

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)がマダニ媒介性の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://www.cdc.gov/arboicat/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℃、5%CO<sub>2</sub>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℃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. longicollis*、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 5 B)。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 5 A)。マダニ乳剤を 0.22 μm 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トウイルス(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 9 A)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., Koboyashi, 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
- 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。

変動 密度調査と環境分析. 第64回日本衛生

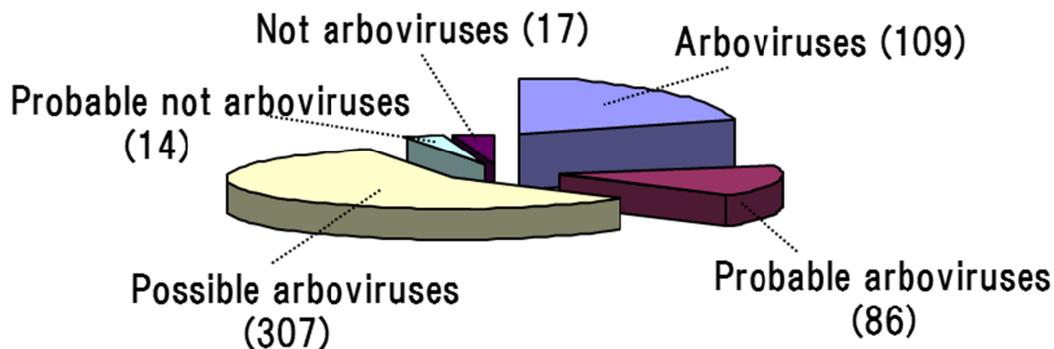


図1. CDC「ArboNET」に記載されているウイルスの分類

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://www.cdc.gov/arbocat/index.asp>)。

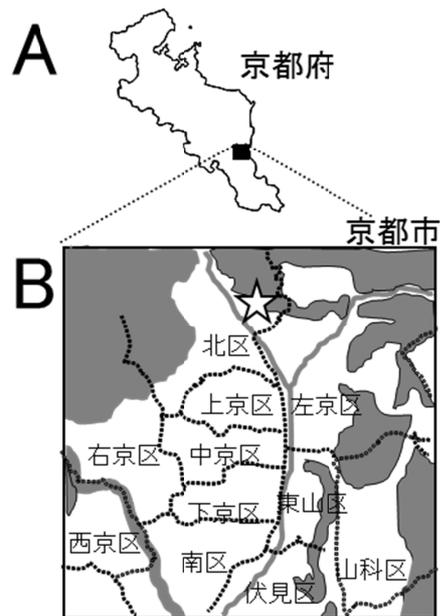


図2. マダニの調査地

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。

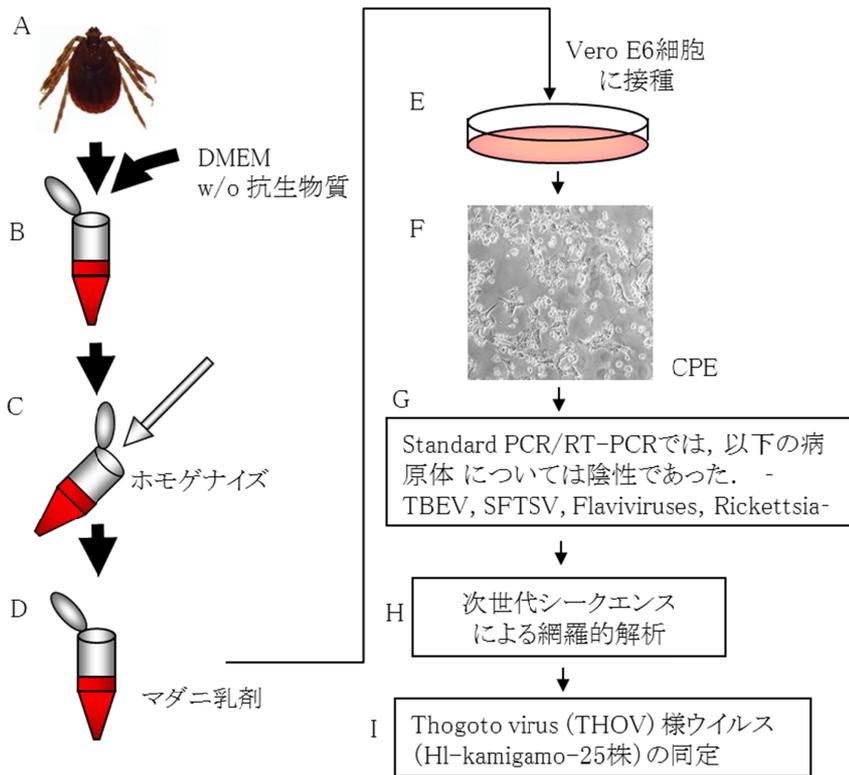


図3. マダニからのThogoto virusの分離

*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°C、5%CO<sub>2</sub> 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)。

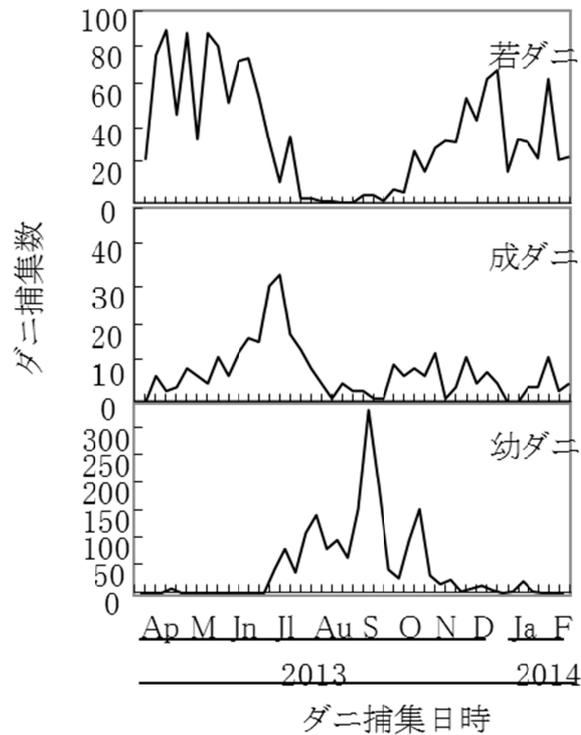


図4. 京都市北区の山間部におけるマダニ(チマダニ種)の季節消長。  
 2013年4月から2014年2月にかけて、週に一回、旗振り法によりマダニを捕集した。優占種であるチマダニ種の若ダニ、成ダニおよび幼ダニの捕集数の季節変化を示す。Ap: 4月, M: 5月, Jn: 6月, Jl: 7月, Au: 8月, S: 9月, O: 10月, N: 11月, D: 12月, Ja: 1月およびF: 2月を表す。

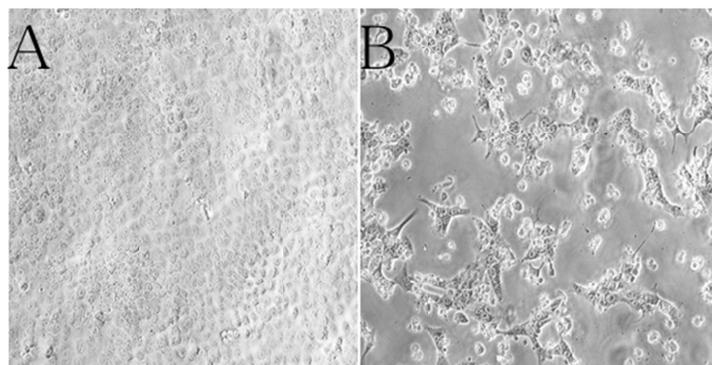


図5. マダニ抽出液の細胞変性効果  
 Vero E6細胞にマダニ抽出液を接種した5日後の細胞を顕微鏡下で観察した(B)、コントロールとして、Mock処理のVero E6細胞の顕微鏡像(A)を示す。

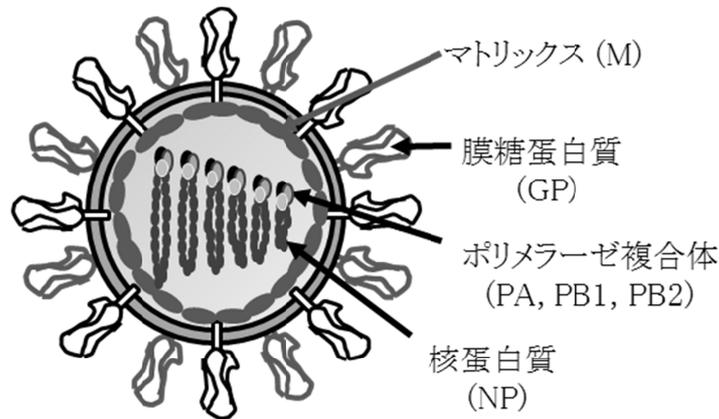


図6. トゴトウイルスの粒子構造

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。

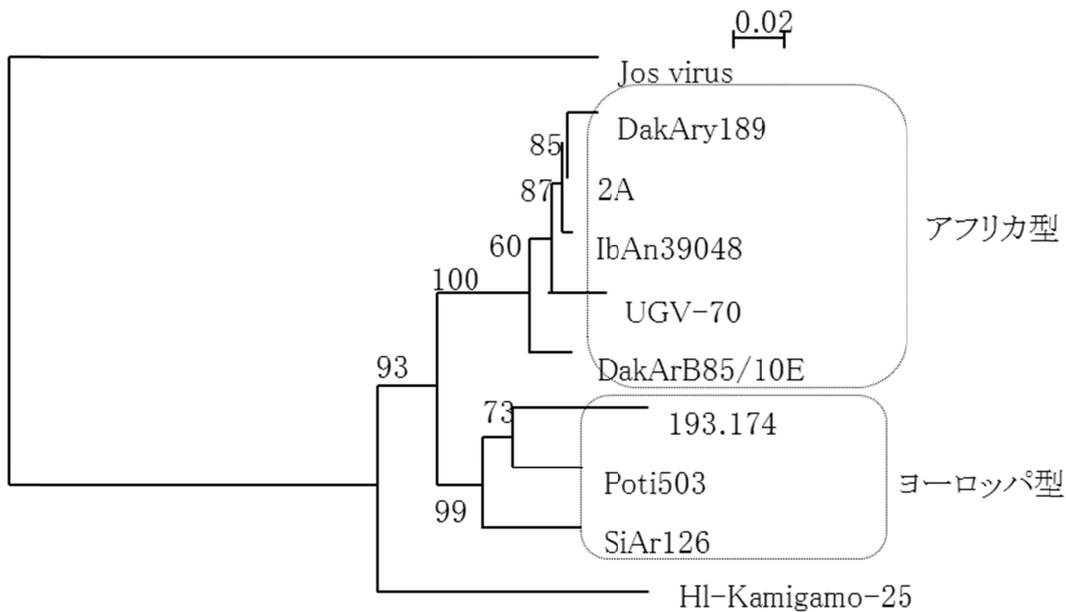


図7. THOVの系統樹解析

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  
HDPKYKGQWYPFLALLQLSNKTKDTILWQKYPVTQELELNNSLEIYANGHGK  
DRLKNSRPRSVGPLVHLLHLKRLQENPPKNPKTKKHLESNAVNGIRKSIVSHLKR  
QCIGETQKAMINQFEMGRWESLSTFAASLLAIKPRIENHFVLTYPVLANCEDFA  
GATLSDEWVFKTMEKIARKGTLRICGPDEKWASFINQITIHCVFQTAGEDLGVL  
EWVFGGRFNQRKEFGRYCKKSQTKVIGLFAFQYVHWSKPLKAAPRSIEGAKRG  
QISCRPSFKGKRPSYNNFTSIDAIQSASSSQATNFYDQVREECQKYMDLRVEGT  
TCFYKKGGTTEIEFPGSLSCNTYLF  
- 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 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。

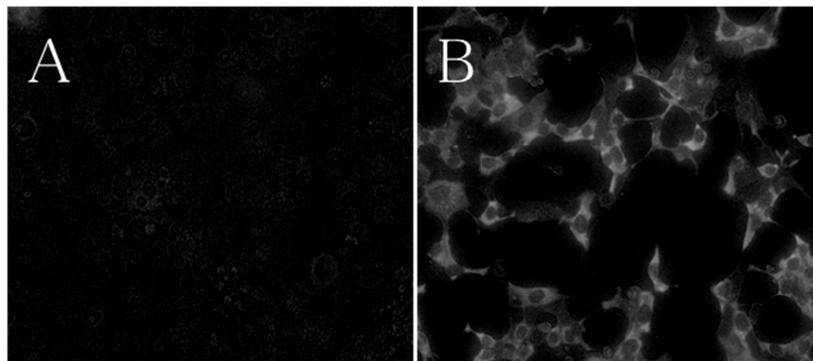


図9. ウサギ抗THOV NPペプチド抗体を用いた免疫抗体法

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。

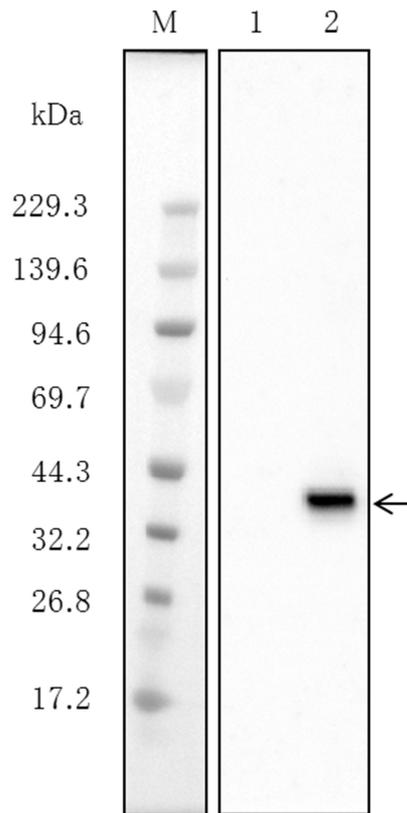


図10. ウサギ抗THOV NPペプチド抗体を用いたウエスタンブロット解析  
 THOV HI-Kamigamo-25株非感染VeroE6細胞(レーン1)と感染VeroE6細胞抽出液(レーン2)を、4-12%SDS-PAGE上に展開し、PVDF膜にブロットした。次に、PVDF膜に展開させた蛋白質に抗THOV NPペプチド抗体を反応させ、THOV NPを検出した。矢印はTHOV NPを示す。レーンMは蛋白質のサイズマーカーを泳動した。