

厚生労働科学研究費

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

**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 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 苅和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

平成 27 (2015) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告	1
近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究 荻和宏明.....	3
II. 分担研究報告	23
ダニ媒介性脳炎の疫学と診断法開発 好井健太郎	25
マダニ類からのウイルス由来遺伝子の検出 早坂大輔.....	33
ハンタウイルス感染症に関する研究 有川二郎	37
近隣地域からの侵入が危惧される感染症の病理学的検索 ー抗ハンタウイルス抗体の免疫組織化学法における有用性の検討ー 永田典代	41
クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの3分節遺伝子の全塩基配列に基づく分子疫学 西條政幸	44
狂犬病の疫学に関する研究 井上智	49
L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスの作出とその性状の解析 伊藤直人	58
ブルセラ症の診断法の開発(無尾類からの新規ブルセラ属菌の分離と解析) 今岡浩一	63
バルトネラ感染症の疫学 丸山総一	71
東南アジアのヤモリ由来 Salmonella Weltebreden の遺伝的関連性ならびに ベトナムの土壌における類鼻疽菌の分布 林谷秀樹	76
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	84

I. 総括研究報告

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の 発生予防に関する研究

研究代表者 苅和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

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

研究要旨

モンゴル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。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状況の把握を目的として、国内のマダニから新規に分離されたブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される HSK ウイルス(仮名)について、Real-time RT-PCR によるウイルス遺伝子検出系を確立した。本検出系は M セグメントの 211bp をターゲットとし、 10^2 copy 以上の感度で検出可能であった。ハンタウイルス感染症について感染げっ歯類を迅速に診断することを目的とし、Protein A を用いたイムノクロマトグラフィー(ICG)の有用性を検討した。ハンタウイルスのヌクレオカプシドタンパクに対するモノクローナル抗体 の SFTS ウイルスと SARS コロナウイルスとの交差反応性について、パラフィン包埋組織切片を用いた免疫組織化学法において検討した。その結果、いずれの抗体も二つのウイルスに対して交差反応性はなく、パラフィン包埋組織上のハンタウイルス抗原の特異的な検出が可能なが判明した。クリミア・コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)は 3 分節の一本鎖 RNA(S-, M-, L-遺伝子)を有し、それぞれ核蛋白質、膜蛋白質、および RNA ポリメラーゼをコードする。CCHFV 株の全塩基配列に基づく分子疫学(系統樹解析)を行ったところ、S-遺伝子に基づく解析では中国株はほぼ 1 つのクラスターを形成するのに対し、M-遺伝子と L-遺伝子による解析では中国株の地域特異性は認められなかった。わが国の近隣地域における野生動物の狂犬病(リッサウイルス感染症を含む)の疫学に関する情報収集を行うために、国後島の野生動物生息状況と、海域を越えて国後島から北海道に狂犬病等の動物由

来感染症が侵入する可能性について調査を行った。狂犬病ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである L 蛋白質は、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、その分子機能に関する情報は極めて少ない。そこで、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、レポーター遺伝子が発現することが確認された。したがって、L 蛋白質欠損ウイルスは、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。無尾類におけるブルセラ属菌の保有状況を明らかにするために、各種の無尾類よりブルセラ属菌の分離を試みたところ、ベルツノガエル 3 個体から新規のブルセラ属菌 3 株が分離された。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%)から塹壕熱の病原体である *Bartonella quintana* が分離された。 *gltA* と *rpoB* 遺伝子、および 16S-23S rRNA 遺伝子間領域(ITS)の解析によって、ヒトおよびサルの種類ごとに独自の遺伝子性状を有する *B. quintana* が分布すること、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。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。近年、海外感染症として我が国に持ち込まれる事例が報告されている類鼻疽(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 mallei*)の分離を試みた。その結果、40 検体中 3 検体(7.5%)から類鼻疽菌が分離され、本地域に類鼻疽菌が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とともに、動物モデルの開発とそれを用いた病態発現機序の解明を目指している。

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 万人以上が狂犬病によって死亡している。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。さらに、感染動物モデルを用いて、発症機序や重症化の機序を解析する。

B. 研究方法

ダニ媒介性脳炎

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砕し、破砕液の上清を 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。

ダニ由来ウイルス

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 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、HSKV M セグメント 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。ベトナムのマダニからの 2013 - 2014 年にベトナム(カッタバ島)で採集したクリイロコイタマダニ 33 匹、オウシマダニ 19 匹から抽出した RNA を用いて、リアルタイム RT-PCR による HSKV 遺伝子検出を試みた。

ハンタウイルス感染症

ヤチネズミ類に由来するハンタウイルス感染をスクリーニングするために、Puumala 型ウイルス (PUUV)の核タンパク(N)の N 末端部位 103 アミノ酸を大腸菌で発現させた。この組換え N をイムノクロマトグラフィー(ICG)のストリップに抗原として塗布し、Protein A を用いて抗ハンタウイルス抗体の検出を行った。

ハンタウイルスのNに対する抗体で、3種類のモノクローナル抗体(マウス腹水由来の精製 IgG1あるいは IgG2a)(Saasa et al., Virology 2012 428:48-57, 昨年度報告書) について、ホルマリン固定パラフィン包埋組織上の特異的な抗原検出の可能性について評価した。

クリミア・コンゴ出血熱

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)の S、M、および L 遺伝子についてその塩基配列を NCBI より入手した。S-遺伝子については 89 株、M-遺伝子については 39 株、そして L-遺伝子については 28 株の情報を得た。入手した遺伝子塩基配列をもとに、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) が提供する ClustalW を用いて系統樹解析を実施した。

狂犬病

平成 26 年 7 月 24 日-28 日に、「平成 26 年度北方領土訪問：国後島リス類・中小哺乳類調査専門家交流(日露隣接地域生態系保全協力プログラム)」の調査に同行し、日本およびロシアの野生動物専門家の協力を得て国後島における現地調査と住民の意識調査等を行った。

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。

ブルセラ症

愛玩用無尾類の繁殖施設で、2014 年に変態後間もない幼蛙の大量死が発生した。そのベルツノガエル(*Ceratophrys ornate*)10 個体の臓器(肝臓、腎臓、大腿骨・骨髄)、計 20 検体を用いてブルセラ属菌の分離を行った。菌分離は、粉碎後の検体をブルセラ選択サプリメント(関東化学 SR83)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。

生化学的性状の検査には、API20E(ピオメリュー)、NF-18(ニッスイ)、BACTOLABO オキシダーゼテスト(和光純薬)を用いた。分離株を BHI 寒天培地で 24 時間培養後、それぞれに添付のプロトコールに従い実施した。薬剤感受性試験はセンシ・ディスク(BD)を使用した KB 法で行った。Brucella 属菌は、本法の標準培地である、ミューラーヒントンおよびヘモフィルステスト寒天培地では、極めて生育が悪く判定が困難なため BHI 寒天培地を使用した。

供試菌をヒツジ血液寒天培地に播種し、2 回継代 24 時間後に使用した。細胞(HeLa 細胞)は、6well カルチャープレートに 2.5×10^5 /well となるように加えた。24 時間培養後、菌を各 well に加え、遠心吸着させた後、37、5%CO₂ で、1 時間感染させた。洗浄後、細胞外の菌を殺菌するため、50ug/ml ゲンタマイシン添加培地で 1 時間処理した。その後、10ug/ml ゲンタマイシン添加培地に交換したのち、培養を継続し、経時的(1, 4, 8, 12, 16, 20, 24hpi)に細胞を回収し、セアーマーチン寒天培地で CFU を計測した。

バルトネラ感染症

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

血液 100 μ l を 5% 兔血液加チョコレート寒天培地に塗抹し、35°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。

サルモネラ感染症

1) 東南アジアのヤモリ由来 *S.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(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 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 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 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 \times 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 で 15 分静置した。プラグに XbaI (TaKaRa) 25U を加えて 37 で 2 時間反応させた。酵素処理終了後、M Buffer を除去し、0.5 \times 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 、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ス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。

類鼻疽

2014 年月にベトナム・メコンデルタで採取した水田の表土 40 検体について、類鼻疽菌の分離を試みた。供試検体 10g を、5 倍量の選択増菌培地(1L 当たりトリプチケースソイブロス(Difco) 10g、グリセロール 40ml 0.1%クリスタルバイオレット 5ml、コリシン 15000U)に入れ、37 、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。

(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

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。また分離株はシベリア型内の同一のサブクラスター内に属しており、以前モンゴルで分離された MucAr M14/10 株とは異なるサブクラスターに分類されることが明らかになった。また MGL-Selenge-13 株の E 蛋白領域について、MucAr M14/10 株、同じくモンゴルで遺伝子のみが検出されている M92 株、及びロシア・イルクーツクで分離された IR99 2f7 株との配列を比較した所、塩基配列では 92M 株とは 96%、MucAr M14/10 株及び IR99 2f7 株とは 94% の相同性があり、アミノ酸配列では全ての株で 99% の相同性が認められた。

ダニ由来ウイルス

HSKV セグメント特異的 Real-time RT-PCR に

より、 10^2 RNA copies 以上の SFTSV RNA 遺伝子の検出が可能であった。ベトナムにおいて採集されたマダニからは HSKV 遺伝子は検出されなかった。

ハンタウイルス感染症

ヨーロッパ、アジアでは SEOV、HTNV 等のネズミ亜科野げっ歯類およびハタネズミ亜科のげっ歯類の媒介する PUUV とその近縁ウイルスが存在するため、これらのウイルスに対する抗体を検出することが必要である。しかしながら、これらのウイルスの宿主の IgG はそれぞれ抗原性が異なり、一種類の試薬で検出することができない。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。Protein A (EY laboratories) を金コロイド標識またはパラジウムコロイド標識の結合 pH を検討した結果、pH 7.0 - 9.0 の範囲で結合が確認された。

これらの ICG は、実験感染血清を用いて評価した。PUUV 実験感染ハタネズミおよびマウス血清各 2 例は、PUUV 抗原のみに反応した。一方、非感染ハタネズミおよびマウス血清ではいずれの場合もラインは観察されなかった。両コロイド間で結果に差はなかったが、パラジウムコロイドの方が結果のコントラストがやや強い傾向が認められた。今回はこれまでの実績から金コロイドを使用して以下の実験を進めた。次に北海道で捕獲された野鼠であるエゾヤチネズミの血清 30 例で本 ICG を評価した。これらはすでに PUUV 類似ウイルスに対する陽性、陰性が診断されている血清である。本研究で試作した ICG ストリップで試験した結果、陽性と陰性を正しく判定することが可能であった。

条件検討の過程でヒトの血清との反応も確認した。Protein A は上記照応物以外にもウサギ、ヒトの IgG と強く結合することが知られている。その結果、一部のヒト血清で非特異反応が認められた。標識用金コロイドのロットを複数準備し、非特異反応の出た血清を検査したところ、一部の金コロイドのロット不良が原因であることが明ら

かとなった。このような不良ロットを迅速に見分けることも必要であることが明らかとなった。ホルマリン固定パラフィン包埋で作製した SFTS ウイルスおよび SARS コロナウイルス感染動物組織標本を用いて検索した結果、今回用いた 5 つの抗体の免疫組織化学法ではいずれも抗原陰性であった。表に、昨年度と今年度の研究結果をまとめた。

クリミア・コンゴ出血熱

解析に用いた CCHFV 株 89 株中、39 株が CCHFV 中国分離株または患者等から増幅された CCHFV の S-遺伝子である。39 株中 1 株を除く 38 株は 1 つのクラスターを形成していた。ただし、中国新疆ウイグル自治区に分布する CCHFV の中には、オマーン、イラン、パキスタンで分離されたウイルスと同一のクラスターを形成する CCHFV が存在した。

M-遺伝子塩基配列による解析によると、中国株は世界各地(中近東、東南アジア、アフリカ)で分離される CCHFV と同じクラスターを形成するウイルスが混在しており、地域特異性が認められないことが明らかとなった。

L-遺伝子塩基配列による解析では、L-遺伝子は 3 つの遺伝子型に分類され、中国株はそのうちタジキスタン(TADJ/HU8966)で分離された株が属するクラスターと、オマーン(Oman)およびパキスタン(Matrin)の分離株が属するクラスターの 2 つの遺伝子型に分類されることが明らかになった。

狂犬病

非特定営利活動法人北の海の動物センターが、日露隣接地域生態系保全協力プログラムによる北方四島生態系関係共同調査を進めており、その調査成果を「オホーツクの生態系とその保全(櫻井泰憲・大島慶一郎・大泰司紀之編著)(2013年)」に報告している。2010年の調査で新たにコウモリ類が 2 種記録され、国後島に計 10 種が分布し、同島と知床半島をモモジロコウモリが行き来していることが示唆されている。国後島住民に生活行動・習慣についてアンケート調査を実施し、17 名から以下の回答を得た。

1) 犬に関する質問

半数以上が犬を飼育しているが、屋外飼育・常時放し飼い・糞便放置・ネズミの捕食ありとの回答が多く、飼育犬の衛生環境は良くないと考えられた。

2) キツネに関する質問

島民による目撃率は高く、遭遇する機会は郊外の沼沢・湿地、だけでなく住居に近接することもある。また、工場・民家の周囲で残飯等をキツネが餌としている。餌付を行っている者が 1 名いたほかに、釣り魚の放置や生活ごみの不適切な処理が、人間とキツネの遭遇機会の増加につながっている可能性が考えられた。

3) 屋外での活動に関する質問

ほとんどの住民が、山菜取りやきのこ狩りを月に数回行っているが、採取した山菜ときのこは毎回洗って摂食しており、経口感染に対する予防意識はあるものと考えられた。

4) 家庭菜園(ダーチャ)について

住民の半数が家庭菜園を所有しており、週に数回ないし月に 1 回程度の作業を行っている。

5) 飲み水に関して

飲用水の煮沸を半数以上で行っておらず、特に井戸水を飲水に利用している場合については煮沸が必要と考えられた。

国後島に在住の野生動物専門家と住民との動物由来感染症に関する意見交換会では、専門家および住民ともに、狂犬病とエキノコックス症についての知識を持っており、関心の高いことが示された。

狂犬病ウイルス西ヶ原株の遺伝子操作により、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 株を一過性に L 蛋白質を発現する NA 細胞に感染させた結果、GFP の発現が確認された。GFP 陽性細胞の数は、接種後時間の経過にしたがい増加することが確認された。一方、同様の実験を Nishi- Δ L/Luc 株で行った場合も、経時的な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

一遺伝子が発現されることが確認された。

ストックウイルス中の Nishi- Δ L/Luc 株は、ヌクレオカプシド上に発現細胞から供給された L 蛋白質を保有している。したがって、Nishi- Δ L/Luc 株を L 蛋白質非発現細胞に接種した場合、ヌクレオカプシド上に持ち込まれた L 蛋白質の作用により初期転写が起こると考えられる。しかし、その後は、L 遺伝子の欠損により L 蛋白質が供給されないため、二次転写およびゲノム複製は起こらない。そこで、ルシフェラーゼ活性を指標とすることで、Nishi- Δ L/Luc 株感染細胞における初期転写を検出できるかどうか検討を行った。L 蛋白質を発現しない NA 細胞に Nishi- Δ L/Luc 株を接種した場合、接種 6 時間後において非接種細胞(mock)よりも3倍以上高いルシフェラーゼ活性が検出された。同活性は、接種 12 時間後にピークに達した後、次第に低下した。以上より、ルシフェラーゼ活性を指標とすることで、Nishi- Δ L/Luc 株の初期転写が検出可能であることが強く示唆された。

ブルセラ症

ベルツノガエル 10 個体のうち、3 個体の肝臓より、ブルセラ属菌が分離された(A7h 株、A9h 株、A10h 株)。Combinatorial-PCR 法により、omp2-ca を除く 3 種のプライマーによる明らかな特異的増幅が認められた。ただ、昨年度分離した A105 株、A141 株では、4 種のプライマーによる特異的増幅が認められたのに対して、今回は omp2-ca の反応性が著しく弱いことから、これらとは異なることが明らかとなった。A7h、A9h、A10h の間には差は認められなかった。

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、無尾類分離株内でも、2 タイプ(A105、A141 タイプと、Ah7、Ah9、Ah10 タイプ)に分かれるようであった。

分離株はマクロライド系、テトラサイクリン系、ニューキノロン系の抗生物質に対しては概ね感性であったが、ブルセラ症の治療に用いられるアミノグリコシド系やリファンピシンには中間的な

耐性を示した。対照に用いた *B. canis* とは若干、異なるプロファイルを示した。

A105 株、A141 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。特に、12hpi 以降、増殖が顕著になるが、20 ないし 24hpi では増殖曲線に鈍化が認められた。

バルトネラ感染症

捕獲されたニホンザルの 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。血中菌数は 50~37,000CFU/ml と、非常に高い値を示す個体も認められた。

gltA、*rhoB* ならびに ITS 領域の塩基配列を解析した結果、全てのニホンザル分離株は同一の遺伝子性状を示すこと、また中国の飼育アカゲザルを由来とする *B. quintana* RM-11 株と同一であるか非常に高い相同性(99.5~100%)を示した。

B. quintana 陽性の 6 個体から代表の 1 株を選抜き MLST 法を試みた結果、いずれの株も新規の ST22 に型別された。連結塩基配列に基づく系統解析では、ニホンザル、アカゲザル、カニクイザルおよびヒト分離株はそれぞれ独立した 4 つのクラスターを形成した。

サルモネラ感染症

1) PFGE 法による染色体 DNA の解析結果

今回供試した *S.Weltevreden*81 株は、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。F1 および F14 についても、分離された地域は同じベトナム国内であり、比較的近い距離にあった。また、地域別に分離されたパターン数をみると、メコンデルタでは 13 パターンと最も多く、2 番目に多かったタイでは 5 パターンであった。

2) 系統樹解析

S.Weltevreden のヤモリ由来株 78 株とヒトの胃腸炎患者由来株 3 株の計 81 株の PFGE パターンの相同性をもとに、UPGMA 法により系統図を

作製した結果、系統樹は大きく 2 つのクラスターに分けられた。パターン数が最も多かったメコンデルタ由来株の大部分は 1 つのクラスターに分類された。また、2 番目に多かったタイ由来株はメコンデルタ由来株とは異なったクラスターに分類された。

3) MLVA 法による遺伝子型別

PFGE で型別されたそれぞれのパターンのうち、パターン F1 から 3 株、パターン F12、F14、F15、F16 および F17 から 2 株ずつ、パターン F2、F3、F4、F5、F6、F7、F8、F9、F10、F11、F13、F18、F19、F20、F21 および F22 からそれぞれ 1 株の計 29 株を用い、MLVA を実施した結果、14 の MLVA タイプに分類された。その内訳は、タイプ M1 に 5 株、タイプ M2 に 4 株、タイプ M3 に 3 株、タイプ M4、M5、M6、M7、M8 および M9 にそれぞれ 2 株ずつ、タイプ M10、M11、M12、M13 および M14 にそれぞれ 1 株ずつであった。RN が菌株間で異なっていた領域は、Sal16 と STTR3 および STTR7 であったが、今回新たに用いた STTR3 および STTR7 の領域で差異が見られたのは 1 株だけであり、菌株識別能力は低かった。これに対し、Sal16 の領域では、RN 数に顕著なばらつきがみられた。また、SE-4 では差異が確認されなかった。

類鼻疽

今回、ベトナム・メコンデルタで採取した水田の土 40 検体について、増菌法を併用して培養法により類鼻疽菌の分離を行ったところ、3 検体 (7.5%) から類鼻疽菌が分離された。

D. 考察

ダニ媒介性脳炎

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。TBE 患者の報告は特に本県で多いことから、同地域での TBE の原因ウイルスはこれらシベリア型 TBEV によるものと考えられる。同地域は多数のシベリア型 TBE が報告されているロシアとの近接地域であり、ロシアから侵入してきているものと考えられる。

またシベリア型 TBEV は遺伝子 RNA の配列からさらに 2 つのサブクラスターに分類される。今回分離された 9 つの MGL-Selenge-13 株は、一つのサブクラスターに属しており、以前モンゴルで分離された MucAr M14/10 株とは異なるサブクラスターに属していた。ロシアのシベリア地方においても、同一の TBE 流行地域において 2 つのサブクラスターのシベリア型 TBEV が分離されていることから、これらの 2 つのサブクラスターの TBEV はそれぞれ独立してモンゴルに侵入している可能性を示している。

ダニ由来ウイルス

HSKV 遺伝子 を特異的に検出できる Real-time PCR 法を確立した。我々はこれまでに、TBEV 遺伝子および SFTSV を特異的に検出できる Real-time RT-PCR 法も確立している。また、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属の数株を検出可能な共通プライマーを用いた RT-PCR 系も確立している。今後、これらの遺伝子検出系を用いて、日本を含む東・東南アジア周辺国においてマダニ媒介性ウイルス遺伝子検出調査を行う予定である。

HSKV のヒトや動物への病原性は未知であるが、HSKV はヒトを含む哺乳動物由来培養細胞に感染性を示し、マウス (IFNAR KO) に致死性を示すことから、実際に感染例が存在する可能性がある。今後、動物およびヒト血清を用いた遺伝子検出調査も行う予定である。

ハンタウイルス感染症

Protein A を用いることによって、多種類のげっ歯類の抗ハンタウイルス抗体の検出を ICG で行うことが可能となった。Protein A の適用範囲の動物としては、ヤチネズミ、ハタネズミ、小型のトガリネズミ類である。今回は検証のため PUUV 抗原のみを用いたが、今後は対象を考慮した Multiplex 抗原と種々の検出試薬の組み合わせの検討が必要となる。

昨年度は、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、いくつかのハンタウイルスの核タンパク質に対する

モノクローナル抗体は、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。

これらのモノクローナル抗体について、ハンタウイルス感染症との鑑別診断が必要である、プニヤウイルス科に属する SFTS ウィルスと、急性呼吸器感染症の原因となる SARS コロナウイルスに対する交差反応の有無を評価した。その結果、これらの抗ハンタウイルス抗体は両ウイルスに対する交差反応性は示さず、これらの抗体は、パラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学法においてもハンタウイルスを特異的に検出することが確認された。

クリミア・コンゴ出血熱

最近、CCHF の流行はアジアにおいては、中国新疆ウイグル自治区(ただし、2002 年以降の流行状況の発表はない)とパキスタンでの流行が報告され、特記すべきこととして、インドでも CCHF の患者発生が報告されている。今回の研究成績からは、CCHF 患者の CCHFV 感染地域を特定するためには、塩基配列に地域特異性のある S-遺伝子を解析に用いるのが有用であることが明らかにされた。

S-遺伝子には地域特異性があるのに対し M-遺伝子にはそれが無い。この違いの背景と CCHFV の詳細な進化の過程を動物やマダニと CCHFV の関連の中で明らかにされることが求められる。

狂犬病

国後島における動物由来感染症の実態調査は行われておらず、ヒトおよび動物の発生状況等について正確な情報はない。北海道におけるエキノコックス症の侵入経路を考えると、島内に生息するキツネの感染症動向調査は島民の健康のためにも必要であると考えられた。また、狂犬病発生リスクが高く野生動物での流行拡大が見られる地域が極東にあるというロシアの専門家による情報を考慮すると、国後島に生息する狂犬病に感受性の高い動物について狂犬病の調査を行うことが必要と考えられた。

国後島住民の生活行動・習慣調査によって、狂犬病の重要な流行宿主である犬の飼育管理

に課題のあることが示され、エキノコックス症に対する予防策とともにヒトに身近なペット動物であるイヌの飼育形態の改善が望まれた。

国後島のコウモリ類については、日露隣接地域生態系保全協力プログラムによる北方四島生態系関係共同調査によって、2010 年の調査で新たな 2 種が記録され、計 10 種の分布が確認されている。特に、国後島と知床半島のモモジロコウモリが両地域を行き来している可能性が示唆されており、国後島から海域を越えて狂犬病等のコウモリ由来動物由来感染症が北海道に侵入する可能性があることから、本調査を継続することによって生態学的な知見を踏まえた発生予測・被害推計などを可能にすることが必要であると考えられた。

これまで、狂犬病ウイルスを含むマイナス鎖 RNA ウィルスの RNA ポリメラーゼの研究には、ミニゲノム転写・複製系が広く用いられてきた。本系は、ゲノム両末端配列の間にレポーター遺伝子(ルシフェラーゼなど)を有するミニゲノム RNA、ならびに RNA ポリメラーゼを含むヌクレオカプシド構成蛋白質を発現する各種プラスミドを細胞に導入することで、感染細胞で行われるウイルス RNA の転写・複製を人工的に再現するものである。本系を用いれば、レポーター遺伝子の発現量を指標として転写・複製効率を簡便に評価することが可能である。その一方で、ミニゲノム転写・複製系は、すべてのウイルス因子の供給をプラスミドからの一過性発現に依存しているため、アーティファクトの影響により必ずしも感染細胞における転写・複製を反映しない可能性も考えられる。それに対し、本研究で樹立した L 遺伝子欠損ウイルスを用いた実験系は、L 蛋白質の発現のみをプラスミドに依存していることから、ミニゲノム転写・複製系よりもアーティファクトの影響が少ないと考えられる。本研究では、L 蛋白質発現プラスミドを導入した細胞に 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。このことは、上記の発現プラスミド上の L 遺伝子 cDNA に種々の変異を導入

した後、同様の実験を実施することで L 蛋白質の機能領域の解析が可能となることを示している。すなわち、本系は、狂犬病ウイルスの L 蛋白質の機能解析に有用なツールとなることが明らかとなった。Nishi- Δ L/Luc 株を接種した L 蛋白質非発現細胞において、非接種細胞よりも高いルシフェラーゼ活性が検出されたことより、これを指標とすることで、狂犬病ウイルスの初期転写が検出可能であることが強く示唆された。通常の狂犬病ウイルスやミニゲノム転写・複製系を用いた場合、技術的に初期転写と二次転写を区別することはできない。したがって、Nishi- Δ L/Luc 株を用いた本系は、狂犬病ウイルスの初期転写の機序を解明する上で極めて有用なツールとなることが予想される。

ブルセラ症

今年度は、国内繁殖の無尾類(ベルツノガエル)3 個体から、新たにそれぞれ 1 株、計 3 株が分離され、特異的 PCR により ブルセラ属菌と判定された。しかしながら、omp2-ca タイプの配列を検出するプライマーでの反応性が非常に弱く、昨年度の 2 株とは異なる遺伝子背景を持つ、新菌種である可能性が示唆された。

これら、計 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。さらに、昨年度の 2 株と今年度の 3 株は生化学的性状に差が認められた。

また、薬剤感受性については、概ね既知のブルセラ属菌と似ているが、ブルセラ症の治療に用いられる薬剤に対する感受性が、やや劣っていた。

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も近縁であることから、ヒト培養細胞への感染性と細胞内増殖能を検討したところ、*B. abortus* や *B. suis* と同様に、顕著な感染・増殖能を示した。ヒトに対する病原性が家畜由来ブルセラ属菌(*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*)より劣る *B. canis* ではヒト培養細胞での感染・増殖とも非常に弱いことを考え

ると、無尾類由来ブルセラ属菌は、ヒトに病原性を持つ公衆衛生的にも注意が必要な菌である可能性がある。今後さらにその病原性について、病原性遺伝子や感染実験により明らかにしていく必要があると考えられる。

バルトネラ感染症

青森県、山形県および和歌山県に棲息する野生のニホンザルは *B. quintana* を保菌していることが初めて明らかとなった。さらに、3 頭の *B. quintana* 陽性のニホンザルの血中菌数はそれぞれ 6,000、12,000、37,000CFU/ml と、高い菌血症状態であった。また、ニホンザル分離株はヒト由来の *B. quintana* Fuller^T 株に比べ、アカゲザル由来の *B. quintana* RM-11 株とより近縁な株であることも明らかとなった。以上の結果から、サルはヒト分離株と異なる遺伝子性状の *B. quintana* を保有するとともに、本菌の自然宿主である可能性が示された。

MLST 法を用いて、ニホンザル分離株の ST を決定したところ、検討した 6 株は同一の ST22 型であることが明らかとなった。さらに MLST 法に基づいて系統解析したところ、ST1~22 は 4 つの独立したクラスターを形成し、それぞれ分離されたヒトあるいはサルの種類ごとに ST が分類された。今回、ニホンザルから分離された *B. quintana* 株は新規の ST であり、また系統解析でもニホンザル独自のクラスターを形成したことから、ヒトおよびサルの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。さらに、青森・山形・和歌山県のニホンザルは、アカゲザルやカニクイザルとは異なる ST の *B. quintana* 株を保有していたことから、わが国ではニホンザル固有の *B. quintana* がサル集団内に分布している可能性が考えられた。本研究のニホンザルの採材地域は 3 県に限定されていたことから、今後、より広範な地域のニホンザルにおける *B. quintana* の分布状況を検討するとともに、分離株の遺伝子性状を詳細に解析していく必要性があると考えられた。

サルモネラ感染症

東南アジアでは、S.Weltevreden が人のサル

モネラ感染患者から分離される最も重要な血清型であり、ヤモリが本血清型を高率に保菌し、自然界における重要なレゼルボアであることが報告されている。本研究では、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。このうち、ヒトの胃腸炎患者由来株のみで見られた 1 つの PFGE パターンをのぞき、それ以外の 21 パターンはすべてヤモリ由来株から得られた。近年、欧米や日本などの先進国で大きな社会的問題となっている *S. Enteritidis* や *S. Infantis* は、PFGE で遺伝子型別しても得られる PFGE パターンは極めて少ないことが報告されており、これらのことは近年のこれらの血清型による *Salmonella* 感染症の流行は特定のクローンによるものであることを示している。一方、メコンデルタで分離された様々な由来の *S.Weltevreden* について PFGE で解析したところ、多様な PFGE パターンが分離されたことが報告されているが、本研究でも東南アジアの野生ヤモリ由来の *S.Weltevreden* は PFGE により、多様なパターンに型別された。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っていた。これらのことは、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。また、メコンデルタの胃腸炎患者由来株 2 株の PFGE パターンは、フエのヤモリから分離されたパターン F14 と同じであったことから、ヤモリはヒトへの感染源となっている可能性が推察される。

日本では *S.Weltevreden* はほとんど分離されないが、沖縄県だけは本血清型菌の分離頻度が高いことが報告されている。沖縄では 1960 年代くらいまでは東南アジアで普遍的に分布するホオグロヤモリは分布しておらず、1960 年代以降にこのヤモリが沖縄に侵入したことが報告されている。本研究で供試した沖縄県におけるヤモ

リ由来 *S.Weltevreden* 2 株の PFGE パターンはどちらもパターン F16 であった。本研究で供試した東南アジアのヤモリ由来株には同じ PFGE パターンを示す菌株は確認されなかったが、系統図解析により東南アジア由来株との遺伝子間の距離を測ると、タイ由来株やメコンデルタ由来株と 57% の相同性を持つことがわかった。そのため、沖縄県のヤモリから分離された *S.Weltevreden* は、東南アジアから沖縄に持ち込まれた可能性が考えられる。今回は沖縄県におけるヤモリ由来株は 2 株だけしか供試できなかったため、結果として得られた PFGE パターンは 1 つのみだったが、沖縄県由来株と東南アジア由来株の *S.Weltevreden* の遺伝的関連性を比較するためには、さらに多くの検体を供試し、遺伝子パターンを比較する必要がある。

PFGE 法は菌株型別能力が高く、現在では分子遺伝子型別のゴールドスタンダードとして、広く普及しているが、手技が煩雑であり、フラグメント解析なので他機関との間で比較がしづらいなどの欠点もあるため、PFGE 法に代わる新たなシーケンス解析による分子遺伝子型別法のひとつとして、MLVA 法が開発されている。Chiou らは、*S. Typhimurium* を PFGE ならびに MLVA で解析した結果、PFGE では 8 パターンであったのに、MLVA では 108 パターンにも型別され、菌株型別能力は MLVA のほうが高かったと報告している。このように、MLVA のほうが PFGE より高い菌株型別能を示すことを指摘する研究者は多い。しかしながら、今回の研究では、PFGE では 22 パターンに分けられたのに対し、MLVA では 14 タイプのみであった。昨年度の検討では、Sal16 と SE-4 の 2 つの領域について、*S.Weltevreden* 株の MLVA 解析を行ったところ、Sal16 では 14 種類の RN が認められ、十分な識別能を発揮したが、SE-4 については、差異が全く認められなかったことを報告している。また、今回新たに使用した領域である、STTR3 と STTR7 についても、差異が認められた株は 1 つだけであり、MLVA の識別能は高くなかった。すなわち、Sal16 以外の 3 つの領域は、あまり遺伝的に多様な領域とは言

えず、今後 *S. Weltevreden* での MLVA の識別能を上げるためには、遺伝的に多様な領域を見つけ、検討することが必要である。今回使用したプライマーは、*S. Weltevreden* のために設計されたものではなく、*S. Typhi*、*S. Typhimurim* および *S. Enteritidis* での MLVA 解析のために設計されたものである。今後 *S. Weltevreden* ではこれらの領域は遺伝的に多様ではなかったものと考えられる。今後 *S. Weltevreden* に MLVA を用いて、PFGE と同等もしくはそれ以上の識別能を得ようとするなら、*S. Enteritidis* などのために設計された既存のプライマーではなく、Tandem Repeat Finder software を用いて、*S. Weltevreden* のシーケンスデータから MLVA マーカーになりうる領域を探し出し、新しくプライマーの設計を行い、最適なプライマーセットを開発する必要があるだろう。

類鼻疽

類鼻疽は我が国における国内発生はほとんどないが、輸入感染症としてしばしば発生が見られる。わが国の類鼻疽の輸入感染例において、感染国として報告の多いベトナムの水田の土を採取し、類鼻疽菌の分離を試みた結果、昨年度は選択培地に直接塗抹する方法では菌は分離されなかったが、今年度は増菌法を併用した結果、類鼻疽菌は 40 検体中 3 検体 (7.5%) から分離された。このことから、ベトナム・メコンデルタにも本菌は分布することが明らかになった。ただ、直接塗抹では分離されなかったことから、分布はしているものの、菌の汚染菌量は高くはないものと思われた。

E. 結論

本年度の研究により、ダニ媒介性脳炎、クリミア・コンゴ出血熱、パルトネラ感染症、サルモネラ感染症、および類鼻疽について、国内外の疫学的情報が得られた。また、ハンタウイルス感染症、ダニ由来ウイルスについて、診断法もしくは検出法を開発することに成功した。今後は新規に開発された診断法を用いて、近隣諸国におけるこれらの感染症の流行状況調査を行い、日本

への侵入・流行の危険性を精査していく事が重要であると考えられる。

本年度の研究で作出された L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスは、狂犬病ウイルスの L 蛋白質の機能解析に有用なツールとなることが明らかとなった。また、本ウイルスは、L 蛋白質を標的とした新たな治療薬のスクリーニングにも応用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。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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*

- Virology, 95:849-861, 2014
- 5) 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
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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, 51, 87.
 - 9) 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.
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) 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
 - 13) 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, 2014
 - 14) 佐藤宏明, 冬賀秀一, 堀田緒留人, 須原靖明, 尾関拓磨, 丸茂一義, 金井尚之, 莊子久美子, 宇田川郁子, 満下恵, 今岡浩一. *Brucella melitensis* による椎間板炎の一例. 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, 35(7): 182-183, 2014
 - 15) 今岡浩一, 木村昌伸. ブルセラ症 - 特集・人獣共通感染症の新しい知見. *臨床と微生物*, 近代出版, 42(1): 27-32, 2015
 - 16) Pangjai, M., Maruyama, S., Boonmar, S., Kabeya, H., Sato, S., Nimsuphan, B., Petkanchanapong, W., Wootta, W., Wangroongsarb, P., Boonyareth, M., Preedakoon, P., Saisongkorh, W., and Sawanpanyalert, P. 2014. Prevalence of zoonotic *Bartonella* species among rodents and shrews in Thailand. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 37(2): 109-114.
 - 17) 丸山総一: 猫ひっかき病, 公衆衛生情報 Vol. 44/No. 3: 22-23. (2014)
- ## 2. 学会発表
- 1) 好井健太郎, 鶴田征太郎, 境瑞紀, 苅和宏明. ダニ媒介性フラビウイルスのインターフェロンアンタゴニスト作用の解析. 第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 山口県山口市. (2014, 5).
 - 2) 下田宙, 米満研三, 早坂大輔, 好井健太郎, 寺田豊, 野口慧多, 鋤田龍星, 高野愛, 前田健. 山口県の野生動物およびダニからフラビウイルスの検出. 第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 山口県山口市. (2014, 5).

- 3) 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. International Union of Microbiological Societies 2014. Montreal, Canada. (2014, 7).
- 4) 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. International Union of Microbiological Societies 2014. Montreal, Canada. (2014, 7).
- 5) Sakai, M., Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Hirano, M., Kariwa, H.: Variable region of the 3' UTR is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. International Union of Microbiological Societies 2014. Montreal, Canada. (2014, 7).
- 6) Kariwa, H., Maki, M., Seto, T., Sanada, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K.: Passage of Hantaan virus strain AA57 in Vero E6 cells affects pathogenicity in mice. International Union of Microbiological Societies 2014. Montreal, Canada. (2014, 7).
- 7) Nakao, R., Kajihara, M., Matsuno, K., Qiu, Y., Mori, A., Nao, N., Yoshii, K., Kariwa, H., Sawa, H., Sugimoto, C., Takada, A., Ebihara, H.: Detection and isolation of novel phleboviruses from ticks in Japan. the 12th Biennial Conference of the Society for Tropical Veterinary Medicine and the VIII International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens. Cape Town, South Africa. (2014, 8).
- 8) Kariwa H, Sanada T, Iwasaki R, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I. Characterization of Hokkaido virus, Genus Hantavirus and generation of the Reassortant Virus with Puumala Virus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases, Taipei, Taiwan (2015. 1)
- 9) Hirano M, Yoshii K, Hasebe R, Ichii O, Kariwa H. Tick-borne encephalitis virus alters membrane structure and replicates in dendrites of primary mouse neuronal cultures. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases, Taipei, Taiwan (2015. 1)
- 10) 中尾桃子, 真田崇弘, 好井健太郎, 佐々木宣哉, 亀山武志, 高岡晃教, 苅和宏明. エゾヤチネズミ腎由来細胞におけるハンタウイルス感染に対するI型インターフェロン応答の解析. 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 6).
- 11) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 平野港, 苅和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの高病原化に関わる3'非翻訳領域 variable region の役割. 第157回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
- 12) 武藤芽未, Boldbaatar, B., 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157回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
- 13) 下田宙, 米満研三, 早坂大輔, 好井健太郎, 寺田豊, 野口慧多, 鋤田龍星, 高野愛, 前田健. 国内の野生動物およびダニから新規フラビウイルスの検出. 第157回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
- 14) 岩崎里菜, 真田崇弘, 好井健太郎, 苅和宏明. Hokkaido ウイルスと Puumala ウイルスの遺伝子再集合体の作出とその性状解析. 第157回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
- 15) 中尾亮, 梶原将大, 邱永晋, 森亜紀奈, 直亨則, 村松美笑子, 好井健太郎, 苅和宏明, 澤洋文, 杉本千尋, 高田礼人. 北海道産マダニからの新規フレボウイルスの検出. 第157回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
- 16) 池端真帆, 好井健太郎, 境瑞紀, 平野港, 苅

- 和宏明. レポーター遺伝子発現ダニ媒介性脳炎ウイルスの作製と性状解析. 第157回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
- 17) 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. The 2nd Sapporo Summer Seminar for One Health. Sapporo, Hokkaido. (2014, 9).
- 18) Muto, M., Bazartseren, B., Yoshii, K., Kariwa, H.: Isolation and characterization of tick-borne encephalitis virus from Mongolia. The 2nd Sapporo Summer Seminar for One Health. Sapporo, Hokkaido. (2014, 9).
- 19) 好井健太郎. フラビウイルス粒子形成・分泌に関与する宿主因子の検索および機能解析. 第21回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 20) 平野港. ダニ媒介性脳炎ウイルスの神経細胞内特異的な複製機構の解析. 第21回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 21) 武藤芽未, Boldbaatar, B., 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62回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 22) 岡本奈津実, 好井健太郎, 中尾亮, Hofstetter, R. K., 藪智子, 益本大輝, 染谷梓, 前田秋彦. Thogoto virus 様ウイルスのダニからの分離. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 23) 池端真帆, 好井健太郎, 境瑞紀, 平野港, 苅和宏明. レポーター遺伝子発現ダニ媒介性脳炎ウイルスの作製と性状解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 24) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 平野港, 苅和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの高病原化に関わる3'非翻訳領域 variable region の役割. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 25) 岩崎里菜, 真田崇弘, 好井健太郎, 苅和宏明. Hokkaido ウイルスと Puumala ウイルスの遺伝子再集合体の作出とその性状解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 26) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
- 27) 好井健太郎, 寸田祐嗣, 五十嵐学, 横澤香菜, 境瑞紀, 苅和宏明, Holbrook, M. R., 高島郁夫. ダニ媒介性フラビウイルスによる中枢神経系病態に関わるウイルス因子の同定. 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
- 28) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 苅和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定. 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
- 29) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 日本ウイルス学会北海道支部第47回夏季シンポジウム. 北海道奈井江町. (2013, 7).
- 30) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 第156回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
- 31) 牧雅大, 真田崇弘, 瀬戸隆弘, 永田典代, 好井健太郎, 苅和宏明. Hantaan ウイルス AA57 株感染マウスにおける病態発現機序の解析. 第156回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
- 32) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 苅和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定. 第156回日

- 本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
- 33) 好井健太郎, 寸田祐嗣, 五十嵐学, 横澤香菜, 境瑞紀, 苅和宏明, Holbrook, M. R., 高島郁夫. ダニ媒介性フラビウイルスによる中枢神経系病態におけるNS5蛋白の影響の解析. 第156回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
- 34) 下田宙, 早坂大輔, 好井健太郎, 米満研三, 寺田豊, 野口慧多, 鎌田龍星, 高野愛, 前田健. 山口県のイノシシからダニ媒介性脳炎ウイルス様遺伝子の検出. 第20回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 兵庫県神戸市. (2013, 11)
- 35) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 36) 牧雅大, 真田崇弘, 瀬戸隆弘, 永田典代, 好井健太郎, 苅和宏明. Hantaan ウイルス AA57 株感染マウスにおける病態発現機序の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 37) 好井健太郎, 寸田祐嗣, 五十嵐学, 横澤香菜, 境瑞紀, 苅和宏明, Holbrook, M. R., 高島郁夫. ダニ媒介性フラビウイルスによる中枢神経系病態に関わるウイルス因子の同定. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 38) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 苅和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 39) Mya Myat Ngwe Tun, 青木康太郎, 千馬正敬, 森田公一, 早坂大輔: ダニ媒介性脳炎ウイルス感染における TNF- α 、IL-10 および IL-2 応答の役割: 第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 山口 (2014, 5)
- 40) 早坂大輔: SFTS ウイルスについてこれまでわかったこと: 第22回 Seminar on Acari-Disease Interface, 太宰府 (2014, 7)
- 41) 黒崎陽平, 中前小百合, 早坂大輔, 安田二郎: 新規ナイロウイルス遺伝子検出法の開発: 第51回ウイルス学会九州支部総会, 鹿児島 (2014, 9)
- 42) 早坂大輔, 嶋田聡, Guillermo Posadas Herrera, 森田公一: 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス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51回ウイルス学会九州支部総会, 鹿児島 (2014, 9)
- 43) 早坂大輔, 嶋田聡, 青木康太郎, 森田公一: 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス遺伝子検出法の確立と長崎県における媒介マダニ調査: 第157回日本獣医学会学術集会, 札幌 (2014,9)
- 44) Mya Myat Ngwe Tun, Kotaro Aoki, Masachika Senba, Corazon C. Buerano, Kenji Shirai, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita and Daisuke Hayasaka: TNF- α and IL-10 reduce the incidence of mortality in mice infected with Tick-borne encephalitis virus: The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Nara (2014, 9)
- 45) 早坂大輔, 余福勲, 吉川亮, 嶋田聡, Guillermo Posadas Herrera, Mya Myat Ngwe Tun, 吾郷昌信, 森田公一: 長崎県における野生動物およびマダニの SFTS ウイルス感染状況の調査: 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014, 11)
- 46) Inoue S. Epidemiology and control strategy of rabies. Regional training on rabies. OIE regional representation for Asia and the Pacific. 5-8 Aug, 2014. Tokyo/Yokohama, Japan.
- 47) Inoue S. Enhancing laboratory network. Regional training on rabies. OIE regional representation for Asia and the Pacific. 5-8 Aug, 2014. Tokyo/Yokohama, Japan.
- 48) Inoue S. Rabies outbreak in wild

- ferret-badgers in Taiwan. Group Exchange 2014 with S.Korea and Taiwan in Tokyo. 27 Aug, 2014. NIID. Tokyo, Japan.
- 49) Inoue S. Coordinated Validation and Value of RFFIT / Rabies Guideline for Survey of Wildlife in Japan. Seminar. 24 Sep, 2014. Research & Diagnostic Center, Taiwan CDC. Taipei, Taiwan.
- 50) Inoue S. Rabies Guideline for Survey of Wildlife in Japan. AHRI Seminar. 25 Sep, 2014. Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan. New Taipei City, Taiwan.
- 51) Inoue S. Coordinated Validation and Value of RFFIT. AHRI Seminar. 25 Sep, 2014. Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan. New Taipei City, Taiwan.
- 52) Inoue S. Can Thailand be a rabies free country by 2020? Learning from rabies management in Japan. Lesson from a current rabies outbreak in Taiwan, a rabies free country. Tokyo-Chiang Mai World Rabies Day Conference. 13 Oct, 2014. Lanna Dog Welfare/World Animal Protection. Chiang Mai, Thailand.
- 53) Inoue S. Can Thailand be a rabies free country by 2020? Learning from rabies management in Japan. Lesson from a current rabies outbreak in Taiwan, a rabies free country. Tokyo-Chiang Mai World Rabies Day Conference. 14 Oct, 2014. Room 153, 15th Floor meeting room of Sujino Building, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. Chiang Mai, Thailand.
- 54) 井上 智. 台湾における狂犬病の疫学と我が国における診断能力向上の取り組み. 狂犬病の疫学とその対策-獣疫学が社会に果たす役割. 第39回獣疫学会学術集会. 2014年4月5日, 獣疫学会, 東京大学・中島薫一郎記念ホール, 東京都
- 55) 井上 智. 動物由来感染症. 平成25年度 JICA 集団研修「獣医技術研究 (Research on Veterinary Technology)」. 2014年4月8日, 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所, つくば, 茨城県
- 56) 井上 智. 狂犬病の現状と日本の取組み (台湾での狂犬病の発生を受けて). 平成26年度大分県狂犬病予防研修会. 2014年5月30日, 大分県生活環境部食品安全・衛生課, 大分市, 大分県
- 57) 井上 智. 台湾で発生した狂犬病と野生動物対策の意義. 日本獣医生命科学大学特別講義. 2014年6月11日, 日本獣医生命科学大学C-501講義室, 武蔵野市, 東京都
- 58) 井上 智. 動物由来感染症 (狂犬病等) と公衆衛生について. 岩手大学農学部・人獣共通感染症学講義. 2014年6月17日, 岩手大学, 盛岡市, 岩手県
- 59) 井上 智. ウイルス: 狂犬病 (犬), シンポジウム I: 身近に存在する人と動物の共通感染症 (Zoonoses within our Living environment). 第3回神戸アニマルケア国際会議 2014 (The 3rd International Conference on Animal Care in Kobe 2014 - For the future of people and other animals). 2014年7月19日, 神戸ポートピアホテル, 神戸市, 兵庫県
- 60) 井上 智. 世界に広がる狂犬病. 第7回世界狂犬病デー (2014 in TOKYO). 2014年9月28日, アリミノホール, 新宿区, 東京都
- 61) 井上 智. 家畜動物における狂犬病: 獣医師の役割. 家畜衛生講習会 (獣疫学特殊講習会). 2014年10月6日, 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所, つくば市, 茨城県
- 62) 井上 智. 我が国における狂犬病対策の現状と課題. 狂犬病の現状と対策: 人と動物の共通感染症を考える. 日本医師会・日本獣医師会 連携シンポジウム. 2014年10月28日, 日本医師会・日本獣医師会, 日比谷公会堂, 東京都
- 63) 井上 智. 台湾の狂犬病について. 平成26

- 年度市町村狂犬病予防担当課長会議及び
狂犬病予防研修会. 2014年10月31日, 京
都府健康福祉部生活衛生課, 京都府福利厚
生センター第3会議室(京都府庁内), 京都
府
- 64) 井上 智. 台湾の狂犬病事例を踏まえた狂
犬病対策と必要な調査研究について. 今, 狂
犬病を考える. 第4回 鹿児島大学共同獣医
学部附属越境性動物疾病制御研究(TDA)セ
ンター市民公開講座. 2014年11月4日, 鹿
児島大学共同獣医学部附属 TAD センター,
鹿児島大学農・獣医共通棟 101 号室, 鹿児
島市, 鹿児島県
- 65) 井上 智. 人と動物の共通感染症としての狂
犬病対策における課題と対応策について.
平成 26 年度福岡県共通感染症対策訓練.
2014年11月26日, 保健医療介護部保健衛
生課, 福岡県獣医畜産会館, 福岡県
- 66) 井上 智. 狂犬病発生の現状と今後の課題,
対策等. 平成 26 年度山口県獣医公衆衛生
講習会. 2014年11月30日, 山口県獣医師
会, 山口市小郡ふれあいセンター, 山口県
- 67) 井上 智. 狂犬病の発生状況について. 九州
地区狂犬病診断研修会. 2014年12月3-5日,
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, 宮崎県
- 68) 井上 智. 地域における危機管理対応につ
いて. 九州地区狂犬病診断研修会. 2014年
12月3-5日, 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, 宮崎県
- 69) 井上 智. 我が国における狂犬病対策の現
状と課題. 平成 26 年度狂犬病予防及び動物
愛護管理研修会. 2014年12月11日, 三重
県健康福祉部食品安全課生活衛生班. 津市,
三重県
- 70) 井上 智. 特別講義: 多様な獣医師の職務.
獣医師と公衆衛生. 2015年1月9日, 東京農
工大学・共同獣医学科, 農学部キャンパス,
東京都
- 71) 井上 智. 狂犬病の現状と対策. 2015年1月
16日, 平成 26 年度 健康科学研究センター
研修会, 保健科学科課, さいたま市, 埼玉県
- 72) Nakagawa K, Ito N, Okada K, Okadera K,
Mitake H, Sugiyama M, Generation and
characterization of L gene-deficient rabies
virus. 17th International Conference on
Emerging Infectious Diseases, Taipei, Taiwan
(2015. 1)
- 73) 動物由来感染症について. 平成 26 年度全国
動物関係事業所協議会関東甲信越静岡プロ
ック会研修会, 千葉, 2014
- 74) 木村昌伸, 宇根有美, 鈴木道雄, 森川茂, 今
岡浩一. 無尾類に由来するブルセラ属菌の
分離と解析. 第 157 回日本獣医学会学術集
会, 札幌, 2014
- 75) 今岡浩一. 身近な愛玩動物から感染する動
物由来感染症について. 平成 26 年度動物由
来感染症研修会(栃木県), 宇都宮, 2014
- 76) 木村昌伸, 宇根有美, 朴ウンシル, 鈴木道雄,
森川茂, 今岡浩一. 無尾類(カエル)に由来
するブルセラ属菌の分離と解析. 第 13 回(爬
虫類・両生類の臨床と病理のための研究会)
ワークショップ, 相模原, 2014
- 77) 佐藤真伍, 武野侍那子, 壁谷英則, 大橋正
孝, 大竹正剛, 丸山総一. わが国の鹿におけ
る Bartonella のベクターの検討. 第 22 回ダニ
と疾患のインターフェイスに関するセミナー,
大分県太宰府館まほろばホール, 2014年7
月6日
- 78) 佐藤真伍, 壁谷英則, 吉野愛香, 関根 涉,
鈴木和男, 東 英生, 櫛引道彦, 山崎翔気,
玉手英利, 丸山総一. わが国の野生ニホン
ザルに分布する Bartonella quintana とその遺
伝的多様性. 第 157 回日本獣医学会学術集
会, 北海道大学, 2014年9月9日
- 79) 新川洋平, 長谷川瑞貴, 永田絵美, Vo Thi
Minh Tam, Nguyen Khanh Thuan, Ly Thi Lien
Khai, 谷口隆秀, 林谷秀樹, 東南アジアおよ
び沖縄県におけるヤモリ由来 *Salmonella*
Weltevreden の分子遺伝子型別. 第 43 回獣
疫学会学術集会, 2015年3月, 東京

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

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

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。そこで本研究では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するために、生息しているマダニからのウイルスの分離を試みた。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。これらの成績から、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、今後は流行株の病原性等の生物性状を調べることで、疫学的危険度を評価していくことが重要であると考えられる。

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性がある。

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。

そこで本研究では、モンゴルにおけるTBEの疫学的危険度を評価するために、生息しているマダニからの流行TBEVの分離及び、その性状解析を試みた。

B. 研究方法

1) マダニの捕集及びウイルス分離

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(図1)。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砕し、破砕液の上清を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、抗ダニ媒介性フラビウイルス特異的抗体を用いた細胞内における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。

2) 分離ウイルスの遺伝子解析

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(forward: 5'-GGTYATGGARGTYRCRTTCTCTCG-3', reverse: 5'-TCCCAGGCGTYTCTCCKATCACTGT-3')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。

C. 研究結果

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(図2)。

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(図3)。また分離株はシベリア型内の同一のサブクラスター内に属しており、以前モンゴルで分離されたMucAr M14/10株とは異なるサブクラスターに分類されることが明らかになった。

またMGL-Selenge-13株のE蛋白領域について、MucAr M14/10株、同じくモンゴルで遺伝子のみが検出されているM92株、及びロシア・イルクーツクで分離されたIR99 2f7株との配列を比較した所、塩基配列では92M株とは96%、MucAr M14/10株及びIR99 2f7株とは94%の相同性があり、アミノ酸配列では全ての株で99%の相同性が認められた(表1)。

D. 考察

研究結果より、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。ヒトのTBE報告は特に本県で多いことから、同地域でのTBEの原因ウイルスはこれらシベリア型TBEVによるものと考えられる。同地域は多数のシベリア型TBEが報告されているロシアとの近接地域であり、鉄道などの交通手段を通じてロシアから侵入してきているものと考えられる。

またシベリア型 TBEV は遺伝子 RNA の配列からさらに 2 つのサブクラスターに分類される。今回分離された 9 つの MGL-Selenge-13 株は、一つのサブクラスターの属しており、以前モンゴルで分離された MucAr M14/10 株とは異なるサブクラスターに属していた。ロシアのシベリア地方においても、同一の TBE 流行地域において 2 つのサブクラスターのシベリア型 TBEV が分離されていることから、これらの 2 つのサブクラスターの TBEV はそれぞれ独立してモンゴルに侵入している可能性を示している。

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 を生息しているマダニから分離した。今後は分離した TBEV の病原性等の解析を行うとともに、さらに同国における疫学調査を進めることによって流行ウイルスの疫学的危険度を評価していく予定である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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

- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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

2. 学会発表

- 1) 好井健太郎, 鶴田征太郎, 境瑞紀, 苅和宏明. ダニ媒介性フラビウイルスのインターフェロンアンタゴニスト作用の解析. 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 山口県山口市. (2014, 5).
- 2) 下田宙, 米満研三, 早坂大輔, 好井健太郎, 寺田豊, 野口慧多, 鎌田龍星, 高野愛, 前田健. 山口県の野生動物およびダニからフラビウイルスの検出. 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 山口県山口市. (2014, 5).

- 3) 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. International Union of Microbiological Societies 2014. Montreal, Canada. (2014, 7).
- 4) 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. International Union of Microbiological Societies 2014. Montreal, Canada. (2014, 7).
- 5) Sakai, M., Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Hirano, M., Kariwa, H.: Variable region of the 3' UTR is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. International Union of Microbiological Societies 2014. Montreal, Canada. (2014, 7).
- 6) Kariwa, H., Maki, M., Seto, T., Sanada, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K.: Passage of Hantaan virus strain AA57 in Vero E6 cells affects pathogenicity in mice. International Union of Microbiological Societies 2014. Montreal, Canada. (2014, 7).
- 7) Nakao, R., Kajihara, M., Matsuno, K., Qiu, Y., Mori, A., Nao, N., Yoshii, K., Kariwa, H., Sawa, H., Sugimoto, C., Takada, A., Ebihara, H.: Detection and isolation of novel phleboviruses from ticks in Japan. the 12th Biennial Conference of the Society for Tropical Veterinary Medicine and the VIII International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens. Cape Town, South Africa. (2014, 8).
- 8) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 平野港, 苅和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの高病原化に関わる 3'非翻訳領域 variable region の役割. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
- 9) 武藤芽未, Boldbaatar, B., 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 157 回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
- 10) 下田宙, 米満研三, 早坂大輔, 好井健太郎, 寺田豊, 野口慧多, 鎌田龍星, 高野愛, 前田健. 国内の野生動物およびダニから新規フラビウイルスの検出. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
- 11) 岩崎里菜, 真田崇弘, 好井健太郎, 苅和宏明. Hokkaido ウイルスと Puumala ウイルスの遺伝子再集合体の作出とその性状解析. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
- 12) 中尾亮, 梶原将大, 邱永晋, 森垂紀奈, 直亨則, 村松美笑子, 好井健太郎, 苅和宏明, 澤洋文, 杉本千尋, 高田礼人. 北海道産マダニからの新規フレボウイルスの検出. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
- 13) 池端真帆, 好井健太郎, 境瑞紀, 平野港, 苅和宏明. レポーター遺伝子発現ダニ媒介性脳炎ウイルスの作製と性状解析. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 北海道札幌市. (2014, 9).
- 14) 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. The 2nd Sapporo Summer Seminar for One Health. Sapporo, Hokkaido. (2014, 9).
- 15) Muto, M., Bazartseren, B., Yoshii, K., Kariwa, H.: Isolation and characterization of tick-borne encephalitis virus from Mongolia. The 2nd Sapporo Summer Seminar for One Health. Sapporo, Hokkaido. (2014, 9).
- 16) 好井健太郎. フラビウイルス粒子形成・分泌に関する宿主因子の検索および機能解析. 第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 17) 平野港. ダニ媒介性脳炎ウイルスの神経細胞内特異的な複製機構の解析. 第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 18) 武藤芽未, Boldbaatar, B., 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 62 回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 19) 岡本奈津実, 好井健太郎, 中尾亮, Hofstetter, R. K., 藪智子, 益本大輝, 染谷梓, 前田秋彦. Thogoto virus 様ウイルスのダニからの分離. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 20) 池端真帆, 好井健太郎, 境瑞紀, 平野港, 苅和宏明. レポーター遺伝子発現ダニ媒介性脳炎ウイルスの作製と性状解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 21) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 平野港, 苅和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの高病原化に関わる 3'非翻訳領域 variable region の役割. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 22) 岩崎里菜, 真田崇弘, 好井健太郎, 苅和宏明. Hokkaido ウイルスと Puumala ウイルスの遺伝子再集合体の作出とその性状解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川県横浜市. (2014, 11).
- 23) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 第 48 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
- 24) 好井健太郎, 寸田祐嗣, 五十嵐学, 横澤香菜, 境瑞紀, 苅和宏明, Holbrook, M. R., 高島郁夫. ダニ媒介性フラビウイルスによる中枢神経系病態に関わるウイルス因子の同定. 第 48 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
- 25) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 苅和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定. 第 48 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
- 26) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 日本ウイルス学会北海道支部第 47 回夏季シンポジウム. 北海道奈井江町. (2013, 7).
- 27) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市.

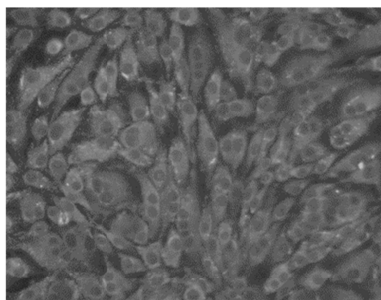
- (2013, 9).
- 28) 牧雅大, 真田崇弘, 瀬戸隆弘, 永田典代, 好井健太郎, 苅和宏明. Hantaan ウイルス AA57 株感染マウスにおける病態発現機序の解析. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
- 29) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 苅和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
- 30) 好井健太郎, 寸田祐嗣, 五十嵐学, 横澤香菜, 境瑞紀, 苅和宏明, Holbrook, M. R., 高島郁夫. ダニ媒介性フラビウイルスによる中枢神経系病態における NS5 蛋白の影響の解析. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
- 31) 下田宙, 早坂大輔, 好井健太郎, 米満研三, 寺田豊, 野口慧多, 鎌田龍星, 高野愛, 前田健. 山口県のイノシシからダニ媒介性脳炎ウイルス様遺伝子の検出. 第 20 回 トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会. 兵庫県神戸市. (2013, 11)
- 32) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウイルスの増殖機構の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 33) 牧雅大, 真田崇弘, 瀬戸隆弘, 永田典代, 好井健太郎, 苅和宏明. Hantaan ウイルス AA57 株感染マウスにおける病態発現機序の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 34) 好井健太郎, 寸田祐嗣, 五十嵐学, 横澤香菜, 境瑞紀, 苅和宏明, Holbrook, M. R., 高島郁夫. ダニ媒介性フラビウイルスによる中枢神経系病態に関わるウイルス因子の同定. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 35) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 苅和宏明. 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 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

図1. モンゴルにおける調査地域



図2. マダニ乳剤接種細胞からの TBEV 特異的抗原の検出 (A) 及び特異的遺伝子の増幅 (C)。
B は陰性対象

A



B

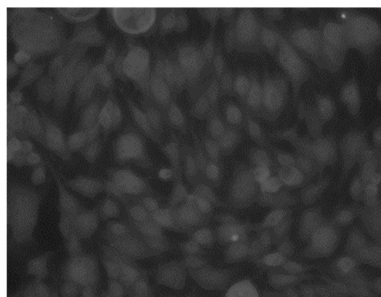


図3. 分離TBEVのE蛋白領域遺伝子を元にした系統樹解析

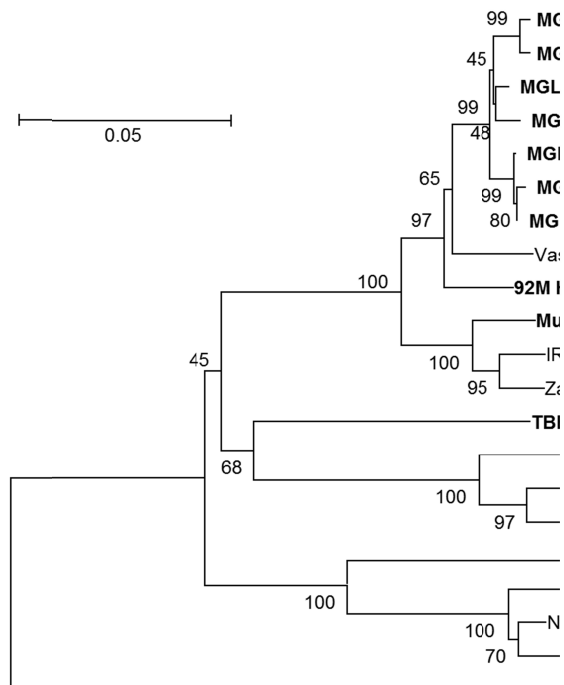


表1. E蛋白領域の遺伝子及びアミノ酸配列の比較

Nucleotide	Amino acid					
	MGL-Selenge-13-12	MGL-Selenge-13-12	MucAr M14/10	92M	IR99 2f7	
MGL-Selenge-13-12		99.2% (492/496 aa)	99.2% (492/496 aa)	98.8% (493/496aa)	99.0% (491/496 aa)	
MGL-Selenge-13-12	98.2% (1462/1488 bp)		99.2% (492/496 aa)	99.0% (491/496 aa)	99.0% (491/496 aa)	
MucAr M14/10	94.6% (1407/1488 bp)	93.9% (1397/1488 bp)		99.6% (494/496aa)	99.8% (495/496aa)	
92M	96.2% (1431/1488bp)	96.2% (1432/1488bp)	94.6% (1407/1488bp)		99.3% (493/496aa)	
IR99 2f7	94.2% (1401/1488 bp)	93.8% (1395/1488 bp)	97.0% (1439/1488bp)	94.6% (1407/1488bp)		

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

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。本年度は、国内のマダニから新規に分離されたブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される HSK ウイルス（仮名）について、Real-time RT-PCR によるウイルス遺伝子検出系を確立した。本検出系は M セグメントの 211b.p. をターゲットとし、 10^2 copy 以上の感度で検出可能であった。また、確立した本法により、ベトナムで採集されたマダニから HSK virus 遺伝子検出を試みたところ、これまでに陽性例は検出されていない。この新規ウイルスについては、ヒトや動物への病原性は未知であるが、マウスや培養細胞に感染性を示すことから実際に感染例が存在する可能性がある。今後、今回確立された遺伝子検出系を用いて、国内およびインドシナ地域におけるマダニ、動物およびヒト血清を用いた調査を行う予定である。

A. 研究目的

マダニ媒介性ウイルスには、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、人や動物の重篤な感染症の原因となるウイルスが知られている。

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、西日本各地で SFTS 患者が報告され、患者や動物に吸着していたマダニから SFTS ウイルス (SFTSV) が分離され、さらに、全国的な地域で植生上から採集されたマダニから SFTSV 遺伝子検出の報告が

されている。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。

さらに、最近世界各地で新しいマダニ由来ウイルス (ブニヤウイルス科、フラビウイルス科やレオウイルス科に分類) が報告されている。我々は、国内 (徳島県、長崎県) で採集されたマダニから、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される新規のウイルス HSK ウイルス (仮名、HSKV) を分離した。このウイルスは、マウスや培養細胞への感染実験により、哺乳動物やヒトへの感染の可能性が考えられる。

そこで本研究では、国内および周辺諸国における HSKV 分布状況を把握するために、ウイルス遺伝子検出法の確立、およびマダニからのウイルス遺伝子検出を目的とした。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) 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、HSKV M セグメント 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) 2013 - 2014 年にベトナム (カッタバ島) で採集したクリロコイタマダニ 33 匹、オウシマダニ 19 匹から抽出した RNA を用いて、リアルタイム RT-PCR による HSKV 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) HSKV セグメント特異的 Real-time RT-PCR により、 10^2 RNA copies 以上の SFTSV RNA 遺伝子の検出が可能であった (図 1)。

2) ベトナムにおいて採集されたマダニからは HSKV 遺伝子は検出されなかった。

D. 考察

1) HSKV 遺伝子を特異的に検出できる Real-time PCR 法を確立した。我々はこれまで

に、TBEV 遺伝子および SFTSV を特異的に検出できる Real-time RT-PCR 法も確立している。また、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属の数株を検出可能な共通プライマーを用いた RT-PCR 系も確立している。今後、これらの遺伝子検出系を用いて、日本を含む東・東南アジア周辺国においてマダニ媒介性ウイルス遺伝子検出調査を行う予定である。

また、HSKV のヒトや動物への病原性は未知であるが、HSKV はヒトを含む哺乳動物由来培養細胞に感染性を示し、マウス (IFNAR KO) に致死性を示すことから、実際に感染例が存在する可能性がある。今回確立した遺伝子検出系により、感染マウス臓器から定量的にウイルス遺伝子検出ができることを確認しており、この方法には迅速診断系としても有用である。今後、動物およびヒト血清を用いた遺伝子検出調査も行う予定である。

E. 結論

本研究成果に新規ブニヤウイルス HSKV 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。今後、国内・インドシナ地域を含む周辺諸国に分布するマダニを用いて HSKV 遺伝子検出調査を行う予定である。

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2) 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.

2.学会発表

- 1) Mya Myat Ngwe Tun, 青木康太郎、千馬正敬、森田公一、早坂大輔：ダニ媒介性脳炎ウイルス感染における TNF- α 、IL-10 および IL-2 応答の役割：第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、山口（2014, 5）
- 2) 早坂大輔：SFTS ウイルスについてこれまでわかったこと：第 22 回 Seminar on Acari-Disease Interface、太宰府（2014, 7）
- 3) 黒崎陽平、中前小百合、早坂大輔、安田二郎：新規ナイロウイルス遺伝子検出法の開発：第 51 回ウイルス学会九州支部総会、鹿児島（2014, 9）
- 4) 早坂大輔、嶋田聡、Guillermo Posadas Herrera、森田公一：重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス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 51 回ウイルス学会九州支部総会、鹿児島（2014, 9）
- 5) 早坂大輔、嶋田聡、青木康太郎、森田公一：

重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス遺伝子検出法の確立と長崎県における媒介マダニ調査：第 157 回日本獣医学会学術集会、札幌（2014,9）

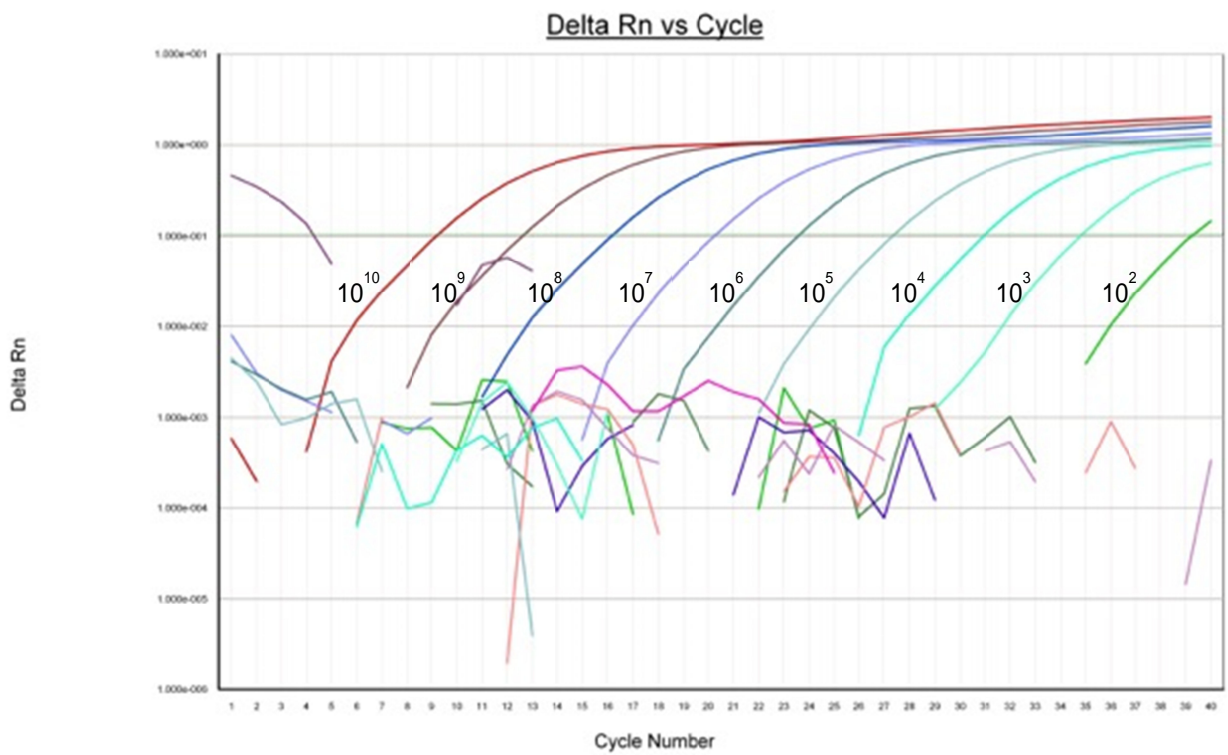
- 6) Mya Myat Ngwe Tun, Kotaro Aoki, Masachika Senba, Corazon C. Buerano, Kenji Shirai, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita and Daisuke Hayasaka : TNF- α and IL-10 reduce the incidence of mortality in mice infected with Tick-borne encephalitis virus : The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Nara (2014, 9)
- 7) 早坂大輔、余福勲、吉川亮、嶋田聡、Guillermo Posadas Herrera、Mya Myat Ngwe Tun, 吾郷昌信、森田公一：長崎県における野生動物およびマダニの SFTS ウイルス感染状況の調査：第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜（2014, 11）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図 1 real-time RT-PCR を用いた HSKV M セグメント遺伝子検出



厚生科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

近隣地域からの侵入が危惧される我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迅速に診断することを目的とした。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 を検討した。

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 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 および SEOV および 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いている。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ある。またトガリネズミ目のハンタウイルスに関しては近隣諸国からの報告が相次いでおり、病原性との関連も含め今後も監視を進める必要がある。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 を検

出試薬として ICG の検討を進めた。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。ラット類についての ICG の開発は抗ラット IgG 抗体を検出試薬としてすでに報告している。今年度はラット類以外を対照とする検出系の確立を目的として ICG の検討を進めた、

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 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)の N 末端部位 103 アミノ酸を抗原として選択し大腸菌ベクターを用いて作成した。さらに、それぞれの宿主の免疫グロブリンを検出するために、Protein A を用いた最適なストリップを作成することを試みた。

Protein A は 3 社からサンプルをとりよせ比較検討した。また、金コロイド標識 (Winered chemical 社)、パラジウムコロイド標識(Winered chemical 社)を検討した。PUUV をマウスに接種した実験感染抗血清あるいは北海道のハンタウイルス自然感染を用いて ICG ストリップの作成と評価を行った。

C. 研究結果

1.ヨーロッパ、アジアでは SEOV、HTNV 等のネズミ亜科野げっ歯類およびハタネズミ亜科の

げっ歯類の媒介する PUUV とその近縁ウイルスが存在するため、これらのウイルスに対する抗体を検出することが必要である。しかしながら、これらのウイルスの宿主の IgG はそれぞれ抗原性が異なり、一種類の試薬で検出することができない。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。Protein A (EY laboratories)を金コロイド標識またはパラジウムコロイド標識の結合 pH を検討した結果、pH 7.0 – 9.0 の範囲で結合が確認された。

これらの ICG は、実験感染血清を用いて評価した。PUUV 実験感染ハタネズミおよびマウス血清各 2 例は、PUUV 抗原のみに反応した。一方、非感染ハタネズミおよびマウス血清ではいずれの場合もラインは観察されなかった。両コロイド間で結果に差はなかったが、パラジウムコロイドの方が結果のコントラストが強ややいため観察しやすい傾向が認められた。今回はこれまでの実績から金コロイドを使用して以下の実験を進めた。次に北海道で捕獲された野鼠であるエゾヤチネズミの血清 30 例で本 ICG を評価した。これらはすでに PUUV 類似ウイルスに対する陽性、陰性が診断されている血清である。本研究で試作した ICG ストリップで試験した結果、陽性と陰性を正しく判定することが可能であった。

条件検討の過程でヒトの血清との反応も確認した。Protein A は上記照応物以外にもウサギ、ヒトの IgG と強く結合することが知られている。その結果、一部のヒト血清で非特異反応が認

められた。標識用金コロイドのロットを複数準備し、非特異反応の出た血清を検査したところ、一部の金コロイドのロット不良が原因であることが明らかとなった。このような不良ロットを迅速に見分けることも必要であることが明らかとなった。

D. 考察

昨年度までは Multiplex ICG をヒト患者血清を用いて検討することにより、抗原側の多様性に対処することが可能となった。今年度は Protein A を用いることによって、宿主側の多様性に対応することが可能となった。Protein A の適用範囲の動物としては、ヤチネズミ、ハタネズミ、小型のトガリネズミ類である Sorex 属の動物、南方に棲息する住家性の Suncus murinus に有効であることが確認されている。Sorex 属に属するトガリネズミは世界各地でハンタウイルスを保有しており、このウイルスのヒトへの病原性は明らかでないものの、これらの新規ハンタウイルスの病原性について監視を続けることが必要である。本研究では Protein A を用いて上記の範囲の小動物を簡便にモニタリングすることが可能となった。今回は検証のため PUUV 抗原のみを用いたが、今後は対象を考慮した Multiplex 抗原と種々の検出試薬の組み合わせの検討が必要となる。また Sorex 属の動物が保有する Seewis ウイルス抗原の準備も今後必要となると考えられる。

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。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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.

2. 学会発表

該当なし

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(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

分担者研究報告書

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

近隣地域からの侵入が危惧される感染症の病理学的検索

—抗ハンタウイルス抗体の免疫組織化学法における有用性の検討—

分担研究者:永田典代(国立感染症研究所 感染病理部第二室 室長)

研究要旨: 昨年度に引き続き、Saasa らが作出したハンタウイルスのヌクレオカプシドタンパクに対するモノクローナル抗体 (Saasa *et al.*, 2012) と1つの市販抗体のパラフィン包埋組織切片を用いた免疫組織化学法における有用性を検討した。今年度は、鑑別診断に必要な、同科の SFTS ウイルス、重症肺炎を引き起こす SARS コロナウイルスとの交差反応性を検索した。その結果、いずれの抗体も二つのウイルスに対して交差反応性はなく、特異的にパラフィン包埋組織上のハンタウイルス抗原の検出が可能なが判明した。

A. 研究目的

ブニヤウイルス科ハンタウイルス属は急性呼吸器感染症のハンタウイルス肺症候群あるいは熱性・腎性疾患の腎症候性出血熱を引き起こす。これらはいずれも4類感染症に分類され、診断が確定した場合には、感染症法に基づき直ちに届出を行わなければならない。感染症死亡例が発生した場合には、病理解剖で得られる組織における病原体の検出によって病理学的診断が可能となる。本研究では、ハンタウイルス感染症の病理学的診断系の確立を目的とする。昨年度は、パラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学法に有用な抗ハンタウイルス抗体を選択した。今年度は、これらの抗体の本法における特異性を検討する。

B. 研究方法

1) 抗ハンタウイルス抗体

いずれもハンタウイルスのヌクレオカプシドタンパクに対する抗体で、Saasa らが作出し、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なが判明した3種類のモノクローナル抗体(マウス腹水由来の精製 IgG1あるいはIgG2a)(Saasa *et al.*, *Virology* 2012 428:48–57, 昨年度報告書)と1つの市販モノクローナル抗体 A1C5、対照として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を用いた。

2) ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本

本研究には、すでに作出してあった次の10%ホルマリン緩衝液固定パラフィン包埋切片を使用した;病理番号090641、プーマラウイルス感染ハムスター肺組織 (Sanada T *et al.*, *Virus Res.* 2011.

160:108-119) ; 病理番号070370-71、SARSコロナウイルス感染マウス組織、病理番号130832-33、SFTSウイルス感染マウス組織。

3) 免疫組織化学法

ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を脱パラフィン後、ポリマー法による免疫組織化学により抗ハンタウイルス抗体の有用性を評価した。一次抗体として用いた抗ハンタウイルスモノクローナルあるいはポリクローナル抗体(荻和代表研究者より分与)は表に示した。抗原賦活化のために、抗原賦活化剤(pH6.0)(ニチレイ マウスステインキット)中で121 20分オートクレーブ処理を行った。また、過酸化水素水・メタノールによる内因性ペルオキシダーゼの阻止を室温30分で行った。1次抗体(1 µg/mlに調整)の反応は4 で一晩インキュベートとした。その後、マウスステインキット(ニチレイ)を用いてプロトコール通り免疫染色を実施し、ペルオキシダーゼ発色基質としてジアミノベンジジン、核染色にはマイヤーのヘマトキシリンを使用した。

C. 研究結果

ホルマリン固定パラフィン包埋で作製したSFTSウイルスおよびSARSコロナウイルス感染動物組織標本を用いて検索した結果、今回用いた5つの抗体の免疫組織化学法ではいずれも抗原陰性であった。表に、昨年度と今年度の研究結果をまとめた。

D. 考察

昨年度は、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ウイルス感染動物組織標本を用いて検索した結果、いくつかの抗体は、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。今年度は、鑑別診断が必要である同じブニヤウイルス科に属するSFTSウイルスと、急性呼吸器感染症の原因となるSARSコロナウイルス等との交差反応の有無を評価した。その結果、これらの抗ハンタウイルス抗体には交差反応性は示さず、これらの抗体は、パラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学法においてもハンタウイルスを特異的に検出することが確認された。

E. 結論

Saasa らが作出した3つの抗ハンタウイルス抗体はホルマリン固定パラフィン組織切片を用いた免疫組織化学法においてハンタウイルスとプーマウイルス抗原を特異的に検出することが可能である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

表 免疫組織化学法による抗体の有用性の検討結果

整理 番号	動物 種	一次抗体	使用標本				
			ハムスター 正常組織	ハムスタ - Puumala virus 感染	マウス Hantaan virus 感染	マウス SFTS ウイ ルス感染	マウス SARS コロ ナウイルス 感染
1	マウス	E5/G6	-	+	+	-	-
2	マウス	A1C5 (市販 抗体)	-	+	-	-	-
3	マウス	G884	-	-	-	NE	NE
4	マウス	7E6	-	+	+	-	-
5	マウス	2F11	*	*	*	NE	NE
6	マウス	10G5	-	-	-	NE	NE
7	マウス	9E5	-	-	-	NE	NE
8	マウス	2H10	-	+	+	-	-
9	ウサギ	NP700	*	*	*	-/*	-/*

*抗原は検出可能だが、非特異反応が強く、判定が困難な場合がある。-*好中球、細気管支上皮の核が非特異的に陽性所見を示した。NE, 未実施

厚生科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

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

クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの3分節遺伝子の全塩基配列に基づく分子疫学

研究分担者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・部長
研究協力者	須田遊人	国立感染症研究所ウイルス第一部・協力研究員
	谷英樹	国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
	福士秀悦	国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
	下島昌幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・第一室長
	唐青	中国 CDC・教授

研究要旨

クリミア・コンゴ出血熱(CCHF)ウイルス(CCHFV)は3分節の一本鎖RNA(S-, M-, L-遺伝子)を有し,それぞれ核蛋白質,膜蛋白質, RNAポリメラーゼを発現する.今年度は,私たちが決定した遺伝子情報を含めて最新のデータをもとに,これらの遺伝子の塩基配列が決定されているCCHFV株の塩基配列に基づく分子疫学(系統樹解析)を明らかにした.S-遺伝子に基づく解析によると,中国株はほぼ1つのクラスターを形成するのに対して,M-遺伝子による解析では中国株はその他の地域で分離されるウイルスと同じクラスターを形成し,地域特異性は認められなかった.ただし,S-遺伝子による解析により,解析に供した61株中1株はオマーンで分離された株と同じクラスターを形成した.また,L-遺伝子の塩基配列に基づく解析によると,CCHFV中国株は中近東で分離されたウイルス,タジキスタンとパキスタンで分離されたウイルス,そして,オマーンで分離されたウイルスと同じクラスターを形成するものがあり,M-遺伝子による解析結果と同様,地域特異性はなかった.CCHFは日本では流行していないが,輸入感染症として発生する危険性がある.特に中国西部では毎年流行が確認されている.本研究によりCCHFVの分子疫学の最新情報が明らかにされた.

A. 研究目的

クリミア・コンゴ出血熱
(Crimean-Congo hemorrhagic fever,
CCHF)はCCHFウイルス(CCHFV)
による感染症で,アフリカ~中東~口

シア・中国西部(新疆ウイグル自治区)
を含むアジアに幅広く発生が認められ
る.CCHFVは3分節の陰性側鎖の一
本鎖RNA(S-, M-, L-遺伝子)を有す
る.S-, M-, L-遺伝子は,それぞれ核蛋

白質，膜蛋白質，RNA ポリメラーゼを発現する．現在日本においてこの感染症の発生は認められていないが，発生の危険度を予測する方法として国内や近隣国における CCHF の発生状況を監視するとともに，もし日本で CCHF 患者が発生した場合に備えて，近隣国の CCHFV 分離株を含む CCHFV の分子疫学を明らかにすることが重要である．

本研究では，これまで私たちが決定した中国株の CCHFV の遺伝子の塩基配列および National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) に CCHFV の遺伝子塩基配列が決定されているが登録されているウイルスの情報（最新情報）に基づいて，世界各地で分離されている CCHFV の分子疫学を明らかにした．

B．研究方法

- 1) CCHFV の各遺伝子の塩基配列の入手．CCHFV の各遺伝子の全塩基配列が登録されている CCHFV の情報（分離された国・地域）およびその塩基配列を NCBI より入手した．S-遺伝子については 89 株，M-遺伝子については 39 株，そして，L-遺伝子については 28 株の情報を得た．尚，CCHFV 中国株の一部の塩基配列は私たちが決定し，NCBI に登録したものである．
- 2) 系統樹解析．入手した遺伝子塩基配列をもとに，DNA Data Bank of Japan (DDBJ) が提供する ClustalW を用いて系統樹解析を実施した．

(倫理面への配慮)

該当しない．

C．研究結果

- 1) S-遺伝子塩基配列による系統樹解析
89 株中 39 株が CCHFV 中国分離株または患者等から増幅された CCHFV の S-遺伝子である．39 株中 1 株の除く 38 株は 1 つのクラスターを形成している．中国分離株のほとんどは，S-遺伝子塩基配列に基づく解析により，同一のクラスターを形成することが明らかになった（図 1）．ただし，中国新疆ウイグル自治区に分布する CCHFV の中には，オマーン，イラン，パキスタンで分離されたウイルスと同一のクラスターを形成する CCHFV (Fub90009) が存在した．
- 2) M-遺伝子塩基配列による系統樹解析
M-遺伝子塩基配列による解析によると，中国株は世界各地（中近東，東南アジア，アフリカ）で分離される CCHFV と同じクラスターを形成するウイルスが混在している．地域特異性が認められないことが明らかとなった（図 2）．
- 3) L-遺伝子塩基配列による系統樹解析
L-遺伝子塩基配列による解析によると，L-遺伝子は 3 つの遺伝子型に分類され，中国株はそのうちの 2 つの遺伝子型に分類されることが明らかにされた．タジキスタン (TADJ/HU8966) で分離された株と同一クラスターを形成するものと，オマーン (Oman) およびパキスタン (Matin) での分離株と同一クラスターを形成するもの

とがある(図3)。

D. 考察

これまで私たちは中国新疆ウイグル自治区で発生した CCHF 患者や患者発生地域のマダニから増幅された CCHFV 遺伝子を増幅し、その情報を基に分子疫学を明らかにしてきた。特に S-遺伝子の塩基配列情報が蓄積されつつある。今回、NCBI に登録されている CCHFV の 3 分節の塩基配列を基に系統樹解析を実施した。

最近、CCHF の流行はアジアにおいては、中国新疆ウイグル自治区(ただし、2002 年以降の流行状況の発表はない)、パキスタンで流行が報告され、特記すべきこととして、インドでも患者発生(CCHF 流行)が報告されている。今回の研究成績は、CCHF 患者の CCHFV 感染地域を特定するためには、S-遺伝子の塩基配列には地域特異性があることからそれを用いるとよいことが明らかにされた。

S-遺伝子には地域特異性があり、M-遺伝子にはそれがない。この違いの背景と CCHFV の詳細な進化の過程を、動物やマダニと CCHFV の関連の中で明らかにされることが求められる。

E. 結論

CCHFV 中国分離株に焦点をあてて、CCHFV の 3 分節塩基配列をもとに分子

疫学を明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 須田遊人, 谷英樹, 西條政幸, 堀本泰介, 下島昌幸. シュードタイプウイルスを利用したクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの株間での中和反応の比較. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 2014 年 9 月, 札幌

2) 須田遊人, 谷英樹, 西條政幸, 堀本泰介, 下島昌幸. クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの株間でのシュードタイプウイルスを利用した抗体への反応性の比較. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜

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

S 330-529 (complete sequence)



図 1 . CCHFV の S -遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析 .

M 3962-4385 (complete sequence)

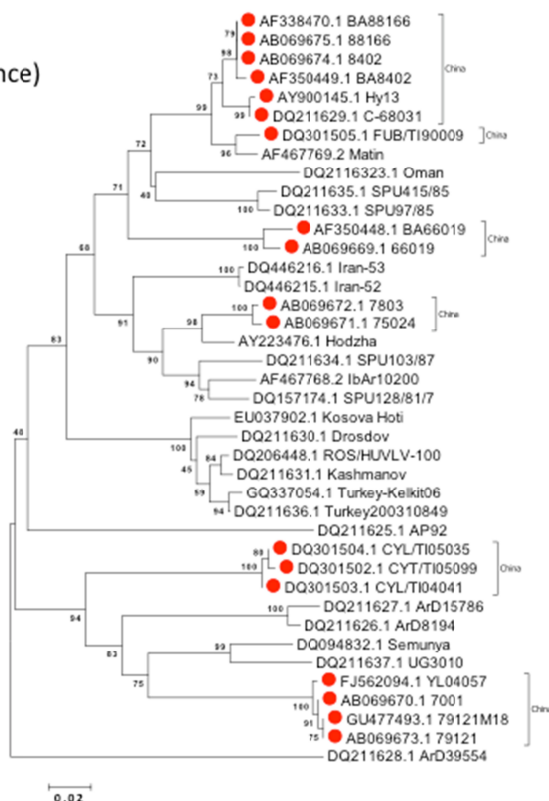


図 2 . CCHFV の M-遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析 .

L orf

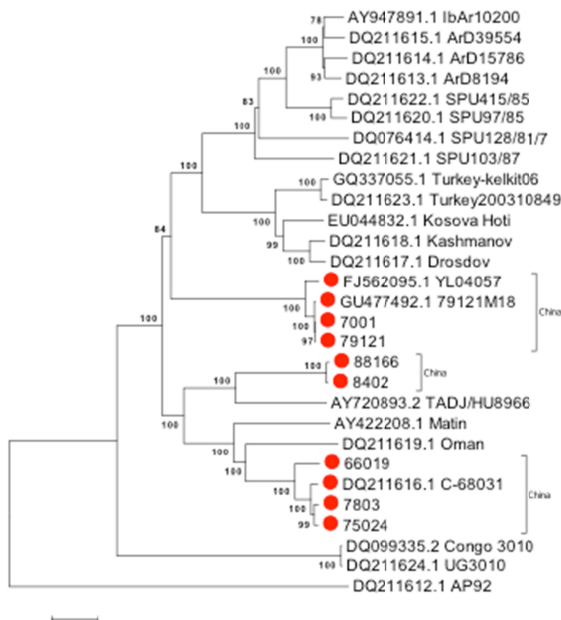


図 3 . CCHFV の L-遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析 .

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

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

（ H 2 5 -新興-一般- 0 0 7 ）

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 河合久仁子

宮城教育大学環境教育実践研究センター

押田龍夫

帯広畜産大学・野生動物学研究室

八木欣平

北海道立衛生研究所・感染症部

森嶋康之

国立感染症研究所・寄生動物部

野口 章

国立感染症研究所・獣医科学部

研究要旨：本研究は、ユーラシア大陸を中心とした動物の狂犬病（リッサウイルス感染症を含む）等について疫学に関する情報の収集、調査、流行様式の解明、新規検出法開発等を行うことによって、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が目的である。狂犬病発生リスクが高く野生動物での流行拡大が見られる地域が極東にあるというロシアの専門家による情報を考慮すると、国後島に生息する狂犬病に感受性の高い動物について狂犬病の調査を行うことが必要と考えられた。そこで、国後島の野生動物生息状況と公衆衛生に係る地域住民の意識調査等を行うとともに、海域を越えて国後島から北海道に狂犬病等の動物由来感染症が侵入する可能性についても調べた。国後島では動物由来感染症の実態調査はこれまでに行われておらず、ヒトおよび動物での発生状況等について正確な情報が無いことが明らかとなった。また、国後島と知床半島のモモジロコウモリが両地域を行き来している可能性が示唆されて、国後島から海域を越えて狂犬病等のコウモリ由来動物由来感染症が北海道に侵入する可能性があり、本調査を継続することによって発生予測・被害推計などが可能になると考えられた。

A. 研究目的

本研究は、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)等について疫学に関する情報の収集、

調査、流行様式の解明、新規検出法開発等を行うことによって、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が目的である。

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おり、アジア、アフリカを中心に年間で少なくとも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狂犬病ウイルス(ラブドウイルス科リッサウイルス属)を原因とするウイルス性動物由来感染症である。

わが国では、1970年と2006年に経験したヒトの輸入狂犬病3症例を除くと、50年以上に渡って国内に生息している動物で狂犬病の報告はない。しかしながら、近年、シベリアに生息しているコウモリから新種のリッサウイルスが発見されて、北海道に生息しているコウモリのウイルス保有状況について関心が高まっている。また、狂犬病発生リスクが高く野生動物での流行拡大が見られる地域が極東にあるというロシアの専門家による情報を考慮すると、国後島に生息する狂犬病に感受性の高い動物について狂犬病の調査を行うことが必要と考えられた。

そこで、「平成26年度北方領土訪問：国後島リス類・中小哺乳類調査専門家交流(日露隣接地域生態系保全協力プログラム)」に同行して、国後島の野生動物生息状況と公衆衛生に係る地域住民の意識調査等を行い、国後島から海域を越えて狂犬病等の動物由来感染症が北海道に侵入する可能性について調べた。

B. 研究方法

「平成26年度北方領土訪問：国後島リス類・中小哺乳類調査専門家交流(日露隣接地域生態系保全協力プログラム)」に同行し、日本およびロシアの野生動物専門家の協力を得て国後島における現地調査と住民の意識調査等を行った。

訪問計画の概要(参考資料1)

- ・訪問期間：平成26年7月24日-28日
- ・訪問団：7名(専門家4名と同行者3名)
- ・交通手段：四島交流等事業使用船舶「えとぴりか」北方領土問題対策協会の主催する四島交流事業船舶に同乗。
- ・旅行経路：根室港 - 国後島(古釜布) - 根室港
- ・宿泊地：友好の家

参考資料1：訪問計画書。

専門家レクチャーによる情報交換

- ・7月25日 16:00-19:00
野生動物と人間のかかわりかたを考える
- 1) 滑空する動物の進化
帯広畜産大学・押田龍夫
- 2) 北海道、国後島、択捉島のコウモリの話
宮城教育大学・河合久仁子(資料2A)
- 3) 狂犬病 Rabies
国立感染研究所・井上智(資料2B)
- 4) エキノコックス症 Echinococcosis
国立感染研究所・井上智(資料2C)

資料2A、2B、2C：レクチャーに使用した

スライド。

国後島住民の生活行動・習慣調査

・専門家レクチャー後に参加住民への意識調査を行った。

平成 25 年に行われた専門家交流で国後島における動物由来感染症(エキノコックスと狂犬病)が話題となり、本調査でアンケート調査を行うことになった。

押田専門家交流訪問団団長と事前に打ち合わせを行い、昨年度の交流において関心の高かったエキノコックス症の感染源動物である犬とキツネについて公衆衛生的な視点でアンケート調査を行うこととした。他の動物由来感染症に対する予防策も念頭に置いて、住民と感染源動物との関係性をとらえる調査票を作成した。

エキノコックス症の衛生対策と予防法等については、北海道衛生研究所の八木先生と国立感染症研究所の森嶋先生を研究協力者に加えて行った。

・参考資料 3A：日本語調査票

・参考資料 3B：ロシア語訳調査票

ロシアの野生動物専門家との情報交換

・7月27日(日)18:00

参加者：

大泰司、押田、井上、河合、

ボイコ・ピクトル、アンチーピン・マクシム、

ネベドムスカヤ・イリーナエコツアーリズム

アンケート調査の成績を取りまとめて報告と情報共有も行った(参考資料4)。

C. 研究結果

国後島の生態系に関する概要

非特定営利活動法人北の海の動物センターが、日露隣接地域生態系保全協力プログラムによる北方四島生態系関係共同調査を進めており、その調査成果を「オホーツクの生態系とその保全(櫻井泰憲・大島慶一郎・大泰司紀之編著)(2013年)」に報告している。特筆すべきは、2010年の調査で新たにコウモリ類が2種記録され、国後島に計10種が分布し、同島と知床半島をモモジロコウモリが行き来している示唆である(参考資料5)。

ニキシヨロ海蝕洞のコウモリ類調査

昨年度、極東に分布するコウモリ類が北海道にまで分布域を広げた可能性が指摘され、北海道に生息するモモジロコウモリ(*Myotis macrodactylus*)についてウイルス由来遺伝子の探索を行った。

本年度、国後島で生息が確認されて継続調査が行われているモモジロコウモリについて、北海道に生息するコウモリとの生態学的な関係性を個体認識表等で確認する予定であったが、天候等により予定していた洞窟調査が不可能となったため、長期滞在しているロシアの専

門家に調査を依頼して後日情報共有することとなった。

国後島住民の生活行動・習慣調査結果（参考資料6）

アンケート調査への回答者は17名（男6名、女10名）、年齢は10代から60以上までそれぞれに分布、職業は水産業（2名）・公務員（2名）・学生（3名）・教員（2名）・その他（6名）と、幅広い層からの回答となった。

1．犬に関する質問

半数以上が犬を飼育しているが、屋外飼育・常時放し飼い・糞便放置・ネズミの捕食ありとの回答が多く、飼育犬の衛生環境は良くないと考えられた。

2．キツネに関する質問

島民による目撃率は高く、短期滞在者によってもしばしば目撃されている。遭遇する機会は郊外の沼沢・湿地で多く、住居に近接することもある。春の山菜取りで頻繁に目撃されている。また、工場・民家の周囲で残飯等をキツネが餌としている。餌付を行っている者が1名いたが、他でも意図せずに釣り魚の放置や生活ごみの不適切な処理が原因となっている可能性が考えられた。

行政が、水産加工上の加工廃棄物の投棄場所を住宅地から離れた場所（森）に指定している（住宅地から5km 郊外）。また、

廃棄場所をクマの餌場として住民の被害を避けている。

3．屋外での活動に関する質問

ほとんどの住民が、山菜取りやきのこ狩りを月に数回行っているが、採取した山菜ときのこは毎回洗って食しており、経口汚染に対する予防はできていると考えられた。

4．家庭菜園（ダーチャ）について

住民の半数が家庭菜園を所有しており、週に数回ないし月に1回程度の作業を行っている。週末にキツネと遭遇する機会が増える。

5．飲み水に関して

水道水と瓶詰（缶詰）を飲用に利用しており、自然環境への直接汚染はないと考えられたが、飲用水の煮沸を半数以上で行っておらず、特に井戸水を飲用に利用している場合については煮沸が必要と考えられた。

国後島に在住の野生動物専門家と住民との動物由来感染症に関する意見交換

専門家および住民は、狂犬病とエキノコックス症についての知識を持っており関心の高いことが示された。狂犬病については、国後島に来る前にロシア（シベリアおよび極東地区を含む）で犬やキツネから感染のリスクを受けた経験があり、危機意識

が高いようである。また、エキノコックス症については、千島列島から北海道に輸入された経緯や、北海道内でのエキノコックス症流行状況を受けて、島内の状況がどうであるのか大きな関心が示された。

D. 考察

国後島における動物由来感染症の実態調査は行われておらず、ヒトおよび動物の発生状況等について正確な情報はない。北海道におけるエキノコックス症の侵入経路を考えると、島内に生息するキツネの感染症動向調査は島民の健康のためにも必要であると考えられた。また、狂犬病発生リスクが高く野生動物での流行拡大が見られる地域が極東にあるというロシアの専門家による情報を考慮すると、国後島に生息する狂犬病に感受性の高い動物について狂犬病の調査を行うことが必要と考えられた。

国後島住民の生活行動・習慣調査によって、狂犬病の重要な流行宿主である犬の飼育管理に課題のあることが示され、エキノコックス症に対する予防策とともにヒトに身近なペット動物であるイヌの飼育形態の改善が望まれた。

島内に生息するキツネについては、これまでに動物由来感染症視点での調査等が行われていないことから、

- 1) キツネを生活環境に**接近**させない。
(餌付け禁止、生ごみ処理の徹底)
- 2) イヌを**放し飼い**しない。

3) **生水**を飲まない。

4) 山菜・野菜は食前によく**洗浄**する。

5) 野外での活動後は**手洗い**を十分にすることといった生活習慣を徹底させると同時に動物由来感染症を想定した適切な動物調査を行うことが望まれた。

国後島のコウモリ類については、日露隣接地域生態系保全協力プログラムによる北方四島生態系関係共同調査によって、2010年の調査で新たな2種が記録され、計10種の分布が確認されている。特に、国後島と知床半島のモモジロコウモリが両地域を行き来している可能性が示唆されており、国後島から海域を越えて狂犬病等のコウモリ由来動物由来感染症が北海道に侵入する可能性があることから、本調査を継続することによって生態学的な知見を踏まえた発生予測・被害推計などを可能にすることが必要であると考えられた。

E. 結論

北方四島地域である国後島に生息するコウモリ類やキツネ等の感受性の高い流行宿主について生態学的な基礎データ収集と病原体調査を行うことで、狂犬病等の動物由来感染症が野生獣類を介して北海道に侵入する可能性を明らかにする発生予測・被害推計が可能になると考えられる。

新種のリッサウイルスが、シベリア南部、モンゴル西部、中国北東部のコウモリから新たに分離されていることから、シベリア

から極東ないしアジア地域、さらにはわが国を含めた包括的なコウモリ類に関する生態学的調査をリンクさせたリッサウイルスの疫学を明らかにすることは公衆衛生上大変有意義であると考えられた。

特に、生態が十分に明らかでなく新興感染症（SARS、エボラ出血熱等）の感染源宿主として注目を浴びているコウモリ類に対して病原微生物調査を行うことは、わが国に生息するコウモリ類を介した新興感染症の侵入や発生予測・被害推計などを可能にする基礎データ収集の基盤整備につながるため、公衆衛生行政における感染症の危機管理対策に大きな波及効果があると考えられた。

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
- 2) 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

- 3) 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

1. 学会発表等

- 1) Inoue S. Epidemiology and control strategy of rabies. Regional training on rabies. OIE regional representation for Asia and the Pacific. 5-8 Aug, 2014. Tokyo/Yokohama, Japan.
- 2) Inoue S. Enhancing laboratory network. Regional training on rabies. OIE regional representation for Asia and the Pacific. 5-8 Aug, 2014. Tokyo/Yokohama, Japan.
- 3) Inoue S. Rabies outbreak in wild ferret-badgers in Taiwan. Group Exchange 2014 with S.Korea and Taiwan in Tokyo. 27 Aug, 2014. NIID. Tokyo, Japan.
- 4) Inoue S. Coordinated Validation and Value of RFFIT / Rabies Guideline for Survey of Wildlife in Japan. Seminar. 24 Sep, 2014. Research & Diagnostic Center, Taiwan CDC. Taipei, Taiwan.

- 5) Inoue S. Rabies Guideline for Survey of Wildlife in Japan. AHRI Seminar. 25 Sep, 2014. Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan. New Taipei City, Taiwan.
- 6) Inoue S. Coordinated Validation and Value of RFFIT. AHRI Seminar. 25 Sep, 2014. Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan. New Taipei City, Taiwan.
- 7) Inoue S. Can Thailand be a rabies free country by 2020? Learning from rabies management in Japan. Lesson from a current rabies outbreak in Taiwan, a rabies free country. Tokyo-Chiang Mai World Rabies Day Conference. 13 Oct, 2014. Lanna Dog Welfare/World Animal Protection. Chiang Mai, Thailand.
- 8) Inoue S. Can Thailand be a rabies free country by 2020? Learning from rabies management in Japan. Lesson from a current rabies outbreak in Taiwan, a rabies free country. Tokyo-Chiang Mai World Rabies Day Conference. 14 Oct, 2014. Room 153, 15th Floor meeting room of Sujino Building, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. Chiang Mai, Thailand.
- 9) 井上 智。台湾における狂犬病の疫学と我が国における診断能力向上の取り組み。狂犬病の疫学とその対策-獣疫医学が社会に果たす役割。第39回獣疫学会学術集会。2014年4月5日、獣疫学会、東京大学・中島薫一郎記念ホール、東京都
- 19) 井上 智。動物由来感染症。平成25年度 JICA 集団研修「獣医技術研究 (Research on Veterinary Technology)」。2014年4月8日、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所、つくば、茨城県
- 11) 井上 智。狂犬病の現状と日本の取り組み (台湾での狂犬病の発生を受けて)。平成26年度大分県狂犬病予防研修会。2014年5月30日、大分県生活環境部食品安全・衛生課、大分市、大分県
- 12) 井上 智。台湾で発生した狂犬病と野生動物対策の意義。日本獣医生命科学大学特別講義。2014年6月11日、日本獣医生命科学大学C-501講義室、武蔵野市、東京都。
- 13) 井上 智。動物由来感染症(狂犬病等)と公衆衛生について。岩手大学農学部・人獣共通感染症学講義。2014年6

- 月 17 日、岩手大学、盛岡市、岩手県。
- 14) 井上 智。ウイルス：狂犬病（犬）シンポジウム I：身近に存在する人と動物の共通感染症（Zoonoses within our Living environment）第 3 回神戸アニマルケア国際会議 2014（The 3rd International Conference on Animal Care in Kobe 2014 - For the future of people and other animals）2014 年 7 月 19 日、神戸ポートピアホテル、神戸市、兵庫県。
- 15) 井上 智。世界に広がる狂犬病。第 7 回世界狂犬病デー（2014 in TOKYO）2014 年 9 月 28 日、アリミノホール、新宿区、東京都。
- 16) 井上 智。家畜動物における狂犬病：獣医師の役割。家畜衛生講習会（獣疫学特殊講習会）2014 年 10 月 6 日、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所、つくば市、茨城県。
- 17) 井上 智。我が国における狂犬病対策の現状と課題。狂犬病の現状と対策：人と動物の共通感染症を考える。日本医師会・日本獣医師会 連携シンポジウム。2014 年 10 月 28 日、日本医師会・日本獣医師会、日比谷公会堂、東京都。
- 18) 井上 智。台湾の狂犬病について。平成 26 年度市町村狂犬病予防担当課長会議及び狂犬病予防研修会。2014 年 10 月 31 日、京都府健康福祉部生活衛生課、京都府福利厚生センター第 3 会議室（京都府庁内）京都府。
- 19) 井上 智。台湾の狂犬病事例を踏まえた狂犬病対策と必要な調査研究について。今、狂犬病を考える。第 4 回 鹿児島大学共同獣医学部附属越境性動物疾病制御研究（TDA）センター市民公開講座。2014 年 11 月 4 日、鹿児島大学共同獣医学部附属 TAD センター、鹿児島大学農・獣医共通棟 101 号室、鹿児島市、鹿児島県。
- 20) 井上 智。人と動物の共通感染症としての狂犬病対策における課題と対応策について。平成 26 年度福岡県共通感染症対策訓練。2014 年 11 月 26 日、保健医療介護部保健衛生課、福岡県獣医畜産会館、福岡県。
- 21) 井上 智。狂犬病発生の現状と今後の課題、対策等。平成 26 年度山口県獣医公衆衛生講習会。2014 年 11 月 30 日、山口県獣医師会、山口市小郡ふれあいセンター、山口県。
- 22) 井上 智。狂犬病の発生状況について。九州地区狂犬病診断研修会。2014 年 12 月 3-5 日、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、宮

崎県。

- 23) 井上 智。地域における危機管理対応について。九州地区狂犬病診断研修会。2014年12月3-5日、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、宮崎県。
- 24) 井上 智。我が国における狂犬病対策の現状と課題。平成26年度狂犬病予防及び動物愛護管理研修会。2014年12月11日、三重県健康福祉部食品安全課生活衛生班、津市、三重県。
- 25) 井上 智。特別講義：多様な獣医師の職務。獣医師と公衆衛生。2015年1月9日、東京農工大学・共同獣医学科、農学部キャンパス、東京都。
- 26) 井上 智。狂犬病の現状と対策。2015年1月16日、平成26年度健康科学研究センター研修会、保健科学科課、さいたま市、埼玉県。
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし
1. 特許取得
- なし
2. 実用新案登録
- なし
3. その他
- なし

L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスの作出とその性状の解析

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: 狂犬病ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである L 蛋白質は、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、その分子機能に関する情報は他のウイルス蛋白質と比べて極めて少ない。本年度は、L 蛋白質の機能解析を推進するための研究ツールを得ることを目的として、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、レポーター遺伝子が発現することが確認された。さらに、ルシフェラーゼを発現する L 遺伝子欠損ウイルスを L 蛋白質非発現細胞に感染させた場合、初期転写を反映するルシフェラーゼ活性が検出された。以上より、L 蛋白質欠損ウイルスは、狂犬病ウイルスの L 蛋白質の機能解析、ならびに初期転写を研究する上で、極めて有用なツールとなることが示された。

A. 研究目的

狂犬病は、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。発症後の致死率がほぼ 100%であること、治療法が存在しないことから、本病は最も恐ろしい感染症のひとつと言える。その原因である狂犬病ウイルスの粒子は、5 種類の構造蛋白質(N、P、M、G および L 蛋白質)とこれらをコードするマイナス鎖 1 本鎖ゲノム RNA によって構成される。これらのウイルス蛋白質のうち L 蛋白質は、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして感染細胞におけるウイルス複製の中心的役割を担っている。また、ゲノム複製活性のみならず、mRNA 転写活性、キャッピング活性、ポリ A 付加活性を有している L 蛋白質は、極めて多機能性に富んだウイルス蛋白質として認識されている。

このような L 蛋白質の重要性と多機能性は、本蛋白質が治療法および新規暴露後予防法の有力な分子標的となる可能性を示しているものの、L 蛋白質の研究は、すべてのウイルス蛋白質の中で最も遅れている。

そこで本年度は、L 蛋白質の機能を解析するための有用な研究ツールを確立する目的で、L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスの作出を試みた。さらに、その研究ツールとしての可能性を検証する目的で、得られた L 遺伝子欠損ウイルスの性状を解析した。

B. 研究方法

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(それぞれ Nishi- Δ L/GFP 株および Nishi- Δ L/Luc 株)を作出した(図 1)。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。

(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

狂犬病ウイルス西ヶ原株の遺伝子操作により、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 株を一過性に L 蛋白質

を発現する NA 細胞に感染させた結果、GFP の発現が確認された(図 2)。GFP 陽性細胞の数は、接種後時間の経過にしたがい増加することが確認された。一方、同様の実験を Nishi- Δ L/Luc 株で行った場合も、経時的なルシフェラーゼ活性の上昇が認められた(図 3)。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。

ストックウイルス中の Nishi- Δ L/Luc 株は、ヌクレオカプシド上に発現細胞から供給された L 蛋白質を保有している。したがって、Nishi- Δ L/Luc 株を L 蛋白質非発現細胞に接種した場合、ヌクレオカプシド上に持ち込まれた L 蛋白質の作用により初期転写が起こると考えられる。しかし、その後は、L 遺伝子の欠損により L 蛋白質が供給されないため、二次転写およびゲノム複製は起こらない。そこで、ルシフェラーゼ活性を指標とすることで、Nishi- Δ L/Luc 株感染細胞における初期転写を検出できるかどうか検討を行った。L 蛋白質を発現しない NA 細胞に Nishi- Δ L/Luc 株を接種した場合、接種 6 時間後において非接種細胞(mock)よりも 3 倍以上高いルシフェラーゼ活性が検出された(図 4)。同活性は、接種 12 時間後にピークに達した後、次第に低下した。以上より、ルシフェラーゼ活性を指標とすることで、Nishi- Δ L/Luc 株の初期転写が検出可能であることが強く示唆された。

D. 考察

これまで、狂犬病ウイルスを含むマイナス鎖 RNA ウイルスの RNA ポリメラーゼの研究には、ミニゲノム転写・複製系が広く用いられてきた。本

系は、ゲノム両末端配列の間にレポーター遺伝子(ルシフェラーゼなど)を有するミニゲノム RNA、ならびに RNA ポリメラーゼを含むヌクレオカプシド構成蛋白質を発現する各種プラスミドを細胞に導入することで、感染細胞で行われるウイルス RNA の転写・複製を人工的に再現するものである。本系を用いれば、レポーター遺伝子の発現量を指標として転写・複製効率を簡便に評価することが可能である。その一方で、ミニゲノム転写・複製系は、すべてのウイルス因子の供給をプラスミドからの一過性発現に依存しているため、アーティファクトの影響により必ずしも感染細胞における転写・複製を反映しない可能性も考えられる。それに対し、本研究で樹立した L 遺伝子欠損ウイルスを用いた実験系は、L 蛋白質の発現のみをプラスミドに依存していることから、ミニゲノム転写・複製系よりもアーティファクトの影響が少ないと考えられる。

本研究では、L 蛋白質発現プラスミドを導入した細胞に 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(図 2 および 3)。このことは、上記の発現プラスミド上の L 遺伝子 cDNA に種々の変異を導入した後、同様の実験を実施することで L 蛋白質の機能領域の解析が可能となることを示している。すなわち、本系は、狂犬病ウイルスの L 蛋白質の機能解析に有用なツールとなることが明らかとなった。

Nishi- Δ L/Luc 株を接種した L 蛋白質非発現細胞において、非接種細胞よりも高いルシフェラーゼ活性が検出されたことより(図 4)、これを指標とすることで、狂犬病ウイルスの初期転写が検出可能であることが強く示唆された。通常の狂犬

病ウイルスやミニゲノム転写・複製系を用いた場合、技術的に初期転写と二次転写を区別することはできない。したがって、Nishi- Δ L/Luc 株を用いた本系は、狂犬病ウイルスの初期転写の機序を解明する上で極めて有用なツールとなることが予想される。

E. 結論

本年度は、GFP および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 (Nishi- Δ L/GFP 株および Nishi- Δ L/Luc 株)の作出に成功した。これらの L 遺伝子欠損ウイルスの性状を解析した結果、これらが狂犬病ウイルスの L 蛋白質機能ならびに初期転写の分子機序を解明する上で有用な研究ツールとなる可能性を示すことができた。

L. 健康危険情報

該当なし

M. 研究発表

1.論文発表

該当なし

2.学会発表

- 1) Nakagawa K, Ito N, Okada K, Okadera K, Mitake H, Sugiyama M, Generation and characterization of L gene-deficient rabies virus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases, Taipei, Taiwan (2015. 1)

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

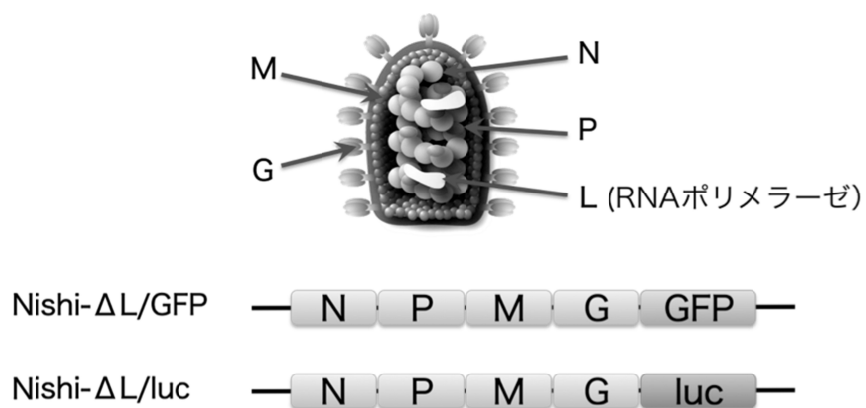


図1. 本研究において作出したL遺伝子欠損狂犬病ウイルス

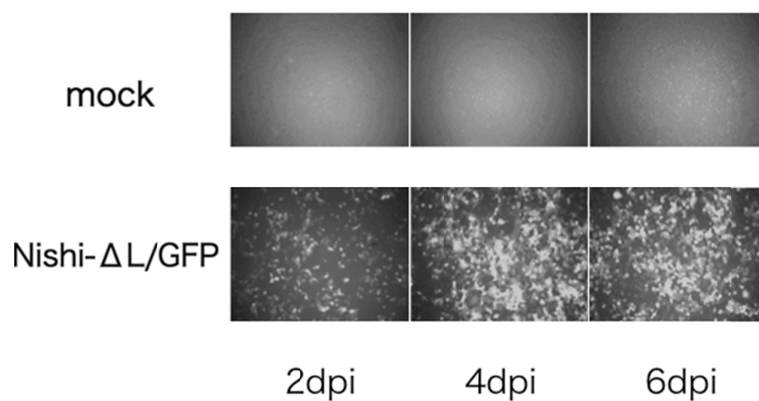


図2. Nishi- Δ L/GFP株によるGFPの発現
(L蛋白質発現プラスミド導入細胞)

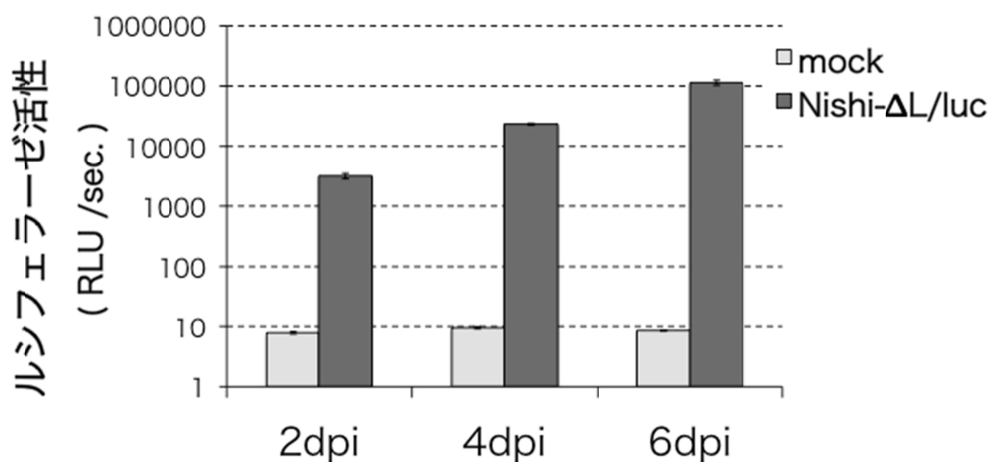


図3. Nishi- Δ L/luc株によるルシフェラーゼの発現
(L蛋白質発現プラスミド導入細胞)

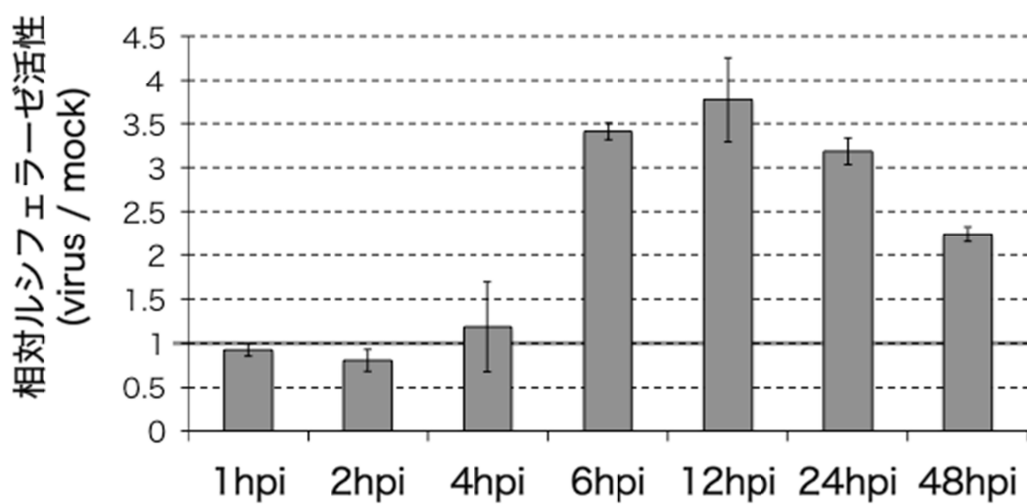


図3. Nishi- Δ L/luc株の初期転写を反映する
ルシフェラーゼ活性の検出
(L蛋白質非発現細胞)

**ブルセラ症の診断法の開発
（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	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	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	宇根 有美	麻布大学	獣医学部 獣医学科	教授

研究要旨： 昨年度、本研究にて、新たな2株を無尾類より分離し、新規ブルセラ属菌であると同定したが、今回、別種の無尾類よりブルセラ属菌の分離を試み、無尾類のブルセラ属菌保有の有無を検討したところ、ベルツノガエル3個体から3株が分離された。これら、分離株は、Combinatorial-PCRの結果、いずれも新規のブルセラ属菌であったが、昨年度報告した株とはPCRの反応性、生化学的性状に違いが見られ、昨年度の株とも異なる新規のブルセラ属菌であることが明らかとなった。さらに、昨年2株では、培養ヒト由来細胞（HeLa）への感染・増殖も認められたことから、ヒトへの感染リスクが有ることが明らかとなった。

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、旧来の家畜由来（*B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*）や犬由来ブルセラ属菌（*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）

B. inopinata は豊胸手術部位の病変

から分離された新規ブルセラ属菌として、2008年に報告され、その後、慢性肺疾患の患者からも近縁の菌が分離・報告された。*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った。そのような中、2012年にアフリカ産無尾類由来の新たなブルセラ属菌が独、米の異なるグループにより相次いで報告され、これらは*B. inopinata* に近縁であった。我々も昨年度、本研究にて、新たな2株を無尾類より分離し、新規ブルセラ属菌であると同定したが、今回、別種の無尾類よりブルセラ属菌の分離を試

み、無尾類のブルセラ属菌保有の有無を検討し、分離株については、その生化学的性状、薬剤感受性、ヒトへの伝播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分離：愛玩用無尾類の繁殖施設で、2014 年に変態後間もない幼蛙の大量死が発生した。そのベルツノガエル (*Ceratophrys ornate*) 10 個体の臓器 (肝臓、腎臓、大腿骨・骨髄) 計 20 検体を用いた。菌分離は、粉碎後の検体をブルセラ選択サプリメント (関東化学 SR83) 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。

2 . 生化学的性状の解析：無尾類由来分離株として、昨年度報告した A105 株 (イエアメガエル由来) A141 株 (デニスフロッグ由来) および今年度、ベルツノガエルより分離した A7h 株、A9h 株、A10h 株を用いた。対照としては、*B. melitensis* 16M、*B. suis* 1330、*B. canis* QE13、*B. neotomae* ATCC23459、*Ochrobactrum anthropi* ATCC49187、*O. intermedium* AQZ08 を用いた。検査には、API20E (ピオメリュー)、NF-18 (ニッスイ)、BACTOLABO オキシダーゼテスト (和光純薬) を用いた。分離株を BHI 寒天培地で 24 時間培養後、それぞれに添付のプロトコールに従い実施した。

3 . 薬剤感受性の解析：無尾類由来分離株として、A105 株、A141 株、A7h

株、A9h 株、A10h 株を用いた。対照としては、*B. canis* QE13、*E. coli* ATCC25922、*S. aureus* ATCC25923 を用いた。試験はセンシ・ディスク (BD) を使用した KB 法で行った。*Brucella* 属菌は、本法の標準培地である、ムーラーヒントンおよびヘモフィルステスト寒天培地では、極めて生育が悪く判定が困難なため BHI 寒天培地を使用した。

4 . 細胞内増殖能の検討：A105 株、A141 株を用いた。菌はマイクロバンクからヒツジ血液寒天培地に播種し、2 回継代 24 時間後に使用した。細胞 (HeLa 細胞) は、6well カルチャープレートに 2.5×10^5 /well となるように加えた。24 時間培養後、菌を各 well に加え、遠心吸着させた後、37、5%CO₂ で、1 時間感染させた (感染処置後の時点を 0hpi とする)。洗浄後、細胞外の菌を殺菌するため、50ug/ml ゲンタマイシン添加培地で 1 時間処理した。その後、10ug/ml ゲンタマイシン添加培地に交換したのち、培養を継続し、経時的 (1, 4, 8, 12, 16, 20, 24hpi) に細胞を回収し、セアーマーチン寒天培地で CFU を計測した。

C . 研究結果

1 . 菌分離 (図 1)：ベルツノガエル 10 個体のうち、3 個体の肝臓より、菌が分離された (A7h 株、A9h 株、A10h 株)。Combinatorial-PCR 法により、omp2-ca を除く 3 種のプライマーによる明らかな特異的増幅が認められた。ただ、昨年度分離した A105 株、A141 株では、4 種のプライマーによる特異的増幅が認められたのに対して、今回

は omp2-ca の反応性が著しく弱いことから、これらとは異なることが明らかとなった。A7h、A9h、A10hの間には差は認められなかった。

2 . 生化学的性状(表2): 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、無尾類分離株内でも、2タイプ(A105、A141タイプと、Ah7、Ah9、Ah10タイプ)に分かれるようであった。

3 . 薬剤感受性(表3): マクロライド系、テトラサイクリン系、ニューキノロン系の抗生物質に対しては概ね感性であったが、ブルセラ症の治療に用いられるアミノグリコシド系やリファンピシンには中間を示した。対照に用いた*B. canis*とは若干、異なるプロファイルを示した。

4 . 細胞内増殖能(図2): A105株、A141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。特に、12hpi以降、増殖が顕著になるが、20ないし24hpiでは増殖曲線に鈍化が認められた。

D . 考察

今年度は、国内繁殖の無尾類(ベルツノガエル)3個体から、新たにそれぞれ1株、計3株が分離され、特異的PCRによりブルセラ属菌と判定された。しかしながら、omp2-caタイプの

配列を検出するプライマーでの反応性が非常に弱く、昨年度の2株とは異なる遺伝子背景を持つ、新菌種である可能性が示唆された。

これら、計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。さらに、昨年度の2株と今年度の3株はその性状に差が認められた。

また、薬剤感受性については、概ね既知のブルセラ属菌と似ているが、ブルセラ症の治療に用いられる薬剤に対する感受性が、やや劣っていた。今回はディスク法による検討であったが、E-test など、さらに詳細に検討する必要がある。

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から、ヒト培養細胞への感染性と細胞内増殖能を検討したところ、*B. abortus* や *B. suis* と同様に、顕著な感染・増殖能を示した。ヒトに対する病原性が家畜由来ブルセラ属菌(*B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*)より劣る *B. canis* ではヒト培養細胞での感染・増殖とも非常に弱いことを考えると、無尾類由来ブルセラ属菌は、ヒトに明確な病原性を持つ公衆衛生学的にも注意が必要な菌である可能性がある。

今後さらにその病原性について、病原性遺伝子や感染実験により明らかにしていく必要があると考えられる。

E . 結論

本研究において、3種の無尾類から

の分離株 5 株は、いずれも新規のブルセラ属菌であった。

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り、ヒト培養細胞に感染・増殖能を示した。未だ無尾類由来のブルセラ属菌によるヒト症例の報告はないものの、飼育者への感染も起こりえるのではないかと懸念される。公衆衛生学的リスクを明らかにするためにも、病原性遺伝子の検出や、他のブルセラ属菌との遺伝的関係を詳細に検討することが必要であると思われる。

* 参考文献

1. De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, Helsel LO, Steigerwalt AG, Vega R, Clark TA, Daneshvar MI, Wilkins PP, Whatmore AM. 2008. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol.* 46, 43-9.
2. Eisenberg T, Hamann HP, Kaim U, Schlez K, Seeger H, Schauerte N, Melzer F, Tomaso H, Scholz HC, Koylass MS, Whatmore AM, Zschöck M. 2012. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl Environ Microbiol.* 78, 3753-5.
3. Fischer D, Lorenz N, Heuser W, Kämpfer P, Scholz HC, Lierz M. 2012. Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *J Zoo Wildl Med.* 43, 625-8.
4. Whatmore AM, Perrett LL, MacMillan AP. 2007. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol.* 20, 7-34.

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表等

1 . 論文発表等

(1) 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, 2014

(2) 佐藤宏明, 冬賀秀一, 堀田緒留人, 須原靖明, 尾関拓磨, 丸茂一義, 金井尚之, 莊子久美子, 宇田川郁子, 満下恵, 今岡浩一. *Brucella melitensis* による椎間板炎の一例. 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, 35(7): 182-183, 2014

(3) 今岡浩一, 木村昌伸. ブルセラ症 - 特集・人獣共通感染症の新しい知見. in: 臨床と微生物, 近代出版, 42(1): 27-32, 2015

2 . 学会発表等

(1) 今岡浩一. 動物由来感染症について. 平成26年度全国動物関係事業所協議会関東甲信越静岡ブロック会研修会, 千葉, 2014

(2) 木村昌伸, 宇根有美, 鈴木道雄, 森川茂, 今岡浩一. 無尾類に由来するブルセラ属菌の分離と解析. 第157回日本獣医学会学術集会, 札幌, 2014

(3) 今岡浩一. 身近な愛玩動物から感染する動物由来感染症について. 平成26年度動物由来感染症研修会(栃木県), 宇都宮, 2014

(4) 木村昌伸, 宇根有美, 朴ウンシル, 鈴木道雄, 森川茂, 今岡浩一. 無

尾類（カエル）に由来するブルセラ属菌の分離と解析. 第13回(爬虫類・両生類の臨床と病理のための研究会)ワークショップ, 相模原, 2014

なし。

H . 知的財産権の出願・登録状況

表 1 : ブルセラ属菌と主なホスト

Brucella sp.	Main Host	
<i>B. melitensis</i>	caprine, ovine	
<i>B. abortus</i>	Bovine	
<i>B. suis</i>	porcine, wild boar, hare, caribou, reindeer	Classic Brucella
<i>B. canis</i>	canine	
<i>B. ovis</i>	ovine	
<i>B. neotomae</i>	desert wood rat (<i>Neotoma lepida</i>)	
<i>B. pinnipedialis</i>	Seal	Marine Brucella
<i>B. ceti</i>	Dolphin, Porpoise, Whale	
<i>B. microti</i>	common vole (<i>Microtus arvalis</i>)	
<i>B. inopinata</i>	unknown	Novel Brucella
NVSL 07-0026	baboon (<i>Papio</i> sp.)	
F965	Red fox (<i>Vulpes vulpes</i>)	

表 2 : 生化学的性状

Test	Anuran isolate					<i>O. anthropi</i>	<i>O. intermedium</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. canis</i>	<i>B. neotomae</i>
	A105	A141	A7h	A9h	A10h	ATCC49187	AQZ08	16M	1330	QE13	ATCC23459
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S production	- (+)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetoin production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Amygdalin fermentation	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Esculin in hydrolysis	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Urea hydrolysis	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Citrate utilization	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Arginin dihydrolase	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Beta-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Acid produced from:											
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表 3 : 薬剤感受性

		カエル由来株					B.canis QE13	E. coli ATCC 25922	S. aureus ATCC 25923	
		イエアメ ガエル	デニス フロッグ	ベルツノガエル (Japan CB)						
		A105	A141	A7h	A9h	A10h				
ペニシリン	ペニシリン	-	-	-	-	-	20	-	34(26-37)	PCG
セフェム	セフトリアキソン	15	22	22	21	22	28	31	22	CTRX
カルバペネム	イミペネム	23	27	24	25	26	22	29(26-37)	34	IPM
アミノグリコシド	ストレプトマイシン	15	19	19	20	19	26	18(12-20)	16(14-22)	SM
	ゲンタマイシン	16	23	20	20	21	28	20(19-26)	20(19-27)	GM
マクロライド	アジスロマイシン	26	32	28	31	28	28	26	23	AZM
テトラサイクリン	テトラサイクリン	32	34	31	30	29	32	19	24	TC
	ドキシサイクリン	31	36	31	31	30	36	20	28	DOXY
ニューキノロン	シプロフロキサシン	28	33	27	27	26	28	29	27	CPFX
サルファ剤系	ST合剤	16	20	16	16	15	28	22	25	ST
	リファンピシン	18	19	18	19	18	24	13	29	RFP

Acceptable zone diameter (m/m)

S (感性)	≥25
(中間)	16-24
R (耐性)	≤15

図 1 : Combinatorial-PCR 法によるブルセラ特異的遺伝子の検出

P: *B.suis* 1330、○ : 陽性、△ : 非特異

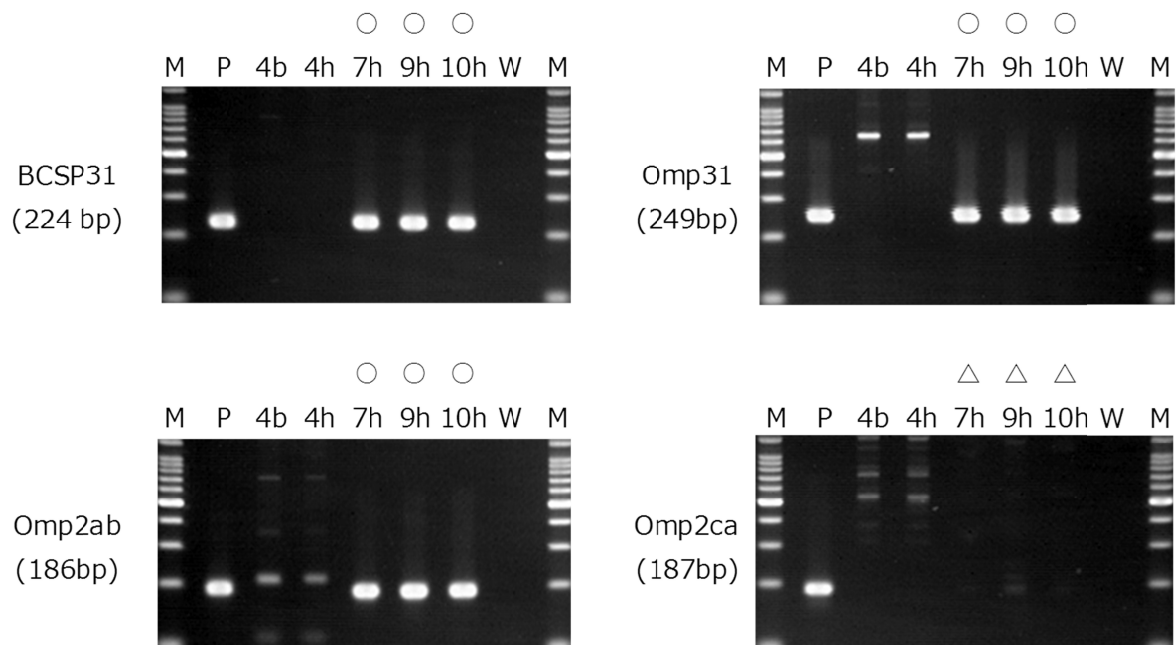
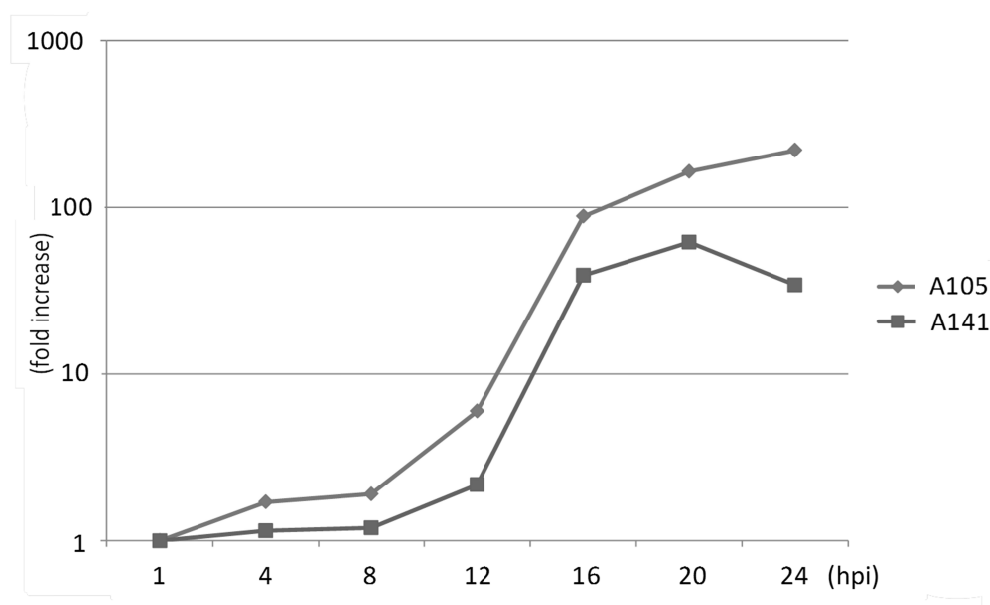


図 2 : Hela 細胞における菌の増殖



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
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：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%）から塹壕熱の病原体である *Bartonella quintana* が分離された。ニホンザルの血中菌数は 50～37,000CFU/ml と，高い菌血症状態を呈する個体が認められたが，いずれの個体も無症状であった。*gltA*，*rpoB* および ITS 領域において，検討した全てのニホンザル分離株は同一の遺伝子性状を示し，中国のアカゲザル由来株と近縁な *B. quintana* であることが明らかとなった。また，MLST 法によって分離株を遺伝子解析した結果，ヒトおよびサルの種類ごとに独自の遺伝子性状を有する *B. quintana* が分布すること，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。

A. 研究目的

Bartonella quintana は塹壕熱の原因菌で，ヒトに発熱，心内膜炎，細菌性血管腫症などを引き起こすことが知られている。本菌はヒトが唯一の自然宿主であると考えられていたが，近年，米国に輸入されたアジア産の飼育カニクイザルと中国の飼育アカゲザルから，それぞれ *B. quintana* が分離されたことから，サルも本菌の自然宿主である可能性が示唆された。

昨年度の研究から，野生のニホンザルも *B. quintana* を保菌していることが明らかとなった。本年度は，青森・山形・和歌山県に棲息するニホンザルを対象として，*B. quintana* の保有状況を検討するとともに，ヒト分離株とサル分離株の遺伝子性状を比較し，サルが *B. quintana* の自然宿主である

可能性について検討した。

B. 研究方法

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100μlを5%兔血液加チョコレート寒天培地に塗抹し，35°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。

(倫理面からの配慮について)

研究対象のニホンザルは、全て管理捕獲された個体であり、捕獲した個体は適切な麻酔下のもと、安楽殺した後に血液を採取した。

C. 研究結果

検討したニホンザルの 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。血中菌数は 50~37,000CFU/ml と、非常に高値を示す個体も認められた (表 1)。

gltA, *rpoB* ならびに ITS 領域の塩基配列を解析した結果、全てのニホンザル分離株は同一の遺伝子性状を示したとともに、中国の飼育アカゲザルを由来とする *B. quintana* RM-11 株と同一であるか非常に高い相同性 (99.5~100%) を示した (表 2)。

B. quintana 陽性の 6 個体から代表の 1 株を選抜し MLST 法を試みた結果、いずれの株も新規の ST22 に型別された。連結塩基配列に基づく系統解析では、ニホンザル、ア

カゲザル、カニクイザルおよびヒト分離株はそれぞれ独立した 4 つのクラスターを形成した (図 1)。

D. 考察

青森県、山形県および和歌山県に棲息する野生のニホンザルは *B. quintana* を保菌していることが初めて明らかとなった。さらに、3 頭の *B. quintana* 陽性のニホンザルの血中菌数はそれぞれ 6,000, 12,000, 37,000CFU/ml と、高い菌血症状態であった。また、ニホンザル分離株はヒト由来の *B. quintana* Fuller^T 株に比べ、アカゲザル由来の *B. quintana* RM-11 株とより近縁な株であることも明らかとなった。以上の結果から、サルはヒト分離株と異なる遺伝子性状の *B. quintana* を保有するとともに、本菌の自然宿主である可能性が示された。

MLST 法を用いて、ニホンザル分離株の ST を決定したところ、検討した 6 株は同一の ST22 型であることが明らかとなった。さらに、MLST 法に基づいて系統解析したところ、ST1~22 は 4 つの独立したクラスターを形成し、それぞれ分離されたヒトあるいはサルの種類ごとに ST が分類された。今回、ニホンザルから分離された *B. quintana* 株は新規の ST であり、また系統解析でもニホンザル独自のクラスターを形成したことから、ヒトおよびサルの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。さらに、青森・山形・和歌山県のニホンザルは、アカゲザルやカニクイザルとは異なる ST の *B. quintana* 株を保有していたことから、わが国ではニホンザル固有の *B. quintana* がサル集団内に

分布している可能性が考えられた。本研究のニホンザルの採材地域は 3 県に限定されていたことから、今後、より広範な地域のニホンザルにおける *B. quintana* の分布状況を検討するとともに、分離株の遺伝子性状を詳細に解析していく必要があると考えられた。

E. 結論

青森県、山形県および和歌山県のニホンザルは塹壕熱の病原体である *B. quintana* 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、本菌の自然宿主である可能性が示唆された。

N. 健康危険情報

今後、わが国でその生息数がさらに増加し、有害鳥獣駆除事業や管理捕獲でヒトとの接触が増加すると考えられるニホンザルを原因とする *B. quintana* の感染にも注意を払う必要があると思われる。

O. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Pangjai, M., Maruyama, S., Boonmar, S., Kabeya, H., Sato, S., Nimsuphan, B., Petkanchanapong, W., Wootta, W., Wangroongsarb, P., Boonyareth, M., Preedakoon, P., Saisongkorh, W., and Sawanpanyalert, P. 2014. Prevalence of zoonotic *Bartonella* species among rodents and shrews in Thailand. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 37(2):

109-114.

- 2) 丸山総一：猫ひっかき病，公衆衛生情報 Vol. 44/No. 3: 22-23. (2014)

2. 学会発表

- 1) 佐藤真伍，武野侍那子，壁谷英則，大橋正孝，大竹正剛，丸山総一．わが国の鹿における *Bartonella* のベクターの検討．第 22 回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー（大分県太宰府館まほろばホール，2014 年 7 月 6 日）
- 2) 佐藤真伍，壁谷英則，吉野愛香，関根 渉，鈴木和男，東 英生，櫛引道彦，山崎翔気，玉手英利，丸山総一．わが国の野生ニホンザルに分布する *Bartonella quintana* とその遺伝的多様性．第 157 回日本獣医学会学術集会（北海道大学，2014 年 9 月 9 日）

P. 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 . *Bartonella* 属菌を保有していたニホンザルとその血中菌数

捕獲地域	検体数	陽性数 (%)	検体番号	血中菌数 (CFU/ml)
青森県	25	1 (4.0)	MF34	3.7×10^4
山形県	5	1 (5.0)	MF19	2.4×10^2
和歌山県	15	4(26.7)	MF1	3.4×10^2
			MF3	5.0×10^1
			MF10	1.2×10^4
			MF11	6.0×10^3

表 2. ニホンザル分離株と *B. quintana* Fuller^T 株および RM-11 株の *gltA* , *rpoB* および ITS 領域における塩基配列の相同性

ニホンザル分離株*	<i>B. quintana</i> Fuller ^T 株 (ヒト由来)			<i>B. quintana</i> RM-11 株 (飼育アカゲザル由来)		
	<i>gltA</i>	<i>rpoB</i>	ITS	<i>gltA</i>	<i>rpoB</i>	ITS
MF1.1	98.7	99.6	98.4	100	100	99.5
MF3.1	98.7	99.6	98.4	100	100	99.5
MF10.1	98.7	99.6	98.4	100	100	99.5
MF11.1	98.7	99.6	98.4	100	100	99.5
MF19.1	98.7	99.6	98.4	100	100	99.5
MF34.1	98.7	99.6	98.4	100	100	99.5

* 同一個体のニホンザルから選択した 5 株は , 3 領域において同一の遺伝子配列であった。

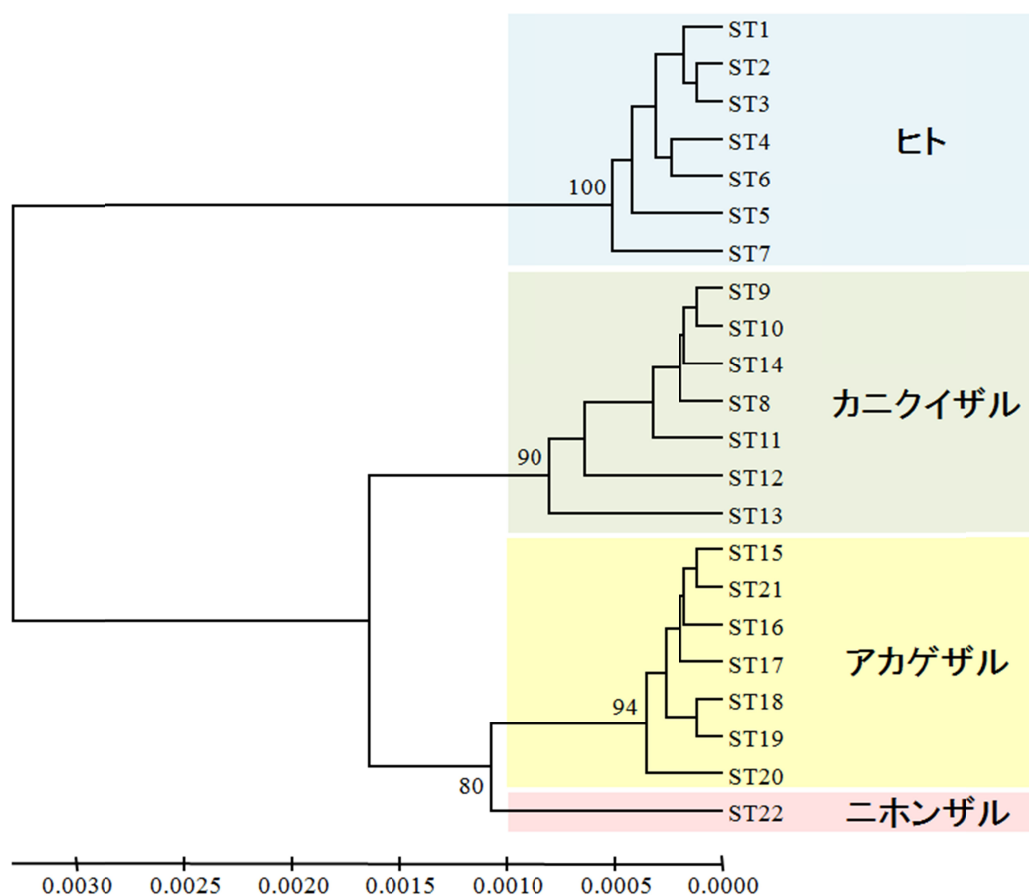


図 1 . MLST 法に用いた 9 遺伝子領域の連結配列に基づく系統解析

MLST 法に用いた 9 つのハウスキーピング遺伝子領域の塩基配列を ST ごとに連結させ、UPGMA, Kimura 2-parameter モデルを用いて系統解析を行った。ST1 ~ 7, ST8 ~ 14, ST15 ~ 21, ST22 の 4 つのクラスターに分類され、それぞれヒト分離株, カニクイザル分離株, アカゲザル分離株, ニホンザル分離株によって構成された。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

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 の遺伝的関連性ならびに

ベトナムの土壌における類鼻疽菌の分布

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 81 株について、分子遺伝子型別法である Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)法ならびに Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) 法を応用して、分子遺伝子型別を行ない、各地域での菌株間の遺伝的異同を検討した。その結果、供試菌 81 株は、PFGE 法では 22 パターンに型別されたが、MLVA 法では 14 パターンにしか型別できなかった。また、また、系統図解析から、それぞれの地域から得られた菌株はいずれも同じクラスターに分類されることが判明したことから、東南アジア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。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報告されている類鼻疽 (Meliodosis) 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 mallei*) の分離を試みた。その結果、増菌法を併用することで 40 検体中 3 検体 (7.5%) から類鼻疽菌は分離され、本地域に類鼻疽菌が分布することが明らかになった。

A. 研究目的

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おり、近年、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 *Salmonella* Weltevreden について、Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)法ならびに昨年度の研究で開発した Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) 法を応用して、分子遺伝子型別を行ない、各地域での菌株間の遺伝的異同を検討した。

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、昨年度は検出されなかったため、本年度は増菌法を併用し、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 MLVA ならびに PFGE による遺伝子型別

1) 供試菌株

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(Can Tho 市)で分離されたヒトの胃腸炎患者由来株 3 株を加えた計 81 株の *S. Weltevreden* を用いた。

2) 染色体 DNA の PFGE 法による解析

(1) 菌液の調整

供試菌株は trypticase soy agar(TSA)平板寒天培地(BBL)に塗抹し、37℃ 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、分光光度計の波長 610nm で吸光度が 0.145 ~ 0.155 になるように濃度を調整した。

(2) DNA 包埋アガロースプラグの作製

アガロースプラグの作製は、Plug mold(Bio-Rad)を用いて行った。滅菌した 1.5ml のマイクロチューブ(TreffLab)に、Proteinase K solution(20mg/ml)を 10 μ l 入れ、濃度調整した菌液 200 μ l を加え、ピペットで良く混和した。TE Buffer に、それぞれ 1%となるように SDS solution と Agarose NA(GE Healthcare Bio-Sciences)を加えて作製したプラグ作製用アガロースを、上記のマイクロチューブに 200 μ l ずつ分注し、ピペットで均一になるように混和した。この混合液を Plug mold に注ぎ入れ、固化させた。中試験管に Proteinase K solution(Wako) を 20 μ l と RIPA Buffer(Wako)を 4ml 入れ、それぞれの中試験管に 1 つずつ Plug を移し入れ、54℃ 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、50℃ の滅菌蒸留水 5ml を中試験管に入れ、50℃ の恒温槽で 15 分間攪拌した。同量の滅菌蒸留水と入れ替え、50℃ で 15 分間再度攪拌した。同様の処理を、滅菌蒸留水でもう一度行い、その後、TE Buffer と入れ替え同じ処理を計 3 回行った。攪拌終了後、プラグを取り出し、2ml の TE Buffer が入った、2ml の滅菌マイクロチューブに移し、4℃ で保存した。

(3) 制限酵素処理による染色体 DNA の消化

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 \times 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 で 15 分静置した。M Buffer を除去し、*Xba*I(TaKaRa)を 25U、BSA を 0.01 % になるよう加えた 1 \times M Buffer 200 μ l を新たに添加し、37 で 2 時間反応させた。酵素処理終了後、M Buffer を除去し、0.5 \times 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。

(4) 電気泳動

プラグ断片をコームに乗せ、1% Agarose NA でコームに固定させた。コームをキャスティングスタンドに設置し、1% Agarose NA を注ぎ入れ、冷え固まるまで静置し、コームを取り除き、コームによってできたウェルを 1% Agarose NA で埋めた。パルスフィールドゲル電気泳動は泳動装置に CHEF-DR[®] III Pulsed Field Electrophoresis Systems(Bio-Rad)を使用し、14 、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。なお、分子マーカーとしては、*Salmonella* Braenderup を用いた。ゲルはエチジウムプロマイド溶液で染色し、UV を照射して撮影後、得られたバンドパターンの解析を行った。なお、PFGE パターンの解析にあたり、Tenoverらの提言に従い、検出されたバンドパターンが 1 つまたは 2 つしか変わらないものは同じ PFGE パターンと判断し、PFGE パターンの整理を行った。

(5) 系統樹解析

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。

3) 染色体 DNA の MLVA 法による解析

(1) TR 領域の選択

使用する TR 領域は、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 領域 Sal16 および SE-4 と、使用しなかった領域の中から 2 領域 STTR3 および STTR7 を選択し、使用した。

(2) 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 TSA(BBL) に接種し、37 で 24 時間培養後、その 1 白金耳を、PBS 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 による遺伝子の増幅

PCR 反応液は、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 \times 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。なお、PCR の反応条件はそれぞれの定法に従った。

(4) PCR 産物の精製

PCR産物に滅菌精製水を加え100 μ lにメスアップし、5M NaCl 6 μ lおよびイソプロパノール100 μ lを加え、15,000rpmで10分間遠心分離した。遠心上清を除去し、70%エタノールを50 μ l加え、再び15,000rpmで3分間遠心分離し、遠心上清を除去し、風乾させた。完全に乾いた後、滅菌蒸留水15 μ lを加えた。

(5) DNA シーケンシング

精製したPCR産物の濃度をNanoDrop Lite (Thermo scientific)を用いて測定し、DNAが適量となるようにPCR用96穴プレートに入れた。それぞれのDNA領域に対応するプライマーを9.6pmol加え、滅菌精製水で21 μ lになるまでメスアップした。DNAシーケンシングはユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼した。

(6) シーケンスデータの解析

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。

2. ベトナムならびに沖縄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、2014年月にベトナム・メコンデルタで採取した水田の表土40検体を用いた。

2) 類鼻疽菌の分離・同定

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 $^{\circ}$ C 24時間培養後、その上清をAshdown's Medium寒天培地に接種し、37 $^{\circ}$ 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。

C. 研究結果

1. PFGE法による染色体DNAの解析結果

今回供試した*S. Weltevreden* 81株は、制限酵素 *XbaI* 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。供試菌株のパターン別の内訳は、F12およびF15にそれぞれ16株ずつ、パターンF1およびF17にそれぞれ12株ずつ、パターンF5に4株、パターンF14に3株、パターンF10およびF16に2株ずつ、パターンF2、F3、F4、F6、F7、F8、F9、F11、F13、F18、F19、F20、F21およびF22にそれぞれ1株ずつであった。また、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。F1およびF14についても、分離された地域は同じベトナム国内であり、比較的近い距離にあった。また、地域別に分離されたパターン数をみると、メコンデルタでは13パターンと最も多く、2番目に多かったタイでは5パターンであった。

2. 系統樹解析

S. Weltevreden のヤモリ由来株78株とヒトの胃腸炎患者由来株3株の計81株のPFGEパターンの相同性をもとに、UPGMA法により系統図を作製した結果、系統樹は大きく2つのクラスターに分けられた。パターン数が最も多かったメコンデ

ルタ由来株の大部分は1つのクラスターに分類された。また、2番目に多かったタイ由来株はメコンデルタ由来株とは異なったクラスターに分類された。

3. MLVA 法による遺伝子型別

PFGE で型別されたそれぞれのパターンのうち、パターン F1 から 3 株、パターン F12、F14、F15、F16 および F17 から 2 株ずつ、パターン F2、F3、F4、F5、F6、F7、F8、F9、F10、F11、F13、F18、F19、F20、F21 および F22 からそれぞれ 1 株の計 29 株を用い、MLVA を実施した結果、14 の MLVA タイプに分類された。その内訳は、タイプ M1 に 5 株、タイプ M2 に 4 株、タイプ M3 に 3 株、タイプ M4、M5、M6、M7、M8 および M9 にそれぞれ 2 株ずつ、タイプ M10、M11、M12、M13 および M14 にそれぞれ 1 株ずつであった。RN が菌株間で異なっていた領域は、Sal16 と STTR3 および STTR7 であったが、今回新たに用いた STTR3 および STTR7 の領域で差異が見られたのは 1 株だけであり、菌株識別能力は低かった。これに対し、Sal16 の領域では、RN 数に顕著なばらつきがみられた。また、SE-4 では差異が確認されなかった。

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 40 検体について、増菌法を併用して培養法により類鼻疽菌の分離を行ったところ、3 検体 (7.5%) から類鼻疽菌が分離された。

D. 考察

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ボアであることが報告されている。本研究では、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。このうち、ヒトの胃腸炎患者由来株のみで見られた 1 つの PFGE パターンをのぞき、それ以外の 21 パターンはすべてヤモリ由来株から得られた。近年、欧米や日本などの先進国で大きな社会的問題となっている *S. Enteritidis* や *S. Infantis* は、PFGE で遺伝子型別しても得られる PFGE パターンは極めて少ないことが報告されており、これらのことは近年のこれらの血清型による *Salmonella* 感染症の流行は特定のクローンによるものであることを示している。一方、メコンデルタで分離された様々な由来の *S. Weltevreden* について PFGE で解析したところ、多様な PFGE パターンが分離されたことが報告されているが、本研究でも東南アジアの野生ヤモリ由来の *S. Weltevreden* は PFGE により、多様なパターンに型別された。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っていた。これらのことは、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。また、メコンデルタの胃腸炎患者由来株 2 株の PFGE パターンは、フエのヤモリから分離されたパターン F14 と同じであったことから、ヤモリはヒトへの感染源となっている可能性が推察される。

日本では *S. Weltevreden* はほとんど分離されないが、沖縄県だけは本血清型菌の分離頻度が高いことが報告されている。沖縄では 1960 年代くらいまでは東南アジアで普遍的に分布するホオグロヤモリは分布しておらず、1960 年代以降にこのヤモリが沖縄に侵入したことが報告されている。本研究で供試した沖縄県におけるヤモリ由来 *S. Weltevreden* 2 株の PFGE パターンはどちらもパターン F16 であった。本研究で供試した東南アジアのヤモリ由来株には同じ PFGE パターンを示す菌株は確認されなかったが、系統図解析により東南アジア由来株との遺伝子間の距離を測ると、タイ由来株やメコンデルタ由来株と 57% の相同性を持つことがわかった。そのため、沖縄県のヤモリから分離された *S. Weltevreden* は、東南アジアから沖縄に持ち込まれた可能性が考えられる。今回は沖縄県におけるヤモリ由来株は 2 株だけしか供試できなかったため、結果として得られた PFGE パターンは 1 つのみだったが、沖縄県由来株と東南アジア由来株の *S. Weltevreden* の遺伝的関連性を比較するためには、さらに多くの検体を供試し、遺伝子パターンを比較する必要がある。

PFGE 法は菌株型別能力が高く、現在では分子遺伝子型別のゴールドスタンダードとして、広く普及しているが、手技が煩雑であり、フラグメント解析なので他機関との間で比較がしづらいなどの欠点もあるため、

PFGE 法に代わる新たなシーケンス解析による分子遺伝子型別法のひとつとして、MLVA 法が開発されている。Chiou らは、*S. Typhimurium* を PFGE ならびに MLVA で解析した結果、PFGE では 8 パターンであったのに、MLVA では 108 パターンにも型別され、菌株型別能力は MLVA のほうが高かったことを報告しているように、MLVA のほうが PFGE より高い菌株型別能を示すことを指摘する研究者は多い。しかしながら、今回の研究では、PFGE では 22 パターンに分けられたのに対し、MLVA では 14 タイプのみであった。昨年度の検討では、Sal16 と SE-4 の 2 つの領域について、*S. Weltevreden* 株の MLVA 解析を行ったところ、Sal16 では 14 種類の RN が認められ、十分な識別能を発揮したが、SE-4 については、差異が全く認められなかったことを報告している。また、今回新たに使用した領域である、STTR3 と STTR7 についても、差異が認められた株は 1 つだけであり、MLVA の識別能は高くなかった。すなわち、Sal16 以外の 3 つの領域は、あまり遺伝的に多様な領域とは言えず、今後 *S. Weltevreden* での MLVA の識別能を上げるためには、遺伝的に多様な領域を見つけ、検討することが必要である。今回使用したプライマーは、*S. Weltevreden* のために設計されたものではなく、*S. Typhi*、*S. Typhimurim* および *S. Enteritidis* での MLVA 解析のために設計されたものである。そのため、*S. Weltevreden* ではこれらの領域は遺伝的に多様ではなかったものと考えられる。今後 *S. Weltevreden* に MLVA を用いて、PFGE と同等もしくはそれ以上の識別能を得ようとするなら、*S. Enteritidis* などのために設計された既存の

プライマーではなく、Tandem Repeat Finder software を用いて、*S. Weltevreden* のシーケンスデータから MLVA マーカーになりうる領域を探し出し、新しくプライマーの設計を行い、最適なプライマーセットを開発する必要があるだろう。

2. ベトナムの土壌からの類鼻疽菌の分離

今回、我が国の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、類鼻疽菌の分離を試みた結果、昨年度は選択培地に直接塗抹する方法では菌は分離されなかったが、今年度は増菌法を併用した結果、類鼻疽菌は 40 検体中 3 検体（7.5%）から分離された。このことから、ベトナム・メコンデルタにも本菌は分布することが明らかになった。ただ、直接塗抹では分離されなかったことから、分布はしているものの、菌の汚染菌量は高くはないものと思われた。

E. 結論

1. 東南アジアのヤモリ由来 *S. weltevreden* 81 株は、PFGE 法では 22 パターンに型別されたが、MLST 法では 14 パターンにしか型別できなかった。また、同じ地域で捕獲されたヤモリ由来の菌株は、近似した PFGE パターンを示した。
2. ベトナム・メコンデルタの土壌から、40 検体中 3 検体（7.5%）から類鼻疽菌は検出された。

F 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 新川洋平¹, 長谷川瑞貴, 永田絵美, Vo Thi Minh Tam, Nguyen Khanh Thuan, Ly Thi Lien Khai, 谷口隆秀, 林谷秀樹², 東南アジアおよび沖縄県におけるヤモリ由来 *Salmonella Weltevreden* の分子遺伝子型別, 第 43 回獣疫学会学術集会、2015 年 3 月、東京

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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshii K, Sunden Y, Yokozawa K, Igarashi M, Kariwa H, Holbrook MR, Takashima I	A Critical Determinant of Neurological Disease Associated with Highly Pathogenic Tick-borne Flavivirus in Mice.	Journal of virology	88 (10)	5406-5420	2014
Chidumayo NN, 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 (4)	373-378	2014
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 (4)	823-835	2014
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 (4)	849-861	2014
Chidumayo NN, Yoshii K, Kariwa H.	Evaluation of the European tick-borne encephalitis vaccine against Omsk hemorrhagic fever virus.	Microbiol Immunol	58 (2)	112-118	2014
Tun MM, Aoki K, Senba M, Buerano CC, 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
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
Amada T, Yoshimatsu K, Koma T, Shimizu K, Gamage, CD, Shiokawa K, Nishio S, Ahlm C, Arikawa J.	Development of an immunochromatography strip test based on truncated nucleocapsid antigens of three representative hantaviruses.	Virol J	11	87	2014
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	88 (13)	7178-7188	2014
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	44 (1)	32-33	2014
井上 智	狂犬病とバイオセーフティ（解説）	JBSA Newsletter	4 (2)	19-21	2014
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	67 (11)	809-818	2014
Pangjai M, Maruyama S, Boonmar S, Kabeya H, Sato S, Nimsuphan B, Petkanchanapong W, Wootta W, Wangroongsarb P, Boonyareth M, Preedakoon P, Saisongkorh W, Sawanpanyalert P.	Prevalence of zoonotic <i>Bartonella</i> species among rodents and shrews in Thailand.	Comp. Immunol. Microbiol. Infect Dis.	37 (2)	109-114	2014
佐藤宏明, 冬賀秀一, 堀田緒留人, 須原靖明, 尾関拓磨, 丸茂一義, 金井尚之, 庄子久美子, 宇田川郁子, 満下恵, 今岡浩一	<i>Brucella melitensis</i> による椎間板炎の一例	病原微生物検出情報	35 (7)	182-183	2014
今岡浩一, 木村昌伸	ブルセラ症 - 特集・人獣共通感染症の新しい知見	臨床と微生物	42 (1)	27-32	2015