

- 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おける NS5 蛋白の影響の解析. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
- 34) 下田宙, 早坂大輔, 好井健太郎, 米満研三, 寺田豊, 野口慧多, 鎌田龍星, 高野愛, 前田健. 山口県のイノシシからダニ媒介性脳炎ウイルス様遺伝子の検出. 第 20 回 トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 兵庫県神戸市. (2013, 11)
- 35) 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 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 36) 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 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 37) 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 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 38) 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 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 39) Mya Myat Ngwe Tun, 青木康太郎, 千馬正敬, 森田公一, 早坂大輔: ダニ媒介性脳炎ウイルス感染における TNF- α IL-10 および IL-2 応答の役割: 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 山口 (2014, 5)
- 40) 早坂大輔: SFTS ウイルスについてこれまでわかったこと: 第 22 回 Seminar on Acari-Disease Interface, 太宰府 (2014, 7)
- 41) 黒崎陽平, 中前小百合, 早坂大輔, 安田二郎: 新規ナイロウイルス遺伝子検出法の開発: 第 51 回ウイルス学会九州支部総会, 鹿児島 (2014, 9)
- 42) 早坂大輔, 嶋田聡, Guillermo Posadas Herrera, 森田公一: 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス感染マウスモデルを用いた抗血清および薬剤効果の検討: 第 51 回ウイルス学会九州支部総会, 鹿児島 (2014, 9)
- 43) 早坂大輔, 嶋田聡, 青木康太郎, 森田公一: 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス遺伝子検出法の確立と長崎県における媒介マダニ調査: 第 157 回日本獣医学会学術集会, 札幌 (2014,9)
- 44) Mya Myat Ngwe Tun, Kotaro Aoki, Masachika Senba, Corazon C. Buerano, Kenji Shirai, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita and Daisuke Hayasaka: TNF- α and IL-10 reduce the incidence of mortality in mice infected with Tick-borne encephalitis virus: The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Nara (2014, 9)
- 45) 早坂大輔, 余福勲, 吉川亮, 嶋田聡, Guillermo Posadas Herrera, Mya Myat Ngwe Tun, 吾郷昌信, 森田公一: 長崎県における野生動物およびマダニの SFTS ウイルス感染状況の調査: 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014, 11)
- 46) Inoue S. Epidemiology and control strategy of rabies. Regional training on rabies. OIE regional representation for Asia and the Pacific. 5-8 Aug, 2014. Tokyo/Yokohama, Japan.
- 47) Inoue S. Enhancing laboratory network. Regional training on rabies. OIE regional representation for Asia and the Pacific. 5-8 Aug, 2014. Tokyo/Yokohama, Japan.
- 48) Inoue S. Rabies outbreak in wild ferret-badgers in Taiwan. Group Exchange 2014 with S.Korea and Taiwan in Tokyo. 27 Aug, 2014. NIID. Tokyo, Japan.
- 49) Inoue S. Coordinated Validation and Value

- of RFFIT / Rabies Guideline for Survey of Wildlife in Japan. Seminar. 24 Sep, 2014. Research & Diagnostic Center, Taiwan CDC. Taipei, Taiwan.
- 50) Inoue S. Rabies Guideline for Survey of Wildlife in Japan. AHRI Seminar. 25 Sep, 2014. Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan. New Taipei City, Taiwan.
- 51) Inoue S. Coordinated Validation and Value of RFFIT. AHRI Seminar. 25 Sep, 2014. Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan. New Taipei City, Taiwan.
- 52) Inoue S. Can Thailand be a rabies free country by 2020? Learning from rabies management in Japan. Lesson from a current rabies outbreak in Taiwan, a rabies free country. Tokyo-Chiang Mai World Rabies Day Conference. 13 Oct, 2014. Lanna Dog Welfare/World Animal Protection. Chiang Mai, Thailand.
- 53) Inoue S. Can Thailand be a rabies free country by 2020? Learning from rabies management in Japan. Lesson from a current rabies outbreak in Taiwan, a rabies free country. Tokyo-Chiang Mai World Rabies Day Conference. 14 Oct, 2014. Room 153, 15th Floor meeting room of Sujino Building, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. Chiang Mai, Thailand.
- 54) 井上 智. 台湾における狂犬病の疫学と我が国における診断能力向上の取り組み. 狂犬病の疫学とその対策-獣疫学が社会に果たす役割. 第39回獣疫学会学術集会. 2014年4月5日, 獣疫学会、東京大学・中島薫一郎記念ホール, 東京都
- 55) 井上 智. 動物由来感染症. 平成25年度JICA 集団研修「獣医技術研究 (Research on Veterinary Technology) J. 2014年4月8日, 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所, つくば, 茨城県
- 56) 井上 智. 狂犬病の現状と日本の取組み (台湾での狂犬病の発生を受けて). 平成26年度大分県狂犬病予防研修会. 2014年5月30日, 大分県生活環境部食品安全・衛生課, 大分市, 大分県
- 57) 井上 智. 台湾で発生した狂犬病と野生動物対策の意義. 日本獣医生命科学大学特別講義. 2014年6月11日, 日本獣医生命科学大学C-501講義室, 武蔵野市, 東京都
- 58) 井上 智. 動物由来感染症(狂犬病等)と公衆衛生について. 岩手大学農学部・人獣共通感染症学講義. 2014年6月17日, 岩手大学, 盛岡市, 岩手県
- 59) 井上 智. ウイルス: 狂犬病(犬), シンポジウム I: 身近に存在する人と動物の共通感染症 (Zoonoses within our Living environment). 第3回神戸アニマルケア国際会議 2014 (The 3rd International Conference on Animal Care in Kobe 2014 - For the future of people and other animals). 2014年7月19日, 神戸ポートピアホテル, 神戸市, 兵庫県
- 60) 井上 智. 世界に広がる狂犬病. 第7回世界狂犬病デー (2014 in TOKYO). 2014年9月28日, アリミノホール, 新宿区, 東京都
- 61) 井上 智. 家畜動物における狂犬病: 獣医師の役割. 家畜衛生講習会 (獣疫学特殊講習会). 2014年10月6日, 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所, つくば市, 茨城県
- 62) 井上 智. 我が国における狂犬病対策の現状と課題. 狂犬病の現状と対策: 人と動物の共通感染症を考える. 日本医師会・日本獣医師会 連携シンポジウム. 2014年10月28日, 日本医師会・日本獣医師会, 日比谷公会堂, 東京都
- 63) 井上 智. 台湾の狂犬病について. 平成26年度市町村狂犬病予防担当課長会議及び

- 狂犬病予防研修会. 2014年10月31日, 京都府健康福祉部生活衛生課, 京都府福利厚生センター第3会議室(京都府庁内), 京都府
- 64) 井上 智. 台湾の狂犬病事例を踏まえた狂犬病対策と必要な調査研究について. 今、狂犬病を考える. 第4回 鹿児島大学共同獣医学部付属越境性動物疾病制御研究(TDA)センター市民公開講座. 2014年11月4日, 鹿児島大学共同獣医学部付属TADセンター, 鹿児島大学農・獣医共通棟101号室, 鹿児島市, 鹿児島県
- 65) 井上 智. 人と動物の共通感染症としての狂犬病対策における課題と対応策について. 平成26年度福岡県共通感染症対策訓練. 2014年11月26日, 保健医療介護部保健衛生課, 福岡県獣医畜産会館, 福岡県
- 66) 井上 智. 狂犬病発生の現状と今後の課題、対策等. 平成26年度山口県獣医公衆衛生講習会. 2014年11月30日, 山口県獣医師会, 山口市小郡ふれあいセンター, 山口県
- 67) 井上 智. 狂犬病の発生状況について. 九州地区狂犬病診断研修会. 2014年12月3-5日, 宮崎大学人獣共通感染症教育・研究プロジェクト, 宮崎大学, 宮崎県
- 68) 井上 智. 地域における危機管理対応について. 九州地区狂犬病診断研修会. 2014年12月3-5日, 宮崎大学人獣共通感染症教育・研究プロジェクト, 宮崎大学, 宮崎県
- 69) 井上 智. 我が国における狂犬病対策の現状と課題. 平成26年度狂犬病予防及び動物愛護管理研修会. 2014年12月11日, 三重県健康福祉部食品安全課生活衛生班. 津市, 三重県
- 70) 井上 智. 特別講義: 多様な獣医師の職務. 獣医師と公衆衛生. 2015年1月9日, 東京農工大学・共同獣医学科, 農学部キャンパス, 東京都
- 71) 井上 智. 狂犬病の現状と対策. 2015年1月16日, 平成26年度健康科学研究センター研修会, 保健科学科課, さいたま市, 埼玉県
- 72) Nakagawa K, Ito N, Okada K, Okadera K, Mitake H, Sugiyama M, Generation and characterization of L gene-deficient rabies virus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases, Taipei, Taiwan (2015. 1)
- 73) 動物由来感染症について. 平成26年度全国動物関係事業所協議会関東甲信越静岡ブロック会研修会, 千葉, 2014
- 74) 木村昌伸, 宇根有美, 鈴木道雄, 森川茂, 今岡浩一. 無尾類に由来するブルセラ属菌の分離と解析. 第157回日本獣医学会学術集会, 札幌, 2014
- 75) 今岡浩一. 身近な愛玩動物から感染する動物由来感染症について. 平成26年度動物由来感染症研修会(栃木県), 宇都宮, 2014
- 76) 木村昌伸, 宇根有美, 朴ウンシル, 鈴木道雄, 森川茂, 今岡浩一. 無尾類(カエル)に由来するブルセラ属菌の分離と解析. 第13回(爬虫類・両生類の臨床と病理のための研究会)ワークショップ, 相模原, 2014
- 77) 佐藤真伍, 武野侍那子, 壁谷英則, 大橋正孝, 大竹正剛, 丸山総一. わが国の鹿における Bartonella のベクターの検討. 第22回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー, 大分県太宰府館まほろばホール, 2014年7月6日
- 78) 佐藤真伍, 壁谷英則, 吉野愛香, 関根 渉, 鈴木和男, 東 英生, 櫛引道彦, 山崎翔気, 玉手英利, 丸山総一. わが国の野生ニホンザルに分布する Bartonella quintana とその遺伝的多様性. 第157回日本獣医学会学術集会, 北海道大学, 2014年9月9日
- 79) 新川洋平, 長谷川瑞貴, 永田絵美, Vo Thi Minh Tam, Nguyen Khanh Thuan, Ly Thi Lien Khai, 谷口隆秀, 林谷秀樹, 東南アジアおよび沖縄県におけるヤモリ由来 *Salmonella* Weltevreden の分子遺伝子型別. 第43回獣疫学会学術集会, 2015年3月,

東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

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

ダニ媒介性脳炎の疫学と診断法開発

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

研究要旨:ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)はヒトに重篤な脳炎を引き起こす、人獣共通感染症の原因ウイルスである。日本では北海道南部において患者が発生し、またユーラシア大陸広域において、ロシアを中心に年間数千人の患者発生が報告されている。モンゴルでは1980年代からTBEVの流行が報告され、近年患者数の増加が見られているが、詳細な流行状況は不明であった。そこで本研究ではモンゴル北部におけるダニ媒介性脳炎の分布状況を調査するために、生息しているマダニからのウイルスの分離を試みた。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。これらの成績から、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、今後は流行株の病原性等の生物性状を調べることにより、疫学的危険度を評価していくことが重要であると考えられる。

A. 研究目的

ダニ媒介性脳炎(Tick-borne encephalitis: TBE)ウイルスは、フラビウイルス科フラビウイルス属に属し、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の原因ウイルスとして知られ、ヒトに致命的な脳炎を引き起こす。

日本では1993年北海道上磯町(現北斗市)において初めてTBE患者が発生し、その後の疫学調査により患者発生地域にTBEウイルスの流行巣が存在することを明らかにしてきた。

これまでの所、新たなTBE患者は発生していない。しかし我々は北海道を中心に継続的な血清疫学調査を行うことによって、道南地域には現在まで10年以上にわたってウイルスの流行巣が

存続している事を明らかにしてきた。さらに近隣の北東アジア諸国においては、TBE患者は依然多数発生が報告されており、ヒトや野生動物の移動により日本に侵入・流行する可能性も存在しているため、今後も日本を含め、近隣諸国において疫学調査を続ける必要性がある。

モンゴルでは1980年代からTBEVの流行が報告され、近年患者数の増加が見られている。しかし、現地においてTBEに対する診断体制が確立していないことから、その疫学状況ほとんど不明である。過去の研究でもモンゴルにおいてTBEVを分離したという報告はほとんどないため、流行ウイルスの病原性などに関する情報はほとんど解析されていないのが現状である。

そこで本研究では、モンゴルにおけるTBEの疫学的危険度を評価するために、生息しているマダニからの流行TBEVの分離及び、その性状解析を試みた。

B. 研究方法

1) マダニの捕集及びウイルス分離

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(図1)。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砕し、破砕液の上清を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、抗ダニ媒介性フラビウイルス特異的抗体を用いた細胞内における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。

2) 分離ウイルスの遺伝子解析

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(forward: 5'-GGTYATGGARGTYRCRTTCTCTCG-3', reverse: 5'-TCCCAGGCGTGYTCTCCKATCACTGT-3')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。

C. 研究結果

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(図2)。

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(図3)。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(表1)。

D. 考察

研究結果より、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。ヒトのTBE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、鉄道などの交通手段を通じて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の属しており、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。

E. 結論

本年度の研究成果により、モンゴルにおいて TBE の流行を引き起こしていると考えられるシベリア型 TBEV を生息しているマダニから分離した。今後は分離した TBEV の病原性等の解析を行うとともに、さらに同国における疫学調査を進めることによって流行ウイルスの疫学的危険度を評価していく予定である。

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

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) 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).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) 中尾亮, 梶原将大, 邱永晋, 森垂紀奈, 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).
- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) 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).
- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) 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).
- 19) 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).
- 20) 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).
- 21) 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).
- 22) 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).
- 23) 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).
- 24) 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).
- 25) 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).
- 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. 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).
- 27) 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).
- 28) 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).
- 29) 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).
- 30) 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おける NS5 蛋白の影響の解析. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
- 31) 下田宙, 早坂大輔, 好井健太郎, 米満研三, 寺田豊, 野口慧多, 鋤田龍星, 高野愛, 前田健. 山口県のイノシシからダニ媒介性脳炎ウイルス様遺伝子の検出. 第 20 回 トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 兵庫県神戸市. (2013, 11)
- 32) 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 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 33) 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 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 34) 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 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 35) 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 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

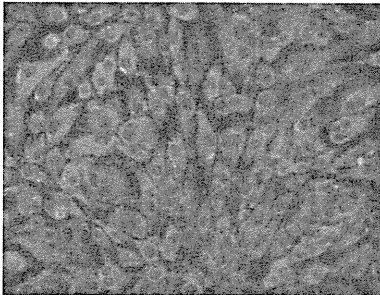
図1. モンゴルにおける調査地域



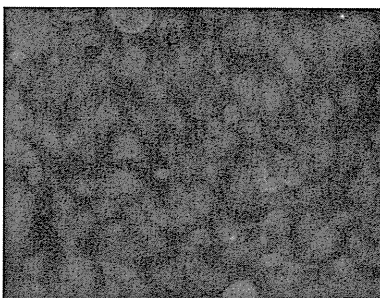
図2. マダニ乳剤接種細胞からの TBEV 特異的抗原の検出(A)及び特異的遺伝子の増幅(C)。

Bは陰性対象

A



B



C

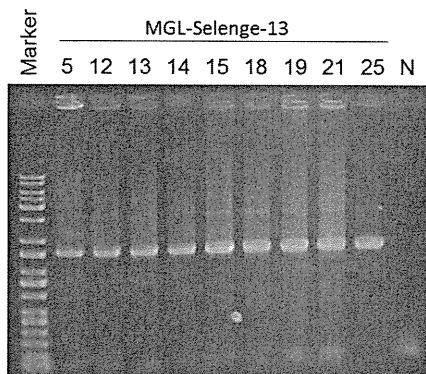


図3. 分離 TBEV の E 蛋白領域遺伝子を元にした系統樹解析

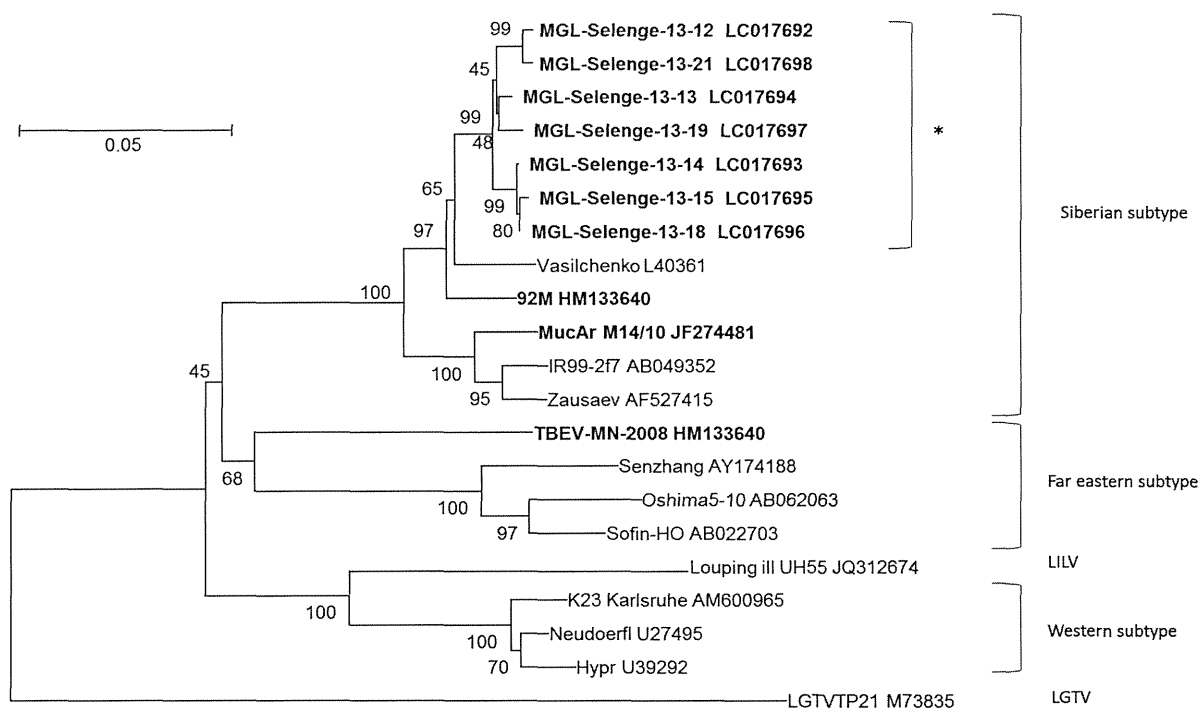


表1. E 蛋白領域の遺伝子及びアミノ酸配列の比較

Nucleotide	Amino acid				
	MGL-Selenge-13-12	MGL-Selenge-13-12	MucAr M14/10	92M	IR99 2f7
MGL-Selenge-13-12		99.2% (492/496 aa)	99.2% (492/496 aa)	98.8% (493/496aa)	99.0% (491/496 aa)
MGL-Selenge-13-12	98.2% (1462/1488 bp)		99.2% (492/496 aa)	99.0% (491/496 aa)	99.0% (491/496 aa)
MucAr M14/10	94.6% (1407/1488 bp)	93.9% (1397/1488 bp)		99.6% (494/496aa)	99.8% (495/496aa)
92M	96.2% (1431/1488bp)	96.2% (1432/1488bp)	94.6% (1407/1488bp)		99.3% (493/496aa)
IR99 2f7	94.2% (1401/1488 bp)	93.8% (1395/1488 bp)	97.0% (1439/1488bp)	94.6% (1407/1488bp)	

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）

分担研究報告書

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

マダニ類からのウイルス由来遺伝子の検出

研究分担者：早坂大輔

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野 助教

研究要旨：本研究は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を把握することを目的とし、マダニ媒介性ウイルス遺伝子検出法の確立、および各地域で採集されるマダニからのウイルス遺伝子検出を行うことを目的とする。本年度は、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。また、確立した本法により、ベトナムで採集されたマダニから HSK virus 遺伝子検出を試みたところ、これまでに陽性例は検出されていない。この新規ウイルスについては、ヒトや動物への病原性は未知であるが、マウスや培養細胞に感染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、今回確立された遺伝子検出系を用いて、国内およびインドシナ地域におけるマダニ、動物およびヒト血清を用いた調査を行う予定である。

A. 研究目的

マダニ媒介性ウイルスには、ダニ媒介性脳炎 (TBE) や重症熱性白血球減少症候群 (SFTS)、クリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) など、人や動物の重篤な感染症の原因となるウイルスが知られている。

日本においては、北海道南部に分布するヤマトマダニからダニ媒介性脳炎 (TBE) ウイルス (TBEV) が確認されている。また、西日本各地で SFTS 患者が報告され、患者や動物に吸着していたマダニから SFTS ウイルス (SFTSV) が分離され、さらに、全国的な地域で植生上から採集

されたマダニから SFTSV 遺伝子検出の報告がされている。また、CCHF はアフリカ大陸、東欧、中近東、中央アジア諸国から中国西部にかけて広く分布しており、人や動物の移動に伴う国内への侵入が危惧されている。

さらに、最近世界各地で新しいマダニ由来ウイルス (ブニヤウイルス科、フラビウイルス科やレオウイルス科に分類) が報告されている。我々は、国内 (徳島県、長崎県) で採集されたマダニから、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される新規のウイルス HSK ウイルス (仮名、HSKV) を分離した。このウイルスは、

マウスや培養細胞への感染実験により、哺乳動物やヒトへの感染の可能性が考えられる。

そこで本研究では、国内および周辺諸国における HSKV 分布状況を把握するために、ウイルス遺伝子検出法の確立、およびマダニからのウイルス遺伝子検出を目的とした。本研究成果によりマダニ媒介性ウイルス感染症の予防に関して重要な情報を提供することが期待される。

B. 研究方法

1) 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。

2) 2013–2014 年にベトナム（カトバ島）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。

（倫理面への配慮）

特になし。

C. 研究結果

1) 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（図 1）。

2) 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。

D. 考察

1) HSKV 遺伝子 を 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。

また、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。今回確立した遺伝子検出系により、感染マウス臓器から定量的にウイルス遺伝子検出ができることを確認しており、この方法には迅速診断系としても有用である。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。

E. 結論

本研究成果に新規ブニヤウイルス HSKV の遺伝子検出法を確立し、マダニからのウイルス検出法の準備が整った。今後、国内・インドシナ地域を含む周辺諸国に分布するマダニを用いて HSKV 遺伝子検出調査を行う予定である。

H. 健康危険情報

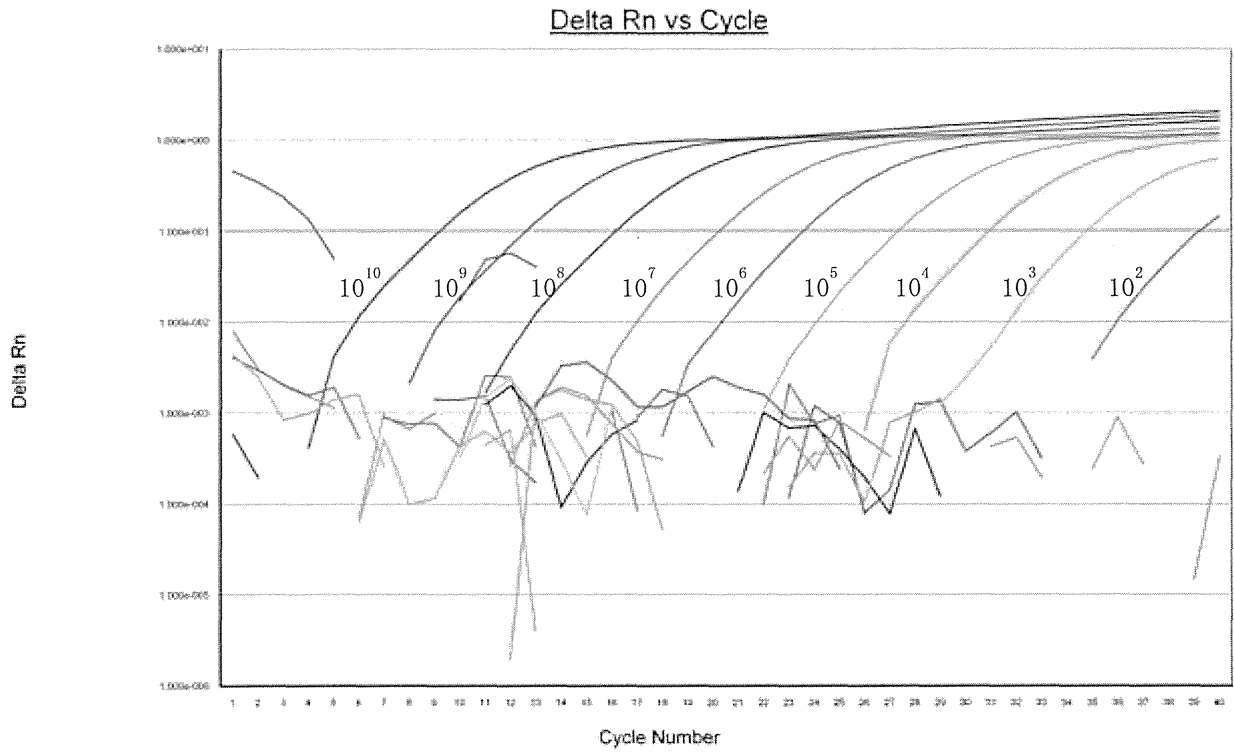
なし

I. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
2. 学会発表
- 1) Mya Myat Ngwe Tun, 青木康太郎、千馬正敬、森田公一、早坂大輔 : ダニ媒介性脳炎ウイルス感染における TNF- α 、IL-10 および IL-2 応答の役割 : 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、山口 (2014, 9)
- 2) 早坂大輔 : SFTS ウイルスについてこれまでわかったこと : 第 22 回 Seminar on Acari-Disease Interface、太宰府 (2014, 7)
- 3) 黒崎陽平、中前小百合、早坂大輔、安田二郎 : 新規ナイロウイルス遺伝子検出法の開発 : 第 51 回ウイルス学会九州支部総会、鹿児島 (2014, 9)
- 4) 早坂大輔、嶋田聡、Guillermo Posadas Herrera、森田公一 : 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス感染マウスモデルを用いた抗血清および薬剤効果の検討 : 第 51 回ウイルス学会九州支部総会、鹿児島 (2014, 9)
- 5) 早坂大輔、嶋田聡、青木康太郎、森田公一 : 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス遺伝子検出法の確立と長崎県における媒介マダニ調査 : 第 157 回日本獣医学会学術集会、札幌 (2014, 9)
- 6) Mya Myat Ngwe Tun, Kotaro Aoki, Masachika Senba, Corazon C. Buerano, Kenji Shirai, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita and Daisuke Hayasaka : TNF- α and IL-10 reduce the incidence of mortality in mice infected with Tick-borne encephalitis virus : The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Nara (2014, 9)
- 7) 早坂大輔、余福勲、吉川亮、嶋田聡、Guillermo Posadas Herrera、Mya Myat Ngwe Tun, 吾郷昌信、森田公一 : 長崎県における野生動物およびマダニの SFTS ウイルス感染状況の調査 : 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜 (2014, 11)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図 1 real-time RT-PCR を用いた HSKV M セグメント遺伝子検出



厚生科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

近隣地域からの侵入が危惧される我が国にない感染症の発生予防に関する研究

ハンタウイルス感染症に関する研究

分担研究者 有川 二郎 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨: 近隣地域からの感染げっ歯類を介して侵入が危惧される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た。自然宿主げっ歯類の種の違いによる二次抗体の交差反応性の相違を考慮し、昨年度の研究で有用性が確認された Protein A を用いた ICG を検討した。

A. 研究目的

ハンタウイルスは、げっ歯類媒介性の人獣共通感染症である、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因ウイルスである。ハンタウイルスのうち、Hantaan (HTNV)、Seoul (SEOV)、Dobrava (DOBV)Thailand (THAIV)および Puumala (PUUV)ウイルスは HFRS の原因となる。また SinNombre virus を始めとするアメリカネズミ亜科のげっ歯類によって媒介されるハンタウイルスは HPS の原因となる。HTNV および SEOV および THAIV および DOBV はネズミ亜科のげっ歯類、そして PUUV はハタネズミ亜科のげっ歯類によって媒介される。これらの他に翼種目およびトガリネズミ目に属するほ乳類によって保有されている病原性不明のハンタウイルスがみついている。これらのハンタウイルス群のウイルスは互いに

抗原性が大きく相違し交差反応性が低いことから、病原性ハンタウイルス感染症の血清診断を行うためには少なくとも3種類の血清型の抗原が必要である。我国には SEOV および PUUV が存在することが明かとなっているが、ロシア、中国、韓国、東南アジア諸国には HTNV, SEOV, THAIV があり、また北米・南米諸国からの輸入症例、げっ歯類の積み荷への混入等についても注意を払う必要がある。またトガリネズミ目のハンタウイルスに関しては近隣諸国からの報告が相次いでおり、病原性との関連も含め今後も監視を進める必要がある。本研究では HFRS および HPS の原因ウイルスを保有する宿主げっ歯類が日本に侵入した場合を想定し、これを迅速に診断するための手段を確立することを目的として、げっ歯類を対象とした多項目同時検出用イムノクロマトグラフィー(Multiplex ICG) の開発を試みる。

今年度は昨年度までの研究で広い結合特性を持つことが明らかとなった Protein A を検出試薬として ICG の検討を進めた。Protein A は生理的条件下ではラットおよびマウスの IgG に対しては結合が弱い、ヤチネズミ、ハタネズミ、トガリネズミ類の IgG に特異的に結合することが明らかとなっている。ラット類についての ICG の開発は抗ラット IgG 抗体を検出試薬としてすでに報告している。今年度はラット類以外を対照とする検出系の確立を目的として ICG の検討を進めた、

B. 研究方法

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、抗原として PUUV を使用した。抗原性の強いウイルス構成タンパクとして核タンパク(N)の N 末端部位 103 アミノ酸を抗原として選択し大腸菌ベクターを用いて作成した。さらに、それぞれの宿主の免疫グロブリンを検出するために、Protein A を用いた最適なストリップを作成することを試みた。

Protein A は 3 社からサンプルをとりよせ比較検討した。また、金コロイド標識 (Winered chemical 社)、パラジウムコロイド標識(Winered chemical 社)を検討した。PUUV をマウスに接種した実験感染抗血清あるいは北海道のハンタウイルス自然感染を用いて ICG ストリップの作成と評価を行った。

C. 研究結果

1.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強やや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。

D. 考察

昨年度までは Multiplex ICG をヒト患者血清を用いて検討することにより、抗原側の多様性に対処することが可能となった。今年度は Protein A を用いることによって、宿主側の多様性に対応する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 *Sorex* 属の動物、南方に棲息する住家性の *Suncus murinus* に有効であることが確認されている。*Sorex* 属に属するトガリネズミは世界各地でハンタウイルスを保有しており、このウイルスのヒトへの病原性は明らかでないものの、これらの新規ハンタウイルスの病原性について監視を続けることが必要である。本研究では Protein A を用いて上記の範囲の小動物を簡便にモニタリングすることが可能となった。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。また *Sorex* 属の動物が保有する Seewis ウイルス抗原の準備も今後必要となると考えられる。

E. 結論

ハンタウイルスの病原性については未だほとんど明らかになっていない。ハンタウイルス感染症を制御するためには、疫学的な解析をより効率よく行い、さらに病原性解析のためのツールをより多く持つことが必要となる。本研究では Multiplex ICG を用いてウイルス宿主のスクリーニング効率を大幅に上昇させ、さらにマウスモデルを用いた病原性の解析を進めることで、近隣諸国から侵入するおそれのあるハンタウイルス感染症対策を進める。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし