作業が進んでいる。空中浮遊ウイルスについては、ウイルスを含む飛沫核を、吸引ポンプで一定量引きゼラチンフィルターを通過させ、同フィルターで捕捉し、フィルターを培養液で溶かすことで回収し、回収されたウイルスの活性をプラーク法で測定することが可能となった。これによって温度・湿度と空中浮遊ウイルスの失活の関係を調べたところ、我々の系でも、Harper や Shaffer らの古典的系による実験の成績に基づいて従来言われてきたこととほぼ同じ傾向が確認された。現在、浮遊途中で湿度が急激に変わった場合に、ウイルスの失活率にそれに応じた変化が現れるのかを調べる実験を行っている。

- 5) 二酸化塩素を含むゲル基材から生活空間に二酸化塩素を芳香剤のように放出することで生活空間あるいは環境表面のウイルス不活化や殺菌効果を謳う市販製品を対象に、実際の効果を上述の我々の実験系でためしてみたところ、ウイルスの積極的失活は、湿度に依存しており、70%RH といった高湿度条件下で 100ppb 近い高い空間濃度が得られた場合著しいものの、冬の室内環境に相当するような乾燥状態 25%RH

での効果はほとんどないことが判明した。そこで、製品ではない純粋な二酸化塩素そのもので実験したところ、同様の成績となった。なお、一方で黄色ブドウ球菌を用いた実験では、上述の 100ppb 付近の空間濃度であっても殺菌効果は認められなかった。

D. 考察

1. A/H5N1, H7N9 インフルエンザや SARS, MERS コロナウイルスについては、本報告書を記載している現在、目前に迫った大きな脅威は存在しない。だが、それでも危機管理の観点からは、油断することなく本邦での感染者出現時の準備を、水面下で粛々と進めておくべきであろう。
2. ウイルスの時間経過と失活の関係については、ひとつの種類のウイルスにひとつの結果があるのではなく、そのウイルスの置かれた条件によって大きく変わるものである。ひとつの数字だけが一人歩きしないように注意が必要であろう。
3. 二酸化塩素は、ウイルス不活化や殺菌に優れた効果を持つ可能性があるが、そのためには使用の条件、すなわち濃度や湿度が至適範囲にある必要がある。

E. 結論

今後も、呼吸器系ウイルスの感染に関する知見について情報収集と指針情報の改定と、それに基づく対応準備を継続的に行うべきである。また、我々がインフルエンザウイルスでおこなった外部環境中のウイルスの活性に関

する研究をすべてのウイルスで実施することが望ましい。それとともに、環境中のウイルスを失活させる適切な方法の模索が必要であり、それらの使用条件の検討ならびに無効な方法の排除のための検証が大事である。

F. 健康危険情報

A/H5N1, H7N9 インフルエンザや SARS, MERS コロナウイルスについては、本報告書を記載している現在、目前に大きな脅威は存在しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Katsushima Y, Katsushima F, Suzuki Y, Seto J, Mizuta K, Nishimura H, Matsuzaki Y: Characteristics of mycoplasma pneumoniae infection identified by culture in a pediatric clinic. *Pediatr Int*, 57: 2014 Sep 29. doi: 10.1111/ped.12513.
- 2) Yamaya M, Nadine LK, Ota C, Kubo H, Makiguchi T, Nagatomi R, Nishimura H. Magnitude of influenza virus replication and cell damage is associated with interleukin-6 production in primary cultures of human tracheal epithelium. *Resp. Physiol. Neurol.*, 202:16-23, 2014.
- 3) E Hatagishi, Okamoto, Ohmiya, H Yano, T Hori, W Saito, H Miki, Y Suzuki, R Saito, T Yamamoto, M Shoji, Y Morisaki, S Sakata, H Nishimura: Establishment and Clinical

Applications of a Portable System for Capturing Influenza Viruses Released through Coughing. *PLOS ONE* 2014 Aug 1; 9(8):e103560. doi: 10.1371

- 4) Yamaya M, Nishimura H, Nadine LK, Ota C, Kubo H, Nagatomi R: Ambroxol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Arch Pharm Res* 37, 520-529, 2014.
- 5) Yamaya M, Nishimura H, Nadine L, Kubo H, Nagatomi R: Formoterol and budesonide inhibit rhinovirus infection and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Respiratory Investigation* 52:251-260, 2014.
- 6) Yamaya M, Nadine L, Kubo H, Saito K, Saito R, Nishimura H: Effects of neuraminidase inhibitors on the release of oseltamivir-sensitive and oseltamivir-resistant influenza viruses from human airway epithelial cells. *J Med Virol* DOI: 10.1002/jmv.23974, 2014
- 7) 菱川容子, 橋本真帆, 倉橋宏和, 別府玲子, 大谷可菜子, 西村秀一: 重症心身障害児(者)施設におけるヒトメタニューモウイルスの集団感染と重症例の発生. *日本重症心身障害学会誌* 39:379-386, 2014.

2. 学会発表

なし	なし
H. 知的財産権の出願・登録状況	2. 実用新案登録
なし.	なし
1. 特許取得	3. その他
	なし

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
分担研究報告書

病原体及び毒素の管理システムおよび評価に関する総括的な研究(H24-新興-一般-013)
ヒトに病原性のあるズーノーシス起因病原体の解析とリスク分類の研究

研究分担者 奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部・主任研究官

研究要旨: 発生が稀だが、公衆衛生上極めて重大な影響を与えうる動物由来感染症(Zoonoses)の海外および国内での発生状況に関する調査を行った結果、細菌性の感染症では新たな脅威と考えられる疾病の発生は認められなかった。今年度は、ウイルス性の新興・再興感染症であり、ヒトに重篤な症状を引き起こす可能性のある BAS-Congo ウイルス感染症およびニパ・ヘンドラウイルス感染症に関する発生リスク評価を行った結果、これらの感染症を含む新興・再興感染症(細菌性、ウイルス性共に)に対するモニタリングおよび継続した情報収集の重要性が示唆された。

A. 研究目的

ヒトに重篤な症状を引き起こす可能性のある動物由来感染症の海外および国内での発生状況を調査したなかで、ヒトに重篤な症状を引き起こす可能性のあるウイルス性の新興・再興感染症である BAS-Congo ウイルス感染症およびニパ・ヘンドラウイルス感染症の発生リスクに応じた備えを可能とするための発生リスクを評価し、万一の発生に備えを行うことが目的である。

B. 研究方法

最近 20 年間で新たに発生したウイルス性のズーノーシスでリスク評価が必要と思われた疾病についての評価シートを作成した。

BAS-Congo ウイルス感染症およびニパ・ヘンドラウ

イルス感染症は複数のヒト死亡例と動物への感染例(ニパ・ヘンドラウイルス)が報告されている。これらの疾病についてリスク評価のための各項目についての資料を作成した(表 1)。

C. 研究結果

事例数や発生地域は限局しているものの、ヒト死亡例が複数報告されている BAS-Congo ウイルス感染症およびニパ・ヘンドラウイルス感染症は、感染経路あるいは再発メカニズムなど未だ不明な点が多いことが改めて示された。

BAS-congo ウイルス感染症は単発的な発生事例のみであるが、感染源が不明である。ヒト-ヒト感染によるものと思われる看護者への二次感染報告もあることから、高い感染力が疑われる。

ニパ・ヘンドラウイルス感染症の場合、ニパはマレーシアおよびバングラデシュでの発生が報告されている。ニパウイルスはマレーシアではコウモリから豚さらにヒトへの感染経路であるのに対し、バングラデシュではコウモリの体液が混入したナツメヤシ樹液の摂取による感染が疑われており、コウモリからヒトへの感染経路である可能性が高い。地域により異なる感染経路が考えられることから地域の特性や産業構造、社会的状況など複数の要因により既知の発生事例とは異なる発生リスクがあり得ることが示された。

ヘンドラウイルス感染症は馬からヒトへの感染経路であることが示されたことから、獣医師や飼養者への啓発が必要であると思われる。

D. 考察

新興・再興感染症のなかでヒトに重篤な病原性をもつウイルス性の動物由来感染症の中には病原性メカニズムや感染源、感染経路がまだ明確ではないことからの的確なリスク管理のため今後も継続した発生動向調査および研究報告調査が必要であることが明らかとなった。

E. 結論

動物由来感染症は数多く発生しているが、今回調査したウイルス性疾患の発生頻度は低く、これまでに日本国内での発生報告はない。一方、輸入感染症として国内に侵入する可能性は常にあるので継続した発生動向モニタリングおよび的確な発生リスク管理が必要であり、それを可能とするモニタリングおよびサーベイランスシステムの構築を行うことが重要であると思われる。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし