

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)

分担研究課題：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

研究分担者：前田健 (山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室)

研究協力者：下田宙、高野愛、鎌田龍星、寺田豊、米満研三、濱崎千菜美 (同)

研究要旨：野生動物を中心とした動物由来感染症病原体の保有状況を把握するために、本年度は、新規発見したラブドウイルスであるニシムロウイルスのイノシシでの疫学調査、別のグループが発見したフレボウイルスとトーゴトウイルスのイノシシでの疫学調査を実施した。更に、フェレットにおける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発見した。

A. 研究目的：

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。本研究は野生動物の保有する動物由来ウイルスの探索を目的として、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。

B. 研究方法：

1) 検査材料

有害鳥獣あるいは狩猟期に捕獲された動物、死亡個体から血清あるいは臓器を回収して検査に供試した。

ダニは、旗振り法にて回収、または動物に付着していたものを検査に供試した。

2) 抗体検出系

ニシムロウイルス感染および Mock 感染 Vero 細胞より抗原を抽出し、ELISA 用抗原に用いた。また新規フレボウイルス、新規トーゴトウイルス感染 Vero 細胞も同様にして抽出し、ELISA 抗原として用いた。ELISA プレートにそれぞれ 0.5 μ g を吸着させ、ブロックエースによりブロッキング後、1:100 希釈の動物血清を 1 次抗体、Protein A/G を 2 次抗体として用い、発色は Peroxidase substrate kit (Bio-Rad) を用いて実施した。感染細胞抗原ウェルの吸光度を Mock 感染細胞抗原ウェルの吸光度で引くことにより、特異的吸光度とした。

3) 新規フラビウイルスの遺伝子検出

血清から QIAamp viral RNA mini kit、あるいは肝臓とダニから RNeasy mini kit を用いて RNA を抽出後、プライマー-cFD2 と MAMD と QIAGEN OneStep RT-PCR kit を用いて、RT-PCR を実施した。さらに nested プライマー-cFD2 と FS778 を用いて nested PCR を実施した。電気泳動にて特異バンドを確認後、塩基配列を決定した。

4) フェレットコロナウイルス抗体検出系の作出

大腸菌にてフェレットコロナウイルス Yamaguchi 株のヌクレオカプシド(N)蛋白の N 末端側 (1-179) と C 末端側 (180-374) を GST 融合蛋白として大腸菌にて発現・精製を行った。精製 GST 融合蛋白および GST 蛋白を ELISA プレートにそれぞれ 0.5 μg を吸着させ、ブロックエースによりブロッキング後、1:100 希釈の動物血清を 1 次抗体、Protein A/G を 2 次抗体として用い、発色は Peroxidase substrate kit (Bio-Rad) を用いて実施した。GST 融合蛋白を抗原としたウェルの吸光度を GST 蛋白を抗原としたウェルの吸光度で引くことにより、特異的吸光度とした。

(倫理面からの配慮について)

野生動物：有害鳥獣として捕獲された個体、死亡個体、狩猟期に捕獲された個体から材料を採取している。

フェレット：飼育者に調査研究に用いることの許可を得ている。

C. 結果：

1) 新規ラブドウイルスであるニシムロウイルスの疫学調査

我々がイノシシの血清中から新規に分離したニシムロラブドウイルスは、イノシシ、シカ、ウシ、ブタに感染することが明らかになっている。しかし、その感染環に関しては不明な点が多い。今回、ニシムロラブドウイルスに対する抗体の検出を目的として、ELISA 系の確立を行った。その結果、吸光度 0.2 で多くの陰性個体が排除できることが判明した (図 1)。そこで、山口県と栃木県のイノシシの疫学調査を実施した結果、山口県で 43.1% のイノシシが感染していることが判明した (表 1)。栃木県のイノシシは 1.1% であったが、これは非特異反応によるものと考えられた (表 1)。今後は、栃木県のイノシシは全て陰性と考えて、Average + 3*SD を Cut-off 値と設定して、調査を継続する必要がある。

2) 新規フレボウイルスの疫学調査

イノシシにおけるダニから分離された新規フレボウイルスの抗体保有率を調査した。Cut-off 値は暫定的に 0.5 として判定した結果、栃木県では 69% の抗体陽性率で最も高かったが、全国に本ウイルスが蔓延していることが確認された。

3) 新規トーチトウイルスの疫学調査

イノシシにおけるダニから分離された新

規トーチウイルスの抗体保有状況の調査を実施した。Cut-off 値は暫定的に 0.5 とし判定した結果、栃木県のイノシシには感染していないことが判明した。今後は、栃木県のイノシシは全て陰性と考えて、Average + 3*SD を Cut-off 値と設定して、調査を継続する必要がある。一方、西日本では多くのイノシシが陽性となった。

4) 新規血清型のフェレットコロナウイルスの発見

フェレットコロナウイルスは 2000 年に初めて見つかった新興感染症である。我々は、国内におけるフェレットコロナウイルスの遺伝子解析を行ってきた。しかし、ウイルスが未分離であることから抗体の検出方法が確立されていない。そこで、我々は、コロナウイルスで比較的保存されており、抗原性が高いヌクレオカプシドプロテイン (N) 蛋白を大腸菌にて発現し、抗体検査用の抗原として用いた。N 末端領域 1-179 番目のアミノ酸を GST 蛋白と融合した蛋白 N(1-179) と C 末端領域の 180-379 番目のアミノ酸を GST 蛋白と融合した N(180-379) を発現・精製後、ELISA 抗原として用いた。その結果、多くのフェレット血清は N(1-179) と N(180-379) に同じように反応したが、2 頭の血清は N(1-179) とはよく反応したが、N(180-379) とはほとんど反応しなかった(図 3、白丸)。このうち一頭の No.22 はウイルス遺伝子も検出されていたのでコロナウイルス共通プライマーで遺伝子解析を実施し

系統樹を作成した結果、これまで報告されているフェレットコロナウイルスとは異なるクラスターに位置することが判明した(図 4)。更に、フェレットから検出されるコロナウイルスの遺伝子解析を行った結果、No.160 も同様のウイルスに感染していることが判明した(図 4)。この結果、フェレットコロナウイルスには、抗原性の異なる新規のウイルスが存在することが示された。

5) 新規フラビウイルスの遺伝子検出

野生動物およびダニからのフラビウイルスの遺伝子の検出を目的として、フラビウイルス共通プライマーを用いて、semi-nested RT-PCR を実施した。その結果、シカの血清から日本脳炎ウイルス、シカおよびイノシシの血清とダニ体内から同じ新規フラビウイルス、イノシシの肝臓からダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)様新規フラビウイルス遺伝子が検出された(表 2)。塩基配列を決定した結果、今回、イノシシ、シカ、ダニから検出された新規フラビウイルスは全く新しいウイルスである可能性が示唆された(図 5)。また、北海道以外で TBEV 様ウイルスが検出されたのは初めてである。

D. 考察：

1) 新規ラブドウイルスであるニシムロウイルスは非常に多くの動物種に感染していることが判明した。また、地

域差もありそうである。しかし、その感染環やベクターの存在に関しては不明である。ヒトへの感染状況なども調査する必要があるのかもしれない。

- 2) 新規フレボウイルス、新規トーチウイルスとともに少なくともイノシシにおいて広く蔓延していることが判明した。新規トーチウイルスはサルへの感染も検出された（現在確認中）。両ウイルスの感染環並びにヒトへの感染状況を調査する必要がある。
- 3) フェレットのおいても異なるウイルスが2種類感染していることが証明された。コロナウイルスは、様々な変異を引き起こして、異種間伝播や高病原性を獲得することがある。今後も、調査の継続が必要である。
- 4) 北海道以外で初めてダニ媒介性脳炎様フラビウイルスが検出された。ヒトへの感染を調べるとともに、ウイルス分離をする必要があるだろう。
- 5) ダニとイノシシとシカから共通の新規フラビウイルスが検出された。様々な動物に感染することから、ヒトへの感染を調べるとともに、ウイルス分離をする必要があるだろう。

E. 結論

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。ヒトへの感染を含めて感

染環を詳細に解析する必要がある。

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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimoda H, Saito A, Noguchi K, Terada Y, Kuwata R, Akari H, Takasaki T, Maeda K*. Seroprevalence of Japanese encephalitis virus infection in captive Japanese macaques (Macaca fuscata). *Primates*. 2014 Jul; 55(3): 441-445.
- 2) Hara Y, Terada Y, Yonemitsu K, Shimoda H, Noguchi K, Suzuki K, Maeda K*. High prevalence of hepatitis E virus in wild boar in Yamaguchi Prefecture, Japan. *Journal of Wildlife Diseases* 2014;50(2):378-383.
- 3) Terada Y, Minami S, Noguchi K, Mahmoud H.Y.A.H., Shimoda H, Mochizuki M, Une Y, Maeda K*. Genetic characterization of coronaviruses from domestic ferrets in Japan. *Emerging Infectious Diseases* 2014 Feb; 20(2): 284-287.
- 4) 鎌田龍星, 杉山弘樹, 下田 宙, 前田 健 「蚊が保有・媒介するウイルス感染症」(総説) *Japanese Journal of Veterinary Parasitology*. 13(2); 91-101
- 5) 米満研三、服部志保、鈴木准子、浜崎千

- 菜美、下田 宙、前田 健「ニホンイノシシのウイルス感染症」兵庫県におけるニホンイノシシの管理の現状と課題（兵庫県森林動物研究センター研究部編集）第8章 p93-105，2014
- 6) 前田 健：「イヌジステンパーウイルスの今」*Companion Animal Practice* 2014. Apr: 298: 47-50 (緑書房)
- 2.学会発表
- 1) 米満研三、原由香、寺田豊、高野愛、下田宙、小寺祐二、竹田努、前田 健「新規開発 ELISA を用いた野生動物における E 型肝炎ウイルス感染状況調査」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜市(パシフィコ横浜) (2014.11.10-11)
- 2) 鎌田龍星、杉山弘樹、米満研三、服部志保、鈴木絢子、南昌平、濱崎千菜美、寺田豊、谷口雅康、下田宙、前田 健「牛舎捕集蚊の消長と分離ウイルスについて」第 21 階トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、横浜市（パシフィコ横浜）(2014.11.9)
- 3) 米満研三、下田宙、鎌田龍星、寺田 豊、高野愛、前田 健「野生動物、ダニからフラビウイルス遺伝子検出」第 21 階トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、横浜市（パシフィコ横浜）(2014.11.9)
- 4) 下田 宙、米満研三、早坂大輔、好井 健太朗、寺田 豊、野口慧多、鎌田龍星、高野 愛、前田 健「国内の野生動物およびダニから新規フラビウイルスの検出」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道 (2014.9.9)
- 5) 野口慧多、下田 宙、寺田 豊、Nguyen Dung、水谷哲也、中村昇太、中屋隆明、鈴木哲朗、本道栄一、前田 健「キクガシラコウモリ由来新規ガンマヘルペスウイルスの遺伝子解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道 (2014.9.10)
- 6) 南 昌平、寺田 豊、下田 宙、前田 健「フェレットコロナウイルス抗体検出系の確立とその評価」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道(2014.9.10)
- 7) 寺田 豊、下田 宙、野口慧多、Nguyen Van Dung、鎌田龍星、城ヶ原貴通、織田銃一、高野 愛、本道栄一、前田 健「実験動物スunks *Suncus murinus* からの新規コロナウイルスの検出」第 29 回中国四国ウイルス研究会(山口大学)(2014.6.29)
- 8) 米満研三、原 由香、寺田 豊、高野 愛、下田 宙、小寺祐二、竹田 努、前田 健「新規開発 ELISA 法を用いた野生動物における E 型肝炎ウイルス抗体保有状況調査」第 29 回中国四国ウイルス研究会（山口大学）(2014.6.29)
- 9) 下田 宙、米満研三、早坂大輔、好井健太朗、寺田 豊、野口慧多、鎌田龍星、高野 愛、前田 健「山口県の野生動物およびダニからフラビウイルスの検出」第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会（山口大学）(2014.5.17)
- 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

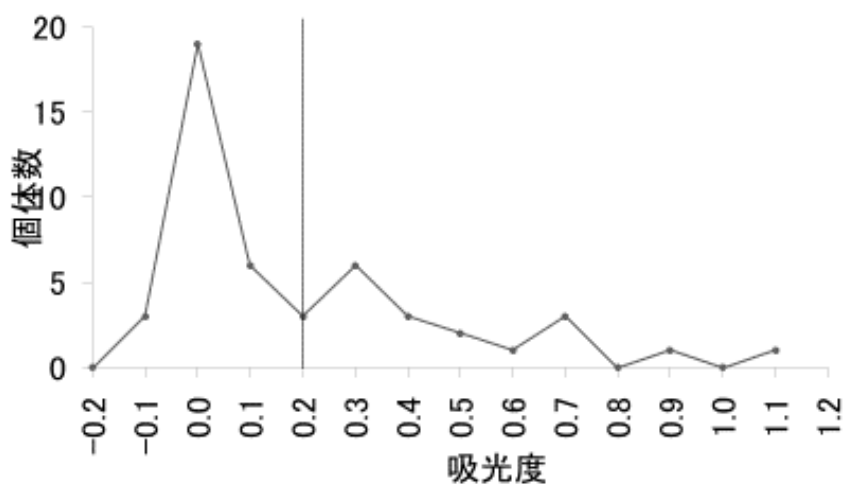


図1 イノシシの抗ニシムロウイルス抗体測定におけるCut-off値の設定

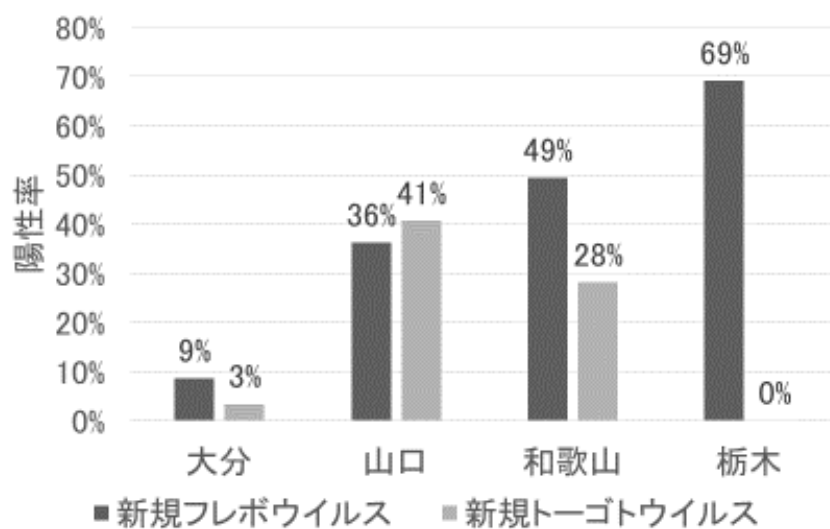


図2 イノシシの新規フレボウイルスおよび新規トーゴトウイルスに対する抗体保有状況

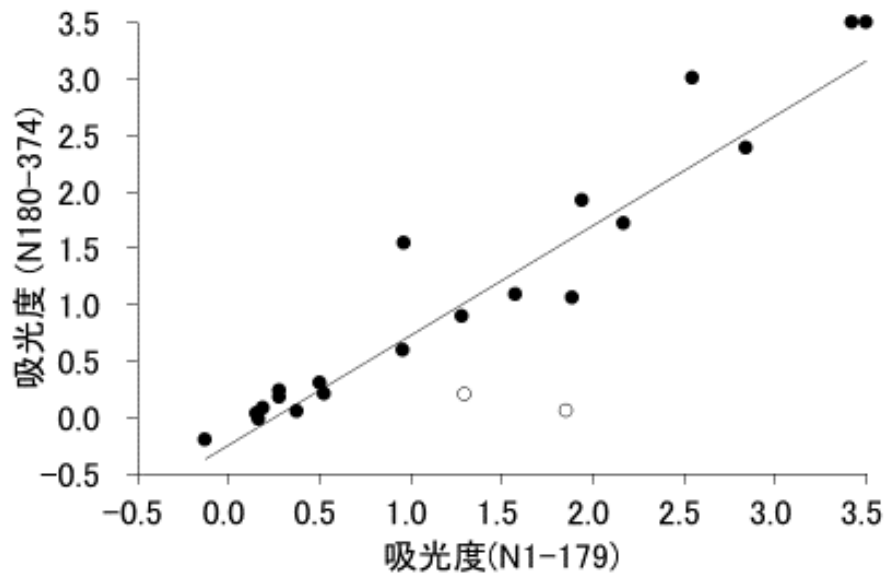


図3 フェレットコロナウイルスの大腸菌発現N蛋白の反応性の比較

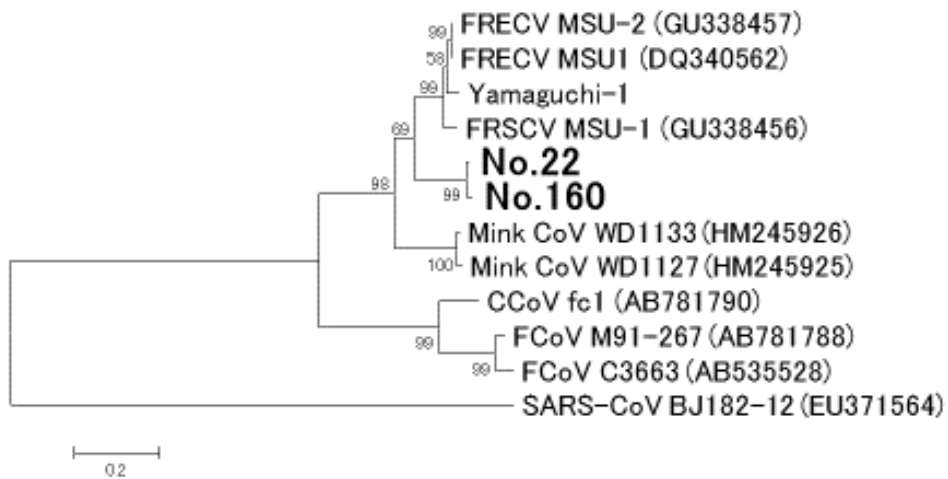


図4 フェレットコロナウイルス株間の遺伝子の比較

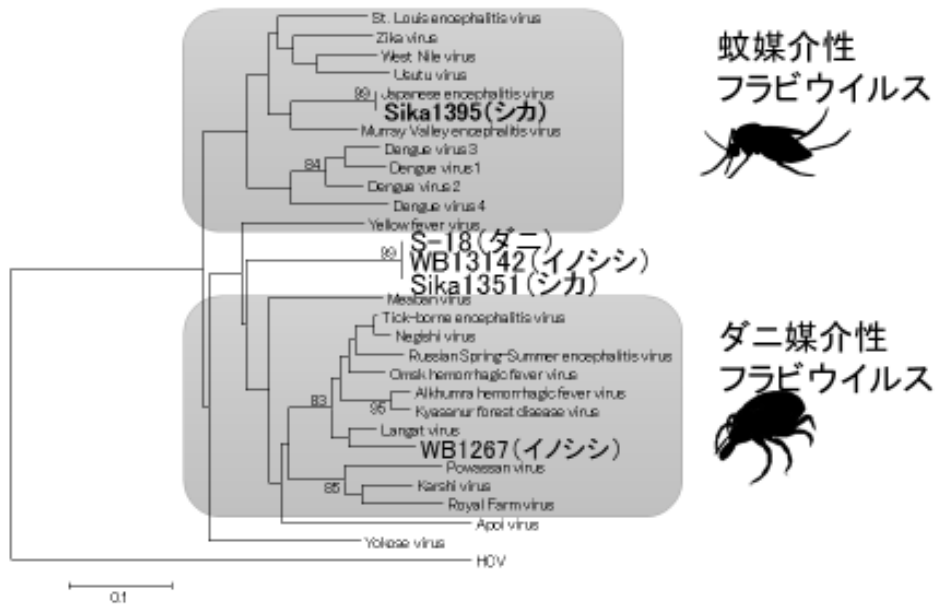


図5 検出されたフラビウイルスの系統樹(NS5, 55aa)

表1 山口県と栃木県のイノシシにおける抗ニシムロウイルス抗体保有状況

イノシシ	下関	栃木
検査頭数	72	188
陽性頭数	31	2
陽性率	43.1%	1.1%

表2 シカ、イノシシ、ダニから検出されたフラビウイルス遺伝子

ID	動物種	性別	体重	臓器	検出
13-95	シカ	オス	24kg	血清	日本脳炎ウイルス
13-51	シカ	オス	38kg	血清	新規フラビウイルス
13-142	イノシシ	メス	26kg	血清	新規フラビウイルス
S-18	キチマダニ	若虫		50匹	新規フラビウイルス
12-67	イノシシ	オス	12.5kg	肝臓	TBEV様新規ウイルス