

## 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、ウイルス力価を測定した。

ウイルス力価の測定は、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、乳剤中のウイルス力価を測定した。

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・分泌に關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)
- 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・ペスチウイルス研  
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・ペスチウ  
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・ペスチウイルス  
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・ペスチウイルス研究会. 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, 神谷巨, 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・分泌に關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, 苅和宏明, 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, 苅和宏明. 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

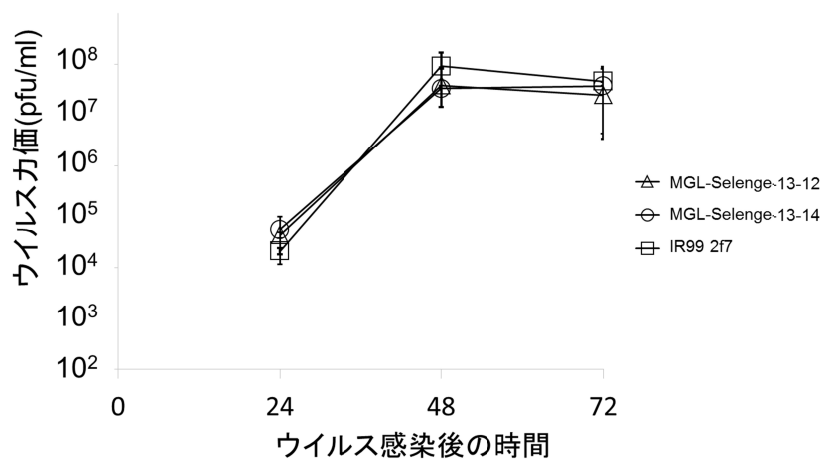
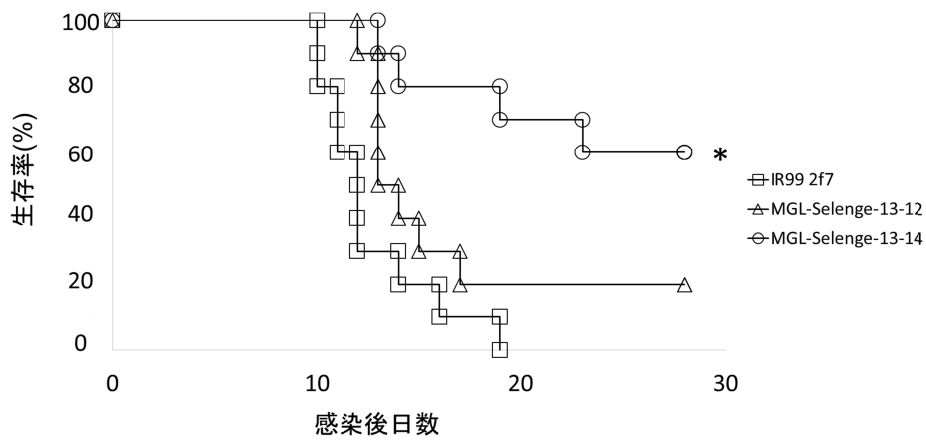


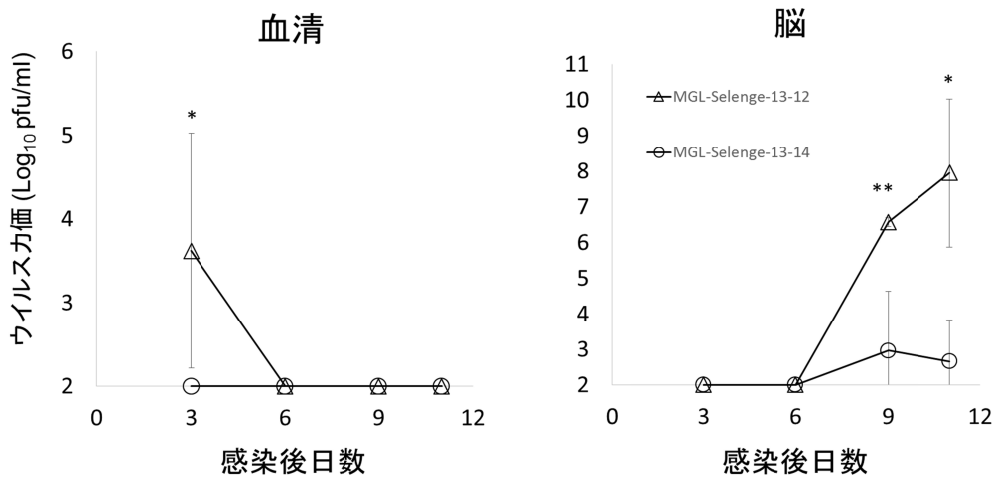


図2. TBEV 感染マウスの生存曲線



\* 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 の間だと有意差あり: \* ( $P < 0.05$ )、\*\* ( $P < 0.01$ )

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

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、本研究結果により、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. *Virol. 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: <sup>18</sup>F-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)	H. 知的財産権の出願・登録状況
10) Daisuke Hayasaka: $^{18}\text{F}$ -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)	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。この二種のウイルスとその宿主に対応することで、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 を完成が期待される。今年度はそのために必要なひとつの課題を達成したと考えられる。

#### E. 結論

ハンタウイルスの病原性については未だほとんど明らかになっていない。ハンタウイルス感染症を制御するためには、疫学的な解析をより効率よ

く行い、さらに病原性解析のためのツールをより多く持つことが必要となる。本研究では Multiplex ICG を用いてウイルス宿主のスクリーニング効率を大幅に上昇させ、さらにマウスモデルを用いた病原性の解析を進めることで、近隣諸国から侵入するおそれのあるハンタウイルス感染症対策を進める事が出来ると考えられる。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

小山芽以、吉松組子、好井健太郎、有川二郎、荻和宏明、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、9月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

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  
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-

国立感染症研究所感染病理部  
永田典代

研究要旨: マウスモデルを利用し、3つの神経毒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。病理組織像によるウイルスの鑑別診断は困難であり、各フラビウイルスに対する抗体が有用であった

#### A 研究目的

わが国のフラビウイルス感染症には日本脳炎と、ロシア春夏脳炎として知られるダニ媒介性脳炎がある。さらに、ウエストナイル熱・脳炎は輸入感染症例や流行が危惧されている。いずれもフラビウイルス科フラビウイルス属が原因となり、新興・再興感染症として警戒されている。これらのフラビウイルスはいずれも感染後にウイルス血症を引き起こし、中枢神経系に侵入後、神経細胞に感染し、直接的あるいは炎症反応によって細胞を破壊する。そのため、致死性あるいは後遺症を残すことがある。よって、予防が重要な感染症である。われわれは、フラビウイルス感染症による脳炎発症機序の解明と新規ワクチン評価系の確立を目的として、BALB/c を用いてウイルス血症モデルを確立し、病理学的解析を行ってきた。今年度は、脳炎関連フラビウイルスの神経病原性の相違点を明らかにする目的で、ダニ媒介性脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、および日本脳炎ウイルスの感染病理を総合的に比較し検討した。

#### B.研究方法

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。感染実験の概略は次の通りである。なお、ウエストナイルウイルスおよび日本脳炎ウイルスの感染実験は国立感染症研究所村山分室高度安全実験施設、ダニ媒介性脳炎ウイルスは長崎大学熱帯医学研究所において各機関のバイオセーフティーレベル 3 病原体取り扱い規定および動物実験委員会規定に従い実施した。

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 30 分)あるいは pH 6.0 あるいは pH9.0 の抗原賦活化液(121 10 分)を用いた。

#### 【倫理面への配慮】

(倫理面への配慮)本動物実験は、国立感染症研究所あるいは長崎大学熱帯医学研究所の動物実験委員会に承認された実験計画に従い行った。

#### C.研究結果

それぞれの接種群の瀕死期中枢神経系組織病変とウイルス抗原所見を図に示した。また、経時的な病変とウイルス抗原陽性の動物数の変化を表にまとめた。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。

#### D.考察

いずれのウイルスも、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(データは示さない)。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。

#### E.結論

3 つの神経向性フラビウイルスはマウスにおいて異なる病原性を示すが、これらはウイルス血症後の中枢神経系侵入経路の違いが反映されており、組織病変によるウイルス種の鑑別は困難であった。

#### F.研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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.

##### 2. 学会発表

該当無し

#### G.知的財産権の出願・登録状況

該当無し

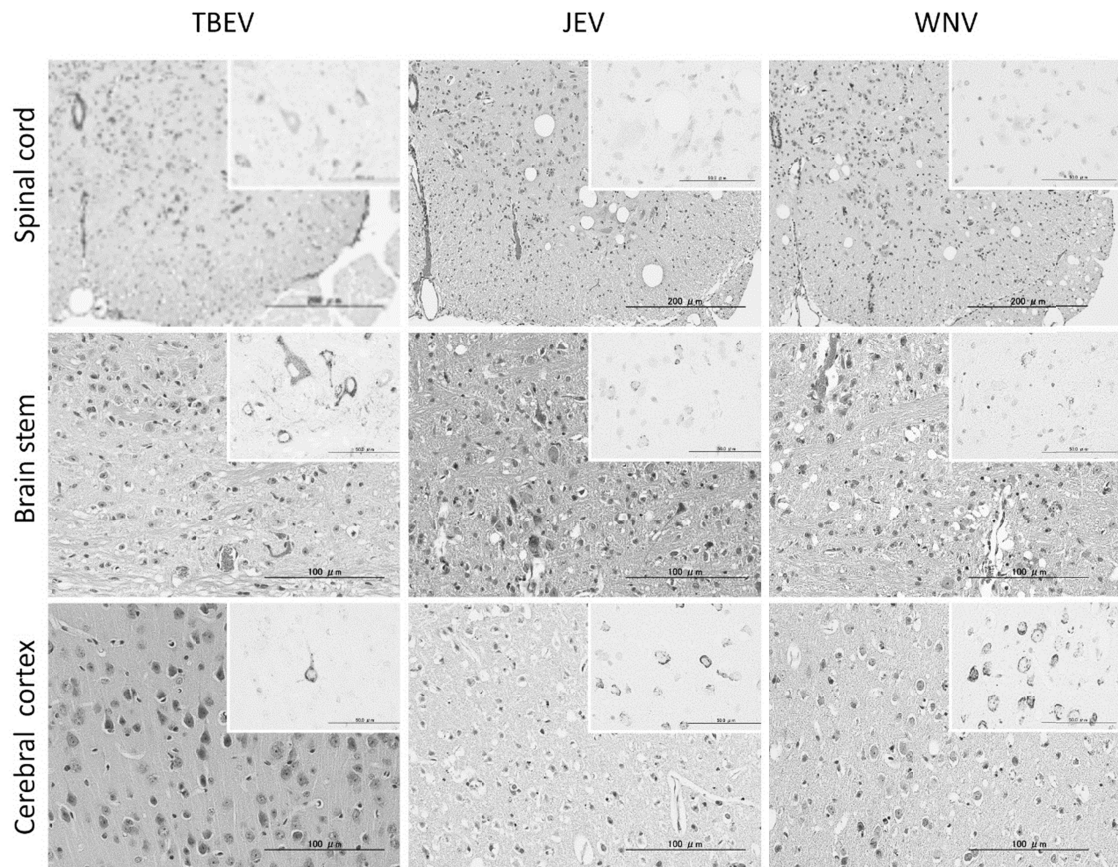


図 フラビウイルス静脈内接種後の BALB/c マウス中枢神経系における組織病変。

静脈内接種後に瀕死となったマウスの組織を比較した。左パネル、ダニ媒介性脳炎 (TBEV) 感染組織。感染 8 日目の脊髄、延髄および大脳皮質において変性した大型の錐体神経細胞にウイルス抗原が検出された(挿入図)。脊髄のみ炎症性細胞浸潤を認める。中央パネル、日本脳炎ウイルス (JEV) 感染組織。脊髄と脳幹の変性した錐体神経細胞にウイルス抗原が陽性である。大脳皮質の多くの細胞は急性壊死に陥り、ウイルス抗原は多くの大型神経細胞が強陽性であった。右パネル、ウエストナイルウイルス (WNV) 感染組織。脊髄と脳幹に神経食現象を認めるが、ウイルス抗原陽性細胞は少ない。大脳皮質の急性壊死あるいは変性した大型の神経細胞がウイルス抗原陽性であった。

表 フラビウイルス静脈内接種後の BALB/c マウスにおける組織病変とウイルス抗原陽性  
所見

解剖日	ダニ媒介性脳炎				日本脳炎ウイルス				ウエストナイルウイルス			
	3日	5日	7日	8日	3日	5日	7日	9-10日	3日	5日	7日	6-14日
腸管神経叢	0/0*	1/0	3/1	3/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1
脊髄	0/0	0/0	2/1	2/1	0/0	0/0	0/0	8/8	0/0	0/0	0/0	1/2
脳幹(視床)	0/0	0/0	1/0	2/1	0/0	0/0	0/0	9/9	0/0	0/0	0/0	6/7
大脳皮質	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	1/1	9/9	0/0	0/0	0/0	6/6

\*ウイルス抗原陽性動物数/組織病変陽性動物数

ダニ媒介性脳炎ウイルス感染 8 日目の動物数：3 匹、日本脳炎ウイルス感染 9-10 日目の動物数：9 匹、ウエストナイルウイルス感染 6-14 日目の動物数：10 匹。

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

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

研究分担者 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部長

研究要旨:クリミア・コンゴ出血熱に対しては、これまで治療薬としてリバビリンの投与が標準的であったが、その効果は科学的には証明されていない。一方、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、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と報告された(PLoS NTD, 2014)。一方、クリミア・コンゴ出血熱の原因ウイルスであるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスと同じようにブニヤウイルス科に属する重症熱性血小板減少症候群ウイルスによる全身感染症(クリミア・コンゴ出血熱の病態に類似する)に対しても、ファビピラビルには高いリバビリンより遙かに高い治療効果の認められるとする研究成績が私たちのグループから発表された(mSphere, 2015)。ファビピラビルは日本で抗インフルエンザウイルス薬として開発された薬剤であり、インフルエンザウイルス感染症に対する治療薬としての治験が済んでいる。輸入感染症として日本でクリミア・コンゴ出血熱患者が発生した場合に備えて、ファビピラビルを使用できるように準備しておく必要があると考えられる。

A. 研究目的

クリミア・コンゴ出血熱(Crimean-Congo hemorrhagic fever, CCHF)は、日本では一類感染症に分類される感染症で、いわゆる狭義のウイルス性出血熱に分類される感染症の代表的な感染症である。ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類されるCCHFウイルス(CCHFV)によるマダニ媒介性ウイルス感染症である。アフリカ、東欧、中近東、中央アジア(インド、中国西部の新疆ウイグル自治区を含む)に広く分布している。ドイツや英国で輸入感染事例も発生しており、日本においても輸入感染事例発生時に備えておく必要がある。

2011年に中国の研究者らによりCCHFVと同様にブニヤウイルス科に分類される新規ウイルスによるマダニ媒介性ウイルス感染症、重症熱性血小板減少症候群(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)が、中国の湖北省、河南省、山東省、黒竜江省等の山岳地域の農民の間で流行していることが報告された。SFTSウイルス(SFTSV)は、ブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される。2013年には、SFTSが日本でも流行していることが明らかにされ、その対策が急務となっている。その対策研究の過程で、ファビピラビルがSFTSVに対して抗ウイルス活性を示し、さらにインターフェロンリセプターノックアウト(IFNRKO)マウスにおける感

染モデルにおいて、高い治療効果が示された。

ファビピラビルは日本の製薬メーカー富山化学の古田要介博士らにより開発された RNA ウイルスに対する広スペクトラム活性を示す抗ウイルス薬 (RNA ポリメラーゼ阻害薬) である。

本研究の目的は CCHF に対する治療においてファビピラビルを用いることの可能性を文献的に評価することである。

## B. 研究方法

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。

## C. 研究結果

PubMed 上において「Crimean-Congo hemorrhagic fever」および「favipiravir」のキーワードで文献検索した結果、論文 1 (Oestereich L, et al. Evaluation of antiviral efficacy of ribavirin, arbidol, and T-705 (favipiravir) in a mouse model for Crimean-Congo hemorrhagic fever. PLoS Neglected Tropical Diseases, 8:e2804, 2014) のみがヒットした。また、「Severe fever with thrombocytopenia syndrome」および「favipiravir」のキーワードで文献検索した結果、論文 2 (Tani H, et al. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the treatment of infections with

lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. mSphere 1(1):e0061-15, 2015) がヒットした。

論文 1 では、リバビリンとファビピラビルの Vero E6 細胞における CCHFV に対する 50% inhibitory concentration (IC50) はそれぞれ、2.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  および 1.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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。

SFTS に対する治療効果を、IFNRKO マウスを用いた研究 (論文 2) においても同様の成績が得られた。リバビリンの曝露後投与により、致命率の改善は得られるものの、発症 (体重減少) 予防効果は限定的であった。一方、ファビピラビルを曝露 (感染) 直後に投与すると、致命率は 0% で、かつ、発症 (体重減少) は認められなかった。SFTSV を感染させてから 3 日目までにファビピラビルを投与すると、致命率は 0% であり、かつ、発症の程度もコントロールに比較して軽症化していた。

## D. 考察

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であった。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遙

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。

#### E. 結論

ファビピラビルには CCHF 及び SFTS に対する治療効果および曝露後投与による発症抑制効果が期待される可能性がある。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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

- 3) 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

##### 2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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



H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

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  
狂犬病等の疫学に関する研究

研究分担者 井上 智 国立感染症研究所・獣医科学部

研究協力者 野口 章 国立感染症研究所・獣医科学部

Bazartseren Boldbaatar モンゴル・獣医学研究所

研究要旨:本研究では、海外の研究協力者と共同してユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病(リッサウイルス感染症を含む)について流行状況に関する情報の収集、疫学調査、流行様式の解明、新規診断法開発等を行ってわが国への侵入可能性や発生予測・被害推計などを可能にすることを目的としている。今年度、モンゴル獣医学研究所の協力を得て、狂犬病と診断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おり、ウイルスの N 遺伝子を利用した分子系統樹からグループ A(モンゴル内陸:イヌ株・キツネ株・オオカミ株)とグループ B(ロシアとの国境沿い:イヌ株・キツネ株)に分類されることが明らかになった。グループ A は 5 つ以上のクレードに細分類できることが示され、オオカミ由来、キツネ由来、イヌ由来のウイルス株がそれぞれの宿主で維持されていることが示唆されたが、モンゴルでオオカミ、キツネ、イヌ間でどのように狂犬病ウイルスが流行・伝搬しているかを解明するためには、狂犬病を発症した時期や場所が近似しているウイルス株についてより詳細な系統解析を行う必要があると考えられた。今後、より詳細な解析を進めることで、異なる野生動物種間での狂犬病ウイルス伝搬と流行の機序解明が可能になると考えられた。

**A. 研究目的**

狂犬病はニュージーランド、オーストラリア、ハワイ、英国、日本などを除く世界のほぼ全域で流行している。毎年、アジアとアフリカを中心に 5 万~7 万人を超える死亡例があると推計されており、ヒトを含むほぼすべての哺乳類に致死的な脳炎を起こすウイルス性の動物由来感染症であ

る。

わが国では、1970 年と 2006 年に発生したヒトの輸入狂犬病 3 症例を除いて、半世紀以上にわたり狂犬病が国内で発生していない。しかしながら、アジア諸国ではイヌを中心に狂犬病が蔓延しており、ヒトの公衆衛生における大きな脅威となっている。

本研究の目的は、海外の研究協力者と共同してユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病(リッサウイルス感染症を含む)について流行状況に関する情報の収集、疫学調査、流行様式の解明、新規診断法開発等を行ってわが国への侵入可能性や発生予測・被害推計を可能にすることである。

今年度、モンゴル獣医学研究所の協力を得て、狂犬病と診断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、異なる野生動物種間での狂犬病ウイルス伝搬と流行の機序の解析を行った。

## B. 研究方法

モンゴルの獣医学研究所 (Institute of Veterinary Medicine) の狂犬病サーベイランスで狂犬病陽性と診断された動物の脳組織からRNAを抽出して狂犬病ウイルスのN遺伝子について分子系統樹による疫学解析を行った。

### 本研究で使用した狂犬病の検体

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。本研究で新しく入手した狂犬病陽性と診断された動物の背景等について表1に示した。また、モンゴルの全国地図と狂犬病陽性となった動物の生息していた9省を図1に示した。

### Viral RNAの解析

モンゴルの獣医学研究所で狂犬病と診断された動物の脳材料から抽出したRNAはRNAstableチューブ(RNAstable Test Kit, Biomatrix, Inc.)を利用して室温で移送した。狂犬病ウイルスのN遺伝子をPCRで増幅させた後に、増幅cDNAの塩基配列をABI 3130 genetic analyzerで特定したものをGENETIX ver.12(株式会社ゼネティックス)で解析した(表2)。

### RT-PCRの反応条件

RT:

10 ul RNA

+

1 ul 50 ng/ul-Random primer

(Promega, C1181)

95 °C 1 min, on ice, room temp.

+

4 ul 5 X Buffer

4 ul dNTP (2.5 mM each)

1 ul rRNasin (Promega, N2511)

1 ul AMV RTase (Promega, M9004)

42 °C 45 min, 95 °C 5 min 4 °C

PCR:

反応試薬

DW 33ul

10 X Buffer 5ul

2mM each-dNTP 5ul

50mM-MgSO<sub>4</sub> 2ul

JW12(mix) 2ul

JW6(mix)	2ul	+	
PI-Taq	0.2ul		BigDye Sequencing Buffer
Temp(x1)	1ul	(x5)	3.5ul
Total	50ul	+	
			Template(606bp) (>10ng/ul)
反応条件			5-20ug
94 °C 2 min		+	
			シーケンスプライマー
94 °C 30 sec		(1pmol-each/ul)	3.2ul
50 °C 30 sec		+	
68 °C 2 min			DW
30 回			up to 20ul
4 °C		=	Total 20ul
使用酵素			使用プライマー
Polymerase: Platium Taq High Fidelity (Invitrogen 11304)			JW12(mix) (1pmol-each)
dNTP(2mM each) (Toyobo NTP-301)			JW6(mix) (1pmol-each)
使用プライマー			サイクルシーケンス
JW12(mix) 10pmol-each			96°C 3min
JW6(mix) 10pmol-each			96°C 10sec
			50°C 5sec
			60°C 4min
増幅cDNAのシーケンス			25 回
精製: QIAquick PCR Purification kit (Qiagen 28104)			4°C
反応試薬			サイクルシーケンス後、Ethanol/EDTA 抽出を 行い ABI 3130 genetic analyzer で配列を決定し た。
BigDye Terminator Ready Reacting Mix (x 2.5) 1ul			

参考文献: Back EM, Lowings JP, Smith J, Heaton PR, McElhinney LM. J.Virol.Method 105:25-35, 2002.

### C. 研究結果

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(図2)。

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。

グループAに分類された狂犬病ウイルスをCladogram / Circularで系統樹表記することで、オオカミ、キツネ、イヌ由来の狂犬病ウイルスは5つのサブグループに分類されることが明らかとなった(図3)。

サブグループA1はキツネ由来5株とオオカミ由来1株、サブグループA2はオオカミ由来3株、サブグループA3とA4はキツネ由来1株とイヌ由来1株、サブグループA5はイヌ由来2株を含むクレードを構成した。

サブグループA3とA4に含まれるイヌ由来株はいずれもキツネ由来株から派生した位置に分類され、グループA1に含まれるキツネ由来5株はオオカミ由来の1株から派生した位置に系統分類さ

れた。

モンゴル獣医学研究所で脳材料から抽出したRNAをRNastableチューブ(RNastable Test Kit, Biomatrix, Inc.)によって移送した24株のRNA中、15株は塩基配列を特定することができたが、残り9株は十分なRNA量が回収できなかった。実験記録から、RNastableチューブによるRNA乾燥が不十分であったため室温移送中にRNAが失活したものと考えられた。今後の検討課題である。

### D. 考察

新たに遺伝子解析を行った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。

本研究で、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。

グループAは5つ以上のクレードに細分類できることが示され、オオカミ由来、キツネ由来、イヌ由来のウイルス株がそれぞれの宿主で維持されていることが示唆されたが、モンゴルでオオカミ、キツネ、イヌ間でどのように狂犬病ウイルスが流行・伝搬しているかを解明するためには、狂犬病を発症した時期や場所が近似しているウイルス株についてより詳細な系統解析を行う必要がある。

ると考えられた。

## E. 結論

今年度、モンゴル獣医学研究所の協力を得て、狂犬病と診断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示唆され、ウイルスの N 遺伝子を利用した分子系統樹からグループ A(モンゴル内陸:イヌ株・キツネ株・オオカミ株)とグループ B(ロシアとの国境沿い:イヌ株・キツネ株)に分類された。グループ A は5つ以上のクレードに細分類できることが示され、オオカミ由来、キツネ由来、イヌ由来のウイルス株がそれぞれの宿主で維持されていることが示唆されたが、モンゴルでオオカミ、キツネ、イヌ間でどのように狂犬病ウイルスが流行・伝搬しているかを解明するためには、狂犬病を発症した時期や場所が近似しているウイルス株についてより詳細な系統解析を行う必要があると考えられた。今後、野生動物における異なる宿主間での狂犬病ウイルス伝搬と流行の機序解明につながるものと期待された。

## J. 健康危険情報

なし

## K. 研究発表

### 1.論文等発表

- 1) 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 . 2015 . 79:467-472 .

- 2) 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 (Hamamoto N. and Inoue S. Rabies and rabies prevention in Japan. Yamaguchi J. Vet. Med. 41:1-12)
- 3) 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 Scienceas)。42:215-223、2015
- 4) 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

### 1.学会発表等

- 1) Yamamoto1, K., Ujii1, 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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

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。

- 10) 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.
- 11) 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。
- 12) 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。
- 13) 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。
- 14) 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。
- 15) 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。
- 16) 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。
- 17) 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。
- 18) 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。



- 19) 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。
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



表1. モンゴル獣医学研究所で狂犬病と診断された動物24頭の背景等

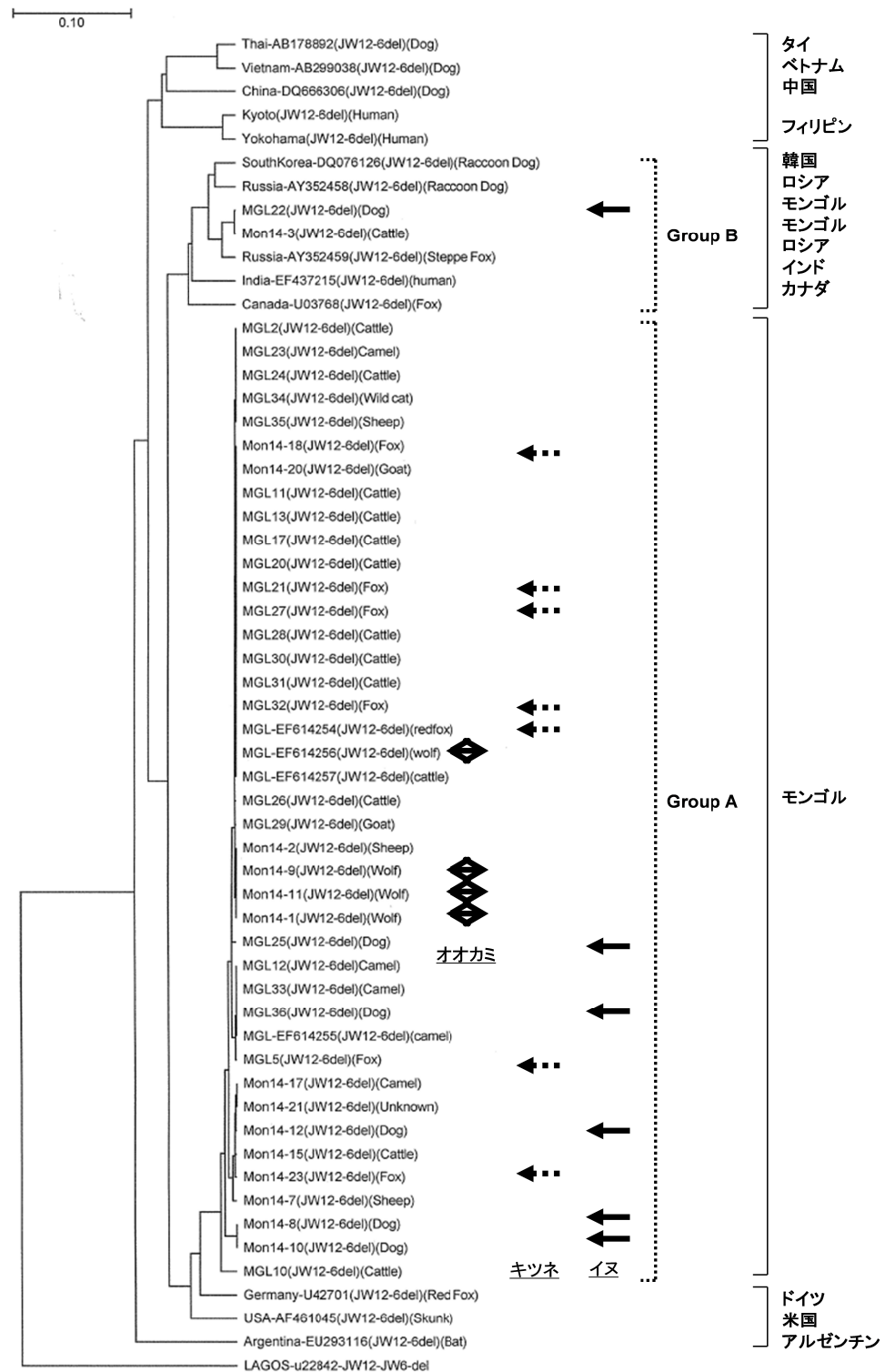
Province	Species				
	Wolf	Fox	Dog	Domestic animals	Unknown
Govi-Altai	4 (3)		2 (2)	1 (1)	
Dundgovi				3 (2)	
Uvurkhangai					2
Govi-Sumber			1 (1)		
Dornogovi				3 (1)	
Dornod					1
Bulgan		1 (1)		3 (1)	
Tuv		1 (1)		1 (1)	
Bayankhongor					1 (1)

( )内の数: ウイルスRNA増幅後にN遺伝子の部分配列

図1. モンゴルの全国地図と狂犬病が陽性であった動物のいた省



図2. モンゴル獣医学研究所で狂犬病と診断されたオオカミ由来株、キツネ由来株、イヌ由来株の系統樹(UPGMA)

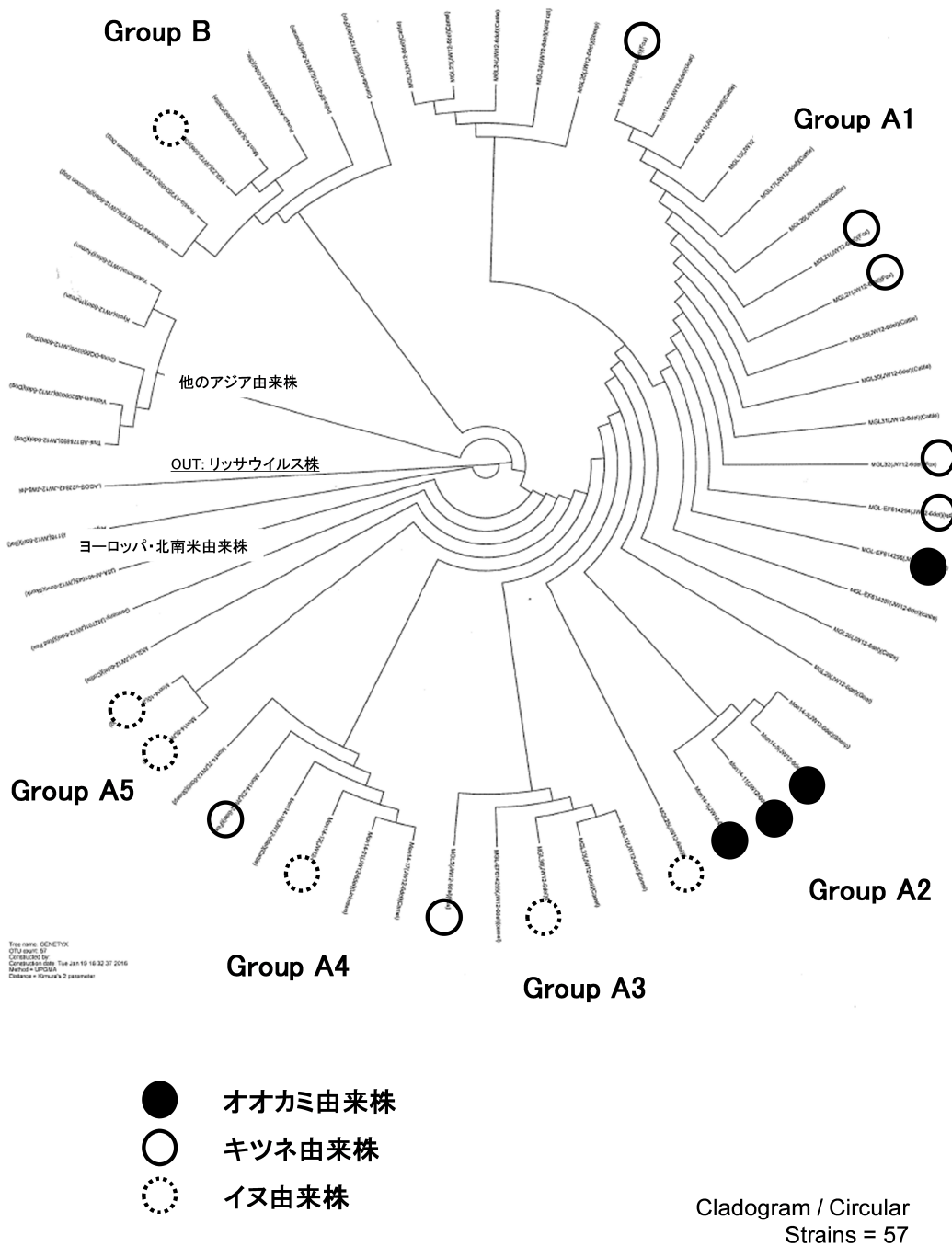


Tree name: GENETYX  
 OTU count: 57  
 Constructed by:  
 Construction date: Tue Jan 19 18:27:37 2016  
 Method = UPGMA  
 Distance = Kimura's 2 parameter

OUT: リッサウイルス株

参照: Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Mongolia.  
 JIID 63:358-363, 2010.

図3. モンゴル獣医学研究所で狂犬病と診断されたオオカミ由来株、キツネ由来株、イヌ由来株の系統樹 (Cladogram / Circular)





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  
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

分担研究者: 伊藤直人 岐阜大学応用生物科学部・准教授

研究要旨: 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ものの、その分子機能についてはほとんど解明されていない。昨年度、L 蛋白質の機能解析を実施するためのツールとして、レポーター遺伝子を発現する L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作出した。本年度は、同ウイルスを用いた L 蛋白質機能解析に使用するため、3xFLAG タグ融合 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、組換え L 蛋白質の検出に成功した。また、3x FLAG タグ融合 L 蛋白質は、タグの付加がない L 蛋白質と同様の効率で、L 遺伝子欠損ウイルスの増殖を支持することが判明した。今後、この組換え L 蛋白質に変異を導入することで、その分子機能の解析を実施する予定である。

A. 研究目的

狂犬病は、ほぼ 100%の高い致死率と重篤な神経症状を特徴とするウイルス性人獣共通感染症である。有効かつ確実な治療法は、現在も確立されていない。その病原体である狂犬病ウイルスは、主に神経細胞で活発に複製する。すべてのウイルス蛋白質が複製に必須であるものの、特に、L 蛋白質は、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして中心的な役割を担っている。L 蛋白質は、ゲノム複製のみならず、mRNA の合成にも関与し、その合成に必要なキャッピング活性およびポリ A 付加活性も保有している。このような重要性および多機能性より、L 蛋白質は治療法の有力な分子標的となると考えられる。しかし、L 蛋白質の分子機能は、ほとんど未解明のままであ

る。

昨年度は、L 蛋白質の機能解析を推進するためのツールとして、レポーター遺伝子を発現する L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作出した。プラスミドを用いた一過性発現により L 蛋白質を供給することで、L 遺伝子欠損ウイルスが複製し、かつレポーター遺伝子が発現されることが確認された。したがって、様々な領域に変異を導入した組換え 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、L 蛋白質の分子機能解析が可能となった。

上記のような機能解析を実施するためには、変異導入が L 蛋白質の発現量に及ぼす影響を同時に評価する必要がある。しかし、これまで、L 蛋白質に対する特異抗体を用いて組換え L 蛋

白質の検出を試みたものの、成功には至っていない(データ未掲載)。そこで本年度は、組換え L 蛋白質の検出を容易にするため、3x FLAG タグを融合した組換え L 蛋白質を作出した後、実際に抗 FLAG 抗体を用いてその発現の検出を行った。また、タグを付加した組換え L 蛋白質が L 遺伝子欠損ウイルスの増殖を支持するか否かについて、同ウイルスが発現するルシフェラーゼの活性を指標として評価した。

## B. 研究方法

常法の DNA クローニング技術を用いて、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 に挿入した。この時、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った。完成したプラスミドを pCNIIL-3xFLAG と命名した。

pCNIIL-3xFLAG からの組換え L 蛋白質の発現を確認する目的で、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た。3 日後に細胞を固定した後、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・プロット法により組換え L 蛋白質の検出を行った。

pCNIIL-3xFLAG から発現される 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)を感染多重度 0.01 で接種した。接種 3 日後、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。同様の実験を、FLAG タグを持たない L 蛋白質を発現するプラスミドを用いて実施した。

(倫理面からの配慮について)

本実験は、岐阜大学組換え DNA 安全委員会の承認を得ている(25 岐大術産 第 2 号の 21)。

## C. 研究結果

pCNIIL-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た。その結果、強い蛍光シグナルが細胞質を中心に観察された(図 1)。一方、空ベクターを導入した細胞に上記のようなシグナルは認められなかった。

ウェスタン・プロット法により組換え L 蛋白質の発現を確認したところ、pCNIIL-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 のバンドが観察された(図 2)。一方、空ベクターを導入した細胞のライセートでは、このようなバンドは確認されなかった。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、pCNIIL-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- $\Delta$ L/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(図 3)。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。

#### D. 考察

L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを用いて L 蛋白質の機能解析を行うには、種々の領域に変異を導入した組換え L 蛋白質を作製・発現し、同ウイルスの複製に伴い誘導されるレポーター遺伝子の発現をモニターする必要がある。すなわち、レポーター遺伝子の発現低下を指標として、L 蛋白質の機能に重要な役割を果たす領域を特定することができると考えられる。一方、変異導入による L 蛋白質の機能低下の機序を検討する場合、当該変異が L 蛋白質の発現量に影響を及ぼす可能性を検証する必要がある。しかしながら、約 220 kDa の L 蛋白質の高い分子量が一因となり、プラスミドから発現した場合でも、組換え蛋白質を検出することは非常に困難である。実際、当研究室で所有している抗 L 蛋白質ウサギ血清を用いて、ウェスタン・ブロット法による組換え L 蛋白質の検出を試みたが、成功には至らなかった(データ未掲載)。そこで、タグの付加とその特異抗体の活用により組換え L 蛋白質の検出が可能となるかについて検討した。

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。その結果、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(図 1 および 2)。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(図 3)。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。

#### E. 結論

L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを用いた L 蛋白質の機能解析に使用する目的で、3xFLAG タグを C 末端に融合した組換え L 蛋白質を作出した。抗 FLAG 抗体により同蛋白質の検出が可能になったこと、ならびに 3xFLAG タグの付加が L 蛋白質の機能に顕著な影響を与えないことが確認されたことから、組換え L 蛋白質の発現量と機能性の両者を評価できる実験系を樹立することができた。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

該当なし

#### 2. 学会発表

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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

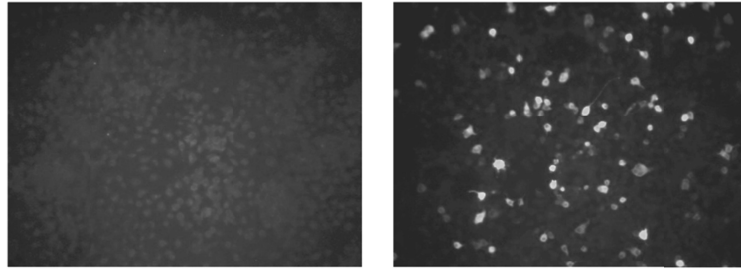
該当なし

#### 2. 実用新案登録

該当なし

#### 3. その他

該当なし



導入プラスミド pCAGGS/MCS (空ベクター) pCNiL-3xFLAG

図1. 間接蛍光抗体法による組換えL蛋白質の検出

細胞：マウス神経芽腫由来NA細胞  
 一次抗体：抗FLAG抗体

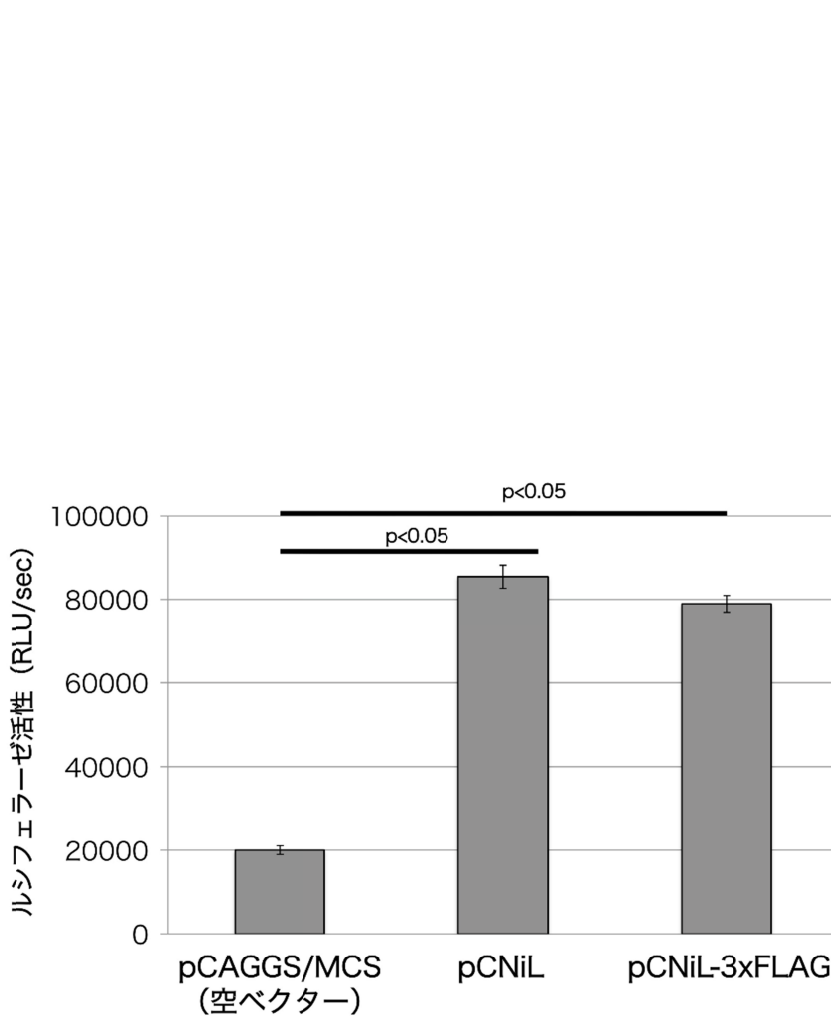


図3. L遺伝子欠損ウイルスを用いた組換えL蛋白質の機能性の確認

kDa  
 245  
 190  
 135  
 100  
 80

図2. ウェスタ



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

**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)

研究分担者 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室長  
研究協力者 朴 ウンシル 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室研究員  
研究協力者 木村 昌伸 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官  
研究協力者 鈴木 道雄 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官  
研究協力者 宇根 有美 麻布大学 獣医学部 獣医学科 教授

**研究要旨:** 1)これまでに、本研究にて、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検討した。A9h (A7h,A10h)に対する抗血清は各種ブルセラ属菌との反応性が *B. abortus* に対する抗血清と同様であった。A141 に対する抗血清は、A141 との反応性が強く、*B. canis* と一部交差反応を示した。A105 は A105 とのみ強く反応していた。3種のカエルから分離された新規ブルセラ属菌はそれぞれ異なる抗原性を持つことが明らかとなった。2) 特異的血清診断法に用いる検出用抗原を作成した。*B. canis* を UV 不活化、超音波処理等を行った後、超遠心処理により得られた上清を抗原として、Western Blotting、2次元電気泳動により、特異的タンパク群を同定した。その中で、ブルセラ属に近縁な *Ochrobactrum* 属菌とのホモロジーが少ないタンパクを選択し、それらの組換えタンパクを作成した。得られた組換えタンパクと *B. canis* 抗血清との反応性を確認したところ、10KDa chaperonin が良好な反応性を示した。

## A. 研究目的

波状熱やマルタ熱として知られるブルセラ症 (Brucellosis) は、ブルセラ属菌 (*Brucella* spp.) による、世界中の多くの国と地域で重要な人獣共通感染症である。近年では、旧来の家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*) やイヌブルセラ菌 (*B. canis*) だけでなく、海棲哺乳類由来や、その他新種のブルセラ属菌が、齧歯類、食肉類、霊長類、さらにヒト患者からも分離されてきている。(表 1)。

1. 2012 年にアフリカ産無尾類由来の新たなブルセラ属菌が報告され、これらは *B. inopinata* に近縁であった。*B. inopinata* はヒトに感染しうる菌と考えられているが、その自然宿主や生態は不明である。我々は、これまでに、本研究にて、3種の無尾類より、新規ブルセラ属菌 5株を分離した(表 2)。これら 5株について、生化学的性状を検討したところ、これまで知られている他のブルセラ属菌よりも、遺伝的に最もブルセラ属菌と近縁であると考えられている *Ochrobactrum* 属菌に近い性状を示したが、A105, A141 株と A9h (A7h,

A10h)株では、その性状に差が認められた。さらに、A9h は、omp2-ca タイプの配列を検出する特異的 PCR で、A105 や A141 に比して、反応性が非常に弱く、これら 2 株とは異なる遺伝子背景を持つことが示唆された。今回、それぞれの死菌をウサギに免疫して作成した抗血清を用いて、抗原性の違いを検討した。

2. 国内では、ブルセラ症の血清診断法には試験管凝集反応 (TAT) が用いられる。しかし、その煩雑さとサンプル血清使用量の多さ、最終的に判定者により差があり得る、目視による判定という欠点の問題となることから、ELISA 法やイムノクロマト法など、より簡便で特異性・普遍性が高い方法の開発が期待されている。LPS が抗原として用いられることもあるが、smooth-type のブルセラ属菌の LPS は *Yersinia enterocolitica* O9 と非常に高いホモロジーを持つ。そこで、Western Blotting 法により、ブルセラ属菌特異的抗原タンパクを選定し、そのアミノ酸配列・遺伝子配列の決定を行い、その組換えタンパクを作成し、診断用抗原としての可能性を検討した。

## B. 研究方法

### 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 (イエアメガエル由来)、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) を用いた。なお、A7h, A9h, A10h 株は同一個体から分離されており、これまでの解析ではその性状等も一致しており単一株と考えられることから、以下、A9h で代表する。

各菌株に対する抗血清は、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 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た。次いで、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-LC-MS/MS 法で当該タンパク群を同定した。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 ベクターを BamHI と KpnI で制限酵素処理を行い、その DNA 断片を、pET43.1b(+) 発現ベクターに挿入し、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。

## C. 研究結果

1. 無尾類由来ブルセラ属菌の抗原性の検討 (図 1): 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

1) 標的タンパクの選定: WB のスポット (図 2) 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) (表 3)。

2) 各遺伝子の construct は sequence でエラーのないことを確認した。各 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 (図 3)。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 (図 3)。当該組換えタンパクを精製した (図 4) が、これについての WB 等、詳細な解析は現在検討中である。

## D. 考察

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) を同定し、これの組換えタンパク作成を行った。その結果、10 kDa 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。さらに、その他既知のタンパクを含め、特異性、感度等の検討が必要である。

## E. 結論

1. 本研究において、これまでに以下の点が明らかとなった。1) 国内に流通するカエルからブルセラ属菌を分離した。2) 遺伝子解析により *B.*

*inopinata*に近縁だった。3)特異的遺伝子検出法を開発した。4)3種の菌はそれぞれ抗原性が異なっていた。5)ヒト細胞に感染、細胞内で増殖することからヒトへの感染・発症リスクを持つことが推測された。

2. 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、ブルセラ属菌に最も近縁とされる *Ochrobactrum* 属菌とホモロジーの低いタンパクについて、ブルセラ特異的組換えタンパクを作成した。10 kDa chaperonin が良好な反応性を示した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表等

### 1. 論文発表等

(1) 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

(2) 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

### 2. 学会発表等

(1) 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

(2) 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

(3) 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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



**表 1：ブルセラ属菌と主なホスト**

種	宿主動物	ヒトへの感染・発症
<b>Old species</b>		
<i>B. melitensis</i>	山羊、めん羊、ラクダ	あり (最も一般的で重要)
<i>B. abortus</i>	牛、水牛、エルク	あり (次に重要)
<i>B. suis</i>	ブタ、いのしし、トナカイ、カリブー	あり
<i>B. canis</i>	犬 (イヌ科)	あり (近年、報告数が増加傾向)
<i>B. ovis</i>	めん羊	報告無し
<i>B. neotomae</i>	げっ歯目	報告無し
<b>Novel species</b>		
<i>B. ceti</i>	クジラ、イルカ	2例の患者報告あり。実験室感染例も報告あり
<i>B. pinnipedialis</i>	アザラシ、アシカ	
<i>B. microti</i>	ハタネズミ、(土壌)	報告無し
<i>B. inopinata</i>	不明、(カエル?)	株名BO1、BO2の2例の報告あり
<b>Future species</b>		
<i>B. sp.</i> 83/13および <i>B. sp.</i> NF2653	げっし目	報告無し
<i>B. papionis sp. nov.</i>	バブーン	報告無し

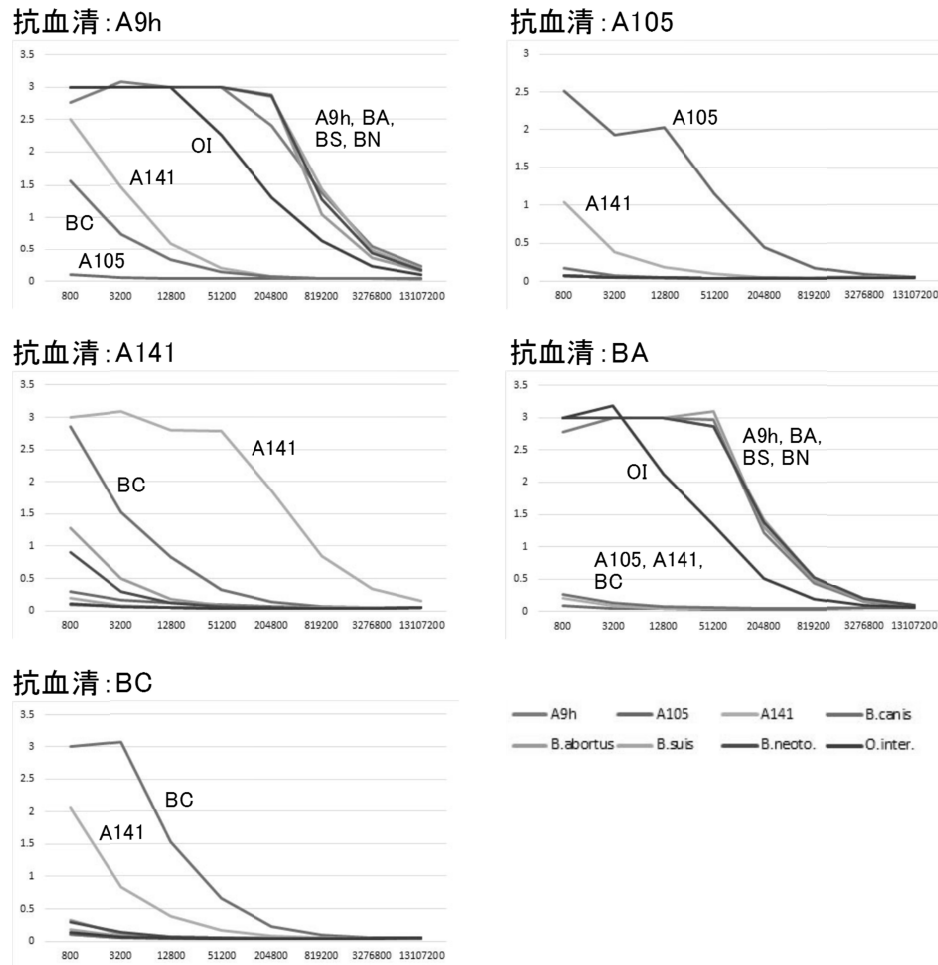
**表 2：無尾類よりの分離株**

株名	由来	臓器
A105	イエアマメガエル <i>Litoria caerulea</i>	骨髄
A141	デニスフロッグ <i>Polypedates dennysii</i>	肝臓
A7h	ベルツノガエル <i>Ceratophrys ornate</i>	肝臓
A9h		
A10h		

**表 3：診断用抗原候補タンパク**

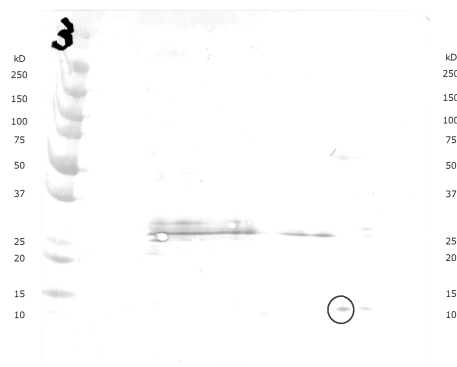
Protein	gene	MW	Note*	BLAST_P
10 kDa chaperonin	groS groES	10,393	<i>gi 489056247</i>	<i>Ochrobactrum</i> 94%
Uncharacterized protein (DNA gyrase subunit B)		12,741	<i>gi 489054589</i>	<i>Ochrobactrum</i> 85%
OsmC family protein		14,232	<i>gi 489055612</i>	<i>Ochrobactrum</i> 94%
Uncharacterized protein		11,217	<i>gi 489057608</i>	<i>Ochrobactrum</i> 83%
Uncharacterized protein		14,831	<i>gi 489053777</i>	<i>Ochrobactrum</i> 82%
NADH-ubiquinone oxidoreductase		11,955	<i>gi 489053677</i>	<i>Ochrobactrum</i> 87%

**図 1 : ELISA による各抗血清と各抗原の反応性**



**図 2 : 標的タンパクの選定用スポット (2次元電気泳動による WB)**

*B. canis* UV2-1  
 ATTO SDS ELIMINANT B遠心G25  
 1D:PH3-10, 2D:5-20%  
 Ag:5 $\mu$ g  
 1st Ab:  $\times 1,000$   
 2nd Ab: proteinA/G-HRP  $\times 10,000$



*B. canis* イヌ感染血清 (MAT x160, TAT160)

図 3 : 組換えタンパクの確認と *B. canis* 免疫ウサギ血清との反応性

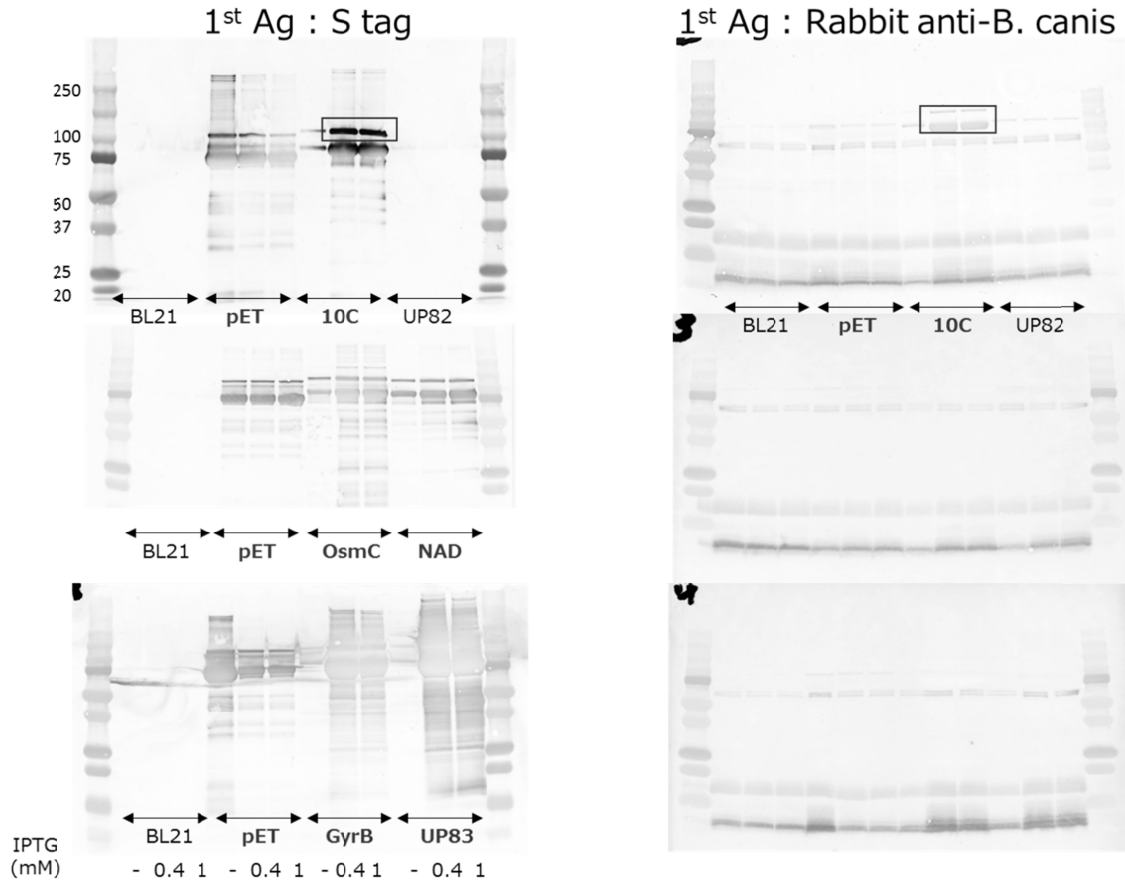
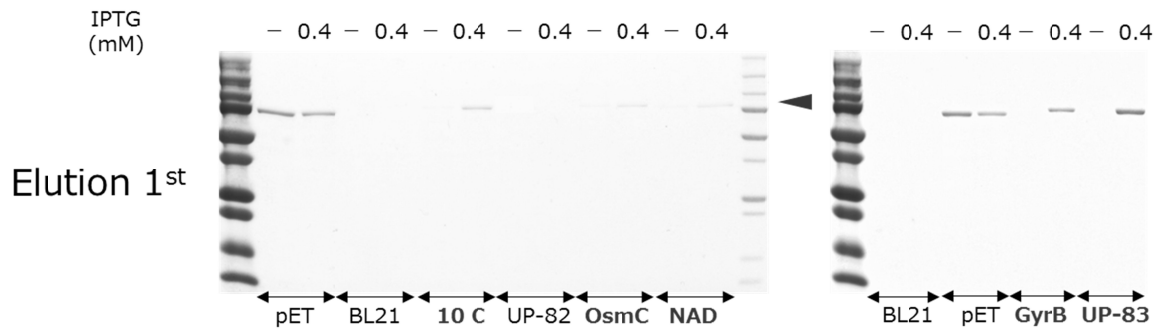


図 4 : 組換えタンパクの精製



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

- バルトネラ感染症の疫学 -

研究分担者 丸山 総一 日本大学生物資源科学部・教授

研究要旨: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。*gltA* と *rpoB* による遺伝子型別の組み合わせによって, 分離株は 12 の遺伝子グループ(I~XII)に分類された。さらに, 5 遺伝子領域(*gltA*, *rpoB*, *ftsZ*, *ribC*, 16S rRNA)の連結配列に基づく系統解析を行ったところ, 日本のユビナガコウモリは 2 種の *Bartonella* を保有していることが明らかとなった。このうち, 1 種は台湾のユビナガコウモリが保有する *Bartonella* と非常に近縁であり, 他の 1 種は既存種とは異なる新種の *Bartonella* であることが示唆された。

A. 研究目的

近年の研究により, コウモリは様々なウイルス性人獣共通感染症の病原菌であることが明らかとなってきた。ニパウイルスやヘンドラウイルスは, マレーシアやバングラデシュ, オーストラリアのオオコウモリ属を, 狂犬病ウイルスを含むリッサウイルスは, ナミチスイコウモリやストローオオコウモリ属からそれぞれ検出されている。また, オーストラリアやブラジルのオオコウモリ属から *Leptospira* DNA が, オランダのヒナコウモリの仲間から *Campylobacter jejuni* がそれぞれ検出されていることから, コウモリはウイルスのみならず細菌性人獣共通感染症の病原菌にもなる可能性が示唆されている。

*Bartonella* は, 哺乳類の赤血球に寄生するグラム陰性菌で, その 13 種 2 亜種は人に病原性を有することが知られている。近年では, イギリス, ケニア, ペルー, グアテマラおよび台湾に生息する複数種のコウモリに *Bartonella* が広く分布する

ことが明らかとなってきた。また, コウモリから分離された *Bartonella mayotimonensis* に類似の DNA が, 人の心内膜炎から検出されたことから, コウモリは人のバルトネラ症の潜在的な病原菌になりうることを示されている。しかしながら, わが国のコウモリにおける *Bartonella* の保有状況は全く不明の状態である。そこで, 本研究では和歌山県で捕獲したユビナガコウモリにおける *Bartonella* の分布状況とその遺伝子性状を詳細に解析した。

B. 研究方法

2013 年に, 和歌山県某所の用水路トンネル内に生息していたユビナガコウモリを複数のコロニーから数頭ずつ捕獲し, 計 50 頭を研究に使用した。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* と推定した。*Bartonella* を保有していた各個体から無作為に 3 株を選択し、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同一性を検討した。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、台湾のコピ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、マイクロスキャン RAID パネルを用いて生化学性状を検討した。

(倫理面からの配慮について)

研究対象のコピナガコウモリは、学術研究用に捕獲された個体である。捕獲した個体は適切な麻酔下のもと、心臓から全採血した。

#### C. 研究結果

検討したコピナガコウモリの 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 の代表株は台湾のコピ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% の同一性であった。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% の同一性であった。(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 の代表株は台湾のコピ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)。

#### D. 考察

本研究では、わが国 (和歌山県) のコピナガコウモリが *Bartonella* を保有していることを初めて明らかにした。*gltA*, *rpoB* 領域の塩基配列の同一性解析および 5 領域の連結配列に基づく系統解析から、和歌山県のコピナガコウモリは 2 種の新たな *Bartonella* を保有しており、1 種は台湾のコピ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、和歌山県のコピ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、和歌山県のコピ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コピ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。

diversity of *Bartonella* species in wild small mammals in Asia. J. Wildl. Dis. 52(1): 10-21.

#### E. 結論

和歌山県のユビナガコウモリは *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。

#### 2. 学会発表

11) 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)

#### L. 健康危険情報

わが国のユビナガコウモリが保有する *Bartonella* の病原性は不明なものの、諸外国では心内膜炎患者の心臓弁から、コウモリを宿主とする *B. mayotimonensis* の DNA が検出されている。コウモリを感染源としたポルトネラ感染症の発生について留意する必要がある。

12) 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)

#### M. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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

#### N. 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. 遺伝子グループ代表株の *gltA* および *rpoB* 各領域の塩基配列の BLAST 検索結果

遺伝子グループ (株名)	近縁な <i>Bartonella</i> との相同性					
	<i>gltA</i>			<i>rpoB</i>		
	株名	由来 (国名)	相同性	株名	由来 (国名)	相同性
I (bat2-1)	No.5,6,8,15	ユピナガコウモリ (台湾)	100%	No.15	ユピナガコウモリ (台湾)	99.4%
II (bat8-1)	No.5,6,8,15	ユピナガコウモリ (台湾)	100%	No.15	ユピナガコウモリ (台湾)	99.3%
III (bat40-1)	No.5,6,8,15	ユピナガコウモリ (台湾)	100%	No.5	ユピナガコウモリ (台湾)	99.5%
IV (bat40-3)	No.5,6,8,15	ユピナガコウモリ (台湾)	100%	No.5	ユピナガコウモリ (台湾)	99.6%
V (bat44-2)	No.5,6,8,15	ユピナガコウモリ (台湾)	100%	No.5	ユピナガコウモリ (台湾)	100%
VI (bat23-1)	No.7,16	ユピナガコウモリ (台湾)	99.7%	No.5	ユピナガコウモリ (台湾)	100%
VII (bat8-3)	No.7,16	ユピナガコウモリ (台湾)	99.7%	No.5	ユピナガコウモリ (台湾)	99.3%
VIII (bat43-1)	No.7,16	ユピナガコウモリ (台湾)	100%	No.5	ユピナガコウモリ (台湾)	100%
IX (bat45-1)	No.7,16	ユピナガコウモリ (台湾)	100%	No.7	ユピナガコウモリ (台湾)	100%
X (bat48-1)	No.7,16	ユピナガコウモリ (台湾)	100%	No.15	ユピナガコウモリ (台湾)	99.3%
XI (bat48-3)	No.7,16	ユピナガコウモリ (台湾)	100%	No.15	ユピナガコウモリ (台湾)	99.2%
XII (bat24-1)	E5	PCR 産物から得られた <i>Bartonella</i> の <i>gltA</i> 領域における塩基配列 クモバエ (マレーシア)	88.1%	<i>B. quintana</i> Fuller <sup>T</sup>	ヒト (ユーゴスラビア)	89.1%

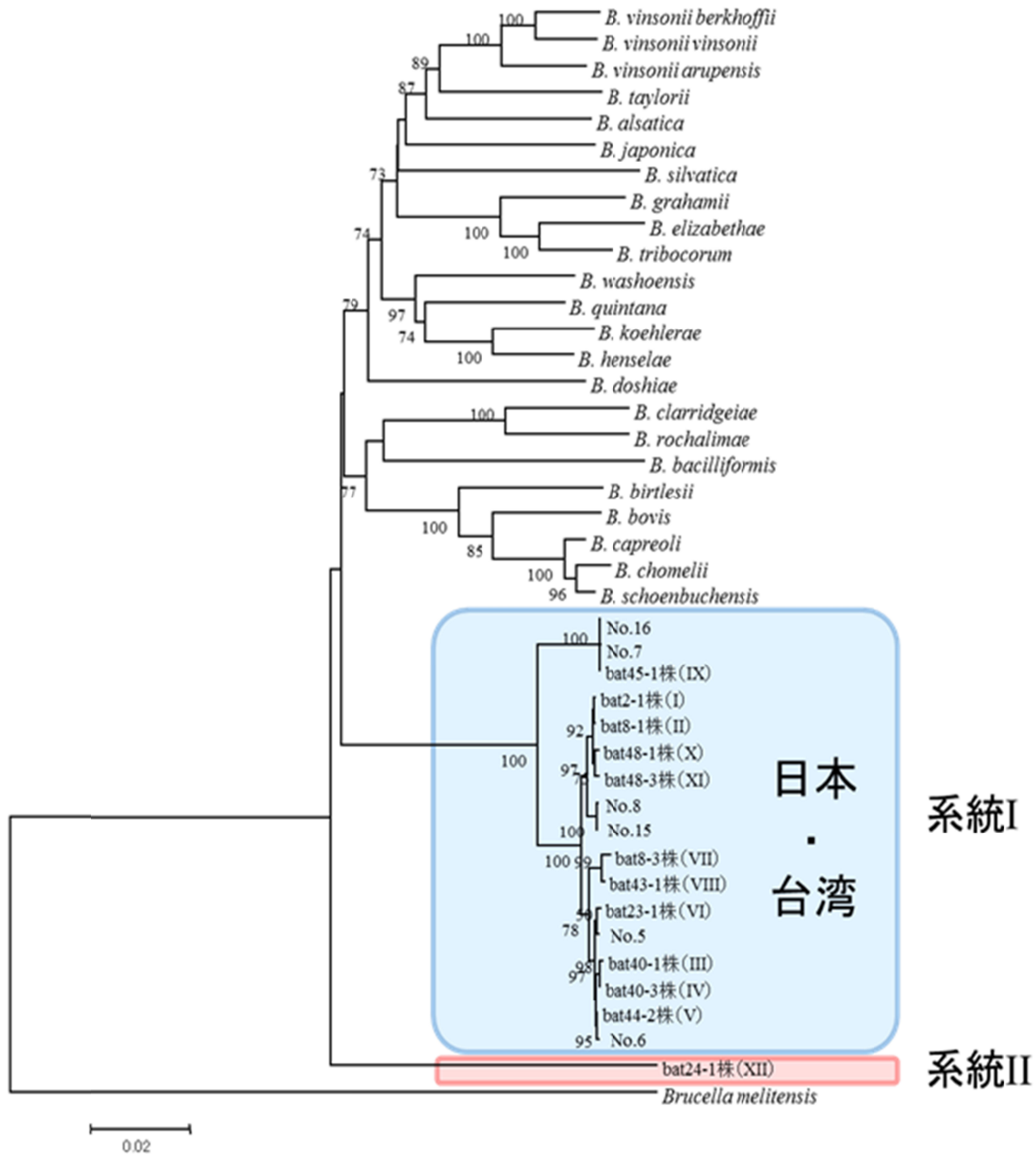


図1. 5 遺伝子 (*gltA*, *rpoB*, *ftsZ*, *ribC*, 16Sr RNA) 領域の連結配列に基づく系統解析

各遺伝子グループの代表株 12 株 ( bat2-1, bat8-1, bat40-1, bat40-3, bat44-2, bat23-1, bat8-3, bat43-1, bat45-1, bat48-1, bat48-3, bat24-1 ), 台湾のユビナガコウモリ由来 *Bartonella* No. 5, 6, 7, 8, 15 および 16 株ならびに *Bartonella* 標準株と共に系統解析を行った。括弧内のローマ数字は遺伝子グループ名を, 系統樹の分岐部に振られた数字は Bootstrap 値をそれぞれ示す。



表 2 . 分離株の生化学性状

生化学性状	系統		系統		既存種 <i>B. henselae</i> , <i>B. v. berkhoffii</i> <i>B. acomydis</i> , <i>B. pachyuromydis</i>
	bat23-1	bat48-1	bat24-1	bat24-2	
p-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド	-	-	-	-	-
p-ニトロフェニル-α-D-ガラクトピラノシド	-	-	-	-	-
ビス-p-ニトロフェニルリン酸	+	+	+	+	+
p-ニトロフェニル-N-アセチル-β-D-グルコサミド	+	+	+	+	-
p-ニトロフェニル-α-D-グルコピラノシド	-	-	-	-	-
o-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシド	-	-	-	-	-
p-ニトロフェニル-α-L-フコピラノシド	-	-	-	-	-
p-ニトロフェニル-α-D-マンノピラノシド	-	-	-	-	-
ロイシン	+	+	+	+	+
メチオニン	+	+	+	+	+
リジン (アルカリ性)	+	+	+	+	+
リジン (酸性)	+	+	+	+	+
グリシルグリシン	+	+	+	+	+
グリシン	+	+	+	+	+
プロリン	+	+	+	+	+
アルギニン	+	+	+	+	+
ピロリドニル	-	-	-	-	-
トリプトファン	+	+	+	+	+
3-インドキシルリン酸	-	-	-	-	-
トレハロース	-	-	-	-	-
ウレアーゼ活性	-	-	-	-	-
インドール反応	-	-	-	-	-
亜硝酸還元反応	-	-	-	-	-
カタラーゼ活性	-	-	-	-	-

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  
東南アジアのヤモリ由来 *Salmonella* Weltevreden 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

分担研究者 林谷秀樹 東京農工大学大学院・准教授

**研究要旨:** 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、その保有率は最も高い遺伝子(4 種)では 100%、低い遺伝子(1 種)では 0%であった。供試した 21 菌株は、病原遺伝子保有の有無により 5 パターンに型別された。また、これまで *S.weltevreden* から検出されたことのない *sopE1* 遺伝子は、沖縄由来株からのみ検出された。また、東南アジアの環境に広く分布し、人獣共通感染症の原因菌の一つとして知られ、近年、海外感染症として我が国に持ち込まれる事例が頻発している類鼻疽 (*Melioidosis*) について、ベトナム・メコンデルタの土壌から原因菌である類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*) の分離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%) から類鼻疽菌は分離され、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**

*Salmonella* Weltevreden は、東南アジアに広く分布し、これらの地域の人のサルモネラ感染症の大きな割合を占めている血清型である。近年、本血清型菌は、我が国の沖縄県に侵入し、その定着・拡大が問題となっている。東南アジアでは、ヤモリが本菌を高率に保有していることが我々の調査で明らかになっているが、本研究では東南アジアのヤモリ由来 *S. Weltevreden* における各種病原遺伝子の保有状況について、PCR 法により検討を行なった。

また、日本に侵入・定着が危惧される類鼻疽菌 (*Burkholderia mallei*) について、本年度は

増菌法と PCR 法を併用し、ベトナム・メコンデルタの土壌から本菌の分離を試みた。

**B. 材料と方法**

**1. 東南アジアのヤモリ由来 *S.weltevreden* の病原性遺伝子の検出**

**1) 供試菌株**

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。

**2) 標的とする病原遺伝子**

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。

### 3) DNA の抽出

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℃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。

### 3) PCR による病原遺伝子の増幅

200 µl の PCR チューブ (Bio-Rad) に、TaKaRa Ex Taq(5units/ µl) (TaKaRa) を 0.25 µl、10×Ex Taq Buffer を 5 µl、dNTP Mixture(2.5mM each)を 4 µl、滅菌精製水を 33.75 µl、50 µM のフォワードおよびリバースプライマーを各 1 µl ならびにテンプレート DNA を 5 µl 入れ、良く混和し、総量を 50 µl 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。なお、PCR の反応条件はそれぞれプライマーの条件に従った。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。

## 2. ベトナムの土壌からの類鼻疽菌の分離

### 1) 供試検体

供試検体として、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 検体を用いた。

### 2) 類鼻疽菌の分離・同定

#### (1) 培養法

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℃24時間培養後、その上清を Ashdown's Medium 寒天培地に接種し、37℃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。(2)PCR法

2)-(1)の増菌培地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。PCRは、Hoらの方法に従って行った。

## C. 研究結果

### 1. 病原遺伝子の検出結果

今回供試した S.Weltevreden21 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。

## 2. ベトナムの土壌からの類鼻疽菌の分離結果

今回、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

### 1. 東南アジアのヤモリ由来 *S.weltevreden* の病原遺伝子の検出

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 MIVA 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。

### 2. ベトナムの土壌からの類鼻疽菌の分離

今回、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。

なし

## E. 結論

1. 東南アジアのヤモリ由来 *S.weltevreden* 21 株における 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、最も高い遺伝子(4 種)では 100%、低い遺伝子(1 種)では 0%であった。供試した 21 菌株は、遺伝子保有の有無で 5 パターンに型別された。これまで *S.weltevreden* から検出されたことのない *sopE1* 遺伝子が、沖縄由来株からのみ検出された。
2. ベトナム・メコンデルタの土壌から、増菌培養法ならびに PCR 法で、200 検体中 26 検体(13.0%)から類鼻疽菌が検出された。

## F 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

なし

## 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



