

201420031A

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)

動物由来感染症の対応に関する研究

(H25－新興－一般－008)

平成26年度 総括・分担研究報告書

平成27年3月

研究代表者 森 川 茂

(国立感染症研究所)

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)

動物由来感染症の対応に関する研究

(H25－新興－一般－008)

平成26年度 総括・分担研究報告書

平成27年 3 月

研究代表者 森 川 茂

(国立感染症研究所)

目 次

I. 総括研究報告書

- 動物由来感染症の対応に関する研究 1
研究代表者：森川 茂（国立感染症研究所 獣医科学部）

II. 分担研究報告書

1. 新興モルビリウイルスの病原性と動物由来新興ブニヤウイルスの国内疫学と総括 9
研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所 獣医科学部）
2. 食虫目、翼手目等のハンタウイルスの分子疫学情報の蓄積研究 25
研究分担者：新井智（国立感染症研究所 感染症疫学センター）
3. 狂犬病の病原性解析と新興ラブドウイルスの診断法の開発 31
研究分担者：井上智（国立感染症研究所 獣医科学部）
4. 動物由来新興ウイルスの細胞侵入機構 39
研究分担者：福士秀悦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
5. 野兔病の病原性発現機構の解析 49
研究分担者：宇田晶彦（国立感染症研究所 獣医科学部）
6. ニホンザル血小板減少症の原因となる SRV のウイルス学的解析 55
研究分担者：三浦智行（京都大学ウイルス研究所附属感染症モデル研究センター霊長類モデル研究領域）
7. 野生動物の動物由来感染症病原体の保有状況の網羅的調査 61
研究分担者：前田健（山口大学共同獣医学部獣医微生物学）
8. 輸入回帰熱の診断法確立と標準化 71
研究分担者：川端寛樹（国立感染症研究所 細菌第一部）
9. 動物由来細菌性腸管感染症の再興に向けた感染制御に関する研究 81
研究分担者：山田章雄（東京大学大学院 農学生命科学研究科）
10. コリネバクテリウムに関する研究 87
研究分担者：山本明彦（国立感染症研究所 細菌第二部）
11. 動物由来新興ヒトバベシア症原虫の国内感染実態の解明 101
研究分担者：新倉綾（国立感染症研究所 動物管理室）
12. ヒトの狂犬病の診断・治療法に関する調査研究 109
研究分担者：菅沼明彦（東京都立駒込病院感染症科）

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 135

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 (H25-新興-一般-008)

国立感染症研究所獣医科学部長 森川 茂

研究要旨：新興・再興感染症の大部分が動物由来感染症である。これらのうち国内で稀にしか発生していない動物由来感染症について、疫学的知見を集積しヒトへの感染リスクを評価する。また、これらの感染症が国内で発生した場合の診断・迅速検査法を確立する。重要な動物由来感染症の病原性発現機構に関する研究を行い、霊長類等に発生した新興感染症に関してヒトへのリスクを科学的に評価する。動物の常在細菌や環境中の菌等から病原性腸内細菌に対し抗菌作用を示す菌種を探索する。これらにより総合的に動物由来感染症対策の体制整備を目指す。本研究は、これらを目的とする3年計画の2年目で、(1)サルに致死性流行を起こしたイヌジステンパーウイルスをクローン化したプラスミドからRGにより回収して性状を調べた。また、新規ネコモルビリウイルスが国内のネコでも20%以上が感染し一部は持続感染する。ウイルスには3遺伝子型があるが地理的分布とは一致しない。(2)ニホンザルに致死性レトロウイルスSRV4をRGで回収し病気が引き起こされること、受容体(ASCT2)を同定した。(3)狂犬病の固定毒と街上毒のG蛋白質の細胞内局在と粒子形成にG蛋白質の糖鎖修飾が重要な役割を果たすことが分かった。(4)MERSコロナウイルスのS蛋白を外殻したVSVシュードタイプによる中和抗体測定法を開発し、ラットのdipeptidyl peptidase 4 (Dpp4) がレセプターとして機能しないことが分かった。(5)野兔病菌の新規病原体遺伝子*pdpC* 遺伝子の機能を解析するため、*pdpC* 遺伝子欠損弱毒株と強毒株の遺伝子発現プロファイルを比較し、6遺伝子の発現レベルが異なることを見出した。(6)国内の野生動物・節足動物間で、新規ラブドウイルス・フレボウイルス・トゴトウイルス・フラビウイルスが蔓延していることが判明した。また、フェレットコロナウイルスに認められるようにまだまだ未知のコロナウイルスが存在することが確認された。北海道のヒメネズミ及びベトナムの翼手目から新規ヘルペスウイルス4株が分離された。(7)齧歯目、トガリネズミ形目、および翼手目のハンタウイルスの解析から、ハンタウイルスはユーラシア大陸で誕生したと推測された。(8)抗体検査によってその感染種の同定は困難とされているボレリア感染症において、*in silico* 解析により回帰熱群特異的抗原や新興回帰熱群特異的抗原を推定し、大腸菌で組換え抗原を作製した。(9) *Bifidobacterium* の特定の菌株には *E. coli* O157:H7 感染防御効果があることが判明した。(10) シカが *Corynebacterium ulcerans* の自然界の保菌者でネコ等に感染させ、ネコが人への感染源の一つになることが示唆された。(11) 日本に存在しないとされていた *B. divergens* をはじめてシカから検出し、全国的に分布している事を明らかにした。シュルツマダニが *B. microti* US-type の自然界での媒介種であることが判明した。今後ヒトバベシア症が国内でも発生するリスクがある。(12) ヒト狂犬病のこれまでのMilwaukee rabies protocolによる救命8症例を参考に現時点で行い得る治療法、院内感染対策などに関してまとめた。

研究分担者：

新井智（国立感染症研究所 感染症疫学センター）、井上智、宇田晶彦（同 獣医科学部）、福士秀悦（同 ウイルス第一部）、川端寛樹（同 細菌第一部）、山本明彦（同 細菌第二部）三浦智行（京都大学ウイルス研究所附属感染症モデル研究センター霊長類モデル研究領域）、前田健（山口大学共同獣医学部獣医微生物学）、山田章雄（東京大学大学院農学生命科学研究科）、菅沼明彦（東京都立駒込病院感染症科）

A. 目的：

新興・再興感染症の大部分が動物由来感染症である。これらのうち国内で稀にしか発生していない、あるいは現在発生のない動物由来感染症について、ヒトへの感染リスクを評価するために必要な知見を集積する必要がある。また、新興動物感染症病原体のうち霊長類に致死感染を起すもの、全く新規に動物で同定されたウイルス感染症などは、科学的にヒトへのリスクを評価するための知見を集積する。宿主域が拡大し、本来の宿主動物から霊長類にまで致死感染をおこすようになったものに関しても、人へのリスクを評価する必要がある。動物由来感染症には、ウイルス感染症、細菌感染症など多くの感染症があるが、これらのうち重要と思われる感染症に関して以下の項目に関して研究を行う。

- 1) 疫学的知見が不十分な動物由来感染症の疫学的知見の集積を行う。
- 2) 患者発生時に必要な動物由来感染症の診断・迅速検査法を確立する。
- 3) 動物由来感染症の病原性に関わる遺伝子とその機能を解明する。
- 4) 霊長類などの新興感染症の発生機序を解明しヒトへのリスクを評価する。
- 5) 病原性細菌に抗菌作用を示す細菌群の同定と作用機構を解明する。

1) から 5) の研究から、国内で発生がなにか稀にしか発生のない重篤な動物由来感染症や今後発生する可能性のある動物由来感染症のリスクを明確にし、事前対策を可能とすることを目的とする。

B. 研究方法：

各分担研究者の研究報告書の研究方法に詳細を記載した。

C. 結果：

1) 新興モルビリウイルス感染症の研究：

サルの新興モルビリウイルス感染症の原因病原体であるイヌジステンパーウイルス(CDV)をリバースジェネティクスで回収しイヌ及びマカク属サルSLAMを介して感染し細胞融合をおこすこと、カニクザルリンパ球で増殖することを確認した。感受性マウスモデル作製に必要なマカク属サルSLAM及びnectin4 TGマウス作製用ベクターを作製しES細胞クローンを作製している。

近年、分離同定されたネコモルビリウイルスの国内のネコにおける疫学調査を継続して行い、香港と同様日本でもネコモルビリウイルス感染率は比較的高く、持続感染することがわかった。ウイルスの遺伝型は3型あるが地理的分布とは一致しない。腎炎等の腎疾患の関連に関して調査している（森川）。

2) ニホンザル血小板減少症の原因となるSRVのウイルス学的解析：

京都大学霊長類研究所においてニホンザルが血小板減少症により大量死した。これまでの次世代シーケンサーなどの研究からサルレトロウイルス4型(SRV-4)との関連が示唆されたが、確定的ではなかった。そこで、発症個体から分離したSRV-4及び新たに作製した感染

性遺伝子クローン由来の SRV-4 をニホンザルに実験感染したところ、血小板減少症が誘導された。また、SRV-4 がニホンザルに感染する際は、中性アミノ酸トランスポーターの一種である ASCT2 を利用することを明らかにし、この分子が多く発現している部位(肺や消化管)で SRV-4 がとくに増殖していることを確認した。本研究により、ニホンザル血小板減少症の原因ウイルスが SRV-4 であることを証明した。(三浦)。

3) 狂犬病の病原性解析:

狂犬病ウイルス (RV) の自然感染では潜伏期間中に RV に対する抗体は産生されずウイルスも検出できないが、実験室内継代等で弱毒化させた固定毒は潜伏期間の短縮と一定化、免疫誘導能の増強といった特徴を示す。RV の固定毒は、細胞表面に G 蛋白質が局在しウイルス粒子形成が起こるが、街上毒では G 蛋白質は小胞体からゴルジ装置へ局在しウイルス粒子形成は細胞膜で起きない。この違いが G 蛋白質の糖鎖修飾によること、特に第 204 位への糖鎖修飾の有無によることが明らかになった。第 204 位の N 型糖鎖付加は、RV の G 蛋白質の小胞体から細胞膜への輸送に重要な役割を果たしていることが明らかになった。(井上)。

4) ヒトの狂犬病の診断・治療法に関する調査研究:

狂犬病は発病するとほぼ全例が死に至る。発病後の治療は未確立であるが、近年、新たな治療法を模索する動きがみられる。狂犬病治療を考える基礎資料として、最新の知見を加えて、狂犬病救命例、治療法、

院内感染対策についてまとめた。これまでに報告された狂犬病発症後の救命例は、少数例にとどまっているが、いずれも狂犬病抗体上昇により診断されており、経過中に採取された各種検体から狂犬病ウイルスが検出されていない。これは、発症早期での狂犬病ウイルスの排除が、転帰に影響することを示唆していると思われる。狂犬病ウイルスの早期排除に、ウイルスの変異、曝露量、宿主の免疫応答などが影響する可能性があり、今後これらの因子について検討が必要である。ヒト狂犬病の治療プロトコールとして Milwaukee rabies protocol(MRP)が提唱され、世界各地で MRP に則った治療が行われ、救命例も報告されているが、MRP 導入例の多くが救命に至らず確立された治療法としての合意は得られていない。WHO における専門家会議では、狂犬病確定例に、苦痛の軽減を目的とした緩和治療を推奨し、人工呼吸器の使用などの侵襲的処置は避けるべきとの見解が表明されている。狂犬病患者に対する院内感染対策として、飛沫感染及び接触感染予防の順守が求められる。患者と接触する医療従事者に対しては、曝露のリスクに応じて、狂犬病ワクチンによる曝露後免疫、曝露前免疫の実施を検討する必要がある。(菅沼)。

5) 野兎病の病原性発現機構の解析:

野兎病菌は非常に高い感染性と病原性を有しており、野兎病菌病原因子や発症機序の解明は公衆衛生上重要である。これまでに、マウス継代を用いて野兎病菌の弱毒株と強毒株のゲノム比較解析から、弱毒株は *pdpC* 遺伝子内の 1 塩基欠損により、マ

ウス病原性が消失している事を明らかにした。本研究では、野兎病菌 *pdpC* 遺伝子が関与している他の病原遺伝子を同定、又は新たな病原遺伝子を同定する事を目的とし、弱毒株と強毒株の遺伝子発現比較解析を試みた。昨年度は、野兎病菌のタンパク質をコードする 1604 遺伝子中で 21 遺伝子が有意に発現変動している事を明らかにした。本年度は、このマイクロアレイ解析について詳細に再検討を行った結果、強毒株では一部の tRNA が強く発現しており、菌体内で病原遺伝子候補を含むタンパク質の生合成が活発である可能性が示唆された。また、弱毒株と強毒株では、6 遺伝子 (*Isflu1*, *hupB*, *usp*, *FTT_1140*, *FTT_0272*, *FTT_965c*) の発現量差異が確認された。この事から、これら 6 遺伝子は新たな病原性関連遺伝子である可能性が示唆された。
(宇田)。

6) 動物由来細菌性腸管感染症の感染制御に関する研究：

乳児の糞便を無菌 (GF) マウスに経口投与して作出したノトバイオート (GB) マウスにおいて、EHEC 感染に抵抗性を示す GB マウスの存在を明らかにしてきた。本研究では GF マウスに EHEC 感染に対する抵抗性を付与できる機構の解析を試みた。その結果乳児の糞便に存在する *Bifidobacterium* の菌種や菌株の中に EHEC による感染死を抑制する効果を有するものがあることが明らかになった。特に *B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 (*B. infantis* 157F) には抑制効果があることを明らかにした (山田)。

7) 食虫目、翼手目等のハンタウイルス等の分子疫学情報の蓄積：

ハンタウイルスの分子疫学情報の蓄積のため、モンゴル、ベトナム、ミャンマー、日本およびロシアの野生小型哺乳類のハンタウイルス感染状況を昨年度に引き続き解析した。その結果、これまでに明らかになっている齧歯目、トガリネズミ形目、および翼手目のハンタウイルスの解析から、ハンタウイルスはユーラシア大陸で誕生したと推測された。また、これらの小動物からウイルス分離・同定を行った結果、ベトナムの翼手目から 3 株の新規翼手目ヘルペスウイルス、北海道のヒメネズミから新規の齧歯目ヘルペスウイルスが分離・同定された。新規ウイルスを分離するツールとして齧歯目、トガリネズミ形目、翼手目の初代培養細胞の分離を広く行い、新たにヒミズ (*Urotrichus talpoides*) の初代培養細胞の分離に成功した (新井)。

8) 中東呼吸器症候群 (MERS) の血清診断法：

MERS は 2012 年にサウジアラビアで新興した新型のコロナウイルス (CoV) による新興感染症で、ヒトコブラクダが感染源とされている。MERS-CoV の血清疫学、ヒトへの感染経路については未だ不明な点が多く、また、MERS-CoV がラットなどの実験用小動物にどの程度可能なか等、宿主域について知見が十分に得られていない。本研究では MERS-CoV の VSV シュードタイプを作製し、MERS-CoV に対する中和抗体測定法を開発した。また、VSV シュードタイプを用いた解析から、MERS-CoV のラットへの感染効率は低いことが明らか

かとなった。(福士)。

9) コリネバクテリウムに関する研究：

ジフテリア様の症状を示すジフテリア毒素産生性の *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans*) による感染症について、リンパ節膿瘍を示す6歳の女児での新規1症例が報告された。この患者からの分離菌株は、本邦初発例と類似の MLST タイプに属した。動物における疫学調査から、シカが自然界の保菌動物として重要で、シカからウシやネコなどが感染して、ネコが人への感染源の一つと考えられた。*C. ulcerans*, *C. diphtheriae* および *C. pseudotuberculosis* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から鑑別するマルチプレックス PCR 法を昨年度開発したが、汎用するには改良が必要なが判明した。また、マウス *C. ulcerans* 感染モデルを用いて IgM 抗体が検出された。(山本)。

10) 野生動物の動物由来感染症病原体の保有状況の網羅的調査：

野生動物や伴侶動物には未だ知られていない感染症が多く存在する。また、ウイルスが分離されていてもその生活環が不明なものもある。本研究では、新規ウイルスの野生動物での感染状況の調査と新規動物保有のウイルスの検出を行った。本年度は、新規に同定したラブドウイルス科のニシムロウイルスのイノシシでの疫学調査を行い地域により感染率が大きく異なることを明らかにした。イノシシ由来の新規フレボウイルスは全国に蔓延していることが明らかとなった。また、マダニ由来新規トーゴトウイルスのイノシシでの疫学調査を実施した結果、西日本では多くが

感染しているが東日本には神韻していないことが明らかになった。更に、新規血清型フェレットコロナウイルス、イノシシやシカ、ダニから新規フラビウイルスを同定した(前田)。

11) 古典的回帰熱の新規抗体検査抗原の確立のための研究：

ボレリア属細菌は大腸菌等で血清型決定基となるような LPS を持たないこと、また鞭毛抗原遺伝子は高度に保存されていること等から、これらをもとにした血清型による型別や感染病原体種の血清学的同定が不可能であり、ボレリア感染症においては抗体検査によってその感染種の同定は困難とされてきた。しかしながら、ゲノム解析技術の向上により、回帰熱群特異的抗原や新興回帰熱群特異的抗原が *in silico* 解析で抽出できるようになってきた。本研究では、候補として選定した 59 orfs の内 44 orfs (74.5%) を大腸菌を用いて単離・発現させた。これらの組換え抗原を用いて、まず、回帰熱群ボレリア、新興回帰熱ボレリア、ライム病群ボレリアを感染させたマウス血清を用いて抗体が誘導される抗原の選定・絞り込みを行う予定である(川端)。

12) 動物由来新興ヒトバベシア症原虫の国内感染実態の解明：

ヒトバベシア症は、マダニ媒介性の人獣共通感染症である。世界的には、米国の *B. microti* と欧州の *B. divergens* が主要因であるが、流行地域以外での近縁種や新種が患者から相次いでみつかると、新興感染症として注目されている。本研究では、日本に存在しないとされていた *B. divergens* を初

めてシカから検出し、全国的に分布している事を明らかにした。また、分子疫学的解析から、本原虫は欧州、米国と同じクレードに属する原虫であり、今後、感染患者が発生する可能性が示唆された。さらに、米国の *B. microti* と同系統である *B. microti* US-type4 株ををシュルツマダニから国内で初めて分離した。分離株は遺伝的、抗原的に野ネズミ由来の原虫と同一であり、シュルツマダニが自然界での媒介種であることが明らかになった（新倉）。

D. 考察：

新興・再興感染症の大部分が動物由来感染症である。これらのうち国内で稀にしか発生していない、あるいは現在発生のない動物由来感染症について、ヒトへの感染リスクを評価するために必要な知見を集積する必要がある。新興動物感染症病原体のうち霊長類に致死感染を起すもの、全く新規に動物で同定されたウイルス感染症などは、科学的にヒトへのリスクを評価するための知見を集積する。宿主域が拡大し、本来の宿主動物から霊長類にまで致死感染をおこすようになったものに関しても、人へのリスクを評価する必要がある。さらに、これらの感染症が国内で発生した場合の診断・迅速検査法を確立する。動物の常在細菌や環境中の菌等から病原性腸内細菌に対し抗菌作用を示す菌種を探索する。これらにより総合的に動物由来感染症対策の体制整備を目指すことを目的とする。

本研究計画は3年間にわたる研究で、今年度は2年度にあたる。結果に記載したように、対象とするモルビリウイルス、サル

レトロウイルス、狂犬病ウイルス、新興コロナウイルス、ハンタウイルス、野兎病菌、コリネバクテリウムに関しては、ほぼ当初の研究計画の予定の結果を得ている。また、*Bifidobacterium* の特定の菌株には *E. coli* O157:H7 感染防御効果があることが判明した。さらに、国内外の野生動物から動物由来感染症病原体の保有状況の網羅的調査を行い、国内の野生動物・節足動物間で、新規ラブドウイルス・フレボウイルス・トーチトウイルス・フラビウイルスが蔓延していることが判明した。また、フェレットコロナウイルス等まだ未知のコロナウイルスが存在することが確認された。北海道のヒメネズミ及びベトナムの翼手目から新規ヘルペスウイルス4株が分離された。これらの検出系に関しても確立したモニに関しては疫学的調査も実施された。日本に存在しないとされていた *B. divergens* をはじめてシカから検出し、全国的に分布している事を明らかにした。シュルツマダニが *B. microti* US-type の自然界での媒介種であることが判明した。これらのことから、今後、国内でもヒトバベシア症が発生するリスクがあると思われる。

E. 結論

- (1)サルに致死流行を起こしたイヌジステンパーウイルスをクローン化したプラスミドから RG により回収して性状を調べた。また、新規ネコモルビリウイルスが国内のネコでも20%以上が感染し一部は持続感染する。ウイルスには3遺伝子型があるが地理的分布とは一致しない。
- (2)ニホンザルに致死なレトロウイルス SRV4 を RG で回収し病気が引き起こされること、受容体 (ASCT2) を同定し

た。(3)狂犬病の固定毒と街上毒の G 蛋白質の細胞内局在と粒子形成に G 蛋白質の糖鎖修飾が重要な役割を果たすことが分かった。(4) MERS コロナウイルスの S 蛋白を外殻した VSV シュードタイプによる中和抗体測定法を開発し、ラットの dipeptidyl peptidase 4 (Dpp4) がレセプターとして機能しないことが分かった。(5) 野兎病菌の新規病原体遺伝子 *pdpC* 遺伝子の機能を解析するため、*pdpC* 遺伝子欠損弱毒株と強毒株の遺伝子発現プロファイルを比較し、6 遺伝子の発現レベルが異なることを見出した。(6) 国内の野生動物・節足動物間で、新規ラブドウイルス・フレボウイルス・トーゴトウイルス・フラビウイルスが蔓延していることが判明した。また、フェレットコロナウイルスに認められるようにまだまだ未知のコロナウイルスが存在することが確認された。北海道のヒメネズミ及びベトナムの翼手目から新規ヘルペスウイルス 4 株が分離された。(7) 齧歯目、トガリネズミ形目、および翼手目のハンタウイルスの解析から、ハンタウイルスはユーラシア大陸で誕生したと推測された。(8) 抗体検査によってその感染種の同定は困難とされているボレリア感染症において、*in silico* 解析により回帰熱群特異的抗原や新興回帰熱群特異的抗原を推定し、大腸菌で組換え抗原を作製した。(9) *Bifidobacterium* の特定の菌株には *E. coli* O157:H7 感染防御効果があることが判明した。(10) シカが *Corynebacterium ulcerans* の自然界の保菌者でネコ等に感染させ、ネコが人への感染源の一つになることが示唆された。(11) 日本に存在しないとされていた *B. divergens* をはじめてシカから検出し、全国的に分布している事を明らかにした。シュルツマダニが *B. microti* US-type の自然界での媒介種で

あることが判明した。今後ヒトバベシア症が国内でも発生するリスクがある。

(12) ヒト狂犬病のこれまでの Milwaukee rabies protocol による救命 8 症例を参考に現時点で行い得る治療法、院内感染対策などに関してまとめた。

F. 健康危険情報

サルでの CDV 感染症の流行は 2008 年以降報告されていない。また、SRV4 によるニホンザルの致死的血小板減少症も京都大学霊長類研究所では制御されている。SRV5 によるニホンザルの致死的血小板減少症が確認された。これらのヒトへの感染例は未だ報告されていない。狂犬病は、これまで日本と同様清浄国とされていた台湾で、野生動物のイタチアナグマで流行しているが、イヌへの感染は 1 例にとどまっている。

G. 研究発表

各研究分担者及び「III. 研究成果の刊行に関する一覧表」に記載した。

Ⅱ. 分担研究報告書

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）〕

分担研究報告書

動物由来感染症の対応に関する研究（H25-新興-一般-008）

分担研究課題：新興モルビリウイルスの病原性と動物由来新興

ブニヤウイルスの国内疫学と総括

研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所獣医科学部部長）

研究協力者：朴ウンシル、鈴木道雄、木村昌伸、今岡浩一（同獣医科学部）、河合康洋、網康至、山田靖子（同、実験動物管理室）、吉河智城、西條政幸（同、ウイルス第一部）、酒井宏治、竹田誠（同、ウイルス第三部）、阪井弘治、俣野哲朗（同、エイズ研究センター）、永田典代、岩田奈緒子、鈴木忠樹、長谷川秀樹（同、感染病理部）、久保田菜美、齊藤隆一、水谷浩志、丸山啓二（東京都動物愛護センター）、古谷哲也、水谷哲也（東京農工大）

研究要旨：新興・再興感染症の大部分は動物由来感染症である。サルの新興モルビリウイルス感染症はイヌジステンパーウイルス(CDV)による。この CDV をリバースジェネティクスにより回収し、元の CDV と同様イヌ、マカク属サル SLAM により感染することを確認した。CDV 感受性マウスモデル作製のため、マカク属サル SLAM/nectin4 TG マウス作出が進展した。一方、近年新興ウイルスとして同定されたネコモルビリウイルスの国内のネコにおける抗体陽性率、ウイルス感染率を明らかにし、日本でもネコモルビリウイルスが浸淫していることが明らかとなった。ネコモルビリウイルス感染ネコのほとんどが腎炎陽性であったが、腎疾患との有意な関連は未だ得られていない。ネコモルビリウイルスに近縁なウイルスが他種動物やヒトに存在するかの不明であり、今後の調査が必要である。

A. 研究目的：

ほとんどの新興・再興感染症は動物由来感染症であることから、その対応には既に新興・再興感染症として顕在化したものだけでなく、宿主域を拡大するなど人の新興感染症になり得ると考えられる動物感染

症も対象とした研究が求められる。パラミクソウイルス科のモルビリウイルスは、宿主域を拡大し易いウイルスと考えられている。実際、ウイルスの遺伝的解析等から、麻疹ウイルスは牛痘の原因ウイルスであるリンダーペストウイルスがヒトへ馴化した

ことが明らかとなっている。また、イヌ類を自然宿主とする犬ジステンパーウイルス (Canine Distemper Virus, CDV) は、自然界で宿主域を拡大し、多くの野生動物に致死感染を引き起こし、ライオン、トラ、パンダなどにも甚大な被害が出ている。さらに宿主域を拡大し、中国、日本などでマカク属サルに大規模な致死感染の流行を引き起こしている。サルに致死感染を引き起こした CDV は、イヌなどから分離された CDV と比較して保存された 19 箇所のアミノ酸に変異がある。また、マカク属サルではリンパ球のレセプター SLAM が CDV に親和性があり感受性がある。サルから分離された CDV は、イヌでも高い病原性を示すことから、CDV がサルにまで宿主域を拡大した理由は、19 箇所のアミノ酸変異によりウイルスの病原性が高くなっている可能性が示唆された。一方、サルから分離された CDV は H 蛋白の 1 アミノ酸の変異により容易にヒト SLAM を効率よく利用できるようなことから人の新興感染症となるリスクがある。

本研究では、サルから分離された CDV の遺伝子改変を可能にするためリバーシジェネティクスにより感染性ウイルスを作製し、強毒化に関わる変異を同定することを最終目的とする。また、病原性解析には小動物モデル系が必須であるため、マカク属サルの SLAM と上皮細胞レセプターである Nectin4 を knock in/knock out した B6 マウスを作製する。これらを用いて CDV の宿主域拡大に関わる遺伝的変異を明らかにし、将

来ヒトへの感染域拡大に繋がる可能性を明らかにすることを目的とする。

一方、2012 年に新規のモルビリウイルスとしてネコモルビリウイルス (feline morbillivirus; FCoV) が分離同定された。本ウイルスは、これまで全く未同定のウイルスであったため、近縁なウイルスが他種動物やヒトに感染しているのか否かも不明で、感染症との関連も不明である。そこで、国内のネコへのネコモルビリウイルスの浸淫状況を調査し、感染症との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 材料と方法：

1) サルでの CDV 感染症流行後期の CDV のカニクイザル感染実験：

これまで流行初期のサルから分離されたウイルスの感染実験によりサルが全身感染することが分かっている。そこで、流行後期のサル由来ウイルスの感染実験を行った。

2) サルから分離された CDV のリバーシジェネティクス：

CDV のリバーシジェネティクスは、基本的に麻疹ウイルスで用いられている方法を用いた。ウイルス RNA 転写用の T7promoter-CDV-CYN07-dV-cDNA-delta ribozyme、ウイルス蛋白発現用の pKS336-CDV-CYN07-dV-NP, pKS336-CDV-CYN07-dV-P, pKS336-CDV-CYN07-dV-L を作製し、これらを T7-polymerase 発現 BHK 細胞に cotransfection する。トランスフェクションした細胞に CDV 感受性の dogSLAM

発現 Vero 細胞を重層して培養し、ウイルスを回収する。

3) マカク属 SLAM knock-in マウス作製用ベクターの作製：

大野らがヒト SLAM knock-in マウス作製に用いたベクター pTK2-5 (JVI 81:1650-59, 2007) をベースに V domain をコードする exon 2 をマカク属 SLAM に入れ替えた。この targeting vector をマウス ES 細胞に導入し、マカク SLAM を発現する ES 細胞を相同組換えにより作製し、キメラマウスを作出して、最終的にマカク SLAM 発現マウスを作製する。必要に応じて I 型インターフェロンレセプター欠損も導入する。

4) マカク属 nectin4 トランスジェニックマウス作製用ベクターの作製：

Nectin4 に関しては、上皮系でのみ発現するための targeting vector、CAG promoter-stop-cassette-mNectin4、を作製した。この targeting vector をマウス nectin4 KO-ES 細胞にベクターを導入し TG マウスを作製する。本 TG マウスでは、Tamoxifen 投与により Keratin14-CreERT2 が上皮細胞特異的に核内移行し、stop-cassette 除去。その結果、macNectin4 を発現するマウスとなると予想される。

5) FMoV 抗体検出系の確立と血清疫学と FMoV 感染ネコからのウイルス遺伝子検出：

FMoV NP 発現 HeLa 細胞を樹立し、塗抹標本作製して間接蛍光抗体法用抗原とした。本抗原により国内のネコの血清抗体を

調べた。FMoV 抗体陽性、抗体陰性ネコの尿から RT-PCR によりウイルス遺伝子を検出した。

(倫理面からの配慮について)

遺伝子組換え実験では機関承認及び大臣確認実験として承認を受け、動物実験にあたっては国立感染症研究所動物実験委員会に申請し承認されている。

C. 結果：

1) 流行後期のサル由来 CDV の感染実験：

サルでの流行後期には、初期の CDV の遺伝子配列に 11 塩基の変異が蓄積したことが分かっている。そこで、流行後期に分離された CDV CYN11-dV 株を 2 頭のカニクイザルに実験感染した。その結果、流行初期のサル由来 CDV CYN07-dV 株と同様のリンパ球 viremia をおこした。全身感染に関しては現在病理組織学的に解析中である。

2) サルから分離された CDV のリバーシジェネティクス：

T7promoter-CDV-CYN07-dV-cDNA-delta ribozyme のコンストラクトを作製した。全塩基配列を決定し、変異がないことを確認した。タンパク発現様プラスミドとして、NP, P, L を発現する pKS336-CDV-CYN07-dV-NP, pKS336-CDV-CYN07-dV-P, pKS336-CDV-CYN07-dV-L を作製した。これらの遺伝子配列を決定し、変異がないことを確認した。これらのプラスミドを T7-polymerase 発現 BHK 細胞へ導入し、dogSLAM 発現 Vero 細胞を重層して培養し

たところ、CDV 特異的な CPE が出現し感染性ウイルスが回収された。回収された CDV CYN07-dVRG は、発症したカニクイザルから分離された CDV CYN07-dV 株と同様、dogSLAM, macSLAM を介した感染と細胞融合をおこしたが、humanSLAM を介した感染、細胞融合は起こさなかったことから、親株の CDV の性状を持ったウイルスが回収されたと考えられる。回収されたウイルスはカニクイザルのリンパ球に感染することが確認された。

3) サルから分離された CDV 等の病原性解析可能な小動物モデル系の開発：

カニクイザルから分離された CDV CYN07-dV 株は、サルに全身感染を起すが、本株の病原性に関与する遺伝子変異を解析するにはリバーシジェネティクスにより CDV CYN07-dV 株と犬由来 CDV 株などとの種々のキメラ CDV や変異導入 CDV を作製して病原性を比較する必要がある。カニクイザルを用いてこれらの解析をするためには莫大な予算が必要で、実質的に実施できる状況にない。CDV は、免疫系細胞では SLAM を、上皮系細胞等では nectin4 をレセプターとして感染するため、小動物代替モデルとして、マカク属サル SLAM 及び nectin4 発現マウスの作製を試みた。マカク属サル SLAM は、大野らが humanSLAM knock-in マウス作製に用いたベクター pTK2-5 (JVI 81:1650-59, 2007) をベースに V domain をコードする exon 2 をマカク属

SLAM に入れ替えた。V domain の N 末端の 2 アミノ酸をヒトや他の霊長類(28R, 49Y)型からマカク属サルの 28 H, 49 H に置換するため、部位特異変異により pTK2-5 のヒト SLAM exon2 に C273T, A339G の変異を導入した。これをベースに targeting vector を作製し、マウス ES 細胞株を樹立するため IDG26.10-3ES 細胞に transfection して、300 クローン選択して相同組換えの有無を確認している。マカク属 nectin4-TG マウス作製には、conditional expression vector である pEx-CAG-stop-bpA に macNectin4 cDNA を挿入した。IDG26.10-3ES 細胞の Rosa26 遺伝子座のアクセプターアレルの hygromycin 耐性遺伝子部位を DNA 組換え配列(att 配列)による組み換えを行う。macSLAM^{KI/+}IDG26.10-3ES 細胞に pEx-CAG-stop-bpA-macNectin4 と BP クロナーゼ発現 pCAG-C31 Int と cotransfection し、G418 選択後にマカク属 nectin4 が相同組換えされた細胞 (macSLAM^{KI/+},macNectin4^{+/-}IDG26.10-3ES 細胞) を選択している(図 2)。ES 細胞での組換えを確認後マウスを作製する。これまでに作製した I 型インターフェロンレセプター KO マウスと交配して、mac-SLAM, -nectin4 発現/Infar(-/-)マウスを最終的に作出する。このマウスを作出後に、CDV 感染実験を行う。

4) ネコモルビリウイルス (FMoV) 感染ネコの調査：

FMoV NP 発現 HeLa 細胞を樹立し、細胞

塗抹標本を抗原として間接蛍光抗体法 (IF) を行った。この IF では CDV 感染イヌ血清は反応しないことから、血清学的に CDV とは交差しないと考えられる。

動物愛護センターで採取されたネコ血清 100 検体中 21 検体(21%)が抗体陽性であった (表 1)。一方、これらの腎組織あるいは尿からの FMoV 遺伝子検出を RT-PCR あるいは nested RT-PCR で行った結果、100 匹中 22 匹 (22%) が遺伝子陽性で、FMoV に感染していた。遺伝子陽性 22 検体中腎及び尿で陽性を示したのが 13 検体、尿のみ陽性が 4 検体、腎組織のみ陽性が 5 検体であった。また、FMoV 遺伝子のみ陽性、FMoV 遺伝子及び抗体陽性、抗体のみ陽性の検体があった。

病理組織学的に RT-PCR 陽性 22 検体と RT-PCR 陰性/抗体陽性 7 検体の腎組織を解析した結果、RT-PCR 陽性 22 検体中 13 検体 (59%)、RT-PCR 陰性/抗体陽性 7 匹中 2 匹(29%)で中度から重度の間質性腎炎が認められた (表 1)。この内、免疫組織染色法により病変部位で FMoV 抗原が認められたのは RT-PCR 陽性の 4 検体のみであった (図 3)。この 4 検体の 3 検体に関してより詳細に検討した結果、いずれも慢性間質性腎炎が認められ、病変部の尿細管に FMoV 抗原が認められ、1 検体は移行上皮細胞が抗原陽性であった。なお、RT-PCR 陰性/抗体陽性 7 検体の腎組織には、いずれも免疫組織染色では FMoV 抗原が認められた (表 1)。

5) 国内の FMoV の分子系統樹解析 :

FMoV 遺伝子陽性検体の L 遺伝子の部分配列に基づく分子系統樹解析を行った結果 (図 4)、香港株 FMoV 3 株 (M252A, 761U, 776U) と日本の株は、3つの遺伝子型に分けられるが、地理的分布と遺伝子型は一致しなかった。

D. 考察 :

CDV は宿主域を拡大し、ライオン、トラ、パンダや種々の野生動物が感染し死亡している。2008 年には CDV はマカク属のサルへも感染域を拡大し、大規模な致死感染症を起こしていることから、ヒトへの感染リスクも危惧された。これまでに、1) サルから分離された CDV は、イヌ、サルの SLAM 及びイヌ、サル、ヒトの nectin4 をレセプターとして感染する、2) H 蛋白の 541 位の近傍の 1 アミノ酸変異でヒトの SLAM をレセプターとして利用できるようになる、3) イヌ由来 CDV も同様の感染域を持つ、4) サル由来 CDV は、イヌにも強い病原性を示す、5) サルでの流行後期には、流行初期の CDV の遺伝子配列に 11 塩基の変異が蓄積したことが分かっている。また、海外で行われた犬由来 CDV のサル感染実験では、リンパ球には感染するが上皮系細胞には感染が広がらないとの報告がある。これらから、本来 CDV はマカク属サルのリンパ球に SLAM を介して感染するが、サルで流行した CDV は強毒であったと考えられ

る。サル由来 CDV はイヌ由来 CDV と比較して多くの変異が認められるが、その原因は不明である。今回の研究では、サルでの流行後期の CDV 株のサルへの感染実験を行ったが、現時点では病理組織学的解析の途中で結論が出ていないため、流行後期のウイルスへの遺伝子変異の蓄積が病原性と関連するかは不明であるため、来年度に結論を出したい。サルに病原性を示す CDV の病原性に関与する遺伝的変異を明らかにすることは、リスク評価の上からも重要であるため、サル由来 CDV をリバースジェネティクス (RG) により感染性ウイルスを回収した。現時点ではサルのリンパ球に効率よく感染することが分かったため、サルへの感染実験により元の CDV と同様の病原性を有するかを明らかにしたい。その上で、イヌ由来 CDV とのキメラウイルスを RG により回収する予定である。また、病原性比較には多くの動物感染実験が必要であることから、CDV 感受性マウスを作出している。マカク属 SLAM knock-in、マカク属 nectin4 TG の ES 細胞クローンを得ているため、マウス作成を来年度行いたい。また、既に InfaR(-/-)マウスを作製したので、InfaR(-/-)も導入予定である。

一方、近年分離同定された新規ネコモルビリウイルスの国内のネコにおける抗体陽性率、ウイルス遺伝子陽性率を継続して調査した結果、抗体陽性率、ウイルス遺伝子陽性率は共に 20%程度と、国内のネコにおけるネコモルビリウイルス感染率は高かつ

た。抗体陽性、遺伝子陰性の腎組織で免疫組織染色法では抗原陽性の検体が多かったこと、遺伝子陽性で抗体陽性の検体が多いことから、本ウイルスが持続感染することがわかった。感染ネコのほとんどが間質性腎炎陽性であるが、現時点では本ウイルスと疾患との関連は明らかでない。これまでの予備調査では、本ウイルスの抗体陽性のイヌは見出されていないが、動物種、検体数を増やして調査する予定である。

E. 結論

サルの致死性感染症の流行の原因となった CDV は病原性が高い。その原因を解析するために RG によりウイルスを回収した。CDV の病原性を解析するためのマウスモデルとしてマカク属サル SLAM/nectin4 TG マウスの作出が進展した。

ネコモルビリウイルスは国内のネコにおいても 20%程度に感染し、さらに多くが持続感染している。ウイルスは遺伝的に 3 型に分けられるが、地理的分布とは一致しない。本ウイルスと疾患との関連に関してはさらなる研究が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Paola Katrina G. Ching, Vikki Carr de los Reyes, Maria Nemia Sucaldito, Enrique

- Tayag, Alah Baby Columna-Vingno, Fedelino F. Malbas, Gilbert C. Bolo, James J. Sejvar, Debbie Eagles, Geoffrey Playford, Erica Dueger, Yoshihiro Kaku, Shigeru Morikawa, Makoto Kuroda, Glenn A. Marsh, Sam McCullough, and A. Ruth Foxwell. Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines. *Emerg Infect Dis.* 2015, 21(5), 21(2):328-31. DOI: 10.3201/eid2102.141433
- 2) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):423-7.
- 3) Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H. Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. *J Gen Virol.* 2014 Oct 15. pii: vir.0.070219-0. doi: 10.1099/vir.0.070219-0.
- 4) David Nadeba Bukbuk, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Koichiro Iha, Aiko Fukuma, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Francis Kasolo, Saka Saheed Baba. Development and Validation of Serological Assays for Viral Hemorrhagic Fevers and Determination of Prevalence of Rift Valley Fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014 Oct 24. pii: tru163. PMID: 25344695
- 5) Eun-Sil Park, Michio Suzuki, Masanobu Kimura, Keiji Maruyama, Hiroshi Mizutani, Ryuichi Saito, Nami Kubota, Tetsuya Furuya, Tetsuya Mizutani, Koichi Imaoka, Shigeru Morikawa. Identification of a natural recombination in the F and H genes of feline morbillivirus. *Virology*, 2014, 468-470: 524-531
- 6) Noriyo Nagata, Masayuki Saijo, Michiyo Kataoka, Yasushi Ami, Yuriko Suzuki, Yuko Sato, Naoko Iwata-Yoshikawa, Momoko Ogata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata, and Hideki Hasegawa. Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey. *Int J Clin Exp Pathol* 2014, 7(7):4359-4370.
- 7) Tomoki Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Shoichi Toda, Yukie Shimazu, Koji Yano, Toshiharu Morimitsu, Katsuyuki Ando, Akira Yoshikawa, Miki Kan, Nobuyuki Kato, Takumi Motoya, Tsuyoshi Kuzuguchi, Yasuhiro Nishino, Hideo Osako, Takahiro Yumisashi, Kouji Kida, Fumie Suzuki, Hirokazu Takimoto,

- Hiroaki Kitamoto, Ken Maeda, Toru Takahashi, Takuya Yamagishi, Kazunori Oishi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, and Masayuki Shimojima. 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*, 2014 Sep;52(9):3325-33.
- 8) Aya Zamoto-Niikura, Masayoshi Tsuji, Koichi Imaoka, Masanobu Kimura, Shigeru Morikawa, Patricia J. Holman, Haruyuki Hirata, and Chiaki Ishihara. Sika Deer Carrying *Babesia* Parasites Closely Related to *B. divergens*, Japan. *EID*, 2014, 20(8):1398-1400.
- 9) Sunohara M, Morikawa S, Fuse A, Sato I. GATA-dependent regulation of TPO-induced c-mpl gene expression during megakaryopoiesis. *Okajimas Folia Anat Jpn*. 2014;90(4):101-6. PMID: 24815109
- 10) Naoko Iwata-Yoshikawa, Akihiko Uda, Tadaki Suzuki, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa and Noriyo Nagata. Effects of Toll-Like Receptor Stimulation on Eosinophilic Infiltration in Lungs of BALB/c Mice Immunized with UV-Inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus Vaccine. *J. Virol*. 2014, 88(15):8597-8614. DOI: 10.1128/JVI.00983-14.
- 11) 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*. 2014, 88(13):7317-7330. DOI:10.1128/JVI.00512-14.
- 12) Yamanaka A, Iwakiri A, Yoshikawa T, Sakai K, Singh H, Himeji D, Kikuchi I, Ueda A, Yamamoto S, Miura M, Shioyama Y, Kawano K, Nagaishi T, Saito M, Minomo M, Iwamoto N, Hidaka Y, Sohma H, Kobayashi T, Kanai Y, Kawagishi T, Nagata N, Fukushi S, Mizutani T, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurane I, Kageyama T, Odagiri T, Saijo M, Morikawa S. Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. *PLoS One*. 2014 Mar 25;9(3):e92777. doi: 10.1371/journal.pone.0092777.
- 13) Uda A, Sekizuka T, Tanabayashi K, Fujita O, Kuroda M, Hotta A, Sugiura N, Sharma N, Morikawa S, Yamada A. Role of Pathogenicity Determinant Protein C (PdpC) in Determining the Virulence of the *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* SCHU. *PLoS One*. 2014 Feb