

201420030A

厚生労働科学研究費

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の
発生予防に関する研究

平成 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 荻和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の
発生予防に関する研究

平成 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 苅和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

平成 27 (2015) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告	1
近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究 荻和宏明.....	3
II. 分担研究報告	23
ダニ媒介性脳炎の疫学と診断法開発 好井健太郎	25
マダニ類からのウイルス由来遺伝子の検出 早坂大輔	33
ハンタウイルス感染症に関する研究 有川二郎	37
近隣地域からの侵入が危惧される感染症の病理学的検索 ー抗ハンタウイルス抗体の免疫組織化学法における有用性の検討ー 永田典代	41
クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの3分節遺伝子の全塩基配列に基づく分子疫学 西條政幸	44
狂犬病等の疫学に関する研究 井上智	49
L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスの作出とその性状の解析 伊藤直人	58
ブルセラ症の診断法の開発(無尾類からの新規ブルセラ属菌の分離と解析) 今岡浩一	63
パルトネラ感染症の疫学 丸山総一	71
東南アジアのヤモリ由来 Salmonella Weltebreden の遺伝的関連性ならびに ベトナムの土壌における類鼻疽菌の分布 林谷秀樹	76
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	84

I. 総括研究報告

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の
発生予防に関する研究

研究代表者 荻和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究

研究代表者	苺和宏明	北海道大学大学院獣医学研究科	教授
研究分担者	好井健太郎	北海道大学大学院獣医学研究科	准教授
	早坂大輔	長崎大学 熱帯医学研究所	助教
	永田典代	国立感染症研究所	室長
	有川二郎	北海道大学大学院医学研究科	教授
	西條政幸	国立感染症研究所	部長
	井上智	国立感染症研究所	室長
	伊藤直人	岐阜大学応用生物科学部	准教授
	今岡浩一	国立感染症研究所	室長
	丸山総一	日本大学生物資源科学部	教授
	林谷秀樹	東京農工大学農学研究院	准教授

研究要旨

モンゴルにおけるダニ媒介性脳炎(TBE)の流行状況を明らかにするために、モンゴル北部で捕集されたマダニからウイルス分離を試みた。26 プール 680 匹のシュルツェマダニから、9 株の TBEV が分離された。分離株のエンベロープ蛋白領域の遺伝子を解析した所、全ての株が同一クラスターを形成し、シベリア型に分類されることが明らかになった。したがって、モンゴル北部にはシベリア型 TBEV が流行していることが示された。日本およびインドシナ地域に存在するマダニ媒介性ウイルスの分布状況の把握を目的として、国内のマダニから新規に分離されたブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される HSK ウイルス(仮名)について、Real-time RT-PCR によるウイルス遺伝子検出系を確立した。本検出系は M セグメントの 211b.p. をターゲットとし、 10^2 copy 以上の感度で検出可能であった。ハンタウイルス感染症について感染げっ歯類を迅速に診断することを目的とし、Protein A を用いたイムノクロマトグラフィー(ICG)の有用性を検討した。ハンタウイルスのヌクレオカプシドタンパクに対するモノクローナル抗体 の SFTS ウイルスと SARS コロナウイルスとの交差反応性について、パラフィン包埋組織切片を用いた免疫組織化学法において検討した。その結果、いずれの抗体も二つのウイルスに対して交差反応性はなく、パラフィン包埋組織上のハンタウイルス抗原の特異的な検出が可能なが判明した。クリミア・コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)は 3 分節の一本鎖 RNA(S-, M-, L-遺伝子)を有し、それぞれ核蛋白質、膜蛋白質、および RNA ポリメラーゼをコードする。CCHFV 株の全塩基配列に基づく分子疫学(系統樹解析)を行ったところ、S-遺伝子に基づく解析では中国株はほぼ 1 つのクラスターを形成するのにに対し、M-遺伝子と L-遺伝子による解析では中国株の地域特異性は認められなかった。わが国の近隣地域における野生動物の狂犬病(リッサウイルス感染症を含む)の疫学に関する情報収集を行うために、国後島の野生動物生息状況と、海域を越えて国後島から北海道に狂犬病等の動物由来感染症が侵入する可能性について調査を行った。狂犬病ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ

である L 蛋白質は、治療法や新規暴露後予防法の有力な分子標的となることが予想されるものの、その分子機能に関する情報は極めて少ない。そこで、レポーター遺伝子(GFP あるいはルシフェラーゼ)を発現する L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作出した。これらの L 遺伝子欠損ウイルスは、L 蛋白質発現プラスミドを導入した細胞において、レポーター遺伝子を発現することが確認された。したがって、L 蛋白質欠損ウイルスは、狂犬病ウイルスの L 蛋白質の機能解析上、極めて有用なツールとなることが示された。無尾類におけるブルセラ属菌の保有状況を明らかにするために、各種の無尾類よりブルセラ属菌の分離を試みたところ、ベルツノガエル 3 個体から新規のブルセラ属菌 3 株が分離された。青森県、山形県および和歌山県で捕獲した野生のニホンザル 45 頭のうち、6 頭(13.3%)から塹壕熱の病原体である *Bartonella quintana* が分離された。*gltA* と *rpoB* 遺伝子、および 16S-23S rRNA 遺伝子間領域(ITS)の解析によって、ヒトおよびサルの種類ごとに独自の遺伝子性状を有する *B. quintana* が分布すること、わが国のニホンザルには固有の *B. quintana* が広く存在することが明らかとなった。東南アジアのヤモリ由来 *Salmonella* Weltevreden 81 株について、Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) 法による分子遺伝子解析を行ったところ、それぞれの地域から得られた菌株は、地域ごとの遺伝子型に分類されることが判明した。したがって、東南アジアには古くから本血清型が土着し、地域ごとに遺伝子の変異が蓄積していったことが示唆された。近年、海外感染症として我が国に持ち込まれる事例が報告されている類鼻疽(Melioidosis)について、ベトナム・メコンデルタの土壌から原因菌である類鼻疽菌(*Burkholderia mallei*)の分離を試みた。その結果、40 検体中 3 検体(7.5%)から類鼻疽菌が分離され、本地域に類鼻疽菌が分布することが明らかになった。

A. 研究目的

野生鳥獣類によって媒介される人獣共通感染症は人に感染すると重篤化するものが多く、世界各国で公衆衛生上の大きな問題となっている。これらの人獣共通感染症は病原体の分布域や宿主動物などが不明な場合が多く、発生予防が難しい。本研究では、日本において患者数は少なくとも、日本の周辺国では大きな問題となっている人獣共通感染症について、診断法の開発や疫学的な解析を行うとともに、動物モデルの開発とそれを用いた病態発現機序の解明を目指している。

ダニ媒介性脳炎はマダニ類によって媒介される危険度の高い人獣共通感染症として知られ、ヒトに致命的な脳炎を引き起こす。ロシア、東欧各国を中心に年間 8,000 名以上の患者が報告されている。ハンタウイルス感染症は腎症候性出血熱とハンタウイルス肺症候群の 2 つの病型が知られ、いずれもげっ歯類によって媒介される。これまで中国、ロシア、ヨーロッパ、南北アメリカ大陸などで多く報告され、年間の

患者発生数が 5 万人ほどとされているが、世界的に調査が不十分な地域が多く存在する。また、狂犬病は一旦発症すれば 100%の致死率を示す致命的な脳炎で、WHO の報告によれば、世界中で毎年 5 万人以上が狂犬病によって死亡している。その他にも、国内外において、クリミア・コンゴ出血熱、ブルセラ症、バルトネラ感染症、サルモネラ感染症、および類鼻疽などの患者が報告されている。上記の感染症はいずれも野生動物によって媒介される重篤な人獣共通感染症であり、国内外における汚染地やヒトにおける感染状況に関する情報が不足している。そこで、本研究では信頼性の高い診断法を開発して野生動物を対象とした疫学調査を実施することにより、上記感染症の分布域や病原巣動物といった基礎的な疫学情報を得る。さらに、感染動物モデルを用いて、発症機序や重症化の機序を解析する。

B. 研究方法

ダニ媒介性脳炎

モンゴル北部の Selenge 県において、旗ずり法により 680 匹のシュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) を捕集した。捕集したマダニを 20~30 匹ずつ計 26 プールに分け、エタノールで洗浄後破碎し、破碎液の上清を BHK 細胞に接種した。接種後の細胞の盲目継代を 2 回行い、細胞変性効果(CPE)を観察した。CPE を示した細胞について、細胞内における TBEV 抗原の検出及び、細胞から抽出した RNA から RT-PCR により TBEV 特異的遺伝子の増幅・検出を行うことにより、TBEV の同定を行った。

分離された TBEV 感染細胞から RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行った後に、TBEV 共通プライマーを用いて、E 蛋白領域の増幅を行った。増幅された PCR 産物からダイレクトシーケンスにより塩基配列を同定し、ランガットウイルスをアウトグループとした系統樹解析を行った。

ダニ由来ウイルス

ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に属する新規の HSK ウイルス(HSKV)の M セグメントゲノムの 211b.p.を増幅するようにプライマーを設計した。Real-time RT-PCR 反応は One Step PrimeScript® RT-PCR kit (TAKARA BIO) を用いて行った。定量評価には、HSKV M セグメント cDNA をクローニングしたプラスミドベクターから T7 RNA ポリメラーゼ反応により得られた RNA を用いた。ベトナムのマダニからの 2013-2014 年にベトナム(カットバ島)で採集したクリイロコイタマダニ 33 匹、オウシマダニ 19 匹から抽出した RNA を用いて、リアルタイム RT-PCR による HSKV 遺伝子検出を試みた。

ハンタウイルス感染症

ヤチネズミ類に由来するハンタウイルス感染をスクリーニングするために、Puumala 型ウイルス(PUUV)の核タンパク(N)の N 末端部位 103 アミノ酸を大腸菌で発現させた。この組換え N をイムノクロマトグラフィー(ICG)のストリップに抗原として塗布し、Protein A を用いて抗ハンタウイルス抗体の検出を行った。

ハンタウイルスの N に対する抗体で、3 種類のモノクローナル抗体(マウス腹水由来の精製 IgG1 あるいは IgG2a)(Saasa et al., Virology 2012 428:48-57, 昨年度報告書)について、ホルマリン固定パラフィン包埋組織上の特異的な抗原検出の可能性について評価した。

クリミア・コンゴ出血熱

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)の S、M、および L 遺伝子についてその塩基配列を NCBI より入手した。S-遺伝子については 89 株、M-遺伝子については 39 株、そして L-遺伝子については 28 株の情報を得た。入手した遺伝子塩基配列をもとに、DNA Data Bank of Japan (DDBJ)が提供する ClustalW を用いて系統樹解析を実施した。

狂犬病

平成 26 年 7 月 24 日-28 日に、「平成 26 年度北方領土訪問: 国後島リス類・中小哺乳類調査専門家交流(日露隣接地域生態系保全協力プログラム)」の調査に同行し、日本およびロシアの野生動物専門家の協力を得て国後島における現地調査と住民の意識調査等を行った。

狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株の遺伝子操作系(Yamada et al., Microbiol. Immunol., 2006)を用いて、L 遺伝子の代わりに GFP 遺伝子あるいはホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を保有する L 遺伝子欠損ウイルスを作出した。これらの株のストックウイルスの作製は、西ヶ原株 L 蛋白質の発現プラスミドが導入されたマウス神経芽細胞腫 NA 細胞を用いて行った。L 蛋白質発現細胞における Nishi- Δ L/GFP 株および Nishi- Δ L/Luc 株の増殖に伴い、それぞれ GFP およびルシフェラーゼが発現されることを確認するため、西ヶ原株 L 蛋白質の発現プラスミドを導入した NA 細胞に L 遺伝子欠損ウイルスを接種した。接種後 2、4 および 6 日目に、Nishi- Δ L/GFP 株に感染した同細胞を蛍光顕微鏡下で観察し、GFP 陽性細胞の出現の確認を行った。同様に、Nishi- Δ L/Luc 株に感染した L 蛋白質発現 NA 細胞を用いて、ルシフェラー

ゼ・アッセイを実施した。Nishi- Δ L/Luc 株の使用によって狂犬病ウイルスの初期転写が検出できる可能性を検証する目的で、L 蛋白質を発現しない NA 細胞に Nishi- Δ L/Luc 株を接種した。接種後 1、2、4、6、12、24 および 48 時間にルシフェラーゼ・アッセイを実施し、ルシフェラーゼ活性の検出を試みた。

ブルセラ症

愛玩用無尾類の繁殖施設で、2014 年に変態後間もない幼蛙の大量死が発生した。そのベルツノガエル (*Ceratophrys ornate*) 10 個体の臓器(肝臓、腎臓、大腿骨・骨髄)、計 20 検体を用いてブルセラ属菌の分離を行った。菌分離は、粉碎後の検体をブルセラ選択サブリメント(関東化学 SR83)添加 20%ウマ血清入り ATCC488 ブロスで培養、適宜、BHI プレートにサブカルチャーし、発育してきたコロニーを釣菌し、分離株については、Combinatorial-PCR 法により確認した。

生化学的性状の検査には、API20E(バイオメリュー)、NF-18(ニッスイ)、BACTOLABO オキシダーゼテスト(和光純薬)を用いた。分離株を BHI 寒天培地で 24 時間培養後、それぞれに添付のプロトコールに従い実施した。薬剤感受性試験はセンシ・ディスク(BD)を使用した KB 法で行った。Brucella 属菌は、本法の標準培地である、ミューラーヒントンおよびヘモフィルステスト寒天培地では、極めて生育が悪く判定が困難なため BHI 寒天培地を使用した。

供試菌をヒツジ血液寒天培地に播種し、2 回継代 24 時間後に使用した。細胞(HeLa 細胞)は、6well カルチャープレートに 2.5×10^5 /well となるように加えた。24 時間培養後、菌を各 well に加え、遠心吸着させた後、37°C、5%CO₂ で、1 時間感染させた。洗浄後、細胞外の菌を殺菌するため、50ug/ml ゲンタマイシン添加培地で 1 時間処理した。その後、10ug/ml ゲンタマイシン添加培地に交換したのち、培養を継続し、経時的(1, 4, 8, 12, 16, 20, 24hpi)に細胞を回収し、セアーマーチン寒天培地で CFU を計測した。

バルトネラ感染症

2011 年~2014 年の間に、青森県、山形県、和歌山県で捕獲された野生ニホンザルそれぞれ 25 頭、5 頭、15 頭から血液を採取した。サルの血液 100 μ l を 5%兔血液加チョコレート寒天培地に塗抹し、35°C、5%CO₂ 下で 1 カ月間培養した。培地上に発育した *Bartonella* を疑うコロニー数から血中菌数を測定した。分離株は、コロニー形態、発育日数ならびにグラム染色性(陰性)から *Bartonella* 属菌と推定した。*Bartonella* 属菌を保有していた各個体から無作為に 5 株を選択し、2 つのハウスキーピング遺伝子領域(*gltA* および *rpoB*)と 16S-23S rRNA 遺伝子間領域(ITS)の塩基配列に基づいて分離株の菌種を同定した。さらに、菌種同定された 3 株から代表の 1 株を選択し、9 つのハウスキーピング遺伝子領域(*atpF*, *bqtR*, *ftsZ*, *gap*, *gltA*, *groE*, *nlpD*, *ribE*, *rpoB*)を用いた Multi-Locus Sequence Typing (MLST) 法によって得られた配列から遺伝子型(Sequence Type: ST)を決定した。さらに、ニホンザル分離株(4 株)と既報のアカゲザル(37 株)、カニクイザル(16 株)およびヒト分離株(16 株)の塩基配列から、各 ST タイプの 9 遺伝子領域の連結塩基配列に基づく系統解析を行った。

サルモネラ感染症

1) 東南アジアのヤモリ由来 *S.weltevreden* の PFGE による遺伝子型別

供試菌株として、ベトナム・メコンデルタ 1 市 2 省(Can Tho 市、Ca Mau 省および Kien Giang 省)由来 25 株、ベトナム・フエ由来 19 株、カンボジア・シエムリアップ由来 16 株、タイ由来株 16 株、沖縄県由来 2 株のヤモリ由来株計 78 株と、ベトナム・メコンデルタ(Can Tho 市)で分離されたヒトの胃腸炎患者由来株 3 株を加えた計 81 株の *S.Weltevreden* を用いた。

供試菌株を trypticase soy agar(TSA)平板寒天培地(BBL)に塗抹し、37°C で 24 時間培養した。そして、培地上に発育したコロニーを Cell Suspension Buffer に接種、懸濁し、プラグ作製用アガロース中で固化させた。中試験管に Proteinase K solution(Wako) 20 μ l と RIPA

Buffer(Wako)4mlを入れ、それぞれの中試験管に1つずつプラグを入れ、54°Cに設定した恒温槽に入れ、振盪しながら2時間反応させた。反応後、溶菌バッファーをすべて除去し、滅菌蒸留水とTE Bufferでプラグを洗浄し、2mlのTE Bufferが入った、2mlの滅菌マイクロチューブに移し、4°Cで保存した。溶菌処理後のアガロースプラグを2mm幅に切断し、プラグ断片を1×M Buffer (SuRe/Cut Buffer H, Roche)を200 μ添加した1.5mlマイクロチューブに入れ、37°Cで15分静置した。プラグにXbaI (TaKaRa) 25Uを加えて37°Cで2時間反応させた。酵素処理終了後、M Bufferを除去し、0.5×TBE(Bio-Rad)を各チューブに添加し、10分間静置し、プラグを洗浄した。プラグ断片をパルスフィールドゲル電気泳動用のゲルにアプライし、14°C、6V/cm、開始スイッチングタイム 2.2秒、最終スイッチングタイム 63.8秒で19時間電気泳動を行った。泳動終了後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、UV照射下で得られたバンドパターンの解析を行った。供試したヤモリ由来株78株とヒトの胃腸炎患者由来株3株の計81株のPFGEパターンから、Phoretix™ 1D (Nonlinear Dynamics)を用いて、非加重結合法(UPGMA法)により系統樹の作製、解析を行い、その遺伝的関連性を検討した。

2) 染色体DNAのMLVA法による解析

過去に *Salmonella enterica* のMLVAで用いられた領域のうち、昨年度の研究で使用し差異が見られた2つの遺伝子領域 Sal16 および SE-4 と、STTR3 および STTR7 をTR領域として選択した。供試菌株からDNAを抽出し、PCRにより遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列の決定を行った。得られた配列データは、遺伝子解析ソフトウェア FinchTV (geospiza) を用いて解析し、菌株ごとにTR反復数をまとめた。

類鼻疽

2014年月にベトナム・メコンデルタで採取した水田の表土40検体について、類鼻疽菌の分離を試みた。供試検体10gを、5倍量の選択

増菌培地(1L 当たりトリプチケースソイブロス (Difco) 10g、グリセロール 40ml 0.1%クリスタルバイオレッド 5ml、コリシン 15000U)に入れ、37°C、24時間培養後、その上清を Ashdown's Medium 寒天培地に接種し、37°Cで48時間培養した。培養後、培地上に発育してきた類鼻疽菌が疑われるコロニーを釣菌し、純培養後、生化学的検査を行い、類鼻疽菌を同定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、研究代表者および研究分担者の研究機関における動物実験委員会の承認を受けたものであり、動物福祉の観点から問題ない。病原体を用いる感染実験は病原体のリスク分類に応じた封じ込め実験室内で実施された。本研究で研究対象となった野生動物は、いずれも管理捕獲によって捕獲された個体か、あらかじめ所管官庁から捕獲許可を得て捕獲された個体である。

C. 研究結果

ダニ媒介性脳炎

26プール中9プールの *I. persulcatus* 乳剤において、BHK細胞への接種後CPEが観察された。CPEが確認された細胞について、間接蛍光抗体法及びRT-PCRによりTBEV特異的抗原及び特異的な遺伝子が検出され、9株のTBEV (MGL-Selenge-13株)の分離が確認された。分離されたMGL-Selenge-13株について、E蛋白領域の全長の遺伝子配列を決定し、他のTBEVとの遺伝子系統樹解析を行ったところ、分離株はシベリア型に分類されることが示された。また分離株はシベリア型内の同一のサブクラスター内に属しており、以前モンゴルで分離された MucAr M14/10 株とは異なるサブクラスターに分類されることが明らかになった。またMGL-Selenge-13株のE蛋白領域について、MucAr M14/10株、同じくモンゴルで遺伝子のみが検出されているM92株、及びロシア・イルクーツクで分離されたIR99 2f7株との配列を比較した所、塩基配列では92M株とは

96%、MucAr M14/10 株及び IR99 2f7 株とは 94%の相同性があり、アミノ酸配列では全ての株で 99%の相同性が認められた。

ダニ由来ウイルス

HSKV セグメント特異的 Real-time RT-PCR により、 10^2 RNA copies 以上の SFTSV RNA 遺伝子の検出が可能であった。ベトナムにおいて採集されたマダニからは HSKV 遺伝子は検出されなかった。

ハンタウイルス感染症

ヨーロッパ、アジアでは SEOV、HTNV 等のネズミ亜科野げっ歯類およびハタネズミ亜科のげっ歯類の媒介する PUUV とその近縁ウイルスが存在するため、これらのウイルスに対する抗体を検出することが必要である。しかしながら、これらのウイルスの宿主の IgG はそれぞれ抗原性が異なり、一種類の試薬で検出することができない。PUUV の抗原を塗布した ICG を作成し、コロイドラベル二次抗体としては、ハタネズミ亜科げっ歯類の免疫グロブリンと強く反応する Protein A を使用したものを作成した。Protein A (EY laboratories)を金コロイド標識またはパラジウムコロイド標識の結合 pH を検討した結果、pH 7.0 - 9.0 の範囲で結合が確認された。

これらの ICG は、実験感染血清を用いて評価した。PUUV 実験感染ハタネズミおよびマウス血清各 2 例は、PUUV 抗原のみに反応した。一方、非感染ハタネズミおよびマウス血清ではいずれの場合もラインは観察されなかった。両コロイド間で結果に差はなかったが、パラジウムコロイドの方が結果のコントラストがやや強いため観察しやすい傾向が認められた。今回はこれまでの実績から金コロイドを使用して以下の実験を進めた。次に北海道で捕獲された野鼠であるエゾヤチネズミの血清 30 例で本 ICG を評価した。これらはすでに PUUV 類似ウイルスに対する陽性、陰性が診断されている血清である。本研究で試作した ICG ストリップで試験した結果、陽性と陰性を正しく判定することが可能であった。

条件検討の過程でヒトの血清との反応も確認した。Protein A は上記照応物以外にもウサギ、ヒトの IgG と強く結合することが知られている。その結果、一部のヒト血清で非特異反応が認められた。標識用金コロイドのロットを複数準備し、非特異反応の出た血清を検査したところ、一部の金コロイドのロット不良が原因であることが明らかとなった。このような不良ロットを迅速に見分けることも必要であることが明らかとなった。

ホルマリン固定パラフィン包埋で作製した SFTS ウイルスおよび SARS コロナウイルス感染動物組織標本を用いて検索した結果、今回用いた 5 つの抗体の免疫組織化学法ではいずれも抗原陰性であった。表に、昨年度と今年度の研究結果をまとめた。

クリミア・コンゴ出血熱

解析に用いた CCHFV 株 89 株中、39 株が CCHFV 中国分離株または患者等から増幅された CCHFV の S-遺伝子である。39 株中 1 株を除く 38 株は 1 つのクラスターを形成していた。ただし、中国新疆ウイグル自治区に分布する CCHFV の中には、オマーン、イラン、パキスタンで分離されたウイルスと同一のクラスターを形成する CCHFV が存在した。

M-遺伝子塩基配列による解析によると、中国株は世界各地(中近東、東南アジア、アフリカ)で分離される CCHFV と同じクラスターを形成するウイルスが混在おり、地域特異性が認められないことが明らかとなった。

L-遺伝子塩基配列による解析では、L-遺伝子は 3 つの遺伝子型に分類され、中国株はそのうちタジキスタン(TADJ/HU8966)で分離された株が属するクラスターと、オマーン(Oman)およびパキスタン(Matrin)の分離株が属するクラスターの 2 つの遺伝子型に分類されることが明らかになった。

狂犬病

非特定営利活動法人北の海の動物センターが、日露隣接地域生態系保全協力プログラムによる北方四島生態系関係共同調査を進

めており、その調査成果を「オホーツクの生態系とその保全(櫻井泰憲・大島慶一郎・大泰司紀之編著)(2013年)」に報告している。2010年の調査で新たにコウモリ類が2種記録され、国後島に計10種が分布し、同島と知床半島をモモジロコウモリが行き来していることが示唆されている。

国後島住民に生活行動・習慣についてアンケート調査を実施し、17名から以下の回答を得た。

1) 犬に関する質問

半数以上が犬を飼育しているが、屋外飼育・常時放し飼い・糞便放置・ネズミの捕食ありとの回答が多く、飼育犬の衛生環境は良くないと考えられた。

2) キツネに関する質問

島民による目撃率は高く、遭遇する機会は郊外の沼沢・湿地、だけでなく住居に近接することもある。また、工場・民家の周囲で残飯等をキツネが餌としている。餌付を行っている者が1名いたほかに、釣り魚の放置や生活ごみの不適切な処理が、人間とキツネの遭遇機会の増加につながっている可能性が考えられた。

3) 屋外での活動に関する質問

ほとんどの住民が、山菜取りやきのこ狩りを月に数回行っているが、採取した山菜ときのこは毎回洗って摂食しており、経口感染に対する予防意識はあるものと考えられた。

4) 家庭菜園(ダーチャ)について

住民の半数が家庭菜園を所有しており、週に数回ないし月に1回程度の作業を行っている。

5) 飲み水に関して

飲用水の煮沸を半数以上で行っておらず、特に井戸水を飲水に利用している場合については煮沸が必要と考えられた。

国後島に在住の野生動物専門家と住民との動物由来感染症に関する意見交換会では、専門家および住民ともに、狂犬病とエキノコックス症についての知識を持っており、関心の高

いことが示された。

狂犬病ウイルス西ヶ原株の遺伝子操作により、Nishi- Δ L/GFP株およびNishi- Δ L/Luc株の作出に成功した。Nishi- Δ L/GFP株を一過性にL蛋白質を発現するNA細胞に感染させた結果、GFPの発現が確認された。GFP陽性細胞の数は、接種後時間の経過にしたがい増加することが確認された。一方、同様の実験をNishi- Δ L/Luc株で行った場合も、経時的なルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。すなわち、L蛋白質発現NA細胞にNishi- Δ L/GFP株およびNishi- Δ L/Luc株を接種した場合、そのゲノムに挿入したレポーター遺伝子が発現されることが確認された。

ストックウイルス中のNishi- Δ L/Luc株は、ヌクレオカプシド上に発現細胞から供給されたL蛋白質を保有している。したがって、Nishi- Δ L/Luc株をL蛋白質非発現細胞に接種した場合、ヌクレオカプシド上に持ち込まれたL蛋白質の作用により初期転写が起こると考えられる。しかし、その後は、L遺伝子の欠損によりL蛋白質が供給されないため、二次転写およびゲノム複製は起こらない。そこで、ルシフェラーゼ活性を指標とすることで、Nishi- Δ L/Luc株感染細胞における初期転写を検出できるかどうか検討を行った。L蛋白質を発現しないNA細胞にNishi- Δ L/Luc株を接種した場合、接種6時間後において非接種細胞(mock)よりも3倍以上高いルシフェラーゼ活性が検出された。同活性は、接種12時間後にピークに達した後、次第に低下した。以上より、ルシフェラーゼ活性を指標とすることで、Nishi- Δ L/Luc株の初期転写が検出可能であることが強く示唆された。

ブルセラ症

ベルツノガエル10個体のうち、3個体の肝臓より、ブルセラ属菌が分離された(A7h株、A9h株、A10h株)。Combinatorial-PCR法により、omp2-caを除く3種のプライマーによる明らかな特異的増幅が認められた。ただ、昨年度分離したA105株、A141株では、4種のプライマ

一による特異的増幅が認められたのに対して、今回は omp2-ca の反応性が著しく弱いことから、これらとは異なることが明らかとなった。A7h、A9h、A10h の間には差は認められなかった。

無尾類分離株は対照としておいたブルセラ属菌よりも特に糖の分解能において、*Ochrobactrum* 属の菌と類似のパターンを示した。また、無尾類分離株内でも、2 タイプ(A105、A141 タイプと、Ah7、Ah9、Ah10 タイプ)に分かれるようであった。

分離株はマクロライド系、テトラサイクリン系、ニューキノロン系の抗生物質に対しては概ね感性であったが、ブルセラ症の治療に用いられるアミノグリコシド系やリファンピシンには中間的な耐性を示した。対照に用いた *B. canis* とは若干、異なるプロファイルを示した。

A105 株、A141 株は、Hela 細胞に感染し、細胞内で増殖を示すことが明らかとなった。特に、12hpi 以降、増殖が顕著になるが、20 ないし 24hpi では増殖曲線に鈍化が認められた。

バルトネラ感染症

捕獲されたニホンザルの 13.3%(6/45)から *B. quintana* が分離された。各県のサルの陽性率は、青森県が 4.0%(1/25 頭)、山形県が 20.0%(1/5 頭)、和歌山県が 26.7%(4/15 頭)であった。血中菌数は 50~37,000CFU/ml と、非常に高い値を示す個体も認められた。

gltA、*rpoB* ならびに ITS 領域の塩基配列を解析した結果、全てのニホンザル分離株は同一の遺伝子性状を示すこと、また中国の飼育アカゲザルを由来とする *B. quintana* RM-11 株と同一であるか非常に高い相同性(99.5~100%)を示した。

B. quintana 陽性の 6 個体から代表の 1 株を選抜し MLST 法を試みた結果、いずれの株も新規の ST22 に型別された。連結塩基配列に基づく系統解析では、ニホンザル、アカゲザル、カニクイザルおよびヒト分離株はそれぞれ独立した 4 つのクラスターを形成した。

サルモネラ感染症

1) PFGE 法による染色体 DNA の解析結果

今回供試した *S.Weltevreden*81 株は、制限酵素 *Xba*I を用いた PFGE 法により、F1~F22 の 22 の PFGE パターンに型別された。各 PFGE パターンと分離された地域との関係をみると、F1 および F14 以外の 20 パターンの菌株は、それぞれ単一の地域で分離されたものであった。F1 および F14 についても、分離された地域は同じベトナム国内であり、比較的近い距離にあった。また、地域別に分離されたパターン数をみると、メコンデルタでは 13 パターンと最も多く、2 番目に多かったタイでは 5 パターンであった。

2) 系統樹解析

S.Weltevreden のヤモリ由来株 78 株とヒトの胃腸炎患者由来株 3 株の計 81 株の PFGE パターンの相同性をもとに、UPGMA 法により系統図を作製した結果、系統樹は大きく 2 つのクラスターに分けられた。パターン数が最も多かったメコンデルタ由来株の大部分は 1 つのクラスターに分類された。また、2 番目に多かったタイ由来株はメコンデルタ由来株とは異なったクラスターに分類された。

3) MLVA 法による遺伝子型別

PFGE で型別されたそれぞれのパターンのうち、パターン F1 から 3 株、パターン F12、F14、F15、F16 および F17 から 2 株ずつ、パターン F2、F3、F4、F5、F6、F7、F8、F9、F10、F11、F13、F18、F19、F20、F21 および F22 からそれぞれ 1 株の計 29 株を用い、MLVA を実施した結果、14 の MLVA タイプに分類された。その内訳は、タイプ M1 に 5 株、タイプ M2 に 4 株、タイプ M3 に 3 株、タイプ M4、M5、M6、M7、M8 および M9 にそれぞれ 2 株ずつ、タイプ M10、M11、M12、M13 および M14 にそれぞれ 1 株ずつであった。RN が菌株間で異なっていた領域は、Sal16 と STTR3 および STTR7 であったが、今回新たに用いた STTR3 および STTR7 の領域で差異が見られたのは 1 株だけであり、菌株識別能力は低かった。これに対し、Sal16 の領域では、RN 数に顕著なばらつきがみられた。

また、SE-4 では差異が確認されなかった。

類鼻疽

今回、ベトナム・メコンデルタで採取した水田の土 40 検体について、増菌法を併用して培養法により類鼻疽菌の分離を行ったところ、3 検体(7.5%)から類鼻疽菌が分離された。

D. 考察

ダニ媒介性脳炎

モンゴル北部の Selenge 県に生息している *I. persulcatus* から 9 株のシベリア型 TBEV が分離された。TBE 患者の報告は特に本県で多いことから、同地域での TBE の原因ウイルスはこれらシベリア型 TBEV によるものと考えられる。同地域は多数のシベリア型 TBE が報告されているロシアとの近接地域であり、ロシアから侵入してきているものと考えられる。

またシベリア型 TBEV は遺伝子 RNA の配列からさらに2つのサブクラスターに分類される。今回分離された 9 つの MGL-Selenge-13 株は、一つのサブクラスターに属しており、以前モンゴルで分離された MucAr M14/10 株とは異なるサブクラスターに属していた。ロシアのシベリア地方においても、同一の TBE 流行地域において 2 つのサブクラスターのシベリア型 TBEV が分離されていることから、これらの 2 つのサブクラスターの TBEV はそれぞれ独立してモンゴルに侵入している可能性を示している。

ダニ由来ウイルス

HSKV 遺伝子の特異的に検出できる Real-time PCR 法を確立した。我々はこれまでに、TBEV 遺伝子および SFTSV を特異的に検出できる Real-time RT-PCR 法も確立している。また、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属の数株を検出可能な共通プライマーを用いた RT-PCR 系も確立している。今後、これらの遺伝子検出系を用いて、日本を含む東・東南アジア周辺国においてマダニ媒介性ウイルス遺伝子検出調査を行う予定である。

HSKV のヒトや動物への病原性は未知であるが、HSKV はヒトを含む哺乳動物由来培養細

胞に感染性を示し、マウス(IFNAR KO)に致死性を示すことから、実際に感染例が存在する可能性がある。今後、動物およびヒト血清を用いた遺伝子検出調査も行う予定である。

ハンタウイルス感染症

Protein A を用いることによって、多種類のげっ歯類の抗ハンタウイルス抗体の検出を ICG で行うことが可能となった。Protein A の適用範囲の動物としては、ヤチネズミ、ハタネズミ、小型のトガリネズミ類である。今回は検証のため PUUV 抗原のみを用いたが、今後は対象を考慮した Multiplex 抗原と種々の検出試薬の組み合わせの検討が必要となる。

昨年度は、ホルマリン固定パラフィン包埋で作製されたハンタウイルスとプーマラウイルス感染動物組織標本を用いて検索した結果、いくつかのハンタウイルスの核タンパク質に対するモノクローナル抗体は、組織上の両種のウイルス抗原の検出ができることが判明した。これらのモノクローナル抗体について、ハンタウイルス感染症との鑑別診断が必要である、ブニヤウイルス科に属する SFTS ウイルスと、急性呼吸器感染症の原因となる SARS コロナウイルスに対する交差反応の有無を評価した。その結果、これらの抗ハンタウイルス抗体は両ウイルスに対する交差反応性は示さず、これらの抗体は、パラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学法においてもハンタウイルスを特異的に検出することが確認された。

クリミア・コンゴ出血熱

最近、CCHF の流行はアジアにおいては、中国新疆ウイグル自治区(ただし、2002 年以降の流行状況の発表はない)とパキスタンでの流行が報告され、特記すべきこととして、インドでも CCHF の患者発生が報告されている。今回の研究成績からは、CCHF 患者の CCHFV 感染地域を特定するためには、塩基配列に地域特異性のある S-遺伝子を解析に用いるのが有用であることが明らかにされた。

S-遺伝子には地域特異性があるのに対し M-遺伝子にはそれがない。この違いの背景と

CCHFV の詳細な進化の過程を動物やマダニと CCHFV の関連の中で明らかにされることが求められる。

狂犬病

国後島における動物由来感染症の実態調査は行われておらず、ヒトおよび動物の発生状況等について正確な情報はない。北海道におけるエキノコックス症の侵入経路を考えると、島内に生息するキツネの感染症動向調査は島民の健康のためにも必要であると考えられた。また、狂犬病発生リスクが高く野生動物での流行拡大が見られる地域が極東にあるというロシアの専門家による情報を考慮すると、国後島に生息する狂犬病に感受性の高い動物について狂犬病の調査を行うことが必要と考えられた。

国後島住民の生活行動・習慣調査によって、狂犬病の重要な流行宿主である犬の飼育管理に課題のあることが示され、エキノコックス症に対する予防策とともにヒトに身近なペット動物であるイヌの飼育形態の改善が望まれた。

国後島のコウモリ類については、日露隣接地域生態系保全協力プログラムによる北方四島生態系関係共同調査によって、2010年の調査で新たな2種が記録され、計10種の分布が確認されている。特に、国後島と知床半島のモモジロコウモリが両地域を行き来している可能性が示唆されており、国後島から海域を越えて狂犬病等のコウモリ由来動物由来感染症が北海道に侵入する可能性があることから、本調査を継続することによって生態学的な知見を踏まえた発生予測・被害推計などを可能にすることが必要であると考えられた。

これまで、狂犬病ウイルスを含むマイナス鎖 RNA ウイルスの RNA ポリメラーゼの研究には、ミニゲノム転写・複製系が広く用いられてきた。本系は、ゲノム両末端配列の間にレポーター遺伝子(ルシフェラーゼなど)を有するミニゲノム RNA、ならびに RNA ポリメラーゼを含むヌcleoカプシド構成蛋白質を発現する各種プラス

ミドを細胞に導入することで、感染細胞で行われるウイルス RNA の転写・複製を人工的に再現するものである。本系を用いれば、レポーター遺伝子の発現量を指標として転写・複製効率を簡便に評価することが可能である。その一方で、ミニゲノム転写・複製系は、すべてのウイルス因子の供給をプラスミドからの一過性発現に依存しているため、アーティファクトの影響により必ずしも感染細胞における転写・複製を反映しない可能性も考えられる。それに対し、本研究で樹立した L 遺伝子欠損ウイルスを用いた実験系は、L 蛋白質の発現のみをプラスミドに依存していることから、ミニゲノム転写・複製系よりもアーティファクトの影響が少ないと考えられる。本研究では、L 蛋白質発現プラスミドを導入した細胞に Nishi- Δ L/GFP 株および Nishi- Δ L/Luc 株を感染させることで経時的なレポーター遺伝子の発現上昇が確認された。このことは、上記の発現プラスミド上の L 遺伝子 cDNA に種々の変異を導入した後、同様の実験を実施することで L 蛋白質の機能領域の解析が可能となることを示している。すなわち、本系は、狂犬病ウイルスの L 蛋白質の機能解析に有用なツールとなることが明らかとなった。Nishi- Δ L/Luc 株を接種した L 蛋白質非発現細胞において、非接種細胞よりも高いルシフェラーゼ活性が検出されたことより、これを指標とすることで、狂犬病ウイルスの初期転写が検出可能であることが強く示唆された。通常の狂犬病ウイルスやミニゲノム転写・複製系を用いた場合、技術的に初期転写と二次転写を区別することはできない。したがって、Nishi- Δ L/Luc 株を用いた本系は、狂犬病ウイルスの初期転写の機序を解明する上で極めて有用なツールとなることが予想される。

ブルセラ症

今年度は、国内繁殖の無尾類(ベルツノガエル)3 個体から、新たにそれぞれ 1 株、計 3 株が分離され、特異的 PCR によりブルセラ属菌と判定された。しかしながら、omp2-ca タイプの配列を検出するプライマーでの反応性が非

常に弱く、昨年度の 2 株とは異なる遺伝子背景を持つ、新菌種である可能性が示唆された。

これら、計 5 株について、生化学的性状を検討したところ、これまで知られている他のブルセラ属菌よりも、遺伝的に最もブルセラ属菌と近縁であると考えられている *Ochrobactrum* 属菌に近い性状を示した。さらに、昨年度の 2 株と今年度の 3 株は生化学性状に差が認められた。

また、薬剤感受性については、概ね既知のブルセラ属菌と似ているが、ブルセラ症の治療に用いられる薬剤に対する感受性が、やや劣っていた。

分離株はいずれも、ヒトに感染しうる *B. inopinata* にブルセラ属菌中で最も近縁であることから、ヒト培養細胞への感染性と細胞内増殖能を検討したところ、*B. abortus* や *B. suis* と同様に、顕著な感染・増殖能を示した。ヒトに対する病原性が家畜由来ブルセラ属菌 (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*) より劣る *B. canis* ではヒト培養細胞での感染・増殖とも非常に弱いことを考えると、無尾類由来ブルセラ属菌は、ヒトに病原性を持つ公衆衛生学的にも注意が必要な菌である可能性がある。今後さらにその病原性について、病原性遺伝子や感染実験により明らかにしていく必要があると考えられる。

バルトネラ感染症

青森県、山形県および和歌山県に棲息する野生のニホンザルは *B. quintana* を保菌していることが初めて明らかとなった。さらに、3 頭の *B. quintana* 陽性のニホンザルの血中菌数はそれぞれ 6,000、12,000、37,000CFU/ml と、高い菌血症状態であった。また、ニホンザル分離株はヒト由来の *B. quintana* Fuller[†] 株に比べ、アカゲザル由来の *B. quintana* RM-11 株とより近縁な株であることも明らかとなった。以上の結果から、サルはヒト分離株と異なる遺伝子性状の *B. quintana* を保有するとともに、本菌の自然宿主である可能性が示された。

MLST 法を用いて、ニホンザル分離株の ST を決定したところ、検討した 6 株は同一の ST22 型であることが明らかとなった。さらに MLST 法に基づいて系統解析したところ、ST1~22 は 4 つの独立したクラスターを形成し、それぞれ分離されたヒトあるいはサルの種類ごとに ST が分類された。今回、ニホンザルから分離された *B. quintana* 株は新規の ST であり、また系統解析でもニホンザル独自のクラスターを形成したことから、ヒトおよびサルの種ごとに固有の遺伝子性状を有する *B. quintana* を保有している可能性が示唆された。さらに、青森・山形・和歌山県のニホンザルは、アカゲザルやカニクイザルとは異なる ST の *B. quintana* 株を保有していたことから、わが国ではニホンザル固有の *B. quintana* がサル集団内に分布している可能性が考えられた。本研究のニホンザルの採材地域は 3 県に限定されていたことから、今後、より広範な地域のニホンザルにおける *B. quintana* の分布状況を検討するとともに、分離株の遺伝子性状を詳細に解析していく必要性があると考えられた。

サルモネラ感染症

東南アジアでは、*S. Weltevreden* が人のサルモネラ感染患者から分離される最も重要な血清型であり、ヤモリが本血清型を高率に保菌し、自然界における重要なレゼルボアであることが報告されている。本研究では、ベトナム、カンボジア、タイおよび沖縄県においてヤモリから分離された *S. Weltevreden* 78 株と、ベトナム・メコンデルタにおいてヒト胃腸炎患者から分離された *S. Weltevreden* 3 株の計 81 株について PFGE 法を実施した結果、22 の PFGE パターンに型別された。このうち、ヒトの胃腸炎患者由来株のみで見られた 1 つの PFGE パターンをのぞき、それ以外の 21 パターンはすべてヤモリ由来株から得られた。近年、欧米や日本などの先進国で大きな社会的問題となっている *S. Enteritidis* や *S. Infantis* は、PFGE で遺伝子型別しても得られる PFGE パターンは極めて少ないことが報告されており、これらのことは近年

のこれらの血清型による *Salmonella* 感染症の流行は特定のクローンによるものであることを示している。一方、メコンデルタで分離された様々な由来の *S.Weltevreden* について PFGE で解析したところ、多様な PFGE パターンが分離されたことが報告されているが、本研究でも東南アジアの野生ヤモリ由来の *S.Weltevreden* は PFGE により、多様なパターンに型別された。また、系統樹解析により、同じ地域で分離された *S.Weltevreden* はほぼ同じクラスターに入っていた。これらのことは、本地域には古くから本血清型が土着しており、やがて地域ごとに遺伝的に多様なものへ分化していったことを示していると考えられる。また、メコンデルタの胃腸炎患者由来株 2 株の PFGE パターンは、フエのヤモリから分離されたパターン F14 と同じであったことから、ヤモリはヒトへの感染源となっている可能性が推察される。

日本では *S.Weltevreden* はほとんど分離されないが、沖縄県だけは本血清型菌の分離頻度が高いことが報告されている。沖縄では 1960 年代くらいまでは東南アジアで普遍的に分布するホオグロヤモリは分布しておらず、1960 年代以降にこのヤモリが沖縄に侵入したことが報告されている。本研究で供試した沖縄県におけるヤモリ由来 *S.Weltevreden* 2 株の PFGE パターンはどちらもパターン F16 であった。本研究で供試した東南アジアのヤモリ由来株には同じ PFGE パターンを示す菌株は確認されなかったが、系統図解析により東南アジア由来株との遺伝子間の距離を測ると、タイ由来株やメコンデルタ由来株と 57% の相同性を持つことがわかった。そのため、沖縄県のヤモリから分離された *S.Weltevreden* は、東南アジアから沖縄に持ち込まれた可能性が考えられる。今回は沖縄県におけるヤモリ由来株は 2 株だけしか供試できなかったため、結果として得られた PFGE パターンは 1 つのみだったが、沖縄県由来株と東南アジア由来株の *S.Weltevreden* の遺伝的関連性を比較するためには、さらに多くの検体を供試し、遺伝子パ

ターンを比較する必要がある。

PFGE 法は菌株型別能力が高く、現在では分子遺伝子型別のゴールドスタンダードとして、広く普及しているが、手技が煩雑であり、フラグメント解析なので他機関との間で比較がしづらいなどの欠点もあるため、PFGE 法に代わる新たなシーケンス解析による分子遺伝子型別法のひとつとして、MLVA 法が開発されている。Chiou らは、*S. Typhimurium* を PFGE ならびに MLVA で解析した結果、PFGE では 8 パターンであったのに、MLVA では 108 パターンにも型別され、菌株型別能力は MLVA のほうが高かったと報告している。このように、MLVA のほうが PFGE より高い菌株型別能を示すことを指摘する研究者は多い。しかしながら、今回の研究では、PFGE では 22 パターンに分けられたのに対し、MLVA では 14 タイプのみであった。昨年度の検討では、Sal16 と SE-4 の 2 つの領域について、*S.Weltevreden* 株の MLVA 解析を行ったところ、Sal16 では 14 種類の RN が認められ、十分な識別能を発揮したが、SE-4 については、差異が全く認められなかったことを報告している。また、今回新たに使用した領域である、STTR3 と STTR7 についても、差異が認められた株は 1 つだけであり、MLVA の識別能は高くなかった。すなわち、Sal16 以外の 3 つの領域は、あまり遺伝的に多様な領域とは言えず、今後 *S.Weltevreden* での MLVA の識別能を上げるためには、遺伝的に多様な領域を見つけ、検討することが必要である。今回使用したプライマーは、*S.Weltevreden* のために設計されたものではなく、*S. Typhi*、*S. Typhimurium* および *S. Enteritidis* での MLVA 解析のために設計されたものである。そのため、*S.Weltevreden* ではこれらの領域は遺伝的に多様ではなかったものと考えられる。今後 *S.Weltevreden* に MLVA を用いて、PFGE と同等もしくはそれ以上の識別能を得ようとするなら、*S. Enteritidis* などのために設計された既存のプライマーではなく、Tandem Repeat Finder software を用いて、*S. Weltevreden* のシーケンスデータから MLVA マ

一カーになりうる領域を探し出し、新しくプライマーの設計を行い、最適なプライマーセットを開発する必要があるだろう。

類鼻疽

類鼻疽は我が国における国内発生はほとんどないが、輸入感染症としてしばしば発生が見られる。わが国の類鼻疽の輸入感染例において、感染国として報告の多いベトナムの水田の土を採取し、類鼻疽菌の分離を試みた結果、昨年度は選択培地に直接塗抹する方法では菌は分離されなかったが、今年度は増菌法を併用した結果、類鼻疽菌は 40 検体中 3 検体 (7.5%) から分離された。このことから、ベトナム・メコンデルタにも本菌は分布することが明らかになった。ただ、直接塗抹では分離されなかったことから、分布はしているものの、菌の汚染菌量は高くはないものと思われた。

E. 結論

本年度の研究により、ダニ媒介性脳炎、クリミア・コンゴ出血熱、バルトネラ感染症、サルモネラ感染症、および類鼻疽について、国内外の疫学的情報が得られた。また、ハンタウイルス感染症、ダニ由来ウイルスについて、診断法もしくは検出法を開発することに成功した。今後は新規に開発された診断法を用いて、近隣諸国におけるこれらの感染症の流行状況調査を行い、日本への侵入・流行の危険性を精査していく事が重要であると考えられる。

本年度の研究で作出された L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスは、狂犬病ウイルスの L 蛋白質の機能解析に有用なツールとなることが明らかとなった。また、本ウイルスは、L 蛋白質を標的とした新たな治療薬のスクリーニングにも応用されることが期待される。

ベルツノガエルからの新規のブルセラ属菌 3 株が分離された。今回の分離株はいずれも、ヒトに感染しうる *B. inopinata* にブルセラ属菌中で最近縁であることと、HeLa 細胞中への侵入性を示したことから、ヒトに感染しうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Igarashi, M., Kariwa, H., Holbrook, M.R., Takashima, I.: A Critical Determinant of Neurological Disease Associated with Highly Pathogenic Tick-borne Flavivirus in Mice. *Journal of virology*, 88: 5406-5420, 2014
- 2) Chidumayo, N.N., Yoshii, K., Saasa, N., Sakai, M., Kariwa, H.: Development of a tick-borne encephalitis serodiagnostic ELISA using recombinant Fc-antigen fusion proteins. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 78 :373-378, 2014
- 3) Sakai, M., Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Hirano, M., Kariwa, H.: The variable region of the 3' untranslated region is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. *J Gen Virol*. 95: 823-835, 2014
- 4) Hirano, M., Yoshii, K., Sakai, M., Hasebe, R., Ichii, O., Kariwa, H.: Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. *J Gen Virol*, 95:849-861, 2014
- 5) Chidumayo, N.N., Yoshii, K., Kariwa, H.: Evaluation of the European tick-borne encephalitis vaccine against Omsk hemorrhagic fever virus. *Microbiol Immunol*, 58: 112-118, 2014
- 6) Tun M.M., Aoki K., Senba M., Buerano C.C., Shirai K., Suzuki R., Morita K., Hayasaka D.: Protective role of TNF- α IL-10 and IL-2 in mice infected with the Oshima strain of Tick-borne encephalitis virus. *Sci. Rep.* 4:5344, 2014.
- 7) Nagata N., Iwata-Yoshikawa N., Hayasaka D., Sato Y., Kojima A., Kariwa H., Takashima I.,

- Takasaki T., Kurane I., Sata T., Hasegawa H. : The pathogenesis of three neurotropic flaviviruses in a mouse model of viremia depends on the route of neuroinvasion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* In press.
- 8) Amada, T.; Yoshimatsu, K.; Koma, T.; Shimizu, K.; Gamage, C.D.; Shiokawa, K.; Nishio, S.; Ahlm, C.; Arikawa, J. Development of an immunochromatography strip test based on truncated nucleocapsid antigens of three representative hantaviruses. *Virology* 2014, 11, 87.
- 9) Koma T, Yoshimatsu K, Nagata N, Sato Y, Shimizu K, Yasuda SP, Amada T, Nishio S, Hasegawa H, Arikawa J. Neutrophil depletion suppresses pulmonary vascular hyperpermeability and occurrence of pulmonary edema caused by hantavirus infection in C.B-17 SCID mice. *J Virol.* 2014. 88:7178-7188.
- 10) 井上 智. 狂犬病の予防と対策. シリーズ:動物由来感染症(第1回). 公衆衛生情報 4, 日本公衆衛生協会. 44:32-33, 2014
- 11) 井上 智. 狂犬病とバイオセーフティ(解説). 日本バイオセーフティ学会(The Japanese Biosafety Association). *JBSA Newsletter.* 4:19-21, 2014
- 12) 井上 智. 狂犬病の発生状況と野生動物調査の意義. 特集:狂犬病をめぐる最近の情勢(野生動物にどう対処するか). *獣医畜産新報(JVM).* 67:809-818, 2014
- 13) 水谷浩志, 久保田菜美, 宗村佳子, 松村藍, 山本智美, 木村昌伸, 今岡浩一. 東京都における犬の抗 *Brucella canis* 抗体保有状況. *日本獣医師会雑誌,* 67(3):204-207, 2014
- 14) 佐藤宏明, 冬賀秀一, 堀田緒留人, 須原靖明, 尾関拓磨, 丸茂一義, 金井尚之, 莊子久美子, 宇田川郁子, 満下恵, 今岡浩一. *Brucella melitensis* による椎間板炎の一例. 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 35(7): 182-183, 2014
- 15) 今岡浩一, 木村昌伸. ブルセラ症—特集・人獣共通感染症の新しい知見. *臨床と微生物,* 近代出版, 42(1): 27-32, 2015
- 16) Pangjai, D., Maruyama, S., Boonmar, S., Kabeya, H., Sato, S., Nimsuphan, B., Petkanchanapong, W., Wootta, W., Wangroongsarb, P., Boonyareth, M., Preedakoon, P., Saisongkorh, W., and Sawanpanyalert, P. 2014. Prevalence of zoonotic *Bartonella* species among rodents and shrews in Thailand. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 37(2): 109-114.
- 17) 丸山総一:猫ひっかき病, 公衆衛生情報 Vol. 44/No. 3: 22-23. (2014)

2. 学会発表

- 1) 好井健太郎, 鶴田征太郎, 境瑞紀, 苅和宏明. ダニ媒介性フラビウウイルスのインターフェロンアンタゴニスト作用の解析. 第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 山口県山口市. (2014, 5).
- 2) 下田宙, 米満研三, 早坂大輔, 好井健太郎, 寺田豊, 野口慧多, 鎌田龍星, 高野愛, 前田健. 山口県の野生動物およびダニからフラビウウイルスの検出. 第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 山口県山口市. (2014, 5).
- 3) Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Igarashi, M., Kariwa, H., Holbrook, M. R., Takashima, I.: A critical determinant of neurological disease associated with highly pathogenic tick-borne flavivirus in mice. *International Union of Microbiological Societies* 2014. Montreal, Canada. (2014, 7).
- 4) Hirano, M., Yoshii, K., Sakai, M., Hasebe, R., Ichii, O., Kariwa, H.: Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in

- dendrites of primary mouse neuronal cultures. International Union of Microbiological Societies 2014. Montreal, Canada. (2014, 7).
- 5) Sakai, M., Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Hirano, M., Kariwa, H.: Variable region of the 3' UTR is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. International Union of Microbiological Societies 2014. Montreal, Canada. (2014, 7).
 - 6) Kariwa, H., Maki, M., Seto, T., Sanada, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K.: Passage of Hantaan virus strain AA57 in Vero E6 cells affects pathogenicity in mice. International Union of Microbiological Societies 2014. Montreal, Canada. (2014, 7).
 - 7) Nakao, R., Kajihara, M., Matsuno, K., Qiu, Y., Mori, A., Nao, N., Yoshii, K., Kariwa, H., Sawa, H., Sugimoto, C., Takada, A., Ebihara, H.: Detection and isolation of novel phleboviruses from ticks in Japan. the 12th Biennial Conference of the Society for Tropical Veterinary Medicine and the VIII International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens. Cape Town, South Africa. (2014, 8).
 - 8) Kariwa H, Sanada T, Iwasaki R, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I. Characterization of Hokkaido virus, Genus Hantavirus and generation of the Reassortant Virus with Puumala Virus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases, Taipei, Taiwan (2015. 1)
 - 9) Hirano M, Yoshii K, Hasebe R, Ichii O, Kariwa H. Tick-borne encephalitis virus alters membrane structure and replicates in dendrites of primary mouse neuronal cultures. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases, Taipei, Taiwan (2015. 1)
 - 10) 中尾桃子, 真田崇弘, 好井健太郎, 佐々木宣哉, 亀山武志, 高岡晃教, 苺和宏明. エゾヤチネズミ腎由来細胞におけるハンタウイルス感染に対するI型インターフェロン応答の解析. 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 6).
 - 11) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 平野港, 苺和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの高病原化に関わる3'非翻訳領域 variable region の役割. 第157回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
 - 12) 武藤芽未, Boldbaatar, B., 好井健太郎, 苺和宏明. モンゴルにおけるダニ媒介性脳炎ウイルスの分離と性状解析. 第157回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
 - 13) 下田宙, 米満研三, 早坂大輔, 好井健太郎, 寺田豊, 野口慧多, 鎌田龍星, 高野愛, 前田健. 国内の野生動物およびダニから新規フラビウイルスの検出. 第157回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
 - 14) 岩崎里菜, 真田崇弘, 好井健太郎, 苺和宏明. Hokkaido ウイルスと Puumala ウイルスの遺伝子再集合体の作出とその性状解析. 第157回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
 - 15) 中尾亮, 梶原将大, 邱永晋, 森亜紀奈, 直亨則, 村松美笑子, 好井健太郎, 苺和宏明, 澤洋文, 杉本千尋, 高田礼人. 北海道産マダニからの新規フレボウイルスの検出. 第157回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
 - 16) 池端真帆, 好井健太郎, 境瑞紀, 平野港, 苺和宏明. レポーター遺伝子発現ダニ媒介性脳炎ウイルスの作製と性状解析. 第157回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
 - 17) Hirano, M., Yoshii, K., Sakai, M., Hasebe, R., Ichii, O., Kariwa, H.: Tick-borne flaviviruses

- alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. The 2nd Sapporo Summer Seminar for One Health. Sapporo, Hokkaido. (2014, 9).
- 18) Muto, M., Bazartseren, B., Yoshii, K., Kariwa, H.: Isolation and characterization of tick-borne encephalitis virus from Mongolia. The 2nd Sapporo Summer Seminar for One Health. Sapporo, Hokkaido. (2014, 9).
- 19) 好井健太郎. フラビウイルス粒子形成・分泌に関与する宿主因子の検索および機能解析. 第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 20) 平野港. ダニ媒介性脳炎ウイルスの神経細胞内特異的な複製機構の解析. 第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 21) 武藤芽未, Boldbaatar, B., 好井健太郎, 苺和宏明. モンゴルにおけるダニ媒介性脳炎ウイルスの分離と性状解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 22) 岡本奈津実, 好井健太郎, 中尾亮, Hofstetter, R. K., 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. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 23) 池端真帆, 好井健太郎, 境瑞紀, 平野港, 苺和宏明. レポーター遺伝子発現ダニ媒介性脳炎ウイルスの作製と性状解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 24) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 平野港, 苺和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの高病原化に関わる 3'非翻訳領域 variable region の役割. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 25) 岩崎里菜, 真田崇弘, 好井健太郎, 苺和宏明. Hokkaido ウイルスと Puumala ウイルスの遺伝子再集合体の作出とその性状解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 26) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苺和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 第 48 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
- 27) 好井健太郎, 寸田祐嗣, 五十嵐学, 横澤香菜, 境瑞紀, 苺和宏明, Holbrook, M. R., 高島郁夫. ダニ媒介性フラビウイルスによる中枢神経系病態に関わるウイルス因子の同定. 第 48 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
- 28) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 苺和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定. 第 48 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
- 29) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苺和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 日本ウイルス学会北海道支部第 47 回夏季シンポジウム. 北海道奈井江町. (2013, 7).
- 30) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苺和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
- 31) 牧雅大, 真田崇弘, 瀬戸隆弘, 永田典代, 好井健太郎, 苺和宏明. Hantaan ウイルス AA57 株感染マウスにおける病態発現機序の解析. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
- 32) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 苺和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
- 33) 好井健太郎, 寸田祐嗣, 五十嵐学, 横澤香菜, 境瑞紀, 苺和宏明, Holbrook, M. R., 高