

- 27) 平野港、境瑞紀、苺和宏明、小林進太郎、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 38 回日本分子生物学会年会. 兵庫県神戸市 (2015, 12)
- 28) 小林進太郎、Wallaya Phongphaew、好井健太郎、平野港、武藤芽未、大場靖子、澤洋文、苺和宏明. ウエストナイルウイルス感染による変性タンパク質蓄積機構の解析. 第 38 回日本分子生物学会年会. 兵庫県神戸市 (2015, 12)
- 29) 嶋田聡、青木康太郎、鍋島武、余福勲、黒崎陽平、塩竈和也、尾之内高慶、坂口美亜子、淵上剛、小野北斗、西弘大、Guillermo Posadas Herrera、内田玲麻、高松由基、安田二郎、堤寛、藤田博己、森田公一、早坂大輔: 国内のマダニから分離された新規ナイロウイルス: 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、京都 (2015, 5)
- 30) 嶋田聡、Guillermo Posadas Herrera、青木康太郎、森田公一、早坂大輔: 重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTS) 感染マウスモデルを用いた抗血清および薬剤効果の検討: 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、京都 (2015, 5)
- 31) 高松由基、森田公一、早坂大輔: 日本脳炎ウイルス JaTH160 と JaOArS982 の病原性の違いを決定するアミノ酸の同定: 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、京都 (2015, 5)
- 32) 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 (2015, 5)
- 33) 早坂大輔: 国内のマダニから分離された新規ナイロウイルス: 第 23 回 Seminar on Acari-Disease Interface、名取 (2015, 6)
- 34) 嶋田聡、青木康太郎、鍋島武、余福勲、黒崎陽平、塩竈和也、尾之内高慶、坂口美亜子、淵上剛、小野北斗、西弘大、Guillermo Posadas Herrera、内田玲麻、高松由基、安田二郎、堤寛、藤田博己、森田公一、早坂大輔: 国内のマダニから分離された新規ナイロウイルス: 第 52 回ウイルス学会九州支部総会、別府 (2015, 9)
- 35) 嶋田聡、青木康太郎、鍋島武、余福勲、坂口美亜子、森田公一、早坂大輔: 国内のマダニから分離された新規ナイロウイルス: 第 158 回日本獣医学会学術集会、十和田 (2015,9)
- 36) Daisuke Hayasaka, Kodai Nishi, Takeshi Fuchigami, Kazuya Shiogama, Takanori Onouchi, Satoshi Shimada, Yutaka Tsutsumi, Kouichi Morita: 18F-FDG PET imaging for identifying the dynamics of gastroenteritis in a mouse model of SFTSV infection: 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡 (2015, 11)
- 37) Satoshi Shimada, Kotaro Aoki, Takeshi Nabeshima, YuFuxun, Yohei Kurosaki, Kazuya Shiogama, Takanori Onouchi, Miako Sakaguchi, Posadas-Herrera Guillermo, Leo Uchida, Yuki Takamatsu, Jiro Yasuda, Yutaka Tsutsumi, Hiromi Fujita, Kouichi Morita, Daisuke Hayasaka: Tofla virus: a new Nairovirus belonging to the Crimean-Congo hemorrhagic fever group isolated from ticks in Japan: 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡 (2015, 11)
- 38) Daisuke Hayasaka: 18F-FDG PET imaging for identifying the dynamics of intestinal disease caused by SFTSV infection in a mouse model: The U.S. - Japan Cooperative Medical Sciences Program presents 50th Anniversary Celebration followed by the 18th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID), Bethesda, USA, (2016, 1)
- 39) Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N,

- Uda A, Morikawa S, Komeno T, Furuta Y, Shimojima M, Saijo M. Efficacy of favipiravir (T-705) against severe fever with thrombocytopenia virus infection. 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka, November 2015
- 40) Lim CK, Ejiri H, 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. Characterization of Muko virus, a new distinct member of the species Great Island virus, isolated from ixodid ticks in Japan. 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka, November 2015
- 41) Yamamoto¹, K., Ujiie¹, M., Noguchi A., Kato, Y., Takeuchi, S., Shinohara, K., Matono, T., Uemura, H., Fujiya¹, Y., Mawatari, M., Kutsuna¹, S., Takeshita¹, N., Hayakawa, K., Kanagawa S., Inoue S., Morikawa S., Ohmagari, N. Rabies Post-exposure Prophylactic Vaccination for Japanese Travelers. Conference of the International Society of Travel Medicine. 24-28 May, 2015. Centre des Congrès de Québec, Canada.
- 42) Kimitsuki, K., Boonsriroj, H., Manalo, L.D., Shimatsu, T., Shiwa, N., Takahashi, Y., Tanaka, N., Inoue, S. and Park, C.-H. A pathological study of the salivary glands of rabid dogs in the Philippines. 7th Asian Society of Veterinary Pathology (ASVP) meeting and symposium 2015. 8-11 November, 2015. Institute of Biology Auditorium University of the Philippines Diliman, Quezon city, Philippines.
- 43) Shimatsu, T., Kawamoto, N., Shiwa, N., Kimitsuki, K., Boonsriroj, H., Manalo, L.D., Shinozaki, H., Takahashi, Y., Tanaka, N., Inoue, S. and Park, C.-H. The utility of muzzle skin of rabid dogs as antemortem and postmortem diagnosis. 7th Asian Society of Veterinary Pathology (ASVP) meeting and symposium 2015. 8-11 November, 2015. Institute of Biology Auditorium University of the Philippines Diliman, Quezon city, Philippines.
- 44) Shiwa, N., Sumi, Y., Shimatsu, T., Kawamoto, N., Kimitsuki, K., Boonsriroj, H., Manalo, L.D., Inoue, S. and Park, C.-H. The utility of muzzle skin of rabid dogs as antemortem and postmortem diagnosis. 7th Asian Society of Veterinary Pathology (ASVP) meeting and symposium 2015. 8-11 November, 2015. Institute of Biology Auditorium University of the Philippines Diliman, Quezon city, Philippines.
- 45) Daria Manalo, Boldbaatar Bazartseren、朴天鎬、井上 智。直接迅速免疫組織化学 (DRIT) 法を利用したフィリピンにおける狂犬病検査法の検討。第 158 回日本獣医学会学術集会、公衆衛生分科会。2015 年 9 月 7 日-9 日、北里大学獣医学部、十和田市、青森県
- 46) 野口 章、町田一哉、徳本誠治、寺原孝明、加来義浩、奥谷晶子、内藤誠之助、森川茂、井上 智。マイクロニードル皮内免疫法による簡便で効果的な狂犬病ワクチンの接種法に関する研究。第 158 回日本獣医学会学術集会、公衆衛生分科会。2015 年 9 月 7 日-9 日、北里大学獣医学部、十和田市、青森県
- 47) 志和 希、島津太一、君付和範、Hassadin Boonsriroj、Daria L. Manalo、井上 智、朴天鎬。狂犬病発病犬の味蕾乳頭(有郭乳頭)と舌小唾液腺(エブネル腺)に関する病理学的研究。第 158 回日本獣医学会学術集会、公衆衛生分科会。2015 年 9 月 7 日-9 日、北里大学獣医学部、十和田市、青森県
- 48) 島津太一、志和 希、君付和範、Hassadin

- Boonsriroj, Daria L. Manalo, 井上 智、朴天鎬。狂犬病発病犬の鼻口部洞毛は死後組織診断材料として極めて有用である。第158回日本獣医学会学術集会、公衆衛生分科会。2015年9月7日-9日、北里大学獣医学部、十和田市、青森県
- 49) Minoru Tobiume, Yuko Sato, Satoshi Inoue, Yoshio Suzuki, Kazumi Shimada, Tetsuya Uno, Michiyo Kataoka。街上毒狂犬病ウイルスの細胞内抗原局在と粒子形成部位の検討。第63回日本ウイルス学会学術集会。2015年11月22日-24日、福岡国際会議場、福岡市、福岡県
- 50) Inoue S. Laboratory network for diagnosis of animal rabies. The 12th Japan-Taiwan symposium on vector-borne diseases, vaccine preventable diseases. 10-11 Sep, 2015. National Institute of Infectious Diseases. Tokyo, Japan.
- 51) 井上 智。特別講義:最近話題となっている感染症。2015年4月27日、日本獣医生命科学大学、東京都。
- 52) 井上 智。狂犬病、公衆衛生における課題。2015年6月11日、平成27年度学際領域特別講義、岐阜大学連合獣医学研究科、帯広畜産大学、北海道。
- 53) 井上 智。狂犬病:ガイドライン等に基づいた注意点等。2015年6月23日、平成27年度狂犬病予防業務地方ブロック技術研修会、厚生労働省健康局結核感染症課、岩手県環境保健研究センター、岩手県。
- 54) 井上 智。狂犬病:ガイドライン等に基づいた注意点等。2015年8月24日、平成27年度狂犬病診断研修会、山口県環境生活部、国立大学法人山口大学共同獣医学部 Icover 棟・病理解剖棟、山口県。
- 55) 井上 智。研修・特別講演:世界における狂犬病の発生状況と国内対策について。2015年9月4日、平成27年度全国公衆衛生獣医師協議会調査研究発表会、全国公衆衛生獣医師協議会。明治記念館、東京都。
- 56) 井上 智。公開講座:狂犬病対策における獣医師の役割。2015年10月16日、第64回九州地区獣医師大会:平成27年度日本獣医公衆衛生学会(九州地区)。メルパルク熊本、熊本市、熊本県。
- 57) 井上 智。日本に必要な狂犬病の予防対策について(Rabies: Crisis preparedness for rabies in Japan)、第1部 国境なき人獣共通感染症-拡大阻止へ-。迫り来る感染症への備え-人獣共通感染症に焦点を当てて-国境なき家畜伝染病防疫対策の取り組み(Part 1. Preparation for Zoonotic Diseases in a Borderless World - To stop spreading. Preparing for Looming Disease Threats - Special Emphasis on Zoonosis Control - The Global Countermeasures against Trans-boundary Animal Diseases)。2015年11月13日、宮崎大学 第5回第国際シンポジウム(The 5th International Symposium)。宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター(Center for Animal Disease Control University of Miyazaki)。宮崎観光ホテル、宮崎市、宮崎県。
- 58) 井上 智。狂犬病の発生状況について。第3回九州地区狂犬病診断研修会。宮崎大学人獣共通感染症教育・研究プロジェクト、宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター、宮崎県福祉部保健部衛生管理課。2015年12月16日、宮崎大学、宮崎県。
- 59) 井上 智。地域における危機管理対応について。第3回九州地区狂犬病診断研修会。宮崎大学人獣共通感染症教育・研究プロジェクト、宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター、宮崎県福祉部保健部衛生管理課。2015年12月16日、宮崎大学、宮崎県。
- 60) 中川賢人、伊藤直人、岡田和真、岡寺康太、三竹博道、杉山誠。L蛋白質機能解析に有用となるL遺伝子欠損型狂犬病ウイルスの樹立。第158回日本獣医学会学術集会。北里大学(青森県十和田市)。2015年9月7

日～9日。

- 61) 佐藤昭裕, 藤田裕晃, 月森彩加, 小林勇仁, 中村造, 福島慎二, 水野泰孝, 大楠清文, 藤井毅, 今岡浩一, 松本哲哉. アニマルケアスタッフの *B. canis* 無症候性保菌. 第89回日本感染症学会総会, 京都, 2015年4月
- 62) 今岡浩一. 人獣共通感染症の動向とリスク評価について. 平成27年度中央畜産技術研修会(畜産物安全行政), 白河, 2015年6月
- 63) 田口由起, 今岡浩一, 片岡紀代, 宇田晶彦, 中津大貴, 堀井咲耶, 國重莉奈, 加納ふみ, 村田昌之. Yip1A は *Brucella abortus* 感染下での小胞体ストレス応答の IRE1 経路の活性化に必要な新規宿主因子である. 第67回日本細胞生物学会大会, 東京, 2015年6-7月
- 64) Sato, S., Kabeya, H., Yoshino, A., Sekine, W., Suzuki, K., Tamate, H. B., Yamazaki, S., Chomel, B. B., and Maruyama, S.. Japanese macaques (*Macaca fuscata*) as a new natural reservoir of *Bartonella quintana*, the causative agent of trench fever. Third International Congress on Pathogens at the Human-Animal Interface(タイ王国チェンマイ, 2015年8月6日～8日)
- 65) 佐藤真伍, 壁谷英則, 植田大二郎, 三浦達弥, 鈴木和男, 丸山総一. 和歌山県のタヌキにおける病原性 *Bartonella* の保有状況. 第158回日本獣医学会学術集会(北里大学, 2015年9月7日～9日)

II. 分担研究報告

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)

分担研究報告書

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

ダニ媒介性脳炎の疫学と診断法開発

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

研究要旨:ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)はヒトに重篤な脳炎を引き起こす、人獣共通感染症の原因ウイルスである。日本では北海道南部において患者が発生し、またユーラシア大陸広域において、ロシアを中心に年間数千人の患者発生が報告されている。モンゴルでは1980年代からTBEVの流行が報告され、近年患者数の増加が見られているが、詳細な流行状況は不明であった。昨年度までの研究で、モンゴル北部におけるダニ媒介性脳炎の分布状況を調査し、生息しているシュルツェマダニからシベリア型TBEVを分離した。本年度では分離されたウイルスの生物性状の解析を行った。モンゴル分離株2株とロシア・イルクーツクで分離された株との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。これらの成績は、自然界で生じるアミノ酸の変異がモンゴル流行TBEVの病原性に影響を与えていることを示しており、今後のモンゴルでのTBEV流行地域における疫学的危険度の評価のための重要な基盤情報になると考えられる。

A. 研究目的

ダニ媒介性脳炎(Tick-borne encephalitis: TBE)ウイルスは、フラビウイルス科フラビウイルス属に属し、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の原因ウイルスとして知られ、ヒトに致命的な脳炎を引き起こす。

日本では1993年北海道上磯町(現北斗市)において初めてTBE患者が発生し、その後の疫学調査により患者発生地域にTBEウイルスの流行巣が存在することを明らかにしてきた。

これまでの所、新たなTBE患者は発生していない。しかし我々は北海道を中心に継続的な血

清疫学調査を行うことによって、道南地域には現在まで10年以上にわたってウイルスの流行巣が存続している事を明らかにしてきた。さらに近隣の北東アジア諸国においては、TBE患者は依然多数発生が報告されており、ヒトや野生動物の移動により日本に侵入・流行する可能性も存在しているため、今後も日本を含め、近隣諸国において疫学調査を続ける必要がある。

モンゴルでは1980年代からTBEVの流行が報告され、近年患者数の増加が見られている。しかし、現地においてTBEに対する診断体制が確立していないことから、その疫学状況ほとんど不明

である。過去の研究でもモンゴルにおいて TBEV を分離したという報告はほとんどないため、流行ウイルスの病原性などに関する情報もほとんど解析されていないのが現状である。

昨年度までの研究により、モンゴルにおける疫学調査を行い、生息しているマダニを捕集した。その結果、680 匹のシュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) が捕集され、その中から 9 株のシベリア型 TBEV (MGL-Selenge-13 株) の分離が確認された。本年度では、さらに分離された TBEV の生物性状の解析を試みた。

B. 研究方法

1) ウイルスの増殖曲線

単層培養された BHK 細胞に multiplicity of infection (MOI) 0.01 PFU/ml となるように TBEV IR99 2f7 株、MGL-Selenge-13-12 株、MGL-Selenge-13-14 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。

ウイルスカ価の測定は、単層培養された BHK 細胞に、適宜希釈したウイルス液を感染させ、1.5%カルボキシメチルセルロース含有培地にて 4 日間培養させた後に、中性緩衝ホルマリンで固定して 0.25% クリスタルバイオレットによって細胞を染色し、生じたプラークをカウントすることにより求めた。

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シングによりウイルス遺伝子 RNA 配列を決定した。

C. 研究結果

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(図1)。

さらに、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(表1・図2)。

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(図3)。

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(表2)。

D. 考察

研究結果より、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1

3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。

E. 結論

本年度の研究成果により、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。

我々が本研究により明らかにしたモンゴルで流行している TBEV の情報は、同国における TBEV の継続的な調査を行い、その疫学的危険度の評価を行っていくうえで有効な基盤情報になると考えられる。

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
- (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,

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

- 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、鋤田
 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
 朗、中尾亮、染谷梓、前田秋彦. トゴトウイル
 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 Langkat 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, 苺和宏明, 好井健太郎. ダニ媒介性脳炎ウイルスの粒子形成・分泌に関与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. solution 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)
- 27) 平野港、境瑞紀、苺和宏明、小林進太郎、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 38 回日本分子生物学会年会. 兵庫県神戸市(2015, 12)
- 28) 小林進太郎、Wallaya Phongphaew、好井健太郎、平野港、武藤芽未、大場靖子、澤洋文、苺和宏明. ウエストナイルウイルス感染による変性タンパク質蓄積機構の解析. 第 38 回日本分子生物学会年会. 兵庫県神戸市(2015, 12)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

表1. ウイルス感染マウスの有病率及び死亡率

| ウイルス株 | 有病率(%) | 死亡率(%) | 発症開始日 | 生存日数 |
|-------------------|-------------|-------------|------------|------------|
| IR99 2f7 | 100 (10/10) | 100 (10/10) | 9.4 ± 1.8 | 12.7 ± 2.9 |
| MGL-Selenge-13-12 | 100 (10/10) | 80 (8/10) | 10.3 ± 1.5 | 13.8 ± 1.6 |
| MGL-Selenge-13-14 | 50 (5/10) | 40 (4/10) | 14.0 ± 4.3 | 17.3 ± 4.6 |

表2. MGL-Selenge-13-12 と MGL-Selenge-13-14 のアミノ酸配列の相違

| アミノ酸部位 | 遺伝子 | MGL-Selenge-13-12 | MGL-Selenge-13-14 |
|--------|----------|-------------------|-------------------|
| 580 | Envelope | Arg | Lys |
| 597 | Envelope | Asn | Thr |
| 631 | Envelope | Asp | Glu |
| 1743 | NS3 | Ser | Gly |
| 1992 | NS3 | Val | Leu |
| 2046 | NS3 | Pro | Ser |
| 2623 | NS5 | Ala | Thr |
| 3221 | NS5 | Cys | Trp |
| 3223 | NS5 | His | Arg |
| 3352 | NS5 | Leu | Pro |
| 3357 | NS5 | Ile | Met |
| 3403 | NS5 | Leu | Ser |
| 3409 | NS5 | Leu | Met |

図1. BHK 細胞における増殖性の比較

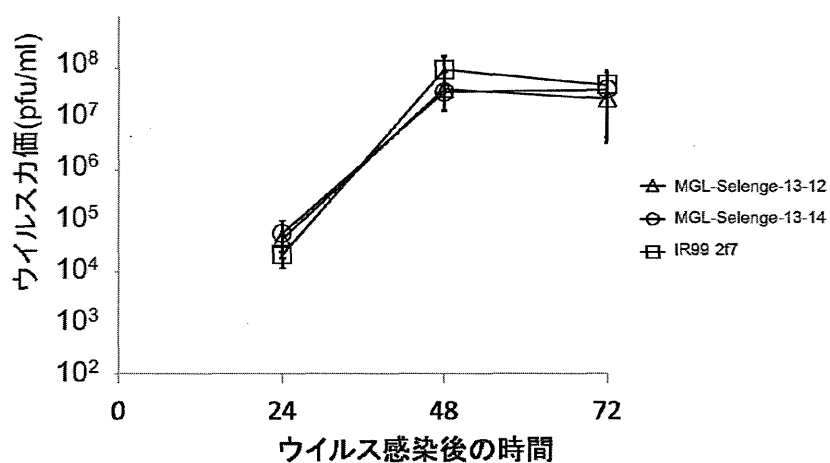
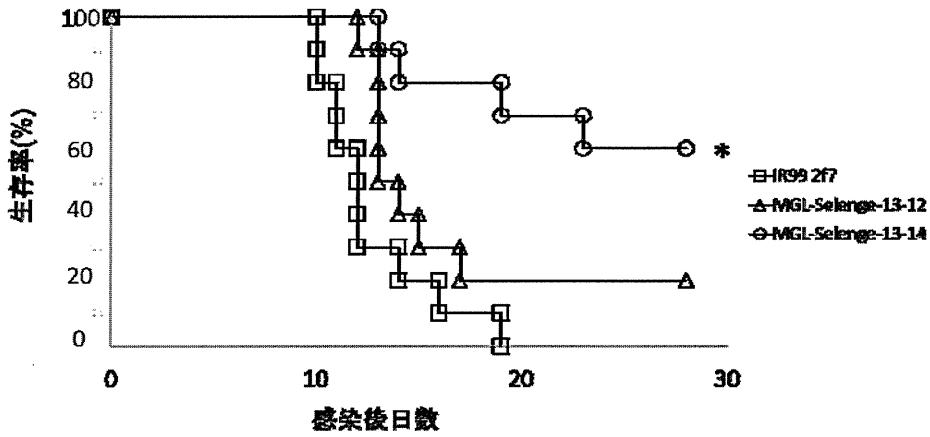
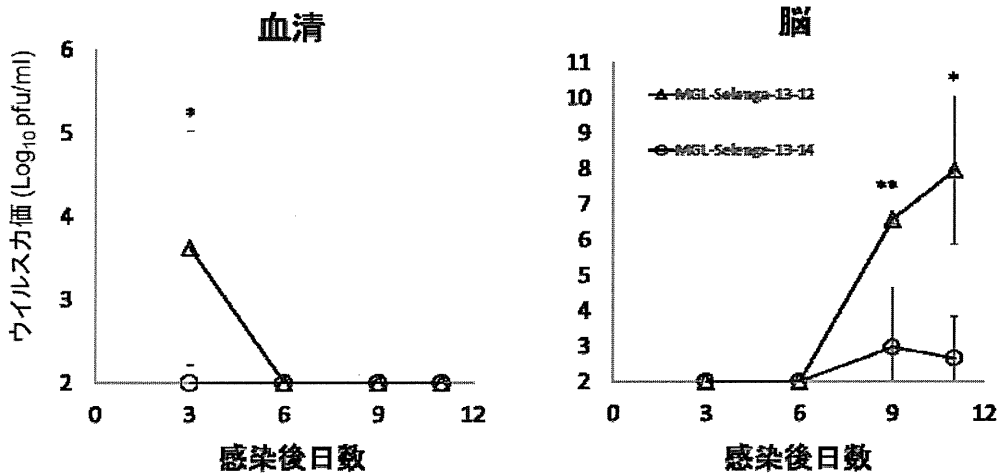


図2. TBEV 感染マウスの生存曲線



* MGL-Selenge-13-14 は、MGL-Selenge-13-12 及び IR99 2f7 と有意差あり(P < 0.05)

図3. TBEV 感染マウスの組織中でのウイルス増殖



MGL-Selenge-13-12 と MGL-Selenge-13-14 の間でと有意差あり: * (P < 0.05)、** (P < 0.01)

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

マダニ類からのウイルス由来遺伝子の検出

研究分担者: 早坂大輔

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野 助教

研究要旨: 本研究は日本およびインドシナ地域に存在するマダニ媒介性ウイルスの分布を把握することを目的とし、マダニ媒介性ウイルス遺伝子検出法の確立、および各地域で採集されるマダニからのウイルス遺伝子検出を行うことを目的とする。そこで、ベトナムおよび長崎県で採集されたマダニを対象に、3種のマダニ媒介(由来)ウイルスについて遺伝子検出を試みた。対象ウイルスは、重症熱性白血球減少症候群(SFTS)ウイルス(SFTSV)、国内のマダニから新規に分離され、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属のクリミア・コンゴ出血熱ウイルスグループに分類される Tofla ウイルス(TFLV)を用いた。さらに、長崎県で採集したマダニからウイルス分離を試みたところ新たに Muko ウイルス(MUV)が分離されたため、このウイルスについても遺伝子検出法を確立し、マダニからのウイルス遺伝子検出を試みた。ベトナムのカッティエン国立公園、および長崎県で採集したマダニから抽出した RNA を基に、SFTSV、TFLV、MUV の遺伝子検出を行ったが、いずれのウイルス遺伝子も検出されなかった。

A. 研究目的

マダニは世界中に分布し様々な病原体を媒介することで知られる。なかでもダニ媒介性脳炎(TBE)や重症熱性白血球減少症候群(SFTS)、クリミア・コンゴ出血熱(CCHF)などのマダニ媒介ウイルスは人や動物の重篤な感染症の原因となり、公衆衛生上その予防対策が重要となる。

日本においては、北海道南部に分布するヤマトマダニからダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルス(TBEV)が確認されている。また、古くは2005年から、主に西日本においてSFTS患者が確認されている。SFTSウイルス(SFTSV)は患者や動物に吸着していたマダニや植生上から採集されたマダニから検出されたとの報告がある。また、CCHFは

アフリカ大陸、東欧、中近東、中央アジア諸国から中国西部にかけて広く分布しており、人や動物の移動に伴う国内への侵入が危惧されている。

我々は昨年度、国内で採集したマダニからウイルス検出を試みたところ、2013年に徳島県で採集されたキチマダニ(若虫)および2014年に長崎県で採集されたタカサゴチマダニ(若虫)からブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される新規ウイルス(Tofla ウイルス:TFLV)を分離した。TFLVはCCHFウイルス(CCHFV)グループに属すること、マウス(IFNAR KO)に病原性を示すこと、ヒト由来培養細胞に感染性を示すことが示されたが、実際に人や動物に感染性・病原性を示すかどうかはわかっていない。

そこで今年度は、国内および周辺諸国におけるこれらのダニ媒介ウイルスの分布状況を把握するために、マダニからの各ウイルス遺伝子検出を目的とした研究を行った。本研究成果によりマダニ媒介性ウイルス感染症の予防に関して重要な情報を提供することが期待される。

B. 研究方法

- 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) Muko ウイルス(MUV)の segment 1 VP1region 遺伝子配列を基にプライマーを作製した (Forward: GGCCAGCTATTCATGGTTCG, Reverse: CGTCTCCAGCTCCGATATGT,プローブ 5'-/56-FAM/TTATCTCGG/ZEN/AGGGAGGGG AT/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 formsencis* (♀7)、*Haemaphysalis hystrix*(♂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。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

- 1)長崎県内で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。
- 2)ベトナムおよび長崎県内で採集されたマダニから SFTSV 遺伝子の検出は確認されなかった。
- 3)ベトナムおよび長崎県内で採集されたマダニから TFLV 遺伝子の検出は確認されなかった。
- 4)ベトナムおよび長崎県内で採集されたマダニから MUV 遺伝子の検出は確認されなかった。

D. 考察

- 1) 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。

2) 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。

E. 結論

昨年度までの研究成果に加え、本研究成果により、各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。東、東南アジアの周辺諸国および国内において、SFTSV、TFLV、MUV、さらに未知のマダニ由来ウイルスの疫学情報を得ることは、既知・未知のマダニ媒介感染症の予防対策において重要となることから、今後の調査継続が必要と思われる。

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

1.論文発表

- 1) 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.
- 2) 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. *Viol. J.* 12:117, 2015.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

2.学会発表

- 1) 嶋田聡、青木康太郎、鍋島武、余福勲、黒崎陽平、塩竈和也、尾之内高慶、坂口美亜子、淵上剛、小野北斗、西弘大、Guillermo Posadas Herrera、内田玲麻、高松由基、安田二郎、堤寛、藤田博己、森田公一、早坂大輔: 国内のマダニから分離された新規ナイロウイルス: 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、京都(2015, 5)
- 2) 嶋田聡、Guillermo Posadas Herrera、青木康太郎、森田公一、早坂大輔: 重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTS)感染マウスモデルを用いた抗血清および薬剤効果の検討: 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、京都(2015, 5)
- 3) 高松由基、森田公一、早坂大輔: 日本脳炎ウイルス JaTH160 と JaOArS982 の病原性の違いを決定するアミノ酸の同定: 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、京都(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(2015, 5)
- 5) 早坂大輔: 国内のマダニから分離された新規ナイロウイルス: 第 23 回 Seminar on Acari-Disease Interface、名取(2015, 6)
- 6) 嶋田聡、青木康太郎、鍋島武、余福勲、黒崎陽平、塩竈和也、尾之内高慶、坂口美亜子、淵上剛、小野北斗、西弘大、Guillermo Posadas Herrera、内田玲麻、高松由基、安田二郎、堤寛、藤田博己、森田公一、早坂大輔: 国内のマダニから分離された新規ナイロウイルス: 第 52 回ウイルス学会九州支部総会、別府(2015, 9)
- 7) 嶋田聡、青木康太郎、鍋島武、余福勲、坂口美亜子、森田公一、早坂大輔: 国内のマダニから分離された新規ナイロウイルス: 第 158 回日本獣医学会学術集会、十和田(2015,9)
- 8) Daisuke Hayasaka, Kodai Nishi, Takeshi Fuchigami, Kazuya Shiogama, Takanori Onouchi, Satoshi Shimada, Yutaka Tsutsumi, Kouichi Morita: ¹⁸F-FDG PET imaging for identifying the dynamics of gastroenteritis in a mouse model of SFTSV infection: 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡(2015, 11)
- 9) Satoshi Shimada, Kotaro Aoki, Takeshi Nabeshima, YuFuxun, Yohei Kurosaki, Kazuya Shiogama, Takanori Onouchi, Miako Sakaguchi, Posadas-Herrera Guillermo, Leo Uchida, Yuki Takamatsu, Jiro Yasuda, Yutaka Tsutsumi, Hiromi Fujita, Kouichi Morita, Daisuke Hayasaka: Tofla virus: a new Nairovirus belonging to the Crimean-Congo hemorrhagic fever group isolated from ticks in Japan: 第 63 回日本ウイルス学会学術集

会、福岡 (2015, 11)

- 10) Daisuke Hayasaka: ^{18}F -FDG PET imaging for identifying the dynamics of intestinal disease caused by SFTSV infection in a mouse model: The U.S. - Japan Cooperative Medical Sciences Program presents 50th Anniversary Celebration followed by the 18th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID), Bethesda, USA, (2016, 1)

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

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)

分担研究報告書

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

ハンタウイルス感染症に関する研究

分担研究者 有川 二郎 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨: 近隣地域からの感染げっ歯類を介して侵入が危惧される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、迅速診断法の開発を目的とした。自然宿主げっ歯類の種の違いによる二次抗体の交差反応性の相違を考慮し、昨年度の研究で有用性が確認された Protein A を用いた ICG を作成し、Puumala ウイルスおよびその関連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、作成した ICG の評価を行った。

A. 研究目的

ハンタウイルスは、げっ歯類媒介性の人獣共通感染症である、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因ウイルスである。ハンタウイルスのうち、Hantaan (HTNV)、Seoul (SEOV)、Dobrava (DOBV)Thailand (THAIV)および Puumala (PUUV)ウイルスは HFRS の原因となる。また Sin Nombre virus (SNV)を始めとするアメリカネズミ亜科のげっ歯類によって媒介されるハンタウイルスは HPS の原因となる。HTNV、SEOV、THAIV および DOBV はネズミ亜科のげっ歯類、そして PUUV はハタネズミ亜科のげっ歯類によって媒介される。これらのハンタウイルス群のウイルスは互いに抗原性が大きく相違し交差反応性が低いことから、病原性ハンタウイルス感染症の血清診断を行うためには少なくとも3種類の血清型の抗原が必要である。我国には SEOV および

PUUV が存在することが明らかとなっているが、ロシア、中国、韓国、東南アジア諸国には HTNV、SEOV、THAIV があり、また北米・南米諸国からの輸入症例、げっ歯類の積み荷への混入等についても注意を払う必要がる。一方、これらの他に翼種目およびトガリネズミ目に属するほ乳類によって保有されている病原性不明のハンタウイルスがみつかっている。

本研究では HFRS および HPS の原因ウイルスを保有する宿主げっ歯類が日本に侵入した場合を想定し、これを迅速に診断するための手段を確立することを目的として、げっ歯類を対象とした多項目同時検出用イムノクロマトグラフィー(Multiplex ICG)の開発を試みる。

今年度は昨年度までの研究で広い結合特性を持つことことが明らかとなった Protein A を金コロイドで標識したものを検出試薬として ICG の評価を進めた。Protein A は生理的条件下ではラットおよび

マウスの IgG に対しては結合が弱い、ヤチネズミ、ハタネズミ、トガリネズミ類の IgG に特異的に結合することが明らかとなっている。そこで、日本の北海道、ヨーロッパ大陸全域、極東ロシアに棲息し、HFRS の原因となる PUUV 関連ウイルスの自然宿主であるヤチネズミ血清群を用いて、抗 PUUV 抗体検出系 ICG の有用性を解析した。

B. 研究方法

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、抗原として PUUV 関連ウイルスである Hokkaido virus(HOKV)抗原を使用した。抗原性の強いウイルス構成タンパクとして核タンパク(N)を抗原として選択し大腸菌ベクターを用いて作成した。Protein A は昨年度に予備的検討を行った結果、ナカライ社の製品を用いた。また、標識色素として、金コロイド標識 (Winered chemical 社)を用いた。これらの抗原およびコンジュゲートを用いて ICG ストリップの作成を行った。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。対象試験として、組換え核蛋白抗原を用いた抗体検出 ELISA は、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)を行った。ICG と対象検査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。

C. 研究結果

本年度は PUUV の抗原を塗布した ICG を作成し、コロイドラベル二次抗体としては、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。これはすでに昨年度に、実験感染血清を用いて十分な反応性を持つことを評価しているものである。今年度ははじめにエゾヤチネズミ血清 10 例を用いて評価を行った。これらの血清の内訳は、IFA および ELISA とともに陽性4例および、両検査で陰性となった6例である。その結果、ICG の陽性および陰性はすべて IFA および ELISA 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 ELISA に対する感度と特異性はそれぞれ 91.5%(43/47), 95.6% (240/251)となった。また、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 ELISA および 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。

D. 考察

これまでに私たちは、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