

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)]

研究分担者報告書

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クエ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

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。

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。

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)

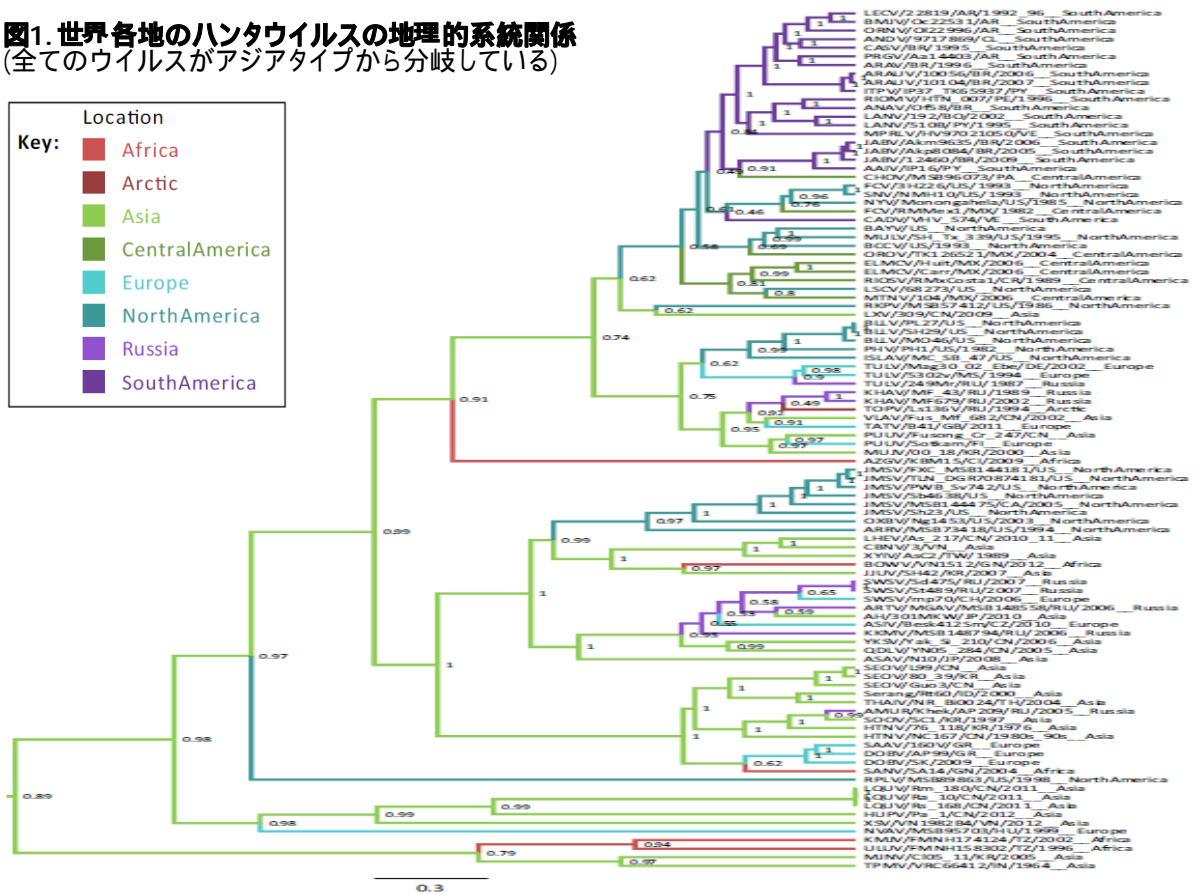


図2. 翼手目および齧歯目から分離した新規ウイルス

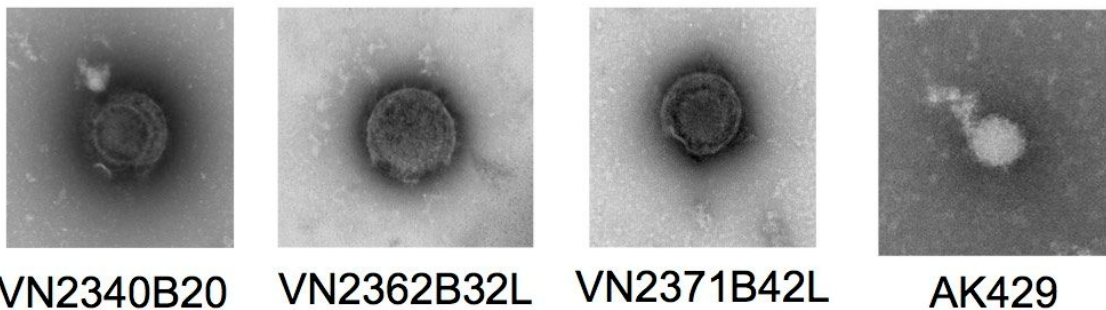


図3. 翼手目および齧歯目から分離した初代培養細胞

