

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)
研究分担報告書

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 様ウイルスのマダニからの分離. 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・ベスチウイルス研究会, 横浜, (2014.11)
- 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)
- 4) Someya, A., Ikenaga, M., Ohonishi, O., Konno, 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)
- 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.

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。

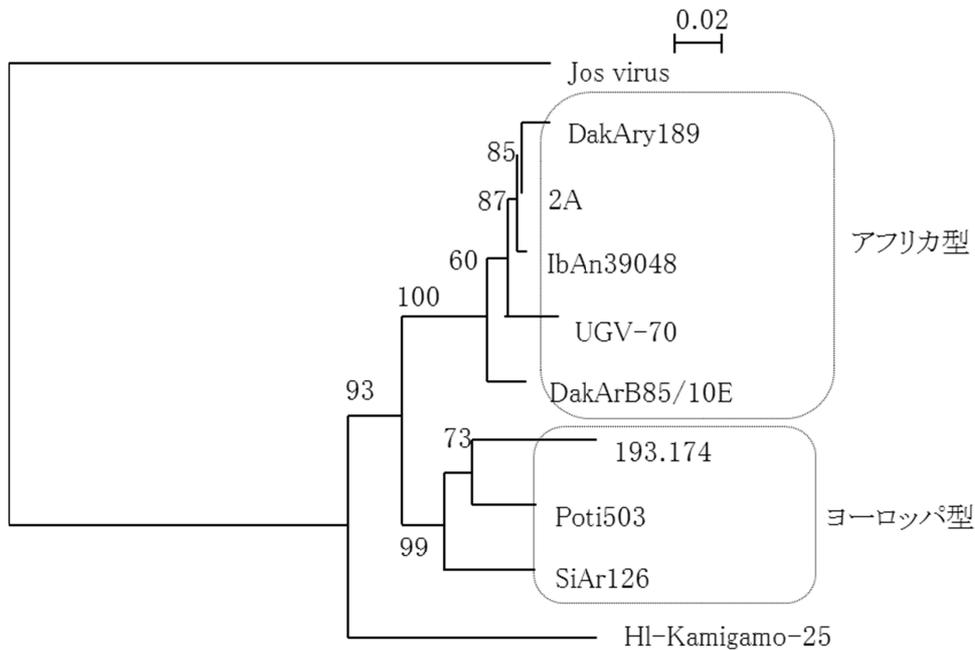


図1. THOVの系統樹解析

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
 HDPKYKGQWYPFLALLQLSNKTKDTILWQKYPVTQELELNSLEIYANGHGIK
 DRLKNSRPRSVGPLVHLLHLKRLQENPPKNPKTKKHLESNAVNGIRKSIVSHLKR
 QCIGETQKAMINQFEMGRWESLSTFAASLLAIKPRIENHFVLTYPLVANCEDFA
 GATLSDEWVFKTMEKIARKGTLRICGPDEKWASFINQITIHCVFQTAGEDLGVL
 EWVFGGRFNQRKEFGRYCKKSQTKVIGLFAFYVHWSKPLKAAPRSIEGAKRG
 QISCRPSFKGKRPSYNNFTSIDAIQSASSSQATNFYDQVREECQKYMDLRVEGT
 TCFYKKGGTTEIEFPGSLSCNTYLFG
 - 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。

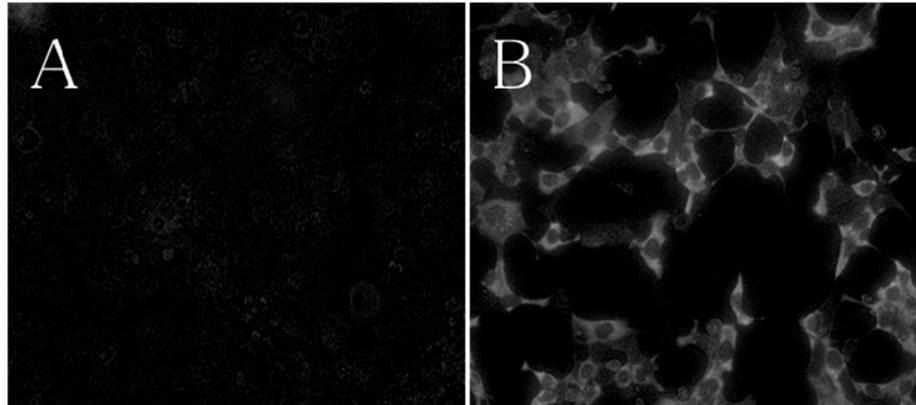


図3. ウサギ抗THOV NPペプチド抗体を用いた免疫抗体法によるTHOV NP蛋白質の検出

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。

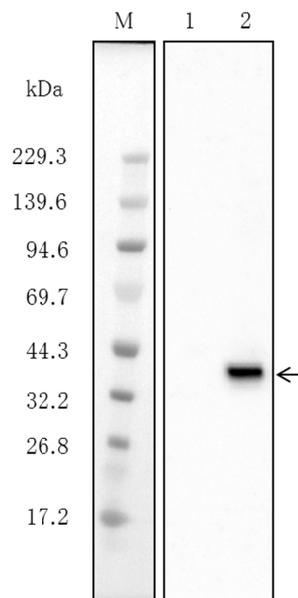


図4. ウサギ抗THOV NPペプチド抗体を用いたウエスタンブロット解析

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。