

B. 研究方法

1) 文献検索, 学会, 国際会議等に参加し, ルジヨウイルス, SFTSV および, SFTSV に近縁なウイルス(ハートランドウイルス, Bhanja グループウイルス, 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。

C. 研究結果

表にそれぞれのウイルスのリスク解析を示す。

1) ルジヨウイルスについて

2008年9-10月に南アフリカで5人が原因不明の出血熱症状を示し(うち4名が死亡), 患者検体からそれまで知られていない新種のアレナウイルスが分離され, Lujo (ルジヨ)ウイルスと命名された。分子系統学的にルジヨウイルスは旧世界アレナウイルスに分類されるが, ラッサウイルスや LCM ウイルスとはかなり距離がある。最初の感染患者はザンビアのサファリツアー会社で働く女性で, 2008年9月2日に発症し, 治療のため9月12日に南アフリカに移送された(2日後に死亡)。この患者は発症前に馬との接触, ダニとの接触の可能性も指摘された。さらにこの患者の血液や体液との直接的接触により, 2名の医療スタッフにも感染が拡がり, 病室のクリーニングを行った1名も感染した。いずれも発症後死亡した。5人目の感染者は二次感染者の看護を担当した看護師であったが, 発病後リバビリン治療を受け回復した。潜伏期間は7-13日で初期症状として発熱, 頭痛, 筋肉痛などのインフルエンザ様症状を呈し, その後重症度が増すとともに下痢, 咽頭炎, 麻疹様発疹が認められた。呼吸困難, 神経症状, 循環虚脱など急性増悪が認められ, 発病後死亡までの期間は9-12日であった。

2) 中国における SFTS の疫学, 流行状況について

2009年3-7月に, 中国湖北省と河南省の山岳地域に住む農民の間で, 発熱, 血小板減少, 胃腸症状, 白血球減少を示す急性の疾患[重症熱性血小板減少症候群(SFTS)]が報告された。2011年中国疾病防疫センターにより, SFTS 患者末梢血よりウイルス培養が試みられ, その結果イヌマクロファージ由来 DH82 細胞やサル腎由来 Vero 細胞で新種のブニヤウイルス(SFTS ウイルス)が分離, 同定された。電子顕微鏡で直径80-100nm のウイルス粒子が確認され, その遺伝子構造から, ブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類されることが明らかにされた。2009年6-9月に, 中国中部, 北東部で広く疫学調査が行われた。241例の SFTS ウイルス感染疑い例(河南省43例, 湖北省52例, 山東省93例, 安徽省31例, 江蘇省11例, 遼寧省11例)があり, そのうち171例が RT-PCR や抗体検査で陽性を呈した。171例のうち21例が死亡(致死率12%)した。SFTS ウイルス感染が確認された患者81名の主な臨床症状は, 発熱(100%), 食欲不振(75%), 疲労(65%), 吐き気(69%), 腹痛(49%), 嘔吐(47%)などで, 検査所見では血小板減少(95%), 白血球減少(86%)が顕著で, AST, ALT, CK, LDH の上昇, タンパク尿, 血尿などが認められた。患者居住地域のダニ等で RT-PCR による SFTS 遺伝子検査が実施され, *Haemaphysalis longicornis*(フタトゲチマダニ)186個体中10個体(5.4%)が陽性を呈した。これらのダニから検出された SFTS ウイルス遺伝子は患者から分離された SFTS ウイルスとは完全には一致していないが, 非常に近縁のものであった。ヒト-ヒト感染例も報

告されている。

3) 韓国における SFTS 症例

韓国春川市在住の 63 歳女性。2012 年 8 月 3 日に発熱により病院を受診。発熱の 2 週間前、農作業中に首に昆虫による咬傷があったとの報告。発病 3 日目から下痢症状がみられ、4 日目以降、血小板減少、リンパ球減少、頸部リンパ節の肥大と壊死が記録されている。その後、病状悪化のため、ソウル大学病院に転院した。検査所見では、汎血球減少、肝酵素高値、フィブリノーゲン減少、蛋白尿がみられた。胸部レントゲンで両側肺血管紋理増加を認め、BNP が高値あったことから心不全と診断された。発病 8 日目に言語障害が認められたが、骨髄検査、脳の画像検査では異常が認められなかった。9 日目には腎機能代替療法が施されたが、10 日目に多臓器不全により死亡した。抗ウイルス剤、免疫抑制薬、免疫グロブリン製剤による治療はなされなかった。7ヶ月後、患者の血清からウイルス分離が行われ、SFTSV が検出された。この症例は韓国において後方視的に確認された最初の SFTS 症例である。その後、SFTS 確定診断例が相次いで報告されている。韓国 CDC の報告では 2011-2012 年に韓国で採取されたフタトゲチマダニから SFTSV が検出されている。

4) 日本における SFTS の疫学、流行状況について

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。

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、植生マ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かっている。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かっている。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。

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。

5) SFTSV に近縁なウイルス(ハートランドウイルス, Bhanja グループウイルス, ウークニエミウイルス)

① 米国で報告されたハートランドウイルス

2009 年ミズーリ州北西部の別々の農場で働く 57 歳と 67 歳の 2 人の男性が発熱、倦怠感、下痢症状を呈し、検査所見で血小板減少、白血球減少がみられた。記憶障害、食欲衰退がしばらく続いたが、その後ゆっくり回復した。急性期患者血液

から SFTSV に近縁なハートランドウイルスが分離された。患者はダニによる咬傷があった。ミズーリ州で最も多く生息するダニはローンスタースターダニであり、このダニがウイルスを保有している可能性がある。しかし、現在までのところ、このダニからハートランドウイルスは検出されていない。

② Bhanja グループウイルス

Bhanja ウイルス (BHAV), Palma (PALV), Forecariah (FORV) は 1970 年代以降、インド、アフリカ、ヨーロッパでダニから分離された。血清学的、遺伝学的に近縁なことから、これらのウイルスは Bhanja グループウイルスと呼ばれている。また、1967 年に米国ケンタッキー州でローンスタースターダニから分離されたローンスタースターウイルス (LSV) も、遺伝学系統樹上、このグループに属す。これまで、BHAV の自然感染により脳炎症状を呈した 1 例、実験室感染 3 例 (うち熱、頭痛など軽度の症状 2 例、1 例は無症候) が報告されている。最初の実験室感染例が感染した研究者により、詳細に報告されている。この研究者 (CHC) は Ft. Collins 研究所で BHAV の細胞培養、suckling マウスを使った継代、界面活性剤による不活化、CF, HI, 中和試験等を行っていた。マウスへの実験初日から 34 日後、筋肉痛、頭痛、軽度の羞明が現れ、研究所で医師の診察を受けた。発病初日に採取した血清を suckling マウス 14 匹に接種したところ、すべての個体に運動失調、摂食障害等が認められ、2 匹が死亡した。血清から分離されたウイルスは、研究者が実験に用いていた BAHV と血清学的に同一であることが確認された。

③ Malsoor ウイルス

インド西海岸沿いにある西ガーツ山脈 (標高平均 1353m) で捕獲されたルーセットオオコウモリの脾

臓および肝臓のホモジネートを Vero E6 細胞に接種したところ細胞変性効果 (CPE) が観察された。電子顕微鏡により、培養細胞中にブニヤウイルス科に特徴的な粒子が認められた。フレボウイルス属を網羅的に検出する PCR primer によりウイルス遺伝子が増幅された。遺伝子配列解析からこのウイルスは新種のフレボウイルスであることが明らかとなり、Malsoor ウイルスと命名された。分子系統解析によりフレボウイルスのなかでも SFTSV, BHAV および PALV と同じグループに属すことが明らかになった。Malsoor ウイルスは Vero E6 細胞以外に BHK-21, Rhabdomyosarcoma (RD), Porcine stable kidney (PS), Vero CCL81 細胞で CPE を起こした。一方、蚊由来 C6/36 およびコウモリ由来 Pipistrellus bat 細胞には感染しなかった。

④ ウークニエミウイルス

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°C 1 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。

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。

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。

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をはじめハートランドウイルス、Bhanja グループ感染症の実態は現在のところ不明であるが、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) ルジヨウイルス, SFTSV, および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) 我が国における, SFTSV に近縁なウイルス (ハートランドウイルス, Bhanja グループウイルス, 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

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 87; 1105-1114, 2013
- 2) Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S. A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. *BMC Vet Res.* 18;8:82, 2012.

- 3) Taniguchi S, Sayama Y, Nagata N, Ikegami T, Miranda ME, Watanabe S, Iizuka I, Fukushi S, Mizutani T, Ishii Y, Saijo M, Akashi H, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Morikawa S. Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. *BMC Vet Res.* 11;8(1):189, 2012.
- 4) Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Saijo M and Morikawa S. Serological Assays Based on Recombinant Viral Proteins for the Diagnosis of Arenavirus Hemorrhagic Fevers. *Viruses* 4. 2097–2114. 2012.
- 5) Lihoradova O, Kalveram B, Indran SV, Lokugamage N, Juelich TL, Hill TE, Tseng CT, Gong B, Fukushi S, Morikawa S, Freiberg AN, Ikegami T. The Dominant-negative Inhibition of dsRNA-dependent Protein Kinase PKR Increases the Efficacy of Rift Valley Fever Virus MP-12 Vaccine. *J Virol.* 86, 7650–7661. 2012
- 6) Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *J. Virol. Methods* 180(–21):68–74, 2012.
- 7) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J Virol.* 87(12):7170–7175. 2013.
- 8) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* Dec 12. 2013.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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, Sajjo 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

特記事項なし

(表) 病原体のリスク解析

	病原体名	分類(科、属等)	ヒトへの感染性	宿主	ヒトへの感染経路	分布	臨床像	致死率	有効なワクチンの有無	有効な薬剤の有無	実験室感染の有無	院内感染の有無	培養の可否	培養可の場合の培養方法	病原体の保管方法
	ルジヨウウイルス	アレナウイルス科	有り	不明	不明	ザンビアで発生後南アフリカで院内感染	出血熱	80%	無	無	無	有	可	Vero	マイナス80°C (BSL4)
アルボウイルス	SFTSV	ブニヤウイルス科フレボウイルス	有り	ダニ	ダニの刺咬、感染した動物、ヒトの体液等との接触	中国、韓国、日本	熱、血小板減少、全身感染	約10%	無	in vitroではリバビリンが有効	無	中国で報告あり	可	DH82, Vero E6など	マイナス80°C (BSL3)
アルボウイルス	ハートランドウイルス	ブニヤウイルス科フレボウイルス	有り	ダニ	ダニの可能性大	北米	熱、血小板減少	不明	無	無	無	無	可	DH82, Vero E6	マイナス80°C (BSL3の予定)
アルボウイルス	Bhanjaウイルス	ブニヤウイルス科フレボウイルス	有り	ダニ	ダニ	インド、ヨーロッパ、アフリカ	熱、頭痛 (mild)	不明	無	無	有(マウス感染実験中)	無	可	DH82, Vero E6	マイナス80°C (BSL2)
アルボウイルス	ローンスターウイルス	ブニヤウイルス科フレボウイルス	不明	ローンスターダニ (リスに付いていた)	不明	北米	Southern Tick-borne Rash Illnessの可能性	不明	無	無	無	無	可	HeLa, Vero	マイナス80°C
不明	Maisoor	ブニヤウイルス科フレボウイルス	不明	ルーセットオオコウモリから分離	不明	インド	不明	不明	無	無	無	無	可	Vero, BHK21, RD, PS等	マイナス80°C
アルボウイルス	ウークニエミウイルス	ブニヤウイルス科フレボウイルス	有り	ダニ	ダニの可能性大	ヨーロッパ、中央アジア等	発熱等(軽症)	不明	無	無	無	無	可	BHK21	マイナス80°C

病原体リスク解析の参考文献

SFTSV

- ① He CQ, Ding NZ. *J Virol.* 2012 Nov;86(22):12426–30
- ② Sun Y, et al., *J Infect Dis.* 2012 Oct 1;206(7):1085–94.
- ③ Gai ZT, et al., *J Infect Dis.* 2012 Oct 1;206(7):1095–102.
- ④ Jin C, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun 19;109(25):10053–8
- ⑤ Jiao Y, et al., *J Clin Microbiol.* 2012 Feb;50(2):372–7.
- ⑥ Gai Z, et al., *Clin Infect Dis.* 2012 Jan 15;54(2):249–52.
- ⑦ Yu XJ, et al., *N Engl J Med.* 2011 Apr 21;364(16):1523–32.
- ⑧ Takahashi T, et al., *J Infect Dis.* 2013 Dec 12.
- ⑨ Kim KH, et al., *Emerg Infect Dis.* 2013 Nov;19(11):1892–4.

ハートランドウイルス

- ① Savage HM, et al., *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Sep;89(3):445–52.
- ② McMullan LK, et al., *N Engl J Med.* 2012 Aug 30;367(9):834–41.

Bhanjaウイルス

- ① Matsuno K, et al., *J Virol.* 2013 Apr;87(7):3719–28.
- ② Vesenjak-Hirjan J, et al., *Am J Trop Med Hyg.* 1977 Sep;26(5 Pt 1):1003–8.
- ③ Calisher CH, Goodpasture HC. *Am J Trop Med Hyg.* 1975 Nov;24(6 Pt 1):1040–2.

ローンスターウイルス

- ① Swei A, et al. *PLoS One.* 2013 Apr 29;8(4):e62083.

Malsoorウイルス

- ① Mourya DT, et al, 2014 *J Virol.* Mar;88(6):3605–9.

ウークニエミウイルス

- ① Palacios G. et al, *J. Virol.* 2013. 87 (6) 3187–3195
- ② Saikku P. *Am. J. Trop. Med. Hygiene* 1973. 22 (3) 400–403.
- ③ Saikku P., Brummer-Korvenkontio M. *Am. J. Trop. Med. Hygiene* 1973. 22 (3) 390–399.
- ④ Hubalek Z, Halouzka J. *Acta Sci. Nat. Brno* 1996. 30:1–95.
- ⑤ Molnar E, et al, *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 1973.17: 1–10.
- ⑥ Traavik T, Mehl R. *Arch. Virol.* 1977. 54:317–331.

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)
 分担総合研究報告書

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)
 節足動物媒介性感染症の検索と、新たに分離したマダニ保有ウイルスに関する研究

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：

節足動物媒介性感染症を引き起こすウイルス(Arbovirus)を対象とする本研究課題の分担研究において、次の2つの項目について検討した。まず、国立感染症研究所病原体取扱規定に記載されていない感染症や、感染症法に指定されていないヒトへの感染症について、そのリスクを評価し分類するための資料を整備するため1)CDC ArboNET の節足動物媒介性感染症について検索・分類した。また、2)京都市のマダニが保有する病原微生物について調査したところ、日本で分離報告のないオルソミクソウイルス科トゴトウイルスが分離された。本ウイルスはダニ媒介性人獣共通感染症に分類されている。しかし、日本においては分離報告がなく、国立感染症研究所病原体取扱規定等での病原体分類にも未登録のウイルス種である。このような未分類の病原体の取扱いや、そのリスク評価を予め検討しておくことは意義があるものと考えられる。

A. 研究目的

近年、世界各地で新興・再興感染症が発生し、日本国内での発生・流行が危惧されている。また、日本国内の自然環境中には、未知の微生物が

存在する可能性もある。その中には、ヒトの感染症や人獣共通感染症を引き起こす可能性のある病原微生物が存在するかもしれない。本研究では、節足動物媒介性感染症を引き起こすウイル

ス(Arbovirus)を研究対象として、これまで報告されている Arbovirus の再分類を行うことを目的の一つとした。

また、身近な環境中に潜む未分類の Arbovirus を分離・同定することにより未知の Arbovirus の国内での存在を証明し、注意を喚起することを目的とした。マダニは種々の病原微生物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)がマダニ媒介性新興感染症として報告されている。私たちが生活する環境中に生息するマダニは、未知の新種の Arbovirus を保有し、今後、新興の感染症を引き起こす可能性がある。そこで、本研究では京都市の北部に生息するマダニから、新種の Arbovirus の分離を試みた。

B. 研究方法

1) CDC「ArboNET」上に掲載されている節足動物媒介性感染症の検索と病原学的分類

<http://wwwn.cdc.gov/arbocat/index.asp> に掲載されている感染症について、CDC の分類区分に従い、Arbovirus, Probable arbovirus, Possible arbovirus, Probable not arbovirus および Not arbovirus の5つに分類した。

2) マダニの捕集

京都市北区の山間部で調査した(図2)。2013年4月から2014年2月に、毎週1回、60分間の旗振り法により、マダニを捕集し、形態学的に種を同定した。

3) マダニが保有する微生物の分離

6月から7月にかけて捕集したフタトゲチマダニ

の成虫(図3A)を、消毒用エタノールに10分間浸し、ダニ表面を消毒した。一頭ずつチューブに入れ(図3B)、PBS(-)を加えホモゲナイザーでダニを破碎し(図3C)、マダニ乳剤を作製した(図3D)。次に、マダニ乳剤をサルの腎細胞由来の Vero E6 細胞に接種し、抗生物質を含まない培養液を用いて、34°C、5%CO₂の条件で、1週間培養した(図3E)。また、抽出液を寒天培地上に塗布し、30°Cで培養してマダニ乳剤中の細菌を検査した。分離された微生物については各種のフラビウイルスや SFTS ウイルス、日本紅斑熱等に対する逆転写-ポリメラーゼ鎖増幅反応(RT-PCR)あるいはポリメラーゼ鎖増幅反応(PCR)検査を実施した(図3G)。

4) 分離微生物の遺伝子の同定

分離した微生物の培養上清中に存在する RNA を抽出し、次世代シーケンスにより網羅的な解析を行った(図3H)。

5) 分離微生物に対するペプチド抗体の作製と、それを用いた抗原の解析

次世代シーケンスにより同定した分離微生物のペプチドをウサギに投与し抗体を作製した。作製した抗ペプチド抗体を用いて、感染 VeroE6 細胞の分離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、感染細胞中の分離微生物の蛋白質をウエスタンブロット解析し、病原体の蛋白質の存在を確認した。

6) マダニの分離微生物の保有状況調査

当該微生物が分離された京都市北区の山間部において、*H. longicolnis*、および *H. flava* を採集し、

RT-PCR により当該微生物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) CDC の「ArboNET catalogue」に掲載されている 533 種類のウイルスについて、CDC の分類区分に従って整理したところ、109 種類の Arbovirus、86 種類の Probable arbovirus、307 種類の Possible arbovirus、14 種類の Probable not arbovirus および 17 種類の Not arbovirus に分類された(図 1)。Arbovirus 109 種類のうち、国立感染症研究所病原体等安全規定に記載されているウイルス種は 26 種類(P2, P3 および P4 に分類されるウイルスは、それぞれ 10, 15 および 1 種類)であった。

2) マダニの季節消長

2013 年 4 月から 2014 年 2 月に、毎週 1 回、マダニを捕獲した。優占種であったチマダニ属のマダニ(*Haemophysalis (H.) spp*)の結果を図 4 に示す。4 月から 7 月は、若ダニが優勢であった(優先種は *H. longicornis* (フタトゲチマダニ))。成ダニは 5 月から 8 月にピークがあり(優先種は *H. longicornis*)、9 月半ばから 2 月まで少数であるが捕獲された。このときの優先種は *H. flava* (キチマダニ)であった。幼ダニは 6 月半ばから 11 月半ばまで捕獲された。

3) マダニ抽出液中の微生物分離

7 月に捕獲した *H. longicornis* の乳剤を Vero E6

細胞に接種したところ、5 日目に細胞変性効果(CPE)が現れた(図 5B)。一方、コントロールの Vero E6 細胞には CPE は認められなかった(図 5A)。マダニ乳剤を 0.22 μ m のフィルターで濾過し、これを抗生物質(ストレプトマイシン+ペニシリン、カナマイシン)を添加した培養液中で培養しても CPE が確認された(結果は示さず)。また、この微生物はハムスター腎細胞である BHK-21 細胞でも、同様な CPE を形成した。PCR あるいは RT-PCR により、これまでに報告されているダニ媒介性感染症を引き起こす病原微生物遺伝子の検出を試みたが、全て陰性であった。寒天培地上にも、少数のコロニーが確認された。

4) 分離された微生物核酸を次世代シーケンスにより網羅的に解析したところ、オルソウイルス科のトゴウイルス(THOV)の 6 つのセグメント RNA と近似する遺伝子が検出された(HI-Kamigamo-25 株)(図 6)。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することが明らかとなった(図 7)。

5) 図 8 に THOV HI-Kamigamo-25 株の核蛋白質(NP)のアミノ酸配列を示す。N 末端の 17 アミノ酸配列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 株の非感染細胞(図 9A)と感染

細胞(図9B)を抗原として IFA を行った。図9B に示すように、感染細胞の細胞質に THOV NP が検出された。

6) 抗 THOV NP ペプチド抗体を用いてウエスタンブロット解析を行い、THOV NP を検出した(図10)。その結果、感染細胞抽出液中にのみ抗 THOV NP ペプチド抗体に反応する約 40kDa の THOV NP が検出された(図10, レーン 2, 矢印)。

7) 京都市北部の山間部で採集した *H. longicolnis* と *H. flava* の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ることが明らかとなった。

D. 考察

CDC の「ArboNET」に掲載されている Arbovirus 感染症 109 種類の内、国立感染症研究所病原体取扱規定に記載されているウイルス感染症(ウイルス種)は 26 種類であった。残りの 86 種類については、当規定には未記載である。今後、これらの節足動物媒介性ウイルス感染症について、その病原性や日本国内での流行の可能性等を考慮し、リスク評価する必要がある。また、2013 年に山口県等より報告された SFTS 等、CDC の「ArboNET」に登録されていない新興の節足動物媒介性ウイルス感染症についても情報を収集し、リスク評価する必要がある。

本研究において、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

シヤ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、アフリカではヒト感染例として 2 例の報告があり、内 1 例が死亡例である。したがって、THOV 感染症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 感染症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詳細に検討する必要がある。また、日本国内で新たに発見される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も、発見後の早期の対応が必要であると考えられる。

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。このことは、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可能性のある、未同定の病原体を保有することを示している。本研究課題で検討したように、これまでに報告されている Arbovirus 感染症について詳細に感染リスクを評価するとともに、新規に同定された病原体についてのリスク解析を十分に行う必要がある。

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、当該ウイルス感染症の発生に注意する必要がある。

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
 - 5) Maeda, A., Maeda, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Veterinary Journal*. 195: 33–40, 2013
 - 6) 染谷梓, 池永充宏, 大西修, Velado Fernandez, Igor, 西野佳以, 前田秋彦. 京都市山科区で駆除されたイノシシに寄生していたマダニ類の解析. *京都産業大学総合学術研究所所報*. 8: 57–62, 2013
- 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 ウィ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)
 - 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)
 - 5) Yonejima, M., Nakaya, T., Nihei, N., Tsuda, Y., Kobayashi, M., Watanabe, M. Maeda, A. Effects of land use pattern on spatial distribution of host-seeking mosquitoes within urban areas in Kyoto, Japan. *International Geographic Union, Kyoto Regional Conference, Kyoto*, (2013. 08)
 - 6) 米島万有子, 前田秋彦, 福田美樹, 伊藤亜希, Igor Velado Fernandez, 津田良夫, 渡辺護, 中谷友樹. 第 65 回日本衛生動物学会, 江別, (2013. 8)
 - 7) 伊藤亜希, 米島万有子, Igor Velado Fernandez, 福田美樹, 染谷梓, 前田秋彦. 京都市における蚊媒介性フラビウイルス媒介蚊の調査. 第

48 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 熱海, 動物学会総会, 松本, (2012.3)
(2013. 5)

- 8) 染谷梓, 池永充宏, 大西修, 近野真由美, 杉江真理子, Igor Velado Fernandez, 西野佳以, 前田秋彦. 京都市における紅斑熱群リケッチアの検出. 第 154 回日本獣医学会総会, 岩手, (2012.9)
- 9) 米島万有子, 大西修, 渡辺護, 二瓶直子, 津田良夫, 小林睦生, 前田秋彦, 中谷友樹. 京都市市街地の住宅における疾病蚊密度の場所間変動—密度調査と環境分析. 第 64 回日本衛生
- 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。

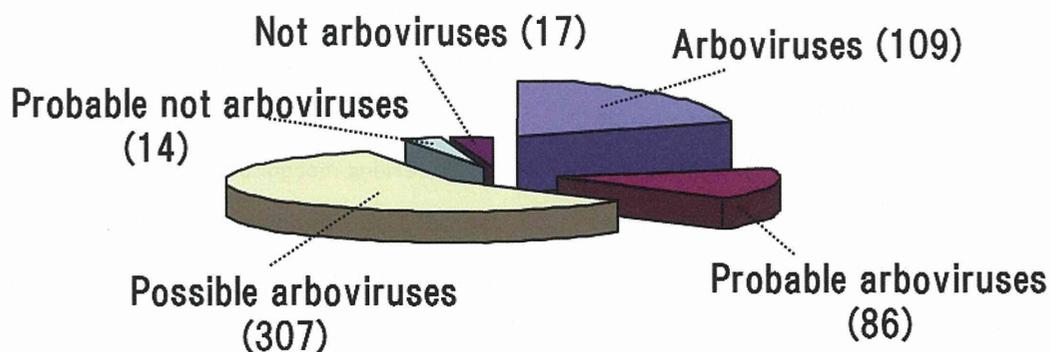


図1. CDC 「ArboNET」に記載されているウイルスの分類

533種類の登録ウイルスはArbovirus109種類、Probable arbovirus86種類、Possible arbovirus307種類、Probable not arbovirus14種類およびNot arbovirus17種類に分類される (<http://wwwn.cdc.gov/arbocat/index.asp>)。

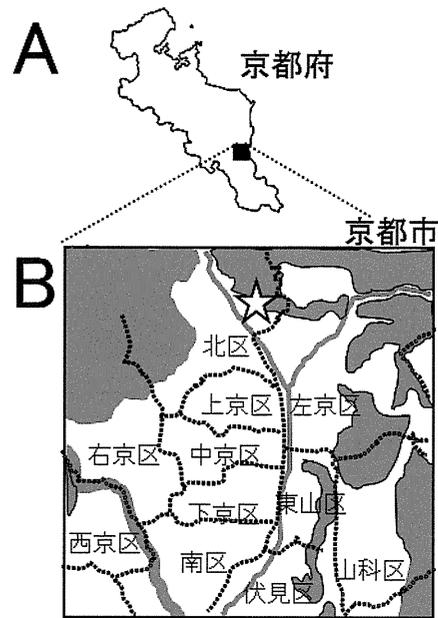


図2. マダニの調査地

2013年4月から2014年2月に実施したマダニ捕獲調査地、京都府 (A) 京都市 (B) の地図を示す。パネルB内の星印が今回の調査地を示している。

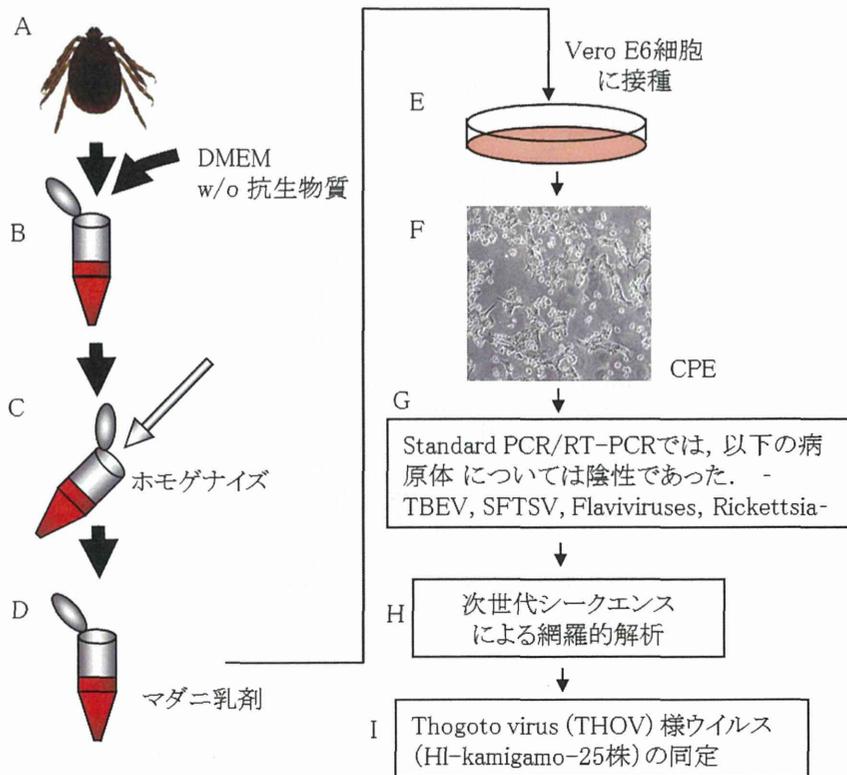


図3. マダニからのThogoto virusの分離

H. longicornis (A) を、抗生物質を含まない DMEM 中 (B) でホモゲナイズし (C)、マダニ乳剤を作製した (D)。本乳剤を Vero E6 細胞に添加し、7日間、37℃、5%CO₂のインキュベーターで培養したところ (E)、顕著な細胞変性効果 (CPE) が現れた (F)。培養細胞あるいは培養上清中に含まれる核酸を抽出し、Standard な PCRあるいは RT-PCRにより病原体の同定を行ったが、病原体を同定出来なかった (G)。そこで、次世代シーケンス法で網羅的な解析を行ったところ (H)、Thogoto virus (THOV) 様のウイルスが同定された (I)。

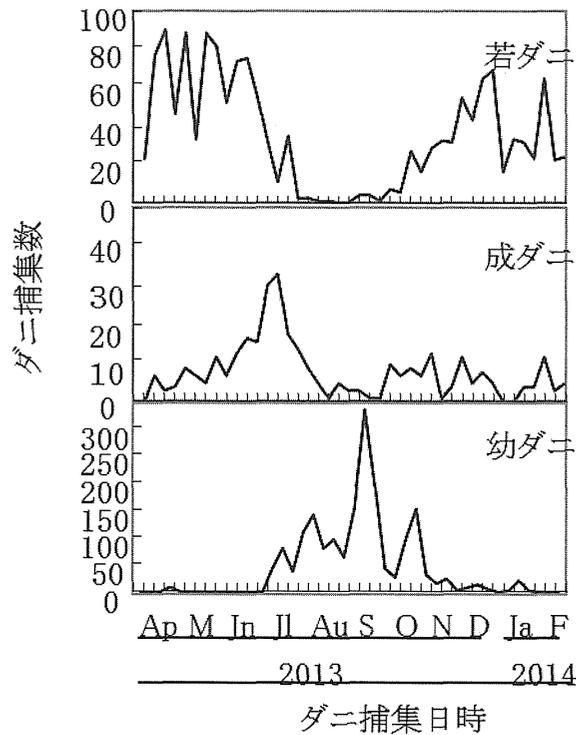


図4. 京都市北区の山間部におけるマダニ(チマダニ種)の季節消長.

2013年4月から2014年2月にかけて、週に一回、旗振り法によりマダニを捕集した。優占種であるチマダニ種の若ダニ、成ダニおよび幼ダニの捕集数の季節変化を示す。Ap: 4月, M: 5月, Jn: 6月, Jl: 7月, Au: 8月, S: 9月, O: 10月, N: 11月, D: 12月, Ja: 1月およびF: 2月を表す。

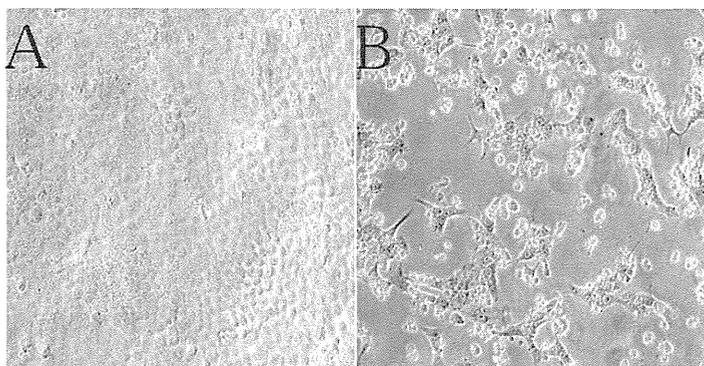


図5. マダニ抽出液の細胞変性効果

Vero E6細胞にマダニ抽出液を接種した5日後の細胞を顕微鏡下で観察した(B)、コントロールとして、Mock処理のVero E6細胞の顕微鏡像(A)を示す。

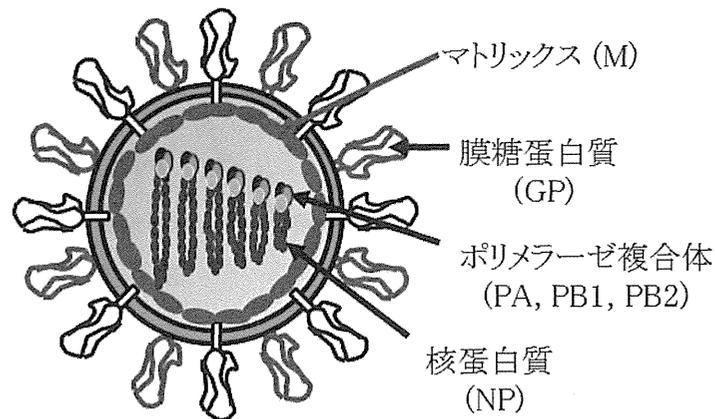


図6. トゴトウイルスの粒子構造

トゴトウイルスはオルソミクソウイルス科に属するマイナス鎖の一本鎖6分節のゲノムRNAを持つ。ウイルス粒子を構成する構造蛋白質としてマトリックス (M)、膜糖蛋白質 (GP)、ポリメラーゼ複合体 (PA、PB1、PB2) および核蛋白質 (NP) が存在する。

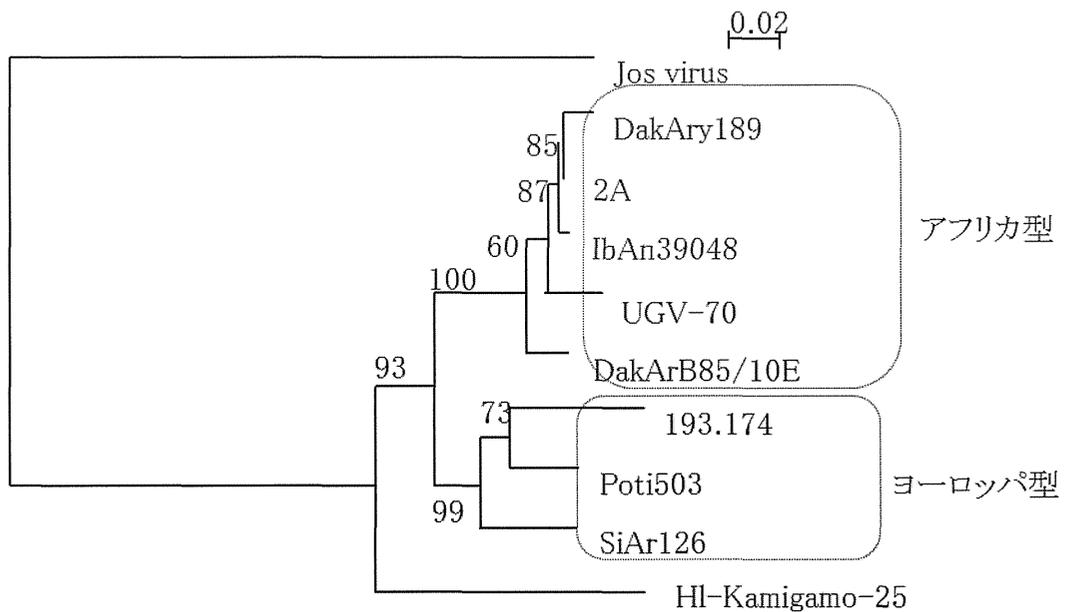


図7. THOVの系統樹解析

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
VLGSIIMAACTNNRDLRPVDKYWFFMGQPGAEMTEVEIDIQPQMOWAKGAV
HDPKYKGQWYPFLALLQLSNKTKDTILWQKYPVTQELELNSLEIYANGHGK
DRLKNSRPRSVGPLVHLLHLKRLQENPPKNPKTKKHLESNAVNGIRKSIVSHLKR
QCIGETQKAMINQFEMGRWESLSTFAASLLAIKPRIENHFVLTYPLVANCEDFA
GATLSDEWVFKTMEKIARKGTLRICGPDEKWAFFINQITIHCVFQTAGEDLGVL
EWWFGGRFNQRKEFGRYCKKSQTKVIGLFAFQYVHWSKPLKAAPRSIEGAKRG
QISCRPSFKGKRPSYNNFTSIDAIQSASSSQATNFYDQVREECQKYMDLRVEGT
TCFYKKGGTTEIEFPGSLSCNTYLFG
- COOH

図8. THOV HL-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 HL-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。

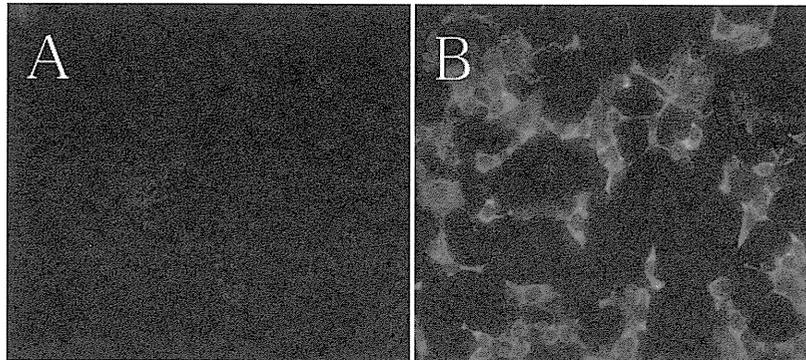


図9. ウサギ抗THOV NPペプチド抗体を用いた免疫抗体法

THOV HL-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。