

- 18;9(2):e89075.
- 14) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akihiko Uda, Osamu Fujita, Toshio Mizoguchi, Junji Shindo, Chun-Ho Park, Noboru Kudo, Hitoshi Hatai, Toshifumi Oyamada, Akio Yamada, Shigeru Morikawa, and Kiyoshi Tanabayashi. Serosurveillance for Francisella tularensis among wild animals in Japan using a newly developed competitive ELISA. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2014 Apr;14(4):234-9
 - 15) Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, et al. , Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. J Inf Dis., 2014 Mar;209(6):816-27.
2. 学会発表
1. 堀田明豊、棚林清、山田章雄、森川茂. 国内の医師および獣医師への One Health についての意識調査. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 北海道, 2014 年 9 月
 2. 堀田明豊, 木村昌伸, 中村幸子, 片山敦司, 中下留美子, 坪田敏男, 猪島康雄, 鈴木道雄, 今岡浩一, 棚林清, 藤田修, 山本美江, 宇田晶彦, 森川茂. 2007 年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) に対する抗体調査. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 北海道, 2014 年 9 月.
 3. 堀田明豊、木村昌伸、坪田敏男、中村幸子、片山敦司、中下留美子、猪島康雄、鈴木道雄、今岡浩一、棚林清、藤田修、山本美江、宇田晶彦、森川茂. 「2007 年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) に対する抗体調査」 第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 4. 藤田修、宇田晶彦、木村昌伸、藤田博己、今岡浩一、森川茂. 「ニホンジカから採取したマダニ類のウイルス遺伝子保有状況からみた自然界における SFTS ウイルス維持様式の検討」 第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 5. 森川茂、木村昌伸、堀田明豊、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、野口章、井上智、今岡浩一、前田健. 「野生のシカにおける SFTS ウイルス抗体調査」 第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 6. 浜崎千菜美、楢田龍星、野口慧多、寺田豊、下田宙、高野愛、鈴木和男、森川茂、前田健. 「野生動物における SFTS ウイルス感染の疫学調査」 第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 7. 松本苑子、橋野正紀、鈴木尋、高野愛、藤田修、堀田明豊、森川茂、高田伸弘、渡邊健太、清水隆、度会雅久. 「ダニに

- における *Francisella tularensis* の全国的疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
8. 堀田明豊、棚林清、山田章雄、森川茂. 「国内の医師および獣医師への One Health についての意識調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 9. 加来義浩、奥谷晶子、河合康洋、野口章、濱本紀子、梁瀬徹、加藤友子、新井智、井上智、森川茂. 「国内で分離された未分類のラプトウイルスの遺伝学的解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 10. 新倉綾、森川茂、平田晴之、石原智明. 「北海道のシュルツマダニ *Ixodes persulcatus* から分離された *Babesia microti* の性状解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 11. 新井智、池山優、Boldgiv Bazartseren、Boldbaatar Bazartseren、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、森川茂、Yanagihara Richard、大石和徳. 「モンゴルのトガリネズミに確認された遺伝的に異なるハンタウイルスの共循環」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 12. 池山優、新井智、Kang Haeji、大館智志、Taylor Kyle、中田圭亮、雲野明、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、森川茂、Yanagihara Richard、大石和徳. 「Sarufutsu virus ; オオアシトガリネズミに感染を確認した新規ハンタウイルス」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 13. 朴ウンシル、鈴木道雄、木村昌伸、丸山啓二、水谷浩志、斉藤隆一、久保田菜美、古谷哲也、水谷哲也、今岡浩一、森川茂「日本のネコにおける新規モルビリウイルス(*feline morbillivirus, FMV*)の疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 14. 森川茂、朴ウンシル、今岡浩一、前田健、宇田晶彦. 「SFTS ウイルスの生活環における野生のシカの役割」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
 15. 西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸. 「重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
 16. 前田健、濱崎千菜美、下田宙、鍬田龍星、野口慧多、米満研三、高野愛、鈴木和男、森川茂. 「SFTS ウイルスの生活環における動物の重要性」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
 17. 朴ウンシル、佐藤由子、中島典子、古谷哲也、水谷哲也、今岡浩一、森川茂. 「日本国内ネコにおける新規モルビリ

- ウイルス (feline morbillivirus, FMV) の疫学調査」 第 62 回日本ウイルス学会 学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
18. 河内健吾、氏家誠、谷英樹、森川茂、田口文広. 「Baculovirus を用いた牛 Torovirus の可溶性 HemagglutininEsterase protein の発現」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
19. 新井智、池山優、Se Hun Gu、Son Truong Nguyen、福井大、大舘智志、吉川泰弘、森川茂、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、Richard Yanagihara、大石和徳. 「ベトナムの翼手目由来に確認されたハンタウイルスの多様性」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
20. 谷英樹、谷口怜、福岡藍子、福士秀悦、森川茂、下島昌幸、西條政幸. 「重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP の細胞融合能と 25-hydroxycholesterol による感染阻害効果」 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
21. 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福岡藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、江川和孝、下島昌幸、森川茂、西條政幸. 「ワクシニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立」 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
22. Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma¹ Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani¹ Tomoyuki Yoshikawa, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in domestic and wild animals in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
23. Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVIIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
24. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Analyses of cell entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus using pseudotype vesicular stomatitis virus system. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
25. Akihiko Uda, Hiroki Kawabata, Shuetsu Fukushi, Yoshiharu Kaku, Masayuki Shimojima, Shuji Ando, Ken Maeda,

- | | |
|---|-------------------------|
| <p>Hiromi Fujita, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Sawabe Kyoko. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July-1Aug 2014.</p> | <p>1. 特許取得
なし</p> |
| <p>26. Yu Ikeyama, Satoru Arai, Bazartseren Boldgiv, Bazartseren Boldbaatar, Kazuko Araki, Hiroshi Satoh, Keiko Tanaka-Taya, Shigeru Morikawa, Richard Yanagihara, Kazunori Oishi. Co-circulation of two distinct divergent hantaviruses in Sorex species in Mongolia. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014</p> | <p>2. 実用新案登録
なし</p> |
| <p>27. Shigeru Morikawa, Akihiko Uda, Masanobu Kimura, Kawabata, Hiroki, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Shuji Ando, Sawabe Kyoko, Hiromi Fujita, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in animals and ticks in Japan. The 10th China-Japan International Conference of Virology, Changchun, China, Aug25-28 2014.</p> | <p>3. その他
なし</p> |
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1. モルビリウイルスと CDV の宿主域拡大

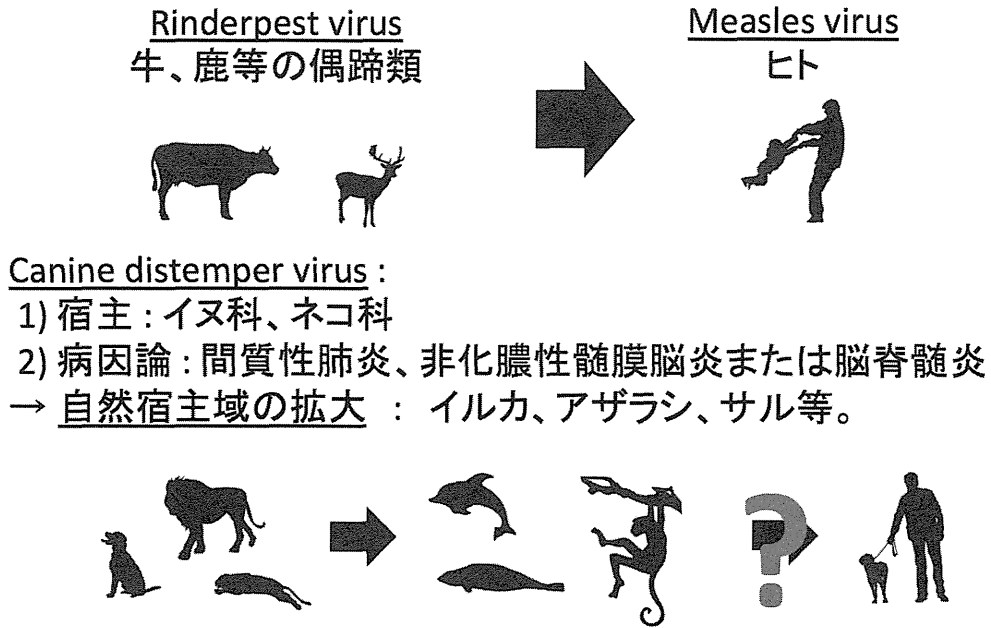


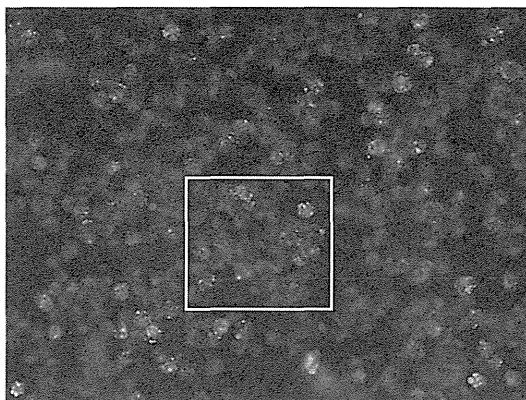
図2. 国内のネコにおけるネコモルビリウイルスの遺伝子陽性率と抗体陽性率

		Virus in urine (n=100)	
		-	+
Virus in Kidney tissue (n=100)	-	78	4
	+	5	13

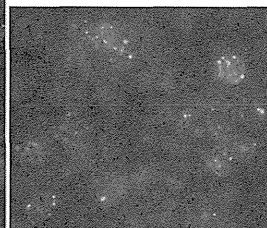
尿または腎組織におけるnested RT-PCR 陽性率 : 22/100 (22%)

尿 : 17/100 (17%)

組織 : 18/100 (18%)



No. N045



IFA 陽性率

IgG : 21/100 (21%)

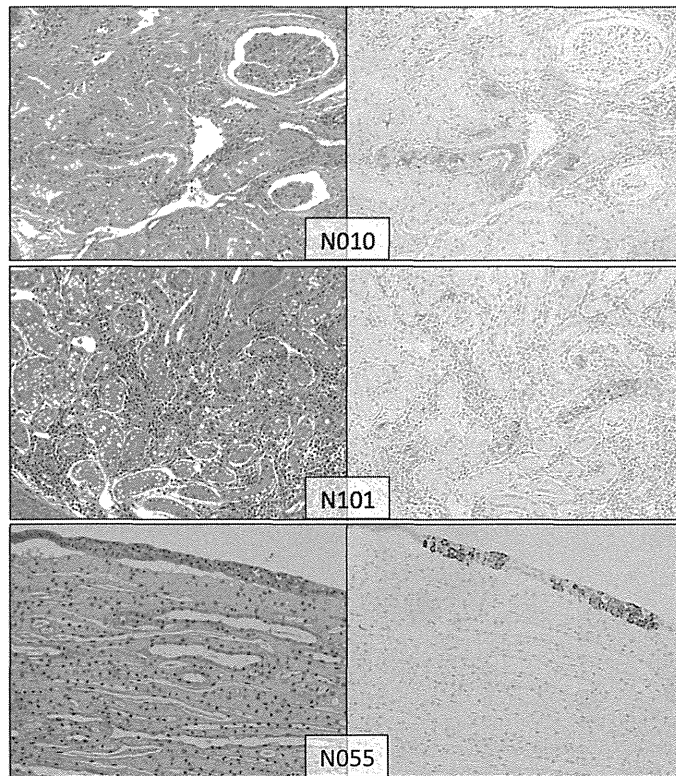
表 1. ネコモルビリウイルス遺伝子または抗体陽性ネコにおける間質性腎炎

FmoPVと間質性腎炎の関連

症例番号	病理学所見	PCR		IFA (IgG)	IHC
		尿	腎		
		+	+	-	++
N007		+	+	10240	++
N010		+	+	>20480	+++
N101		+	+	5120	+++
N110		+	+	1280	++
N134		+	+	160	++
N141		+	+	2560	+
N153		+	+	640	+++
N020	石灰化	+	-	5120	+
N050		+	-	640	++
N104		+	-	1280	++
N028		-	+	5120	++
N040	石灰化	-	+	1280	++
N045		-	+	2560	+
N144	壊死	-	+	640	+
N001		+	+	-	++
N003		+	+	-	+++
N055		+	+	-	+++
N073		+	+	-	+
N076		+	+	-	++
N109		+	+	-	+
N063		-	+	-	++
N065		+	-	-	++
N024		-	-	2560	+
N064		-	-	2560	++
N131		-	-	320	+
N136		-	-	640	++
N138		-	-	320	++
N140		-	-	640	+
N148		-	-	2560	++

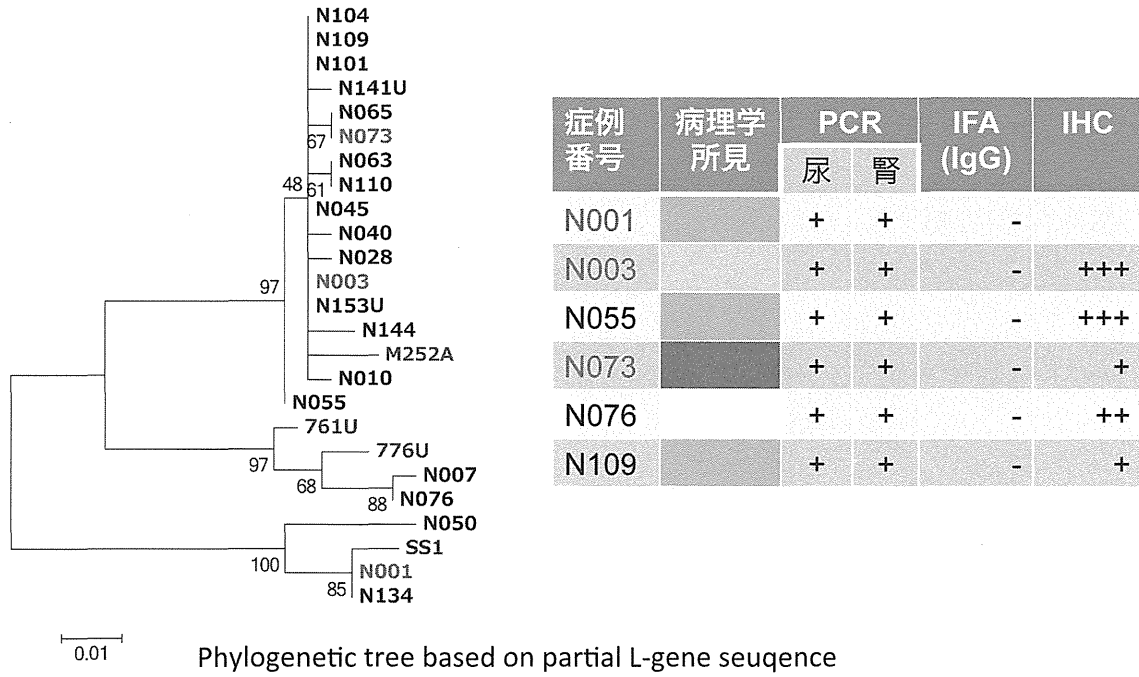
軽度炎症細胞浸潤
 中度間質性腎炎
 重度慢性間質性腎炎
 + 腎盤 軽 陽性 ++ 腎盤 重 陽性 +++ 病変部 陽性

図 3.慢性間質性腎炎の腎組織中の FMoV 抗原の分布



N010, N101 では病変部位の尿細管に、N055 では移行上皮細胞に FMoV 抗原が分布する。

図 4. FMoV の日本株と香港株の分子系統樹



香港株 FMoV 3 株 (M252A, 761U, 776U) と日本株 (その他全て) は 3 つの遺伝子型を形成するが地理的分布と遺伝子型は一致しない。

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)

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

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)

研究協力者：池山優、荒木和子、佐藤 弘、多屋馨子、大石和徳(国立感染症研究所 感染症疫学センター)、川田伸一郎(国立科学博物館)、城ヶ原貴通(岡山理科大)、太田香織(東京都動物園協会)、水谷哲也(東京農工大学)、本川雅治(京都大学)、大館智志、南波興之、鈴木仁(北海道大学)、福井大(和歌山大学)、永田典代(国立感染症研究所 感染病理部)、森川茂(国立感染症研究所 獣医科学部)

研究要旨：ハンタウイルスの分子疫学情報の蓄積のため、引き続きモンゴル、ベトナム、ミャンマー、日本およびロシアのサンプルについて野生小型哺乳類のサンプルを入手しハンタウイルス感染を検索した。これまでに感染を確認したサンプルについては、全長配列の決定の為に継続した配列検索を進めた。これまでベトナムの翼手目から分離した3株の未知のウイルスは、新規の翼手目ヘルペスウイルスであった。一方、北海道のヒメネズミから分離したウイルスは、新規の齧歯目ヘルペスウイルスであった。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ことを推測した。新しい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。今後、新たに明らかになった翼手目由来ハンタウイルスを含め、小型野生動物の未知のウイルスの分子疫学情報をさらに収集する予定である。

A. 研究目的

近年、小型野生動物を自然宿主とするウイルスによるアウトブレイクが複数報告されている。特に2014年2月にギニアから始まったエボラウイルスのアウトブレイクは、

2015年1月23日現在、21,689例の症例と8,626例の死亡が確認され、大きな社会問題となっている。これら動物由来感染症の感染メカニズム、細胞生理や分子疫学情報解析のため、自然宿主の株化細胞が求められている。

特にウイルス感染においては、自然宿主の細胞は、ウイルスを増殖させるだけでなく、感染メカニズムの解析に利用可能で、診断用抗原の作成や免疫応答の解析に利用するなどワクチン開発に必要不可欠なツールとして機能する。これまでハンタウイルスでは、齧歯目が主な自然宿主と考えられてきたものの、2007年以降トガリネズミ形目や翼手目に新しいハンタウイルス感染が報告され、これまで考えられてきた以上に多様な生物がハンタウイルスに感染している事実が明らかになってきた。更に2013年には、本研究班において翼手目の新しいハンタウイルスの存在を明らかにした。そこで、これら小型野生哺乳類の未知のハンタウイルス感染を明らかにするとともに、効率よくウイルスを分離するため、自然宿主である齧歯目、トガリネズミ形目、翼手目の肺や腎臓から初代培養細胞を分離し、ウイルスの分離に利用することを計画した。

B. 研究方法

1) これまでに入手することのできたモンゴル、ベトナム、ミャンマー、日本およびロシアのサンプルについてハンタウイルス共通領域にデザインしたプライマーを用いて新規ハンタウイルスの検索を行った。スクリーニング用プライマーには、S, M, L-segmentsのそれぞれに対してデザインし、できる限り多様なウイルスが検出できるようにデザインした。また、生材料が入手できた場合には、肺および腎臓から可能な限り初代培養細胞を分離

し、未知のウイルス分離用として利用を目指すと共に、これらの細胞から未知のウイルスが検出されるかどうか検索した。

2) 初代細胞の分離は、齧歯目の *Myodes rex*、*Myodes rufocanus*、*Myodes rutilus*、*Apodemus argenteus*、*Apodemus speciosus*、トガリネズミ形目の *Crocidura dsinezumi*、*Sorex gracillimus*、*Sorex caecutiens*、*Sorex unguiculatus*、*Urotrichus talpoides* 翼手目の *Cynopterus brachyotis*、*Hipposideros laravatus*、*Hipposideros pomona*、*Ia io*、*Kerivoula* cf. *papillosa*、*Megaerops niphanae*、*Myotis muricola*、*Myotis siligorensis*、*Phoniscus jagorii*、*Rhinolophus acuminatus*、*Rhinolophus luctus*、*Rhinolophus microglobosus*、*Rhinolophus pearsonii*、*Rhinolophus sinicus*、*Rhinolophus thomasi*、*Rhinolophus* sp.、*Tylonycteris pachypus*、*Tylonycteris* sp.の肺および腎臓を用いた。CPEの認められた初代細胞については培養上清を用いて電子顕微鏡による観察を行い、電子顕微鏡でウイルス様粒子が確認されたサンプルについてシーケンスによる感染ウイルスの同定を行った。

(倫理面からの配慮について)

野生動物の捕獲調査では、可能な限り生存した状態で捕獲し、麻酔科で安楽殺した後に組織を採取した。

C. 研究結果

1) これまでに報告されているハンタウイ

ルスおよびこれまでに検出した齧歯目、トガリネズミ形目、翼手目のハンタウイルス配列からハンタウイルスの起源はユーラシア大陸にあることを推測した(図 1)

- 2) 初代培養細胞の分離に伴い、ベトナムの翼手目から新規ヘルペスウイルスの分離に成功した(図 2)。
- 3) 未知のウイルス感染対策の一環として、多様な生物種から初代培養細胞を分離することを進めた。その結果、新たにベトナムの翼手目や日本のヒミズから初代培養細胞の分離に成功した(図 3)。
- 4) 昨年度の研究で分離していた北海道のヒメネズミから分離した未知のウイルスは、新規齧歯目ヘルペスウイルスであることが明らかになった。

D. 考察

近年、未知のウイルスや新規病原体の解析に次世代シーケンサーを用いた解析が頻繁に用いられるようになってきた。しかしながら、臨床検体を用いた解析では、断片的な結果は得られるものの、宿主の遺伝子配列がノイズとして多数検出され、十分な結果が得られない場合も多数報告されている。そこで、新規ウイルスや未知のウイルス性感染症対策の一環として、これまでに株化細胞が樹立されていない生物種について初代培養細胞を分離し、効率良くウイルス分離するツール作りを進めた。

今回、昨年度の続き、新たに日本のヒミズ(*Urotrichus talpoides*)で初代培養細胞の分離

を試みたところ、培地にサプリメント加えることで良好な増殖を得ることができた。ヒミズの初代細胞分離に利用した培地をコウベモグラについても利用したところ、良好な増殖を認めた。しかしながら、細胞増殖に伴い、コウベモグラに潜在的に感染していたウイルスの再活性化が観察され、強度のCPE(cytopathic effect)が認められ、細胞分離は成功しなかった。また、手技的にも臓器ごとに若干の変更を加えることでこれまで以上に良好な増殖を得られること明らかになってきた。今後、検体数を増やし検証を進める予定である。

今回、未同定のウイルスの塩基配列を決定したところ、3株が新規翼手目ヘルペスウイルスで1株が齧歯目ヘルペスウイルスであった。電子顕微鏡による観察と若干の齧齶が認められたが、サンプル純度等に若干問題があった点が挙げられ、今後改良の必要があると示唆された。

E. 結論

- ① これまでに明らかになった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起源であると推定した。
- ② トガリネズミ形目、齧歯目および翼手目の初代培養細胞の分離に成功した。
- ③ 分離できた初代培養細胞の分離に伴い複数の株にCPEが検出され、シーケンスの結果、新規翼手目ヘルペスウイルスおよび新規齧歯目ヘルペスウイルスの分離に成功した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Yanagihara R, Gu S H, Arai S, Kang H J, Song J W. Hantaviruses: Rediscovery and new beginnings. *Virus Research*. 187:6-14. 2014
- 2) Bennett S N, Gu S H, Kang H J, Arai S, Yanagihara R. Reconstructing the evolutionary origins and phylogeography of hantaviruses. *Trends in Microbiology*. 8:473-482. 2014
- 3) Gu S H, Lim B K, Kadjo B, Arai S, Kim J A, Nicolas V, Lalis A, Denys C, Cook J A, Dominguez S R, Holmes K V, Urushadze L, Sidamonidze K, Putkaradze D, Kuzmin IV, Kosoy M Y, Song J W, Yanagihara R. Molecular phylogeny of hantaviruses harbored by insectivorous bats in Côte d'Ivoire and Vietnam. *Viruses*. 6:1897-1910. 2014

2.学会発表

- 1) Ikeyama, Y., Arai, S., Boldgiv, B., Boldbaatar, B., Araki, K., Satoh, H., Tanaka-Taya, K., Morikawa, S., Yanagihara, R., Oishi, K. Co-circulation of two distinct divergent hantaviruses in *Sorex* species in Mongolia. XVIth International Congress of Virology, Montréal, Canada (2014. 07-08)
- 2) 池山優, 新井 智, Hae ji Kang, 大館智志, Kyle Taylor, 中田圭亮, 雲野明, 荒木和子, 佐藤弘, 多屋馨子, 森川茂, Richard

Yanagihara, 大石和徳. Sarufutsu virus ; オオアシトガリネズミに感染を確認した新規ハンタウイルス. 第 157 回日本獣医学会, 札幌, (2014. 9)

- 3) 新井智, 池山優, Bazartseren Boldgiv, Bazartseren Boldbaatar, 荒木和子, 佐藤弘, 多屋馨子, 森川茂, Richard Yanagihara, 大石和徳. モンゴルのトガリネズミに確認された遺伝的に異なるハンタウイルスの共循環. 第 157 回日本獣医学会, 札幌, (2014. 9)
- 4) 新井 智, 池山優, Se Hun Gu, Son Truong Nguyen, 福井大, 大館智志, 吉川泰弘, 森川茂, 荒木和子, 佐藤弘, 多屋馨子, Richard Yanagihara, 大石和徳. ベトナムの翼手目由来に確認されたハンタウイルスの多様性. 第 62 回日本ウイルス学会, 神奈川県, (2014. 11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

図1. 世界各地のハンタウイルスの地理的系統関係
(全てのウイルスがアジアタイプから分岐している)

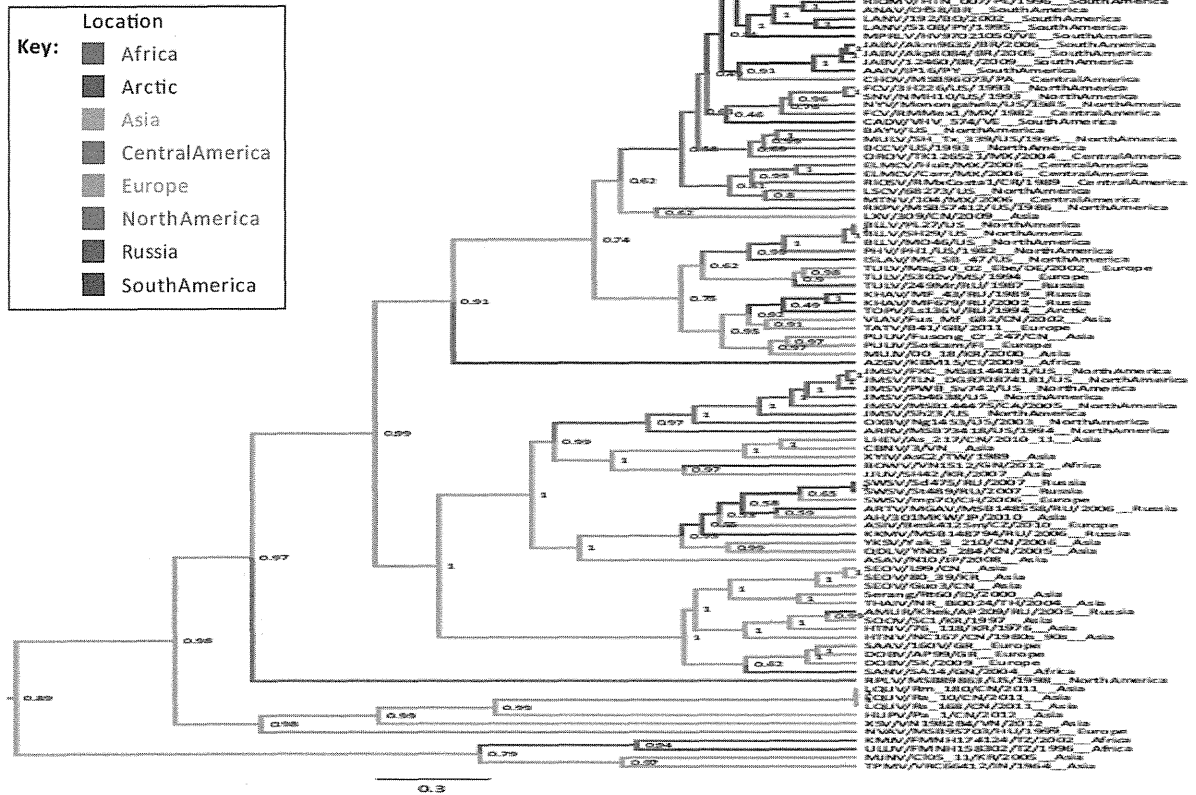


図2. 翼手目および齧歯目から分離した新規ウイルス

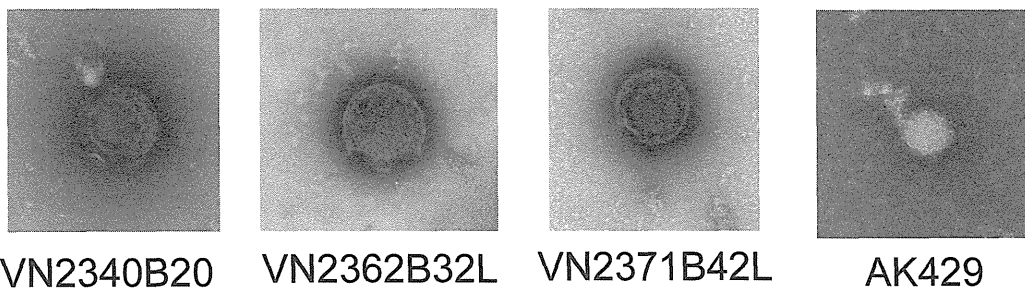
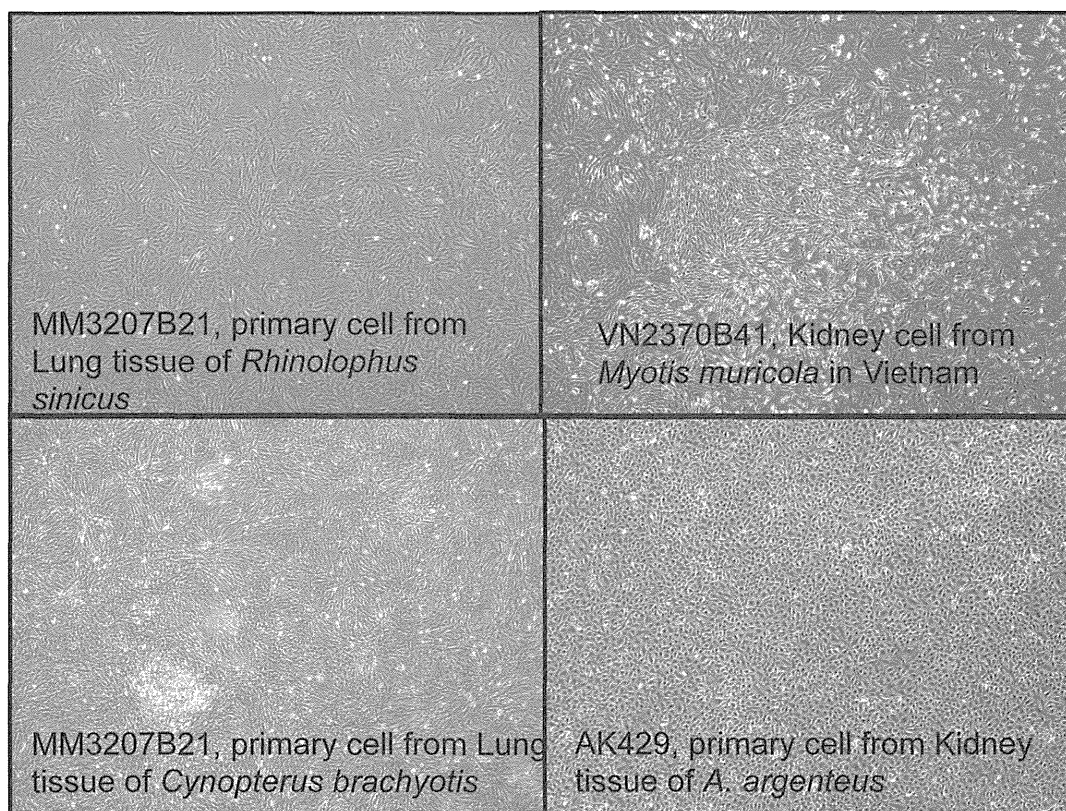


図3. 翼手目および齧歯目から分離した初代培養細胞



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)

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

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：濱本紀子、宇田晶彦、野口章、加来義浩、奥谷晶子 (同 獣医科学部)、飛梅実 (同 感染病理部)、朴天鎬 (北里大学 獣医病理学研究室)

研究要旨：狂犬病ウイルス (RV) は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、野外株である街上毒を実験室内継代等で弱毒化させた固定毒は容易に中和抗体を誘導し、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。本研究では、狂犬病ワクチンの標的である G 蛋白質の細胞内における発現様式・動態を明らかにして、現行の暴露後予防的治療をより効果的・安価に行える方法の開発を可能にするために、Kyoto 株 (街上毒) と CVS-26 株 (固定毒) の G 蛋白質の細胞内発現とその局在を *in vitro* で比較解析した。Kyoto 株組み換え G 蛋白質をマウス神経芽腫由来 MNA 細胞に発現させると G 蛋白質は核周囲小胞体に分布し細胞膜に分布しないが、CVS-26 株 G 蛋白質の多くは細胞膜に分布し、両株 G 蛋白質の N 型糖鎖付加を阻害させると核周囲小胞体に分布すること、また、Kyoto 株 G 蛋白質の第 204 位アミノ酸を N 型糖鎖付加部位に置換すると細胞膜に分布することを明らかにした。固定毒化が進んでいる CVS-26 株 G 蛋白質の第 204 位アミノ酸を N 型糖鎖付加部位に変異させても一部が細胞膜に分布したことから、第 204 位の N 型糖鎖付加は G 蛋白質の細胞膜輸送を規定するが、これ以外にも細胞膜輸送に関与する因子が存在することが示唆された。街上毒が固定毒化の過程で獲得した細胞膜からのウイルス粒子の発芽や宿主の免疫応答の亢進に、G 蛋白質 204 位への N 型糖鎖付加が大きく関与しており、糖鎖付加によって小胞体等から細胞膜への蛋白質輸送が可能になることを明らかにした。

A. 研究目的

狂犬病ウイルスは、ラブドウイルス科リッサウイルス属に属し、野外流行株である街上毒と街上毒を実験室内で継代することによって宿

主に対する末梢感染性が減弱して潜伏期間が短縮・一定化し、さらには免疫誘導能が増強した固定毒 (ワクチン株・実験株) に分けることができる。

電子顕微鏡で感染細胞を観察すると、街上毒では細胞膜からウイルスが出芽する像が観察されないが、固定毒では細胞膜から高頻度に出芽している像が報告されており、街上毒の固定毒化に伴う培養細胞でのウイルス増殖効率の上昇やマウスに対する病原性の低下は狂犬病ウイルス G 蛋白質の糖鎖修飾と関連していると考えられている。

街上毒株と固定毒株で比較解析を行うことにより、街上毒が固定毒化する過程で獲得した表現型について弱毒化の機序を解明することができれば、狂犬病の発症機序を明らかにして、現行の暴露後予防的治療をより効果的・安価に行える方法の開発が可能になる。

本研究では、街上毒が固定毒化する過程で G 蛋白質の N 型糖鎖付加部位が増加することに着目し、分子生物学的・免疫組織学的手法を用いて街上毒 Kyoto 株と固定毒 CVS-26 株の組み換え G 蛋白質の糖鎖付加部位に種々の変異を導入し、G 蛋白質の N 型糖鎖修飾と細胞内局在について比較解析を行った。

B. 研究方法

分子生物学的・免疫組織学的手法により、街上毒 Kyoto 株と固定毒 CVS-26 株の組み換え G 蛋白質を作製して、N 型糖鎖修飾の違いによる細胞内局在について比較解析を行った。

細胞：狂犬病ウイルス G 蛋白質の発現には、マウス神経芽細胞腫（MNA）細胞を用い、MEM-10% FBS で培養した。

N 型糖鎖付加部位へ変異導入した組換え G 蛋白質発現プラスミドの作製：PrimeSTAR mutagenesis Basal kit（TAKARA）を用いて、pzKyoto-G および pzC26-G の潜在的糖鎖付加部位への変異導入を行った（図 1）。変異導入の確認は遺伝子配列を決定して確認した。変異導入 G 蛋白質の cDNA を挿入したプラスミド、pzKyoto-G(S204N)、pzC26-G(N204S)、pzC26-G

(N37S)、pzC26-G(N319Q)、pzC26-G (N204S, N319Q)、pzC26-G(N37S, N204S, N319Q) を作製した。これらにより図 1 に示す変異導入 G 蛋白質が発現される。

トランスフェクション：6 穴プレートまたは CELLview4 分画ガラスボトムシャーレ（Greiner Bio-One）に培養した MNA 細胞に上記プラスミドトランスフェクションし、48 時間培養後に WB と IFA により発現した G 蛋白質を解析した。

C. 研究結果

G 蛋白質単独発現細胞における G 蛋白質の分布：Kyoto 株および CVS-26 株の G 蛋白質発現プラスミドをトランスフェクションした MNA 細胞において、Kyoto 株由来の組換え G 蛋白質(Kyoto rG)は細胞質内の小胞体だけに分布し、CVS-26 株由来の組換え G 蛋白質 (CVS-26 rG) は、細胞質内（小胞体）及び細胞膜に分布した（図 2, 3）。また、CVS-26 rG 発現時にツニカマイシンを添加すると G 蛋白質は小胞体に分布した。

Kyoto 株と CVS-26 株の G 蛋白質の N 型糖鎖修飾：MNA 細胞に発現させた Kyoto rG は、CVS-26 rG よりも分子量が小さかった。Kyoto rG と CVS-26 rG はツニカマイシン存在下で発現したり、発現蛋白を PNGase F 処理すると同等の分子量を示したことから、Kyoto rG よりも CVS-26 rG の方が N 型糖鎖が多いことが明らかとなった。

第 204 位アミノ酸の N 型糖鎖に影響する変異導入の組換え G 蛋白質の分子量と細胞内分布に与える影響：Kyoto 株と CVS-26 株の G 蛋白質遺伝子の配列をもとに、アミノ酸配列を確認したところ、Kyoto 株 G 蛋白質は、第 37 位アミノ酸と、第 319 位アミノ酸の 2 か所が潜在的な N 型糖鎖付加部位であるのに対し、

CVS-26 株 G 蛋白質では、第 37 位アミノ酸と、第 319 位アミノ酸に加え、第 204 位アミノ酸が潜在的な N 型糖鎖付加部位 (Asn-Lys-Thr) であった。Kyoto 株 G 蛋白質では、第 204 位アミノ酸はセリンで潜在的 N 型糖鎖付加部位ではない (Ser-Lys-Thr)。Genbank に登録された街上毒の G 蛋白質では、第 204 位アミノ酸が潜在的 N 型糖鎖付加部位である株はなかった。

そこで街上毒 Kyoto 株の G 蛋白質には存在しない第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加が、G 蛋白質の細胞内局在に与える影響を調べるために、Kyoto 株 G 蛋白質の第 204 位アミノ酸をセリンからアスパラギンに変異導入して N 型糖鎖付加配列にした組換え G 蛋白質 [Kyoto rG (S204N)] と、CVS-26 株由来の G 蛋白質の第 204 位アミノ酸をアスパラギンからセリンに変異導入して糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [CVS-26 rG (N204S)] を MNA 細胞に発現させた。その結果、これらの変異導入 G 蛋白質の分子量を、それぞれ Kyoto rG および CVS-26 rG と比較した結果、Kyoto rG (S204N) は、Kyoto rG よりも分子量の大きなバンドと、Kyoto rG とほぼ同じ分子量のバンドに分かれた。CVS-26 rG (N204S) は、Kyoto rG と同程度の分子量のバンドと、CVS-26 rG と同程度の分子量のバンドに分かれた (図 4)。

また、Kyoto rG (S204N) は、細胞膜への分布が認められた。一方、CVS-26 rG(S204N)は、CVS-26 rG と同様に細胞膜への分布が依然認められたものの、細胞質内では Kyoto rG と同様に核周囲に多くの G 蛋白質の分布が見られるようになった。

第 37 位と第 319 位アミノ酸の N 型糖鎖に影響する変異導入の CVS-26 株 G 蛋白質の分子量と細胞内分布に与える影響：CVS-26 株 G 蛋白質の第 37 位アミノ酸と第 319 位アミノ酸への N 型糖鎖付加が G 蛋白質の細胞内局在を規定しているかを明らかにするために、第 37 位アミノ酸をアスパラギンからセリンへ変

異させ N 型糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [CVS-26 rG (N37S)] と第 319 位アミノ酸をアスパラギンからグルタミンに変異させ N 型糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [CVS-26 rG (N319Q)] を MNA 細胞に発現させた。その結果、CVS-26 rG (N37S) は CVS-26 rG と同じ分子量であったが、CVS-26 rG (N319Q) は CVS-26 rG よりも分子量が低下していた (図 5)。さらに、第 204 位アミノ酸と第 319 位アミノ酸の N 型糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [CVS-26 rG (N204S, N319Q)] を発現させると、ツニカマイシン存在下で発現させた CVS-26 rG と同じ分子量の蛋白質が大部分であったが、それより分子量の大きいバンドが少量認められた (図 5)。

これらの結果から、CVS-26 株の G 蛋白質の第 37 位の N 型糖鎖付加配列には効率よく N 型糖鎖修飾されていないと考えられる。

また、CVS-26 rG (N37S) と CVS-26 rG (N319Q) は細胞膜へ分布したが、CVS-26 rG (N319Q) の細胞膜への分布は CVS-26 rG と比べて減少した。CVS-26 rG (N204S, N319Q) も、細胞膜への分布は認められたが、CVS-26 rG (N319Q) と比べて細胞膜への分布はさらに減少した。3 か所の潜在的 N 型糖鎖付加部位を完全に欠失させた CVS-26 rG (N37S, N204S, N319Q) は、細胞膜へは分布しなかった。

D. 考察

狂犬病ウイルスの G 蛋白質を単独で MNA 細胞に発現させた場合でも、Kyoto 株と CVS-26 株を MNA 細胞に感染させた場合と同様に、Kyoto 株の rG 蛋白質は細胞膜に分布せず小胞体に局在し、CVS-26 株由来の rG 蛋白質は細胞膜に分布した (図 2, 3)。粗面小胞体で G 蛋白質が合成された後に Kyoto rG が小胞体に留まるのに対して、CVS-26 rG は細胞内の糖蛋白質輸送経路を利用してゴルジ体経由で細胞膜に輸送されると考えられる。これは、固定毒のウイルス粒子が細胞膜から主に出芽するのに

対して、街上毒のウイルス粒子は細胞膜からはほとんど出芽せず、小胞体やゴルジ体などの細胞内小器官の膜から細胞質内に出芽する知見と一致する。つまり、狂犬病の G 蛋白質がウイルス粒子形成部位を規定すると思われる。

G 蛋白質の潜在的 N 型糖鎖付加部位は、街上毒では 1~2 か所であるのに対し固定毒では 3~4 か所ある。実際、CVS-26 rG 蛋白質は Kyoto rG よりも多くの N 型糖鎖が付加されていた。

また、ツニカマイシンを培地に添加して、Kyoto rG と CVS-26 rG を発現させると、Kyoto rG はツニカマイシンの有無にかかわらず小胞体へ局在したが、CVS-26 rG ではツニカマイシン処理により細胞膜への局在が無くなり、小胞体にものみ局在したことから、CVS-26 rG に存在し Kyoto rG に存在しない N 型糖鎖付加が細胞膜局在に必要であると考えられた。

そこで、各種変異導入 G 蛋白質を発現して局在を調べた。その結果、第 204 位に N 型糖鎖付加部位を導入した Kyoto rG (S204N) は細胞膜へ分布したことから、第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加は G 蛋白質が細胞膜輸送に重要であると考えられる。一方、CVS-26 rG(N204S)では、一部の G 蛋白質の細胞膜への分布が認められたことと、CVS-26 rG(N204S)の大部分は CVS-26 rG よりも分子量が小さくなるものの、一部は CVS-26 rG と同等の分子量であることから、第 204 位の糖鎖修飾が阻害されるとほかの潜在的 N 型糖鎖付加部位へ糖鎖が付加されることが示唆された。

CVS-26 rG(N204S)の一部が細胞膜に分布した原因を明らかにするために、第 37 位アミノ酸と第 319 位アミノ酸への糖鎖付加部位を欠失させた。第 37 位アミノ酸への糖鎖付加部位を欠失させた CVS-26 rG(N37S)の分子量は、CVS-26 rG と同等の分子量を示したことから、第 37 位アスパラギンにはほとんど N 型糖鎖が付加されないことが示された。第 204 位の N 型糖鎖付加を欠失させた CVS-26 rG (N204S) と第 204 位と第 319 位の N 型糖鎖付加配列を

欠失させた CVS-26 rG (N204S、N319Q) では、糖鎖修飾のない G 蛋白質に相当する分子量とより大きい分子量の二種類の G 蛋白質が認められたことから、これらの組換え G 蛋白質では一部の第 37 位アスパラギンに N 型糖鎖が付加されていたことが示された。

CVS-26 rG (N37S)と第 319 位アミノ酸への糖鎖付加部位を欠失させた CVS-26 rG(N319Q)は細胞膜に分布したが、CVS-26 rG (N319Q) の細胞膜への分布は CVS-26 rG や CVS-26 rG (N37S) と比較して明らかに低下したことから、第 319 位アスパラギンへの N 型糖鎖付加も G 蛋白質の細胞膜への分布に関与することが示唆された。3 か所の N 型糖鎖付加配列を全て欠失させた CVS-26 rG (N37S、N204S、N319Q) は細胞膜へ分布せず、核周辺にものみ局在したことから N 型糖鎖が CVS-26 rG の細胞膜への輸送に必要な不可欠であることが示された。

今後、Kyoto 株の G 蛋白質と CVS-26 株の G 蛋白質について、第 204 位アミノ酸への変異導入による蛋白質の立体構造の変化を詳細に調べることで、固定毒化の機序をさらに究明できると考えられる。

E. 結論

街上毒の Kyoto 株の G 蛋白質の第 204 位のアミノ酸への糖鎖付加は、G 蛋白質の局在を小胞体から細胞膜にシフトさせることからこの部位の糖鎖修飾が街上毒と固定毒の性状の違いに関わる大きな要因であると考えられた。固定毒の CVS-26 株の G 蛋白質は第 204 位のアミノ酸の N 型糖鎖付加以外にも細胞膜輸送に関与する糖鎖修飾があることも示された。

本研究によって、街上毒が固定毒化する過程で獲得した G 蛋白質の第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加が、ウイルス粒子の細胞膜からの出芽や宿主の免疫応答の亢進に関与している可能性が示唆され、街上毒が固定毒化する過程で獲得した新たな N 型糖鎖付加部位がどのよう

に固定毒の中和抗体誘導に係るかを解明できれば、現行の暴露後予防的治療をより効果的・安価に行う方法の開発に寄与できると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1.論文発表

1) Hamamoto N, Uda A, Tobiume M, Park C-H, Noguchi A, Kaku Y, Okutani A, Morikawa S, Inoue S. Association between RABV G Proteins Transported from the Perinuclear Space to Cell Surface Membrane and N-glycosylation of the Sequon at Asn204. Japanese Journal of Infectious Diseases. In press. 2015

2.学会発表

- 1) 西條政幸. ヘルペスウイルスによる中枢神経感染症. 第16回日本神経感染症学会学術集会、東京、(2014.11)
- 2) 高橋有里花、篠崎春美、矢野川祥子、君付和範、Hassadin Boonsriroj、Daria L. Manalo、井上 智、朴天鎬. 狂犬病発病犬の唾液腺に関する病理学的研究. 第157回日本獣医学会学術集会、北海道、(2014.9)
- 3) 篠崎春美、高橋有里花、矢野川祥子、君付和範、Hassadin Boonsriroj、Daria L. Manalo、井上 智、朴天鎬. 狂犬病発病犬の口唇皮膚におけるウイルス抗原の局在と診断的有用性. 第157回日本獣医学会学術集会、北海道、(2014.9)
- 4) 山田健太郎、渡辺一平、アハメド カムルディン、Daria L. Manalo、Miranda Mary、Lapiz Stella、Tapdasan Emerson、Petspophonsakul Wilaiwan、井上 智、朴天鎬、Khawplod Pakamat、西園 晃. イムノクロマト法をベースにした狂犬病ウイルス中和抗体価迅速検出キットのイヌ血清を用いた多国的評価. 第157回日本獣医学会学術集会、第157

回日本獣医学会学術集会、北海道、(2014.9)

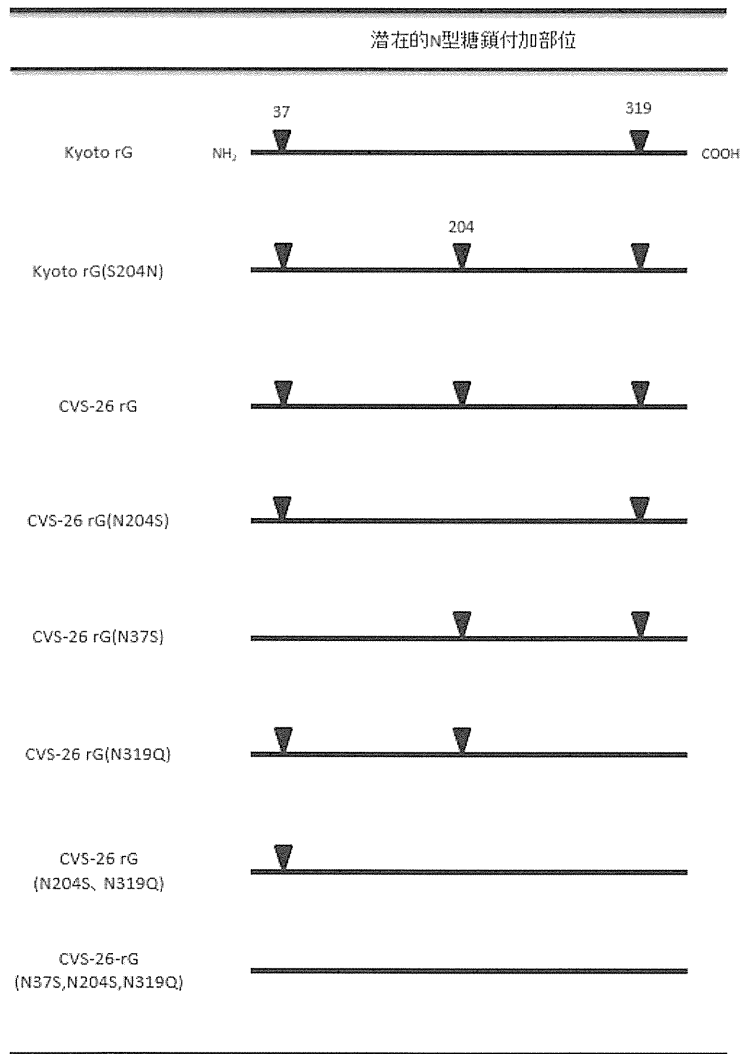
- 5) 加来義浩、奥谷晶子、河合康洋、野口 章、濱本紀子、梁瀬 徹、加藤友子、新井 智、井上 智、森川 茂. 国内で分離された未分類のラブドウイルスの遺伝学的解析. 第157回日本獣医学会学術集会、第157回日本獣医学会学術集会、北海道、(2014.9)
- 6) 松浦真翔、鶴田一郎、坊菌慶信、山田健太郎、井上智、三澤尚明. 官学連携による狂犬病診断体制の構築. 平成26年度獣医学術九州地区学会、鹿児島、(2014.10)
- 7) 景岡美穂、李松熹、加来義浩、井上 智、長棟輝行、河原正浩. 細胞増殖を指標とした細胞内抗体選 択法の開発. 2014年度細胞アッセイ研究会シンポジウム「細胞アッセイ技術の現状と将来」、東京、(2015.1)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

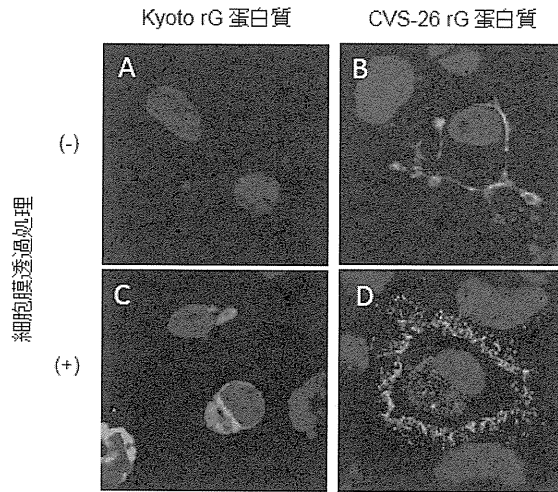
1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

図1. 組換え G 蛋白質の糖鎖付加部位



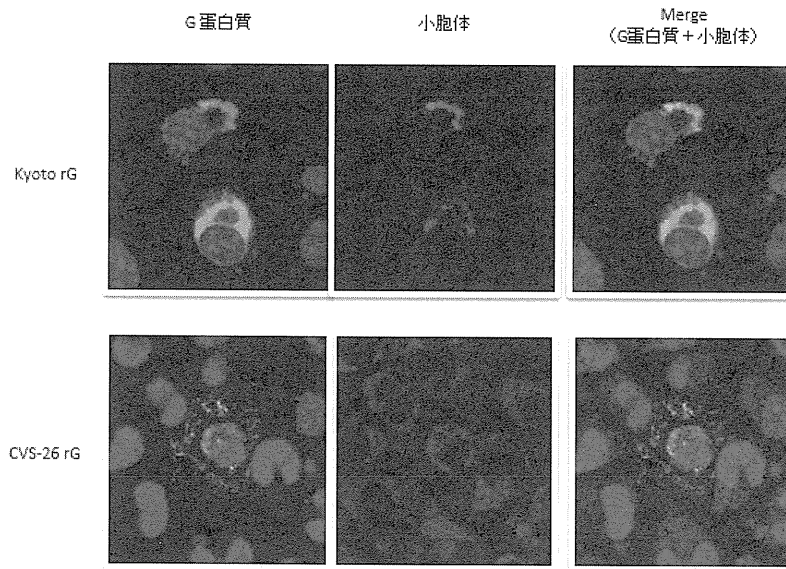
▼ N型糖鎖付加配列(N-X-SまたはN-X-T(Xはプロリン以外))のアスパラギンの位置。番号は成熟G蛋白質のN末端アミノ酸を1番として数えた。

図 2. 組み換え G 蛋白質の細胞内分布



Kyoto 株の組換え G 蛋白質発現細胞(A、C)と、CVS-26 株の組み換え G 蛋白質発現細胞(B、D)を、ホルマリン固定後、抗 G モノクローナル抗体 7-1-9 で染色したもの(A、B)と 0.2%Triton-X100 処理により細胞膜の透過処理を行い(C、D) 染色した。対比染色として DAPI で核を染色した。緑色蛍光：rG 蛋白質。青色蛍光：核。

図 3. 組み換え G 蛋白質の細胞内分布



G 蛋白質発現プラスミドを MNA 細胞にトランスフェクションし、48 時間培養した後ホルマリン固定し、Triton X-100 による透過処理を行った。その後、抗 G モノクローナル抗体 7-1-9 で染色し、ER Red dye による小胞体の染色、DAPI による核染色により、G 蛋白質の局在を調べた。緑色蛍光：rG 蛋白質。赤色蛍光：小胞体。青色蛍光：核