

201517003A

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の  
発生予防に関する研究

平成 27 年度 総括研究報告書

研究代表者 苅和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

平成 28 (2016) 年 3 月



厚生労働科学研究費

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の  
発生予防に関する研究

平成 27 年度 総括研究報告書

研究代表者 荻和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

平成 28 (2016) 年 3 月

## 目次

I. 総括研究報告 .....	1
近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究 苅和宏明 .....	3
II. 分担研究報告 .....	23
ダニ媒介性脳炎の疫学と診断法開発 好井健太郎 .....	25
マダニ類からのウイルス由来遺伝子の検出 早坂大輔 .....	33
ハンタウイルス感染症に関する研究 有川二郎 .....	38
人獣共通感染症の病理学的検索 -フラビウイルスの病理学的鑑別- 永田典代 .....	41
クリミア・コンゴ出血熱の治療法に関する進展:文献的考察 西條政幸 .....	45
狂犬病等の疫学に関する研究 井上智 .....	49
狂犬病ウイルス L 蛋白質の分子機能解析に有用となる組換え L 蛋白質の作出と機能性の確認 伊藤直人 .....	60
ブルセラ症の診断法の開発 (含、無尾類からの新規ブルセラ属菌の分離と解析) 今岡浩一 .....	66
バルトネラ感染症の疫学 丸山総一 .....	73
東南アジアのヤモリ由来 <i>Salmonella</i> Weltebreden における病原遺伝子の分布ならびに ベトナムの土壌からの類鼻疽菌の分離 林谷秀樹 .....	79
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	83

# I. 総括研究報告

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の  
発生予防に関する研究

研究代表者 苅和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究

研究代表者	苅和宏明	北海道大学大学院獣医学研究科	教授
研究分担者	好井健太郎	北海道大学大学院獣医学研究科	准教授
	早坂大輔	長崎大学 熱帯医学研究所	助教
	永田典代	国立感染症研究所	室長
	有川二郎	北海道大学大学院医学研究科	教授
	西條政幸	国立感染症研究所	部長
	井上智	国立感染症研究所	室長
	伊藤直人	岐阜大学応用生物科学部	准教授
	今岡浩一	国立感染症研究所	室長
	丸山総一	日本大学生物資源科学部	教授
	林谷秀樹	東京農工大学農学研究院	准教授

研究要旨

モンゴル北部のダニから分離されたダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)の生物性状の解析を行った。モンゴル分離株2株について培養細胞における増殖性を比較した所、増殖性に差は認められなかった。しかし、マウスモデルにおける病原性を解析した所、モンゴル分離株2株はそれぞれ異なる病原性を示した。両株のウイルスゲノム全長を解析した所、13箇所しかアミノ酸の相違が認められなかった。ベトナムおよび長崎県で採集されたマダニを対象に、重症熱性白血球減少症候群(SFTS)ウイルス(SFTSV)、Toflaウイルス(TFLV)、およびMukoウイルス(MUV)の3種類のマダニ媒介性ウイルスについて遺伝子検出を試みたが、ベトナムおよび長崎県で採集したいずれのマダニからもウイルス遺伝子は検出されなかった。ハンタウイルス感染症について感染げっ歯類を対象とした、抗体検出用のイムノクロマトグラフィー(ICG)の開発を試みた。ハンタウイルスの宿主であるエゾヤチネズミおよびヨーロッパヤチネズミ血清を用いて、ICGの評価を行ったところ、蛍光抗体法(IFA)と比較して95%以上の感度および敏感度が得られた。マウスモデルを利用し、3つの神経向性フラビウイルスの病理について解析した結果、いずれもマウスの錐体神経細胞に感染し、非特異的脳炎像を示した。一方でマウスモデルにおける病像がウイルスによって異なるのは神経系への侵入経路が一因であることを病理学的に示した。RNAウイルスに対する広スペクトラムを有する抗ウイルス剤であるファビピラビルがクリミア・コンゴ出血熱ウイルスに*in vitro*で抗ウイルス活性を有し、しかもインターフェロン受容体ノックアウトマウスにおける感染動物モデルでも、ファビピラビルがリバビリンよりもより高い治療効果が認められることを最新の文献から考察した。モンゴル獣医学研究所の協力を得て、モンゴルの野生動物で流行している狂犬病ウイルスの分子疫学的な解析を行った。モンゴルではイヌ以外にキツネやオオカミでも狂犬病が維持されていることが明らかになった。RNA依存性RNAポリメラーゼである狂犬病ウイルスL蛋白質は、狂犬病の治療法や新規暴露後予防法の有力な分子標的となることが予想される。3つの

FLAG タグが付加された狂犬病ウイルスの L 蛋白質を発現するプラスミドを構築し、同蛋白質の検出および機能性の確認を行なった。抗 FLAG 抗体を用いた間接蛍光抗体法およびウェスタン・ブロット法により、本組換え L 蛋白質が検出された。また、ルシフェラーゼアッセイにより、本 L 蛋白質が RNA 合成機能を有することが示唆された。3 種の無尾類より、新規ブルセラ属菌 5 株を分離した。今回、ウサギ免疫血清を用いて、本分離菌の抗原性を各種ブルセラ属菌との交差反応性をもとに解析した。特異的血清診断法に用いる検出用抗原として *Brucella canis* から特異的タンパク質群を同定した。その中で、ブルセラ属に近縁な *Ocrobactrum* 属菌とのホモロジーが少ないタンパク質を選択し、それらの組換えタンパクを作製した。和歌山県で捕獲したユビナガコウモリ 50 頭の血液から *Bartonella* の分離を試みた結果、12 頭 (24.0%) から *Bartonella* が分離された。東南アジアのヤモリ由来 *Salmonella* Weltevreden 21 株について、10 種類の病原遺伝子の保有状況を PCR 法により調べたところ、病原遺伝子保有の有無により 5 パターンに型別された。ベトナム・メコンデルタの土壌から類鼻疽の原因菌である類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*) の検出を増菌培養法ならびに PCR 法を用いて試みた。その結果、両法を併用することで 200 検体中 26 検体 (13.0%) から類鼻疽菌が分離され、本地域に類鼻疽菌が広くかつ高率に分布することが明らかになった。

#### A. 研究目的

野生鳥獣類によって媒介される人獣共通感染症は人に感染すると重篤化するものが多く、世界各国で公衆衛生上の大きな問題となっている。これらの人獣共通感染症は病原体の分布域や宿主動物などが不明な場合が多く、発生予防が難しい。本研究では、日本において患者数は少なくとも、日本の周辺国では大きな問題となっている人獣共通感染症について、診断法の開発や疫学的な解析を行うことにより、発生予防のための具体的な手段と知見を得ることを目指している。

ダニ媒介性脳炎はマダニ類によって媒介される危険度の高い人獣共通感染症として知られ、ヒトに致命的な脳炎を引き起こす。ロシア、東欧各国を中心に年間 8,000 名以上の患者が報告されている。ハンタウイルス感染症は腎症候性出血熱とハンタウイルス肺症候群の 2 つの病型が知られ、いずれもげっ歯類によって媒介される。これまで中国、ロシア、ヨーロッパ、南北アメリカ大陸などで多く報告され、年間の患者発生数が 5 万人ほどとされているが、世界的に調査が不十分な地域が多く存在する。また、狂犬病は一旦発症すれば 100% の致死率を示す致死的な脳炎で、WHO の報告によれば、

世界中で毎年 5 万 5 千人以上が狂犬病によって死亡している。しかしながら、狂犬病の発症機序は未だに不明な部分が多く、ウイルスの複製機構の詳細な解明や感染動物モデルを用いた発症機序の解析も重要である。その他にも、国内外において、クリミア・コンゴ出血熱、ブルセラ症、バルトネラ感染症、サルモネラ感染症、および類鼻疽などの患者が報告されている。上記の感染症はいずれも野生動物によって媒介される重篤な人獣共通感染症であり、国内外における汚染地やヒトにおける感染状況に関する情報が不足している。そこで、本研究では信頼性の高い診断法を開発して野生動物を対象とした疫学調査を実施することにより、上記感染症の分布域や病原巣動物といった基礎的な疫学情報を得る。

#### B. 研究方法

##### ダニ媒介性能脳炎

##### 1) ウイルスの増殖曲線

単層培養された BHK 細胞にモンゴル由来のダニ媒介性脳炎ウイルス株である MGL-Selenge-13-12 株、MGL-Selenge-13-14 株とロシアのシベリア由来株である TBEV IR99

2f7 株を感染させ、感染 12、24、48、72 時間後に培養上清を回収し、ウイルスカ価を測定した。

## 2) マウスモデルにおける感染実験

5 週令の雌の C57BL/6L マウスに 1,000 pfu の TBEV を皮下接種した。発症率や生存曲線を求めるためには 28 日間の観察を行った。またウイルスの体内動態を解析するために、ウイルス感染後、3、6、9、11 日目にマウスを安楽殺し、血清及び臓器を採集した。臓器は 10% 乳剤となるように 10% ウシ胎児血清添加 PBS で調整し、乳剤中のウイルスカ価を測定した。動物実験は北海道大学の動物実験委員会の承認を受け、そのガイドラインに沿って行われた。

## 3) ウイルス遺伝子塩基配列決定

ウイルス感染 BHK 細胞より抽出した RNA を鋳型に、TBEV 特異的プライマーによりウイルス遺伝子に相補的な DNA を増幅し、ダイレクトシーケンスによりウイルス遺伝子 RNA 配列を決定した。

## ダニ媒介性ウイルス

1) 長崎県内で採集されたアカコッコマダニおよびキチマダニの破碎乳剤を A129 マウス (IFNAR ノックアウトマウス) に接種し、症状、致死性を観察した。接種マウスのうち致死個体の脾臓を取り出し、RNA 抽出後、次世代シーケンス (GS Junior 454) にてウイルス遺伝子検出を行った。

2) レオウイルス科オルビウイルス属に属する Muko ウイルス (MUV) の segment 1 VP1 region 遺伝子配列を基にプライマーを作製した (Forward: GGCCAGCTATTCATGGTTCCG, Reverse: CGTCTCCAGCTCCGATATGT, プローブ 5'-/56-FAM/TTATCTCGG/ZEN/AGGGAGGGGAT/3IABkFQ/-3)。SFTSV については L セグメントゲノムのポリメラーゼ蛋白領域を増幅するようにプライマーを設計した。また、TFLV は M セグメントゲノムの 211b.p. を増幅するよう

にプライマーを設計した。Real-time RT-PCR 反応は One Step PrimeScript® RT-PCR kit (TAKARA BIO) を用いて行った。定量評価には、各ウイルス遺伝子 cDNA をクローニングしたプラスミドベクターから T7 RNA ポリメラーゼ反応により得られた RNA を用いた。

2) 2015 年にベトナムのカッティエン国立公園において旗振り法で採集した *Haemaphysalis cornigera* (♂3, ♀1)、*Dermacentor auratus* (♂7, ♀3)、*Dermacentor astrosignatus* (♂1)、長崎県内で捕獲されたイノシシから採集された *Haemaphysalis formosensis* (♀7)、*Haemaphysalis hystris* (♂1, ♀8)、シカから採集された *Haemaphysalis longicornis* (♂117, ♀2)、旗振り法で採集した *Haemaphysalis flava* (若虫 150, ♂1, ♀3)、*Haemaphysalis longicornis* (若虫 32, ♂1, ♀1) から抽出した RNA を用いて、リアルタイム RT-PCR による SFTSV、TFLV、MUV の各ウイルス遺伝子検出を試みた。

## ハンタウイルス感染症

ヤチネズミ類に由来するハンタウイルス感染をスクリーニングするために、PUUV 関連ウイルスである Hokkaido virus (HOKV) の核タンパク (N) を抗原として選択し、大腸菌ベクターを用いて作製した。Protein A を金コロイド標識し、標識色素として用いた。これらの抗原および標識色素を用いてイムノクロマトグラフィー (ICG) ストリップの作製を行った。これらを用いて、ヨーロッパヤチネズミ血清 298 例、エゾヤチネズミ 10 例、合計 308 例用いて ICG ストリップによる診断を試みた。Puumala ウイルス (PUUV) 感染 Vero E6 細胞をアセトン固定し、これを抗原として用いた間接蛍光抗体法 (IFA) を対象試験として行った。ICG と IFA との比較解析により、診断法の感度、特異性、他の検査法との一致率を解析し、本 ICG ストリップの評価を行った。

## フラビウイルス感染症の病理学的解析

本研究班でこれまでに実施したフラビウイルス

感染マウスの感染組織ホルマリン固定標本を用いて病理学的検索を行った。ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV, Sofjin株)、日本脳炎ウイルス(JEV, JaTH株)、あるいはウエストナイルウイルス(WNV, NY99株)を用い、一匹あたり100%致死ウイルス量に相当するウイルス量を8週齢のBALB/cマウスにそれぞれ静脈内接種した。接種3、5、あるいは7日目(一群3匹)と瀕死期にこれらの動物(一群3、9あるいは14匹)を過麻酔殺、心臓採血し心臓からの10%ホルマリン緩衝液の灌流固定を行った。その後、臓器を採取し、これら採取した組織材料は10%ホルマリン緩衝液に浸漬固定した。常法通り、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。さらに、ウイルス抗原の検出のため、抗TBEV-Eウサギポリクローナル抗体、抗JEV-Eウサギポリクローナル抗体、あるいは抗WNV-Eマウスモノクローナル抗体を用いたポリマー法(Vector社あるいはニチレイ)による免疫組織化学染色を行った。なお、抗原賦活化方法には0.05%塩化カルシウム添加0.025%トリプシン(37°C30分)あるいはpH6.0あるいはpH9.0の抗原賦活化液(121°C10分)を用いた。

#### クリミア・コンゴ出血熱

CCHFの抗ウイルス薬による治療に関する文献を精査し、CCHFに対する治療における最新の情報を確認した。また、SFTSに対する抗ウイルス薬による治療法に関する最新の文献を精査した。これらの文献の内容を確認し、特に効果が期待されると考えられたfavipiravirのCCHFに対する治療効果及び曝露後投与による感染(発症)予防効果について考察した。

#### 狂犬病

モンゴル獣医学研究所の実験室で狂犬病と診断されたイヌ、キツネ、オオカミ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、動物種不明の24個体について脳組織中の狂犬病ウイルスの遺伝子増幅を行い、データベース上の遺伝子40配列と

合わせて遺伝子解析を行った。

狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株のL遺伝子cDNAを哺乳類細胞発現プラスミドベクターpCAGGS/MCSに挿入し、さらに組換えL蛋白質のC末端に3xFLAGタグが融合するように遺伝子操作を行なった。マウス神経芽細胞腫由来NA細胞に同プラスミドを導入し、細胞を固定後、抗FLAGタグ抗体を用いた間接蛍光抗体法を実施した。また、プラスミド導入3日後のNA細胞のライセートを作製し、ウェスタン・ブロット法により組換えL蛋白質の検出を行なった。発現したFLAGタグ融合L蛋白質の機能性を検討するため、同プラスミドをNA細胞に導入した後、ホタルルシフェラーゼ発現L遺伝子欠損ウイルスNishi- $\Delta$ L/Luc株(昨年度に作出)を感染させ、ウイルス増殖に伴い発現されるルシフェラーゼの活性を測定することで、L蛋白質機能を評価した。

#### ブルセラ症

##### 1. 無尾類由来ブルセラ属菌の抗原性の検討

1) 無尾類由来ブルセラ属菌および抗血清: A105株(イエアマガエル由来)、A141株(デニスフロッグ由来)およびA9h株(ベルツノガエル由来)に対する抗血清は、ホルマリン不活化全菌体をアジュバント(TiterMax Gold, TiterMax社)とともにウサギ(日本白色種)に免疫することにより作成した。

2) ELISA: 抗原として、A9h, A105, A141, *B. canis* (BC), *B. abortus* (BA), *B. suis* (BS), *B. neotomae* (BN), *O. intermedium* (OI)のホルマリン不活化全菌体を使用した。96ウェルマイクロプレートに抗原(0.01OD/ml)を50ul入れ、4°Cで一晩、固相化した。ブロッキングした後、800倍から4倍段階希釈したA9h, A105, A141, BA, BCに対するウサギ免疫血清を反応させ、二次抗体として抗ウサギIgG-HRPO抗体を反応後、ABTSを用いて発色を検討した。

##### 2. ブルセラ属菌特異的診断用抗原の作出

1) 標的タンパクの選定: *B. canis*菌液を紫外線照射により不活化後、凍結融解・超音波処理



を行い、超遠心により、その上清である分画 BcUV2-1 を得た。BcUV2-1 を抗原とし、1 次元および 2 次元電気泳動による WB 法で、ブルセラ属菌等に対する各種ウサギ免疫血清及び B.canis 感染血清との反応性をみた。それぞれ、抗ブルセラ抗体が特異的に反応するスポットを回収し、NANO-LG-MS/MS 法で当該タンパク質群を同定した。その中で、ブルセラ属菌と近縁な *Ochrobactrum* 属菌とのホモロジーが少ないタンパク質を選定した。

2) 組換えタンパクの作成と確認: ブルセラ菌 (*Brucella* spp.) の DNA を鋳型とし、制限酵素サイトを含むプライマーを用いて PCR で各タンパク質のコード領域の遺伝子増幅を行った。増幅した DNA 断片を pCR4-TOPO に挿入し、大腸菌(XL1-blue)にトランスフォームし、組換えプラスミドを調整し、挿入塩基配列の確認を行った。各遺伝子 DNA が挿入された pCR4-TOPO ベクターからその DNA 断片を制限酵素で切り出して、pET43.1b(+)-発現ベクターに再度挿入し、大腸菌 (BL21(DE3)pLysS) をトランスフォームした。得られた組換え大腸菌を IPTG で発現誘導し、Nus タグ融合タンパクを発現した大腸菌からニッケルカラムで Nus タグ融合タンパク質として精製し、SDS-PAGE および WB を用いて各タンパク質を確認した。さらに、Ni-NTA agarose (QIAGEN) と His-Bind buffer kit (NOVAGEN) で fusion protein を精製し、SDS-PAGE および WB を用いて各タンパク質を確認した。

### バルトネラ感染症

2013 年に、和歌山県で 50 頭のユビナガコウモリを捕獲した。コウモリの血液およそ 100 $\mu$ l を 5% 兔血液加 Heart Infusion 寒天培地に塗抹し、35 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 下で 1 カ月間培養した。分離株は、コロニー形態、発育日数ならびにグラム染色性(陰性)から *Bartonella* と推定し、さらに 2 つのハウスキーピング遺伝子領域 (gltA および rpoB) を標的とした PCR により *Bartonella* と同定した。分離株は、gltA および rpoB 領域の

塩基配列から各領域の遺伝子型を決定し、その組み合わせに基づいて遺伝子グループに分類した。各遺伝子グループから無作為に選抜し代表株について、BLAST 検索により両領域の塩基配列の相同性を検討した。さらに代表株の 5 遺伝子領域 (gltA, rpoB, ftsZ, ribC, 16S rRNA) の連結配列に基づき、台湾のユビナガコウモリ属由来 *Bartonella* 6 株と *Bartonella* 標準株とともに系統解析を行った。遺伝子解析で、新種と疑われた系統の株については、マイクロキャン RAID パネルを用いて生化学性状を検討した。

### サルモネラ感染症

供試菌株として、昨年度の研究で異なる PFGE パターンを示したヤモリ由来 S.Weltevreden 21 株(ベトナム由来 14 株、カンボジア由来 1 株、タイ由来株 5 株および沖縄県由来 1 株)を用いた。病原性遺伝子として、gipA、sodC1、sopE1、sseC、gtgB、sspH1、spvC、pipA、ssrB および pefA の 10 種の遺伝子を対象にした。

供試菌株からの DNA 抽出は、ボイル法を用いて行った。まず、供試菌株を trypticase soy 寒天培地(TSA,BBL)に接種し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養後、その 1 白金耳を、滅菌蒸留水 2ml へ懸濁し、10 分間煮沸溶菌した。その後、10,000rpm で 10 分間遠心分離し、その遠心上清を 1.5ml のマイクロチューブに移し、99.5%エタノールを加え、よく混合後、10,000rpm で 10 分間遠心分離し、遠心上清を捨てた後、風乾させた。精製した DNA は、TE バッファーで適切な濃度になるように溶解し、テンプレート DNA とした。200  $\mu$ l の PCR チューブ (Bio-Rad) に、TaKaRa Ex Taq(5units/ $\mu$ l) (TaKaRa) を 0.25  $\mu$ l、10  $\times$  Ex Taq Buffer を 5  $\mu$ l、dNTP Mixture(2.5mM each) を 4  $\mu$ l、滅菌精製水を 33.75  $\mu$ l、50  $\mu$ M のフォワードおよびリバースプライマーを各 1  $\mu$ l ならびにテンプレート DNA を 5  $\mu$ l 入れ、良く混和し、総量を 50  $\mu$ l とした。スピンドウンした後、サーマルサイクラー (Bio-Rad) に

セットし、PCRを行った。PCR増幅産物は1.5%アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、UVトランスイルミネーターで観察した。

### 類鼻疽

2015年7～9月にベトナム・メコンデルタで採取した水田の表土200検体を供試検体として用いた。供試検体10gを、5倍量の選択増菌培地(1L当たりトリプチケースソイブロス(Difco)10g、グリセロール40ml 0.1%クリスタルバイオレット5ml、コリシン15000U)に入れ、37°C24時間培養後、その上清をAshdown's Medium寒天培地に接種し、37°Cで48時間培養した。培養後、培地上に発育してきた類鼻疽菌が疑われるコロニーを釣菌し、純培養後、生化学的検査を行い、類鼻疽菌を同定した。増菌培地2mlをマイクロチューブに移し、10,000rpmで10分間遠心分離後、上清を捨て、滅菌蒸留水2mlへ加えて、10分間煮沸溶菌した。その後、10,000rpmで10分間遠心分離し、その遠心上清を1.5mlのマイクロチューブに移し、99.5%エタノールを加え、よく混合後、10,000rpmで10分間遠心分離し、遠心上清を捨てた後、風乾させた。精製したDNAは、TEバッファーで適切な濃度になるように溶解し、テンプレートDNAとした。

(倫理面への配慮)

動物実験は、研究代表者および研究分担者の研究機関における動物実験委員会の承認を受けたものであり、動物福祉の観点から問題ない。病原体を用いる感染実験は病原体のリスク分類に応じた封じ込め実験室内で実施された。本研究で研究対象となった野生動物は、いずれも管理捕獲によって捕獲された個体か、あらかじめ所管官庁から捕獲許可を得て捕獲された個体である。

## C. 研究結果

### ダニ媒介性脳炎

モンゴル分離株であるシベリア型TBEV、MGL-Selenge-13-12株及びMGL-Selenge-13-14株、そしてロシア・イルクーツクで分離された同じくシベリア型TBEVであるIR99 2F7株をそれぞれBHK細胞に感染させ、その増殖性を比較した。3つの株は、同様の増殖性を示した。マウスモデルを用いて3つのシベリア型TBEVの病原性を比較解析した。IR99 2F7株もしくはMGL-Selenge-13-12株に感染した全てのマウスは体重減少や沈鬱等の臨床症状を示し、四肢の麻痺や平衡感覚障害等の重篤な神経症状を示す個体も多く見受けられた。MGL-Selenge-13-14株に感染したマウスは、他の2株に感染したものと比較して、有病率や死亡率は明らかに低く、発症までの期間や生存日数も長かった。またMGL-Selenge-13-12株またはMGL-Selenge-13-14株感染マウスの臓器中での増殖性を解析した。血清中のウイルス増殖は、MGL-Selenge-13-12株感染マウスで感染初期(感染3日目)に認められたものの、MGL-Selenge-13-14株感染マウスでは認められなかった。また脳内でのウイルス増殖は感染9日目以降に認められたものの、MGL-Selenge-13-14株感染マウスでは、MGL-Selenge-13-12株感染マウスと比較して、有意に低いウイルス力価を示した。以上の結果より、MGL-Selenge-13-12株は、MGL-Selenge-13-14株と比較して高い病原性をマウスに示すことが明らかになった。MGL-Selenge-13-12株と、MGL-Selenge-13-14株の遺伝子RNA配列の全長を決定し比較した所、塩基配列で99.1%(11005塩基/11106塩基)の相同性があり、アミノ酸配列ではE蛋白領域に3箇所、NS3蛋白領域に3箇所、NS5蛋白領域に7箇所のみ相違が認められた。

### ダニ媒介性ウイルス

長崎県内で新規に採集されたマダニのうち、アカコッコマダニの破碎乳剤接種によりA129

マウスが致死性を示した。致死マウスの脾臓から抽出した RNA を用いて次世代シーケンスにより網羅的に遺伝子探索を行った結果、MUV(2015年にEjiriらにより報告されたレオウイルス科オルビウイルス属のウイルス)であった。MUVの分離を除き、ベトナムおよび長崎県内で採集されたマダニから SFTSV、TFLV、および MUV の遺伝子は検出されなかった。

### ハンタウイルス感染症

PUUVの近縁なハンタウイルスであるHOKVの核タンパク質を抗原として塗布したICGを作成し、コロイドラベル試薬としては、ハタネズミ亜科げっ歯類の免疫グロブリンと強く反応するProtein Aを使用したものを作成した。金コロイド標識したProtein Aを検出試薬とし、PUUVと抗原的にほぼ同一なHOKVの抗原を用いてICGを作成した。はじめにエゾヤチネズミ血清10例(IFAで陽性4例および、陰性6例)を用いて評価を行ったところ、ICGの陽性および陰性はすべてIFAの結果と一致した。

次にヨーロッパヤチネズミ血清298例を用いてさらに評価を進めた。その結果、ヨーロッパヤチネズミ血清のICGのIFAに対する感度と特異性はそれぞれ97.8%(44/45)、96.0%(243/245)となった。以上の結果から、PUUV関連ウイルスの宿主として極東に分布するエゾヤチネズミ(タイリクヤチネズミ)およびヨーロッパに分布するヨーロッパヤチネズミの両宿主において、本ICGが従来法であるIFAと同等の感度と特異性を示し、野生ヤチネズミ類の抗ハンタウイルス抗体の検出に有用であることが示された。

### フラビウイルス感染症の病理的検索

TBEV接種群では7日目には立毛、腹部膨満、元気消失を呈し、8日目には瀕死となった。これらの個体では、腸管筋層の神経叢および大脳・脳幹・脊髄および小脳の神経細胞にウイルス抗原が検出された。脊髄に髄膜炎が認められたが、脳幹と大脳皮質のウイルス検出部

位における炎症性反応は乏しかった。JEV接種群では脳炎による神経症状を発症し、およそ11日目に髄膜炎、脳炎所見を伴い瀕死となった。大脳皮質に強い急性壊死が認められた。WNV接種群では腹部膨満、弛緩性麻痺あるいは脳炎症状と個体によって異なる症状を示し、およそ9日目に瀕死となった。炎症性反応は比較的弱かった。いずれも大脳・脳幹・脊髄の大型の錐体神経細胞にウイルス抗原陽性細胞が認められた。

### クリミア・コンゴ出血熱

文献上の情報を精査したところ、リバビリンとファビピラビルのVero E6細胞におけるクリミア・コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)に対する50% inhibitory concentration(IC<sub>50</sub>)はそれぞれ、2.8 µg/ml および 1.1 µg/ml とほぼ同等であった。しかし、IFNRKOマウスの感染モデルでは、リバビリンとファビピラビルの曝露後投与による発症予防効果は、大きく異なり、ファビピラビルの効果の方がリバビリンのそれよりも高かった。ファビピラビルとリバビリンの併用により、相乗効果が期待される成績が示されている。

### 狂犬病

モンゴル獣医学研究所で狂犬病と診断されたイヌ、キツネ、オオカミ等について、狂犬病ウイルスの遺伝子配列特定後にデータベース上から選択した狂犬病ウイルス40株の遺伝子配列と合わせて系統樹を作成したところ、ロシアや韓国で分離されたウイルスの遺伝子配列に近似するグループBと、モンゴル国内で流行しているウイルスで構成されるグループAの二種類の遺伝子型に大きく分かれた。グループAの狂犬病ウイルスは、オオカミ、キツネ、イヌ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ラクダが宿主であり、このうち、オオカミ、キツネ、イヌが狂犬病の流行を媒介すると考えられた。

狂犬病ウイルスのL蛋白質を発現するプラスミド(pCNI-L-3xFLAG)を導入したNA細胞を用いて、抗FLAG抗体による間接蛍光抗体法

を実施し、本タンパク質の発現が確認された。pCNI<sub>L</sub>-3xFLAG 導入 NA 細胞のライセートにおいて、L 蛋白質の分子量と一致する、約 220 kDa のバンドがウェスタン・ブロット法により観察された。以上より、プラスミドからの組換え L 蛋白質の発現が確認された。次に、pCNI<sub>L</sub>-3xFLAG から発現される組換え L 蛋白質の機能性を検証した。同蛋白質を発現する NA 細胞に Nishi-ΔL/Luc 株を接種した結果、ウイルス増殖を示すルシフェラーゼの発現が確認された。このルシフェラーゼ活性の値は、空ベクター(pCAGGS/MCS)を導入した場合と比べ有意に高かった(p<0.01)。また、その値は、FLAG タグを持たない組換え蛋白質を用いた場合の値と同等であった。以上より、L 蛋白質 C 末端への FLAG タグの付加は、その機能に顕著な影響を与えないことが明らかとなった。

## ブルセラ感染症

1. 無尾類由来ブルセラ属菌の抗原性の検討  
A9h に対する抗血清は、ホモである A9h だけでなく、BA, BS, BN とも強く反応し、やはり Smooth-type のブルセラ属菌と交差性が言われている OI とも強く反応した。この反応性は、BA に対する抗血清を用いたときの反応と類似していた。A141 に対する抗血清は、A141 との反応性が強く、BC とも一部交差反応を示した。逆に、BC に対する抗血清は、A141 との反応性が強く、BC とも一部交差反応を示した。A105 は A105 とのみ強く反応していた。以上のことから、3 種のカエルから分離された新規ブルセラ属菌は、BA タイプ(A9h)、BC タイプ(A141)、既知のブルセラ属菌とは反応しないタイプ(A105)と、それぞれ異なる抗原性を持つことが明らかとなった。

## 2. ブルセラ属菌特異的診断用抗原の作出

WB のスポットから確認されたタンパク群のうち、以下の 6 タンパクを *Ochrobactrum* 属とのホモロジーが低いことから、診断用抗原候補として選定した。10 kDa chaperonin(以下、10C)、OsmC family protein(OsmC)、Uncharacterized

protein (gi|489053777) ( UP82 )、Uncharacterized protein (gi|489057608) (UP83)、DNA gyrase subunit B (gyrB)、NADH-ubiquinone oxidoreductase(NAD)。

各タンパク質遺伝子がクローニングされた construct (10C/pET43.1b(+), NAD/pET43.1b(+), OsmC/pET43.1b(+), GyrB/pET43.1b(+), UP-82/pET43.1b(+), UP-83/pET43.1b(+))で BL21(DE3)pLysS をトランスフォームし、0.4mM と 1mM IPTG で各組換えタンパクの発現を誘導した。結果、0.4mM と 1mM IPTG の両濃度で 5 つの組換えタンパク、10C、OsmC、NAD、gyrB、UP83 の発現が SDS-PAGE と S tag (Novagen, monoclonal anti-mouse)に対する抗体を用いた immunoblot で確認された。すべて 70~75 kDa 付近でバンドが確認された。しかし、*B. canis* に対するウサギ免疫血清は 10C のみに反応を示した。

## バルトネラ感染症

検討したユビナガコウモリの 24.0%(12/50) から *Bartonella* が分離された。分離株は、*gltA* 領域と *rpoB* 領域の遺伝子型の組み合わせから 12 の遺伝子グループ(I~XII)に分類された。

BLAST 検索の結果、遺伝子グループ I~XI の代表株は台湾のユビナガコウモリ属由来 *Bartonella* と *gltA* 領域で 99.7~100%、*rpoB* 領域で 99.2~100%の相同性であった。一方、遺伝子グループ XII の代表株は、マレーシアのクモバエ由来 *Bartonella* DNA と *gltA* 領域で 88.1%、*B. quintana* Fuller<sup>T</sup> と *rpoB* 領域で 89.1%の相同性であった。(表 1)。

5 領域の連結配列に基づく系統解析では、遺伝子グループ I~XI の代表株は台湾のユビナガコウモリ属由来 *Bartonella* と同一のクラスター(系統 I)を形成したのに対し、遺伝子グループ XII の代表株は独立したクラスター(系統 II)を形成した(図 1)。また、検討したコウモリ分離株は全て同一の生化学性状を示し、*B. henselae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B.*

*acomydis*, *B. pachyuromydis* の 4 菌種と最も類似した性状であった(表 2)。

#### サルモネラ感染症

今回供試した *S.Weltevreden* 21 株における 10 種の病原遺伝子の保有状況は、*gtgB*、*sspH1*、*pipA* および *ssrB* はいずれも 100%、*gipA* および *sodC1* はそれぞれ 95.2%、*sseC* は 42.9%、*sopE1* は 4.8%ならびに *spvC* は 0%であった。病原遺伝子の保有状況の組み合わせにより、供試した 21 菌株は 5 パターンに型別された。また、*sopE1* 遺伝子は 1 菌株からのみ検出されたが、この菌株は沖縄由来株であった。

#### 類鼻疽菌

ベトナム・メコンデルタで採取した水田の土 200 検体について、増菌法と PCR 法を併用して *Burkholderia* 属菌の分離を行ったところ、*Burkholderia* 属菌は 26 検体 (13.0%) から検出された。分離された *Burkholderia* 属菌はいずれも類鼻疽菌であった。また、PCR 法でも増菌培養法で菌が検出されたものと同じ 26 検体 (13.0%) から類鼻疽菌が検出された。

#### D. 考察

##### ダニ媒介性脳炎

モンゴル由来のシベリア型ダニ媒介性脳炎ウイルスである MGL-Selenge-13-12 株と、MGL-Selenge-13-14 株は、培養細胞における増殖性は同様であったが、マウスモデルにおいて MGL-Selenge-13-14 株は低い病原性を示し、また臓器中でのウイルス増殖性も低かった。これらの結果は、自然免疫を中心とした免疫応答の誘導が、両ウイルス株の間で異なり、これがウイルスの臓器中での増殖性に影響を与えたためであると考えられる。MGL-Selenge-13-12 株と、MGL-Selenge-13-14 株の間ではアミノ酸にして 13 箇所しか認められず、これら自然界で生じたアミノ酸配列の変異がウイルスの病原性に影響を与えたものと考えられる。近年の研究

により NS5 蛋白は宿主の自然免疫系を抑制するインターフェロン拮抗作用があり、NS5 上のアミノ酸配列の変異がこの作用に影響を与えることが明らかになっている。両株の病原性の相違に関わるアミノ酸を同定することで、シベリア型 TBEV の病態発現機序を解明する上での重要な基盤となりうるものと考えられる。

##### ダニ媒介性ウイルス

新たに長崎県のアカコッコマダニから MUV を分離した。しかしながら、同地域で採集したマダニのうち、分離したマダニ以外からは、ウイルス遺伝子の検出がされなかったことから、マダニの保有率は非常に低いことが考えられた。また我々は、MUV は A129 マウスに致死性を示すこと、BHK 細胞や Vero E6 細胞に感染性を示し CPE を起こすことを確認していることから、MUV は哺乳動物へ感染性・病原性を示す可能性が示唆される。今後、動物やヒトでの血清疫学調査により、有用な疫学情報が得られるものと考えられる。

今回、調査対象地域としたベトナム南部および長崎県(五島含む)においては、マダニから各ウイルス遺伝子の検出が確認できなかった。SFTSV は 2016 年 1 月までに主に西日本において 170 人以上の患者報告があり、他の研究グループによりマダニからのウイルス遺伝子検出報告があるが、本研究結果からは、マダニ中のウイルス量が低い、特定の地区に分布していること、などが考えられた。TFLV は徳島県と長崎県、MUV は兵庫県、長崎県で分離されており、少なくともこれらの地域にはそれぞれのウイルスが分布している可能性が考えられる。今後、動物やヒトへの感染性、病原性の有無を調べ、ウイルス保有マダニの分布域、保有率などを調べることは重要と思われる。

##### ハンタウイルス感染症

これまで、ヒトの血清について種々のハンタウイルスに対する抗体を検出する ICG を開発・評価し、報告してきた。しかしながらハンタウイ



ルス感染症の制圧のためには、宿主げっ歯類のモニターが必要であると考えられる。そこで、多種のげっ歯類の抗体を検出することができる Protein A を用いて、昨年度までに安定した Protein A-標識試薬を選定・作成してきた。今年度はこの Protein A-金コロイドコンジュゲートを用いた ICG のヤチネズミ類への適応について評価した。多くの検体を使用して従来の抗体検出法である ELISA および IFA による結果と比較した結果、有用性が確認された。ヒトの HFRS の原因となり、また患者数の比較的多い PUUV について簡便に宿主げっ歯類の抗体を検査できるシステムが構築されたことから、安全かつ簡便にこれらの病原体の侵入について監視を行うことが可能となった。これまでにラット類を対象とする ICG の作成と評価を行ってきた。今回は PUUV 関連ウイルスとその宿主についてのシステムが構築された。この2種のウイルスとその宿主に対応することで、発生頻度の高い HFRS の原因となるハンタウイルス感染症についてのモニターが可能となった。しかしながら南米および北米由来の HPS の原因となるハンタウイルス感染症の宿主げっ歯類を対象とした ICG についても、今後評価を行っていくことが必要である。最終的には全てのげっ歯類に適応できる Multiplex ICG の完成が期待される。

#### フラビウイルス感染症の病理学的検索

いずれのフラビウイルスも、静脈内接種後に中枢神経系に侵入し、大型の錐体神経細胞に感染、増殖し、神経症状を引き起こし、非特異的な所見を示した。いくつかの相違点が明らかとなったが、これらは神経系への侵入経路が一因であると考えられた。

TBEV の Sofjin 株は、血中からまず腸管の神経叢にウイルスが伝播し、増殖し、神経細胞が破壊されるため、腸管の拡張が引き起こされたと考えられた。病理学的に Sofjin 株はマウスの神経細胞に非常に強い親和性を示し、血中のウイルスは神経叢から自律神経系を介し

て中枢神経系に移行すると考えられた。JEV の JaTH 株感染は、臨床症状発現前の期間、リンパ節でウイルスが分離された。よって、リンパを含む血流を介して中枢神経系へ移行し、大脳皮質が主な標的組織であったと考えられた。WNV の NY99 株感染は個体によって異なる病態を示しており、中枢神経系への経路として、血行性と神経行性の両方の経路が考えられた。そのため、個体によって種々の臨床症状を示したと考えられた。これらの病原性は、分離後の継代歴やウイルスそのものの特徴が反映されていると考えられる。ヒトにおいて WNV や TBEV の腸管神経叢への感染は不明であるが、TBEV 感染患者には悪心、嘔吐、胃痛、食欲不振など胃腸症状を発症初期から訴えるものも報告されている。

#### クリミア・コンゴ出血

これまで CCHF に対しては、CCHF に対するリバビリンによる治療効果が確認されていない状況ではあるが、リバビリン投与が一般的とされていた。しかし、ファビピラビルによる治療効果を IFNRKO マウス用いた感染モデルで評価したところ、ファビピラビルによる治療効果および曝露後投与による発症予防効果はリバビリンのそれよりも遥かに高かった。今後は CCHF に対してファビピラビルによる治療効果を評価することが求められる。日本で CCHF の輸入感染事例が発生した場合には、可能であればファビピラビル投与を検討する必要がある。

#### 狂犬病

新たに遺伝子解析を行った狂犬病ウイルスの 15 株 (Gobi-Alti 省 6 株、Dundgovi 省 2 株、Govi-Sumber 省 1 株、Dornogovi 省 1 株、Bulgan 省 2 株、Tuv 省 2 株、Bayankhongor 省 1 株) は、いずれもモンゴル国内で流行しているグループ A に分類され、ロシアとの国境を越えて移動したと考えられるグループ B (Kuzmin, I.V., et al. J. Wildlife Dis. 40 :617-631, 2004 and Bazartseren B., et al. Jpn. J. Infect. Dis.

63:358-363, 2010)に分類されるウイルス株はなかった。研究で、モンゴル国内で流行している狂犬病は、イヌとキツネ以外にオオカミでもウイルスが維持されていることが示唆された。

既知の狂犬病ウイルス株のL蛋白質のアミノ酸配列を比較した結果、そのC末端に、他の株では認められない15アミノ酸の余剰配列を有する株(固定毒PV株)が確認された。このことは、通常のウイルス株のL蛋白質にタグ配列を付加しても、その機能に大きな影響が生じないことを示唆している。そこで、固定毒の西ヶ原株のL蛋白質C末端に、22アミノ酸からなる3xFLAGタグを融合することにした。3xFLAG融合L蛋白質を発現するプラスミドpCNI-L-3xFLAGをNA細胞に導入し、間接蛍光抗体法およびウェスタン・ブロット法により組換え蛋白質の検出を試みたところ、いずれの方法においても、抗FLAG抗体により組換えL蛋白質を検出することに成功した。3xFLAGタグは、基本的に従来のFLAGタグを3連結した構造を持つ。一般に、3xFLAGタグの使用により、組換え蛋白質の検出感度が20~200倍上昇すると言われている。実際、従来のFLAGタグを融合した組換えL蛋白質も作出したが、その検出感度は3xFLAGタグを融合したものよりも明らかに低かった(データ未掲載)。以上より、3xFLAGタグの活用は、組換え蛋白質の検出感度を著しく上昇させることが確認された。3xFLAG融合L蛋白質の発現は、タグの付加がないL蛋白質と同等の効率で、L遺伝子欠損ウイルスの増殖を支持することが確認された。すなわち、C末端への3xFLAGタグの付加がL蛋白質の機能に影響を及ぼさないことが裏付けられた。このことは、組換えL蛋白質の発現量と機能を同時に評価できる実験系の確立を意味している。現在、本系の有用性をさらに評価する目的で、L蛋白質の728-730位に存在するRNAポリメラーゼ活性モチーフ(GDN)をSDDに置換した不活性型変異体の作出を行なっている。L蛋白質は、様々な酵素活性を有する多機能

蛋白質である。このような多機能性が同一分子内でどのような様式で保持されているのかについては興味深い課題であるものの、その実態は明らかになっていない。今回、樹立した3xFLAG融合L蛋白質とL遺伝子欠損ウイルスを組み合わせて使用することで、従来よりも詳細なL蛋白質の機能解析が可能になる。このような解析から得られる知見は、狂犬病の治療法確立のための有益な基盤情報となると考えられる。

### ブルセラ感染症

これまでに、国内繁殖の無尾類3種から、ブルセラ特異的PCRによりブルセラ属菌と判定される菌を5株分離した。これらは、遺伝子タイピングに用いられる9座の遺伝子について、ホモロジー解析と系統樹解析を実施した結果、*B. inopinata*に近縁であることがわかっている。しかしながら、今回、これら分離株の抗原性を検討したところ、一様ではなく、BAタイプ(A9h)、BCタイプ(A141)、既知のブルセラ属菌とは反応しないタイプ(A105)と、それぞれ異なる抗原性を持つことが明らかとなった。これまでに、ヒト培養細胞に感染し、細胞内で増殖することを明らかにしているが、今後さらにその病原性について、より詳細に*in vitro*、*in vivo*で検討を加え、3種それぞれの特徴を確認し、ヒトへの感染リスクを検討する必要があると考えられる。

今回、ブルセラ属菌特異的診断法の開発のため、ブルセラ特異的抗原(抗血清と特異的反応性を示すタンパク質)を同定し、これの組換えタンパク質の作製を行った。その結果、10kDa chaperoninが良好な反応性を示した。これについては、精製とWBおよびELISAでの反応性の検証を現在行っているところである。

### バルトネラ感染症

本研究では、わが国(和歌山県)のユビナガコウモリが*Bartonella*を保有していることを初めて明らかにした。*glxA*、*rpoB*領域の塩基配列の相同性解析および5領域の連結配列に基づ

く系統解析から、和歌山県のユビナガコウモリは2種の *Bartonella* を保有しており、1種は台湾のユビナガコウモリ属由来 *Bartonella* と同種、他の1種は台湾株や既存種とは異なる *Bartonella* 種であることが明らかとなった。さらに、和歌山県のユビナガコウモリから分離された株は *B. henselae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. acomydis*, *B. pachyuromydis* の4菌種と非常に類似した生化学性状を有することも明らかとなった。本研究では、和歌山県のユビナガコウモリのみを用いたことから、全国的なコウモリにおける *Bartonella* の保有状況を示していない。今後、国内に生息する他種のコウモリや全国的なユビナガコウモリにおける *Bartonella* の保有状況を明らかにするとともに、コウモリ分離株の遺伝子性状から、コウモリにおける本菌の宿主特異性についても検討する必要があると考えられた。さらに、コウモリが保有する *Bartonella* の人における病原性についても明らかにする必要があると思われる。

#### サルモネラ感染症

東南アジアでは、*S.Weltevreden* が人のサルモネラ感染患者から分離される最も重要な血清型であり、ヤモリが本血清型を高率に保菌し、自然界における重要なレゼルポアであることが報告されている。昨年の研究で、供試した *S.Weltevreden* は21の PFGE パターンと13の MVA パターンに型別されたが、本年度の研究により病原遺伝子の保有状態により5つのパターンに型別された。また、*sopE1* 遺伝子はこれまで *S.Weltevreden* から検出されることがなかったが、本研究で沖縄のヤモリ由来株からのみ検出された。病原性遺伝子の保有の有無による菌株の型別法は、PFGE や MLVA に比べ、菌株型別能力は低いですが、手技が簡便なため、菌株の遺伝子型別に使用できる可能性が示された。今後さらに病原遺伝子の種類を増やして、*S.Weltevreden* における保有状況を検討し、遺伝子型別への応用を試みたい。また、本研究でこれまで *S.Weltevreden* から検

出されたことのない *sopE1* 遺伝子が日本の沖縄からのみ検出されたことから、今後本血清型菌の我が国への侵入を検討する際、本病原遺伝子の有無がその指標になる可能性があり、今後、さらに菌株を増やし検討をしていきたい。

#### 類鼻疽

昨年度に引き続き、我が国で発生する類鼻疽の海外での感染国として報告の多いベトナムの水田の土を採取し、増菌培養法ならびに PCR 法を用いて類鼻疽菌の分離を試みた。その結果、類鼻疽菌は200検体中26検体(13.0%)から分離された。また、土壌から分離された *Burkholderia* 属菌はすべて類鼻疽菌であった。また、類鼻疽菌特異的な遺伝子を標的とした PCR 法でも増菌培養法で類鼻疽菌が検出された検体がいずれも陽性になった。これらのことから、ベトナム・メコンデルタには類鼻疽菌が広く分布していることが判明した。我が国では、2010年に2例、2011年に3例、2013年に4例、2015年に1例と、近年、類鼻疽が頻発しており、その多くが東南アジア、特にベトナムでの感染例である。また、最近の研究で類鼻疽の分布はこれまで考えられていたよりもずっと広範囲に分布し、その感染事例も報告されているよりもっと多数に上ることが報告された。今後、本菌の分布や予防法などについて、より詳細に検討し、本菌の我が国への侵入を防ぐ手立てを考えていく必要がある。

#### E. 結論

モンゴルにおいて TBE の流行を引き起こしていると考えられるシベリア型 TBEV は、ロシア・シベリア地方で流行しているウイルスと同様の病原性を有している可能性が示された。またその病原性は自然界で生じる遺伝子の変異により変化することが明らかになった。各種マダニ媒介ウイルスの遺伝子検出法を確立し、マダニからのウイルス検出法の準備が整った。ICGにより、ヤチネズミ類におけるハンタウイルス

感染の検査が容易になった。3つの神経向性フラビウイルスのマウスにおける病原性の違いが、ウイルス血症後の中枢神経系侵入経路の違いによって起こる可能性が示唆された。モンゴルの野生動物で流行している狂犬病ウイルスの分子疫学的な解析を行い、モンゴルではイヌ以外にキツネやオオカミでも狂犬病が維持されていることが示唆された。狂犬病ウイルスの組換え L タンパク質の発現量と機能の両者を評価できる実験系の樹立に成功した。抗ブルセラ抗体と特異的に反応するタンパク群を同定し、その中で、他の菌と交差反応性のない、ブルセラ特異的組換えタンパク質を作製した。和歌山県のユビナゴウモリは *Bartonella* を保有しており、新種と思われる *Bartonella* が分布していることも明らかとなった。東南アジアのヤモリ由来 *S.weltevreden* には様々な病原遺伝子が保有されていることが明らかになった。ベトナム・メコンデルタの土壌は類鼻疽菌に広く汚染していることが明らかになった。

以上のように、様々な人獣共通感染症について診断法の開発や、疫学調査の実施、および感染モデルの確立などが行われた。本研究により、人獣共通感染症に対する具体的な対応手段が確保されるとともに、予防のための貴重な知見が得られた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Lubick KJ, Robertson SJ, McNally KL, Freedman BA, Rasmussen AL, Taylor RT, Walts AD, Tsuruda S, Sakai M, Ishizuka I, Boer EF, Foster EC, Chiramel AI, Addison CB, Green R, Kastner DL, Katze MG, Holland SM, Forlino A, Freeman AF, Boehm M, Yoshii K, Best SM: Flavivirus antagonism of type I interferon signaling reveals prolidase as a regulator of IFNAR1 maturation and

expression. *Cell Host Microbe*, 18: 61–74, 2015.

- 2) Muto M, Bazartseren B, Tsevel B, Dashzevge E, Yoshii K, Kariwa H: Isolation and characterization of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes persulcatus* in Mongolia in 2012. *Ticks and tick-borne diseases*, 6: 623–629, 2015.
- 3) Sakai M, Muto M, Hirano M, Kariwa H, Yoshii K: Virulence of tick-borne encephalitis virus is associated with intact conformational viral RNA structures in the variable region of the 3'-UTR. *Virus Res*, 203: 36–40, 2015.
- 4) Yoshii K, Okamoto N, Nakao R, Hofstetter RK, Yabu T, Masumoto H, Someya A, Kariwa H, Maeda A: Isolation of the Thogoto virus from a *Haemaphysalis longicornis* in Kyoto city, Japan. *J Gen Virol*, 96: 2099–2103, 2015.
- 5) Shimada S., Posada-Herrera G., Aoki K., Morita K., Hayasaka D.: Therapeutic effect of post-exposure treatment with anti-serum on severe fever with thrombocytopenia syndrome SFTS in a mouse model of SFTS virus infection. *Virology*. 482:19–27, 2015.
- 6) Yu F., Du Y., Huang X., Ma H., Xu B., Adungo F., Hayasaka D., Buerano C.C., Morita K.: Application of recombinant severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleocapsid protein for the detection of SFTSV-specific human IgG and IgM antibodies by indirect ELISA. *Virology*. 12:117, 2015.
- 7) Hayasaka D., Shimada S., Aoki K., Takamatsu Y., Uchida L., Horio M., Fuxun Y., Morita K.: Epidemiological survey of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Nagasaki, Japan. *Trop. Med. Health*. 43:159–164, 2015.
- 8) Hayasaka D., Fuxun Y., Yoshikawa A., Posada-Herrera G., Shimada S., Tun M.M., Ago M., Morita K.: Seroepidemiological

- evidence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infections in wild boars in Nagasaki, Japan. *Trop. Med. Health*. Accepted.
- 9) Shimada S., Aoki K., Nabeshima T., Yu F., Kurosaki Y., Shiogama K., Onouchi T., Sakaguchi M., Fuchigami T., Ono H., Nishi K., Posadas-Herrera G., Uchida L., Takamatsu Y., Yasuda J., Tsutsumi Y., Fujita H., Morita K., Hayasaka D. : Tofla virus: A newly identified Nairovirus of the Crimean-Congo hemorrhagic fever group isolated from ticks in Japan. *Sci. Rep.* accepted.
- 10) Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Hayasaka D, Sato Y, Kojima A, Kariwa H, Takashima I, Takasaki T, Kurane I, Sata T, Hasegawa H. The pathogenesis of 3 neurotropic flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 74(3): 250-260, 2015.
- 11) Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Suzuki T, Nagata Noriyo, Hasegawa H, Kawai Y, Uda A, Morikawa S, Shimojima M, Watanabe H, Saijo M. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the treatment of infections with lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *mSphere* 1(1):e0061-15, 2015
- 12) Ejiri H, Lim CK, Isawa H, Kuwata R, Kobayashi D, Yamaguchi Y, Takayama-Ito M, Kinoshita H, Kakiuchi S, Horiya M, Kotaki A, Takasaki T, Maeda K, Hayashi T, Sasaki T, Kobayashi M, Saijo M, Sawabe K. Genetic and biological characterization of Muko virus, a new distinct member of the species Great Island virus (genus Orbivirus, family Reoviridae), isolated from ixodid ticks in Japan. *Archives of Virology* 160(12):2965-2977, 2015.
- 13) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Saijo M. Combination effects of ribavirin and interferons on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection. *Virology Journal* 12:181, 2015.
- 14) 井上 智. 狂犬病. 特集:感染症の新たな脅威. *The Journal of Public Health Practice*. 医学書院. 79:467-472, 2015.
- 15) 濱本紀子、井上 智. 狂犬病とその対策. *山口獣医学雑誌*. 41:1-12, 2015.
- 16) 井上 智、畠山 薫、水越文徳、野口 章. 特集:国境を越える感染症. 狂犬病. 獨協医学会 (*Dokkyo Journal of Medical Sciences*) 42:215-223, 2015
- 17) 井上 智. 第8弾 狂犬病. 2015年度年間連載「感染症」. 中学保健ニュース. 少年写真新聞社 2016年. 少年写真新聞 (*Junior's Visual Journal*) 第1646号付録、1月28日発行、2016.
- 18) Taguchi, Y., Imaoka, K., Kataoka, M., Uda, A., Nakatsu, D., Horii-Okazaki, S., Kunishige, R., Kano, F. and Murata, M. Yip1A, a novel host factor for the activation of the IRE1 pathway of the unfolded protein response during *Brucella* infection. *PLoS Pathogens*, 11(3): DOI:10.1371/journal.ppat.1004747 March 5, 2015.
- 19) 武藤義和, 山元佳, 橋本武博, 片浪雄一, 忽那賢志, 竹下望, 早川佳代子, 金川修造, 大曲貴夫, 加藤康幸, 今岡浩一. *Brucella melitensis* 感染症と診断されたソマリア人男性の1例. in: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 36(10): 195-196, 2015.
- 20) Sato, S., Kabeya, H., Yoshino, A., Sekine, W., Suzuki, K., Tamate, H. B., Yamazaki, S., Chomel, B. B., and Maruyama, S. 2015. Japanese Macaques (*Macaca fuscata*) as Natural Reservoir of *Bartonella quintana*. *Emerg. Infect. Dis.* 21(12): 2168-2170.
- 21) Kim, K. S., Inoue, K., Kabeya, H., Sato, S.,



Takada, T., Pangjai, D., Chiu, S. H., Fujita, H., Kawabata, H., Takada, N., Kariwa, H., and Maruyama, S. 2016. Prevalence and diversity of *Bartonella* species in wild small mammals in Asia. *J. Wildl. Dis.* 52(1): 10-21.

## 2. 学会発表

- 1) 好井健太郎、石塚万里子、神谷亘、苅和宏明. フラビウイルス粒子形成・分泌に関与する宿主因子の検索及び機能解析. 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 京都府京都市 (2015, 5)
- 2) 平野港、境瑞紀、苅和宏明、好井健太郎. 神経細胞内におけるダニ媒介性脳炎ウイルスのゲノム RNA 輸送機構の解析. 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 京都府京都市 (2015, 5)
- 3) 武藤芽未、Boldbaatar Bazartseren、Bazartseren Tsevel、Erdenechimeg Dashzevge、好井 健太郎、苅和 宏明. モンゴルにおけるダニ媒介性脳炎ウイルスの分離と性状解析. 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 京都府京都市 (2015, 5)
- 4) 下田宙、早坂大輔、好井健太郎、米満研三、鎌田龍星、高野愛、前田健. 山口県のイノシシから Langat ウイルスに対する抗体の検出. 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 京都府京都市 (2015, 5)
- 5) 佐々木創平、好井健太郎、岡本奈津実、中尾亮、染谷梓、前田秋彦. マダニからの Thogoto virus の分離と解析. 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 京都府京都市 (2015, 5)
- 6) 平野港、境瑞紀、苅和宏明、好井健太郎. ダニ媒介性脳炎ウイルスの神経細胞内におけるウイルスゲノム RNA 輸送機構の解析. 第 17 回日本 RNA 学会年会. 北海道札幌市 (2015, 7)
- 7) Hiroshi Shimoda, Kenzo Yonemitsu, Ryusei Kuwata, Kentaro Yoshii, Daisuke Hayasaka, Ken Maeda. Tick-borne flavivirus infection in Japan. The International Conference on Diseases in Nature Communicable to Man (ICDNM), The 70th meeting. Hamilton, Montana, USA, (2015, 8)
- 8) 稲垣恵理、境瑞紀、平野港、武藤芽未、苅和宏明、好井健太郎. ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス様粒子を用いた動物種非特異的な新規血清学的診断法の開発. 第 158 回日本獣医学会学術集会. 青森県十和田市 (2015, 9)
- 9) 小山芽以、吉松組子、好井健太郎、有川二郎、苅和宏明. イムノクロマトグラフィー法によるハンタウイルスの迅速診断法の開発. 第 158 回日本獣医学会学術集会. 青森県十和田市 (2015, 9)
- 10) Melbourne Rio Talactac, 好井健太郎、辻尚利、藤崎幸蔵、田仲哲也、望月雅美. Virucidal activity of Haemaphysalis longicornis longicin P4 peptide against tick-borne encephalitis virus surrogate Langat virus. 第 158 回日本獣医学会学術集会. 青森県十和田市 (2015, 9)
- 11) Memi Muto, Boldbaatar Bazartseren, Bazartseren Tsevel, Erdenechimeg Dashzevge, Kentaro Yoshii, Hiroaki Kariwa. Isolation and characterization of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes persulcatus* in Mongolia in 2012. The 3rd Sapporo Summer Seminar for One Health. Sapporo, Hokkaido. (2015, 9).
- 12) Minato Hirano, Mizuki Sakai, Hiroaki Kariwa, Shintaro Kobayashi, Kentaro Yoshii. Analysis of the transport mechanism of the genomic RNA of TBEV to the neurites. The 3rd Sapporo Summer Seminar for One Health. Sapporo, Hokkaido. (2015, 9).
- 13) Tapiwa Lundu Mtonga, Kentaro Yoshii, Hiroaki Kariwa. Ecological survey of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus (SFTSV) in Japan. The 3rd Sapporo Summer Seminar for One Health. Sapporo,

- Hokkaido. (2015, 9).
- 14) Mizuki Sakai, Minato Hirano, Memi Muto, Hiroaki Kariwa, Kentaro Yoshii. The variable region of the 3' untranslated region is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in mouse model. International Symposium on Flaviviruses: Structure and Immunity. Vienna, Austria (2015, 10).
  - 15) 平野港、境瑞紀、小林進太郎、苅和宏明、好井健太郎. ダニ媒介性脳炎ウイルスの神経細胞内におけるウイルスゲノムRNA輸送機構の解析. 第22回トガ・フラビ・ペステウイルス研究会. 福岡県福岡市(2015, 11)
  - 16) 下田宙、水野純子、米満研三、南昌平、鎌田龍星、好井健太郎、早坂大輔、前田健. ダニ媒介性脳炎ウイルス様ウイルスの西日本のイノシシでの感染. 第22回トガ・フラビ・ペステウイルス研究会. 福岡県福岡市(2015, 11)
  - 17) 脊戸優、佐々木創平、岡本奈津実、好井健太郎、中尾亮、染谷梓、前田秋彦. トゴウイルスのゲノムRNAの解析とウイルス蛋白質発現の解析. 第22回トガ・フラビ・ペステウイルス研究会. 福岡県福岡市(2015, 11)
  - 18) 稲垣恵理、境瑞紀、平野港、武藤芽未、苅和宏明、好井健太郎. ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス様粒子を用いた動物種非特異的な新規血清学的診断法の開発. 第22回トガ・フラビ・ペステウイルス研究会. 福岡県福岡市(2015, 11)
  - 19) Kentaro Yoshii, Mariko Ishizuka, Shintaro Kobayashi, Wataru Kamitani, Hiroaki Kariwa. BAP31 regulates the assembly and secretory pathway of the flavivirus particles. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 福岡県福岡市(2015, 11)
  - 20) Talactac Melbourne Rio, Kentaro Yoshii, Tetsuya Tanaka, Kozo Fujisaki, Masami Mochizuki. Survival dynamics of tick-borne encephalitis virus surrogate Langat virus in *Haemaphysalis longicornis*. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 福岡県福岡市(2015, 11)
  - 21) Minato Hirano, Mizuki Sakai, Hiroaki Kariwa, Shintaro Kobayashi, Kentaro Yoshii. Analysis of the transport mechanism of the genomic RNA of TBEV in the neurites of neuron. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 福岡県福岡市(2015, 11)
  - 22) Hiroshi Shimoda, Kenzo Yonemitsu, Ryusei Kuwata, Daisuke Hayasaka, Kentaro Yoshii, Ken Maeda. Tick-borne flavivirus infection in main island of Japan.
  - 23) Shintaro Kobayashi, Phongphaew Wallaya, Kentaro Yoshii, Minato Hirano, Memi Muto, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Hiroaki Kariwa. Analysis of the accumulation mechanism of denatured proteins by West Nile virus infection.
  - 24) 山内沙也果, 平野港, 石塚万里子, 武藤芽未, 小林進太郎, 神谷亘, 苅和宏明, 好井健太郎. ダニ媒介性脳炎ウイルスの粒子形成・分泌に関する宿主因子の同定と機能解析. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 福岡県福岡市(2015, 11)
  - 25) Daichi Kanameda, Takahiro Sanada, Mizuki Sakai, Masahiro Maki, Kumiko Yoshimatsu, Jiro Arikawa, Shintaro Kobayashi, Kentaro Yoshii, Hiroaki Kariwa. Isolation of Puumala virus using MRK 101 cell line which derived from the kidney of the grey red-backed vole (*Myodes rufocanus bedfordiae*) 第63回日本ウイルス学会学術集会. 福岡県福岡市(2015, 11)
  - 26) Eri Inagaki, Mizuki Sakai, Minato Hirano, Memi Muto, Shintaro Kobayashi, Hiroaki Kariwa, Kentaro Yoshii. ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス様粒子を用いた動物種非特異的な新規血清学的診断法の開発. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 福岡県福岡市(2015, 11)