

201517003B

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の
発生予防に関する研究

平成 25 年度～平成 27 年度 総合研究報告書

研究代表者 荻和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

平成 28 (2016) 年 3 月

厚生労働科学研究費

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の
発生予防に関する研究

平成 25 年度～平成 27 年度 総合研究報告書

研究代表者 荻和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

平成 28 (2016) 年 3 月

I. 総合研究報告

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究

苅和宏明..... 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 37

I. 総合研究報告

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の
発生予防に関する研究

研究代表者 荻和宏明
北海道大学大学院獣医学研究科

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)
総括研究報告書

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

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

研究要旨

ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)のウイルスエンベロープ膜蛋白 E をウサギ IgG 抗体の Fc 領域と融合させることで、可溶性が高く、簡便に精製可能な分泌型抗原として発現させた。発現させた蛋白を抗原として、ELISA 法による血清中の抗 TBEV 抗体検出系へと応用した所、中和試験の成績と比較して 90%以上の高い相関性を示した。モンゴルにおけるダニ媒介性脳炎(TBE)の流行状況を明らかにするために、モンゴル北部で捕集されたマダニからウイルス分離を試みた。26 プール 680 匹のシュルツェマダニから、9 株の TBEV が分離された。分離株のエンベロープ蛋白領域の遺伝子を解析した所、全ての株が同一クラスターを形成し、シベリア型に分類されることが明らかになった。したがって、モンゴル北部にはシベリア型 TBEV が流行していることが示された。モンゴル分離株 2 株について培養細胞における増殖性を比較した所、増殖性に差は認められなかった。しかし、マウスモデルにおける病原性を解析した所、モンゴル分離株 2 株はそれぞれ異なる病原性を示した。両株のウイルスゲノム全長を解析した所、13 箇所しかアミノ酸の相違が認められなかった。

ベトナムおよび長崎県で採集されたマダニを対象に、重症熱性白血球減少症候群 (SFTS)ウイルス (SFTSV)、HSK ウイルス (HSKV)、および Muko ウイルス (MUV) の3種類のマダニ媒介性ウイルスについて遺伝子検出を試みたが、ベトナムおよび長崎県で採集したいずれのマダニからもウイルス遺伝子は検出されなかった。

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、イムノクロマトグラフィー(ICG)による迅速診断法を開発した。ハンタウイルスの宿主であるヨーロッパヤチネズミ血清を用いて ICG の評価を行ったところ、蛍光抗体法 (IFA) と比較して95%以上の感度および敏感度が得られた。

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)の代替として BSL2 施設で取扱い可能な CCHFV シュードタイプを開発し、本シュードタイプを用いて CCHF 患者の急性期および回復期の血清を用いて中和抗体価の経時変化を調べたところ、回復期において中和抗体価の有意な上昇が認められた。

モンゴル獣医学研究所の協力を得て、モンゴルの野生動物で流行している狂犬病ウイルスの分子

疫学的な解析を行った。モンゴルではイヌ以外にキツネやオオカミでも狂犬病が維持されていることが明らかになった。

狂犬病ウイルスの末梢神経侵入性の異なる固定毒 2 株(西ヶ原株及び Ni-CE 株)とこれらのキメラウイルスをマウス運動神経細胞の分離培養系を用いて増殖性を解析したところ、いずれの株も、その末梢感染性の違いにかかわらず、軸索末端から神経細胞に感染する能力を有していることが判明した。すなわち、末梢神経への感染効率ではなく、むしろ筋肉細胞におけるウイルス増殖が狂犬病ウイルスの末梢感染性の違いに関与することが示唆された。さらに、末梢感染性の高い西ヶ原株の P 遺伝子が筋肉細胞中の IFN 関連遺伝子の発現を抑制する機能を有しているのに対し、末梢感染性の低い Ni-CE 株の P 遺伝子ではこの機能が減弱していることが確認された。以上より、狂犬病ウイルスの末梢感染性には、筋肉細胞における IFN 系の回避が重要であることが示唆された。レポーター遺伝子 (GFP あるいはルシフェラーゼ) を発現する L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作出した。これらの L 遺伝子欠損ウイルスは、L 蛋白質発現プラスミドを導入した細胞において、レポーター遺伝子を発現することが確認された。3 つの FLAG タグが付加された狂犬病ウイルスの L 蛋白質を発現するプラスミドを構築し、同蛋白質の検出および機能性の確認を行なった。抗 FLAG 抗体を用いた間接蛍光抗体法およびウェスタン・ブロット法により、本組換え L 蛋白質が検出され、ルシフェラーゼアッセイにより、本 L 蛋白質が RNA 合成機能を有することが示唆された。L 蛋白質欠損ウイルスと FLAG タグ付加 L 蛋白質発現系は、狂犬病ウイルスの L 蛋白質の機能解析上、極めて有用なツールとなることが示された。

3 種の無尾類より、新規ブルセラ属菌 5 株を分離した。今回、ウサギ免疫血清を用いて、本分離菌の抗原性を各種ブルセラ属菌との交差反応性をもとに解析した。特異的血清診断法に用いる検出用抗原として *Brucella canis* から特異的タンパク質群を同定した。その中で、ブルセラ属に近縁な *Ocrobactrum* 属菌とのホモロジーが少ないタンパク質を選択し、それらの組換えタンパクを作製した。

青森県、山形県および和歌山県で捕獲した野生のニホンザル 45 頭のうち、6 頭(13.3%)から壱塚熱の病原体である *Bartonella quintana* が分離された。わが国のニホンザルには固有の *B. quintana* が広く存在することが明らかとなった。和歌山県で捕獲したユビナガコウモリ 50 頭の血液から *Bartonella* の分離を試みた結果、12 頭(24.0%)から *Bartonella* が分離された。

東南アジアのヤモリ由来 *Salmonella* Weltevreden 81 株について、Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) 法による分子遺伝子解析を行ったところ、それぞれの地域から得られた菌株は、地域ごとの遺伝子型に分類されることが判明した。したがって、東南アジアには古くから本血清型が土着し、地域ごとに遺伝子の変異が蓄積していったことが示唆された。東南アジアのヤモリ由来 *Salmonella* Weltevreden 21 株について、10 種類の病原遺伝子の保有状況を PCR 法により調べたところ、病原遺伝子保有の有無により 5 パターンに型別された。

ベトナム・メコンデルタの土壌から類鼻疽の原因菌である類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*) の検出を増菌培養法ならびに PCR 法を用いて試みた。その結果、両法を併用することで 200 検体中 26 検体(13.0%)から類鼻疽菌が分離され、本地域に類鼻疽菌が広くかつ高率に分布することが明らかになった。

A. 研究目的

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

ダニ媒介性脳炎はマダニ類によって媒介される危険度の高い人獣共通感染症として知られ、ヒトに致命的な脳炎を引き起こす。ロシア、東欧各国を中心に年間 8,000 名以上の患者が報告されている。ハンタウイルス感染症は腎症候性出血熱とハンタウイルス肺症候群の 2 つの病型が知られ、いずれもげっ歯類によって媒介される。これまで中国、ロシア、ヨーロッパ、南北アメリカ大陸などで多く報告され、年間の患者発生数が 5 万人ほどとされているが、世界的に調査が不十分な地域が多く存在する。また、狂犬病は一旦発症すれば 100%の致死率を示す致死的な脳炎で、WHO の報告によれば、世界中で毎年 5 万 5 千人以上が狂犬病によって死亡している。しかしながら、狂犬病の発症機序は未だに不明な部分が多く、ウイルスの複製機構の詳細な解明や感染動物モデルを用いた発症機序の解析も重要である。その他にも、国内外において、クリミア・コンゴ出血熱、ブルセラ症、バルトネラ感染症、サルモネラ感染症、および類鼻疽などの患者が報告されている。上記の感染症はいずれも野生動物によって媒介される重篤な人獣共通感染症であり、国内外における汚染地やヒトにおける感染状況に関する情報が不足している。そこで、本研究では信頼性の高い診断法を開発して野生動物を対象とした疫学調査を実施することにより、上記感染症の分布域や病原巣動物といった基礎的な疫学情報を得る。

B. 研究方法

ダニ媒介性脳炎 (TBEV):

1) E-Fc 蛋白の作製

1995 年に犬の血液より分離された TBEV の Oshima 5-10 株の prM 蛋白及び E 蛋白の細胞外領域(1-449 アミノ酸)をコードする遺伝子領域を pCAGGS プラスミドにクローニングし、さらに発現蛋白の C 末端領域にウサギ IgG 抗体の Fc 領域が融合するように発現プラスミド (pCAGprME449-Fc) を構築した。pCAGprME449-Fc を 293T 細胞にトランスフェクトすることにより、E-Fc を発現させ、培養上清へと分泌させ回収した。

2) E-Fc を抗原とした ELISA (E-Fc ELISA) の構築

ELISA 用 96 穴プレートに抗ウサギ IgG 抗体をコーティングし、E-Fc を捕捉した。その後、被験血清を反応させ、被験動物種に対応したペルオキシダーゼ標識 2 次抗体を反応させた。酵素活性を OPD 試薬を用いて測定し、陰性対象との測定値との比を基準に抗体価の判定を行った。

3) モンゴルのマダニからの TBEV の分離

モンゴル北部の Selenge 県において、旗ずり法により 680 匹のシュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) を捕集した。捕集したマダニを 20~30 匹ずつ計 26 プールに分け、エタノールで洗浄後破碎し、破碎液の上清を BHK 細胞に接種した。接種後の細胞の盲目継代を 2 回行い、細胞変性効果 (CPE) を観察した。CPE を示した細胞について、細胞内における TBEV 抗原の検出及び、細胞から抽出した RNA から RT-PCR により TBEV 特異的遺伝子の増幅・検出を行うことにより、TBEV の同定を行った。

分離された TBEV 感染細胞から RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行った後に、TBEV 共通プライマーを用いて、E 蛋白領域の増幅を行った。増幅された PCR 産物からダイレクトシーケンスにより塩基配列を同定し、ランガットウイルスをアウトグループとした系統樹解析を行った。

4) モンゴル分離株の性状解析

(1) ウイルスの増殖曲線

単層培養された BHK 細胞にモンゴル由来のダニ媒介性脳炎ウイルス株である MGL-Selenge-13-12 株、MGL-Selenge-13-14 株とロシアのシベリア由来株である TBEV IR99 2f7 株を感染させ、感染 12、24、48、72 時間後に培養上清を回収し、ウイルス力価を測定した。

(2) マウスモデルにおける感染実験

5 週令の雌の C57BL/6L マウスに 1,000 pfu の TBEV を皮下接種した。発症率や生存曲線を求めるためには 28 日間の観察を行った。またウイルスの体内動態を解析するために、ウイルス感染後、3、6、9、11 日目にマウスを安楽殺し、血清及び臓器を採集した。臓器は 10% 乳剤となるように 10% ウシ胎児血清添加 PBS で調整し、乳剤中のウイルス力価を測定した。

(3) ウイルス遺伝子塩基配列決定

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

ダニ媒介性ウイルス:

長崎県各地(長崎市、諫早市、島原市、対馬市、五島市)およびベトナム(カッチエン、カットバ島)でマダニを採集し種を同定した。採集したマダニ 1-30 匹を 1 プールにして、乳化し、遠心後上清を回収した。回収液より Isogen-LS を用いて RNA を抽出し遺伝子検出に用いた。また、回収液を Vero E6 細胞に接種し 5-6 日間培養後、上清をさらに別の Vero E6 細胞に接種、培養しウイルス分離を試みた。ウイルス分離の確認は、上清から RNA を抽出し SFTSV 特異的およびフレボウイルス共通プライマー(Matsuno K, et al. JVI 2013. doi: 10.1128/JVI.02845-12)を用いて Real-time RT-PCR および RT-PCR により確認した。

ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に属する新規の HSK ウイルス(HSKV)の 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

リアルタイム RT-PCR による HSKV 遺伝子検出を試みた。

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。レオウイルス科オルビウイルス属に属する Muko ウイルス(MUV)の segment 1 VP1region 遺伝子配列を基にプライマーを作製した。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。

ベトナムのカッチエン国立公園と長崎県内で捕集されたマダニから RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により HSKV、MUV、および SFTSV の各ウイルス遺伝子の検出を試みた。

ハンタウイルス感染症:

1) 抗体検出用イムノクロマトグラフィーの開発

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

2) 抗ハンタウイルスモノクローナル抗体の免疫組織化学法への応用

ハンタウイルスのヌクレオカプシドタンパクに対する6種類のモノクローナル抗体 (Saasa et al., Virology 2012 428:48-57) と、1つの市販モノ

クローナル抗体A1C5、すでにホルマリン固定パラフィン包埋組織上の抗原検出が可能であることが判明しているハイブリドーマ細胞上清由来のモノクローナル抗体E5G6 (Okumura et al., Clin. Vaccine Immunol. 2007 14:173-181)およびウサギポリクローナル抗体NP700を免疫組織化学法に用いた。ハムスター正常肺組織、PUUV感染ハムスター肺組織、Hantaanウイルス(HTNV)感染マウス肺組織を染色する標本として用いた。

クリミア・コンゴ出血熱(CCHF):

1) シュードタイプウイルスの作製

CCHFV IbAr10200株由来の糖タンパク質(GP)遺伝子の相補的DNA(cDNA)を蛋白質発現用プラスミドに挿入し、293T細胞に形質導入することによりCCHFVのGPを発現させた。シュードタイプであるpVSV-CCHFV-GPはレポーターとしてルシフェラーゼを有し、水疱性口炎ウイルスVSVをベースとした増殖能欠損型を用いて作製した(Takada et al., PNAS, 1997)。

2) CCHF患者血清

患者血清として、中国新疆ウイグル自治区のCCHF患者の経時血清(発熱日をDay 0としDay 1, Day 5, Day 9に採取されたもの)を用いた。これらの血清は組換えN蛋白質を用いたELISAにより、CCHFVに対するIgGおよびIgMの上昇が既に確認された血清である(Tang et al., Clin Diagn Lab Immunol, 2003)。患者血清を最終希釈1:20でpVSV-CCHFV-GPと混合し、一定時間後VeroE6細胞に接種した。20時間後、基質を加えて発光度をルミノメーターで測定した。先行研究の成績から、患者血清を加えなかった場合の39%以下に発光度が低下した場合を中和抗体陽性と判定した。中和抗体が陽性であった場合は、血清を更に2倍階段希釈し中和抗体価を求めた。

狂犬病:

1) モンゴル由来狂犬病株の遺伝子解析

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。

2) マウス運動神経細胞の初代培養系の作製

マウス運動神経細胞の分離培養系は、以下のように作製した。まず、ICRマウスの子宮より摘出した13日目胚から脊髄を採取し、背根部を除去したものをトリプシン処理することで運動神経細胞を得た。これらの神経細胞を、ポリジメチルシロキサンを用いて作製したマイクロ流体プラットフォームの細胞体側の太流路内に播種し、CO₂インキュベーター内で細胞を培養した。培養5日目に細流路に入り込んだ軸索が、その末端を反対側の太流路内に伸長していることを確認した後に、以下の実験に使用した。

3) マウス運動神経細胞への狂犬病ウイルスの感染

CE(NiP)株及びNi-CE株の軸索末端からの感染能を比較する目的で、上記の方法で作製した分離培養系の軸索末端側のウェルにGFP遺伝子組換えCE(NiP)株あるいはNi-CE株[それぞれCE(NiP)-GFP株、Ni-CE-GFP株]を接種した。ウイルス接種24、36および48時間後に、蛍光顕微鏡下で神経細胞体におけるGFPシグナルを観察し、撮影した。撮影された画像に基づき、細胞体側の太流路におけるGFP陽性細胞の割合を算出した。

4) マウス筋肉由来細胞への狂犬病ウイルスの感染

西ヶ原株、CE(NiP)株及びNi-CE株に感染した筋肉細胞におけるIFN関連遺伝子の発現量を比較する目的で、マウス骨格筋由来G-8細胞及びC2C12細胞に各株をmoi=1にて接種した。接種24時間後に、感染細胞からRNAを抽出し、ランダムプライマーを用いた逆転写反応を行った。得られたcDNAを鋳型として、リアルタイムPCR法(TaqMan法)により各種IFN関連遺伝子(Ifn- β 、Mx1及びOas1)の定量を行った。なお、Gapdh遺伝子についても定量を行い、内在性コントロールとして使用した。

5) L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスと L 蛋白質の発現系の構築

狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株の遺伝子操作系(Yamada et al., Microbiol. Immunol., 2006)を用いて、L 遺伝子の代わりに GFP 遺伝子あるいはホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を保有する L 遺伝子欠損ウイルスを作出した。これらの株のストックウイルスの作製は、西ヶ原株 L 蛋白質の発現プラスミドが導入されたマウス神経芽細胞腫 NA 細胞を用いて行った。L 蛋白質発現細胞における Nishi- Δ L/GFP 株および Nishi- Δ L/Luc 株の増殖に伴い、それぞれ GFP およびルシフェラーゼが発現されることを確認するため、西ヶ原株 L 蛋白質の発現プラスミドを導入した NA 細胞に L 遺伝子欠損ウイルスを接種した。接種後 2、4 および 6 日目に、Nishi- Δ L/GFP 株に感染した同細胞を蛍光顕微鏡下で観察し、GFP 陽性細胞の出現の確認を行った。同様に、Nishi- Δ L/Luc 株に感染した L 蛋白質発現 NA 細胞を用いて、ルシフェラーゼ・アッセイを実施した。Nishi- Δ L/Luc 株の使用によって狂犬病ウイルスの初期転写が検出できる可能性を検証する目的で、L 蛋白質を発現しない NA 細胞に Nishi- Δ L/Luc 株を接種した。接種後 1、2、4、6、12、24 および 48 時間にルシフェラーゼ・アッセイを実施し、ルシフェラーゼ活性の検出を試みた。

6) L 蛋白質発現系の改良

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

イルス増殖に伴い発現されるルシフェラーゼの活性を測定することで、L 蛋白質機能を評価した。

ブルセラ感染症:

1) 無尾類からのブルセラ属菌の分離

無尾類の臓器検体をビードビーターで粉碎後、一部を菌分離に使用し、残りのサンプルから DNA を抽出した。ブルセラ特異的遺伝子検出は、ブルセラ症の原因となる家畜ブルセラ菌 3 種とイヌブルセラ菌 1 種、計 4 種を簡易的に識別可能な Combinatorial-PCR 法を実施した。菌分離は、粉碎後の検体をブルセラ選択サプリメント添加 20%ウマ血清入り ATCC488 ブロスで培養、適宜、BHI プレートにサブカルチャーし、発育してきたコロニーを釣菌し、分離株については、Combinatorial-PCR 法により確認した。さらに分離株については多座遺伝子解析(MLSA9)による同定を行った。

2) 無尾類由来ブルセラ属菌の抗原性の検討

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)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。

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

4) ブルセラ属菌特異的診断用抗原の作出

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 法で当該タンパク質群を同定した。その中で、ブルセラ属菌と近縁な *Ochrobactrum* 属菌とのホモロジーが少ないタンパク質を選定した。

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

バルトネラ感染症：

1) ニホンザルからの *Bartonella* 属菌の分離と遺伝子解析

2011年～2014年の間に、青森県、山形県、和歌山県で捕獲された野生ニホンザルそれぞれ25頭、5頭、15頭から血液を採取した。サルの血液 100 μ l を 5% 兎血液加チョコレート寒天培地に塗抹し、35 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で 1 カ月間培養した。培地上に発育した *Bartonella* を疑うコロニー数から血中菌数を測定した。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* 属菌と推定した。*Bartonella* 属菌を保有していた各個体から無作為に 5 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*) と 16S-23S rRNA 遺伝子間領域 (ITS) の塩

基配列に基づいて分離株の菌種を同定した。さらに、菌種同定された 3 株から代表の 1 株を選択し、9 つのハウスキーピング遺伝子領域 (*atpF*, *bqtR*, *ftsZ*, *gap*, *gltA*, *groE*, *nlpD*, *ribE*, *rpoB*) を用いた Multi-Locus Sequence Typing (MLST) 法によって得られた配列から遺伝子型 (Sequence Type: ST) を決定した。さらに、ニホンザル分離株 (4 株) と既報のアカゲザル (37 株)、カニクイザル (16 株) およびヒト分離株 (16 株) の塩基配列から、各 ST タイプの 9 遺伝子領域の連結塩基配列に基づく系統解析を行った。

2) ユビナガコウモリからの *Bartonella* 属菌の分離と遺伝子解析

2013年に、和歌山県で50頭のユビナガコウモリを捕獲した。コウモリの血液およそ100 μ lを5%兎血液加Heart Infusion寒天培地に塗抹し、35 $^{\circ}$ C、5%CO₂下で1カ月間培養した。分離株は、コロニー形態、発育日数ならびにグラム染色性(陰性)から *Bartonella* と推定し、さらに2つのハウスキーピング遺伝子領域 (*gltA* および *rpoB*) を標的としたPCRにより *Bartonella* と同定した。分離株は、*gltA* および *rpoB* 領域の塩基配列から各領域の遺伝子型を決定し、その組み合わせに基づいて遺伝子グループに分類した。各遺伝子グループから無作為に選抜し代表株について、BLAST 検索により両領域の塩基配列の相同性を検討した。さらに代表株の 5 遺伝子領域 (*gltA*, *rpoB*, *ftsZ*, *ribC*, 16S rRNA) の連結配列に基づき、台湾のユビナガコウモリ属由来 *Bartonella* 6 株と *Bartonella* 標準株とともに系統解析を行った。遺伝子解析で、新種と疑われた系統の株については、マイクロスキャン RAID パネルを用いて生化学性状を検討した。

サルモネラ感染症：

1) 東南アジアのヤモリ由来 *Salmonella* Weltevreden の PFGE による遺伝子型別

供試菌株として、ベトナム・メコンデルタ 1 市 2 省 (Can Tho 市、Ca Mau 省および Kien Giang 省) 由来 25 株、ベトナム・フエ由来 19 株、カンボジア・シエムリアップ由来 16 株、タイ由来株 16 株、

沖縄県由来 2 株のヤモリ由来株計 78 株と、ベトナム・メコンデルタ(Gan Tho 市)で分離されたヒトの胃腸炎患者由来株 3 株を加えた計 81 株の *S.Weltevreden* を用いた。

供試菌株を trypticase soy agar(TSA)平板寒天培地(BBL)に塗抹し、37°Cで 24 時間培養した。そして、培地上に発育したコロニーを Cell Suspension Buffer に接種、懸濁し、プラグ作製用アガロース中で固化させた。中試験管に Proteinase K solution(Wako) 20 μ l と RIPA Buffer(Wako)4ml を入れ、それぞれの中試験管に 1 つずつプラグを入れ、54°Cに設定した恒温槽に入れ、振盪しながら2時間反応させた。反応後、溶菌バッファーをすべて除去し、滅菌蒸留水と TE Buffer でプラグを洗浄し、2ml の TE Buffer が入った、2ml の滅菌マイクロチューブに移し、4°Cで保存した。溶菌処理後のアガロースプラグを 2mm 幅に切断し、プラグ断片を 1×M Buffer (SuRe/Cut Buffer H, Roche)を 200 μ l 添加した 1.5ml マイクロチューブに入れ、37°Cで 15 分静置した。プラグに XbaI (TaKaRa) 25U を加えて 37°C で 2 時間反応させた。酵素処理終了後、M Buffer を除去し、0.5×TBE(Bio-Rad)を各チューブに添加し、10 分間静置し、プラグを洗浄した。プラグ断片をパルスフィールドゲル電気泳動用のゲルにアプライし、14°C、6V/cm、開始スイッチングタイム 2.2 秒、最終スイッチングタイム 63.8 秒で 19 時間電気泳動を行った。泳動終了後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、UV 照射下で得られたバンドパターンの解析を行った。供試したヤモリ由来株 78 株とヒトの胃腸炎患者由来株 3 株の計 81 株の PFGE パターンから、PhoretixTM 1D (Nonlinear Dynamics)を用いて、非加重結合法(UPGMA 法)により系統樹の作製、解析を行い、その遺伝的関連性を検討した。

2) 染色体 DNA の MLVA 法による解析

過去に *Salmonella enterica* の MLVA で用いられた領域のうち、昨年度の研究で使用し差異が見られた 2 つの遺伝子領域 Sal16 および SE-4 と、STTR3 および STTR7 を TR 領域として選択した。供試菌株から DNA を抽出し、PCR により

遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列の決定を行った。得られた配列データは、遺伝子解析ソフトウェア FinchTV (geospiza) を用いて解析し、菌株ごとに TR 反復数をまとめた。

3) *S.Weltevreden* の病原性遺伝子の検索

ヤモリ由来 *S.Weltevreden* 21 株(ベトナム由来 14 株、カンボジア由来 1 株、タイ由来株 5 株および沖縄県由来 1 株)を用いた。病原性遺伝子として、gipA、sodC1、sopE1、sseC、gtgB、sspH1、spvC、pipA、ssrB および pefA の 10 種の遺伝子を対象にした。

供試菌株からの DNA 抽出は、ボイル法を用いて行った。まず、供試菌株を trypticase soy 寒天培地(TSA,BBL)に接種し、37°Cで 24 時間培養後、その 1 白金耳を、滅菌蒸留水 2ml へ懸濁し、10 分間煮沸溶菌した。その後、10,000rpm で 10 分間遠心分離し、その遠心上清を 1.5ml のマイクロチューブに移し、99.5%エタノールを加え、よく混合後、10,000rpm で 10 分間遠心分離し、遠心上清を捨てた後、風乾させた。精製した DNA は、TE バッファーで適切な濃度になるように溶解し、テンプレート DNA とした。200 μ l の PCR チューブ (Bio-Rad) に、TaKaRa Ex Taq(5units/ μ l) (TaKaRa)を 0.25 μ l、10×Ex Taq Buffer を 5 μ l、dNTP Mixture(2.5mM each)を 4 μ l、滅菌精製水を 33.75 μ l、50 μ M のフォワードおよびリバースプライマーを各 1 μ l ならびにテンプレート DNA を 5 μ l 入れ、良く混和し、総量を 50 μ l とした。スピンドウンした後、サーマルサイクラー(Bio-Rad)にセットし、PCR を行った。PCR 増幅産物は 1.5%アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、UV トランスイルミネーターで観察した。

類鼻疽:

2015 年 7~9 月にベトナム・メコンデルタで採取した水田の表土 200 検体を供試検体として用いた。供試検体 10gを、5 倍量の選択増菌培地 (1L 当たりトリプチケースソイブロス(Difco) 10g、グリセロール 40ml 0.1%クリスタルバイオレッド

5ml、コリシン 15000U)に入れ、37°C24 時間培養後、その上清を Ashdown's Medium 寒天培地に接種し、37°Cで 48 時間培養した。培養後、培地上に発育してきた類鼻疽菌が疑われるコロニーを釣菌し、純培養後、生化学的検査を行い、類鼻疽菌を同定した。増菌培地 2ml をマイクロチューブに移し、10,000rpm で 10 分間遠心分離後、上清を捨て、滅菌蒸留水 2ml へ加えて、10 分間煮沸溶菌した。その後、10,000rpm で 10 分間遠心分離し、その遠心上清を 1.5ml のマイクロチューブに移し、99.5%エタノールを加え、よく混合後、10,000rpm で 10 分間遠心分離し、遠心上清を捨てた後、風乾させた。精製した DNA は、TE バッファーで適切な濃度になるように溶解し、テンプレート DNA とした。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

ダニ媒介性脳炎

pCAGprME449-Fc をトランスフェクトした 293T 細胞では E-Fc 蛋白が発現し、培養上清へも十分な量が分泌していることが確認された。また細胞内では E 蛋白に対するシャペロン様活性を持つ prM 蛋白との相互作用も確認され、発現・分泌した E-Fc 蛋白は本来の E 蛋白と同様の性状を保持していることが示唆された。

E-Fc 蛋白を抗原として用いた E-Fc ELISA による抗 TBEV 抗体の検出法への応用を試み、TBEV の感染が疑われた野鼠及びヒトの血清を使用して中和試験との成績比較を行った。その結果、TBEV 流行巣で捕獲された 66 検体の野鼠

血清を調べたところ、E-Fc ELISA は中和試験の成績と比較して敏感度 90.6%、特異度 91.2%を示した。また、96 検体の TBE が疑われた患者血清を調べたところ、中和試験で TBE と診断された 85 検体の内、83 検体 (97.6%) が E-Fc ELISA により陽性と判定された。さらに JE 患者血清 10 検体を用いて交差反応性を調べた所、全て TBE 陰性と判定され、交差反応性は示さなかった。

これらの成績より、今回開発した E-Fc ELISA は TBEV 特異抗体を検出する血清診断において非常に有効であることが示された。

モンゴルで採集された 680 匹のシュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) のうち、26 プール中 9 プールの *I. persulcatus* 乳剤において、BHK 細胞への接種後 CPE が観察された。CPE が確認された細胞について、間接蛍光抗体法及び RT-PCR により TBEV 特異的抗原及び特異的な遺伝子が検出され、9 株の TBEV (MGL-Selenge-13 株) の分離が確認された。分離された MGL-Selenge-13 株について、E 蛋白領域の全長の遺伝子配列を決定し、他の TBEV との遺伝子系統樹解析を行ったところ、分離株はシベリア型に分類されることが示された。

モンゴル分離株であるシベリア型 TBEV、MGL-Selenge-13-12 株及び MGL-Selenge-13-14 株、そしてロシア・イルクーツクで分離された同じくシベリア型 TBEV である IR99 2f7 株をそれぞれ BHK 細胞に感染させ、その増殖性を比較した。3 つの株は、同様の増殖性を示した。マウスモデルを用いて 3 つのシベリア型 TBEV の病原性を比較解析した。IR99 2F7 株もしくは MGL-Selenge-13-12 株に感染した全てのマウスは体重減少や沈鬱等の臨床症状を示し、四肢の麻痺や平衡感覚障害等の重篤な神経症状を示す個体も多く見受けられた。MGL-Selenge-13-14 株に感染したマウスは、他の 2 株に感染したものと比較して、有病率や死亡率は明らかに低く、発症までの期間や生存日数も長かった。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。脳内でのウイルス増殖は感染9日目以降に認められたものの、MGL-Selenge-13-14株感染マウスでは、MGL-Selenge-13-12株感染マウスと比較して、有意に低いウイルス力価を示した。以上の結果より、MGL-Selenge-13-12株は、MGL-Selenge-13-14株と比較して高い病原性をマウスに示すことが明らかになった。MGL-Selenge-13-12株と、MGL-Selenge-13-14株の遺伝子RNA配列の全長を決定し比較した所、塩基配列で99.1%(11005塩基/11106塩基)の相同性があり、アミノ酸配列ではE蛋白領域に3箇所、NS3蛋白領域に3箇所、NS5蛋白領域に7箇所のみに相違が認められた。

ダニ媒介性ウイルス

ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に属する新規の HSK ウイルス(HSKV)の遺伝子検出法を確立した。長崎県内で新規に採集されたマダニのうち、アカコッコマダニの破碎乳剤接種によりA129マウスが致死性を示した。致死マウスの脾臓から抽出したRNAを用いて次世代シーケンズにより網羅的に遺伝子探索を行った結果、Muko virus(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)が分離されたことが判明した。MUVの分離例を除き、ベトナムおよび長崎県内で採集されたマダニからSFTSV、HSKV、およびMUVの遺伝子は検出されなかった。

ハンタウイルス感染症

金コロイド標識したProtein Aを検出試薬とし、PUUVと抗原的にほぼ同一なHOKVの抗原を用いてICGを作成した。はじめにエゾヤチネズミ血清10例(IFAで陽性4例および陰性6例)を用いて評価を行ったところ、ICGの陽性および陰性はすべてIFAの結果と一致した。

次にヨーロッパヤチネズミ血清298例を用いてさらに評価を進めた。その結果、ヨーロッパヤチ

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

ホルマリン固定パラフィン包埋で作製されたHTNVとPUUV感染動物組織標本を用いて検索した結果、6種類の新規モノクローナル抗体のうち3つの抗体で組織上の両種のウイルス抗原の検出ができることが判明した。

クリミア・コンゴ出血熱

水疱性口炎ウイルス(VSV)をもとにしたクリミア・コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)のシュードタイプウイルス(pVSV-CCHFV-GP)を作出した。本VSVシュードタイプは、中国新疆ウイグル自治区のCCHF患者の経時血清によって中和されることが明らかになった。

狂犬病

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

軸索末端からの神経細胞へのウイルス感染能を検討する目的で、Ni-CE-GFP株またはCE(NiP)-GFP株を神経細胞の軸索末端に接種し、GFPシグナルを観察した。その結果、いずれ

の株を接種した神経細胞においても、その細胞体で明瞭な GFP シグナルが観察された。Ni-CE 株は CE(NiP)株と同様、軸索末端から神経細胞に感染する能力を有していることが示され、その能力に顕著な差がないことが示唆された。

西ヶ原株及び CE(NiP)株感染 G-8 細胞における Ifn- β 遺伝子の発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低く($p < 0.05$)、それぞれ約 1/47 及び 1/10 であった。また、各株感染 C2C12 細胞における Ifn- β 遺伝子の発現量についても同様に、西ヶ原株及び CE(NiP)株感染細胞における発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低かった ($p < 0.05$)。以上より、西ヶ原株及び CE(NiP)株は、感染筋肉細胞において、Ni-CE 株よりも効率良く IFN 産生を抑制することが示された。

西ヶ原株及び CE(NiP)株を感染させた G-8 細胞における Mx1 遺伝子の発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低く($p < 0.05$)、それぞれ約 1/74 及び 1/14 であった。また、各株感染 G-8 細胞における Oas1 遺伝子発現量についても同様に、西ヶ原株及び CE(NiP)株感染細胞における発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低かった ($p < 0.05$)。以上より、西ヶ原株及び CE(NiP)株は、感染筋肉細胞において、Ni-CE 株よりも効率良く IFN 誘導遺伝子の発現を抑制することが示された。

狂犬病ウイルス西ヶ原株の遺伝子操作により、レポーター遺伝子を発現することが可能な L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスである Nishi- Δ L/GFP 株および Nishi- Δ L/Luc 株の作出に成功した。Nishi- Δ L/GFP 株と Nishi- Δ L/Luc 株をそれぞれ一過性に L 蛋白質を発現する NA 細胞に感染させた結果、GFP とルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。すなわち、L 蛋白質発現 NA 細胞に Nishi- Δ L/GFP 株および Nishi- Δ L/Luc 株を接種した場合、そのゲノムに挿入したレポーター遺伝子が発現されることが確認された。

狂犬病ウイルスの L 蛋白質を発現するプラスミド(pCNiL-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

したところ、本タンパク質の発現が確認された。同蛋白質を発現する NA 細胞に Nishi- Δ 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。したがって、L 蛋白質 C 末端への FLAG タグの付加は、その機能に顕著な影響を与えないことが明らかとなった。

ブルセラ感染症

日本国内に輸入もしくは飼育されている無尾類から 5 株のブルセラ属菌が分離された。無尾類分離株は対照としておいたブルセラ属菌よりも特に糖の分解能において、*Ochrobactrum* 属の菌と類似のパターンを示した。また、これらの分離株のうち 2 株は Hela 細胞に感染し、細胞内で増殖を示すことが明らかとなった。

Ochrobactrum 属とのホモロジーの低い、診断用抗原候補として、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)を選定し、組換え蛋白質を大腸菌で発現させた。10 kDa chaperonin が特に良好な反応性を示した。

バルトネラ感染症

我が国のニホンザルの 13.3%(6/45)から *B. quintana* が分離された。各県のサルの陽性率は、青森県が 4.0%(1/25 頭)、山形県が 20.0%(1/5 頭)、和歌山県が 26.7%(4/15 頭)であった。*Bartonella* が血中から検出されたニホンザルは無症状であった。

日本のユビナガコウモリの 24.0%(12/50)から *Bartonella* が分離された。

サルモネラ感染症

ベトナム・メコンデルタのヤモリ由来の S.Weltevreden 78 株とベトナム・メコンデルタ(Can Tho 市)で分離されたヒトの胃腸炎患者由来株 3 株を加えた合計 81 株の S.Weltevreden について、制限酵素 *Xba*I を用いた PFGE 法により、F1

～F22 の 22 の PFGE パターンに型別された。各 PFGE パターンと分離された地域との関係を見ると、F1 および F14 以外の 20 パターンの菌株は、それぞれ単一の地域で分離されたものであった。

類鼻疽

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

D. 考察

ダニ媒介性脳炎

TBEV の E 蛋白の細胞膜貫通領域を IgG 抗体の Fc 領域に置き換えて、シャペロン様活性を持つ prM 蛋白と共に発現させることで、本来の性状を保ったまま E 蛋白を培養上清に分泌させ、簡便に精製できるようになった。モンゴル北部の Selenge 県に生息している *I. persulcatus* から 9 株のシベリア型 TBEV が分離された。これら 9 株のうち 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。MGL-Selenge-13-12 株と、MGL-Selenge-13-14 株の間ではアミノ酸にして 13 箇所しか違いが認められず、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。

ダニ媒介性ウイルス

ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に属する新規の HSK virus やレオウイルス科オルビウイルス属の Muko virus がマダニから分離され、これらのウイルスの遺伝子検出法を確立した。

ハンタウイルス感染症

ハンタウイルスの核タンパク質を抗原として使用した抗体検出用イムノクロマトグラフィー(ICG)ユニットを作成した。従来法との比較により、本 ICG は非常に高い感度と特異性でハンタウイルスの宿主となるげっ歯類の抗体を検出できることが明らかになった。

ホルマリン固定パラフィン包埋で作製されたハンタウイルスとプーマラウイルス感染動物組織標本を用いて検索した結果、3 種類の新規モノクローナル抗体が組織上の両種のウイルス抗原の検出ができることが判明した。

クリミア・コンゴ出血熱

水疱性口炎ウイルスをもとにしたクリミア・コンゴ出血熱ウイルスのシュードタイプウイルス(pVSV-CCHFV-GP)を作出した。本シュードタイプウイルスを用いることにより、クリミア・コンゴウイルスに対する中和抗体を検出することが可能になった。

狂犬病

モンゴルで分離された狂犬病ウイルスの遺伝子解析を行ったところ、モンゴルにおいて狂犬病は、イヌとキツネ以外にオオカミでも集団内でウイルスが維持されていることが示唆された。

狂犬病ウイルス(西ヶ原株)の P 蛋白質は、その IFN 拮抗作用を介して、筋肉細胞でのウイルス増殖を支持し、結果として末梢神経の感染効率を高めていることが強く示唆された。

狂犬病ウイルスの L 蛋白質発現プラスミドを導入した細胞に L 蛋白質を欠損させて GFP もしくはルシフェラーゼをリポータとして組み込んだ(Nishi- Δ L/GFP 株および Nishi- Δ L/Luc 株)を感染させることで経時的なレポーター遺伝子の発現上昇が確認された。このことにより狂犬病ウイルスの L 蛋白質の機能解析に有用なツールが開発された。さらに、3xFLAG 融合 L 蛋白質を発現するプラスミド pCNiL-3xFLAG を NA 細胞に導入することで、RNA ポリメラーゼ活性を有する L 蛋白質が発現することが明らかになった。

3xFLAG 融合 L 蛋白質を用いることで、従来よりも詳細な L 蛋白質の機能解析が可能になる。このような解析から得られる知見は、狂犬病の治療法確立のための有益な基盤情報となると考えられる。

ブルセラ感染症

本研究において、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判明した。これまでに、これらの無尾類由来株はヒト培養細胞に感染し、細胞内で増殖することが明らかになったが、今後さらにその病原性について、より詳細に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。ブルセラ属菌特異的診断法の開発のため、ブルセラ特異的抗原(抗血清と特異的反応性を示すタンパク質)を同定し、これの組換えタンパク質の作製を行った。その結果、10 kDa chaperonin が良好な反応性を示した。

バルトネラ感染症

和歌山県で捕獲された野生のニホンザルは 26.7%(4/15)と高率に *Bartonella* 属菌を保有していることが初めて明らかとなった。*B. quintana* を保有していたニホンザルは高い菌血症状態であったにもかかわらず、無症状であったことから、本菌の自然病原巣である可能性が示唆された。

遺伝子解析の結果、ニホンザル分離株はヒトに塹壕熱を引き起こす *B. quintana* に非常に近縁な(相動性 \geq 97.0%)ことが明らかになった。系統樹解析の結果、ヒトおよびサル種ごとに固有の遺伝子性状を有する *B. quintana* を保有している可能性が示唆された。わが国(和歌山県)のユビナゴコウモリが *Bartonella* 属菌を保有していることが初めて明らかになった。今後、我が国のニホンザルやコウモリなどの野生動物由来の *Bartonella* 属菌について、人への感染性や病原性について調査する必要がある。

サルモネラ感染症

ベトナム、カンボジア、タイおよび沖縄県においてヤモリから分離された *S. Weltevreden* 78 株と、ベトナム・メコンデルタにおいてヒト胃腸炎患者から分離された *S. Weltevreden* 3 株の計 81 株について PFGE 法を実施した結果、22 の PFGE パターンに型別された。この地域由来の *S. Weltevreden* が多様な PFGE パターンを示すこと、また、系統樹解析により、同じ地域で分離された *S. Weltevreden* はほぼ同じクラスターに入ることなどから、本地域には古くから本血清型が土着しており、やがて地域ごとに遺伝的に多様なものへ分化していったことを示していると考えられる。本血清型について 10 種の病原遺伝子の検出系を確立した。

類鼻疽

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。

E. 結論

安全で簡便かつ信頼性の高いダニ媒介性脳炎、ハンタウイルス感染症、およびクリミア・コンゴ出血熱の診断法を開発することに成功した。また、各種マダニ媒介ウイルスの遺伝子検出法を確立した。

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。モンゴルにおいて狂犬病は、イヌとキツネ以外にオオカミでも集団内でウイルスが維持されていることが示唆された。狂犬病ウイルス(西ヶ原株)の P 蛋白質は、その IFN 拮抗作用を介して、筋肉細胞でのウイルス増殖を支持し、結果として末梢神経の感染効率を高めていることが強く示唆された。狂犬病ウイルスの RNA ポリメラーゼである L 蛋白質の機能を解析する手段が確立された。今後、L 蛋白質の機能解析を通じて、狂犬病ウイルスに対する治療薬が開発されることが期待される。

ベルツノガエルからの新規のブルセラ属菌 3 株が分離された。今回の分離株はいずれも、ヒトに感染しうる *B. inopinata* にブルセラ属菌中で最近縁であることと、HeLa 細胞中への侵入性を示したことから、ヒトに感染しうる可能性が示唆された。抗ブルセラ抗体と特異的に反応するタンパク群を同定し、その中で、他の菌と交差反応性のない、ブルセラ特異的組換えタンパク質を作製した。

野生のニホンザルは蜃壕熱の病原体である *B. quintana* を 26.7%と高率に保有していることが初めて明らかとなった。*B. quintana* を保有していたニホンザルは高い菌血症状態であったにもかかわらず、無症状であったことから、本菌の自然病原巣である可能性が示唆された。和歌山県のユビナガコウモリが *Bartonella* 属菌を保有していることも明らかとなった。

東南アジアのヤモリ由来のサルモネラ属菌である *S.weltevreden* には様々な病原遺伝子が保有されていることが明らかになった。ベトナム・メコンデルタの土壌は類鼻疽菌に広く汚染していることが明らかになった。

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chidumayo, N.N., Yoshii, K., Saasa, N., Sakai, M., Kariwa, H.: Development of a tick-borne encephalitis serodiagnostic ELISA using recombinant Fc-antigen fusion proteins. *Diagn Microbiol Infect Dis*, In press
- 2) Sakai, M., Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Hirano, M., Kariwa, H.: The variable region of the 3' untranslated region is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. *J Gen Virol*. Epub ahead of print, 2014
- 3) Hirano, M., Yoshii, K., Sakai, M., Hasebe, R., Ichii, O., Kariwa, H.: Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. *J Gen Virol*, Epub ahead of print, 2014
- 4) Chidumayo, N.N., Yoshii, K., Kariwa, H.: Evaluation of the European tick-borne encephalitis vaccine against Omsk hemorrhagic fever virus. *Microbiol Immunol*, Epub ahead of print, 2013
- 5) Kariwa, H., Murata, R., Totani, M., Yoshii, K., Takashima, I.: Increased Pathogenicity of West Nile Virus (WNV) by Glycosylation of Envelope Protein and Seroprevalence of WNV in Wild Birds in Far Eastern Russia. *Int J Environ Res Public Health*, 10: 7144-7164, 2013
- 6) Yoshii, K., Yanagihara, N., Ishizuka, M., Sakai, M., Kariwa, H.: N-linked glycan in tick-borne encephalitis virus envelope protein affects viral secretion in mammalian cells, but not in tick cells. *J Gen Virol*, 94: 2249-2258, 2013
- 7) Kentaro, Y., Yamazaki, S., Mottate, K.,

- Nagata, N., Seto, T., Sanada, T., Sakai, M., Kariwa, H., Takashima, I.: Genetic and biological characterization of tick-borne encephalitis virus isolated from wild rodents in southern Hokkaido, Japan in 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 13: 406-414, 2013
- 8) Yoshii, K., Moritoh, K., Nagata, N., Yokozawa, K., Sakai, M., Sasaki, N., Kariwa, H., Agui, T., Takashima, I.: Susceptibility to flavivirus-specific antiviral response of Oas1b affects the neurovirulence of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. *Arch Virol*, 158: 1039-1046, 2013
- 9) 苅和宏明, 尾崎由佳, 真田崇宏, 池中良徳, 石塚真由美, 坪田敏夫, 好井健太郎, 吉松組子, 有川二郎, 高島郁夫: 日本のげっ歯類におけるハンタウイルス感染の血清疫学調査とエゾヤチネズミが保有するHokkaido ウイルスの分離. *獣医畜産新報*, 66: 262-264, 2013
- 10) Takamatsu Y., Okamoto K., Dinh DT., Yu F., Hayasaka D., Uchida L., Nabeshima T., Buerano C.C., Morita K.: NS1' protein expression facilitates production of Japanese encephalitis virus in avian cells and embryonated chicken eggs. *J. Gen. Virol.* 95(2):373-383. 2014.
- 11) Luat L.X., Ngwe Tun M.M., Buerano C.C., Aoki K., Morita K., Hayasaka D.: Pathologic potential of variant clones of the Oshima strain of Far Eastern subtype tick-borne encephalitis virus. *Trop. Med. Health*. In press.
- 12) Hayasaka D., Shirai K., Aoki K., Nagata N., Simantini D.S., Kitaura K., Takamatsu Y., Gould E., Suzuki R., Morita K.: TNF- α Acts as an Immunoregulator in the Mouse Brain by Reducing the Incidence of Severe Disease Following Japanese Encephalitis Virus Infection. *PLOS ONE*. 8(8):1-18, 2013.
- 13) Amada T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Shimizu K, Koma T, Hayashimoto N, Gamage CD, Nishio S, Takakura A, Arikawa J. 2013. Rapid, whole blood diagnostic test for detecting anti-hantavirus antibody in rats. *J Virol Methods* 193:42-49.
- 14) Saito, M., Oshitani, H., Orbina, J.R.C., Tohma, T., de Guzman A.S., Kamigaki, T., Demetria, C.S., Manalo, D.L., Noguchi, A., Inoue, S., Quiambao, B.P. (2013) Genetic Diversity and Geographic Distribution of Genetically Distinct Rabies Viruses in the Philippines. *PLoS Ne.Trop.Dis.*, 7 e2144
- 15) Nguyen, A.T.K., Nguyen, T.T., Noguchi, A., Nguyen, D.V., Ngo, G.C., Thong, V.D., Olowokure, B., Inoue, S. (2014) Bat Lyssaviruses, Northern Vietnam. *EID*, 20:161-163.
- 16) 佐藤 克、井上 智。狂犬病。特集:ペットからの感染症 13。小児科 (Pediatrics of Japan)。54:89-95、2013
- 17) Yamaoka S, Ito N, Ohka S, Kaneda S, Nakamura H, Agari T, Masatani T, Nakagawa K, Okada K, Okadera K, Mitake H, Fujii T, Sugiyama M. Involvement of the rabies virus phosphoprotein gene in neuroinvasiveness. *J. Virol.* 2013. 87:12327-12338.
- 18) 今岡浩一。犬ブルセラ症ー特集・診断シリーズ・感染症. in: SA Medicine, インターズー, pp.53-56, 2013
- 19) Sato, S., Kabeya, H, Shigematsu Y., Sentsui, H., Une, Y., Minami, M., Murata, K., Ogura, G., and Maruyama, S. 2013. Small Indian mongooses and masked palm civets serve as new reservoirs of *Bartonella henselae* and potential sources of infection for humans. *Clin. Microb. Infect.* 19:1181-1187.
- 20) Tateno, M., Nishio, T., Sakuma, M., Nakanishi, N., Izawa, M., Asari, Y., Okamura, M., Maruyama, S., Miyama, T. S., Setoguchi, A. and Endo, Y. 2013. Molecular epidemiological survey of *Bartonella*,

- Ehrlichia and Anaplasma infections in Japanese Iriomote and Tsushima leopard cats. *J. Wildl. Dis.* 49(3): 646–652.
- 21) Bai, Y., Malania, L., Alvarez Castillo, D., Moran, D., Boonmar, S., Chanlun, A., Suksawat, F., Maruyama, S., Knobel, D., and Kosoy, M. 2013. Global distribution of Bartonella infections in domestic bovine and characterization of Bartonella bovis strains using multi-locus sequence typing. *Plos One.* 8(11): e80894.
- 22) Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Igarashi, M., Kariwa, H., Holbrook, M.R., Takashima, I.: A Critical Determinant of Neurological Disease Associated with Highly Pathogenic Tick-borne Flavivirus in Mice. *Journal of virology*, 88: 5406–5420, 2014
- 23) Chidumayo, N.N., Yoshii, K., Saasa, N., Sakai, M., Kariwa, H.: Development of a tick-borne encephalitis serodiagnostic ELISA using recombinant Fc-antigen fusion proteins. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 78 :373–378, 2014
- 24) Sakai, M., Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Hirano, M., Kariwa, H.: The variable region of the 3' untranslated region is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. *J Gen Virol.* 95: 823–835, 2014
- 25) Hirano, M., Yoshii, K., Sakai, M., Hasebe, R., Ichii, O., Kariwa, H.: Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. *J Gen Virol*, 95:849–861, 2014
- 26) Chidumayo, N.N., Yoshii, K., Kariwa, H.: Evaluation of the European tick-borne encephalitis vaccine against Omsk hemorrhagic fever virus. *Microbiol Immunol*, 58: 112–118, 2014
- 27) Tun M.M., Aoki K., Senba M., Buerano C.C., Shirai K., Suzuki R., Morita K., Hayasaka D.: Protective role of TNF- α IL-10 and IL-2 in mice infected with the Oshima strain of Tick-borne encephalitis virus. *Sci. Rep.* 4:5344, 2014.
- 28) 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 three neurotropic flaviviruses in a mouse model of viremia depends on the route of neuroinvasion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* In press.
- 29) Amada, T.; Yoshimatsu, K.; Koma, T.; Shimizu, K.; Gamage, C.D.; Shiokawa, K.; Nishio, S.; Ahlm, C.; Arikawa, J. Development of an immunochromatography strip test based on truncated nucleocapsid antigens of three representative hantaviruses. *Virology* 2014, 11, 87.
- 30) Koma T, Yoshimatsu K, Nagata N, Sato Y, Shimizu K, Yasuda SP, Amada T, Nishio S, Hasegawa H, Arikawa J. Neutrophil depletion suppresses pulmonary vascular hyperpermeability and occurrence of pulmonary edema caused by hantavirus infection in C.B-17 SCID mice. *J Virol.* 2014. 88:7178–7188.
- 31) 井上 智. 狂犬病の予防と対策. シリーズ: 動物由来感染症(第1回). 公衆衛生情報 4, 日本公衆衛生協会. 44:32–33, 2014
- 32) 井上 智. 狂犬病とバイオセーフティ(解説). 日本バイオセーフティ学会(The Japanese Biosafety Association). *JBSA Newsletter.* 4:19–21, 2014
- 33) 井上 智. 狂犬病の発生状況と野生動物調査の意義. 特集: 狂犬病をめぐる最近の情勢(野生動物にどう対処するか). *獣医畜産新報(JVM).* 67:809–818, 2014
- 34) 水谷浩志, 久保田菜美, 宗村佳子, 松村藍, 山本智美, 木村昌伸, 今岡浩一. 東京都における犬の抗 Brucella canis 抗体保有状況. *日本獣医師会雑誌*, 67(3):204–207,