

2. 実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし

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

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

—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—

分担研究者: 永田典代(国立感染症研究所 感染病理部第二室 室長)

研究要旨: 昨年度に引き続き、Saasa らが作出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 (Saasa *et al.*, 2012) と1つの市販抗体のパラフィン包埋組織切片を用いた免疫組織化学法における有用性を検討した。今年度は、鑑別診断に必要な、同科の SFTS ウイルス、重症肺炎を引き起こす SARS コロナウイルスとの交差反応性を検索した。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、特異的にパラフィン包埋組織上のハンタウイルス抗原の検出が可能なが判明した。

A. 研究目的

ブニヤウイルス科ハンタウイルス属は急性呼吸器感染症のハンタウイルス肺症候群あるいは熱性・腎性疾患の腎症候性出血熱を引き起こす。これらはいずれも4類感染症に分類され、診断が確定した場合には、感染症法に基づき直ちに届出を行わなければならない。感染症死亡例が発生した場合には、病理解剖で得られる組織における病原体の検出によって病理学的診断が可能となる。本研究では、ハンタウイルス感染症の病理学的診断系の確立を目的とする。昨年度は、パラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学法に有用な抗ハンタウイルス抗体を選択した。今年度は、これらの抗体の本法における特異性を検討する。

B. 研究方法

1) 抗ハンタウイルス抗体

いずれもハンタウイルスのヌクレオカプシドタンパクに対する抗体で、Saasa らが作出し、すでにホルマリン固定パラフィン包埋組織上の抗原検出が可能であることが判明した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)と1つの市販モノクローナル抗体 A1C5、対照としてハイブリドーマ細胞上清由来のモノクローナル抗体 E5G6 (Okumura *et al.*, *Clin. Vaccine Immunol.* 2007 14:173-181)およびウサギポリクローナル抗体 NP700 を用いた。

2) ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本

本研究には、すでに作出してあった次の10%ホルマリン緩衝液固定パラフィン包埋切片を使用した; 病理番号090641、プーマラウイルス感染ハムスター肺組織 (Sanada T *et al.*, *Virus Res.* 2011.

160:108-119) ; 病理番号070370-71、SARSコロナウイルス感染マウス組織、病理番号130832-33、SFTSウイルス感染マウス組織。

3) 免疫組織化学法

ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を脱パラフィン後、ポリマー法による免疫組織化学により抗ハンタウイルス抗体の有用性を評価した。一次抗体として用いた抗ハンタウイルスモノクローナルあるいはポリクローナル抗体(苅和代表研究者より分与)は表に示した。抗原賦活化のために、抗原賦活化剤(pH6.0)(ニチレイ マウスステインキット)中で121°C20分オートクレーブ処理を行った。また、過酸化水素水・メタノールによる内因性ペルオキシダーゼの阻止を室温30分で行った。1次抗体(1 µg/mlに調整)の反応は4°Cで一晩インキュベートとした。その後、マウスステインキット(ニチレイ)を用いてプロトコール通り免疫染色を実施し、ペルオキシダーゼ発色基質としてジアミノベンジジン、核染色にはマイヤーのヘマトキシリンを使用した。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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。今年度は、鑑別診断が必要である同じ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コロナウイルス等との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には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。

E. 結論

Saasaらが作出した3つの抗ハンタウイルス抗体はホルマリン固定パラフィン組織切片を用いた免疫組織化学法においてハンタウイルスとプーマウイルス抗原を特異的に検出することが可能である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

表 免疫組織化学法による抗体の有用性の検討結果

整理 番号	動物 種	一次抗体	使用標本				
			ハムスター 正常組織	ハムスタ — Puumala virus 感染	マウス Hantaan virus 感染	マウス SFTS ウイ ルス感染	マウス SARS コロ ナウイルス 感染
1	マウス	E5/G6	-	+	+	-	-
2	マウス	A1C5 (市販 抗体)	-	+	-	-	-
3	マウス	G884	-	-	-	NE	NE
4	マウス	7E6	-	+	+	-	-
5	マウス	2F11	*	*	*	NE	NE
6	マウス	10G5	-	-	-	NE	NE
7	マウス	9E5	-	-	-	NE	NE
8	マウス	2H10	-	+	+	-	-
9	ウサギ	NP700	*	*	*	-/*	-/*

*抗原は検出可能だが、非特異反応が強く、判定が困難な場合がある。-/＊好中球、細気管支上皮の核が非特異的に陽性所見を示した。NE, 未実施

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わが国にない感染症の発生予防に関する研究

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

研究分担者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・部長
研究協力者	須田遊人	国立感染症研究所ウイルス第一部・協力研究員
	谷英樹	国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
	福士秀悦	国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
	下島昌幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・第一室長
	唐青	中国 CDC・教授

研究要旨

クリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) 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, RNA ポリメラーゼを発現する. 今年度は, 私たちが決定した遺伝子情報を含めて最新のデータをもとに, これらの遺伝子の塩基配列が決定されている CCHFV 株の塩基配列に基づく分子疫学 (系統樹解析) を明らかにした. S-遺伝子に基づく解析によると, 中国株はほぼ1つのクラスターを形成するのに対して, M-遺伝子による解析では中国株はその他の地域で分離されるウイルスと同じクラスターを形成し, 地域特異性は認められなかった. ただし, S-遺伝子による解析により, 解析に供した61株中1株はオマーンで分離された株と同じクラスターを形成した. また, L-遺伝子の塩基配列に基づく解析によると, CCHFV 中国株は中近東で分離されたウイルス, タジキスタンとパキスタンで分離されたウイルス, そして, オマーンで分離されたウイルスと同じクラスターを形成するものがあり, M-遺伝子による解析結果と同様, 地域特異性はなかった. CCHF は日本では流行していないが, 輸入感染症として発生する危険性がある. 特に中国西部では毎年流行が確認されている. 本研究により CCHFV の分子疫学の最新情報が明らかにされた.

A. 研究目的

クリミア・コンゴ出血熱
(Crimean-Congo hemorrhagic fever,
CCHF) は CCHF ウイルス (CCHFV)

による感染症で, アフリカ～中東～ロシア・中国西部 (新疆ウイグル自治区) を含むアジアに幅広く発生が認められる. CCHFV は3分節の陰性側鎖の一

本鎖 RNA (S-, M-, L-遺伝子) を有する。S-, M-, L-遺伝子は、それぞれ核蛋白質、膜蛋白質、RNA ポリメラーゼを発現する。現在日本においてこの感染症の発生は認められていないが、発生の危険度を予測する方法として国内や近隣国における CCHF の発生状況を監視するとともに、もし日本で CCHF 患者が発生した場合に備えて、近隣国の CCHFV 分離株を含む CCHFV の分子疫学を明らかにすることが重要である。

本研究では、これまで私たちが決定した中国株の CCHFV の遺伝子の塩基配列および National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) に CCHFV の遺伝子塩基配列が決定されているが登録されているウイルスの情報 (最新情報) に基づいて、世界各地で分離されている CCHFV の分子疫学を明らかにした。

B. 研究方法

- 1) CCHFV の各遺伝子の塩基配列の入手。CCHFV の各遺伝子の全塩基配列が登録されている CCHFV の情報 (分離された国・地域) およびその塩基配列を 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。尚、CCHFV 中国株の一部の塩基配列は私たちが決定し、NCBI に登録したものである。
- 2) 系統樹解析。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。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

- 1) S-遺伝子塩基配列による系統樹解析
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 株の除く 38 株は 1 つのクラスターを形成している。中国分離株のほとんどは、S-遺伝子塩基配列に基づく解析により、同一のクラスターを形成することが明らかになった (図 1)。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 (Fub90009) が存在した。
- 2) M-遺伝子塩基配列による系統樹解析
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している。地域特異性が認められないことが明らかとなった (図 2)。
- 3) L-遺伝子塩基配列による系統樹解析
L-遺伝子塩基配列による解析によると、L-遺伝子は 3 つの遺伝子型に分類され、中国株はそのうちの 2 つの遺伝子型に分類されることが明らかにされた。タジキスタン (TADJ/HU8966) で分離された株と同一クラスターを形成するものと、オマーン (Oman)

およびパキスタン (Matin) での分離株と同一クラスターを形成するものがある (図 3) .

D. 考察

これまで私たちは中国新疆ウイグル自治区で発生した CCHF 患者や患者発生地域のマダニから増幅された CCHFV 遺伝子を増幅し、その情報を基に分子疫学を明らかにしてきた。特に S-遺伝子の塩基配列情報が蓄積されつつある。今回、NCBI に登録されている CCHFV の 3 分節の塩基配列を基に系統樹解析を実施した。

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)、パキスタンで流行が報告され、特記すべきこととして、インドでも患者発生 (CCHF 流行) が報告されている。今回の研究成績は、CCHF 患者の CCHFV 感染地域を特定するためには、S-遺伝子の塩基配列には地域特異性があることからそれをを用いるとよいことが明らかにされた。

S-遺伝子には地域特異性があり、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。

E. 結論

CCHFV 中国分離株に焦点をあてて、

CCHFV の 3 分節塩基配列をもとに分子疫学を明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 須田遊人, 谷英樹, 西條政幸, 堀本泰介, 下島昌幸. シュードタイプウイルスを利用したクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの株間での中和反応の比較. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 2014 年 9 月, 札幌

2) 須田遊人, 谷英樹, 西條政幸, 堀本泰介, 下島昌幸. クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの株間でのシュードタイプウイルスを利用した抗体への反応性の比較. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜

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

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

S 330-529 (complete sequence)

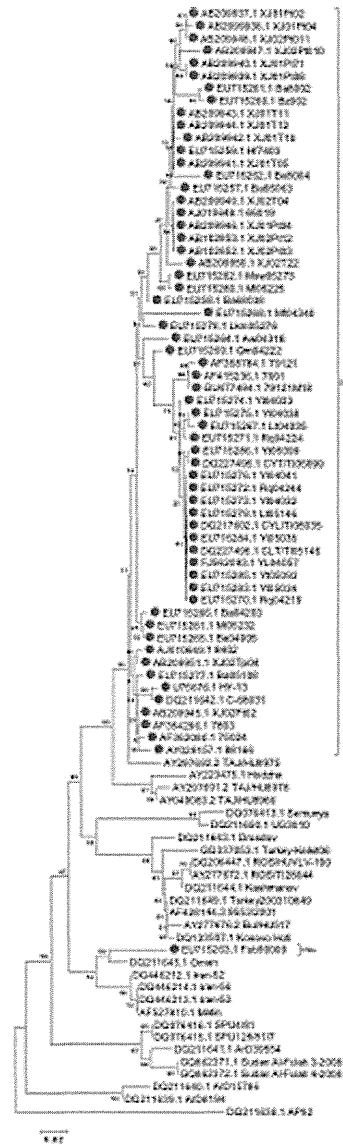


図 1. CCHFV の S-遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析。

M 3962-4385 (complete sequence)

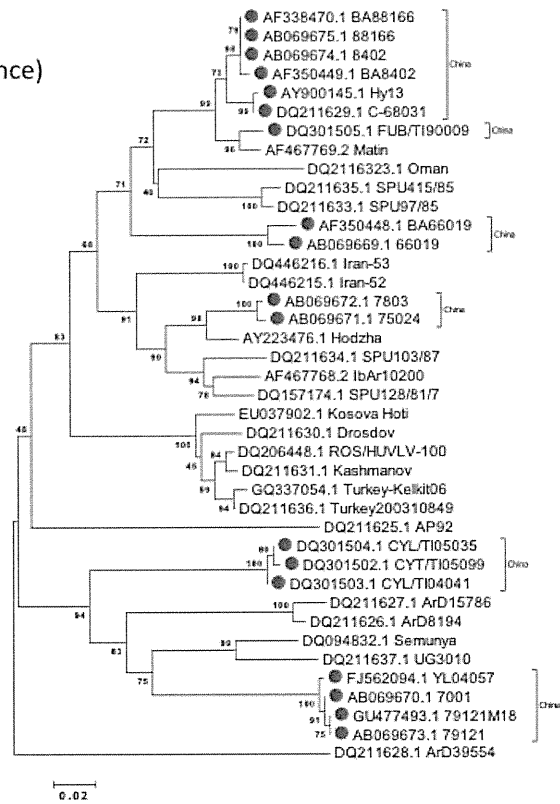


図 2. CCHFV の M-遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析.

L orf

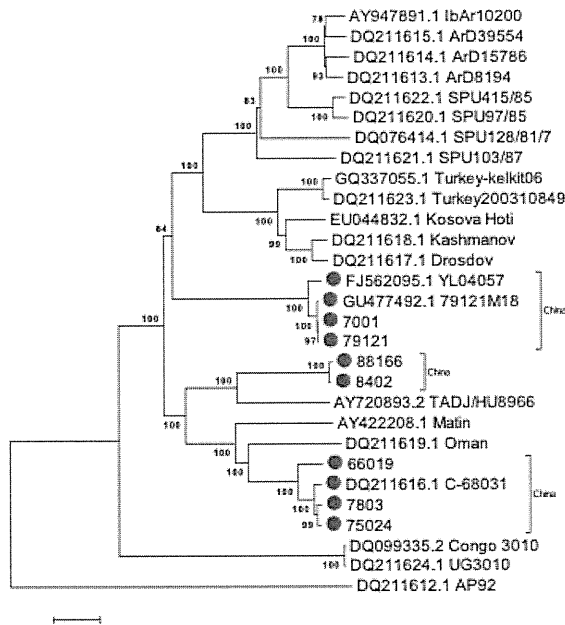


図 3. CCHFV の L-遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析.

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

（H25-新興-一般-007）

狂犬病等の疫学に関する研究

研究分担者	井上 智	国立感染症研究所・獣医科学部
研究協力者	河合久仁子	宮城教育大学環境教育実践研究センター
	押田龍夫	帯広畜産大学・野生動物学研究室
	八木欣平	北海道立衛生研究所・感染症部
	森嶋康之	国立感染症研究所・寄生動物部
	野口 章	国立感染症研究所・獣医科学部

研究要旨：本研究は、ユーラシア大陸を中心とした動物の狂犬病（リッサウイルス感染症を含む）等について疫学に関する情報の収集、調査、流行様式の解明、新規検出法開発等を行うことによって、わが国への侵入可能性や発生予測・被害推計などを可能にすることが目的である。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。そこで、国後島の野生動物生息状況と公衆衛生に係る地域住民の意識調査等を行うとともに、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も調べた。国後島では動物由来感染症の実態調査はこれまでに行われておらず、ヒトおよび動物での発生状況等について正確な情報が無いことが明らかとなった。また、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、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り、本調査を継続することによって発生予測・被害推計などが可能になると考えられた。

A. 研究目的

本研究は、ユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病（リッサウイルス感染症を含む）等について疫学に関する情報の収集、

調査、流行様式の解明、新規検出法開発等を行うことによって、わが国への侵入可能性や発生予測・被害推計などを可能にすることが目的である。

狂犬病はニュージーランド、オーストラリア、ハワイ、英国、日本などを除く世界のほぼ全域で流行しており、アジア、アフリカを中心に年間で少なくとも5万～7万人を超える死亡例があると推計されており、ヒトを含むほぼすべての哺乳類に致死的な脳炎を起こす狂犬病ウイルス(ラブドウイルス科リッサウイルス属)を原因とするウイルス性動物由来感染症である。

わが国では、1970年と2006年に経験したヒトの輸入狂犬病3症例を除くと、50年以上に渡って国内に生息している動物で狂犬病の報告はない。しかしながら、近年、シベリアに生息しているコウモリから新種のリッサウイルスが発見されて、北海道に生息しているコウモリのウイルス保有状況について関心が高まっている。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。

そこで、「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）」に同行して、国後島の野生動物生息状況と公衆衛生に係る地域住民の意識調査等を行い、国後島から海域を越えて狂犬病等の動物由来感染症が北海道に侵入する可能性について調べた。

B. 研究方法

「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）」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。

■ 訪問計画の概要（参考資料1）

- ・訪問期間：平成26年7月24日-28日
- ・訪問団：7名（専門家4名と同行者3名）
- ・交通手段：四島交流等事業使用船舶「えとぴりか」北方領土問題対策協会の主催する四島交流事業船舶に同乗。
- ・旅行経路：根室港－国後島（古釜布）－根室港
- ・宿泊地：友好の家

※参考資料1：訪問計画書。

■ 専門家レクチャーによる情報交換

- ・7月25日 16:00-19:00
- 野生動物と人間のかかわりかたを考える
 - 1) 滑空する動物の進化
帯広畜産大学・押田龍夫
 - 2) 北海道、国後島、択捉島のコウモリの話
宮城教育大学・河合久仁子（資料2A）
 - 3) 狂犬病 Rabies
国立感染研究所・井上智（資料2B）
 - 4) エキノコックス症 Echinococcosis
国立感染研究所・井上智（資料2C）

※ 資料2A、2B、2C：レクチャーに使用した

スライド。

■ 国後島住民の生活行動・習慣調査

・専門家レクチャー後に参加住民への意識調査を行った。

※ 平成 25 年に行われた専門家交流で国後島における動物由来感染症（エキノコックスと狂犬病）が話題となり、本調査でアンケート調査を行うことになった。

※ 押田専門家交流訪問団団長と事前に打ち合わせを行い、昨年度の交流において関心の高かったエキノコックス症の感染源動物である犬とキツネについて公衆衛生的な視点でアンケート調査を行うこととした。他の動物由来感染症に対する予防策も念頭に置いて、住民と感染源動物との関係性をとらえる調査票を作成した。

※ エキノコックス症の衛生対策と予防法等については、北海道衛生研究所の八木先生と国立感染症研究所の森嶋先生を研究協力者に加えて行った。

・参考資料 3A：日本語調査票

・参考資料 3B：ロシア語訳調査票

■ ロシアの野生動物専門家との情報交換

・7月27日（日）18:00

参加者：

大泰司、押田、井上、河合、

ボイコ・ピクトル、アンチーピン・マクシム、

ネベドムスカヤ・イリーナエコツーリズム

※ アンケート調査の成績を取りまとめて報告と情報共有も行った（参考資料 4）。

C. 研究結果

■ 国後島の生態系に関する概要

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。特筆すべきは、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示唆である（参考資料 5）。

■ ニキショロ海蝕洞のコウモリ類調査

昨年度、極東に分布するコウモリ類が北海道にまで分布域を広げた可能性が指摘され、北海道に生息するモモジロコウモリ（*Myotis macrodactylus*）についてウイルス由来遺伝子の探索を行った。

本年度、国後島で生息が確認されて継続調査が行われているモモジロコウモリについて、北海道に生息するコウモリとの生態学的な関係性を個体認識表等で確認する予定であったが、天候等により予定していた洞窟調査が不可能となったため、長期滞在しているロシアの専

門家に調査を依頼して後日情報共有することとなった。

■ 国後島住民の生活行動・習慣調査結果（参考資料6）

アンケート調査への回答者は17名（男6名、女10名）、年齢は10代から60以上までそれぞれに分布、職業は水産業（2名）・公務員（2名）・学生（3名）・教員（2名）・その他（6名）と、幅広い層からの回答となった。

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、短期滞在者によってもしばしば目撃されている。遭遇する機会は郊外の沼沢・湿地で多く、住居に近接することもある。春の山菜取りで頻繁に目撃されている。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名いたが、他でも意図せずに釣り魚の放置や生活ごみの不適切な処理が原因となっている可能性が考えられた。

※行政が、水産加工上の加工廃棄物の投棄場所を住宅地から離れた場所（森）に指定している（住宅地から5km 郊外）。また、

廃棄場所をクマの餌場として住民の被害を避けている。

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食しており、経口汚染に対する予防はできていると考えられた。

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。週末にキツネと遭遇する機会が増える。

5. 飲み水に関して

水道水と瓶詰（缶詰）を飲用に利用しており、自然環境への直接汚染はないと考えられたが、飲用水の煮沸を半数以上で行っておらず、特に井戸水を飲用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

専門家および住民は、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。狂犬病については、国後島に来る前にロシア（シベリアおよび極東地区を含む）で犬やキツネから感染のリスクを受けた経験があり、危機意識

が高いようである。また、エキノコックス症については、千島列島から北海道に輸入された経緯や、北海道内でのエキノコックス症流行状況を受けて、島内の状況がどうであるのか大きな関心が示された。

D. 考察

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。

島内に生息するキツネについては、これまでに動物由来感染症視点での調査等が行われていないことから、

- 1) キツネを生活環境に接近させない。
(餌付け禁止、生ごみ処理の徹底)
- 2) イヌを放し飼いしない。

- 3) 生水を飲まない。
- 4) 山菜・野菜は食前によく洗浄する。
- 5) 野外での活動後は手洗いを十分にする。
といった生活習慣を徹底させると同時に動物由来感染症を想定した適切な動物調査を行うことが望まれた。

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。

E. 結論

北方四島地域である国後島に生息するコウモリ類やキツネ等の感受性の高い流行宿主について生態学的な基礎データ収集と病原体調査を行うことで、狂犬病等の動物由来感染症が野生獣類を介して北海道に侵入する可能性を明らかにする発生予測・被害推計が可能になると考えられる。

新種のリッサウイルスが、シベリア南部、モンゴル西部、中国北東部のコウモリから新たに分離されていることから、シベリア

から極東ないしアジア地域、さらにはわが国を含めた包括的なコウモリ類に関する生態学的調査をリンクさせたリッサウイルスの疫学を明らかにすることは公衆衛生上大変有意義であると考えられた。

特に、生態が十分に明らかでなく新興感染症（SARS、エボラ出血熱等）の感染源宿主として注目を浴びているコウモリ類に対して病原微生物調査を行うことは、わが国に生息するコウモリ類を介した新興感染症の侵入や発生予測・被害推計などを可能にする基礎データ収集の基盤整備につながるため、公衆衛生行政における感染症の危機管理対策に大きな波及効果があると考えられた。

J. 健康危険情報

なし

K. 研究発表

1. 論文等発表

- 1) 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
- 2) 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

- 3) 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

1. 学会発表等

- 1) 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.
- 2) Inoue S. Enhancing laboratory network. Regional training on rabies. OIE regional representation for Asia and the Pacific. 5-8 Aug, 2014. Tokyo/Yokohama, Japan.
- 3) 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.
- 4) 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.

- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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-獣疫医学が社会に果たす役割。第 39 回獣疫医学学会学術集会。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
- 19) 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)」。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
- 11) 井上 智。狂犬病の現状と日本の取り組み (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
- 12) 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。
- 13) 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。
- 14) 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。
- 15) 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。
- 16) 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。
- 17) 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。
- 18) 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。
- 19) 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附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附属 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。
- 20) 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。
- 21) 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。
- 22) 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。

- 23) 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。
- 24) 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。
- 25) 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。
- 26) 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。
- 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

L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスの作出とその性状の解析

分担研究者:伊藤直人 岐阜大学応用生物科学部・准教授

研究要旨: 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他のウイルス蛋白質と比べて極めて少ない。本年度は、L 蛋白質の機能解析を推進するための研究ツールを得ることを目的として、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、レポーター遺伝子が発現することが確認された。さらに、ルシフェラーゼを発現する L 遺伝子欠損ウイルスを L 蛋白質非発現細胞に感染させた場合、初期転写を反映するルシフェラーゼ活性が検出された。以上より、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、ならびに初期転写を研究する上で、極めて有用なツールとなることが示された。

A. 研究目的

狂犬病は、重篤な神経症状を特徴とするウイルス性人獣共通感染症である。発症後の致死率がほぼ 100%であること、治療法が存在しないことから、本病は最も恐ろしい感染症のひとつと言える。その原因である狂犬病ウイルスの粒子は、5 種類の構造蛋白質(N、P、M、G および L 蛋白質)とこれらをコードするマイナス鎖 1 本鎖ゲノム RNA によって構成される。これらのウイルス蛋白質のうち L 蛋白質は、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして感染細胞におけるウイルス複製の中心的役割を担っている。また、ゲノム複製活性のみならず、mRNA 転写活性、キャッピング活性、ポリ A 付加活性を有している L 蛋白質は、極めて多機能

性に富んだウイルス蛋白質として認識されている。

このような L 蛋白質の重要性と多機能性は、本蛋白質が治療法および新規暴露後予防法の有力な分子標的となる可能性を示しているものの、L 蛋白質の研究は、すべてのウイルス蛋白質の中で最も遅れている。

そこで本年度は、L 蛋白質の機能を解析するための有用な研究ツールを確立する目的で、L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスの作出を試みた。さらに、その研究ツールとしての可能性を検証する目的で、得られた L 遺伝子欠損ウイルスの性状を解析した。

B. 研究方法

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(それぞれ Nishi- Δ L/GFP 株および Nishi- Δ L/Luc 株)を作出した(図 1)。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。

(倫理面からの配慮について)

本実験は、岐阜大学組換え DNA 安全委員会の承認を得ている(25 岐大術産 第 2 号の 21)。

C. 研究結果

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(図 2)。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(図 3)。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(図 4)。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。

D. 考察

これまで、狂犬病ウイルスを含むマイナス鎖