

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（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）

委託業務成果報告（総括）

「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究

（H26-新興実用化-一般-019）

業務主任者： 森川 茂 国立感染症研究所獣医科学部長

研究要旨：多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。しかし、これらには重篤で重要なウイルス感染症や細菌感染症がある。本研究では、6ヶ月と短期間の研究であるため、ポイントを絞って「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得るための研究を行い、以下の成果を得た。1) 中東呼吸器症候群(MERS)はアラビア半島全域で新興した重篤な MERS コロナウイルス(MERS-CoV)による急性呼吸器感染症で、ヒトコブラクダを感染源動物とする。本研究ではヒト、ラクダ以外の動物にも容易に感染することから、MERS-CoV の種特異性は低いと考えられた。ブタは感受性が高いため中東外の国で養豚場などに MERS-CoV が浸淫すると、ブタを感染源として流行が起きる可能性がある。現在開発された MERS の遺伝子診断法は、動物感染によりウイルスに変異が生じても対応可能であることも確認された。2) マレーシア、バングラデシュ、インドに加えてフィリピンでも流行が確認されたニパウイルス感染症は、ニパウイルスによる神経症状、呼吸器症状を主徴とし致死率が高いコウモリを感染源とする。これまでに整備されている遺伝子診断、中和試験に加えて、組換え抗原による IgG, IgM 抗体検出法 (ELISA, IF) 及び陽性対照サル血清を作製した。3) コウモリレオウイルスはヒトの重篤な急性呼吸器感染症の原因となり、東南アジアで感染者が発生しているがこれまで診断法がなかった。組換えウイルス蛋白質を用いた抗体検出系、保存性の高い領域を標的とする遺伝子診断法を開発した。4) イシククル熱はダニ媒介性ウイルス感染症で、中央アジアで流行している。国内のダニから分離されたイシククルウイルスの遺伝子配列を決定し、遺伝子診断法を開発した。遺伝子診断法は、患者の診断だけでなく、国内のダニ等におけるウイルス浸淫度を調査することに応用できる。5) カエルから分離された新規ブルセラ属菌 2 株のほぼ全塩基配列を決定した。既知のブルセラ属菌と遺伝的に異なる新規ブルセラ属菌の *B. inopinata* と同様、カエル由来株は既知のブルセラ属菌と遺伝的に異なること、これらの novel ブルセラ属菌間でも遺伝的にそれぞれ距離があったことからカエルが novel ブルセラ属菌の宿主の一つであると考えられる。これらを識別可能な遺伝子検査法を開発した。6) イヌ、ネコの咬傷等により感染するカプノサイトファーガ属菌感染症患者から、*C. canimorsus* とは遺伝的に異なる新規菌株が 3 株分離された。これらは、*C. canimorsus* とは DNA hybridization で 12~15%と新

菌種であった。全遺伝子配列を決定した結果、3株は同一菌株であり、*Capnocytophaga* 属の新菌種であった。得られた遺伝子配列情報から PCR 法による鑑別診断系を確立した。
7) バイオテロ対策上も極めて重要な野兎病菌には、生ワクチンがロシア、米国で開発されているが病原性復帰が大きな問題である。新規病原性遺伝子として同定した *pdpC* 遺伝子を KO した野兎病菌を用いて、その生ワクチンとしての有効性を検証した。

業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名：

松山州徳（国立感染症研究所 ウイルス第二部）、加来義浩（国立感染症研究所 獣医科学部）、下島昌幸（国立感染症研究所 ウイルス第一部）、福士秀悦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）、今岡浩一（国立感染症研究所 獣医科学部）、鈴木道雄（国立感染症研究所 獣医科学部）、宇田晶彦（国立感染症研究所 獣医科学部）

A. 研究目的：

多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため、「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。本研究では、動物由来ウイルス感染症と動物由来細菌感染症に関して以下の研究を行い、これら「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得ることを目的とする。

MERS: 中東で新興したコロナウイルスによる新興感染症で本年4月には急激に患者数が増加し、国内では指定感染症（病原ウイルスは特定3種）に指定された。MERS コロナウイルスは複数の動物に感受性がある。これらの動物由来細胞で継代培養して遺伝子変異がおきるかを調べ、変異による遺伝子検査法への影響が想定される場合には、事前に対応可能な遺伝子検査系を開発する。

ニパウイルス感染症: マレーシア、バングラディッシュ等以外に、本年4月にフィリピンでニパウイルス感染症の発生が確認

された。サル(ニパ)ウイルス特異的 IgM 抗体を作製し、IgM 抗体検出系を確立する。ネルソンベイオルソレオウイルス感染症: コウモリのレオウイルス (PRV) による重篤な呼吸器感染症であるが、診断法が開発されていない。そこで、PRV 遺伝子検査法と抗体検査法を確立する。

イシククル (Issyk-kul) 熱: クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに近縁なイシククルウイルスによる感染症で高熱・頭痛を主徴とし、キルギスタン・タジキスタンに常在する。昨年、イシククルウイルスと非常に近縁なウイルスが分離され、国内にも同種のウイルスが常在する可能性が示唆された。本研究では、遺伝子診断法・血清診断法を開発し、国内の人や動物の疫学、ダニの分子疫学を行う手法を確立する。

ブルセラ症: 近年、新種のブルセラ属菌が種々の動物や人から分離されている。人からの分離株は無尾類由来菌と遺伝的に近縁と考えられる。そこで、愛玩用無尾類から分離したブルセラ属菌の遺伝子配列を決定し、新規遺伝子診断法、鑑別法を開発する。

カブノサイトファーガ感染症: イヌ、ネコの口腔内常在菌による重症敗血症で、近年患者数が増加している。カブノサイトファーガカニモルサスと遺伝的に異なる同種菌が分離されたことから、これらの遺伝子、生物学的解析を行う。

野兎病: 野兎病菌の新規病原性遺伝子 KO 株を作製した。本株のワクチンとしての有用性を、病原性解析、強毒株チャレンジ防御能を解析して明らかにする。

B. 研究方法：

各業務項目の委託業務成果報告の研究方法来に詳細を記載した。

C. 研究結果：

1) 中東呼吸器症候群 (MERS) のリスク評価と診断法：

2012 年に中東で新興した MERS は 2014 年 4 月に急激に患者数が増加し、日本国内では 2 類感染症に指定された。MERS コロナウイルスは、中東とアフリカ全域のヒトコブラクダに蔓延していることから、容易には排除できない。ヒトは、ラクダからの直接感染以外に、ヒト-ヒト感染、ラクダ以外の動物を介した感染が疑われており調査が続けられている。本研究から、特にブタ、ウサギ、サル由来の細胞に MERS コロナウイルスが効率良く感染することがわかった。サル細胞での継代によりウイルスの細胞侵入に関わる部位に遺伝子変異が見られたが、他の細胞での継代培養では変異は認められなかった。このことから、MERS コロナウイルスは宿主に対する種の壁が低く様々な動物由来細胞に感染できるが、それぞれの動物細胞における選択圧は低く遺伝子変異は起こり難いと考えられた。また、現行の遺伝子検査法に影響を及ぼすような変異ではないことから、試験法の改良の必要性はなかった。

2) ニパウイルス感染症の血清診断法：

ニパウイルス (NiV) 感染症は、1998-99 年のマレーシアで新興感染症として発生した後、バングラデシュ、インドで発生し、2014 年にはフィリピンでも流行が確認された。国内での患者発生はないが、アジア・アフリカ各地で、自然宿主のオコウモリから NiV 抗体が確認されてい

ることから NiV は広範囲に分布すると考えられる。NiV 感染症の感染拡大の阻止には発症初期の迅速診断がきわめて重要となる。国立感染症研究所では、シュードタイプによる代替中和試験、不活化した NiV 抗原による IgG-ELISA は確立しているが、IgM 検出系は確立していない。そこで、組換え NiV-N 蛋白質をカニクイザルに免疫して IgM 陽性対照血清、IgG 陽性対照血清を作製した。また、組換え NiV-N 蛋白質を用いて IgM 抗体検出系、IgG 抗体検出系を開発し、作製した IgM、IgG 陽性対照血清を用いて評価した。その結果、組換え抗原を用いた IgM-ELISA、IgG-ELISA が開発された。また、NiV-N 蛋白質を恒常的に発現する HeLa 細胞を樹立し、これを用いた蛍光抗体法による IgM、IgG 抗体検出法も開発した。

3) コウモリレオウイルスのゲノム情報と診断法：

近年、コウモリレオウイルス Pteropine orthoreovirus (PRV) によるヒトの呼吸器疾患 (PRV 感染症) がマレーシアおよびインドネシアにおいて新興し、日本国内への輸入例も 1 例発生した。ヒトからヒトへの感染事例も知られており、国内で流行を起こすことも懸念される。PRV 感染症の診断法が確立されていないことから、PRV の遺伝子検査法と抗体検査法を確立することを目的とした。遺伝子検査法では PRV の遺伝子配列情報を比較し、保存性の高い S2 segment 内にプライマーを設計し、遺伝子検出系を開発した。抗体検査法では、複数ある PRV 株のウイルス蛋白質のアミノ酸配列を比較し、保存性が高い major outer capsid (MOC) 蛋白質を抗原に用いることとした。組換えバキュロウイルスにより発

現した組換え MOC 蛋白質を抗原とした ELISA を開発した結果、日本への輸入症例の回復期血清の IgG 抗体を効率よく検出できた。

4) イシククル(Issyk-kul)熱の診断法と疫学：

イシククル熱は高熱、頭痛、筋肉痛を主徴とする、ダニあるいは蚊媒介性のイシククルウイルスによる感染症で、中央アジア（タジキスタンなど）で患者が報告されているがウイルス学的に詳細な解析がなされていない。2011 年、国内で採取されたコウモリマルヒメダニからイシククルウイルスと遺伝的に非常に近縁なウイルスがダニから分離され、国内にもイシククルウイルスまたは近縁ウイルスが常在することが示唆された。本研究では、国内で分離されたイシククル様ウイルスの全遺伝子配列を決定し、感受性細胞を同定した。また、リアルタイム PCR による遺伝子検出法を確立し、患者発生時の診断法として、また国内のダニおよびイシククル様ウイルスの分子疫学を行う手法としても有用である。

5) 新規ブルセラ属菌の遺伝子情報と診断法：

既知のブルセラ属菌とは異なる新種のブルセラ属菌 *B. inopinata* が患者から同定されているがその起源は不明である。近年、カエル類から新規ブルセラ属菌が相次いで分離された。本研究では 2 株のカエル由来ブルセラ属菌の全遺伝子配列を決定した。その結果、Classic species(*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. neotomae*)、

Marine species (*B. ceti*, *B. pinnipedialis*) と Novel species のげっ歯類由来 *B. microti* は単一クレードを形成し、カエル分離株は、*B. microti* 以外の Novel species、*B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2、*B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 と別のクレードを形成した。また、遺伝子配列情報を基にカエル由来ブルセラ属菌特異的遺伝子検出法を開発した。

6) 新規カプノサイトファーガ属菌の遺伝子情報と診断法：

イヌ・ネコに咬傷・搔傷を受けた際に感染する *Capnocytophaga canimorsus* 感染症の重症敗血症例 3 例から *C. canimorsus* とは遺伝子的に異なる菌株が分離された。この新規 *Capnocytophaga* 属菌の全遺伝子配列を決定した。また、生物学的解析を行った。その結果、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 菌株は、*C. canimorsus* との DNA-DNA ハイブリッド形成試験において、同一菌種の基準である相同値 70%以上を大きく下回る 12~15%であった。さらに 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子の相同値、また各種の生理・生化学的性状および理化学分析の結果から、3 株同士は同一菌種であり、*Capnocytophaga* 属の新菌種であると考えられた。新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的な 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子を標的とする PCR 法を開発し、*C. canimorsus* を含む既知の *Capnocytophaga* 菌種との鑑別診断法を確立した。

7) 野兔病弱毒株の作出とワクチン効果：

野兔病菌は非常に高い感染性を示し、致死率も高いことから、生物兵器として使用

されることが懸念されている。日本国内では、2008年に5症例報告されたのみであるが、動物の疫学的調査から国内にも以前広範囲に病原菌が存在していることが分かっている。野兎病菌のワクチンは、かつて米国で実験従事者用の生ワクチンが用いられたが病原性復帰等の問題から現在では用いられていない。ロシアでは、旧ソ連時代に開発された生ワクチンがある。これら以外に、野兎病菌のワクチンはない。そこで、既に我々が作製した新規病原性遺伝子(*pdpC* 遺伝子)を挿入破壊によりKOした野兎病菌株(*pdpC* 株)の生ワクチン効果を検証した。*pdpC* 株は、マウスに対する病原性を消失しているがカニクイザルでの病原性は不明である。そこで、カニクイザルに *pdpC* 株を感染させたところ弱毒化が確認された。サルに強毒株を感染させると、2頭いずれも野兎病を発症し致死性的であった。一方、*pdpC* 株感染3週間後に強毒株を接種すると、2頭中1頭が非致死性的野兎病を発症したが、1頭は発症しなかった。いずれも3週間生残した。この結果から、カニクイザルにおいて *pdpC* 株は生ワクチンとして有効であることが示唆された。今後、*pdpC* 株の接種量、接種回数、有効免疫期間等の検討が必要である。

D. 考察：

多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため、「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。本研究では、動物由来ウイルス感染症と動物由来細菌感染症に関して以下の研究を行い、これら「顧みられない動物由来感染症」の

制御に繋がる成果を得ることを目的とした。なお、本研究は6ヶ月と短期間の研究であるため、ポイントを絞って「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得るための研究を行なった。その結果、1) MERS-CoV はヒトコブラクダ、ヒト以外動物にも感受性を有するものが多く、その種特異性は低いと考えられた。ブタは感受性が高いため中東外の国で養豚場などに MERS-CoV が浸淫すると、ブタを感染源として流行が起きる可能性がある。一方、国立感染症研究所で開発された MERS の遺伝子診断法は、動物感染によりウイルスに変異が生じても対応可能であることも確認された。2) マレーシア、バングラデシュ、インドに加えてフィリピンでも流行が確認されたニパウイルス感染症に関して、これまでに整備されているウイルス遺伝子診断、中和試験に加えて、組換え抗原による IgG, IgM 抗体検出法 (ELISA, IF) 及び陽性対照サル血清を作製した。3) コウモリレオウイルスはヒトの重篤な急性呼吸器感染症の原因となり、東南アジアで感染者が発生しているがこれまで診断法がなかった。今回、組換えウイルス蛋白質を用いた抗体検出系、保存性の高い領域を標的とする遺伝子診断法が開発された。4) イシククル熱はダニ媒介性ウイルス感染症で、中央アジアで流行している。国内のダニから分離されたイシククル様ウイルスの遺伝子配列を決定し、高感度な遺伝子診断法を開発した。遺伝子診断法は、患者の診断だけでなく、国内のダニ等におけるウイルス浸淫度を調査することに応用できる。5) カエル由来新規ブルセラ属菌2株のほぼ全塩基配列を決定した。既知のブ

ルセラ属菌と遺伝的に異なる新規ブルセラ属菌の *B. inopinata* と同様、カエル由来株は既知のブルセラ属菌と遺伝的に異なること、これらの novel ブルセラ属菌間でも遺伝的にそれぞれ距離があったことからカエルが novel ブルセラ属菌の宿主の一つであると考えられた。これらを識別可能な遺伝子検査法も開発した。6) カプノサイトファーガ属菌感染症患者から分離された、新規菌株 3 株の性状と遺伝子配列解析を行った結果、これら 3 株は同一菌株であり、*C. canimorsus* とは異なる新菌種であった。これらの鑑別診断可能な PCR 法を開発した。7) 野兔病菌の新規病原性遺伝子として同定した *pdpC* 遺伝子を KO した野兔病菌株を用いて、その生ワクチンとしての有効性が検証された。

これらの研究成果は、目的に合致するものであり、今後の実用化に向けてさらに詳細な検討が必要であるが、当初の目標は達成できた。

E. 結論

- 1) MERS-CoV はラクダ、ヒト以外動物にも感受性を有する動物が多く、その種特異性は低いと考えられた。国立感染症研究所で開発された MERS の遺伝子診断法は、動物感染によりウイルスに変異が生じても対応可能であることを確認した。
- 2) ニパウイルス感染症の血清診断に用いられる IgG, IgM 抗体検出法 (ELISA と IF) を組換え抗原を用いて開発した。また、陽性対照血清として、組換え抗原免疫サル血清を作製した。
- 3) コウモリレオウイルス感染症の組換えウイルス蛋白質を用いた抗体検出系と遺伝子診断法を開発した。

- 4) イシククル熱はダニ媒介性ウイルス感染症で、中央アジアで流行している。国内のダニから分離されたイシククル様ウイルスの遺伝子配列を決定し、高感度な遺伝子診断法を開発した。遺伝子診断法は、患者の診断だけでなく、国内のダニ等におけるウイルス浸淫度を調査することに応用できる。
- 5) カエル由来ブルセラ属菌株は既知のブルセラ属菌と遺伝的に異なること、最近分離同定された novel ブルセラ属菌との間でも遺伝的にそれぞれ距離があることから、カエルが novel ブルセラ属菌の宿主の一つであると考えられた。これらを識別可能な遺伝子検査法も開発した。
- 6) カプノサイトファーガ属菌感染症患者から *C. canimorsus* とは異なる新菌種を分離・同定した。これらの鑑別診断可能な PCR 法を開発した。
- 7) *pdpC* 遺伝子を KO した野兔病菌株が生ワクチン候補株として有用であることが示された。

F. 健康危険情報

MERS は国内では輸入症例の報告はない。ニパウイルス感染症は、2014 年にフィリピンで初めて流行した。コウモリレオウイルスによる急性呼吸器感染症は、2006 年以降東南アジアでの感染による患者発生が 7 回報告され、家族内感染も起きている。タジキスタン等の中央アジアで流行しているイシククル熱の病原ウイルスに非常に近縁なウイルスが国内で分離・同定されたが、患者は確認されていない。新規ブルセラ属菌がカエルより分離された。これによる患者発生は報告がない。カプノサイトファーガ属菌感染症患者 3 名から *C. canimorsus* とは異なる新菌種を分離・同定した。野兔病は北米で

は強毒型による患者が発生しているが、国内では患者は2008年以降発生がない。

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。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

