

厚生労働科学研究費補助金 [ 新興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 ) ]

## 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中毒の 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 シール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。(11) 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、国内で発生がない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ッ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、カニクイ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) 野兔病の病原性発現機構の解析：

野兔病菌は非常に高い感染性と病原性を有しており、野兔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兔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、野兔病菌 *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、野兔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のか等、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チ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となった。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）。

#### 1 2 )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ри、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的感染症を起すもの、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的感染症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、野兔病菌、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。これらの検出系につい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た。

#### E. 結論

(1)サルに致死性の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)ニホンザルに致死的なレトロウイルス 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市毒の 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。(11)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性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性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。