

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  
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

# 動物由来感染症の対応に関する研究

(H25-新興-一般-008)

平成26年度 総括・分担研究報告書

平成27年3月

研究代表者 森 川 茂  
(国立感染症研究所)

## 目 次

I. 総括研究報告書	
動物由来感染症の対応に関する研究 .....	1
研究代表者：森川 茂（国立感染症研究所獣医科学部）	
II. 分担研究報告書	
1. 新興モルビリウイルスの病原性と動物由来新興ブニヤウイルスの国内疫学と総括 . . .	9
研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所獣医科学部）	
2. 食虫目、翼手目等のハンタウイルスの分子疫学情報の蓄積 .....	25
研究分担者：新井智（国立感染症研究所 感染症疫学センター）	
3. 狂犬病の病原性解析と新興ラブドウイルスの診断法の開発 .....	31
研究分担者：井上智（国立感染症研究所 獣医科学部）	
4. 動物由来新興ウイルスの細胞侵入機構 .....	39
研究分担者：福士秀悦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
5. 野兔病の病原性発現機構の解析 .....	49
研究分担者：宇田晶彦（国立感染症研究所 獣医科学部）	
6. ニホンザル血小板減少症の原因となる SRV のウイルス学的解析 .....	55
研究分担者：三浦智行（京都大学ウイルス研究所附属感染症モデル研究 センター霊長類モデル研究領域）	
7. 野生動物の動物由来感染症病原体の保有状況の網羅的調査 .....	61
研究分担者：前田健（山口大学共同獣医学部獣医微生物学）	
8. 輸入回帰熱の診断法確立と標準化 .....	71
研究分担者：川端寛樹（国立感染症研究所細菌第一部）	
9. 動物由来細菌性腸管感染症の再興に向けた感染制御に関する研究 .....	81
研究分担者：山田章雄（東京大学大学院農学生命科学研究科）	
10. コリネバクテリウムに関する研究 .....	87
研究分担者：山本明彦（国立感染症研究所細菌第二部）	
11. 動物由来新興ヒトバベシア症原虫の国内感染実態の解明 .....	101
研究分担者：新倉綾（国立感染症研究所動物管理室）	
12. ヒトの狂犬病の診断・治療法に関する調査研究 .....	109
研究分担者：菅沼明彦（東京都立駒込病院感染症科）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	135



厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

## 総括研究報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )

国立感染症研究所獣医科学部長 森川 茂

研究要旨：新興・再興感染症の大部分が動物由来感染症である。これらのうち国内で稀にしか発生していない動物由来感染症について、疫学的知見を集積しヒトへの感染リスクを評価する。また、これらの感染症が国内で発生した場合の診断・迅速検査法を確立する。重要な動物由来感染症の病原性発現機構に関する研究を行い、霊長類等に発生した新興感染症に関してヒトへのリスクを科学的に評価する。動物の常在細菌や環境中の菌等から病原性腸内細菌に対し抗菌作用を示す菌種を探索する。これらにより総合的に動物由来感染症対策の体制整備を目指す。本研究は、これらを目的とする 3 年計画の 2 年目で、(1)サルに致死性流行を起こしたイヌジステンパーウイルスをクローン化したプラスミドから RG により回収して性状を調べた。また、新規ネコモルビリウイルスが国内のネコでも 20% 以上が感染し一部は持続感染する。ウイルスには 3 遺伝子型があるが地理的分布とは一致しない。(2)ニホンザルに致死性なレトロウイルス SRV4 を RG で回収し病気が引き起こされること、受容体 (ASCT2) を同定した。(3)狂犬病の固定毒と街上市毒の G 蛋白質の細胞内局在と粒子形成に G 蛋白質の糖鎖修飾が重要な役割を果たすことが分かった。(4) MERS コロナウイルスの S 蛋白を外殻した VSV シュードタイプによる中和抗体測定法を開発し、ラットの dipeptidyl peptidase 4 (Dpp4) がレセプターとして機能しないことが分かった。(5) 野兎病菌の新規病原体遺伝子 *pdpC* 遺伝子の機能を解析するため、*pdpC* 遺伝子欠損弱毒株と強毒株の遺伝子発現プロファイルを比較し、6 遺伝子の発現レベルが異なることを見出した。(6) 国内の野生動物・節足動物間で、新規ラブドウイルス・フレボウイルス・トーゴトウイルス・フラビウイルスが蔓延していることが判明した。また、フェレットコロナウイルスに認められるようにまだまだ未知のコロナウイルスが存在することが確認された。北海道のヒメネズミ及びベトナムの翼手目から新規ヘルペスウイルス 4 株が分離された。(7) 齧歯目、トガリネズミ形目、および翼手目のハンタウイルスの解析から、ハンタウイルスはユーラシア大陸で誕生したと推測された。(8) 抗体検査によってその感染種の同定は困難とされているボレリア感染症において、*in silico* 解析により回帰熱群特異的抗原や新興回帰熱群特異的抗原を推定し、大腸菌で組換え抗原を作製した。(9) *Bifidobacterium* の特定の菌株には *E. coli* O157:H7 感染防御効果があることが判明した。(10) シカが *Corynebacterium ulcerans* の自然界の保菌者でネコ等に感染させ、ネコが人への感染源の一つになることが示唆された。(11) 日本に存在しないとされていた *B. divergens* をはじめてシカから検出し、全国的に分布している事を明ら

かにした。シュルツマダニが *B. microti* US-type の自然界での媒介種であることが判明した。今後ヒトバベシア症が国内でも発生するリスクがある。(11) ヒト狂犬病のこれまでの Milwaukee rabies protocol による救命 8 症例を参考に現時点で行い得る治療法、院内感染対策などに関してまとめた。

研究分担者：

新井智（国立感染症研究所 感染症疫学センター）、井上智、宇田晶彦（同 獣医科学部）、福士秀悦（同 ウイルス第一部）、川端寛樹（同 細菌第一部）、山本明彦（同 細菌第二部）三浦智行（京都大学ウイルス研究所附属感染症モデル研究センター霊長類モデル研究領域）、前田健（山口大学共同獣医学部獣医微生物学）、山田章雄（東京大学大学院農学生命科学研究科）、菅沼明彦（東京都立駒込病院感染症科）

#### A. 目的：

新興・再興感染症の大部分が動物由来感染症である。これらのうち国内で稀にしか発生していない、あるいは現在発生のない動物由来感染症について、ヒトへの感染リスクを評価するために必要な知見を集積する必要がある。また、新興動物感染症病原体のうち霊長類に致死感染を起すもの、全く新規に動物で同定されたウイルス感染症などは、科学的にヒトへのリスクを評価するための知見を集積する。宿主域が拡大し、本来の宿主動物から霊長類にまで致死感染をおこすようになったものに関しても、人へのリスクを評価する必要がある。動物由来感染症には、ウイルス感染症、細菌感染症など多くの感染症があるが、これらのうち重要と思われる感染症に関して以下の項目に関して研究を行う。

- 1) 疫学的知見が不十分な動物由来感染症の疫学的知見の集積を行う。
- 2) 患者発生時に必要な動物由来感染症の診断・迅速検査法を確立する。
- 3) 動物由来感染症の病原性に関わる遺伝子とその機能を解明する。
- 4) 霊長類などの新興感染症の発生機序を解明しヒトへのリスクを評価する。
- 5) 病原性細菌に抗菌作用を示す細菌群の同定と作用機構を解明する。

1) から 5) の研究から、国内で発生がないか稀にしか発生のない重篤な動物由来感染症や今後発生する可能性のある動物由来感染症のリスクを明確にし、事前対策を可能とすることを目的とする。

#### B. 研究方法：

各分担研究者の研究報告書の研究方法に詳細を記載した。

#### C. 結果：

- 1) 新興モルビリウイルス感染症の研究：  
サルの新興モルビリウイルス感染

症の原因病原体であるイヌジステンパーウイルス(CDV)をリバースジェネティックスで回収しイヌ及びマカク属サル SLAM を介して感染し細胞融合をおこすこと、カニクイザルリンパ球で増殖することを確認した。感受性マウスモデル作製に必要なマカク属サル SLAM 及び nectin4 TG マウス作製用ベクターを作製し ES 細胞クローンを作製している。

近年、分離同定されたネコモルビリウイルスの国内のネコにおける疫学調査を継続して行い、香港と同様日本でもネコモルビリウイルス感染率は比較的高く、持続感染することがわかった。ウイルスの遺伝型は 3 型あるが地理的分布とは一致しない。腎炎等の腎疾患の関連に関して調査している（森川）。

#### 2) ニホンザル血小板減少症の原因となる SRV のウイルス学的解析：

京都大学霊長類研究所においてニホンザルが血小板減少症により大量死した。これまでの次世代シーケンサーなどの研究からサルレトロウイルス 4 型(SRV-4)との関連が示唆されたが、確定的ではなかった。そこで、発症個体から分離した SRV-4 及び新たに作製した感染性遺伝子クローン由来の SRV-4 をニホンザルに実験感染したところ、血小板減少症が誘導された。また、SRV-4 がニホンザルに感染する際は、中性アミノ酸トランスポーターの一種である ASCT2 を利用することを明らかにし、この分子が多く発現している部位(肺や消化管)で SRV-4 がとくに増殖していることを確認した。本研究により、ニホンザル血小板減少症の原因ウイルスが SRV-4 であることを証明した。（三浦）。

#### 3) 狂犬病の病原性解析：

狂犬病ウイルス (RV) の自然感染では潜伏期間中に RV に対する抗体は産生されずウイルスも検出できないが、実験室内継代等で弱毒化させた固定毒は潜伏期間の短縮と一定化、免疫誘導能の増強といった特徴を示す。RV の固定毒は、細胞表面に G 蛋白質が局在しウイルス粒子形成が起こるが、街上毒では G 蛋白質は小胞体からゴルジ装置へ局在しウイルス粒子形成は細胞膜で起きない。この違いが G 蛋白質の糖鎖修飾によること、特に第 204 位への糖鎖修飾の有無によることが明らかになっ

た。第 204 位の N 型糖鎖付加は、RV の G 蛋白質の小胞体から細胞膜への輸送に重要な役割を果たしていることが明らかになった。(井上)。

#### 4) ヒトの狂犬病の診断・治療法に関する調査研究：

狂犬病は発病するとほぼ全例が死に至る。発病後の治療は未確立であるが、近年、新たな治療法を模索する動きがみられる。狂犬病治療を考える基礎資料として、最新の知見を加えて、狂犬病救命例、治療法、院内感染対策についてまとめた。これまでに報告された狂犬病発症後の救命例は、少数例にとどまっているが、いずれも狂犬病抗体上昇により診断されており、経過中に採取された各種検体から狂犬病ウイルスが検出されていない。これは、発症早期での狂犬病ウイルスの排除が、転帰に影響することを示唆していると思われる。狂犬病ウイルスの早期排除に、ウイルスの変異、曝露量、宿主の免疫応答などが影響する可能性があり、今後これらの因子について検討が必要である。ヒト狂犬病の治療プロトコールとして Milwaukee rabies protocol(MRP)が提唱され、世界各地で MRP に則った治療が行われ、救命例も報告されているが、MRP 導入例の多くが救命に至らず確立された治療法としての合意は得られていない。WHO における専門家会議では、狂犬病確定例に、苦痛の軽減を目的とした緩和治療を推奨し、人工呼吸器の使用などの侵襲的処置は避けるべきとの見解が表明されている。狂犬病患者に対する院内感染対策として、飛沫感染及び接触感染予防の順守が求められる。患者と接触する医療従事者に対しては、曝露のリスクに応じて、狂犬病ワクチンによる曝露後免疫、曝露前免疫の実施を検討する必要がある。(菅沼)。

#### 5) 野兔病の病原性発現機構の解析：

野兔病菌は非常に高い感染性と病原性を有しており、野兔病菌病原因子や発症機序の解明は公衆衛生上重要である。これまでに、マウス継代を用いて野兔病菌の弱毒株と強毒株のゲノム比較解析から、弱毒株は *pdpC* 遺伝子内の 1 塩基欠損により、マウス病原性が消失している事を明らかにした。本研究では、野兔病菌 *pdpC* 遺伝子が関与している他の病原遺伝子を同定、又は新たな病原遺伝子を同定する事を目的とし、弱毒株と強毒株の遺伝子発現比較解析を試みた。昨年度は、野兔病菌のタンパク質をコードする 1604 遺伝子中で 21 遺伝子が有意に発現変動している事を明らかにした。本年度は、このマイクロアレイ解析について詳細に再検討を行った結果、強毒株では一部の tRNA が強く発現しており、菌体内で病原遺伝子候補を含むタンパク質の生合成が活発である可能性が示唆された。また、弱毒株と強毒株では、6 遺伝子(*Isflu1*, *hupB*, *usp*, *FTT\_1140*, *FTT\_0272*, *FTT\_965c*)の発現量差異が確認された。この事から、これら 6 遺伝子は新たな病原性関連遺伝子である可能性が示唆された。

(宇田)。

#### 6) 動物由来細菌性腸管感染症の感染制御に関する研究：

乳児の糞便を無菌 (GF) マウスに経口投与して作出したノトバイオト (GB) マウスにおいて、EHEC 感染に抵抗性を示す GB マウスの存在を明らかにしてきた。本研究では GF マウスに EHEC 感染に対する抵抗性を付与できる機構の解析を試みた。その結果乳児の糞便に存在する *Bifidobacterium* の菌種や菌株の中に EHEC による感染死を抑制する効果を有するものがあることが明らかになった。特に *B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 (*B. infantis* 157F) には抑制効

果があることを明らかにした(山田)。

7)食虫目、翼手目等のハンタウイルス等の分子疫学情報の蓄積:

ハンタウイルスの分子疫学情報の蓄積のため、モンゴル、ベトナム、ミャンマー、日本およびロシアの野生小型哺乳類のハンタウイルス感染状況を昨年度に引き続き解析した。その結果、これまでに明らかになっている齧歯目、トガリネズミ形目、および翼手目のハンタウイルスの解析から、ハンタウイルスはユーラシア大陸で誕生したと推測された。また、これらの小動物からウイルス分離・同定を行った結果、ベトナムの翼手目から3株の新規翼手目ヘルペスウイルス、北海道のヒメネズミから新規の齧歯目ヘルペスウイルスが分離・同定された。新規ウイルスを分離するツールとして齧歯目、トガリネズミ形目、翼手目の初代培養細胞の分離を広く行い、新たにヒミズ(*Urotrichus talpoides*)の初代培養細胞の分離に成功した(新井)。

8)中東呼吸器症候群(MERS)の血清診断法:

MERSは2012年にサウジアラビアで新興した新型のコロナウイルス(CoV)による新興感染症で、ヒトコブラクダが感染源とされている。MERS-CoVの血清疫学、ヒトへの感染経路については未だ不明な点が多く、また、MERS-CoVがラットなどの実験用小動物にどの程度可能なのか等、宿主域について知見が十分に得られていない。本研究ではMERS-CoVのVSVシュードタイプを作製し、MERS-CoVに対する中和抗体測定法を開発した。また、VSVシュードタイプを用いた解析から、MERS-CoVのラットへの感染効率は低いことが明らかとなった。(福士)。

9)コリネバクテリウムに関する研究:

ジフテリア様の症状を示すジフテリア毒素産生性の *Corynebacterium ulcerans*(*C. ulcerans*)による感染症について、リンパ節膿瘍を示す6歳の女児での新規1症例が報告された。この患者からの分離菌株は、本邦初発例と類似のMLSTタイプに属した。動物における疫学調査から、シカが自然界の保菌動物として重要で、シカからウシやネコなどが感染して、ネコが人への感染源の一つと考えられた。*C. ulcerans*, *C. diphtheriae* および *C. pseudotuberculosis* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から鑑別するマルチプレックスPCR法を昨年度開発したが、汎用するには改良が必要なが判明した。また、マウス *C. ulcerans* 感染モデルを用いてIgM抗体が検出された。(山本)。

10)野生動物の動物由来感染症病原体の保有状況の網羅的調査:

野生動物や伴侶動物には未だ知られていない感染症が多く存在する。また、ウイルスが分離されていてもその生活環が不明なものもある。本研究では、新規ウイルスの野生動物での感染状況の調査と新規動物保有のウイルスの検出を行った。本年度は、新規に同定したラブドウイルス科のニシムロウイルスのイノシシでの疫学調査を行い地域により感染率が大きく異なることを明らかにした。イノシシ由来の新規フレボウイルスは全国に蔓延していることが明らかとなった。また、マダニ由来新規トーチウイルスのイノシシでの疫学調査を実施した結果、西日本では多くが感染しているが東日本には神韻していないことが明らかとなった。更に、新規血清型フェレットコロナウイルス、イノシシやシカ、ダニから新規フラビウイルスを同定した(前田)。

11)古典的回帰熱の新規抗体検査抗原の確立のための研究:



ボレリア属細菌は大腸菌等で血清型決定基となるような LPS を持たないこと、また鞭毛抗原遺伝子は高度に保存されていること等から、これらをもとにした血清型による型別や感染病原体種の血清学的同定が不可能であり、ボレリア感染症においては抗体検査によってその感染種の同定は困難とされてきた。しかしながら、ゲノム解析技術の向上により、回帰熱群特異的抗原や新興回帰熱群特異的抗原が *in silico* 解析で抽出できるようになってきた。本研究では、候補として選定した 59 orfs の内 44 orfs (74.5%) を大腸菌を用いて単離・発現させた。これらの組換え抗原を用いて、まず、回帰熱群ボレリア、新興回帰熱ボレリア、ライム病群ボレリアを感染させたマウス血清を用いて抗体が誘導される抗原の選定・絞り込みを行う予定である（川端）。

#### 1 2 )動物由来新興ヒトバベシア症原虫の国内感染実態の解明：

ヒトバベシア症は、マダニ媒介性の人獣共通感染症である。世界的には、米国の *B. microti* と欧州の *B. divergens* が主要因であるが、流行地域以外での近縁種や新種が患者から相次いでみつかри、新興感染症として注目されている。本研究では、日本に存在しないとされていた *B. divergens* を初めてシカから検出し、全国的に分布している事を明らかにした。また、分子疫学的解析から、本原虫は欧州、米国と同じクレードに属する原虫であり、今後、感染患者が発生する可能性が示唆された。さらに、米国の *B. microti* と同系統である *B. microti* US-type4 株ををシュルツマダニから国内で初めて分離した。分離株は遺伝的、抗原的に野ネズミ由来の原虫と同一であり、シュルツマダニが自然界での媒介種であることが明らかになった（新倉）。

#### D. 考察：

新興・再興感染症の大部分が動物由来感染症である。これらのうち国内で稀にしか発生していない、あるいは現在発生のない動物由来感染症について、ヒトへの感染リスクを評価するために必要な知見を集積する必要がある。新興動物感染症病原体のうち霊長類に致死的感染症を起すもの、全く新規に動物で同定されたウイルス感染症などは、科学的にヒトへのリスクを評価するための知見を集積する。宿主域が拡大し、本来の宿主動物から霊長類にまで致死的感染症をおこすようになったものに関しても、人へのリスクを評価する必要がある。さらに、これらの感染症が国内で発生した場合の診断・迅速検査法を確立する。動物の常在細菌や環境中の菌等から病原性腸内細菌に対し抗菌作用を示す菌種を探索する。これらにより総合的に動物由来感染症対策の体制整備を目指すことを目的とする。

本研究計画は3年間にわたる研究で、今年度は2年度にあたる。結果に記載したように、対象とするモルビリウイルス、サルレットウイルス、狂犬病ウイルス、新興コロナウイルス、ハンタウイルス、野兔病菌、コリネバクテリウムに関しては、ほぼ当初の研究計画の予定の結果を得ている。また、*Bifidobacterium* の特定の菌株には *E. coli* O157:H7 感染防御効果があることが判明した。さらに、国内外の野生動物から動物由来感染症病原体の保有状況の網羅的調査を行い、国内の野生動物・節足動物間で、新規ラプトウイルス・フレボウイルス・トーゴトウイルス・フラビウイルスが蔓延していることが判明した。また、フェレットコロナウイルス等まだ未知のコロナウイルスが存在することが確認された。北海道のヒメネズミ及びベトナムの翼手目から新規ヘルペスウイルス4株が分離された。これらの検出系についても確立したモニに関しては疫学的調査も実施された。日

本に存在しないとされていた *B. divergens* をはじめてシカから検出し、全国的に分布している事を明らかにした。シュルツマダニが *B. microti* US-type の自然界での媒介種であることが判明した。これらのことから、今後、国内でもヒトバベシア症が発生するリスクがあると思われた。

#### E. 結論

(1)サルに致死性の流行を起こしたイヌジステンパーウイルスをクローン化したプラスミドから RG により回収して性状を調べた。また、新規ネコモルビリウイルスが国内のネコでも 20% 以上が感染し一部は持続感染する。ウイルスには 3 遺伝子型があるが地理的分布とは一致しない。(2)ニホンザルに致死的なレトロウイルス SRV4 を RG で回収し病気が引き起こされること、受容体 (ASCT2) を同定した。(3)狂犬病の固定毒と街上市毒の G 蛋白質の細胞内局在と粒子形成に G 蛋白質の糖鎖修飾が重要な役割を果たすことが分かった。(4) MERS コロナウイルスの S 蛋白を外殻した VSV シュードタイプによる中和抗体測定法を開発し、ラットの dipeptidyl peptidase 4 (Dpp4) がレセプターとして機能しないことが分かった。(5)野兎病菌の新規病原体遺伝子 *pdpC* 遺伝子の機能を解析するため、*pdpC* 遺伝子欠損弱毒株と強毒株の遺伝子発現プロファイルを比較し、6 遺伝子の発現レベルが異なることを見出した。(6)国内の野生動物・節足動物間で、新規ラブドウイルス・フレボウイルス・トゴトウイルス・フラビウイルスが蔓延していることが判明した。また、フェレットコロナウイルスに認められるようにまだまだ未知のコロナウイルスが存在することが確認された。北海道のヒメネズミ及びベトナムの翼手目から新規ヘルペスウイルス 4 株が分離された。(7)齧歯目、トガリネズミ形目、および翼手目のハンタウイルスの解析から、ハンタウイルスはユーラシア大陸で誕生したと推測された。(8)抗体検査によってその感染種の同定は困難とされているボレリア感染症において、in silico 解析により回帰熱群特異的抗原や新興回帰熱群特異的抗原を推定し、大腸菌で組換え抗原を作製した。(9) *Bifidobacterium* の特定の菌株には *E. coli* O157:H7 感染防御効果があることが判明した。(10)シカが *Corynebacterium ulcerans* の自然界の保菌者でネコ等に感染させ、ネコが人への感染源の一つになることが

示唆された。(11)日本に存在しないとされていた *B. divergens* をはじめてシカから検出し、全国的に分布している事を明らかにした。シュルツマダニが *B. microti* US-type の自然界での媒介種であることが判明した。今後ヒトバベシア症が国内でも発生するリスクがある。(11)ヒト狂犬病のこれまでの Milwaukee rabies protocol による救命 8 症例を参考に現時点で行い得る治療法、院内感染対策などに関してまとめた。

#### F. 健康危険情報

サルでの CDV 感染症の流行は 2008 年以降報告されていない。また、SRV4 によるニホンザルの致死性血小板減少症も京都大学霊長類研究所では制御されている。SRV5 によるニホンザルの致死性血小板減少症が確認された。これらのヒトへの感染例は未だ報告されていない。狂犬病は、これまで日本と同様清浄国とされていた台湾で、野生動物のイタチアナグマで流行しているが、イヌへの感染は 1 例にとどまっている。

#### G. 研究発表

各研究分担者及び「III. 研究成果の刊行に関する一覧表」に記載した。

厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )

分担研究課題：新興モルビリウイルスの病原性と動物由来新興  
ウイルスの国内疫学と総括

研究分担者：森川 茂 ( 国立感染症研究所獣医科学部部長 )

研究協力者：朴ウンシル、鈴木道雄、木村昌伸、今岡浩一 ( 同獣医科学部 )、河合康洋、網康至、山田靖子 ( 同、実験動物管理室 )、吉河智城、西條政幸 ( 同、ウイルス第一部 )、酒井宏治、竹田誠 ( 同、ウイルス第三部 )、阪井弘治、俣野哲朗 ( 同、エイズ研究センター )、永田典代、岩田奈緒子、鈴木忠樹、長谷川秀樹 ( 同、感染病理部 )、久保田菜美、齊藤隆一、水谷浩志、丸山啓二 ( 東京都動物愛護センター )、古谷哲也、水谷哲也 ( 東京農工大 )

研究要旨：新興・再興感染症の大部分は動物由来感染症である。サルの新興モルビリウイルス感染症はイヌジステンパーウイルス(CDV)による。この CDV をリバーシジェネティクスにより回収し、元の CDV と同様イヌ、マカク属サル SLAM により感染することを確認した。CDV 感受性マウスモデル作製のため、マカク属サル SLAM / nectin4 TG マウス作出が進展した。一方、近年新興ウイルスとして同定されたネコモルビリウイルスの国内のネコにおける抗体陽性率、ウイルス感染率を明らかにし、日本でもネコモルビリウイルスが浸淫していることが明らかとなった。ネコモルビリウイルス感染ネコのほとんどが腎炎陽性であったが、腎疾患との有意な関連は未だ得られていない。ネコモルビリウイルスに近縁なウイルスが他種動物やヒトに存在するかの不明であり、今後の調査が必要である。

A. 研究目的：

ほとんどの新興・再興感染症は動物由来感染症であることから、その対応には既に新興・再興感染症として顕在化したものだけでなく、宿主域を拡大するなど人の新興感染症になり得ると考えられる動物感染

症も対象とした研究が求められる。パラミクソウイルス科のモルビリウイルスは、宿主域を拡大し易いウイルスと考えられている。実際、ウイルスの遺伝的解析等から、麻疹ウイルスは牛痘の原因ウイルスであるリンダーペストウイルスがヒトへ馴化した

ことが明らかとなっている。また、イヌ類を自然宿主とする犬ジステンパーウイルス (Canine Distemper Virus, CDV) は、自然界で宿主域を拡大し、多くの野生動物に致死感染を引き起こし、ライオン、トラ、パンダなどにも甚大な被害が出ている。さらに宿主域を拡大し、中国、日本などでマカク属サルに大規模な致死感染の流行を引き起こしている。サルに致死感染する CDV は、イヌなどから分離された CDV と比較して保存された 19 箇所のアミノ酸に変異がある。また、マカク属サルではリンパ球のレセプター SLAM が CDV に親和性があり感受性がある。サルから分離された CDV は、イヌでも高い病原性を示すことから、CDV がサルにまで宿主域を拡大した理由は、19 箇所のアミノ酸変異によりウイルスの病原性が高まっている可能性が示唆された。一方、サルから分離された CDV は H 蛋白の 1 アミノ酸の変異により容易にヒト SLAM を効率よく利用できるようになることから人の新興感染症となるリスクがある。

本研究では、サルから分離された CDV の遺伝子改変を可能にするためリバーシジェネティクスにより感染性ウイルスを作製し、強毒化に関わる変異を同定することを最終目的とする。また、病原性解析には小動物モデル系が必須であるため、マカク属サルの SLAM と上皮細胞レセプターである Nectin4 を knock in/knock out した B6 マウスを作製する。これらを用いて CDV の宿主域拡大に関わる遺伝的変異を明らかにし、将

来ヒトへの感染域拡大に繋がる可能性を明らかにすることを目的とする。

一方、2012 年に新規のモルビリウイルスとしてネコモルビリウイルス (feline morbillivirus; FCoV) が分離同定された。本ウイルスは、これまで全く未同定のウイルスであったため、近縁なウイルスが他種動物やヒトに感染しているのか否かも不明で、感染症との関連も不明である。そこで、国内のネコへのネコモルビリウイルスの浸淫状況を調査し、感染症との関連を明らかにすることを目的とした。

## B. 材料と方法：

### 1) サルでの CDV 感染症流行後期の CDV のカニクイザル感染実験：

これまで流行初期のサルから分離されたウイルスの感染実験によりサルが全身感染することが分かっている。そこで、流行後期のサル由来ウイルスの感染実験を行った。

### 2) サルから分離された CDV のリバーシジェネティクス：

CDV のリバーシジェネティクスは、基本的に麻疹ウイルスで用いられている方法を用いた。ウイルス RNA 転写用の T7promoter-CDV-CYN07-dV-cDNA-delta ribozyme、ウイルス蛋白発現用の pKS336-CDV-CYN07-dV-NP, pKS336-CDV-CYN07-dV-P, pKS336-CDV-CYN07-dV-L を作製し、これらを T7-polymerase 発現 BHK 細胞に cotransfection する。トランスフェクションした細胞に CDV 感受性の dogSLAM

発現 Vero 細胞を重層して培養し、ウイルスを回収する。

3) マカク属 SLAM knock-in マウス作製用ベクターの作製 :

大野らがヒト SLAM knock-in マウス作製に用いたベクター pTK2-5 (JVI 81:1650-59, 2007) をベースに V domain をコードする exon 2 をマカク属 SLAM に入れ替えた。この targeting vector をマウス ES 細胞に導入し、マカク SLAM を発現する ES 細胞を相同組換えにより作製し、キメラマウスを作出して、最終的にマカク SLAM 発現マウスを作製する。必要に応じて I 型インターフェロンレセプター欠損も導入する。

4) マカク属 nectin4 トランスジェニックマウス作製用ベクターの作製 :

Nectin4 に関しては、上皮系でのみ発現するため targeting vector、CAG promoter-stop-cassette-mNectin4、を作製した。この targeting vector をマウス nectin4 KO-ES 細胞にベクターを導入し TG マウスを作製する。本 TG マウスでは、Tamoxifen 投与により Keratin14-CreERT2 が上皮細胞特異的に核内移行し、stop-cassette 除去。その結果、macNectin4 を発現するマウスとなると予想される。

5) FCoV 抗体検出系の確立と血清疫学と FCoV 感染ネコからのウイルス遺伝子検出 :

FCoV NP 発現 HeLa 細胞を樹立し、塗抹標本を作製して間接蛍光抗体法用抗原とした。本抗原により国内のネコの血清抗体を

調べた。FCoV 抗体陽性、抗体陰性ネコの尿から RT-PCR によりウイルス遺伝子を検出した。

(倫理面からの配慮について)

遺伝子組換え実験では機関承認及び大臣確認実験として承認を受け、動物実験にあたっては国立感染症研究所動物実験委員会に申請し承認されている。

C. 結果 :

1) 流行後期のサル由来 CDV の感染実験 :

サルでの流行後期には、初期の CDV の遺伝子配列に 11 塩基の変異が蓄積したことが分かっている。そこで、流行後期に分離された CDV CYN11-dV 株を 2 頭のカニクイザルに実験感染した。その結果、流行初期のサル由来 CDV CYN07-dV 株と同様のリンパ球 viremia をおこした。全身感染に関しては現在病理組織学的に解析中である。

2) サルから分離された CDV のリバーシジェネティクス :

T7promoter-CDV-CYN07-dV-cDNA-delta ribozyme のコンストラクトを作製した。全塩基配列を決定し、変異がないことを確認した。タンパク発現様プラスミドとして、NP, P, L を発現する pKS336-CDV-CYN07-dV-NP, pKS336-CDV-CYN07-dV-P, pKS336-CDV-CYN07-dV-L を作製した。これらの遺伝子配列を決定し、変異がないことを確認した。これらのプラスミドを T7-polymerase 発現 BHK 細胞へ導入し、dogSLAM 発現 Vero 細胞を重層して培養し

たところ、CDV 特異的な CPE が出現し感染性ウイルスが回収された。回収された CDV CYN07-dVRG は、発症したカニクイザルから分離された CDV CYN07-dV 株と同様、dogSLAM, macSLAM を介した感染と細胞融合をおこしたが、humanSLAM を介した感染、細胞融合は起こさなかったことから、親株の CDV の性状を持ったウイルスが回収されたと考えられる。回収されたウイルスはカニクイザルのリンパ球に感染することが確認された。

### 3) サルから分離された CDV 等の病原性解析可能な小動物モデル系の開発：

カニクイザルから分離された CDV CYN07-dV 株は、サルに全身感染を起すが、本株の病原性に関与する遺伝子変異を解析するにはリバーシジェネティクスにより CDV CYN07-dV 株と犬由来 CDV 株などとの種々のキメラ CDV や変異導入 CDV を作製して病原性を比較する必要がある。カニクイザルを用いてこれらの解析をするためには莫大な予算が必要で、実質的に実施できる状況にない。CDV は、免疫系細胞では SLAM を、上皮系細胞等では nectin4 をレセプターとして感染するため、小動物代替モデルとして、マカク属サル SLAM 及び nectin4 発現マウスの作製を試みた。マカク属サル SLAM は、大野らが humanSLAM knock-in マウス作製に用いたベクター pTK2-5 (JVI 81:1650-59, 2007) をベースに V domain をコードする exon 2 をマカク属

SLAM に入れ替えた。V domain の N 末端の 2 アミノ酸をヒトや他の霊長類(28R, 49Y)型からマカク属サルの 28 H, 49 H に置換するため、部位特異変異により pTK2-5 のヒト SLAM exon2 に C273T, A339G の変異を導入した。これをベースに targeting vector を作製し、マウス ES 細胞株を樹立するため IDG26.10-3ES 細胞に transfection して、300 クローン選択して相同組換えの有無を確認している。マカク属 nectin4-TG マウス作製には、conditional expression vector である pEx-CAG-stop-bpA に macNectin4 cDNA を挿入した。IDG26.10-3ES 細胞の Rosa26 遺伝子座のアクセプターアレルの hygromycin 耐性遺伝子部位を DNA 組換え配列(att 配列)による組み換えを行う。macSLAM<sup>KI/+</sup>IDG26.10-3ES 細胞に pEx-CAG-stop-bpA-macNectin4 と BP クロナーゼ発現 pCAG-C31 Int と cotransfection し、G418 選択後にマカク属 nectin4 が相同組換えされた細胞(macSLAM<sup>KI/+</sup>,macNectin4<sup>+/-</sup> IDG26.10-3ES 細胞)を選択している(図 2)。ES 細胞での組換えを確認後マウスを作製する。これまでに作製した I 型インターフェロンレセプター-KO マウスと交配して、mac-SLAM, -nectin4 発現/InfaR(-/-)マウスを最終的に作出する。このマウスを作出後に、CDV 感染実験を行う。

### 4) ネコモルビリウイルス (FMoV) 感染ネコの調査：

FMoV NP 発現 HeLa 細胞を樹立し、細胞

塗抹標本を抗原として間接蛍光抗体法 (IF) を行った。この IF では CDV 感染イヌ血清は反応しないことから、血清学的に CDV とは交差しないと考えられる。

動物愛護センターで採取されたネコ血清 100 検体中 21 検体(21%)が抗体陽性であった(表1)。一方、これらの腎組織あるいは尿からの FMoV 遺伝子検出を RT-PCR あるいは nested RT-PCR で行った結果、100 匹中 22 匹(22%)が遺伝子陽性で、FMoV に感染していた。遺伝子陽性 22 検体中腎及び尿で陽性を示したのが 13 検体、尿のみ陽性が 4 検体、腎組織のみ陽性が 5 検体であった。また、FMoV 遺伝子のみ陽性、FMoV 遺伝子及び抗体陽性、抗体のみ陽性の検体があった。

病理組織学的に RT-PCR 陽性 22 検体と RT-PCR 陰性/抗体陽性 7 検体の腎組織を解析した結果、RT-PCR 陽性 22 検体中 13 検体(77%)、RT-PCR 陰性/抗体陽性 7 匹中 2 匹(53%)で中度から重度の間質性腎炎が認められた(表1)。この内、免疫組織染色法により病変部位で FMoV 抗原が認められたのは RT-PCR 陽性の 4 検体のみであった(図3)。この 4 検体の 3 検体に関してより詳細に検討した結果、いずれも慢性間質性腎炎が認められ、病変部の尿細管に FMoV 抗原が認められ、1 検体は移行上皮細胞が抗原陽性であった。なお、RT-PCR 陰性/抗体陽性 7 検体の腎組織には、いずれも免疫組織染色では FMoV 抗原が認められた(表1)。

#### 5) 国内の FMoV の分子系統樹解析：

FMoV 遺伝子陽性検体の L 遺伝子の部分配列に基づく分子系統樹解析を行った結果(図4)、香港株 FMoV 3 株(M252A, 761U, 776U)と日本の株は、3つの遺伝子型に分けられるが、地理的分布と遺伝子型は一致しなかった。

#### D. 考察：

CDV は宿主域を拡大し、ライオン、トラ、パンダや種々の野生動物が感染し死亡している。2008 年には CDV はマカク属のサルへも感染域を拡大し、大規模な致死感染症を起こしていることから、ヒトへの感染リスクも危惧された。これまでに、1)サルから分離された CDV は、イヌ、サルの SLAM 及びイヌ、サル、ヒトの nectin4 をレセプターとして感染する、2)H 蛋白の 541 位の近傍の 1 アミノ酸変異でヒトの SLAM をレセプターとして利用できるようになる、3)イヌ由来 CDV も同様の感染域を持つ、4)サル由来 CDV は、イヌにも強い病原性を示す、5)サルでの流行後期には、流行初期の CDV の遺伝子配列に 11 塩基の変異が蓄積したことが分かっている。また、海外で行われた犬由来 CDV のサル感染実験では、リンパ球には感染するが上皮系細胞には感染が広がらないとの報告がある。これらから、本来 CDV はマカク属サルのリンパ球に SLAM を介して感染するが、サルで

流行した CDV は強毒であったと考えられる。サル由来 CDV はイヌ由来 CDV と比較して多くの変異が認められるが、その原因は不明である。今回の研究では、サルでの流行後期の CDV 株のサルへの感染実験を行ったが、現時点では病理組織学的解析の途中で結論が出ていないため、流行後期のウイルスへの遺伝子変異の蓄積が病原性と関連するかは不明であるため、来年度に結論を出したい。サルに病原性を示す CDV の病原性に関与する遺伝的変異を明らかにすることは、リスク評価の上からも重要であるため、サル由来 CDV をリバーシジェネティックス (RG) により感染性ウイルスを回収した。現時点ではサルのリンパ球に効率よく感染することが分かったため、サルへの感染実験により元の CDV と同様の病原性を有するかを明らかにしたい。その上で、イヌ由来 CDV とのキメラウイルスを RG により回収する予定である。また、病原性比較には多くの動物感染実験が必要であることから、CDV 感受性マウスを作出している。マカク属 SLAM knock-in、マカク属 nectin4 TG の ES 細胞クローンを得ているため、マウス作成を来年度行いたい。また、既に InfaR(-/-)マウスを作製したので、InfaR(-/-)も導入予定である。

一方、近年分離同定された新規ネコモルビリウイルスの国内のネコにおける抗体陽性率、ウイルス遺伝子陽性率を継続して調査した結果、抗体陽性率、ウイルス遺伝子陽性率は共に 20%程度と、国内のネコにお

けるネコモルビリウイルス感染率は高かった。抗体陽性、遺伝子陰性の腎組織で免疫組織染色法では抗原陽性の検体が多かったこと、遺伝子陽性で抗体陽性の検体が多いことから、本ウイルスが持続感染することがわかった。感染ネコのほとんどが間質性腎炎陽性であるが、現時点では本ウイルスと疾患との関連は明らかでない。これまでの予備調査では、本ウイルスの抗体陽性のイヌは見出されていないが、動物種、検体数を増やして調査する予定である。

#### E. 結論

サルの致死性感染症の流行の原因となった CDV は病原性が高い。その原因を解析するために RG によりウイルスを回収した。CDV の病原性を解析するためのマウスモデルとしてマカク属サル SLAM / nectin4 TG マウスの作出が進展した。

ネコモルビリウイルスは国内のネコにおいても 20%程度に感染し、さらに多くが持続感染している。ウイルスは遺伝的に 3 型に分けられるが、地理的分布とは一致しない。本ウイルスと疾患との関連に関してはさらなる研究が必要である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Paola Katrina G. Ching, Vikki Carr de los



- Reyes, Maria Nemia Sualdito, Enrique Tayag, Alah Baby Columna-Vingno, Fedelino F. Malbas, Gilbert C. Bolo, James J. Sejvar, Debbie Eagles, Geoffrey Playford, Erica Dueger, Yoshihiro Kaku, Shigeru Morikawa, Makoto Kuroda, Glenn A. Marsh, Sam McCullough, and A. Ruth Foxwell. Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines. *Emerg Infect Dis.* 2015, 21(5), 21(2):328-31. DOI: 10.3201/eid2102.141433
- 2) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):423-7.
- 3) Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H. Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. *J Gen Virol.* 2014 Oct 15. pii: vir.0.070219-0. doi: 10.1099/vir.0.070219-0.
- 4) David Nadeba Bukbuk, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Koichiro Iha, Aiko Fukuma, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Francis Kasolo, Saka Saheed Baba. Development and Validation of Serological Assays for Viral Hemorrhagic Fevers and Determination of Prevalence of Rift Valley Fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014 Oct 24. pii: tru163. PMID: 25344695
- 5) Eun-Sil Park, Michio Suzuki, Masanobu Kimura, Keiji Maruyama, Hiroshi Mizutani, Ryuichi Saito, Nami Kubota, Tetsuya Furuya, Tetsuya Mizutani, Koichi Imaoka, Shigeru Morikawa. Identification of a natural recombination in the F and H genes of feline morbillivirus. *Virology*, 2014, 468-470: 524-531
- 6) Noriyo Nagata, Masayuki Saijo, Michiyo Kataoka, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Yuko Sato, Naoko Iwata-Yoshikawa, Momoko Ogata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata, and Hideki Hasegawa. Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey. *Int J Clin Exp Pathol* 2014, 7(7):4359-4370.
- 7) Tomoki Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Shoichi Toda, Yukie Shimazu, Koji Yano, Toshiharu Morimitsu, Katsuyuki Ando, Akira Yoshikawa, Miki Kan, Nobuyuki Kato, Takumi Motoya, Tsuyoshi Kuzuguchi, Yasuhiro Nishino, Hideo Osako, Takahiro Yumisashi, Kouji

- Kida, Fumie Suzuki, Hirokazu Takimoto, Hiroaki Kitamoto, Ken Maeda, Toru Takahashi, Takuya Yamagishi, Kazunori Oishi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, and Masayuki Shimojima. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J. Clin. Microbiol.* 2014 Sep;52(9):3325-33.
- 8) Aya Zamoto-Niikura, Masayoshi Tsuji, Koichi Imaoka, Masanobu Kimura, Shigeru Morikawa, Patricia J. Holman, Haruyuki Hirata, and Chiaki Ishihara. Sika Deer Carrying *Babesia* Parasites Closely Related to *B. divergens*, Japan. *EID*, 2014, 20(8):1398-1400.
- 9) Sunohara M, Morikawa S, Fuse A, Sato I. GATA-dependent regulation of TPO-induced c-mpl gene expression during megakaryopoiesis. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2014;90(4):101-6. PMID: 24815109
- 10) Naoko Iwata-Yoshikawa, Akihiko Uda, Tadaki Suzuki, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa and Noriyo Nagata. Effects of Toll-Like Receptor Stimulation on Eosinophilic Infiltration in Lungs of BALB/c Mice Immunized with UV-Inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus Vaccine. *J. Virol.* 2014, 88(15):8597-8614. DOI: 10.1128/JVI.00983-14.
- 11) Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular stomatitis virus. *J Virol.* 2014, 88(13):7317-7330. DOI:10.1128/JVI.00512-14.
- 12) Yamanaka A, Iwakiri A, Yoshikawa T, Sakai K, Singh H, Himeji D, Kikuchi I, Ueda A, Yamamoto S, Miura M, Shioyama Y, Kawano K, Nagaishi T, Saito M, Minomo M, Iwamoto N, Hidaka Y, Sohma H, Kobayashi T, Kanai Y, Kawagishi T, Nagata N, Fukushi S, Mizutani T, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurane I, Kageyama T, Odagiri T, Saijo M, Morikawa S. Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. *PLoS One.* 2014 Mar 25;9(3):e92777. doi: 10.1371/journal.pone.0092777.
- 13) Uda A, Sekizuka T, Tanabayashi K, Fujita O, Kuroda M, Hotta A, Sugiura N, Sharma N, Morikawa S, Yamada A. Role of Pathogenicity Determinant Protein C (PdpC) in Determining the Virulence of the *Francisella tularensis* Subspecies

- tularensis SCHU. PLoS One. 2014 Feb 18;9(2):e89075.
- 14) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akihiko Uda, Osamu Fujita, Toshio Mizoguchi, Junji Shindo, Chun-Ho Park, Noboru Kudo, Hitoshi Hatai, Toshifumi Oyamada, Akio Yamada, Shigeru Morikawa, and Kiyoshi Tanabayashi. Serosurveillance for Francisella tularensis among wild animals in Japan using a newly developed competitive ELISA. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2014 Apr;14(4):234-9
  - 15) Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, et al. , Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. J Inf Dis., 2014 Mar;209(6):816-27.
2. 学会発表
1. 堀田明豊、棚林清、山田章雄、森川茂. 国内の医師および獣医師への One Health についての意識調査.第 157 回日本獣医学会学術集会, 北海道, 2014 年 9 月
  2. 堀田明豊,木村昌伸,中村幸子,片山敦司,中下留美子,坪田敏男,猪島康雄,鈴木道雄,今岡浩一,棚林清,藤田修,山本美江,宇田晶彦,森川茂. 2007 年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス ( SFTSV ) に対する抗体調
  3. 堀田明豊、木村昌伸、坪田敏男、中村幸子、片山敦司、中下留美子、猪島康雄、鈴木道雄、今岡浩一、棚林清、藤田修、山本美江、宇田晶彦、森川茂.「2007 年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス ( SFTSV ) に対する抗体調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  4. 藤田修、宇田晶彦、木村昌伸、藤田博己、今岡浩一、森川茂. 「ニホンジカから採取したマダニ類のウイルス遺伝子保有状況からみた自然界における SFTS ウイルス維持様式の検討」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  5. 森川茂、木村昌伸、堀田明豊、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、野口章、井上智、今岡浩一、前田健. 「野生のシカにおける SFTS ウイルス抗体調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  6. 浜崎千菜美、鍬田龍星、野口慧多、寺田豊、下田宙、高野愛、鈴木和男、森川茂、前田健. 「野生動物における SFTS ウイルス感染の疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  7. 松本苑子、橋野正紀、鈴木尋、高野愛、藤田修、堀田明豊、森川茂、高田伸弘、

- 渡邊健太、清水隆、度会雅久. 「ダニにおける *Francisella tularensis* の全国的疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
8. 堀田明豊、棚林清、山田章雄、森川茂. 「国内の医師および獣医師への One Health についての意識調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
9. 加来義浩、奥谷晶子、河合康洋、野口章、濱本紀子、梁瀬徹、加藤友子、新井智、井上智、森川茂. 「国内で分離された未分類のラプトウイルスの遺伝学的解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
10. 新倉綾、森川茂、平田晴之、石原智明. 「北海道のシュルツマダニ *Ixodes persulcatus* から分離された *Babesia microti* の性状解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
11. 新井智、池山優、Boldgiv Bazartseren、Boldbaatar Bazartseren、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、森川茂、Yanagihara Richard、大石和徳. 「モンゴルのトガリネズミに確認された遺伝的に異なるハンタウイルスの共循環」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
12. 池山優、新井智、Kang Haeji、大館智志、Taylor Kyle、中田圭亮、雲野明、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、森川茂、Yanagihara Richard、大石和徳. 「Sarufutsu virus ; オオアシトガリネズミに感染を確認した新規ハンタウイルス」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
13. 朴ウンシル、鈴木道雄、木村昌伸、丸山啓二、水谷浩志、斉藤隆一、久保田菜美、古谷哲也、水谷哲也、今岡浩一、森川茂「日本のネコにおける新規モルビリウイルス(*feline morbillivirus, FMV*)の疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
14. 森川茂、朴 ウンシル、今岡 浩一、前田 健、宇田 晶彦. 「SFTS ウイルスの生活環における野生のシカの役割」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
15. 西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸. 「重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
16. 前田健、濱崎千菜美、下田宙、鍬田龍星、野口慧多、米満研三、高野愛、鈴木和男、森川茂. 「SFTS ウイルスの生活環における動物の重要性」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
17. 朴ウンシル、佐藤由子、中島典子、古谷哲也、水谷哲也、今岡浩一、森川茂.

- 「日本国内ネコにおける新規モルビリウイルス (feline morbillivirus, FMV) の疫学調査」 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
18. 河内健吾、氏家誠、谷英樹、森川茂、田口文広. 「Baculovirus を用いた牛 Torovirus の可溶性 HemagglutininEsterase protein の発現」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
19. 新井智、池山優、Se Hun Gu、Son Truong Nguyen、福井大、大館智志、吉川泰弘、森川茂、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、Richard Yanagihara、大石和徳. 「ベトナムの翼手目由来に確認されたハンタウイルスの多様性」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
20. 谷英樹、谷口怜、福間藍子、福士秀悦、森川茂、下島昌幸、西條政幸. 「重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP の細胞融合能と 25-hydroxycholesterol による感染阻害効果」 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
21. 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、江川和孝、下島昌幸、森川茂、西條政幸. 「ワクシニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立」 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
22. Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma<sup>1</sup> Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani<sup>1</sup> Tomoyuki Yoshikawa, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in domestic and wild animals in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
23. Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Masayuki Shimojim<sup>1</sup>, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
24. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Analyses of cell entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus using pseudotype vesicular stomatitis virus system. XVIIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
25. Akihiko Uda, Hiroki Kawabata, Shuetsu Fukushi, Yoshiharu Kaku, Masayuki

- |   |  |
|---|--|
| Shimojima, Shuji Ando, Ken Maeda,   | なし   |
| Hiromi Fujita, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Sawabe Kyoko. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July-1Aug 2014.   | 1. 特許取得<br>なし<br>2. 実用新案登録<br>なし<br>3. その他<br>なし |
| 26. Yu Ikeyama, Satoru Arai, Bazartseren Boldgiv, Bazartseren Boldbaatar, Kazuko Araki, Hiroshi Satoh, Keiko Tanaka-Taya, Shigeru Morikawa, Richard Yanagihara, Kazunori Oishi. Co-circulation of two distinct divergent hantaviruses in Sorex species in Mongolia. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014  |  |
| 27. Shigeru Morikawa, Akihiko Uda, Masanobu Kimura, Kawabata, Hiroki, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Shuji Ando, Sawabe Kyoko, Hiromi Fujita, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in animals and ticks in Japan. The 10 <sup>th</sup> China-Japan International Conference of Virology, Changchun, China, Aug25-28 2014. |  |

H. 知的財産権の出願・登録状況

図1 . モルビリウイルスとCDV の宿主域拡大

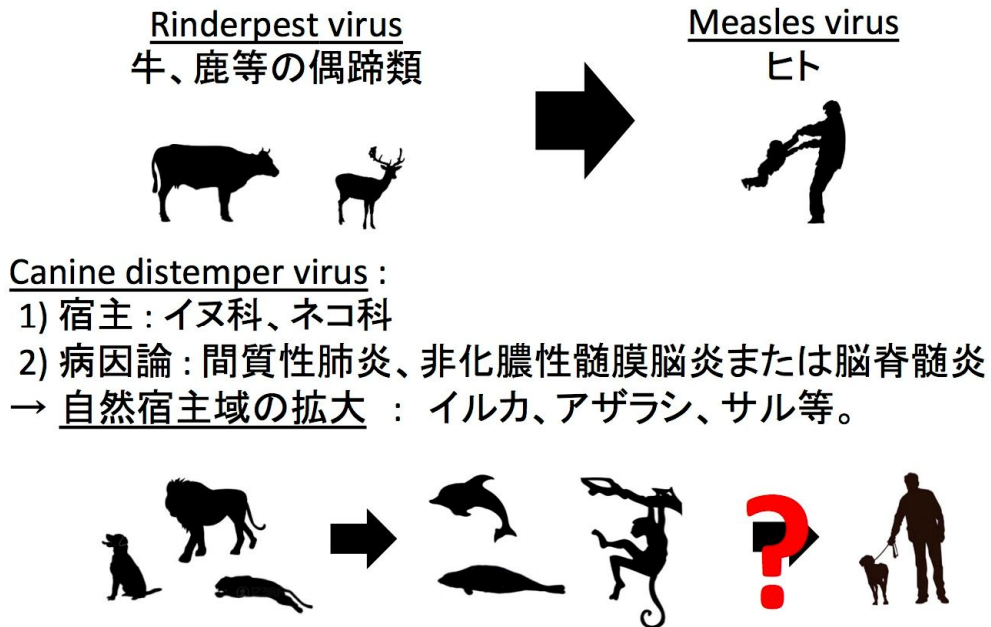


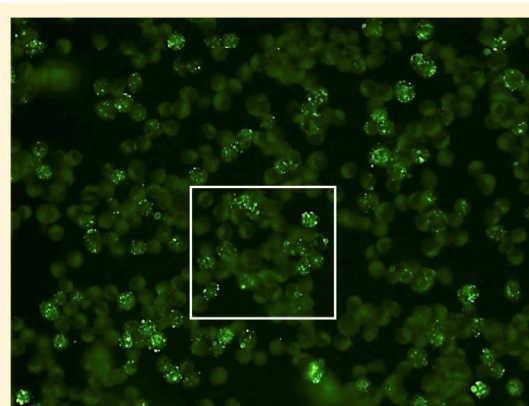
図2 . 国内のネコにおけるネコモルビリウイルスの遺伝子陽性率と抗体陽性率

		Virus in urine (n=100)	
		-	+
Virus in Kidney tissue (n=100)	-	78	4
	+	5	13

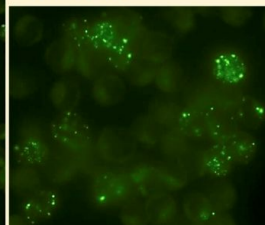
尿または腎組織におけるnested RT-PCR 陽性率 : 22/100 (22%)

尿 : 17/100 (17%)

組織 : 18/100 (18%)



No. N045



IFA 陽性率

IgG : 21/100 (21%)

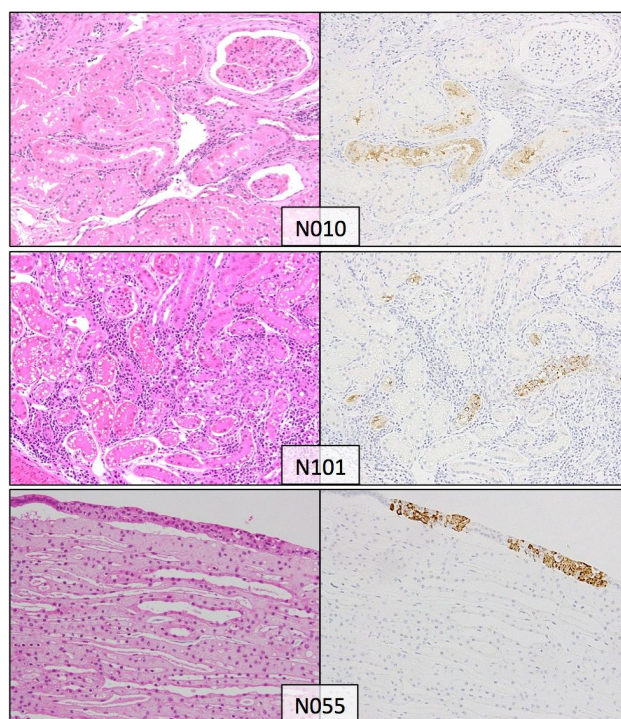
表 1. ネコモルビリウイルス遺伝子または抗体陽性ネコにおける間質性腎炎

FmoPVと間質性腎炎の関連

症例番号	病理学所見	PCR		IFA (IgG)	IHC	症例番号	病理学所見	PCR		IFA (IgG)	IHC
		尿	腎					尿	腎		
N001						N001		+	+	-	++
N007		+	+	10240	++	N003		+	+	-	+++
N010		+	+	>20480	+++	N055		+	+	-	+++
N101		+	+	5120	+++	N073		+	+	-	+
N110		+	+	1280	++	N076		+	+	-	++
N134		+	+	160	++	N109		+	+	-	+
N141		+	+	2560	+	N063		-	+	-	++
N153		+	+	640	+++	N065		+	-	-	++
N020	石灰化	+	-	5120	+	N024		-	-	2560	+
N050		+	-	640	++	N064		-	-	2560	++
N104		+	-	1280	++	N131		-	-	320	+
N028		-	+	5120	++	N136		-	-	640	+
N040	石灰化	-	+	1280	++	N138		-	-	320	++
N045		-	+	2560	+	N140		-	-	640	+
N144	壊死	-	+	640	+	N148		-	-	2560	++

■ 軽度炎症細胞浸潤    ■ 中度間質性腎炎    ■ 重度慢性間質性腎炎  
 + 腎盤 軽 陽性    ++ 腎盤 重 陽性    +++ 病変部 陽性

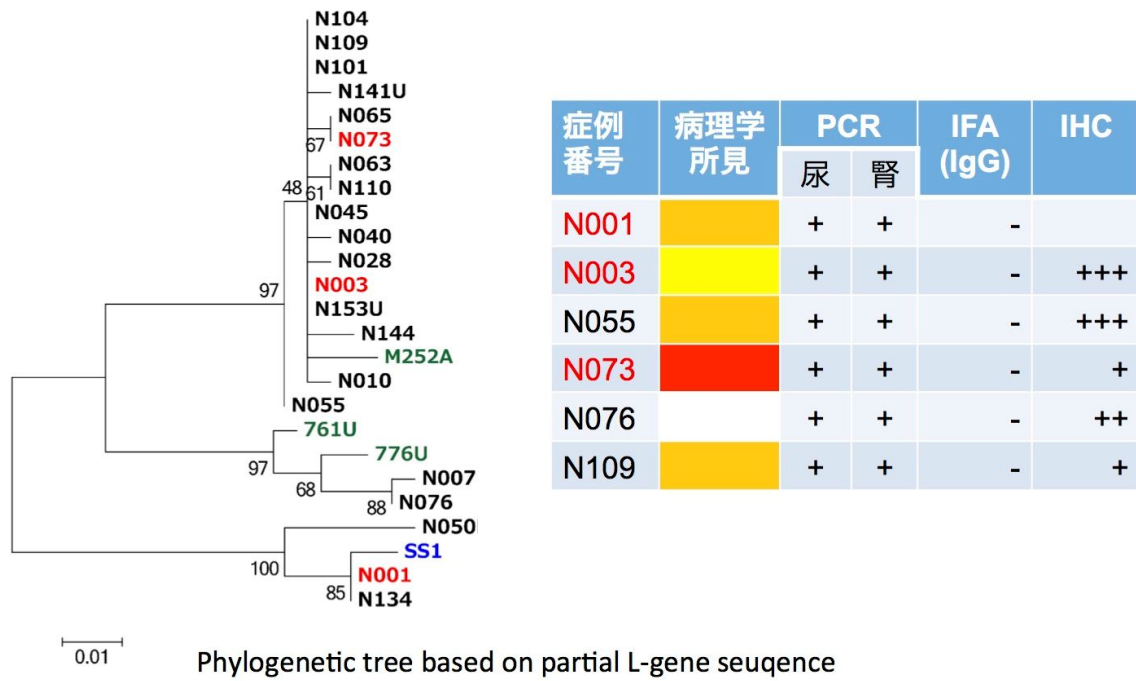
図 3. 慢性間質性腎炎の腎組織中の FMoV 抗原の分布



N010, N101 では病変部位の尿細管に、N055 では移行上皮細胞に FMoV 抗原が分布する。



図4. FMoVの日本株と香港株の分子系統樹



香港株 FMoV 3 株 (M252A, 761U, 776U) と日本株 (その他全て) は3つの遺伝子型を形成するが地理的分布と遺伝子型は一致しない。



厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )  
食虫目、翼手目等のハンタウイルスの分子疫学情報の蓄積研究

研究分担者：新井 智 ( 国立感染症研究所 感染症疫学センター )

研究協力者：池山優、荒木和子、佐藤 弘、多屋馨子、大石和徳(国立感染症研究所 感染症疫学センター)、川田伸一郎(国立科学博物館)、城ヶ原貴通(岡山理科大)、太田香織(東京都動物園協会)、水谷哲也(東京農工大学)、本川雅治(京都大学)、大館智志、南波興之、鈴木仁(北海道大学)、福井大(和歌山大学)、永田典代(国立感染症研究所 感染病理部)、森川茂(国立感染症研究所 獣医科学部)

研究要旨：ハンタウイルスの分子疫学情報の蓄積のため、引き続きモンゴル、ベトナム、ミャンマー、日本およびロシアのサンプルについて野生小型哺乳類のサンプルを入手しハンタウイルス感染を検索した。これまでに感染を確認したサンプルについては、全長配列の決定の為に継続した配列検索を進めた。これまでベトナムの翼手目から分離した3株の未知のウイルスは、新規の翼手目ヘルペスウイルスであった。一方、北海道のヒメネズミから分離したウイルスは、新規の齧歯目ヘルペスウイルスであった。これまでに明らかになっている齧歯目、トガリネズミ形目、および翼手目のハンタウイルスの解析から、ハンタウイルスはユーラシア大陸で誕生したことを推測した。新しいウイルスを分離するツールとして齧歯目、トガリネズミ形目、翼手目の初代培養細胞の分離を広く行い、新たにヒミズ(*Urotrichus talpoides*)の初代培養細胞の分離に成功した。今後、新たに明らかになった翼手目由来ハンタウイルスを含め、小型野生動物の未知のウイルスの分子疫学情報をさらに収集する予定である。

A. 研究目的

近年、小型野生動物を自然宿主とするウイルスによるアウトブレイクが複数報告されている。特に2014年2月にギニアから始まったエボラウイルスのアウトブレイクは、

2015年1月23日現在、21,689例の症例と8,626例の死亡が確認され、大きな社会問題となっている。これら動物由来感染症の感染メカニズム、細胞生理や分子疫学情報解析のため、自然宿主の株化細胞が求められている。

特にウイルス感染においては、自然宿主の細胞は、ウイルスを増殖させるだけでなく、感染メカニズムの解析に利用可能で、診断用抗原の作成や免疫応答の解析に利用するなどワクチン開発に必要なツールとして機能する。これまでハンタウイルスでは、齧歯目が主な自然宿主と考えられてきたものの、2007年以降トガリネズミ形目や翼手目に新しいハンタウイルス感染が報告され、これまで考えられてきた以上に多様な生物がハンタウイルスに感染している事実が明らかになってきた。更に2013年には、本研究班において翼手目の新しいハンタウイルスの存在を明らかにした。そこで、これら小型野生哺乳類の未知のハンタウイルス感染を明らかにするとともに、効率よくウイルスを分離するため、自然宿主である齧歯目、トガリネズミ形目、翼手目の肺や腎臓から初代培養細胞を分離し、ウイルスの分離に利用することを計画した。

## B. 研究方法

1) これまでに入手することのできたモンゴル、ベトナム、ミャンマー、日本およびロシアのサンプルについてハンタウイルス共通領域にデザインしたプライマーを用いて新規ハンタウイルスの検索を行った。スクリーニング用プライマーには、S, M, L-segmentsのそれぞれに対してデザインし、できる限り多様なウイルスが検出できるようにデザインした。また、生材料が入手できた場合には、肺および腎臓から可能な限り初代培養細胞を分離

し、未知のウイルス分離用として利用を目指すと共に、これらの細胞から未知のウイルスが検出されるかどうか検索した。

2) 初代細胞の分離は、齧歯目の *Myodes rex*、*Myodes rufocanus*、*Myodes rutilus*、*Apodemus argenteus*、*Apodemus speciosus*、トガリネズミ形目の *Crocidura dsinezumi*、*Sorex gracillimus*、*Sorex caecutiens*、*Sorex unguiculatus*、*Urotrichus talpoides* 翼手目の *Cynopterus brachyotis*、*Hipposideros laravatus*、*Hipposideros pomona*、*Ia io*、*Kerivoula cf. papillosa*、*Megaerops niphanae*、*Myotis muricola*、*Myotis siligorensis*、*Phoniscus jagorii*、*Rhinolophus acuminatus*、*Rhinolophus luctus*、*Rhinolophus microglobosus*、*Rhinolophus pearsonii*、*Rhinolophus sinicus*、*Rhinolophus thomasi*、*Rhinolophus sp.*、*Tylonycteris pachypus*、*Tylonycteris sp.*の肺および腎臓を用いた。CPEの認められた初代細胞については培養上清を用いて電子顕微鏡による観察を行い、電子顕微鏡でウイルス様粒子が確認されたサンプルについてシークエンスによる感染ウイルスの同定を行った。

(倫理面からの配慮について)

野生動物の捕獲調査では、可能な限り生存した状態で捕獲し、麻酔科で安楽殺した後に組織を採取した。

## C. 研究結果

1) これまでに報告されているハンタウイルスおよびこれまでに検出した齧歯目、

トガリネズミ形目、翼手目のハンタウイルス配列からハンタウイルスの起源はユーラシア大陸にあることを推測した(図 1)

- 2) 初代培養細胞の分離に伴い、ベトナムの翼手目から新規ヘルペスウイルスの分離に成功した(図 2)。
- 3) 未知のウイルス感染対策の一環として、多様な生物種から初代培養細胞を分離することを進めた。その結果、新たにベトナムの翼手目や日本のヒミズから初代培養細胞の分離に成功した(図 3)。
- 4) 昨年度の研究で分離していた北海道のヒメネズミから分離した未知のウイルスは、新規齧歯目ヘルペスウイルスであることが明らかになった。

#### D. 考察

近年、未知のウイルスや新規病原体の解析に次世代シーケンサーを用いた解析が頻繁に用いられるようになってきた。しかしながら、臨床検体を用いた解析では、断片的な結果は得られるものの、宿主の遺伝子配列がノイズとして多数検出され、十分な結果が得られない場合も多数報告されている。そこで、新規ウイルスや未知のウイルス性感染症対策の一環として、これまでに株化細胞が樹立されていない生物種について初代培養細胞を分離し、効率良くウイルス分離するツール作りを進めた。

今回、昨年度の続き、新たに日本のヒミズ(*Urotrichus talpoides*)で初代培養細胞の分離を試みたところ、培地にサプリメント加える

ことで良好な増殖を得ることができた。ヒミズの初代細胞分離に利用した培地をコウベモグラについても利用したところ、良好な増殖を認めた。しかしながら、細胞増殖に伴い、コウベモグラに潜在的に感染していたウイルスの再活性化が観察され、強度のCPE(cytopathic effect)が認められ、細胞分離は成功しなかった。また、手技的にも臓器ごとに若干の変更を加えることでこれまで以上に良好な増殖を得られること明らかになってきた。今後、検体数を増やし検証を進める予定である。

今回、未同定のウイルスの塩基配列を決定したところ、3株が新規翼手目ヘルペスウイルスで1株が齧歯目ヘルペスウイルスであった。電子顕微鏡による観察と若干の齧齶が認められたが、サンプル純度等に若干問題があった点が挙げられ、今後改良の必要があると示唆された。

#### E. 結論

これまでに明らかになったハンタウイルスの解析から、ハンタウイルスはユーラシア大陸起源であると推定した。

トガリネズミ形目、齧歯目および翼手目の初代培養細胞の分離に成功した。

分離できた初代培養細胞の分離に伴い複数の株にCPEが検出され、シーケンスの結果、新規翼手目ヘルペスウイルスおよび新規齧歯目ヘルペスウイルスの分離に成功した。

#### F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1.論文発表

- 1) Yanagihara R, Gu S H, Arai S, Kang H J, Song J W. Hantaviruses: Rediscovery and new beginnings. *Virus Research*. 187:6–14. 2014
- 2) Bennett S N, Gu S H, Kang H J, Arai S, Yanagihara R. Reconstructing the evolutionary origins and phylogeography of hantaviruses. *Trends in Microbiology*. 8:473-482. 2014
- 3) Gu S H, Lim B K, Kadjo B, Arai S, Kim J A, Nicolas V, Lalis A, Denys C, Cook J A, Dominguez S R, Holmes K V, Urushadze L, Sidamonidze K, Putkaradze D, Kuzmin IV, Kosoy M Y, Song J W, Yanagihara R. Molecular phylogeny of hantaviruses harbored by insectivorous bats in Côte d'Ivoire and Vietnam. *Viruses*. 6:1897-1910. 2014

### 2.学会発表

- 1) Ikeyama, Y., Arai, S., Boldgiv, B., Boldbaatar, B., Araki, K., Satoh, H., Tanaka-Taya, K., Morikawa, S., Yanagihara, R., Oishi, K. Co-circulation of two distinct divergent hantaviruses in *Sorex* species in Mongolia. XVI<sup>th</sup> International Congress of Virology, Montréal, Canada (2014. 07-08)
- 2) 池山優,新井 智, Hae ji Kang, 大館智志, Kyle Taylor, 中田圭亮, 雲野明, 荒木和子, 佐藤弘, 多屋馨子, 森川茂, Richard Yanagihara, 大石和徳. Sarufutsu virus ; オ

オアシトガリネズミに感染を確認した新規ハンタウイルス. 第 157 回日本獣医学会, 札幌, (2014. 9)

- 3) 新井智, 池山優, Bazartseren Boldgiv, Bazartseren Boldbaatar, 荒木和子, 佐藤弘, 多屋馨子, 森川茂, Richard Yanagihara, 大石和徳. モンゴルのトガリネズミに確認された遺伝的に異なるハンタウイルスの共循環. 第 157 回日本獣医学会, 札幌, (2014. 9)
- 4) 新井 智, 池山優, Se Hun Gu, Son Truong Nguyen, 福井大, 大館智志, 吉川泰弘, 森川茂, 荒木和子, 佐藤弘, 多屋馨子, Richard Yanagihara, 大石和徳. ベトナムの翼手目由来に確認されたハンタウイルスの多様性. 第 62 回日本ウイルス学会, 神奈川県, (2014. 11)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし.

### 1. 特許取得

特になし.

### 2. 実用新案登録

特になし.

### 3. その他

特になし.

図1. 世界各地のハンタウイルスの地理的系統関係  
(全てのウイルスがアジアタイプから分岐している)

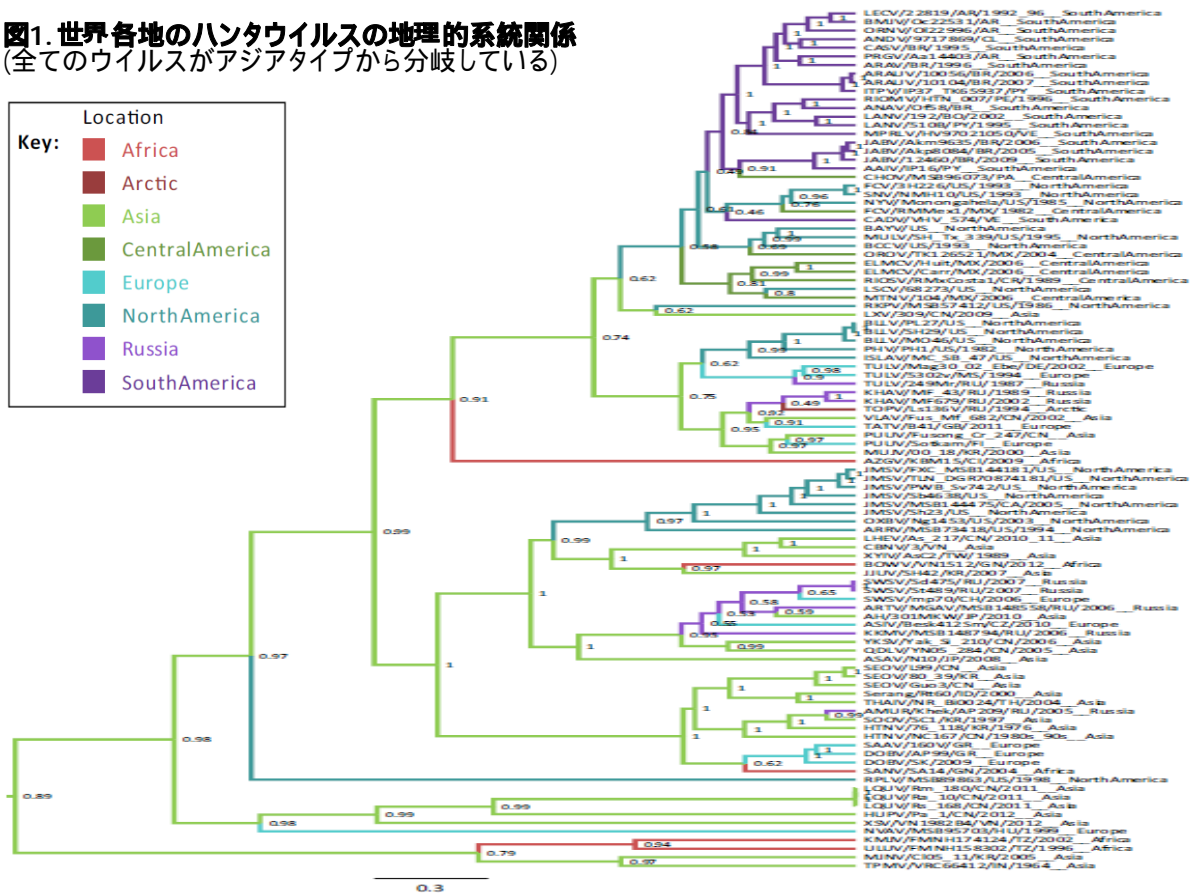


図2. 翼手目および齧歯目から分離した新規ウイルス

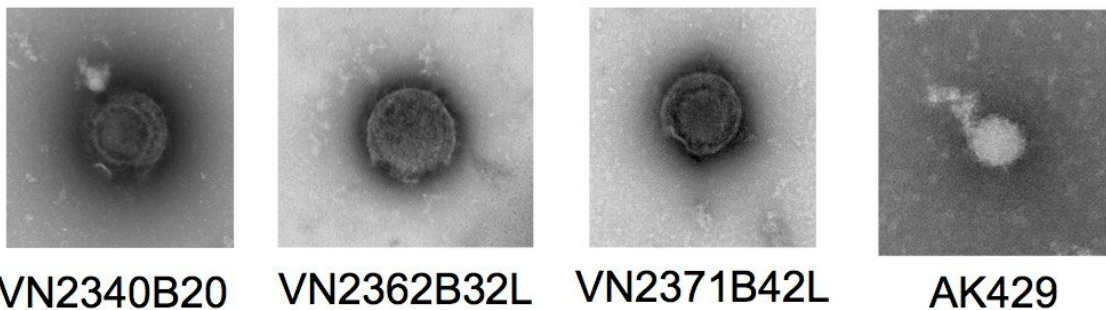
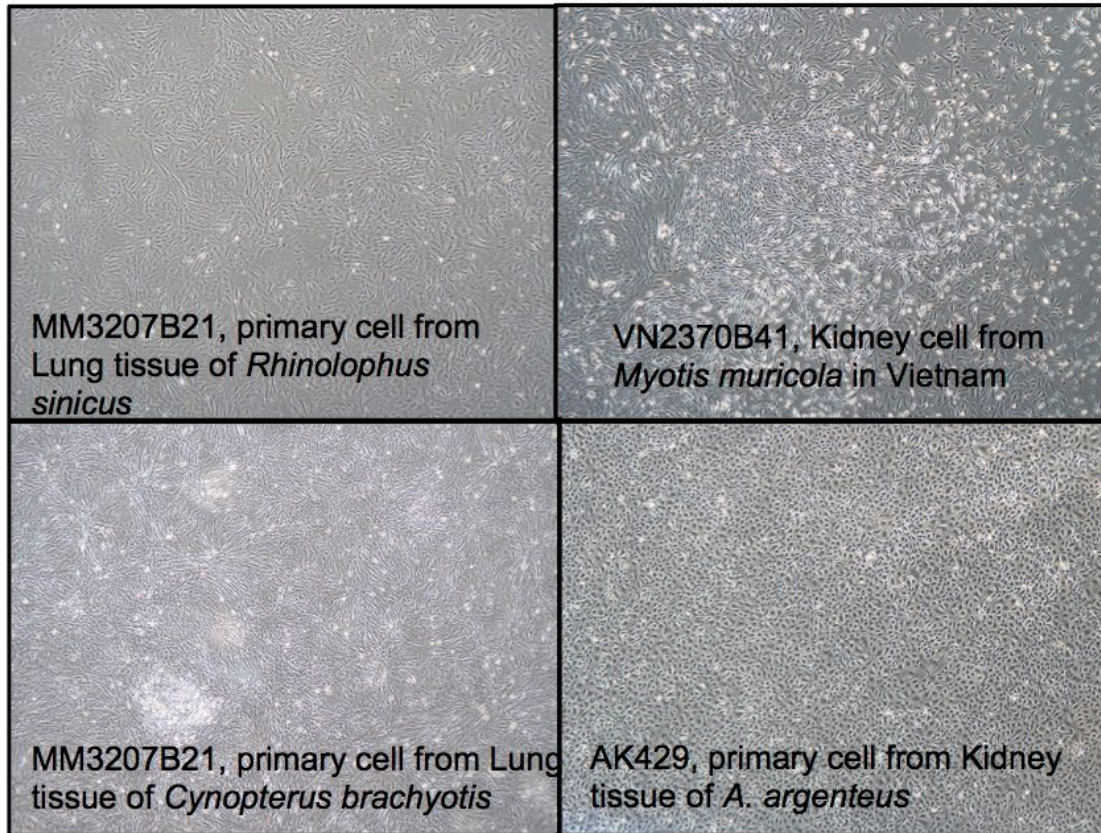




図3. 翼手目および齧歯目から分離した初代培養細胞





厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )

狂犬病の病原性解析と新興ラブドウイルスの診断法の開発

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：濱本紀子、宇田晶彦、野口章、加来義浩、奥谷晶子 ( 同 獣医科学部 )、飛梅実 ( 同 感染病理部 )、朴天鎬 ( 北里大学 獣医病理学研究室 )

研究要旨：狂犬病ウイルス ( RV ) は自然感染では潜伏期間中に RV に対する抗体は産生されずウイルスも検出できないが、野外株である街上毒を実験室内継代等で弱毒化させた固定毒は容易に中和抗体を誘導し、潜伏期間の短縮と一定化、免疫誘導能の増強といった特徴を示す。本研究では、狂犬病ワクチンの標的である G 蛋白質の細胞内における発現様式・動態を明らかにして、現行の暴露後予防的治療をより効果的・安価に行える方法の開発を可能にするために、Kyoto 株 ( 街上毒 ) と CVS-26 株 ( 固定毒 ) の G 蛋白質の細胞内発現とその局在を *in vitro* で比較解析した。Kyoto 株組み換え G 蛋白質をマウス神経芽腫由来 MNA 細胞に発現させると G 蛋白質は核周囲小胞体に分布し細胞膜に分布しないが、CVS-26 株 G 蛋白質の多くは細胞膜に分布し、両株 G 蛋白質の N 型糖鎖付加を阻害させると核周囲小胞体に分布すること、また、Kyoto 株 G 蛋白質の第 204 位アミノ酸を N 型糖鎖付加部位に置換すると細胞膜に分布することを明らかにした。固定毒化が進んでいる CVS-26 株 G 蛋白質の第 204 位アミノ酸を N 型糖鎖付加部位に変異させても一部が細胞膜に分布したことから、第 204 位の N 型糖鎖付加は G 蛋白質の細胞膜輸送を規定するが、これ以外にも細胞膜輸送に関与する因子が存在することが示唆された。街上毒が固定毒化の過程で獲得した細胞膜からのウイルス粒子の発芽や宿主の免疫応答の亢進に、G 蛋白質 204 位への N 型糖鎖付加が大きく関与しており、糖鎖付加によって小胞体等から細胞膜への蛋白質輸送が可能になることを明らかにした。

A. 研究目的

狂犬病ウイルスは、ラブドウイルス科リッサウイルス属に属し、野外流行株である街上毒と街上毒を実験室内で継代することによって宿

主に対する末梢感染性が減弱して潜伏期間が短縮・一定化し、さらには免疫誘導能が増強した固定毒 ( ワクチン株・実験株 ) に分けることができる。

電子顕微鏡で感染細胞を観察すると、街上毒では細胞膜からウイルスが出芽する像が観察されないが、固定毒では細胞膜から高頻度に出芽している像が報告されており、街上毒の固定毒化に伴う培養細胞でのウイルス増殖効率の上昇やマウスに対する病原性の低下は狂犬病ウイルス G 蛋白質の糖鎖修飾と関連していると考えられている。

街上毒株と固定毒株で比較解析を行うことにより、街上毒が固定毒化する過程で獲得した表現型について弱毒化の機序を解明することができれば、狂犬病の発症機序を明らかにして、現行の暴露後予防的治療をより効果的・安価に行える方法の開発が可能になる。

本研究では、街上毒が固定毒化する過程で G 蛋白質の N 型糖鎖付加部位が増加することに着目し、分子生物学的・免疫組織学的手法を用いて街上毒 Kyoto 株と固定毒 CVS-26 株の組み換え G 蛋白質の糖鎖付加部位に種々の変異を導入し、G 蛋白質の N 型糖鎖修飾と細胞内局在について比較解析を行った。

## B. 研究方法

分子生物学的・免疫組織学的手法により、街上毒 Kyoto 株と固定毒 CVS-26 株の組み換え G 蛋白質を作製して、N 型糖鎖修飾の違いによる細胞内局在について比較解析を行った。

**細胞：**狂犬病ウイルス G 蛋白質の発現には、マウス神経芽細胞腫 (MNA) 細胞を用い、MEM-10% FBS で培養した。

**N 型糖鎖付加部位へ変異導入した組換え G 蛋白質発現プラスミドの作製：**PrimeSTAR mutagenesis Basal kit (TAKARA) を用いて、pzKyoto-G および pzC26-G の潜在的糖鎖付加部位への変異導入を行った (図 1)。変異導入の確認は遺伝子配列を決定して確認した。変異導入 G 蛋白質の cDNA を挿入したプラスミド、pzKyoto-G(S204N)、pzC26-G(N204S)、pzC26-G

(N37S)、pzC26-G(N319Q)、pzC26-G (N204S, N319Q)、pzC26-G(N37S, N204S, N319Q) を作製した。これらにより図 1 に示す変異導入 G 蛋白質が発現される。

**トランスフェクション：**6 穴プレートまたは CELLview4 分画ガラスボトムシャーレ (Greiner Bio-One) に培養した MNA 細胞に上記プラスミドトランスフェクションし、48 時間培養後に WB と IFA により発現した G 蛋白質を解析した。

## C. 研究結果

**G 蛋白質単独発現細胞における G 蛋白質の分布：**Kyoto 株および CVS-26 株の G 蛋白質発現プラスミドをトランスフェクションした MNA 細胞において、Kyoto 株由来の組換え G 蛋白質 (Kyoto rG) は細胞質内の小胞体のみ に分布し、CVS-26 株由来の組換え G 蛋白質 (CVS-26 rG) は、細胞質内 (小胞体) 及び細胞膜に分布した (図 2, 3)。また、CVS-26 rG 発現時にツニカマイシンを添加すると G 蛋白質は小胞体に分布した。

**Kyoto 株と CVS-26 株の G 蛋白質の N 型糖鎖修飾：**MNA 細胞に発現させた Kyoto rG は、CVS-26 rG よりも分子量が小さかった。Kyoto rG と CVS-26 rG はツニカマイシン存在下で発現したり、発現蛋白を PNGase F 処理すると同等の分子量を示したことから、Kyoto rG よりも CVS-26 rG の方が N 型糖鎖が多いことが明らかとなった。

**第 204 位アミノ酸の N 型糖鎖に影響する変異導入の組換え G 蛋白質の分子量と細胞内分布に与える影響：**Kyoto 株と CVS-26 株の G 蛋白質遺伝子の配列をもとに、アミノ酸配列を確認したところ、Kyoto 株 G 蛋白質は、第 37 位アミノ酸と、第 319 位アミノ酸の 2 か所が潜在的な N 型糖鎖付加部位であるのに対し、CVS-26

株 G 蛋白質では、第 37 位アミノ酸と、第 319 位アミノ酸に加え、第 204 位アミノ酸が潜在的な N 型糖鎖付加部位(Asn-Lys-Thr)であった。Kyoto 株 G 蛋白質では、第 204 位アミノ酸はセリンで潜在的 N 型糖鎖付加部位ではない(Ser-Lys-Thr)。Genbank に登録された街上市毒の G 蛋白質では、第 204 位アミノ酸が潜在的 N 型糖鎖付加部位である株はなかった。

そこで街上市毒 Kyoto 株の G 蛋白質には存在しない第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加が、G 蛋白質の細胞内局在に与える影響を調べるために、Kyoto 株 G 蛋白質の第 204 位アミノ酸をセリンからアスパラギンに変異導入して N 型糖鎖付加配列にした組換え G 蛋白質 [ Kyoto rG (S204N) ] と、CVS-26 株由来の G 蛋白質の第 204 位アミノ酸をアスパラギンからセリンに変異導入して糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [ CVS-26 rG (N204S) ] を MNA 細胞に発現させた。その結果、これらの変異導入 G 蛋白質の分子量を、それぞれ Kyoto rG および CVS-26 rG と比較した結果、Kyoto rG (S204N) は、Kyoto rG よりも分子量の大きなバンドと、Kyoto rG とほぼ同じ分子量のバンドに分かれた。CVS-26 rG (N204S) は、Kyoto rG と同程度の分子量のバンドと、CVS-26 rG と同程度の分子量のバンドに分かれた (図 4)。

また、Kyoto rG (S204N) は、細胞膜への分布が認められた。一方、CVS-26 rG(S204N)は、CVS-26 rG と同様に細胞膜への分布が依然認められたものの、細胞質内では Kyoto rG と同様に核周囲に多くの G 蛋白質の分布が見られるようになった。

**第 37 位と第 319 位アミノ酸の N 型糖鎖に影響する変異導入の CVS-26 株 G 蛋白質の分子量と細胞内分布に与える影響:** CVS-26 株 G 蛋白質の第 37 位アミノ酸と第 319 位アミノ酸への N 型糖鎖付加が G 蛋白質の細胞内局在を規定しているかを明らかにするために、第 37 位アミノ酸をアスパラギンからセリンへ変異させ

N 型糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [ CVS-26 rG (N37S) ] と第 319 位アミノ酸をアスパラギンからグルタミンに変異させ N 型糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [ CVS-26 rG (N319Q) ] を MNA 細胞に発現させた。その結果、CVS-26 rG (N37S) は CVS-26 rG と同じ分子量であったが、CVS-26 rG (N319Q) は CVS-26 rG よりも分子量が低下していた (図 5)。さらに、第 204 位アミノ酸と第 319 位アミノ酸の N 型糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [ CVS-26 rG (N204S, N319Q) ] を発現させると、ツニカマイシン存在下で発現させた CVS-26 rG と同じ分子量の蛋白質が大部分であったが、それより分子量の大きいバンドが少量認められた (図 5)。

これらの結果から、CVS-26 株の G 蛋白質の第 37 位の N 型糖鎖付加配列には効率よく N 型糖鎖修飾されていないと考えられる。

また、CVS-26 rG (N37S) と CVS-26 rG (N319Q) は細胞膜へ分布したが、CVS-26 rG (N319Q) の細胞膜への分布は CVS-26 rG と比べて減少した。CVS-26 rG (N204S, N319Q) も、細胞膜への分布は認められたが、CVS-26 rG (N319Q) と比べて細胞膜への分布はさらに減少した。3 か所の潜在的 N 型糖鎖付加部位を完全に欠失させた CVS-26 rG (N37S, N204S, N319Q) は、細胞膜へは分布しなかった。

#### D. 考察

狂犬病ウイルスの G 蛋白質を単独で MNA 細胞に発現させた場合でも、Kyoto 株と CVS-26 株を MNA 細胞に感染させた場合と同様に、Kyoto 株の rG 蛋白質は細胞膜に分布せず小胞体に局在し、CVS-26 株由来の rG 蛋白質は細胞膜に分布した (図 2, 3)。粗面小胞体で G 蛋白質が合成された後に Kyoto rG が小胞体に留まるのに対して、CVS-26 rG は細胞内の糖蛋白質輸送経路を利用してゴルジ体経由で細胞膜に輸送されると考えられる。これは、固定毒のウイルス粒子が細胞膜から主に出芽するのに

対して、街上毒のウイルス粒子は細胞膜からはほとんど出芽せず、小胞体やゴルジ体などの細胞内小器官の膜から細胞質内に出芽する知見と一致する。つまり、狂犬病の G 蛋白質がウイルス粒子形成部位を規定すると思われる。

G 蛋白質の潜在的 N 型糖鎖付加部位は、街上毒では 1~2 か所であるのに対し固定毒では 3~4 か所ある。実際、CVS-26 rG 蛋白質は Kyoto rG よりも多くの N 型糖鎖が付加されていた。

また、ツニカマイシンを培地に添加して、Kyoto rG と CVS-26 rG を発現させると、Kyoto rG はツニカマイシンの有無にかかわらず小胞体へ局在したが、CVS-26 rG ではツニカマイシン処理により細胞膜への局在がなくなり、小胞体にものみ局在したことから、CVS-26 rG に存在し Kyoto rG に存在しない N 型糖鎖付加が細胞膜局在に必要であると考えられた。

そこで、各種変異導入 G 蛋白質を発現して局在を調べた。その結果、第 204 位に N 型糖鎖付加部位を導入した Kyoto rG (S204N) は細胞膜へ分布したことから、第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加は G 蛋白質が細胞膜輸送に重要であると考えられる。一方、CVS-26 rG(N204S)では、一部の G 蛋白質の細胞膜への分布が認められたことと、CVS-26 rG(N204S)の大部分は CVS-26 rG よりも分子量が小さくなるものの、一部は CVS-26 rG と同等の分子量であることから、第 204 位の糖鎖修飾が阻害されるとほかの潜在的 N 型糖鎖付加部位へ糖鎖が付加されることが示唆された。

CVS-26 rG(N204S)の一部が細胞膜に分布した原因を明らかにするために、第 37 位アミノ酸と第 319 位アミノ酸への糖鎖付加部位を欠失させた。第 37 位アミノ酸への糖鎖付加部位を欠失させた CVS-26 rG(N37S)の分子量は、CVS-26 rG と同等の分子量を示したことから、第 37 位アスパラギンにはほとんど N 型糖鎖が付加されないことが示された。第 204 位の N 型糖鎖付加を欠失させた CVS-26 rG (N204S) と第 204 位と第 319 位の N 型糖鎖付加配列を

欠失させた CVS-26 rG(N204S、N319Q)では、糖鎖修飾のない G 蛋白質に相当する分子量とより大きい分子量の二種類の G 蛋白質が認められたことから、これらの組換え G 蛋白質では一部の第 37 位アスパラギンに N 型糖鎖が付加されていたことが示された。

CVS-26 rG(N37S)と第 319 位アミノ酸への糖鎖付加部位を欠失させた CVS-26 rG(N319Q)は細胞膜に分布したが、CVS-26 rG (N319Q)の細胞膜への分布は CVS-26 rG や CVS-26 rG (N37S)と比較して明らかに低下したことから、第 319 位アスパラギンへの N 型糖鎖付加も G 蛋白質の細胞膜への分布に関与することが示唆された。3 か所の N 型糖鎖付加配列を全て欠失させた CVS-26 rG (N37S、N204S、N319Q)は細胞膜へ分布せず、核周辺にものみ局在したことから N 型糖鎖が CVS-26 rG の細胞膜への輸送に必要不可欠であることが示された。

今後、Kyoto 株の G 蛋白質と CVS-26 株の G 蛋白質について、第 204 位アミノ酸への変異導入による蛋白質の立体構造の変化を詳細に調べることによって、固定毒化の機序をさらに究明できると考えられる。

## E. 結論

街上毒の Kyoto 株の G 蛋白質の第 204 位のアミノ酸への糖鎖付加は、G 蛋白質の局在を小胞体から細胞膜にシフトさせることからこの部位の糖鎖修飾が街上毒と固定毒の性状の違いに関わる大きな要因であると考えられた。固定毒の CVS-26 株の G 蛋白質は第 204 位のアミノ酸の N 型糖鎖付加以外にも細胞膜輸送に関与する糖鎖修飾があることも示された。

本研究によって、街上毒が固定毒化する過程で獲得した G 蛋白質の第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加が、ウイルス粒子の細胞膜からの出芽や宿主の免疫応答の亢進に関与している可能性が示唆され、街上毒が固定毒化する過程で獲得した新たな N 型糖鎖付加部位がどのよう

に固定毒の中和抗体誘導に係るかを解明できれば、現行の暴露後予防的治療をより効果的・安価に行う方法の開発に寄与できると考えられた。

F. 健康危険情報  
なし。

G. 研究発表

1.論文発表

1) Hamamoto N, Uda A, Tobiume M, Park C-H, Noguchi A, Kaku Y, Okutani A, Morikawa S, Inoue S. Association between RABV G Proteins Transported from the Perinuclear Space to Cell Surface Membrane and N-glycosylation of the Sequon at Asn204. Japanese Journal of Infectious Diseases. In press. 2015

2.学会発表

- 1) 西條政幸．ヘルペスウイルスによる中枢神経感染症．第16回日本神経感染症学会学術集会、東京、(2011.11)
- 2) 高橋有里花、篠崎春美、矢野川祥子、君付和範、Hassadin Boonsriroj、Daria L. Manalo、井上 智、朴天鎬．狂犬病発病犬の唾液腺に関する病理学的研究．第157回日本獣医学会学術集会、北海道、(2014.9)
- 3) 篠崎春美、高橋有里花、矢野川祥子、君付和範、Hassadin Boonsriroj、Daria L. Manalo、井上 智、朴天鎬．狂犬病発病犬の口唇皮膚におけるウイルス抗原の局在と診断的有用性．第157回日本獣医学会学術集会、北海道、(2014.9)
- 4) 山田健太郎、渡辺一平、アハメド カムルディン、Daria L. Manalo、Miranda Mary、Lapiz Stella、Tapdasan Emerson、Petspophonsakul Wilaiwan、井上 智、朴天鎬、Khawplod Pakamatz、西園 晃．イムノクロマト法をベースにした狂犬病ウイルス中和抗体価迅速検出キットのイヌ血清を用いた多国的評価．第157回日本獣医学会学術集会、第157

回日本獣医学会学術集会、北海道、(2014.9)

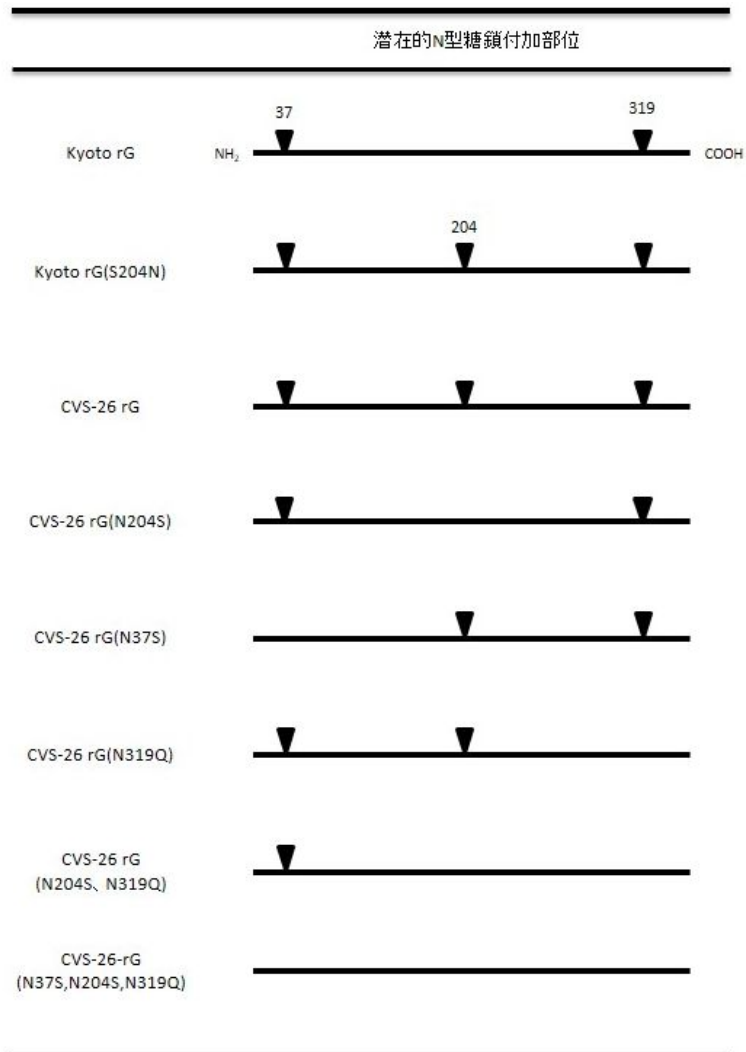
- 5) 加来義浩、奥谷晶子、河合康洋、野口 章、濱本紀子、梁瀬 徹、加藤友子、新井 智、井上 智、森川 茂．国内で分離された未分類のラブドウイルスの遺伝学的解析．第157回日本獣医学会学術集会、第157回日本獣医学会学術集会、北海道、(2014.9)
- 6) 松浦真翔、鶴田一郎、坊園慶信、山田健太郎、井上智、三澤尚明．官学連携による狂犬病診断体制の構築．平成26年度獣医学術九州地区学会、鹿児島、(2014.10)
- 7) 景岡美穂、李松熹、加来義浩、井上 智、長棟輝行、河原正浩．細胞増殖を指標とした細胞内抗体選 択法の開発 .2014年度細胞アッセイ研究会シンポジウム「細胞アッセイ技術の現状と将来」、東京、(2015.1)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし．

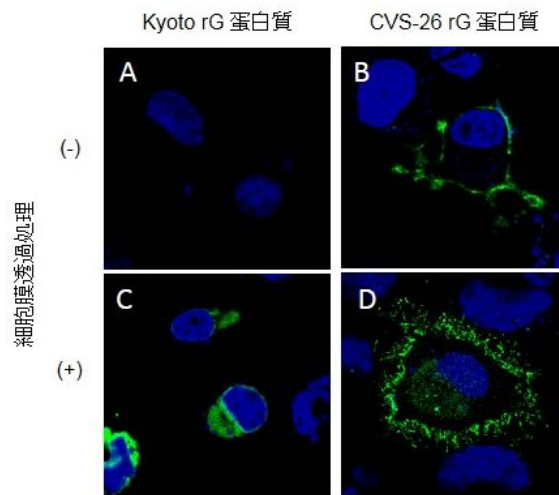
1. 特許取得  
なし．
2. 実用新案登録  
なし．
3. その他  
なし．

図 1 . 組換え G 蛋白質の糖鎖付加部位



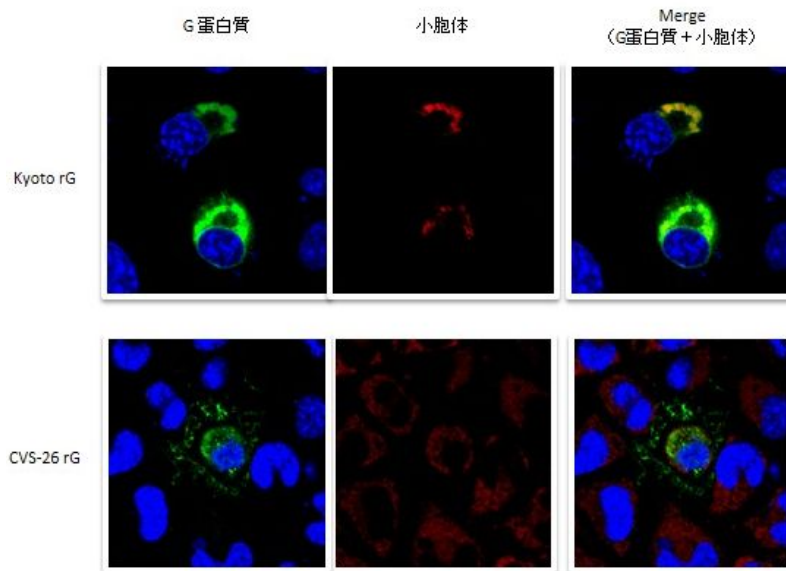
▼ N型糖鎖付加配列(N-X-SまたはN-X-T(Xはプロリン以外))のアスパラギンの位置。番号は成熟G蛋白質のN末端アミノ酸を1番として数えた。

図 2 . 組み換え G 蛋白質の細胞内分布



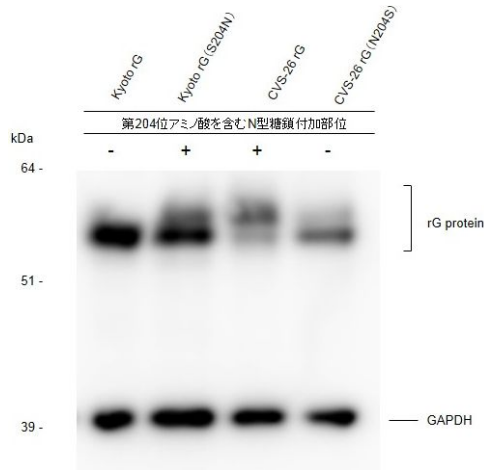
Kyoto 株の組み換え G 蛋白質発現細胞(A、C)と、CVS-26 株の組み換え G 蛋白質発現細胞(B、D)を、ホルマリン固定後、抗 G モノクローナル抗体 7-1-9 で染色したもの(A、B)と 0.2% Triton-X100 処理により細胞膜の透過処理を行い(C、D) 染色した。対比染色として DAPI で核を染色した。緑色蛍光：rG 蛋白質。青色蛍光：核。

図 3 . 組み換え G 蛋白質の細胞内分布



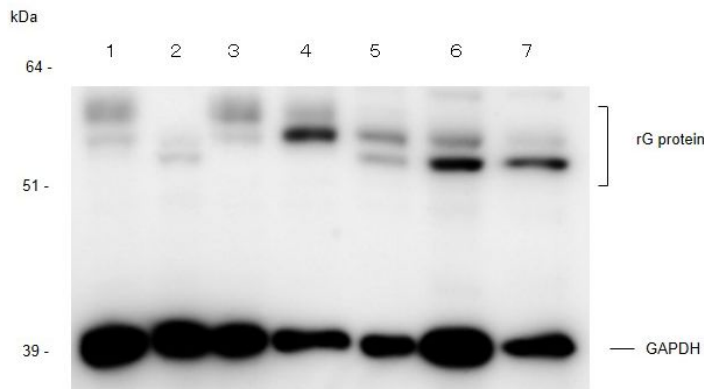
G 蛋白質発現プラスミドを MNA 細胞にトランスフェクションし、48 時間培養した後ホルマリン固定し、Triton X-100 による透過処理を行った。その後、抗 G モノクローナル抗体 7-1-9 で染色し、ER Red dye による小胞体の染色、DAPI による核染色により、G 蛋白質の局在を調べた。緑色蛍光：rG 蛋白質。赤色蛍光：小胞体。青色蛍光：核

図4 . 第 204 位アミノ酸に変異導入した組み換え G 蛋白質の分子量の変動



Kyoto 株、CVS-26 株の第 204 位アミノ酸に変異導入して N 型糖鎖付加部位を導入あるいは欠失した G 蛋白質の分子量をウェスタンブロッティングで解析した。

図5 . CVS-26 株の 37 位、319 位アミノ酸に変異導入した G 蛋白質の分子量の変動



1 : CVS-26 rG .2 : CVS-26 rG( ツニカマイシン添加 ).3 : CVS-26 rG(N37S) .  
 4 : CVS-26 rG(N204S) .5 : CVS26 rG(N319Q) .6 : CVS-26 rG(N204S、 N319Q) .  
 7 : C26 rG(N37S、 N204S、 N319Q) . MNA 細胞に rG 蛋白質を発現させてウ  
 エスタンブロッティングにより G 蛋白質を検出した。



厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )

分担研究課題：動物由来新興ウイルスの細胞侵入機構

研究分担者 福士秀悦 ( 国立感染症研究所ウイルス第一部 )

研究協力者 須田遊人、福間藍子 ( 同 )

研究要旨：中東呼吸器症候群 ( MERS ) は 2012 年にサウジアラビアで最初に報告のあった、新型コロナウイルス ( MERS-CoV ) による感染症である。MERS-CoV の血清疫学、ヒトへの感染経路については未だ不明な点が多く、また、MERS-CoV がラットなどの実験用小動物にどの程度可能なのか等、宿主域について知見が十分に得られていない。本研究では MERS-CoV の擬似ウイルス ( VSV シュードタイプ ) を作製した。これを利用した、MERS-CoV に対する中和抗体が検出可能となった。また、VSV シュードタイプを用いた解析から、MERS-CoV のラットへの感染効率は低いことが明らかとなった。

A . 研究目的：

2012 年に中東地域で発生した中東呼吸器症候群 ( MERS ) の原因ウイルスである MERS コロナウイルス ( MERS-CoV ) はコウモリあるいはラクダがヒトへの感染源と推測されている。MERS-CoV のヒトへの感染リスクを評価するためには、ウイルスの自然宿主動物を同定し、ヒトへの感染経路を解明しなければならない。しかし、これまでのところ調査された地域、動物種は限られており、ウイルスの分布が中東地域に限局するのか、また、ウイルスがどのように自然宿主動物からヒトへ伝播するのか、その経路は今でも不明な点が多い。

水疱性口炎ウイルス ( VSV ) をベースにした擬似ウイルス ( VSV シュードタイプ ) はウイルス中和抗体を安全かつハイスループットに測定するための、また、ウイルス感染初期過程を解析するための有用なツールであり、これまで様々な新興ウイルスの感染性の研究に応用されてきた。本研究は、MERS-CoV の Spike ( S ) を被った VSV シュードタイプ ( MERSpv ) を作製し、MERS-CoV 中和抗体検出法を開発し、これを MERS の血清疫学に役立てることを目的とする。また、MERSpv を用いて MERS-CoV 感受性細胞域を調べ、細胞への吸着・侵入機構を明らかにすることを目的とする。

平成 25 年度は MERS<sub>Spv</sub> の作製を試みたが、ウイルス感染性の解析のための十分な感染価が得られなかった。このため、平成 26 年度は MERS-CoV S の細胞質内ドメインの欠失変異体を作製し、これを被った感染価の高い MERS<sub>Spv</sub> を作製し、これを用いた中和抗体測定法を開発した。また、MERS-CoV 感受性細胞域を調べるため、MERS-CoV のレセプターであるジペプジジルペプチダーゼ 4 (DPP4) に着目し、実験用小動物の一つであるラットの DPP4 がどの程度 MERS-CoV のレセプターとして機能するか検討した。

#### B. 研究方法：

- 1) MERS-CoV S の細胞質内ドメインを C 末端側から 7, 11, 16, 20 アミノ酸を削った cDNA 欠失変異体を作製し哺乳細胞発現ベクター-pcDNA にクローニングした(図 1A)。
- 2) 各発現プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクトし、シュードタイプ種ウイルスである VSV G\* (GFP をレポーター遺伝子として持つ)を感染させ、MERS-CoV の各種欠失変異 S を被った VSV シュードタイプ(MERS<sub>Spv</sub>)を作製した。MERS<sub>Spv</sub> の細胞への感染性の解析は、GFP 陽性細胞数を計測することにより行った。
- 3) ヒト DPP4、ラット DPP4、ラット DPP4 のうち S 結合部分のアミノ酸(T292, V334, E342)をそれぞれ一つずつヒト

DPP4 のアミノ酸(L292, R334, Q342)に置換したラット DPP4(ラット DPP4-T292L、ラット DPP4-V334R、ラット DPP4-E342Q)、これらの 3 つの変異を同時に導入したラット DPP4-mut x3、あるいはラット DPP4 の S 結合部位をヒト DPP4 に入れ替えたヒト-ラット DPP4 キメラを発現させた CHO 細胞を用いて、それぞれが MERS-CoV のレセプターとして働くかどうか検討した。

#### C. 結果：

- 1) MERS-CoV S の細胞質内ドメインを C 末端側から 7, 11, 16, 20 アミノ酸を削った cDNA 欠失変異体を作製し(図 1A)、それぞれの S を被った VSV シュードタイプ(MERS<sub>Spv</sub>)を作製した。C 末端から 16 アミノ酸を削ると最も高い感染効率を示し(MERS<sub>Spv</sub>-St16)、その感染価は完全長の S を被った VSV シュードタイプ(MERS<sub>Spv</sub>-Wt)よりも 10 倍高かった(図 1B)。
- 2) C 末端を削ることにより S の細胞内分布が変わるかどうか蛍光抗体法で調べたところ、全長の S は細胞内の ER 付近にとどまっているのに対し、C 末端を削った S は、その分布が ER から細胞膜付近に発現していることが明らかとなった。これは S の C 末端側に存在する ER 局在シグナルを欠失させたためであると考えられる(図 2)。
- 3) MERS<sub>Spv</sub>-St16 の感染は MERS-CoV S に

対する抗血清により濃度依存的に阻害された。一方、コントロールとして用いた、MERS-CoV NあるいはSARS-CoV Sに対する抗血清では MERSpv-St16 の感染は阻害されなかった。このことから、MERSpv-St16 の感染は MERS-CoV S 依存的であると考えられた (図3)。

- 4) ヒト DPP4 の MERS-CoV S 結合に必須のアミノ酸配列とコウモリ (MERS-CoV 感染可能) およびラット DPP4 の相当する部位のアミノ酸配列を図4に示す。ヒト DPP4、ラット DPP4、ラット DPP4 のうち S 結合部分のアミノ酸 (T292, V334, E342) をそれぞれ一つずつヒト DPP4 のアミノ酸 (L292, R334, Q342) に置換したラット DPP4 (ラット DPP4-T292L、ラット DPP4-V334R、ラット DPP4-E342Q)、これらの3つの変異を同時に導入したラット DPP4-mut x3、あるいは、ラット DPP4 の S 結合部位をヒト DPP4 に入れ替えたヒト-ラット DPP4 キメラを発現させた CHO 細胞に MERSpv-St16 を接種した。ラット DPP4 発現細胞には MERSpv-St16 はほとんど感染せず (図5)、1 アミノ酸をヒト型に入れ替えたラット DPP4-T292L、ラット DPP4-V334R、ラット DPP4-E342Q 発現細胞でも同様であった。3 アミノ酸を同時に入れ替えたラット DPP4-mut x3 発現細胞には MERSpv-St16 は感染することから、3つのアミノ酸の違いが MERS-CoV の感染する、しないを規定する主要な要因であ

ると考えられた (図6)。また、ラット DPP4-mut x3 発現細胞への感染はヒト DPP4 およびヒト-ラット DPP4 キメラを発現する細胞への感染よりも効率が低かったことから、MERS-CoV の効率的な感染には3つのアミノ酸のみならず、S 結合部位の他の部位のアミノ酸配列も効率的な感染に必要であると考えられた (図6)。

#### D. 考察：

本研究で、MERS-CoV の S を被った感染価の高い VSV シュードタイプ (MERSpv-St16) を作製することができた。MERSpv-St16 の感染は S タンパク質依存的であったことから、このシュードタイプは MERS-CoV そのものの感染性を解析するうえで、また MERS-CoV に対する中和抗体を測定するうえで有用なツールとなりうる。

ラット由来 DPP4 は MERS-CoV のレセプターとして機能しないことが明らかとなった。このことから、MERS-CoV の動物モデルとしてラットは適していないと考えられた。また、ラット DPP4 の S タンパク質結合部位のアミノ酸を一つヒトの DPP4 のアミノ酸に入れ替えてもレセプターとして機能せず、また、S タンパク質結合部位をヒト DPP4 に入れ替えないとレセプターとして十分に機能しないことから、MERS-CoV レセプター機能には S 結合部位の多くのアミノ酸が関与していると考えられた。ラット DPP4 発現細胞へ MERS-CoV の感染効率

は非常に低いが、MERS-CoV の S に変異を導入することにより、感染効率が上昇するかどうかについて、構造解析を含めて検討する予定である。

#### E. 結論

- 1) MERS-CoV の S を被った感染価の高い VSV シュードタイプ(MERSpv-St16) を作製することができた。
- 2) MERSpv-St16 は MERS-CoV そのものの感染性を解析するうえで、また MERS-CoV に対する中和抗体を測定するうえで有用なツールとなりうる。
- 3) ラット DPP4 は MERS-CoV レセプターとして機能しないことが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

MERSは、サウジアラビアを中心として、未だに患者が発生している。これまでに、輸入症例が発生しているのは、英国、フランス、チュニジア、イタリア、マレーシア、フィリピン、ギリシャ、エジプト、米国、オランダ、アルジェリア、オーストリア、トルコである。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. Analysis of Lujo Virus Cell

Entry using Pseudotype Vesicular Stomatitis Virus. *J Virol.* 88(13):7317-7330,2014.

- 2) Bukbuk DN, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Iha K, Fukuma A, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M, Kasolo F, Baba SS. Development and validation of serological assays for viral hemorrhagic fevers and determination of the prevalence of Rift Valley fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 108(12):768-773, 2014.
- 3) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J Clin Microbiol.* 52(9):3325-3333, 2014.

#### 2. 学会発表

- 1) 福士秀悦、永田典代、岩田奈織子、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、下島昌幸、西條政幸. 高齢マウスにおける重症熱性血小板減少症候群ウイルスの感染感受性の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).

- 2) 福間藍子、福士秀悦、吉河智城、鈴木忠樹、谷英樹、谷口怜、下島昌幸、西條政幸. SFTS ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA への応用. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 3) 西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布. 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜, (2014. 11).
- 4) 下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、谷口怜、西條政幸. プラークを形成する SFTS ウイルスによる中和抗体価測定. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 5) 谷英樹、谷口怜、福間藍子、福士秀悦、森川茂、下島昌幸、西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP の細胞融合能と 25-hydroxycholesterol による細胞阻害効果. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 6) 谷口怜、堀本泰介、Joseph Masangkay、Puentepina Roberto Jr.、大松勉、永田典代、江川和孝、福間藍子、Harpal Singh、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、下島昌幸、吉河泰弘、西條政幸、久和茂、前田健. フィリピンのコウモリからのプテロパインオルソレオウイルスの分離. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 7) 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、江川和孝、下島昌幸、森川茂、西條政幸. ワクシニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 8) 岩田奈織子、福士秀悦、福間藍子、鈴木忠樹、竹田誠、田代真人、長谷川秀樹、永田典代. 中東呼吸器症候群コロナウイルスに対するマウスおよびラットの感受性について. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 9) Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Masayuki Saijo, Masayuki Shimojima. Development of antigen-capture ELISA for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).
- 10) Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Joseph S Masangkay, Roberto P Puentespina, Tsutomu Omatsu, Ken Maeda, Aiko Fukuma, Tomoki Yoshikawa, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shigeru Kyuwa, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. Seroepidemiological study of SFTS in wild bats in the Philippines. The 10th China-Japan International Conference of

Virology. Changchun, China. (2014. 08).

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

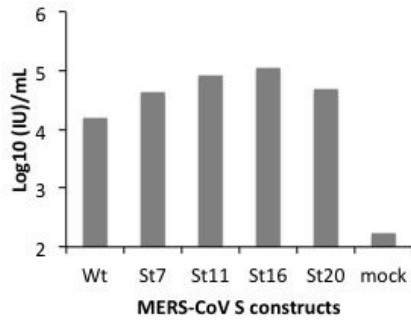
3. その他

なし

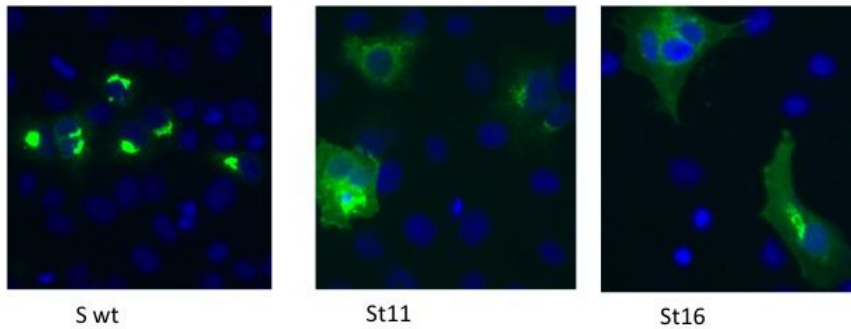
(A)

		Trans-membrane	Cytoplasmic	
SARS S wt	1192	I...V.....I.IVM-.TIL...MTSCCS.LK.ACS.GS..-KFD.D.S..VLKG.KLHYT		1255
MERS S wt	1293	NKWPYIWLGFIAGLVALALCVFFILCCPGCGTNCM-GKLKCNRCDDRYEYDLEPHKVHVH----		1353
		*****	* * * * *	
MERS St7	1293	NKWPYIWLGFIAGLVALALCVFFILCCPGCGTNCM-GKLKCNRCDDRYEYDLE		1346
MERS St11	1293	NKWPYIWLGFIAGLVALALCVFFILCCPGCGTNCM-GKLKCNRCDDRYEE		1342
MERS St16	1293	NKWPYIWLGFIAGLVALALCVFFILCCPGCGTNCM-GKLKCNRC		1337
MERS St20	1293	NKWPYIWLGFIAGLVALALCVFFILCCPGCGTNCM-GKLKC		1333

(B)



(图1) VSV pseudotyped with cytoplasmic deletion mutants of S protein. (A) C-terminal sequences of MERS-CoV S protein variants used in this study. The C-terminal 19 amino acid deletion mutant of SARS-CoV S is shown for comparison. Gray box indicated cytoplasmic domain. (B) VSV/GFP pseudotyped with deletion mutants was inoculated on Vero cells. GFP-expressing cells were represented as infectious unit (IU). The data indicate representative of two independent experiments with similar results.



(图2) Differential subcellular localization of C-terminus truncated S proteins. Vero cells were transfected with expression plasmids encoding MERS-CoV full-length S (S wt), C-terminal 11 amino acids (St11), or 16 amino acids (St16) truncated version of MERS-CoV S. After 48hrs, S proteins were detected with a monoclonal antibody against MERS-CoV S (45E-11, kindly provided from Dr. K. Onishi, National Institute of Infectious Diseases, Japan, manuscript in preparation).

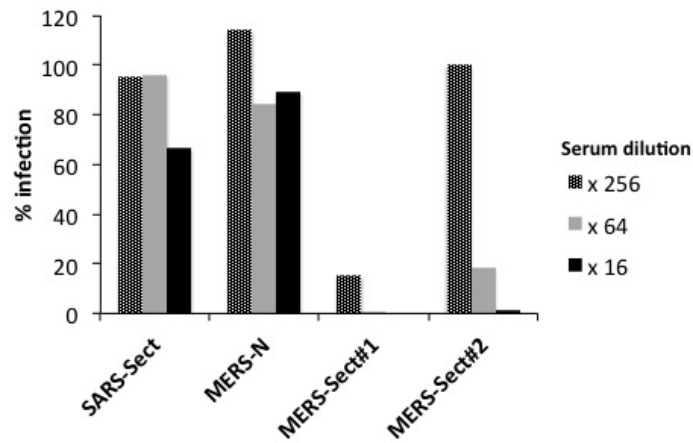
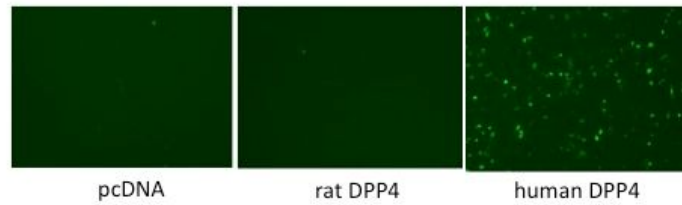


Figure 3 Specificity of MERSpv-St16 infection on Vero cells. MERSpv-St16 was pre-incubated with serially diluted rabbit anti-sera. Then the mixture was inoculated to Vero cells. The GFP-positive cells in the absence of antibodies was set as 100%. The data indicate representative of two independent experiments with similar results.

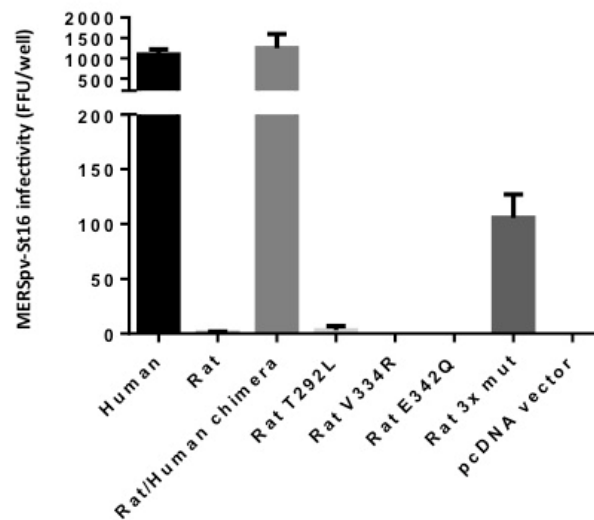
DPP4	RBD-contacting residues in DPP4*										
	265	284	286	289	292	293	315	320	334	342	344
Human	K	Q	T	A	L	I	R	Y	R	Q	I
Bat	K	Q	T	A	L	T	R	Y	K	Q	I
Rat	K	Q	T	A	T	T	R	Y	V	E	I

Figure 4 DPP4 residues contact with RBD of MERS-CoV  
 \* The position of amino acid residues refers to the rat DPP4.  
 Red characters indicate the amino acid residues different from human DPP4.





- ☒ 5 Rat DPP4 does not act as a MERS-CoV receptor. MERSpv-St16 was inoculated to the cells transfected with expression plasmid encoding human or rat DPP4 or pcDNA vector. GFP expression was examined by fluorescence microscopy.



- ☒ 6 Mutational analysis of rat DPP4. MERSpv-St16 was inoculated on the CHO cells transfected with expression plasmids encoding human DPP4, rat DPP4, or rat DPP4 mutants. GFP expression was examined by fluorescence microscopy, and the number of the GFP-positive cells was determined.



厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )

分担研究課題：野兔病の病原性発現機構の解析

研究分担者 宇田 晶彦 ( 国立感染症研究所獣医科学部 )

研究協力者 藤田修、堀田明豊、田徳雨 ( 国立感染症研究所獣医科学部 )

研究要旨：野兔病菌は動物に対して非常に高い感染性と病原性を有しており、野兔病菌病原因子の同定や、野兔病の発症機序の解明は公衆衛生上必要不可欠である。これまでに、マウス継代を用いて野兔病菌弱毒株 ( SCHU P0 および P5 ) から野兔病菌強毒株 ( SCHU P9 ) を作出し、両者のゲノム比較解析から弱毒株は pdpC 遺伝子の欠損により、マウスに対する病原性が完全に消失している事を明らかにしてきた。そこで本研究では、野兔病菌 pdpC 遺伝子が関与している他の病原遺伝子を同定、又は新たな病原遺伝子を同定する事を目的とし、弱毒株と強毒株の遺伝子発現比較解析を試みている。昨年度は、野兔病菌のタンパク質をコードする 1604 遺伝子中で 21 遺伝子が有意に発現変動している事を明らかにした。本年度は、このマイクロアレイ解析について詳細に再検討を行った。この結果、強毒株では一部の tRNA が強く発現しており、野兔病強毒株の菌体内で病原遺伝子候補を含むタンパク質の生合成が活発である可能性が示唆された。また、弱毒株と強毒株では、6 遺伝子 ( Isflu1、hupB、usp、FTT\_1140、FTT\_0272、FTT\_965c ) の発現量差異が確認された。この事から、これら 6 遺伝子は新たな病原性関連遺伝子である可能性が示唆された。

A . 研究目的：

野兔病は、野兔病菌の感染によって引き起こされる人畜共通感染症である。野兔病菌のヒトへの感染経路は多岐にわたり、菌を保持するダニや蚊等の吸血昆虫による媒介、感染動物との接触、感染動物の排泄物や死体に汚染された食料や飲料水の摂取、菌を含むエアロゾルの吸引等が挙げられる。

これらのヒトへの感染は 10 個以下という極微量の生菌数で感染が成立することから、バイオテロに使用される可能性のある病原体として分類されている。故に、高い感染力を保持する野兔病菌の病原因子を同定し、感染機序を解明する事は公衆衛生上必要不可欠である。

そこで本研究では、野兔病菌弱毒株と強

毒株の遺伝子発現比較解析を用いて、pdpC 遺伝子が関与している遺伝子の同定、又は新たな病原遺伝子を同定する事を目的とした。

## B. 研究方法：

### バクテリア及びウイルスからの核酸抽出

*F. tularensis* subsp. *tularensis* (野兎病菌) SCHU P0 株、SCHU P5 株および SCHU P9 株は Chamberlain defined medium (CDM 培地) で培養した後、10% グリセロールを含む CDM 培地に浮遊させ、使用するまで -80 で保管した。

野兎病菌を CDM 培地で培養し (OD<sub>600</sub> = 2.0~2.5)、遠心にて集菌した後 RNeasy mini kit (Qiagen Ltd., Valencia, CA) を用いて Total RNA を精製した。得られたサンプルは 1 mM EDTA を含む 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液で溶出した。抽出した RNA サンプルの濃度は Nanodrop 1000 (Scrum, Tokyo, Japan) で測定し、マイクロアレイ解析を行うまで -80 で保管した。

### マイクロアレイのデザイン

野兎病菌 SCHU S4 株の全ゲノム塩基配列を NCBI からダウンロードした後、Array Designer 3.01 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) にインポートした。野兎病菌 SCHU S4 に添付されていたアノテーション情報に基づき、1604 種類のタンパク質をコードする遺伝子、38 種類の tRNA 遺伝子、および 10 種類の rRNA 遺伝子毎に塩基配列

を分割し、各遺伝子毎に 1 種類のプローブを設計した。プローブの設計時の条件は、60 mer、T<sub>m</sub> 75°C ± 5.0°C、ヘアピンループ (< - 3.0 kcal/mol) 及びセルフダイマー (< - 3.0 kcal/mol)、そしてクロスホモロジーは極力避けた。設計したプローブは ProbeMower (Symplus, Tokyo, Japan) を用いてホモロジー検索 (BLAST 検索) および結果取得を行い、十分な特異性を持つ 1652 種類のセンス鎖プローブを選定した。1652 種類のプローブはアレイあたり 7 連でプリントしたマイクロアレイの作製はアジレントに委託した。

### マイクロアレイのハイブリダイゼーションとデータ解析

野兎病菌 SCHU P0、P5 および P9 から抽出した Total RNA は 65 、15 分間熱処理を行った後、Ullysis Alexa Flour 546 Nucleic Acid Labeling Kit (Molecular probes, Eugene, OR) を添加し、80 、15 分間インキュベートした。標識された RNA はエタノール沈澱した後、70% エタノールでリンスし、乾燥後 25 μl の DEPC 処理水で溶解した。各サンプルに 25 μl の 2x Fragmentation Buffer (Agilent) を添加した後 50 、30 分間断片化処理を行い、50 μl の 2x Hi-RPM Gene Expression Hybridization Buffer (Agilent) と混合した。100 μl のハイブリダイゼーションサンプル溶液はガスケットスライド (Agilent) の上に拡げ、マイクロアレイスライドと張り合わせホルダーにセットした。

ハイブリダイゼーションは Hybridization Oven (Agilent) を用いて 65°C、毎分 10 回転で 17 時間行った。ハイブリダイゼーション後のスライドはアジレントプロトコール ver. 6.5 に従い洗浄し、マイクロアレイスキャナーのグリーンレーザーを用いてマイクロアレイスライドの蛍光画像ファイルを取得した。得られた画像ファイルから、Feature Extraction (Agilent) を用いて各スポットの蛍光強度を数値化した。

### マイクロアレイデータの解析

Feature Extraction によって出力された SCHU P0、P5、P9 株の遺伝子発現データは GeneSpring GX (Agilent) にインポートし、チップ間 (Shift to 50 percentile) および各遺伝子 (median of all samples) を normalization (標準化) した。補正したデータから 3 つの株間のいずれかで有意に変動した遺伝子 (2 倍以上、 $p < 0.05$ ) を抽出した。

### C. 結果：

#### 野兎病菌の新たな病原遺伝子候補の同定

昨年度行った野兎病菌強毒株 (SCHU P9) と弱毒株 (SCHU P0 および P5) の遺伝子発現比較解析について再度詳細に検討を行った。液体培養した SCHU P0、P5、P9 株 (各株  $n=2$ ) から Total RNA を抽出後蛍光標識したサンプルと野兎病菌発現解析アレイを用いて、遺伝子発現比較解析を試みた。マイクロアレイスキャナによって読み取られ

たマイクロアレイの画像を、Feature Extraction ソフトウェアによって各遺伝子発現量を数値化、そのデータを遺伝子発現比較ソフト (GeneSpring) へ取込後、アレイ間補正および遺伝子発現補正を行った。野兎病菌弱毒株 (SCHU P0 および P5) と強毒株 (SCHU P9) の 3 株間で、2 倍以上の発現量差異、且つ有意に変動した ( $p < 0.05$ ) 遺伝子を抽出した結果、強毒株では 19 遺伝子が発現上昇し、2 遺伝子が発現減少しており、昨年度と同じ結果が得られた。しかし、昨年度に行った解析では、これら 21 遺伝子のアノテーション情報付加の作業手順に誤りが有る事が明らかとなった。そこで、本年度は正しいアノテーション情報を付加し、再度解析を試みた。この結果、強毒 (SCHU P9) 株では 12 種類の tRNA と 1 種類の rRNA の発現量が顕著に上昇しており、野兎病強毒株の菌内では病原遺伝子候補を含むタンパク質の生合成が活発である可能性が示唆された。また、弱毒 (SCHU P0 & P5) 株と強毒 (SCHU P9) 株では、6 遺伝子 (Isflu1、hupB、usp、FTT\_1140、FTT\_0272、FTT\_965c) の発現量に差が有る事が確認され、これらの遺伝子が病原性に関与している可能性が示唆された。

#### 野兎病菌 PdpC タンパク質の核酸結合能に関する検討

本研究で使用している野兎病菌弱毒株 (SCHU P0 および P5) は pdpC 遺伝子が欠損している事を昨年度までに明らかにして

きた。PdpC タンパク質は、野兔病菌の中で 2 番目に大きな分子量を持ち、最も強い塩基性を示すタンパク質である。この性状は核酸結合性タンパク質に多くみられることから、PdpC も類似した機能を持つと推測されていた。そこで、液体培養した SCHU P0、P5、P9 株からタンパク質抽出を行い、抗 PdpC 抗体を用いて免疫沈降を行った。しかしながら、野兔病菌 PdpC タンパク質が核酸に結合する証拠は未だ得られていない。

#### D. 考察：

野兔病菌は哺乳類に対して極めて高い感染性と病原性を有し、病気性発揮機序の解析や病原性遺伝子の同定は公衆衛生上非常に重要である。本研究では、野兔病菌強毒株と弱毒株の遺伝子発現量比較解析を用いて、病原遺伝子の同定を試みている。

本年度のマイクロアレイ解析において、強毒株と弱毒株間で 6 遺伝子( Isflu1、hupB、usp、FTT\_1140、FTT\_0272、FTT\_965c)の発現量に有意差が確認された。これらの遺伝子は病原性に関わっている可能性が推測されることから、遺伝子破壊株の作出後、マクロファージ中での増殖能やマウスに対する病原性の確認について、今後精力的に検討を行っていきたい。また、強毒株において一部の tRNA の発現量が強く維持されていたことから野兔病菌の病原因子を含むタンパク質合成が活発に行われている可能性が示唆された。しかし、tRNA や rRNA は、比較的安定性のある RNA として知られてお

り、サンプル採材時の生菌および死菌の構成比率によって、見掛け上の遺伝子発現変動は大きな誤差を生む可能性が考えられた。また、タンパク質の生合成に関わる他の遺伝子発現変動は観察されなかった事を鑑みれば、tRNA や rRNA の発現変動が病原性に関与している可能性は少ないと思われた。しかしながら、強毒株と弱毒株における網羅的タンパク質発現比較解析を実施し、tRNA や rRNA の発現変動との関連性について検討を試行する必要性は感じられ、今後の検討課題としたい。

以上の結果から、野兔病菌強毒株と弱毒株で有意な遺伝子発現量に差異が観察された 6 遺伝子( Isflu1、hupB、usp、FTT\_1140、FTT\_0272、FTT\_965c)の病原性について重点的に検討を行う必要性が有ると考えられた。

#### E. 結論

野兔病菌強毒株と弱毒株の遺伝子発現比較を行い、6 種類の新たな病原遺伝子候補を同定した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

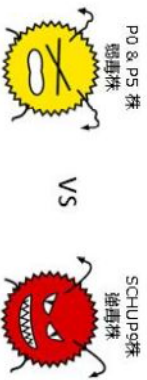
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 野兔病菌の病原性に関する研究



弱毒株と強毒株のmRNA発現比較解析  
昨年得られた結果を詳細に再解析した

P0	P5	P9	Target ID	Gene Symbols	Description	micrarray		
						Log <sub>2</sub> (P5/P0)	Log <sub>2</sub> (P9/P0)	Log <sub>2</sub> (P9/P5)
			NC_006570-PR1311	FTT_d04	16S ribosomal RNA	0.7	-0.8	-2.8
			NC_006570-PR983	FTT_965c	hypothetical protein	0.2	-1.1	-2.4
			NC_006570-PR815	FTT_h11	RNA-phel(GAA)	0.1	1.9	3.5
			NC_006570-PR1603	FTT_l32	RNA-Mel(CAT)	0.1	2.0	3.9
			NC_006570-PR888	FTT_h16	RNA-Mel(GGA)	0.1	2.1	4.0
			NC_006570-PR819	FTT_h15	RNA-Mel(TAG)	0.1	2.2	4.1
			NC_006570-PR818	FTT_h14	RNA-His(GTG)	-0.2	2.0	4.6
			NC_006570-PR278	FTT_l07	RNA-Gln(TTG)	-0.2	2.0	4.6
			NC_006570-PR713	FTT_l09	RNA-Val(TAC)	-0.2	2.8	7.8
			NC_006570-PR318	FTT_l08	RNA-Gln(TTC)	-0.2	2.7	7.6
			NC_006570-PR139	FTT_l03	RNA-Tyr(GTA)	-0.1	2.6	6.5
			NC_006570-PR412	FTT_l01	5S ribosomal RNA	-0.1	2.6	6.8
			NC_006570-PR1525	FTT_l27	RNA-Arg(GCC)	-0.1	2.6	6.7
			NC_006570-PR1158	FTT_l140	hypothetical protein	-1.0	1.4	5.4
			NC_006570-PR223	FTT_0217	(pseudo)	0.3	1.5	2.4
			NC_006570-PR1517	FTT_l481c	isflu1	0.1	1.6	2.8
			NC_006570-PR636	FTT_0827	huppB	-0.5	0.7	2.4
			NC_006570-PR251	FTT_0245	usp	-0.3	0.8	2.1
			NC_006570-PR1680	FTT_l33	RNA-Mel(CAT)	0.3	1.1	1.6
			NC_006570-PR1279	FTT_l261c	(pseudo)	0.2	1.0	1.8
			NC_006570-PR279	FTT_0272	hypothetical protein	0.3	1.0	1.7

強毒株 (SCHU P9) : 発現減少 2遺伝子 / 発現上昇 19遺伝子

### 弱毒株と強毒株の遺伝子発現比較の結果

1. 強毒株では19遺伝子が発現上昇し、2遺伝子の発現が抑制されている

2. 強毒 (SCHU P9) 株では、tRNAの発現量が高い

→野兔病強毒株の菌内では、病原遺伝子候補を含むタンパク質の合成が活発である可能性が示唆された。強毒株と弱毒株の網羅的タンパク質発現比較を行い、確認する必要性アリ。

3. 弱毒 (SCHU P0 & P5) 株と強毒 (SCHU P9) 株では、6遺伝子 (Isflu1、huppB、usp、FTT\_1140、FTT\_0272、FTT\_965c)に発現量に差がある。

→これらは、病原性に関与している可能性が示唆された。6遺伝子の欠損株では、病原性の欠損が認められることを確認する。

### まとめ

野兔病菌強毒株の高い感染性と病原性は、活発なタンパク質合成に支えられている可能性が示唆された。

また、6種類の新たな病原遺伝子候補を見つけた。



厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )

分担研究課題：ニホンザル血小板減少症の原因となる SRV のウイルス学的解析

研究分担者 三浦智行( 京都大学ウイルス研究所附属感染症モデル研究センター霊長類モデル研究領域 准教授)

研究協力者 宮沢孝幸( 京都大学ウイルス研究所細胞生物学研究部門信号伝達学研究分野 准教授)

研究要旨：最近、京都大学霊長類研究所にてニホンザルが血小板減少症により大量死した。これまでの次世代シーケンサーなどの研究からサルレトロウイルス 4 型(SRV-4)との関連が示唆された。昨年度においては、SRV-4 をニホンザルに実験感染した際に、同様の症状を再現できたことを報告した。このことから、京都大学霊長類研究所におけるニホンザルが血小板減少症の原因ウイルスは SRV-4 であることを確定した(発表論文、 )。最近、京都大学霊長類研究所とは異なる自然科学研究機構生理学研究所の動物施設にて同様の症状を呈しニホンザルが死亡する事例があった。しかし、これらのニホンザルにおいて SRV-4 の感染は確認できなかった。そこで、メタゲノム解析を行ったところ、発症個体特異的に SRV-5 に相同性の高い核酸配列が検出され、SRV-5 もしくは SRV-5 に類似したウイルスがニホンザルの血小板減少症の発症に関与していると考えられた。今年度は、発症個体より SRV-5 を分離し、その全塩基配列を確定した。さらには感染性クローンの作製に成功した。

A. 研究目的：

2001 年から 2010 年の間に 2 度、京都大学霊長類研究所にてニホンザルが急性血小板減少症を呈して大量死する事例があった。SRV-4 が原因ウイルスであることを確定したことを昨年度に報告した。今回、新たに霊長類研究所とは異なる動物施設(自然科

学研究機構生理学研究所関連施設)にてニホンザルが同様の症状を呈し死亡する事例があった。まず、最初に SRV-4 を疑い、SRV-4 の感染を PCR で調査した。しかし、SRV-4 の核酸配列は検出できなかった。そこで、メタゲノム解析を行ったところ、発症個体特異的に SRV-5 に相同性の高い核酸

配列が検出され、SRV-5 もしくは SRV-5 に類似したウイルスがニホンザルの血小板減少症の発症に関与していると考えられた。今回、我々は SRV-5 核酸陽性個体よりウイルスを分離し、ウイルスの塩基配列の決定及び感染性クローンの作製を試みた。

#### B. 研究方法：

6 頭の SRV-5 核酸陽性のニホンザルの血漿を、ヒト胎児腎臓由来株化細胞 (293T 細胞) に接種し、25 日間培養した。その後、ゲノム DNA を抽出し、SRV-5 特異的プライマーを用いて PCR を行った。さらに、SRV-5 特異的プライマー及び SRV 共通プライマーを用いて全長をクローニングし、全塩基配列を決定、感染性クローンを作製した。クローンの感染性は PCR 及び LacZ マーカーレスキューアッセイを用いて確認した(図 1)。

#### C. 研究結果：

ニホンザル 6 頭中 2 頭よりウイルス分離に成功した(図 2)。ニホンザルより分離された SRV-5 は既存の SRV-5(AB611707)と塩基配列で 99% 相同であった。また、作製したクローンは感染性であることが確認できた(図 3)。

#### D. 考察：

今回、血小板減少症ニホンザルより SRV-5 の分離に成功した。SRV-5 は SRV-4 と非常に近縁なウイルスであることが知ら

れている。このことから、SRV-5 は SRV-4 と同様にニホンザルに急性に血小板減少症を引き起こすことが強く示唆される。加えて、今回作製に成功した SRV-5 の感染性クローンは、SRV-5 のウイルス学的性状の解析に役立つと考えられる。

#### E. 結論

SRV-5 はニホンザルに感染し、増殖しうることがわかった。

#### F. 健康危険情報

現在のところ、国内において SRV4 及び 5 がヒトに感染した事例はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yoshikawa R, Okamoto M, Sakaguchi S, Nakagawa S, Miura T, Hirai H, Miyazawa T. Simian Retrovirus 4 Induces Lethal Acute Thrombocytopenia in Japanese Macaques. *Journal of Virology* 2015 (*in press*).
- 2) Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H. Emergence of infectious malignant

thrombocytopenia in Japanese macaques  
(*Macaca fuscata*) by SRV-4 after  
transmission to a novel host. *Scientific  
Reports* 2015 (*in press*)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

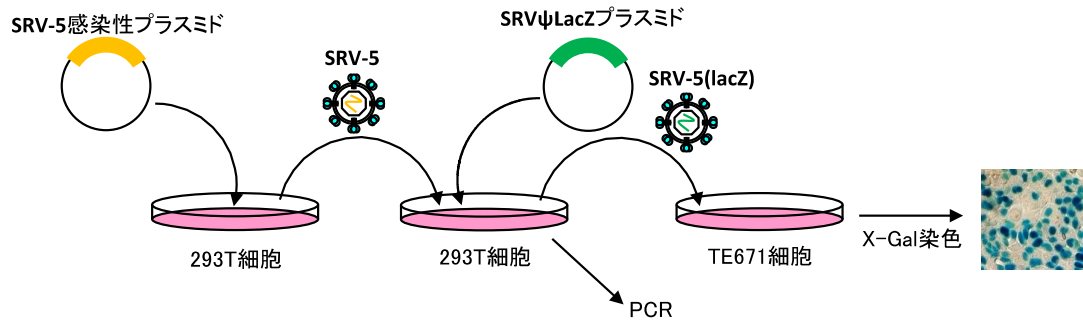
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1:SRV-5プラスミドの感染性確認方法



293T細胞: ヒト胎児由来腎臓株化細胞  
 TE671細胞: ヒト横紋筋肉腫株化細胞

SRV $\psi$ LacZプラスミド: SRVパッケージングシグナルとLacZ遺伝子の融合プラスミド  
 SRV-5(lacZ): LacZ遺伝子を取り込んだSRV-5

図2:病態個体血漿からのSRV5の分離

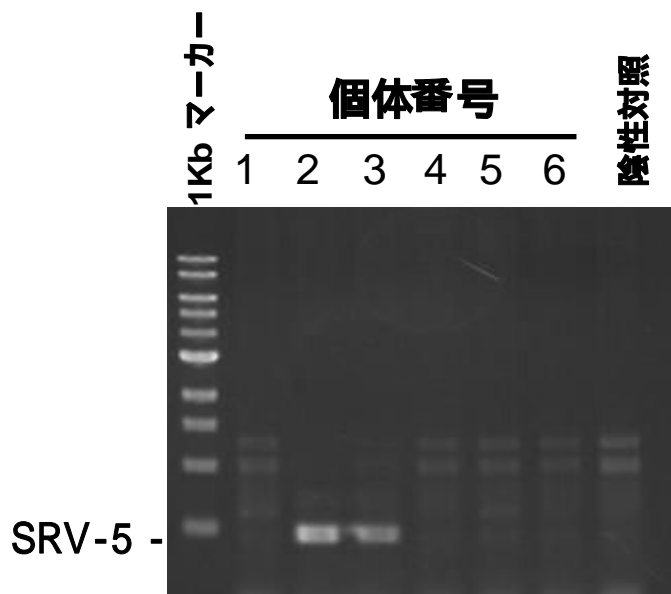
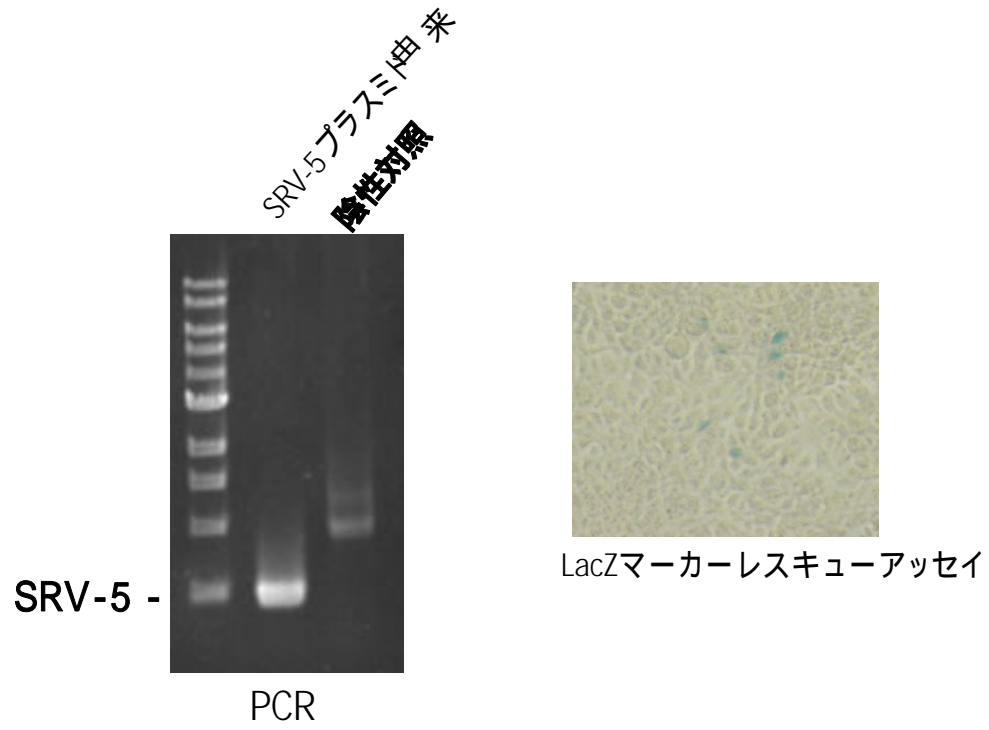


図3: SRV-5プラスミドの感染性確認





厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )

分担研究課題：野生動物の動物由来感染症病原体の保有状況の網羅的調査

研究分担者：前田健 ( 山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室 )

研究協力者：下田宙、高野愛、鎌田龍星、寺田豊、米満研三、濱崎千菜美 ( 同 )

研究要旨：野生動物を中心とした動物由来感染症病原体の保有状況を把握するために、本年度は、新規発見したラブドウイルスであるニシムロウイルスのイノシシでの疫学調査、別のグループが発見したフレボウイルスとトーゴトウイルスのイノシシでの疫学調査を実施した。更に、フェレットにおける新規血清型フェレットコロナウイルス、イノシシやシカ、ダニから新規フラビウイルスを発見した。

A. 研究目的：

野生動物や伴侶動物には未だ知られていない感染症が多く存在する。また、ウイルスが分離されていてもその生活環が不明なものもある。本研究は野生動物の保有する動物由来ウイルスの探索を目的として、新規ウイルスの野生動物での感染状況の調査と新規動物保有のウイルスの検出を行った。

B. 研究方法：

1) 検査材料

有害鳥獣あるいは狩猟期に捕獲された動物、死亡個体から血清あるいは臓器を回収して検査に供試した。

ダニは、旗振り法にて回収、または動物に付着していたものを検査に供試した。

2) 抗体検出系

ニシムロウイルス感染および Mock 感染 Vero 細胞より抗原を抽出し、ELISA 用抗原に用いた。また新規フレボウイルス、新規トーゴトウイルス感染 Vero 細胞も同様にして抽出し、ELISA 抗原として用いた。ELISA プレートにそれぞれ 0.5  $\mu$ g を吸着させ、ブロックエースによりブロッキング後、1:100 希釈の動物血清を 1 次抗体、Protein A/G を 2 次抗体として用い、発色は Peroxidase substrate kit (Bio-Rad) を用いて実施した。感染細胞抗原ウェルの吸光度を Mock 感染細胞抗原ウェルの吸光度で引くことにより、特異的吸光度とした。

3) 新規フラビウイルスの遺伝子検出

血清から QIAamp viral RNA mini kit、あるいは肝臓とダニから RNeasy mini kit を用いて RNA を抽出後、プライマー-cFD2 と MAMD と QIAGEN OneStep RT-PCR kit を用いて、RT-PCR を実施した。さらに nested プライマー-cFD2 と FS778 を用いて nested PCR を実施した。電気泳動にて特異バンドを確認後、塩基配列を決定した。

#### 4) フェレットコロナウイルス抗体検出系の作出

大腸菌にてフェレットコロナウイルス Yamaguchi 株のヌクレオカプシド(N)蛋白の N 末端側 (1-179) と C 末端側 (180-374) を GST 融合蛋白として大腸菌にて発現・精製を行った。精製 GST 融合蛋白および GST 蛋白を ELISA プレートにそれぞれ 0.5  $\mu$ g を吸着させ、ブロックエースによりブロッキング後、1:100 希釈の動物血清を 1 次抗体、Protein A/G を 2 次抗体として用い、発色は Peroxidase substrate kit (Bio-Rad) を用いて実施した。GST 融合蛋白を抗原としたウェルの吸光度を GST 蛋白を抗原としたウェルの吸光度で引くことにより、特異的吸光度とした。

(倫理面からの配慮について)

野生動物：有害鳥獣として捕獲された個体、死亡個体、狩猟期に捕獲された個体から材料を採取している。

フェレット：飼育者に調査研究に用いることの許可を得ている。

#### C. 結果：

##### 1) 新規ラブドウイルスであるニシムロウイルスの疫学調査

我々がイノシシの血清中から新規に分離したニシムロラブドウイルスは、イノシシ、シカ、ウシ、ブタに感染することが明らかになっている。しかし、その感染環に関しては不明な点が多い。今回、ニシムロラブドウイルスに対する抗体の検出を目的として、ELISA 系の確立を行った。その結果、吸光度 0.2 で多くの陰性個体が排除できることが判明した (図 1)。そこで、山口県と栃木県のイノシシの疫学調査を実施した結果、山口県で 43.1% のイノシシが感染していることが判明した (表 1)。栃木県のイノシシは 1.1% であったが、これは非特異反応によるものと考えられた (表 1)。今後は、栃木県のイノシシは全て陰性と考えて、Average + 3\*SD を Cut-off 値と設定して、調査を継続する必要がある。

##### 2) 新規フレボウイルスの疫学調査

イノシシにおけるダニから分離された新規フレボウイルスの抗体保有率を調査した。Cut-off 値は暫定的に 0.5 として判定した結果、栃木県では 69% の抗体陽性率で最も高かったが、全国に本ウイルスが蔓延していることが確認された。

##### 3) 新規トーチトウイルスの疫学調査

イノシシにおけるダニから分離された新



規トーチウイルスの抗体保有状況の調査を実施した。Cut-off 値は暫定的に 0.5 とし判定した結果、栃木県のイノシシには感染していないことが判明した。今後は、栃木県のイノシシは全て陰性と考えて、Average + 3\*SD を Cut-off 値と設定して、調査を継続する必要がある。一方、西日本では多くのイノシシが陽性となった。

#### 4) 新規血清型のフェレットコロナウイルスの発見

フェレットコロナウイルスは 2000 年に初めて見つかった新興感染症である。我々は、国内におけるフェレットコロナウイルスの遺伝子解析を行ってきた。しかし、ウイルスが未分離であることから抗体の検出方法が確立されていない。そこで、我々は、コロナウイルスで比較的保存されており、抗原性が高いヌクレオカプシドプロテイン (N) 蛋白を大腸菌にて発現し、抗体検査用の抗原として用いた。N 末端領域 1-179 番目のアミノ酸を GST 蛋白と融合した蛋白 N(1-179) と C 末端領域の 180-379 番目のアミノ酸を GST 蛋白と融合した N(180-379) を発現・精製後、ELISA 抗原として用いた。その結果、多くのフェレット血清は N(1-179) と N(180-379) に同じように反応したが、2 頭の血清は N(1-179) とはよく反応したが、N(180-379) とはほとんど反応しなかった(図 3、白丸)。このうち一頭の No.22 はウイルス遺伝子も検出されていたのでコロナウイルス共通プライマーで遺伝子解析を実施し

系統樹を作成した結果、これまで報告されているフェレットコロナウイルスとは異なるクラスターに位置することが判明した(図 4)。更に、フェレットから検出されるコロナウイルスの遺伝子解析を行った結果、No.160 も同様のウイルスに感染していることが判明した(図 4)。この結果、フェレットコロナウイルスには、抗原性の異なる新規のウイルスが存在することが示された。

#### 5) 新規フラビウイルスの遺伝子検出

野生動物およびダニからのフラビウイルスの遺伝子の検出を目的として、フラビウイルス共通プライマーを用いて、semi-nested RT-PCR を実施した。その結果、シカの血清から日本脳炎ウイルス、シカおよびイノシシの血清とダニ体内から同じ新規フラビウイルス、イノシシの肝臓からダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)様新規フラビウイルス遺伝子が検出された(表 2)。塩基配列を決定した結果、今回、イノシシ、シカ、ダニから検出された新規フラビウイルスは全く新しいウイルスである可能性が示唆された(図 5)。また、北海道以外で TBEV 様ウイルスが検出されたのは初めてである。

#### D. 考察：

1) 新規ラブドウイルスであるニシムロウイルスは非常に多くの動物種に感染していることが判明した。また、地

域差もありそうである。しかし、その感染環やベクターの存在に関しては不明である。ヒトへの感染状況なども調査する必要があるのかもしれない。

- 2) 新規フレボウイルス、新規トーチウイルスとともに少なくともイノシシにおいて広く蔓延していることが判明した。新規トーチウイルスはサルへの感染も検出された（現在確認中）。両ウイルスの感染環並びにヒトへの感染状況を調査する必要がある。
- 3) フェレットのおいても異なるウイルスが2種類感染していることが証明された。コロナウイルスは、様々な変異を引き起こして、異種間伝播や高病原性を獲得することがある。今後も、調査の継続が必要である。
- 4) 北海道以外で初めてダニ媒介性脳炎様フラビウイルスが検出された。ヒトへの感染を調べるとともに、ウイルス分離をする必要があるだろう。
- 5) ダニとイノシシとシカから共通の新規フラビウイルスが検出された。様々な動物に感染することから、ヒトへの感染を調べるとともに、ウイルス分離をする必要があるだろう。

#### E. 結論

国内の野生動物・節足動物間で、新規ラブドウイルス、フレボウイルス、トーチウイルス、フラビウイルスが蔓延していることが判明した。ヒトへの感染を含めて感

染環を詳細に解析する必要がある。

フェレットコロナウイルスに認められるようにまだまだ未知のコロナウイルスが存在することが確認された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shimoda H, Saito A, Noguchi K, Terada Y, Kuwata R, Akari H, Takasaki T, Maeda K\*. Seroprevalence of Japanese encephalitis virus infection in captive Japanese macaques (Macaca fuscata). *Primates*. 2014 Jul; 55(3): 441-445.
- 2) Hara Y, Terada Y, Yonemitsu K, Shimoda H, Noguchi K, Suzuki K, Maeda K\*. High prevalence of hepatitis E virus in wild boar in Yamaguchi Prefecture, Japan. *Journal of Wildlife Diseases* 2014;50(2):378-383.
- 3) Terada Y, Minami S, Noguchi K, Mahmoud H.Y.A.H., Shimoda H, Mochizuki M, Une Y, Maeda K\*. Genetic characterization of coronaviruses from domestic ferrets in Japan. *Emerging Infectious Diseases* 2014 Feb; 20(2): 284-287.
- 4) 鎌田龍星, 杉山弘樹, 下田 宙, 前田 健 「蚊が保有・媒介するウイルス感染症」(総説) *Japanese Journal of Veterinary Parasitology*. 13(2); 91-101
- 5) 米満研三、服部志保、鈴木准子、浜崎千

- 菜美、下田 宙、前田 健「ニホンイノシシのウイルス感染症」兵庫県におけるニホンイノシシの管理の現状と課題（兵庫県森林動物研究センター研究部編集）第8章 p93-105，2014
- 6) 前田 健：「イヌジステンパーウイルスの今」*Companion Animal Practice* 2014. Apr: 298: 47-50 (緑書房)
- 2.学会発表
- 1) 米満研三、原由香、寺田豊、高野愛、下田宙、小寺祐二、竹田努、前田 健「新規開発 ELISA を用いた野生動物における E 型肝炎ウイルス感染状況調査」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜市(パシフィコ横浜) (2014.11.10-11)
- 2) 鎌田龍星、杉山弘樹、米満研三、服部志保、鈴木絢子、南昌平、濱崎千菜美、寺田豊、谷口雅康、下田宙、前田 健「牛舎捕集蚊の消長と分離ウイルスについて」第 21 階トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、横浜市（パシフィコ横浜）(2014.11.9)
- 3) 米満研三、下田宙、鎌田龍星、寺田 豊、高野愛、前田 健「野生動物、ダニからフラビウイルス遺伝子検出」第 21 階トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、横浜市（パシフィコ横浜）(2014.11.9)
- 4) 下田 宙、米満研三、早坂大輔、好井 健太朗、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 (2014.9.9)
- 5) 野口慧多、下田 宙、寺田 豊、Nguyen Dung、水谷哲也、中村昇太、中屋隆明、鈴木哲朗、本道栄一、前田 健「キクガシラコウモリ由来新規ガンマヘルペスウイルスの遺伝子解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道 (2014.9.10)
- 6) 南 昌平、寺田 豊、下田 宙、前田 健「フェレットコロナウイルス抗体検出系の確立とその評価」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道(2014.9.10)
- 7) 寺田 豊、下田 宙、野口慧多、Nguyen Van Dung、鎌田龍星、城ヶ原貴通、織田銃一、高野 愛、本道栄一、前田 健「実験動物スルクス *Suncus murinus* からの新規コロナウイルスの検出」第 29 回中国四国ウイルス研究会(山口大学)(2014.6.29)
- 8) 米満研三、原 由香、寺田 豊、高野 愛、下田 宙、小寺祐二、竹田 努、前田 健「新規開発 ELISA 法を用いた野生動物における E 型肝炎ウイルス抗体保有状況調査」第 29 回中国四国ウイルス研究会（山口大学）(2014.6.29)
- 9) 下田 宙、米満研三、早坂大輔、好井健太朗、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（山口大学）(2014.5.17)
- 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

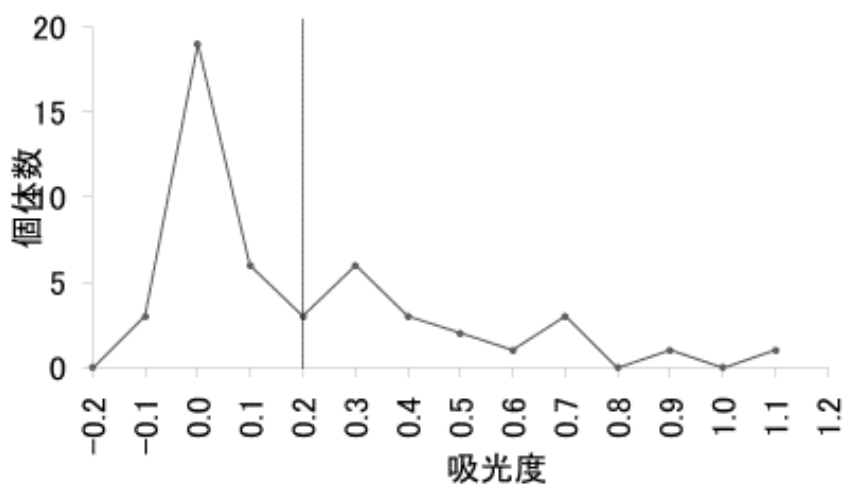


図1 イノシシの抗ニシムロウイルス抗体測定におけるCut-off値の設定

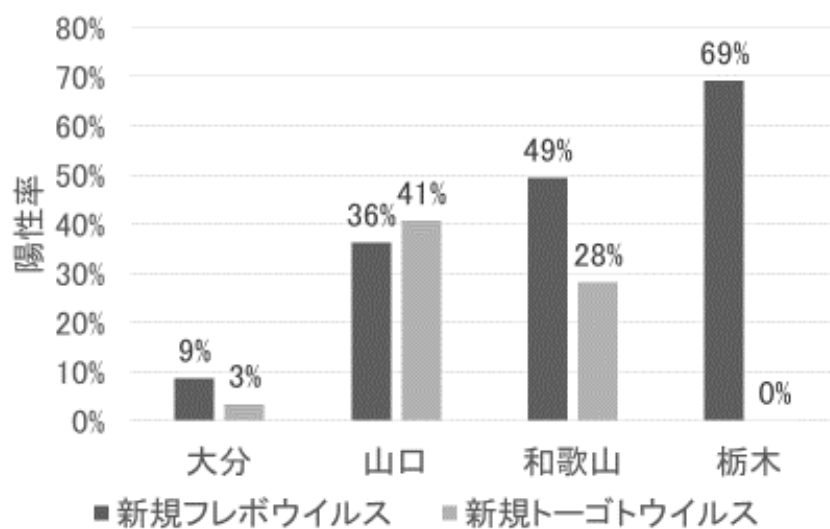


図2 イノシシの新規フレボウイルスおよび新規トーゴトウイルスに対する抗体保有状況

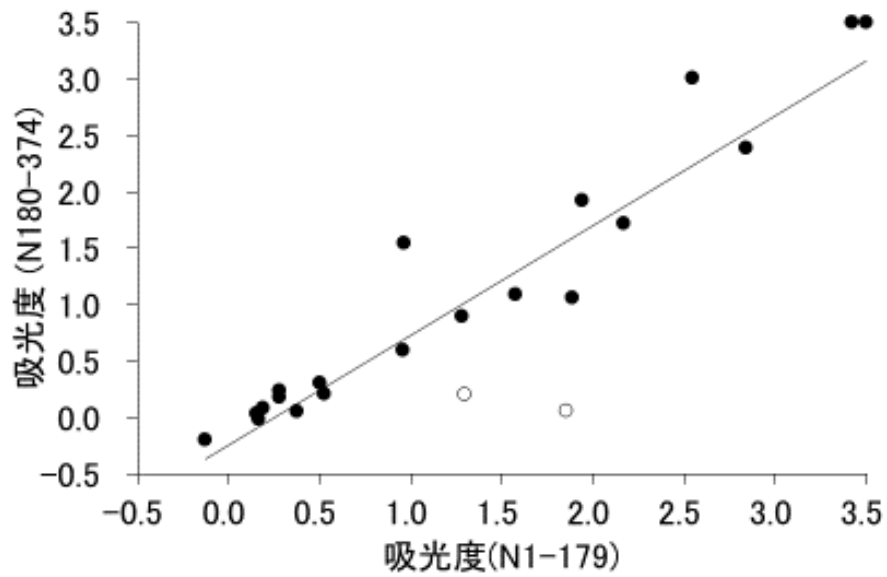


図3 フェレットコロナウイルスの大腸菌発現N蛋白の反応性の比較

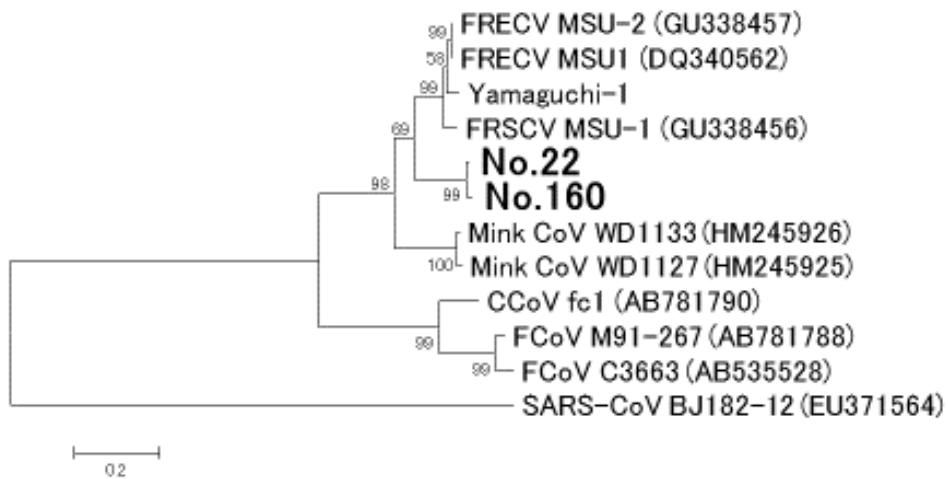


図4 フェレットコロナウイルス株間の遺伝子の比較

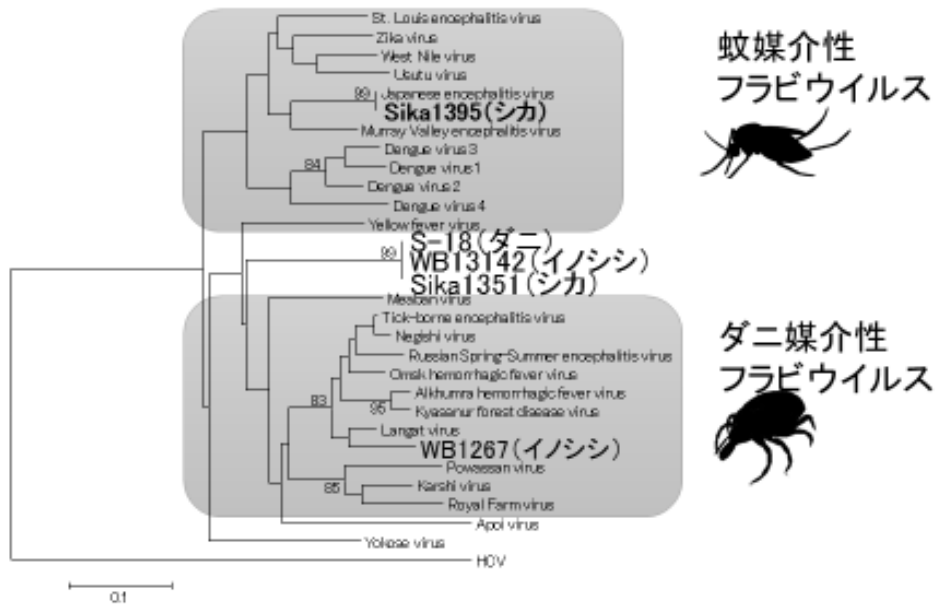


図5 検出されたフラビウイルスの系統樹(NS5, 55aa)

表1 山口県と栃木県のイノシシにおける抗ニシムロウイルス抗体保有状況

イノシシ	下関	栃木
検査頭数	72	188
陽性頭数	31	2
陽性率	43.1%	1.1%

表2 シカ、イノシシ、ダニから検出されたフラビウイルス遺伝子

ID	動物種	性別	体重	臓器	検出
13-95	シカ	オス	24kg	血清	日本脳炎ウイルス
13-51	シカ	オス	38kg	血清	新規フラビウイルス
13-142	イノシシ	メス	26kg	血清	新規フラビウイルス
S-18	キチマダニ	若虫		50匹	新規フラビウイルス
12-67	イノシシ	オス	12.5kg	肝臓	TBEV様新規ウイルス



厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )

輸入回帰熱の診断法確立と標準化

研究分担者 川端寛樹 ( 国立感染症研究所 細菌第一部 )

研究協力者 高野 愛 ( 山口大学 共同獣医学部 )

研究協力者 佐藤 梢 ( 国立感染症研究所 細菌第一部 )

研究要旨：回帰熱はアフリカ、中近東、中央アジアで流行するダニ媒介性感染症であり、特にアフリカではマラリアと誤診断されるケースが報告されている。そこで本研究では、新規の回帰熱の抗体検査抗原を開発に着手した。本研究では、輸入例における抗体検査法ならびに、ライム病、新興回帰熱との鑑別法も確立することを目標としている。

A. 研究目的

回帰熱はライム病群ボレリアとは異なる 1 群のボレリア属細菌による感染症で、アフリカ諸国での感染例が最も多く、北米や南欧、中近東、中央アジアなどでも感染例が報告されている。これら地域内では、散発的、もしくは集発的な感染が報告され、かつ死亡例も散見される。回帰熱には、ヒメダニが媒介する種類とシラミによって媒介されるものがあるが、現在上記地域で流行しているもののほとんどがヒメダニ媒介性回帰熱である。バルトネラ属細菌感染症の塹壕熱やリケッチア属細菌感染症である発疹チフス同様、シラミによって媒介される回帰熱は、戦争等により衛生状況が悪化し、シラミ寄生が蔓延した場合に流行する。第一次世界大戦中、兵士や避難民の間で回帰熱が流行し、

1919 年から 1923 年の間におよそ 500 万人の患者が亡くなったと推計されている。ダニ媒介性の回帰熱は 2 つに大別される。1 つは旧来から知られているヒメダニ媒介性回帰熱( 古典的回帰熱の一部 ) で、抗菌薬による治療を行わない場合、その致死率はヒメダニ媒介性回帰熱では 2-5% とされている ( シラミ媒介性回帰熱では 4-40% とされている )。もう一つは、2011 年に初めて報告された *Borrelia miyamotoi* 感染による新興回帰熱である。*B. miyamotoi* は 1995 年に我が国で発見・同定されたボレリアで、発見当時はその病原性は不明であったが、2011 年のロシアでの感染例を皮切りに、アメリカ、オランダ、日本で患者が報告された。本ボレリア感染症の全容は未だ不明であるが、*Ixodes* 属マダニが病原体を伝播すると考えられている。

我が国では2010年、2012年に中央アジア、アフリカからの「古典的回帰熱」の輸入例が報告されるとともに、新興回帰熱の国内感染例が2013年に報告され、急速に未自家な感染症となりつつある。一方、古典的回帰熱、新興回帰熱の抗体検査用として確立された抗原として glycerophosphodiester phosphodiesterase (GlpQ) があるが、必ずしも検査感度は高い訳ではないことから、新規の診断抗原開発が急務とされてきた。

そこで本研究では、回帰熱ボレリアに特異的な抗原を組換え体として作成し検査用抗原としての可否を評価するとともに、古典的回帰熱と新興回帰熱の鑑別法を確立することを最終目的とし、以下研究を開始した。

## B. 研究方法

### 1) 比較ゲノム解析による回帰熱ボレリア特異的遺伝子の検索

Draft genome 配列として公開されている回帰熱群ボレリアの一種 *Borrelia miyamotoi* FR64b ゲノム配列 (ゲノムサイズ:1.38Mb, Accession 番号: CP004217-CP004266, 変更修正日:2014/10/01)の内、ボレリア種間で variation が多いプラスミド性配列と推測される 48 contig (CP004218- CP004266)に含まれる 649 orfs の各々について、BLASTP 解析を行った。BLASTP 解析はライム病群ボレリアの3種 {*Borrelia burgdorferi* B31 (taxid:224326)、*Borrelia garinii* PBi (taxid:290434)、および *Borrelia afzelii* PKo (taxid:390236)} ならびに回帰熱群ボレリア3種 {*Borrelia turicatae* 91E135 (taxid:314724)、*Borrelia recurrentis* A1

(taxid:412418)、および *Borrelia duttonii* (taxid:40834)}のゲノム配列を参照して実施し、相同性の有無を Cutoff E-value:1e-5 で判定した。

### 2) 抽出された候補遺伝子群の特性解析

抽出された候補遺伝子群について、そのアミノ酸配列から、各々の1)シグナル配列の有無、2)Lipoprotein である可能性の予測、ならびに3)膜貫入ドメインの有無に関する予測を行い、候補抗原の性質について計算・予測を行った。またこれに先立ち、ボレリア属細菌の抗原で、その Localization が明らかな 28 抗原(膜タンパク質、ペリプラズマ抗原、ならびに細胞質タンパク質)について同様の計算を行い、予測の正確性について検証を行った。これら解析は CBS prediction server ([www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk)) を用いて行った。

### 3) 抽出された候補遺伝子群のパラログ解析

抽出された遺伝子について、各々 Position-Specific Iterated-BLAST(PSI-BLAST)により「Coverage (>80%) および Identical (>80%)」条件下で *B. miyamotoi* FR64b(taxid:1292392) genome 内に配列が見つかったものをパラログとした。

4)候補遺伝子の大家菌を用いたクローニング  
候補遺伝子から必要に応じて5'末端側の推定シグナル配列を除いた配列を、*Borrelia miyamotoi* FR64b 株 DNA を鋳型とし、KOD-FX Neo (TOYOBO)を用い PCR で増幅した。PCR 産物の精製には HighPure PCR product purification kit(Roche)を用いた。精製した PCR 産物は T4 DNA polymerase 処理により5'突出末端を形成させた後、pET46 Ek/Lic ベクター (Novagen)とアニーリングさせた。本ベクター

での組換えタンパク質はその N 末端に 6XHis が付加されるよう設計した。クローニングした遺伝子の発現には大腸菌 Rossetta (DE3) pLys 株を用いた。以上の組換え DNA 実験は、国立感染症研究所 組換え DNA 実験安全委員会により承認を受けて行われた(承認番号:機 26-83)。

#### 4)組換え抗原の発現

大腸菌での組換え抗原発現を見るため、形質転換を行った大腸菌を LB 培地もしくは SOB 培地で 37℃、一晚震盪培養した後、培養液を MagicMedia (Lifetechnologie)へ 1/100 接種し、20℃もしくは 28-30℃で 36-46 時間震盪培養を行った。培養液は、2XSDS-PAGE buffer と等量混和後、SDS-PAGE を行った。電気泳動後のゲルは常法に従い PVDF 膜(Bio-Rad)へ転写した。一次抗体には Anti-His monoclonal 抗体(BDL)、二次抗体には HRP ラベルされた Anti-mouse IgG(KPL)を用い、HRP の検出には ECL prime kit(GE Healthcare)を用いた。

(倫理面からの配慮について)

該当しない。

### C. 研究結果

#### 1) In silico 解析

BLASTP 解析により全 649 orfs は、回帰熱群ボレリア間で保存される 45 orfs、*B. miyamotoi* FR64b 株に特異的な 34 orfs、Variable membrane protein (VMP) 遺伝子群 64 orfs、ならびに *Borrelia* 属で保存されている 506 orfs に分けられた(表 1)。これら各群から paralog family を PSI-BLAST により検索し、それぞれの中から代表的な 1 orf を組換え抗原作製候補として選

定した(表 1、表 2)。また、*Borrelia* 属で保存されている 506orfs 中、推定される homolog に対して相同性が低い 12orfs 中、paralog を除いた 7orfs も候補に加えた(表 1)。

ボレリア属細菌の既知抗原を用いた細胞内局在を SignalP 4.0/LipoP 1.0/TMHMN 2.0 protocol によって推定した場合、SignalP 4.0/LipoP 1.0 protocol により、細胞質抗原と膜抗原/ペリプラズム抗原間には、SignalP による D 値および SpI/SpII サイトの有無により高確度で判別可能である(data not shown)。本研究で候補に選定した 59orfs の内 26orfs は膜抗原/ペリプラズム抗原と推定された(表 2)。

#### 2)各 59orfs の組換え抗原の大腸菌による発現成績

試験に供した 59orfs 中、3orfs(BOM 1320, BOM 1183, BOM 1515)を除き、大腸菌の形質転換株が得られた。これら各々の orf 形質転換株について、anti-His 抗体を用いた Immunoblot 法によりいずれかの条件で組換え抗原の発現が見られた株は 44orf を保持する大腸菌株であった(表 3)。

### D. 考察

ボレリア属細菌は大腸菌等で血清型決定基となるような LPS を持たないこと、また鞭毛抗原遺伝子は高度に保存されていること等からこれらをもとにした血清型による型別や感染病原体種の血清学的同定が不可能である。これらのことから、いずれのボレリア感染症においても抗体検査によってその感染種の同定は困難とされてきた。しかしながら、ゲノム解析技術の向上により、回帰熱群特異的抗原や新興

回帰熱群特異的抗原が in silica 解析で抽出できるようになってきた。本研究で候補として選定した 59orfs の内、44 orfs (74.5%)が大腸菌を用いて単離・発現させることができた。今後、これら組換え抗原を用いて、まず、回帰熱群ボレリア、新興回帰熱ボレリア、ライム病群ボレリアを感染させたマウス血清を用い、抗体が誘導される抗原の選定・絞り込みを行う。次いで海外研究機関と連携し、絞り込まれた抗原の感度、特異性を検討する予定である。

#### E. 結論

海外から輸入される回帰熱について、ゲノム情報を活用した新規抗体検査系確立のための基礎的情報を提供した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

- 1) Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi T, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Oikawa Y, Honda T, Gokuden M, Tsunoda T, Turumi M, Ando S, Andoh M, Sato K, Kawabata H. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial 16S rDNA gene. *Medical Entomology and Zoology*. 65(1): 13-21, 2014.
- 2) Oda S, Kabeya H, Sato S, Shimonagane A, Inoue K, Hayashidani H, Takada N, Fujita H, Kawabata H, Maruyama S. Isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* 1B/O:8 in

from *Apodemus* mice in Japan. *Journal of Wildlife Diseases* 51(1): 260-264, 2015.

##### 2.学会発表

- 1) 藤田信子, 藤田博己, 角坂照貴, 安藤秀二, 川端寛樹. 四国型恙虫病の媒介種トサツガムシの現況(予報). 第69回日本衛生動物学会西日本支部大会. 愛知, (2014.11)
- 2) 川端寛樹. 新興回帰熱病原体 *Borrelia miyamotoi* の病原性解析. 第69回日本衛生動物学会西日本支部大会. 愛知, (2014.11)
- 3) 梶田弘子, 岩淵香織, 高橋雅輝, 佐藤直人, 山内貴義, 斎藤幸一, 高野愛, 川端寛樹, 宇田晶彦, 森川茂. 岩手県におけるマダニの生息調査および病原体保有状況. 第60回日本衛生動物学会北日本支部大会・日本寄生虫学会北日本支部合同大会. 盛岡, (2014.10)
- 4) 川端寛樹, 今内覚, 高野愛, 中尾稔, 伊東拓也, 佐藤梢. 北海道におけるマダニ媒介性新興回帰熱病原体ボレリアの分布調査. 第60回日本衛生動物学会北日本支部大会・日本寄生虫学会北日本支部合同大会. 盛岡, (2014.10)
- 5) Kyunglee Lee, 高野 愛, Kyle Taylor, 左鹿万里子, 下鶴倫人, 今内 覚, 川端寛樹, 坪田敏男. A RF *Borrelia* sp. found among wild sika deer and *Haemaphysalis* ticks in Hokkaido. 第157回日本獣医学会学術集会. 札幌, (2014.9)
- 6) 大場真己, 大松勉, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野愛, 片山幸枝, 古谷哲也, 長井誠, 水谷哲也. コウモリマルヒメダニから分離され

- た新規ブニヤウイルスについて．第 157 回  
日本獣医学会学術集会．札幌, (2014.9)
- 7) 川端寛樹 .ダニ媒介性細菌感染症の疫学および診断法 第 157 回日本獣医学会学術集会．  
札幌, (2014.9)
- 8) 川端寛樹 ,高野愛 ,大西真 .後向きサーベイ  
ランスにより明らかとなった新興回帰熱の  
2 例．第 88 回日本感染症学会学術講演会．  
福岡, (2014.6)
- 9) 岡恵子 , 川端寛樹 .スウェーデンで *Borrelia*  
保有のマダニに咬着された 2 例．第 30 回臨  
床皮膚科医会総会．横浜, (2014.4)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし．
3. その他  
なし．



表3. 大腸菌を用いた、Anti His-Tag 抗体による各々の組換え抗原発現の有無.

No.	30M N .	試験条件			いずれかの条件で発現が 見られたもの
		20 , 36hrs	30 , 36hrs	28-30 , 46hrs	
1	885	+	+	+	+
2	947	+	+	-	+
3	1172	-	-	-	
4	1280	-	-	+	+
5	1284	-	-	+	+
6	1341	+	+	+	+
7	1367	-	-	-	
8	1374	-	-	+	+
9	1378	+	+	+	+
10	1381	+	+	-	+
11	1440	+	+	+	+
12	1441	+	+	+	+
13	1092	+	+	+	+
14	1167	-	-	-	
15	1197	-	-	+	+
16	1218	-	-	-	
17	1226	-	-	+	+
18	1232	+	+	+	+
19	1318	+	+	+	+
20	1320	/	/	/	/
21	1385	+	+	+	+
22	1394	+	+	+	+
23	1470	+	+	+	+
<hr/>					
1	886	-	-	-	
2	889	-	-	+	+
3	891	+	+	+	+
4	892	+	+	-	+
5	896	+	+	+	+
6	897	+	+	+	+
7	899	+	+	+	+
8	900	+	+	+	+
9	902	+	+	-	+
10	903	+	+	+	+
11	911	+	+	+	+
12	930	-	-	-	
13	931	+	+	+	+
14	932	-	-	+	+
15	934	+	+	+	+
16	937	-	-	+	+
17	1029	-	-	-	
18	1071	-	-	-	
19	1134	+	+	+	+
20	1137	+	+	+	+
21	1183	/	/	/	/
22	1195	-	-	+	+
23	1323	+	+	+	+
24	1377	+	+	+	+
25	1379	+	+	-	+
26	1399	+	+	+	+
27	1486	-	-	-	
28	1065	-	-	-	
29	1515	/	/	/	/
<hr/>					
1	1038	+	+	+	+
2	1147	+	+	+	+
3	1148	+	+	+	+
4	1149	+	+	+	+
5	1382	-	-	+	+
6	1383	+	+	+	+
7	1384	-	-	-	

BOM 1320, BOM 1183 および BOM1515 の各 orf は大腸菌を用いて単離出来なかった。

表 2 . 本研究で組換え抗原を作製した *Borrelia miyamotoi* 由来 orfs と各種 In silico 解析結果

No.	3OM No.	Annotation	BLASTP	PSI-BLAST B.miyamotoi FR64b (txid:1292392) Independency [Coverage (>80%) & Identical (>80%)]	SignalP 4.1	LipoP 1.0		
20	1	885	Hypothetical protein	M23 peptidase domain-containing protein	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.256)	-
30	2	947	Hypothetical protein	holin [Borrelia turicatae 91E135]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.110)	-
38	3	1172	Hypothetical protein	Single-strand DNA binding protein [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	969 (969,1172,1307,1340)	- (0.086)	-
44	4	1280	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01449 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.220)	SpII
45	5	1284	Hypothetical protein	Smf protein [Borrelia turicatae 91E135]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.087)	-
46	6	1341	Hypothetical protein	DNA gyrase subunit A [Borrelia burgdorferi B31]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	1341 (970,1171,1341)	- (0.208)	-
47	7	1367	Hypothetical protein	BppA [Borrelia duttonii]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.185)	-
16	8	1374	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01449 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.287)	SpII
49	9	1378	Hypothetical protein	putative lipoprotein [Borrelia recurrentis A1]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.145)	-
51	10	1381	Hypothetical protein	adenine specific DNA methyltransferase [Borrelia burgdorferi B31]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.107)	-
57	11	1440	Hypothetical protein	oligoendopeptidase F [Borrelia turicatae 91E135]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.219)	SpII
18	12	1441	Hypothetical protein	hypothetical protein BAPKO_3547 [Borrelia afzelii PKo]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	1441(1198,1199, 1285, 1441)	+ (0.526)	SpII
9	13	1092	Fibronectin-binding lipoprotein	antigenic protein P35 [Borrelia recurrentis A1]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	1092 (1516,1517,1092)	+ (0.538)	SpII
37	14	1167	Mlp lipoprotein family protein	Congo red-binding lipoprotein NlpH [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.332)	SpII
41	15	1197	Mlp lipoprotein family protein	protein MlpJ [Borrelia burgdorferi B31]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.279)	-
42	16	1218	Mlp lipoprotein family protein	Congo red-binding lipoprotein NlpH [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.366)	-
12	17	1226	Congo red-binding lipoprotein NlpH	Mlp lipoprotein family protein [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.299)	-
43	18	1232	Mlp lipoprotein family protein	MlpJ protein [Borrelia duttonii]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.325)	SpII
13	19	1318	Hypothetical protein	antigen P35-like protein [Borrelia recurrentis A1]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.376)	SpI
14	20	1320	Hypothetical protein	Mlp lipoprotein family protein [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.279)	SpII
55	21	1385	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA033 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	+ (0.545)	SpII
17	22	1394	Fibronectin-binding lipoprotein	hypothetical protein BDCR2A_01902 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	1394 (1375,1394)	+ (0.538)	SpII
58	23	1470	Putative cytosolic protein	immunogenic protein P37 [Borrelia burgdorferi B31]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.256)	SpII
21	1	886	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA011 [Borrelia turicatae]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.377)	SpII
22	2	889	Hypothetical protein	hypothetical protein BRE_1030 [Borrelia recurrentis A1]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.162)	-
1	3	891	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01136 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.189)	SpII
23	4	892	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA033 [Borrelia turicatae 91E135]1	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.124)	-
2	5	896	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA034 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.403)	SpII
3	6	897	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA035 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.274)	SpII
24	7	899	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA033 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.229)	SpII
4	8	900	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA044 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	+ (0.861)	SpII
25	9	902	Hypothetical protein	putative lipoprotein [Borrelia recurrentis A1]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.135)	-



26	10	903	Ribonucleoside-diphosphate reductase beta chain	ribonucleoside reductase beta subunit [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.104)	-
5	11	911	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA055 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	+ (0.636)	SpII
27	12	930	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA073 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.203)	-
28	13	931	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA073 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.298)	-
6	14	932	Hypothetical protein	immunogenic protein A [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	932 (932,933)	+ (0.487)	SpII
60	15	933	Hypothetical protein	immunogenic protein A [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	932 (932,933)	+ (0.485)	SpII
29	16	934	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA092 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.264)	-
7	17	937	Hypothetical protein	arthropod-associated lipoprotein [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	+ (0.711)	SpII
31	18	1029	BDR-repeat family protein	BDR-repeat family protein [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	1029 (1403,1029,1164,978,1220)	- (0.110)	-
8	19	1071	Hypothetical protein	membrane protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.291)	-
10	20	1134	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01220 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	Independent	+ (0.562)	SpII
11	21	1137	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific	1137(1137,1472)	- (0.287)	SpII
39	22	1183	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01356 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	1183 (960, 1017,1140, 1183)	- (0.137)	-
40	23	1195	BDR-repeat family protein	bdr proitein [Borrelia recurrentis A1]	Probable Relapsing fever specific	1195 (1195, 1510,1512, 1461)	- (0.101)	-
15	24	1323	Congo red-binding lipoprotein NlpH	Congo red-binding lipoprotein NlpH [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.313)	SpII
48	25	1377	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA111 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.123)	-
50	26	1379	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.111)	-
56	27	1399	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia persica]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.404)	SpII
59	28	1486	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific	1486 (1395, 1466, 1486, 1505)	- (0.085)	-
33	29	1065	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific. Low similarity was found in LD group	Independent	- (0.290)	-
19	30	1515	Antigen P35	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific. Low similarity was found in LD group	1515 (1093, 1515)	-(0.307)	SpII
32	1	1038	BDR-repeat family protein	hypothetical protein BAPKO_2516 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i> )	Independent	- (0.119)	-
34	2	1147	Hypothetical protein	hypothetical protein BB_Q23 [Borrelia burgdorferi B31]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i> )	1147 (953, 1147, 1420)	- (0.138)	-
35	3	1148	Hypothetical protein	hypothetical protein BB_Q22 [Borrelia burgdorferi B31]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i> )	1148 (952,1148,1419)	- (0.110)	-
36	4	1149	Hypothetical protein	hypothetical protein BafPKo_Q0007 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i> )	1149 (1149, 1418)	- (0.098)	-
52	5	1382	Adenine-specific methyltransferase	hypothetical protein BafPKo_Q0015 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i> )	Independent	- (0.116)	-
53	6	1383	Adenine-specific methyltransferase	hypothetical protein BAPKO_3518 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i> )	Independent	- (0.107)	-
54	7	1384	Adenine-specific methyltransferase	hypothetical protein BafPKo_Q0015 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i> )	Independent	- (0.138)	-



厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )

分担研究課題：動物由来細菌性腸管感染症の再興に向けた感染制御に関する研究

研究分担者 山田章雄 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

研究協力者 平山和宏 東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授

吉村和敏 東京大学大学院農学生命科学研究科

研究要旨：腸管出血性大腸菌 ( EHEC ) による腸炎の治療における抗菌薬投与は EHEC からの志賀毒素 ( Stx2 ) の産生を促進することから、勧められていない。われわれは乳児の糞便を無菌 ( GF ) マウスに経口投与して作出したノトバイオート ( GB ) マウスにおいて、EHEC 感染に抵抗性を示す GB マウスの存在を明らかにしてきた。本研究では GF マウスに EHEC 感染に対する抵抗性を付与できる機構の解析を試みた。その結果乳児の糞便に存在する *Bifidobacterium* の菌種や菌株の中に EHEC による感染死を抑制する効果を有するものがあることが明らかになった。特に同じ菌種・亜種であっても、*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222T ( *B. infantis* T ) は抑制効果を持たないが、*B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 ( *B. infantis* 157F ) には抑制効果があることを明らかにした。

A. 研究目的：

腸管出血性大腸菌症は年間 3000 から 5000 人の患者ならびに数例の死亡が報告されており、動物由来感染症としては極めて重要な疾患である。通常細菌性腸炎の治療には抗菌薬投与が行われるが、抗菌薬投与は EHEC からの Stx2 産生を促し、溶血性尿毒症 ( HUS ) などの重篤な合併症につながる可能性があり、慎重な使用が求められている。われわれは乳児の糞便を無菌 ( GF ) マウスに経口投与して作出したノトバイオ

オート ( GB ) マウスにおいて、EHEC 感染に抵抗性を示す GB マウスの存在を明らかにしてきた。本研究では GF マウスに EHEC 感染に対する抵抗性を付与できる機構の解明を目的とする。

B. 研究方法：

1) 動物

当教室で繁殖維持している無菌 Balb/c マウスを 8~13 週齢で実験に供与した。

2) 菌株

以下の 6 菌種 9 菌株を使用した。 *B. adolescentis* JCM1275T (*B. adolescentis* T)、*B. bifidum* JCM1255T (*B. bifidum* T)、*B. bifidum* M、*B. breve* JCM1192T (*B. breve* T)、*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222T (*B. infantis* T)、*B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 (*B. infantis* 157F)、*B. longum* subsp. *longum* JCM1217T (*B. longum* T)、*B. longum* subsp. *longum* NCC2705 (*B. longum* NS)、*B. pseudocatenulatum* JCM1200T (*B. pseudocatenulatum* T)。 EHEC は *E. coli* O157:H7 strain 44<sup>Rf</sup> (Stx2) (*E. coli* 44<sup>Rf</sup>) を使用した。

3) *Bifidobacterium* の経口投与 7 日後に *E. coli* 44<sup>Rf</sup> を同様に経口投与した。 Stx2 は VTEC-RPLA キット (Denka, Japan) とノバパスベロ毒素 EIA キット (BIORAD, USA) を用いて測定した。

(倫理面からの配慮について)

マウスにおける全ての感染実験は東京大学農学生命科学研究科動物実験委員会による審査を経て承認されている。

C. 結果：

1. 上記 9 菌株を GF マウスに経口接種し作出した GB マウスに *E. coli* 44<sup>Rf</sup> を感染させた後のマウスの生残を図 1 に示す。図から明らかなように *B. infantis* 157F と *B. longum* NS を投与した GB マウスは *E. coli* 44<sup>Rf</sup> 感染を耐過したが、*Bifidobacterium* 未投与対象群並びにこ

れら以外の 7 菌株の接種で作出した GB マウスはすべて *E. coli* 44<sup>Rf</sup> 感染により死亡した。

2. これら GB マウス糞便中の *E. coli* 44<sup>Rf</sup> 菌数を経日的に測定し比較したところ、GF マウスに予め *Bifidobacterium* を投与しても *E. coli* 44<sup>Rf</sup> の糞便中への排泄に差は認められず、腸管内への定着には影響がないと考えられた。
3. 表 1 に示すように *E. coli* 44<sup>Rf</sup> 感染 6 日後における盲腸内容物中の Stx2 濃度は *B. infantis* 157F と *B. longum* NS 接種した GB マウスでは他の *Bifidobacterium* 投与群と比較して低いことが明らかになった。また、マウス血清中の Stx2 濃度を測定したところ、感染抵抗性を示した GB マウスでは血清中 Stx 濃度が優位に低いことが明らかになった。

D. 考察：

以上の成績は *B. longum* subsp. *longum/infantis* に属する特定の菌には、他の *Bifidobacterium* に比べて、*E. coli* O157:H7 感染に対する高い防御効果を示すものが存在することを示している。さらにその防御効果は *E. coli* O157:H7 の腸管粘膜への定着を阻害することによるものではなく、腸管内での Stx2 産生の抑制及びその体内への移行を阻害することによるものであることが示唆された。今後は防御効果の機構について詳細に解析したい。

E. 結論

*Bifidobacterium* 投与により作出した GB マウスを用いて、*Bifidobacterium* の *E. coli* O157:H7 感染に及ぼす影響を調べたところ特定の菌株には明らかな感染防御効果があることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

なし。

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

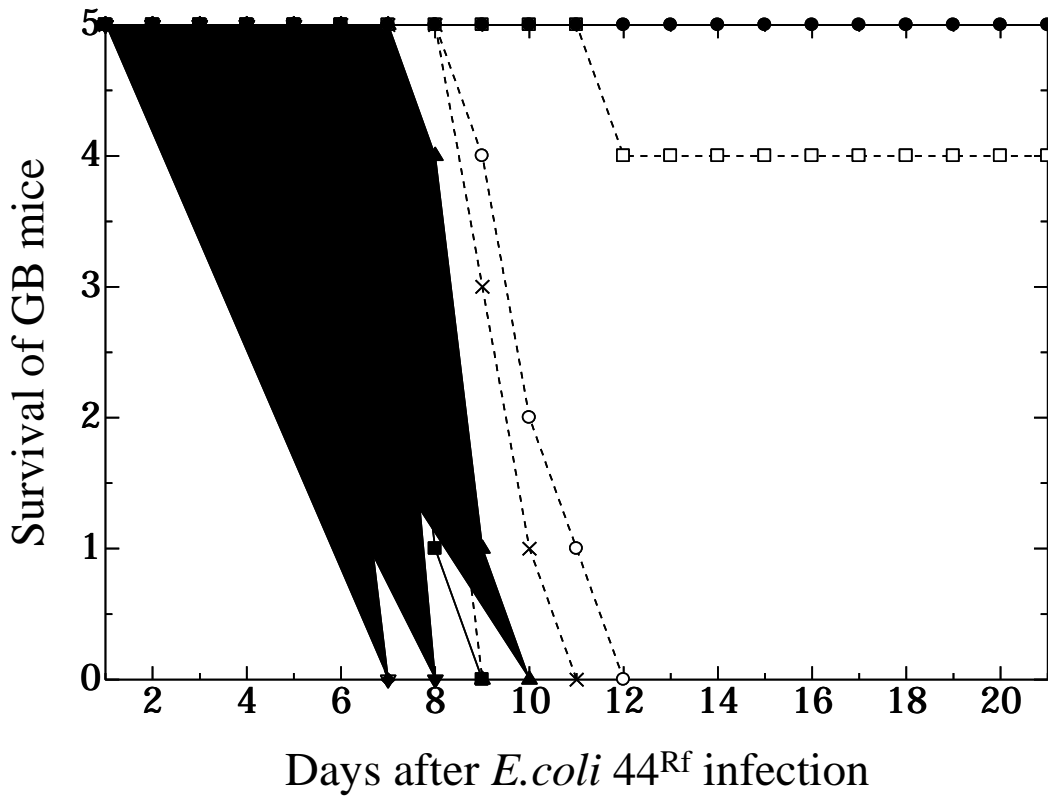
表 1. 盲腸内容物中の Stx2 濃度

<i>Bifidobacterium</i> strains	days after <i>E. coli</i> 44 <sup>Rf</sup> infection		
	1	6	14
<i>B. adolescentis</i> <sup>T</sup>	8.6	9.5	NT
<i>B. bifidum</i> <sup>T</sup>	8.5	10.1	NT
<i>B. breve</i> <sup>T</sup>	8.9	9.4	NT
<i>B. infantis</i> <sup>T</sup>	8.9	9.6	NT
<i>B. infantis</i> 157F	8.9	9.3	9.1
<i>B. longum</i> <sup>T</sup>	8.9	9.6	NT
<i>B. longum</i> NS	8.8	9.5	9.5
<i>B. pseudocatenulatum</i> <sup>T</sup>	8.7	9.4	NT
( <i>E. coli</i> 44 <sup>Rf</sup> only)	9	10	NT

*Bifidobacterium* の経口投与 7 日後に *E. coli* 44<sup>Rf</sup> を同様に経口投与した。

盲腸内容物中の Stx2 は VTEC-RPLA キット (Denka, Japan) とノバパスペロ毒素 EIA キット (BIORAD, USA) を用いて測定した。

図1. *Bifidobacterium* の9菌種のノトバイオームマウスの *E. coli* 44<sup>Rf</sup> 感受性



—△— *B. adolescentis* T    —▲— *B. bifidm* M    —▽— *B. bifidm* T    —◇— *B. breve* T  
 —▽— *B. infantis* T    —□— *B. infantis* 157F    —●— *B. longum* NS    —○— *B. longum* T  
 —■— *B. pseudocatenulatum* T    —●— *E. coli* 44<sup>Rf</sup> only





厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )

分担研究課題：コリネバクテリウムに関する研究

研究分担者：山本明彦 ( 国立感染症研究所・細菌第二部主任研究官 )

研究協力者：畠山薫、久保田寛顕、奥野ルミ、貞升健志、井出 治、加藤敦子 ( 東京都健康安全研究センター )、本間幸子、佐藤弘康 ( 川崎市健康安全研究所 )、古川一郎、石岡慎也、岡本浩介、水谷達二 ( 神奈川県衛生研究所 )、勝川千尋 ( 大阪府立公衆衛生研究所 )、梅田薫、阿部拓人、畠山理沙、木村吉秀 ( 大阪市立環境科学研究所 )、中嶋洋、狩屋英明、岸本壽男、橋本英典、近藤 真、東 正秋、藤原慎一 ( 岡山県環境保健センター )、内田順子、有塚真弓、藤井康三 蔦田博也 ( 香川県環境保健センター )、小山絵理子 ( 徳島県保健環境センター )、畠山敬、後藤郁男、山口友美 ( 宮城県環境衛生センター )、青木敦子、嶋田直美、近真理奈 ( 埼玉県衛生研究所 )、柳井徳磨 ( 岐阜大学 )、秋定健、兵行儀、與田茂利、黒川幸徳、山根一和 ( 川崎医科大学 )、本間康夫 ( 信楽園病院 )、天尾弘実、藤平篤志、佐伯穂波 ( 日本獣医生命科学大学 )、小宮貴子、岩城正昭、網 康至、須崎百合子、新倉綾、高橋元秀、今岡浩一 ( 国立感染症研究所 )

研究要旨：ジフテリア様の症状を示すジフテリア毒素産生性の *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans*) による感染症について、リンパ節膿瘍を示す 6 歳の女兒での新規 1 症例が報告された。この患者分離菌株は MLST 解析から、本邦初発例と類似の MLST タイプに属することが判明した。また、キャリアーとなる動物の 7 地域の検索ではイヌから 1% ネコからは 5.7% *C. ulcerans* が分離され、さらに血清ジフテリア抗毒素価の調査でウシの 6.7%、シカ血清から 12.2% が陽性である結果から、シカが自然界の保菌者でウシやネコなどに感染させ、ネコが人への感染の *C. ulcerans* のキャリアーの一つになっていることが示唆された。*C. ulcerans*、*Corynebacterium diphtheria* (*C. diphtheriae*) および *C. pseudotuberculosis* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から鑑別する迅速診断法として、マルチプレックス PCR 法を昨年開発したが、汎用するには改良が必要なが判明した。さらに、昨年開発したマウス *C. ulcerans* 感染モデルで *C. ulcerans* 抗体の消長を追うべく ELISA 測定系を作成して感染と抗体応答の関連を調べたところ感染に伴う IgM 抗体が検出された。

## A. 研究目的：

*C. ulcerans*、*C. diphtheriae* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から迅速かつ簡易に鑑別する実験室診断法として、昨年度に開発した鑑別診断法のを協力研究機関である地方衛生研究所に周知し試薬を配布して、その特異性と測定精度などを検討する。さらに、*Corynebacterium* 属菌全菌体を用いた ELISA 法を開発し、抗体による診断方法の開発を行う。

また、発生患者周辺や動物の疫学調査を行なうとともに、分離菌の分子疫学的解析ツールを検討する。

ジフテリアは、ジフテリア毒素を有する *C. diphtheriae* による細菌感染症である。高い死亡率と飛沫感染で広範囲に伝染することから、感染症法の 2 類感染症に分類される。日本ではこの 10 年間患者の発生はない。この感染症は古くから知られる疾患で、ジフテリア毒素を不活化して作成したワクチン接種による防疫が全世界的に実施されている。2001 年よりジフテリア様の症状を示すジフテリア毒素産生性の *C. ulcerans* による感染症が、本邦でも報告されるようになった（表 1）。ジフテリア毒素を主要な病原因子とする *C. ulcerans* 感染症はヒトを含む哺乳動物が広く罹患する。ECDC の定義では、ヒトに特異的な *C. diphtheriae* 感染症とあわせ「ジフテリア」とされるが、本邦では *C. ulcerans* 感染症は感染症法の対象疾患ではない。患者発生時の迅速な対応が要求される 2 類感染症と分類される *C.*

*diphtheriae* 感染症（ジフテリア）との鑑別診断が公衆衛生上の課題である。昨年開発した迅速診断法を実際の対応を行う地方衛生研究所評価した。

同感染症は、これまでの症例報告から動物由来感染症であるが、その実態が不明な点がある。そこで、国内の発生患者の症状や患者周辺の動物についての疫学調査を実施した。また、どの動物がその感染源となるのかについて協力研究者を中心に調査を実施した。さらに、昨年開発したマウス感染モデルでの *C. ulcerans* 全菌体に対する抗体の消長を調べた。感染源としての動物のリスク評価に役立てることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 新規発生患者周辺調査

今年度リンパ節膿瘍を呈した 1 名の患者が医療機関で確認された。医師と患者の同意を得たのち、患者からの病原体確認および患者の環境調査を行なった。さらに、患者および病院を所轄する自治体の衛生研究所との共同調査を実施した。

### 2. 各地の動物及びヒトからの菌分離、抗体調査

#### 1) *C. ulcerans* の菌分離法

被検体となる動物の口腔、鼻、背、耳、尾、腹部、尻、血液等のスワブを採取し、培養は検体をヒツジ血液寒天培地および亜テルル酸カリウム添加活性炭未加ヒツジ血液寒天培地（以下、荒川変法血液寒天培地）

に塗抹、血液寒天培地は 18～24 時間後、荒川変法血液寒天培地は 24 または 48 時間後に疑われる集落について性状を検査した。同定は DSS 培地による糖分解性状のスクリーニング、カタラーゼ試験、ウレアーゼ試験を実施した後、*Api coryne*(bioMérieux)を用いて確定した。なお、各衛研の研究協力者の経験的技術と知識の違いにより、出現したコロニーをエーゼで掻き取り (Sweep 法)、DNA を抽出し PCR を実施するか、または疑われる黒色コロニーをグループ毎 (Mix 法) にリアルタイム PCR で毒素遺伝子を検出する方法を組み合わせる場合もあった。菌の毒素原性はジフテリア毒素遺伝子の A サブユニット相当部分の一部を特異的に増幅するプライマーを用いた PCR、寒天内沈降反応の Elek 法および培養細胞法で確認した。

## 2) ジフテリア抗毒素価の測定

各種動物より採取した血液より血清を分離し、一定量のジフテリア試験毒素と 2 倍階段希釈した血清を等量 Vero 細胞の培養液に加えて 4 日間培養し、Vero 細胞へのジフテリア毒素の細胞障害性の抑制を観察することで血清中のジフテリア抗毒素価を算出した。既知の標準抗毒素とジフテリア試験毒素との毒素活性中和能と比較して抗毒素価を算出する。毎回の測定時に、ジフテリア試験毒素の細胞障害性と検体となる血清中の細胞障害活性も確認した。

## 3. 分離菌株の分子疫学解析

これまでの *C. ulcerans* 分離菌株の解析は、*Sfi* I を用いた PFGE 法を用いてきたが、再現性、データのポータビリティ等において PFGE より優れているとされる MLST 法での解析を今回試みた。解析は König et al, (2014) J. Clin. Microbiol. 52(12):4318-4324 に従った。供試菌体を熱抽出して得たゲノム DNA を含む画分を鋳型として 7 つの遺伝子 (*atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA*, *rpoB*) の断片をそれぞれ増幅し、塩基配列を決定後 web サイト pubMLST (<http://pubmlst.org/cdiphtheriae/>) 上の解析アプリケーションにより MLST タイプを決定した。

## 4. 簡易迅速鑑別診断法の汎用化検討

*C. ulcerans*、*C. diphtheriae* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から迅速かつ簡易に鑑別する実験室診断法として、*Corynebacterium* 属菌の遺伝子診断に用いられている *rpoB* 遺伝子の遺伝子配列からそれぞれ候補配列を選択して primer を設計し、それを組み合わせることで Multiplex PCR 法を昨年作成した。作成した Multiplex PCR 法について、汎用化の可能性を探るために地方衛生研究所の 6 実験室に 4 種類の primer pair と 6 種類の DNA を配布して、その特異性や感度などを調べた。

## 5. 感染実験動物モデルの開発

*C. ulcerans* 感染モデルの作成のため、汎用

実験動物であるマウスを用いた経鼻感染モデルを昨年作成した。本年は感染モデル抗体応答を調べるため Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay(ELISA)による抗 *C. ulcerans* 全菌体抗体価測定系を構築し、経鼻感染マウスにおける IgG および IgM 抗体価の測定を行った。

(倫理面からの配慮について)

人を対象とする調査に関しては、国立感染症研究所医学研究倫理委員会へ「*C. ulcerans* によるジフテリア症の血清疫学と菌分離調査」として審査申請を行い承認を得た(承認期間～H28年3月31日)。また、感染実験動物モデルの作成には、国立感染症研究所・動物実験委員会に計画書を提出しその承認を得て実験を行った。

## C. 研究結果

### 1. 新規発生患者周辺調査

#### 1) 国内 14 症例目の患者調査

本邦 14 例目となる徳島県での *C. ulcerans* 症例は、6 歳の女児であった。平成 26 年 4 月に友人と顔をぶつけて唇を切る事故を起こし、翌日に熱感をもって左耳下腺部が腫れ、発熱(38.5)もあり疼痛を伴っていたため近医を受診したが、症状が治まらず、徳島県立中央病院小児科に紹介され入院となった。超音波検査にて左耳下腺部の腫れは、最大直径 9mm の膿瘍を形成し、その周囲が炎症あるリンパ節膿瘍と診断された。膿瘍の穿刺培養を行って *C. ulcerans* のみ培養

された。治療で発熱は収まり退院した。しかし、腫れが再燃したために外来受診しマクロライド系抗生物質を投与して 4 日後には腫れが消失した。患者の入院時のジフテリア抗毒素価は、0.756IU/mL で腫れの消失時の抗体価は 6.06IU/mL と高い値を示した。患者は、日本脳炎以外のワクチン投与は行っていた。今回の症例の調査にて、抗ジフテリア毒素抗体が十分にあってても *C. ulcerans* 感染が成立したことは初めての知見である。

感染経路に関しては、飼い猫からの可能性が高い。患者宅では、飼い猫を 1 匹飼育しているが、患者が発症するころひどい皮膚病にかかっている、獣医科病院の受診をしてエリスロマイシンを投与されている。治療により患者の症状が消失したところに、この猫の皮膚炎痕や口腔、耳スワブなど採材して菌培養の検査を行ったが、*Corynebacterium* 属菌は培養されたが、*C. ulcerans* は陰性であった。その原因として、*C. ulcerans* に感受性のあるエリスロマイシンの治療が皮膚炎への処置として行われていたためであると推測される。

### 2. 各地の動物及び人での調査結果

7 都道府県 7 地域について、動物からの菌分離及び血清ジフテリア抗毒素価の調査を行った。

#### 1) O 県

O 県では、県内病院と提携して臨床で分離された *Corynebacterium* 属菌について同

定を行い動物との関連についても聞き取りを行った。その結果、平成 26 年に 16 検体ほど *Corynebacterium* 属菌が分離された。その由来は喀痰、血液が主で膿、尿、耳漏なども含まれていた。*C.ulcerans* は分離されなかったが、どの症例もネコを飼育する環境であった。

## 2 ) T 県

T 県においては、平成 22 年から 25 年のイヌ、ネコの調査で分離された *C.ulcerans* 7 株 (DLT (+) 5 株、DLT(-)2 株) について、型別方法を検討した。DLT 毒素遺伝子配列による解析 DLT 毒素遺伝子を持つ 5 株から得られた DLT 毒素遺伝子 (約 1683bp) 配列、ならびに O102 株を含めた 12 株の DLT 遺伝子配列を用いて、系統樹解析を行った。5 株中 4 株は、O102 株と同一クラスターを形成したが、1 株はイヌ由来株 (大阪) ならびに O510 株と同一のクラスターを形成した。また、JCM10387 は供試した株とは異なる型であった。MLST 法による解析 : *C.diphtheriae* MLSTdata (<http://pubmlst.org/cdiphtheriae/>) に準じた、ハウスキーピング遺伝子 7 部位の遺伝子配列を比較し型別を行った。7 株中 6 株 (DLT(+)) 4 株、DLT(-)2 株) は O102 株と同一型となったが、1 株は異なる型となった。この株は、DLT 遺伝子解析でも他と異なる結果となった株であった。イヌ、ネコには、単一クローンの *C.ulcerans* が分布しているのではなく、少なくとも 2 種類以上のクローンが分布していることが示唆され

た。

## 3 ) Ok 県

Ok 県においては、食肉検査上に搬入される全国から搬入される牛の血液のジフテリア抗毒素価の調査を行った。平成 26 年度は 133 頭を調査し 9 頭 (6.7%) からジフテリア抗毒素価が検出された。

さらに、川崎医科大学との共同研究で、耳鼻咽喉科外来患者からの *C.ulcerans* 検索、内科受信患者及び入院患者から分離された *Corynebacterium* 属菌 70 株について同定を行った。同定された菌株は 40 株が *C.striatum* でおよそ 6 割を占めていた。*C.ulcerans* は分離されなかった。

## 4 ) K 県

K 県内動物管理事務所に搬入されたネコ 102 匹、イヌ 13 匹の咽頭ぬぐい、また環境 6 か所のふきとり検体について、培養にて *C.ulcerans* の検出を試みた。結果は培養同定、毒素遺伝子共に全て陰性であった。

## 5 ) S 県

S 県では動物指導センターに搬入された犬及び猫で、安楽死処分直後にシードスワブ 3 号を使用し採取した咽頭ぬぐい液及び血液を検体とし、菌分離と抗毒素価その久亭を行った。

犬の調査総数 95 頭中、1 頭より *Corynebacterium* 属菌が分離され、猫 35 頭中 2 頭より *C.ulcerans* が分離された。

## 6 ) Ka 県

Ka 県では、2013 年度から 2014 年度にかけて県内の動物病院で採材されたイヌ 18 頭、

ネコ 56 頭の口腔内ぬぐい液あるいは目脂を検体とした。検体処理は前景の方法で行った。イヌ 18 検体およびネコ 56 検体について調査した結果、*C.ulcerans* はジフテリア毒素遺伝子を標的とした PCR 法では検出されず、培養法においても菌分離には至らず、陽性率は 0%であった。

#### 7) To 県

To 県では、本邦 14 例目の比と発症例を経験した。*C.ulcerans* の汚染状況調査は今までに実施した結果、地域猫 241 検体より 4.2% で菌分離された。汚染地域は県内に偏りがなくほとんどの保菌猫が無症状であった。ヒト分離菌株と県内猫からの分離菌株を PFGE 法で比較した結果、同じパターンを示す猫分離株が存在した。

#### 8) シカ血清調査

全国より収集した狩猟されたシカ 332 頭の血清に関してジフテリア抗毒素価の測定を行った。測定した 332 頭の血清の内測定可能であった 319 検体中 39 頭が陽性であった。(12.2%)

#### 3. 分離菌株の分子疫学解析

*C. ulcerans* について MLST を実施するための予備的検討を行った。この方法はそれぞれの分離株の 7 種類の遺伝子のシーケンス成績をデータベースからタイプ分けするものであった。現在までに分離された人臨床分離株及び患者の感染経路と密接な関係のある動物からの分離株を合わせて *C. ulcerans* 19 株についての解析では 6 種類の

MLST タイプに分別された。この結果は PFGE での解析結果と類似するものであった。本邦 14 例目の徳島県の症例で患者から分離された菌株は、千葉県症例と同じ MLST タイプに分類された。

#### 4. 簡易診断法の汎用化予備実験

昨年開発した multiplex PCR 法に関して 6 か所の地方衛生研究所で検討を実施し、4 か所からのデータがまとまった。その結果、非特異バンドについては、毒素陰性株で毒素遺伝子と同様のサイズの PCR 増幅産物を認めた。また一部で *C.diphtheriae* の *rpo B* 遺伝子と同サイズのバンドが認められた。この日特異的増幅は、アニーリング温度の変更では解消することができなかった。

#### 5. *C. ulcerans* 感染実験モデルでの解析

*C. ulcerans* 加熱死菌体を 96 穴プレートに固相化し、抗 *C. ulcerans* 全菌体に対する血中抗体価を測定するための ELISA 測定系を構築した(図 1)。ウサギおよびマウスの高度免疫血清を用いて測定可能域の確認を行なったのち、感染後 2、4、6、8、10 日の経鼻感染マウス血清中抗体価の測定を行なった。感染後 10 日目まで、抗 *C. ulcerans* 全菌体 IgG 抗体価は測定限界以下であった(図 2)。一方、同じ血清において、IgM 抗体価は経日的に緩やかな上昇傾向を示した(図 3)。IgM については今後詳細な検討が必要であるが、この測定結果は、感染初期の抗 *C. ulcerans* 全菌体 IgM 抗体レベルの上昇を反

映している可能性がある。なお、肺の生菌数は感染直後から 10 日間の間で著しく生菌数は減少することを昨年度の報告書で示したが、IgM 抗体が本菌の感染後の減少に直接関与している証拠は得られなかった。

#### D. 考察

本年度初頭に徳島県で発生した 1 例の新規 *C. ulcerans* 感染症罹患者の調査で、14 例目の患者はリンパ節炎膿瘍を示す 6 歳の女児であった（表 1）。さらに、患者の飼育するネコは患者の発症前に皮膚炎を患っており、ネコが *C. ulcerans* 感受性のエリスロマイシンを用いた治療がなされたために、ネコから同菌が分離されなかったが、この飼い猫からの感染が疑われる。患者の発生した徳島県内のネコの汚染調査はすでに行われていて、県内偏りがなく保菌率は 4.2% であることが判明している。（論文 1）この点は、これまでに報告された症例 6,7,8 と同様の結果であった。一方、今回の患者は 6 歳と大変若く、昨年度発生した DPT ワクチンを接種していない 20 歳女性患者より患者年齢を大きく下回った。海外の報告では同世代の報告があるが日本で確認されたのは初めてである。また、この症例の 6 歳という年齢は DPT1 期が終了してジフテリア免疫が出来上がったばかりの年齢である。事実 DPT1 期を接種した 6 歳児の 87% はジフテリア抗毒素価がジフテリア発症予防の 0.1 IU/ml を越えていると報告されており、

予防接種完了後の小児では *C. ulcerans* の感染は起こりにくいと考えられた。この患者もジフテリア抗毒素価を測定したところ、0.76IU/mL と測定されて大変高く十分な発症防御抗体のレベルであった。（論文 1）患者の症状が呼吸器症状ではなくリンパ節膿瘍と会われたことに関連があるのかもしれない。今後、小児のリンパ節膿瘍についても *C. ulcerans* 感染の可能性を考慮する必要がある。

7 地域の動物の保菌状況を調査した結果、イヌの 1% からネコの 5.7% から *C. ulcerans* が分離されることから、地域を問わずネコは *C. ulcerans* のキャリアーの一つになっていることが示唆された。血清ジフテリア抗毒素価の調査ではウシの 6.7% シカの 12.2%（表 2）が陽性を示した。ネコヤイヌでの調査と比較すると抗体陽性動物はシカが最も多いことから、自然界の保菌者としてこの菌を環境中に保持しているかの世が示唆された。今回の調査だけでは結論できないが、今後対象動物数を増やして検索を行う必要がある。また、Ok 県で行われている来院患者の調査で、多くの *Corynebacterium* 属菌が分離される事実は、同種菌が環境中と人との間を行き来する可能性を示した。今後 *C. ulcerans* 菌感染との関連性をさらに追求してゆく必要性が示唆された。ただし、昨年から実施している人の臨床分離株の同定調査では、およそ 120 株の分離された *Corynebacterium* 属菌から *C. ulcerans* 菌が 1 株も同定されなかったこ

とから、この菌が分離されることは大変低い可能性が示唆された。

*C. ulcerans* について MLST を実施するための予備的検討を行った。が臨床分離株及び関係のある動物からの分離株 *C. ulcerans* 19 株についての解析では 6 種類の MLST タイプに分別された。この結果は PFGE での解析結果と類似するものであった。本邦 14 例目の徳島県の症例で患者から分離された菌株は、千葉県の場合と同じ MLST タイプに分類された。これらの結果から MLST 法は少なくとも PFGE 法の解析力よりも弱いものではないこととシーケンス解析によるために実験者による誤差が少なくそのデータを世界で使用しているデータベースで分類するので大変再現性の良いデータが得られることも実証できた。今後保有している他の分離菌株についての解析を進めてゆく予定である。

*C. ulcerans*、*C. diphtheriae* および *C. pseudotuberculosis* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から迅速簡易に鑑別診断法として昨年開発した Multiplex PCR 法の 4 実験室での評価結果から、各地の地方衛生研究所で汎用するには改善が必要なことが判明した。

昨年作成したマウス *C. ulcerans* 感染モデルを用いてその抗体価の消長を今年度に関与した *C. ulcerans* 菌全菌体を用いた ELISA 法で解析した。今年度開発した ELISA 法は、特異性が高くバックグラウンドが低い抗体検出系と評価でき(図 1)、*C. ulcerans* 感染に伴った全菌体に対する抗体の消長を測定す

ることができた。今年度に関鼻感染マウスの使用した血清は感染後 2、4、6、8、10 日のものであったため、IgG 抗体の上昇は見られなかった(図 2)。IgM 抗体は経日的に緩やかな上昇傾向を示した。(図 3)。今後もこの感染モデルを用いて、*C. ulcerans* 感染症について、より詳細な解析を行ってゆく予定である。

## E. 結論

1. ヒトからジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* 感染によるリンパ節炎膿瘍を示した 14 例目の症例が徳島県で報告された。同症例は DPT 基礎免疫を終えた 6 歳女児であったことから、若年性の感染が起きうることが実証されたとともにジフテリア抗毒素を持つ症例での *C. ulcerans* 発症例として特質すべきものである。

2. 7 地域の動物の保菌状況を調査した結果、ネコの 4.5% から *C. ulcerans* が分離され、さらに血清ジフテリア抗毒素価の調査でウシの 6.7%、シカ血清から 12.2% が陽性である結果から、シカが自然界の保菌者でウシやネコなどに感染させ、ネコが人への感染の *C. ulcerans* のキャリアーの一つになっていることが示唆された。

3. *C. ulcerans*、*C. diphtheriae* を類縁の *Corynebacterium* 属菌から迅速簡易に鑑別診断できる方法として、第一年度に関与したマルチプレックス PCR 法について、6 か所の地衛研で評価を行ったところ、非特異的バンドの増幅や実験室による反応性の違



いなど、問題点が見つかった。

4. 今年度発生した国内初の *C. ulcerans* 小児症例についての調査を行った。また、分離菌の分子疫学的解析ツールとして MLST 法を用いて解析を行い本邦初発の千葉の症例と同じ MLST に属することが判明した。
5. 昨年度に開発したマウスを用いた *C. ulcerans* 感染モデルを用いて感染に伴う抗体価の消長を解析するため、*Corynebacterium* 属菌全菌体に対する血中抗体価を測定するための ELISA 系を開発し、感染マウスの血中抗体価の測定を行なった。

#### G. 研究発表

- 1) 寺田知正、小山恵理子、山本明彦、本邦初となる *Corynebacterium ulcerans* 感染の小児例、IASR 35: 226-227、2014.
- 2) 石井照之、嶋田直美、青木敦子、小宮貴子、山本明彦、再感染を疑わせる *Corynebacterium ulcerans* 感染症の 1 例、IASR 35: 247-248、2014
- 3) KOUNO T , SANO T , MOMIYAMA A , SUDO M , YAMAMOTO A , KOMIYA T , UMEHARA S , AOKI K and ISHIKAWA K. Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* Isolated from Dogs and Cats in Shiga Prefecture. Republic of Shiga Prefecture Institute of Public Health 49: 5-8, 2014.

#### 2.学会発表

- 1) 上野太輔 ,山根一和 ,山本明彦 ,中嶋 洋. *Corynebacterium striatum* によるカテー

テル関連血流感染症を来した 1 例. 第 88 回日本感染症学会総会. 福岡、(2014. 6)

- 2) 小山絵理子、石田弘子、矢野さやか、都築謙治、下野生世、嶋田啓司、山本 明彦. ジフテリア毒素原性陽性 *Corynebacterium ulcerans* の徳島県内におけるネコの浸潤状況と患者発生事例について第 26 回四国獣医学術大会、徳島、(2014、9)
- 3) 畠山理沙、梅田 薫、阿部拓人、小笠原準、小宮貴子、岩城正昭、山本明彦、長谷 篤、真田秀一、大阪市のイヌ・ネコにおけるジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* 保菌状況調査、平成 26 年度獣医学術近畿地区大会、大阪、(2014、9)
- 4) 寺田知正 松浦 里、小野朱美、井上美紀、須賀健一、川人雅美、森 一博、山本明彦、ジフテリア毒素産生型 *Corynebacterium ulcerans* 感染による頸部リンパ節炎：本邦最年少例、第 46 回日本小児感染症学会総会、東京、(2014、10)

#### 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

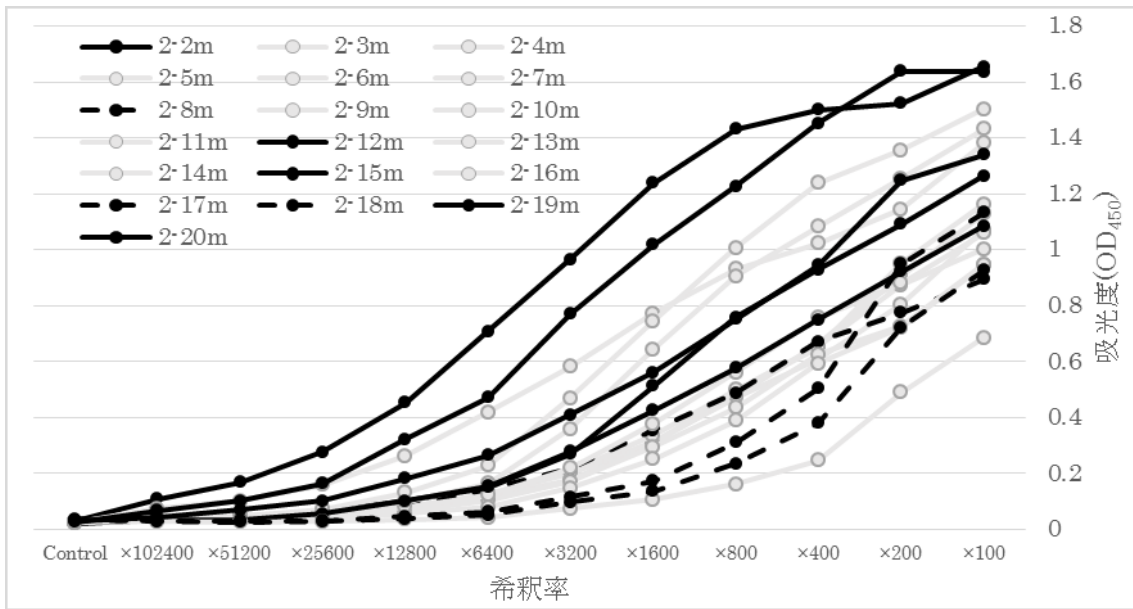
表1 . *C.ulcerans* 患者発生一覧

No	発症日	患者	症状等	その他	毒素原性
1	2001年2月	52歳、女性、千葉県旭市	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等	猫を20匹飼育、1匹の猫が皮膚炎で死亡後に本人が発症	+
2	2002年10月	54歳、男性、千葉県旭市	同上	1例目の患者と同地区に住居	+
3	2005年9月	58歳、男性、岡山県	左耳下腺部腫脹、軽度の咳等	飼育犬は慢性の皮膚疾患で死亡後に患者が発症	+
4	2005年10月	51歳、男性、大分県	肺に多発性空洞病変、咳、痰、発熱等	猫を12匹飼育	+
5	2006年7月	57歳、女性、神奈川県	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等(腸痙及び関節リウマチ)	詳細情報なし	+
6	2009年1月	57歳、女性、東京都葛飾区	咽頭痛、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等(関節リウマチ)	自宅に集まる野良猫5匹中2匹から菌分離陽性。家内外に飼育している犬2匹及び猫4匹は陰性	+
7	2010年7月	55歳、男性、神奈川県横浜市	ピンポン玉大の腋下膿瘍。その穿刺液より菌分離。(HIV)	猫10匹を屋内外で飼育。1匹から菌分離	+
8	2010年10月	51歳、女性、茨城県行方市	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等	猫1匹飼育。この猫の眼やにから菌分離	+
9	2011年4月	57歳、女性、滋賀県大津市	同上	猫14匹、犬7匹、ヤギ2匹飼育。	+
10	2011年12月	38歳、女性、山形県鶴岡市	ピンポン玉大の右肘膿瘍。その穿刺液より菌分離。	猫6匹飼育。	+
11	2012年1月	33歳、男性、香川県高松市	ピンポン玉大の腋下リンパ節膿瘍。その穿刺液より菌分離。	妻の実家で犬3匹飼育。	+
12	2012年11月	71歳、女性、埼玉県朝霞市	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等	自宅に飼育している猫4匹は中1匹から菌分離陽性。毒素産生性	+
13	2013年4月	20歳、女性、埼玉県桶川市	呼吸困難、嘔声、咽頭痛、咳、発熱、上咽頭と喉頭前庭に白色偽膜等	猫18匹飼育。9匹は室内飼育、9匹は屋外ベランダで飼育	+
14	2014年4月	6歳、女児、徳島県	ピンポン玉大の頸部リンパ節膿瘍。その穿刺液より菌分離。	発病時皮膚病のひどい猫1匹飼育	+

表2. ジフテリア抗毒素価(シカ)

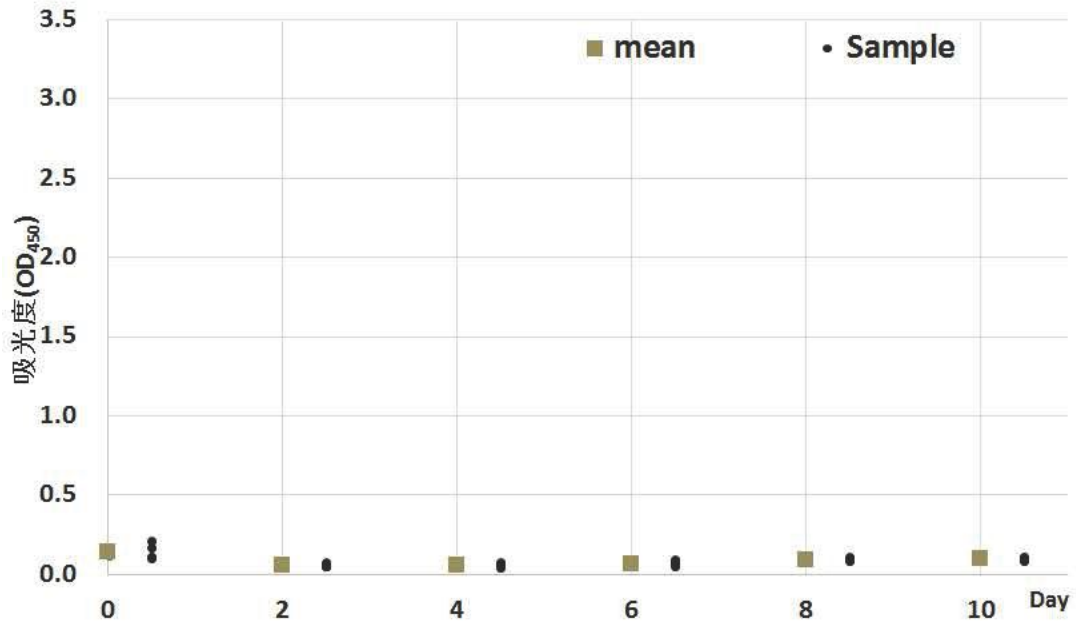
検体番号	都道府県	畜種	体重(kg)	年齢(才)	ジフテリア抗毒素価	検体番号	都道府県	畜種	体重(kg)	年齢(才)	ジフテリア抗毒素価	検体番号	都道府県	畜種	体重(kg)	年齢(才)	ジフテリア抗毒素価
1	岩手県		110	7	検出レベル以下	108	滋賀県		20	4	検出レベル以下	215	兵庫県		40	5	検出レベル以下
2	岩手県		91	6	検出レベル以下	109	滋賀県		50	1	検出レベル以下	216	兵庫県		50	3	検出レベル以下
3	岩手県		92	6	検出レベル以下	110	滋賀県		70	5	検出レベル以下	217	兵庫県		35	5	検出レベル以下
4	岩手県		45	3	0.0100	111	滋賀県		70	5	検出レベル以下	218	兵庫県		60	6	検出レベル以下
5	岩手県		91	5	検出レベル以下	112	滋賀県		50	3	検出レベル以下	219	兵庫県		15	1	検出レベル以下
6	岩手県		55	5	検出レベル以下	113	滋賀県		50	3	0.0050	220	兵庫県		25	2	検出レベル以下
7	岩手県		40	2	検出レベル以下	114	滋賀県		70	7	検出レベル以下	221	兵庫県		35	4	検出レベル以下
8	岩手県		90	12	検出レベル以下	115	滋賀県		60	6	0.0036	222	兵庫県		40	2	検出レベル以下
9	岩手県		47	4	検出レベル以下	116	滋賀県		80	5	検出レベル以下	223	兵庫県		65	7	検出レベル以下
10	岩手県		48	4	検出レベル以下	117	滋賀県		40	1	検出レベル以下	224	兵庫県		30	3	検出レベル以下
11	岩手県		80	6	検出レベル以下	118	滋賀県		40	1	検出レベル以下	225	兵庫県		13	1	検出レベル以下
12	岩手県		75	4	検出レベル以下	119	滋賀県		60	3	0.0200	226	兵庫県		40	3	0.0050
13	岩手県		85	6	検出レベル以下	120	滋賀県		60	3	検出レベル以下	227	兵庫県		30	2	検出レベル以下
14	岩手県		58	5	検出レベル以下	121	滋賀県		45	3	検出レベル以下	228	兵庫県		60	5	検出レベル以下
15	岩手県		58	4	検出レベル以下	122	静岡県		60	7	検出レベル以下	229	兵庫県		45	4	検出レベル以下
16	岩手県		52	4	検出レベル以下	123	静岡県		40	3	検出レベル以下	230	兵庫県		30	3	検出レベル以下
17	岩手県		40	1	検出レベル以下	124	静岡県		15	2	検出レベル以下	231	兵庫県		35	3	0.0050
18	岩手県		90	6	検出レベル以下	125	静岡県		70	4	検出レベル以下	232	福島県		50	6	検出レベル以下
19	岩手県		70	2	検出レベル以下	126	静岡県		30	2	検出レベル以下	233	福島県		5	5	検出レベル以下
20	岩手県		73	7	検出レベル以下	127	静岡県		60	3	検出レベル以下	234	福島県		100	7	検出レベル以下
21	岩手県		40	2	検出レベル以下	128	静岡県		50	5	検出レベル以下	235	福島県		50	3	検出レベル以下
22	岩手県		42	2	検出レベル以下	129	静岡県		79	6	0.0400	236	北海道		100	10	検出レベル以下
23	岩手県		90	5	0.0200	130	静岡県		79	7	検出レベル以下	237	北海道		50	2	検出レベル以下
24	岩手県		110	7	検出レベル以下	131	静岡県		40	4	検出レベル以下	238	北海道		50	2	検出レベル以下
25	岩手県		62	3	検出レベル以下	132	静岡県		50	3	検出レベル以下	239	北海道		70	7	検出レベル以下
26	岩手県		80	8	検出レベル以下	133	静岡県		63	6	検出レベル以下	240	北海道		80	8	検出レベル以下
27	岩手県		70	6	検出レベル以下	134	静岡県		55	4	検出レベル以下	241	北海道		50	1	検出レベル以下
28	岩手県		27	2	検出レベル以下	135	静岡県		35	3	検出レベル以下	242	北海道		60	2	検出レベル以下
29	岩手県		35	2	0.0036	136	静岡県		40	4	検出レベル以下	243	北海道		80	4	検出レベル以下
30	岩手県		60	4	検出レベル以下	137	静岡県		60	5	0.0400	244	北海道		90	2	検出レベル以下
31	岐阜県		40	2	検出レベル以下	138	静岡県		86	7	検出レベル以下	245	北海道		80	3	検出レベル以下
32	岐阜県		65	4	検出レベル以下	139	静岡県		50	4	検出レベル以下	246	北海道		120	5	検出レベル以下
33	岐阜県		60	4	検出レベル以下	140	鳥取県		60	4	検出レベル以下	247	北海道		90	4	検出レベル以下
34	岐阜県		50	3	検出レベル以下	141	鳥取県		45	-	検出レベル以下	248	北海道		120	5	検出レベル以下
35	岐阜県		50	2	検出レベル以下	142	鳥取県		35	2	検出レベル以下	249	北海道		100	3	検出レベル以下
36	岐阜県		50	4	検出レベル以下	143	鳥取県		35	3	検出レベル以下	250	北海道		120	10	検出レベル以下
37	岐阜県		60	5	検出レベル以下	144	鳥取県		60	5	0.160	251	北海道		80	5	検出レベル以下
38	岐阜県		45	3	検出レベル以下	145	鳥取県		40	-	検出レベル以下	252	北海道		80	5	検出レベル以下
39	岐阜県		70	4	0.0144	146	鳥取県		60	-	検出レベル以下	253	北海道		80	3	検出レベル以下
40	岐阜県		40	2	検出レベル以下	147	鳥取県		40	2	検出レベル以下	254	北海道		60	2	検出レベル以下
41	岐阜県		80	5	0.0200	148	鳥取県		90	-	0.0100	255	北海道		55	5	検出レベル以下
42	岐阜県		40	2	検出レベル以下	149	鳥取県		50	-	検出レベル以下	256	北海道		90	14	検出レベル以下
43	岐阜県		35	2	検出レベル以下	150	鳥取県		45	4	検出レベル以下	257	北海道		65	4	検出レベル以下
44	岐阜県		60	4	検出レベル以下	151	鳥取県		40	4	検出レベル以下	258	北海道		60	1	検出レベル以下
45	岐阜県		70	3	0.0400	152	鳥取県		35	3	検出レベル以下	259	北海道		90	5	検出レベル以下
46	岐阜県		55	3	検出レベル以下	153	鳥取県		50	4	検出レベル以下	260	北海道		80	3	検出レベル以下
47	岐阜県		40	2	検出レベル以下	154	鳥取県		25	2	検出レベル以下	261	三重県		60	4	検出レベル以下
48	岐阜県		60	5	0.0400	155	栃木県		70	1	検出レベル以下	262	三重県		50	5	検出レベル以下
49	岐阜県		25	1	検出レベル以下	156	栃木県		60	5	検出レベル以下	263	三重県		75	12	0.0200
50	岐阜県		50	2	検出レベル以下	157	栃木県		60	5	検出レベル以下	264	三重県		65	10	検出レベル以下
51	岐阜県		30	2	検出レベル以下	158	栃木県		50	3	0.0036	265	三重県		45	4	検出レベル以下
52	岐阜県		40	4	検出レベル以下	159	栃木県		60	3	検出レベル以下	266	三重県		60	4	検出レベル以下
53	岐阜県		60	2	検出レベル以下	160	栃木県		70	7	検出レベル以下	267	三重県		50	2	検出レベル以下
54	岐阜県		25	1	検出レベル以下	161	栃木県		50	3	検出レベル以下	268	三重県		40	3	0.0800
55	岐阜県		70	3	0.0800	162	栃木県		65	4	検出レベル以下	269	三重県		40	2	検出レベル以下
56	岐阜県		55	5	0.0400	163	栃木県		40	2	検出レベル以下	270	三重県		50	5	検出レベル以下
57	京都府		75	4	検出レベル以下	164	栃木県		55	2	検出レベル以下	271	三重県		35	2	検出レベル以下
58	京都府		50	5	165	165	栃木県		90	3	検出レベル以下	272	三重県		50	3	検出レベル以下
59	京都府		60	3	検出レベル以下	166	栃木県		70	1	検出レベル以下	273	三重県		70	7	0.0050
60	京都府		50	3	検出レベル以下	167	栃木県		40	1	検出レベル以下	274	三重県		45	3	検出レベル以下
61	京都府		45	-	検出レベル以下	168	栃木県		50	3	検出レベル以下	275	三重県		75	5	検出レベル以下
62	京都府		25	1	検出レベル以下	169	栃木県		40	2	検出レベル以下	276	三重県		40	4	検出レベル以下
63	京都府		25	1	検出レベル以下	170	栃木県		55	4	0.0200	277	三重県		50	4	検出レベル以下
64	京都府		40	3	検出レベル以下	171	栃木県		35	1	検出レベル以下	278	三重県		70	5	検出レベル以下
65	京都府		65	3	検出レベル以下	172	栃木県		57	3	検出レベル以下	279	三重県		60	5	検出レベル以下
66	京都府		60	5	検出レベル以下	173	栃木県		60	5	0.0072	280	三重県		65	10	0.0200
67	京都府		40	2	0.0200	174	栃木県		60	3	検出レベル以下	281	三重県		30	2	検出レベル以下
68	京都府		70	3	検出レベル以下	175	栃木県		70	2	検出レベル以下	282	三重県		50	6	検出レベル以下
69	京都府		30	2	検出レベル以下	176	長野県		70	4	検出レベル以下	283	宮城県		55	4	検出レベル以下
70	京都府		55	4	検出レベル以下	177	長野県		50	2	検出レベル以下	284	宮城県		40	3	検出レベル以下
71	京都府		30	2	検出レベル以下	178	長野県		100	6	検出レベル以下	285	宮城県		30	3	検出レベル以下
72	京都府		35	3	検出レベル以下	179	長野県		90	3	検出レベル以下	286	宮城県		20	2	検出レベル以下
73	京都府		40	3	検出レベル以下	180	長野県		90	4	検出レベル以下	287	宮城県		65	5	検出レベル以下
74	京都府		50	4	0.116	181	長野県		40	2	検出レベル以下	288	宮城県		70	6	検出レベル以下
75	群馬県		40	2	検出レベル以下	182	長野県		40	2	検出レベル以下	289	宮城県		40	3	検出レベル以下
76	群馬県		80	5	検出レベル以下	183	長野県		40	3	検出レベル以下	290	宮城県		80	7	検出レベル以下
77	群馬県		45	1	検出レベル以下	184	長野県		15	1	検出レベル以下	291	宮城県		50	4	検出レベル以下
78	群馬県		60	5	検出レベル以下	185	長野県		60	4	検出レベル以下	292	宮城県		40	4	検出レベル以下
79	群馬県		25	3	検出レベル以下	186	長野県		15	1	検出レベル以下	293	宮城県		70	6	検出レベル以下
80	群馬県		60	5	検出レベル以下	187	長野県		50	2	検出レベル以下	294	宮城県		70	6	検出レベル以下
81	群馬県		65	4	検出レベル以下	188	長野県		70	4	検出レベル以下	295	宮城県		120	10	0.0100
82	群馬県		100	8	検出レベル以下	189	長野県		40	3	検出レベル以下	296	宮城県		21	1	検出レベル以下
83	群馬県		50	2	検出レベル以下	190	長野県		55	3	検出レベル以下	297	山梨県		80	5	検出レベル以下
84	群馬県		55	3	検出レベル以下	191	長野県		55	3	0.0100	298	山梨県		90	5	0.0400
85	群馬県		65	6	検出レベル以下	192	長野県		70	5	検出レベル以下	299	山梨県		100	6	0.0100
86	群馬県		45	4	検出レベル以下	193	長野県		30	1	検出レベル以下	300	山梨県		60	3	検出レベル以下
87	群馬県		50	5	検出レベル以下	194	長野県		50	2	検出レベル以下	301	山梨県		60	2	検出レベル以下
88	群馬県		45	2	検出レベル以下	195	長野県		70	4	0.0036	302	山梨県		60	3	検出レベル以下
89	群馬県		100	10	検出レベル以下	196	長野県		40	2	検出レベル以下	303	山梨県		70	5	検出レベル以下
90	群馬県		55	3	検出レベル以下	197	長野県		70	5	検出レベル以下	304	山梨県		70	4	検出レベル以下
91	群馬県		70	7	検出レベル以下	198	長野県		50	2	検出レベル以下	305	山梨県		80	4	0.0050
92	群馬県		40	3	検出レベル以下	199	長野県		40	1	検出レベル以下	306	山梨県		65	4	0.0100
93	群馬県		40	3	検出レベル以下	200	長野県		80	6	0.0200	307	山梨県		63	3	0.0288
94	群馬県		30	2	検出レベル以下	201	長野県		80	5	検出レベル以下	308	山梨県		75	4	検出レベル以下
95	滋賀県		40	2	検出レベル以下	202	長野県		60								

図1. マウスの血清を用いた ELISA 測定系の検討



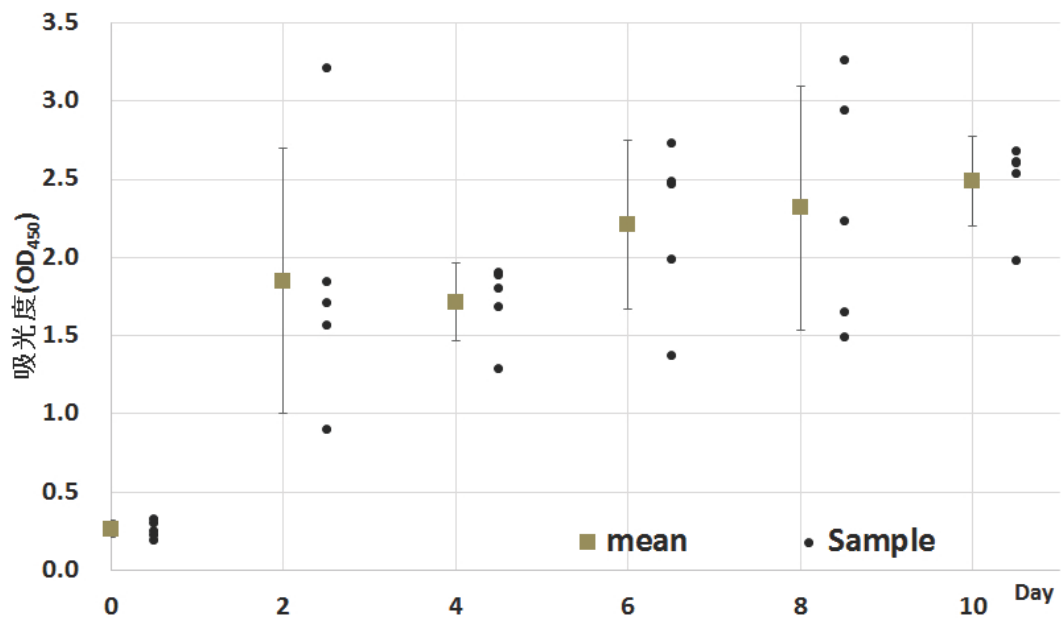
黒実線：強ポジティブコントロール 黒点線：弱ポジティブコントロール

図2 . 経鼻感染マウスの IgG 抗体の測定 n=5、mean ± SE



# : <0.01(vs day2)、\* : <0.01(vs day4)

図3 . 経鼻感染マウスの IgM 抗体の測定 n=5、mean ± SE



# : <0.01(vs day2)、\* : <0.01(vs day4)



厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )

分担研究課題：動物由来新興ヒトバベシア症原虫の国内感染実態の解明

研究分担者 新倉 綾 ( 国立感染症研究所 動物管理室 主任研究官 )

研究協力者 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 平田 晴之 ( 酪農学園大学 獣医学群 准教授 )

研究要旨：ヒトバベシア症はマダニ媒介性の人獣共通感染症である。世界的には、米国の *B. microti* 欧州の *B. divergens* が主要因であるが、流行地域以外での近縁種や新種が患者から相次いでみつかり、ヒトバベシア症は新興感染症として注目されている。本研究で我々は、これまで日本に存在しないとされていた *B. divergens* をはじめてシカから検出し、全国的に分布している事を明らかにした。また、分子疫学的解析から、本原虫は欧州、米国と同じクレードに属する原虫であり、今後、感染患者が発生する可能性が示唆された。さらに、米国の *B. microti* と同系統である *B. microti* US-type の分離を *Ixodes persulcatus* ( シュルツマダニ ) からはじめて成功し、4 株を樹立した。分離株は遺伝的、抗原的に野ネズミ由来の原虫と同一であり、シュルツマダニが自然界での媒介種であることが確定した。シュルツマダニはマダニ刺口症の主要種であることから、汚染地域におけるヒトへの感染を監視する必要がある。

A. 研究目的

*Babesia divergens* は欧州のウシバベシア症の主病因であるが、時にヒトに感染して重症化することが知られ、とくに脾臓摘出者では死亡率は約 40% に上る。レゼルボアは、欧州ではウシとされてきたが、シカが自然界における本来の宿主ではないかとの報告が相次いでいる。一方、最近、米国で *B. divergens*

の近縁種 (*Babesia* sp.MO1) 感染による死亡例が相次ぎ、新興感染症として注目されている。本研究では、日本シカ (*Cervus nippon*) の血液を調べる機会に恵まれたため、*B. divergens* 感染の有無を、赤血球を材料とした遺伝子検査にて検出を行い、遺伝子配列の解読と系統解析を行った。

一方 *Babesia microti* US-lineage によるヒト

バベシア症は米国北東部が主な流行地であり、野ネズミ( deer mouse ) と *Ixodes scapularis* (black legged tick) が、レゼルボアおよびベクターである。近年、シカやマダニの増加と生息域の拡大に伴い、患者発生地域の拡大や輸血による感染事故の増加が問題となっている。我々はこれまで、北海道、道東地方の野鼠から US-lineage を分離し、これが米国分離株と遺伝的に近縁であること、同地方の *Ixodes. persulcatus* (シュルツマダニ) から野鼠由来株と同一の遺伝子が検出されること等を報告してきた。本研究では、シュルツマダニがベクターであることを確定するため、原虫分離を試み、抗原・遺伝子性状を野鼠由来株や米国株と比較した。

## B. 研究方法

### 1) *B. divergens* の検出と解析

21 都道府県 (北海道、岩手、宮城、栃木、群馬、山梨、長野、岐阜、静岡、千葉、三重、滋賀、京都、兵庫、鳥取、島根、広島、宮崎、徳島、熊本、鹿児島) で捕獲された、合計 449 匹のニホンシカの血餅をマイクロビーズで破碎し、定法により DNA を抽出した。次に *B. divergens* の 18SrRNA をターゲットとしたプライマー-dv101F/dv1353R (1<sup>st</sup>) と dv159F/dv1296R (2nd) を用いて Nested PCR によりスクリーニングを行った。陽性検体の 18SrRNA と  $\beta$ -tubulin、CCT7 遺伝子について、特異的プライマーにより増幅を試み、塩基配列を決定した。GenBank に登録されている類似の配列を用いて、ClustalW による

アライメントを行った。進化系統樹解析は neighbor-joining method 用い、系統樹の分枝位置の信頼性については 1,000 回のブーツストラップによって計算された値を用いた。

### 2) *B. microti* の分離

旗振り法により未吸血のマダニを北海道各地で採集し、形態学的に種分類を行った。レゼルボアの生息密度を間接的に知るため、採集時間と採集数を記録し、各採集地域における採集効率を計算した。シュルツマダニのオスは冷凍、メスは 4 で保存した。オスはプール (~5 匹) してホモジナイザーで破碎後、定法により DNA した。US-lineage の  $\beta$ -tubulin をターゲットとした PCR でスクリーニングを行い、採集地ごとの *B. microti* US-lineage 陽性率を算出した。シュルツマダニのメスはスナネズミに数日吸血させた後回収した。実体顕微鏡下で唾液腺を取り出し、そのホモジェネートをハムスターに腹腔内接種した。感染ハムスターを定期的に微量採血し、血液塗抹標本を作成した。赤血球内感染率がピークに達した時点で全採血し、感染赤血球の凍結保存、ウェスタンブロット並びに CCT7 遺伝子のシークエンス材料とした。また、感染後 8 週後の血液から血清を分離し、抗血清とした。

(倫理面からの配慮について)

本課題の動物実験は、国立感染症研究所動物実験委員会に承認され、指針に基づいて国



立感染症研究所にて行われた。

### C. 研究結果

- 1) 32 検体（北海道を含む 8 都道府県）が陽性を示し(図 1)、1 検体を除いて全てが *B. divergens* に分類された。そのうち 11 検体の *18SrRNA* 及び  $\beta$ -tubulin 遺伝子配列を決定したところ、同一であり、欧州の *B. divergens*、米国の *Babesia* sp. MO1 と近似していた(表 1)。また、進化系統樹上でシカの前虫は一つのクラスターを形成し、欧州や米国の原虫株と同じクレードに属した(図 2)。残りの 1 検体は、*B. divergens* および *B. odocoilei* の両種から遺伝的に中間に位置する原虫であった(図 2)。
- 2) マダニの採集効率は採集地によって大きく異なっていた(表 2)。シュルツマダニのオス合計 253 匹のうち 12 検体が PCR 陽性であり、採集効率の高い地域と相関していた。US-lineage 陽性地域は 4 カ所で最小感染率 (MIR、%) は 21.2 から 0.9 だった(表 2)。MIR の高い 3 地域の♀を分離に用いた。吸血刺激したメス 41 匹のうち、5 匹の唾液腺が PCR 陽性を示し、うち 4 株の原虫分離に成功した(表 3)。分離株の *18S rRNA*,  $\beta$ -tubulin、*CCT7* 遺伝子配列は一致しており、道東地方の野ネズミ由来株とも一致した。一方、海外の株とは 3 遺伝子とも一致することはなく、米国株の *CCT7* 遺伝子では 1.54% の相違が見られた(表 4)。抗原性状はシュルツマ

ダニ由来株と野鼠由来株の間ではほぼ同様の交差反応が認められたが、米国株とは殆ど交差が認められなかった(図 3)。

### D. 考察

我が国では全国的にシカが *B. divergens* に感染し、これが、欧米や米国の患者由来の株と遺伝的に近縁であることが明らかとなった。これまで患者の報告は無いが、シカの生息域や生息数拡大に伴って、シカが保有する病原体にヒトが感染するリスクは高まっていると考えられる。世界的にも、近年新型原虫によるヒトのバベシア症の発生報告が続いており、早急な血清学的診断方法の開発、ヒトの抗体保有率の調査等が急務の課題であり、患者の発生を注意深く監視してゆく必要がある。さらに、今回我々は初めて *B. microti* US-lineage をシュルツマダニから分離し、ベクターであることを確定証明した。シュルツマダニはヒトを吸血し、ライム病のベクターでもあることから陽性地域感染地における、ヒトバベシア症の発生を注意深く観察していく必要がある。

### E. 結論

日本のシカが、欧米の患者由来の原虫に近縁な *B. divergens* を保有していること、ヒト嗜好性の高い、道東地方のシュルツマダニが *B. microti* US-lineage のベクターであることを明らかにした。今後、診断法の確立、及び、ヒトバベシア症発生を注意深く監視していく必要がある。

F. 健康危険情報

\*\*\*\*\*

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Zamoto-Niikura A, Tsuji M, Qiang W, Hirata H, Nakajima R, Morikawa S, et al. Field survey and molecular analysis of *Babesia microti* group. In: Ltd. iP, editor. Epidemiology II -Theory, Research and Practice 1st ed: iConcept Press Ltd.; in press
- 2) Zamoto-Niikura A, Tsuji M, Imaoka K, Kimura M, Morikawa S, Holman PJ, et al. Sika deer carrying *Babesia* parasites closely related to *B. divergens*, Japan. Emerg Infect Dis. 20(8):1398-400, 2014
- 3) Taharaguchi, M., Takimoto, K., Zamoto-Niikura, A., Yamada, Y. K.. Effect of weak Acid hypochlorous solution on selected viruses and bacteria of laboratory rodents. Exp Anim, 63; 141-147, 2014.
- 4) Zamoto-Niikura A, Tsuji M, Qiang W, Nakao M, Hirata H, Ishihara C. Detection of two zoonotic *Babesia microti*, Hobetsu and U.S. lineages, respectively, in sympatric tick species, *Ixodes ovatus* and *Ixodes persulcatus*, in Japan. Appl Environ Microbiol. 78.3424 - 3430, 2012

2.学会発表

- 1) 新倉（座本）綾、森川茂、平田晴之、石原智明. 北海道のシュルツマダニ *Ixodes persulcatus* から分離された *Babesia microti* の性状解析. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 札幌 (2014. 9)
- 2) 新倉（座本）綾、福士秀悦、森川茂、山田靖子. リフトバレー熱ウイルス L 蛋白のポリメラーゼ機能における C 末端領域の重要性. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013, 11)
- 3) 新倉(座本)綾、今岡浩一、木村昌伸、森川茂、平田晴之、石原智明、山田靖子. ニホンジカ (*Cervus nippon*) からの *Babesia divergens* 様遺伝子の検出, 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜 (2013. 9)
- 4) 根来沙弥、平田晴之、新倉 綾、萩原克郎、石原智明 . 北海道のエゾシカ (*Cervus nippon yezoensis*) における *B. divergens* の感染状況の把握進化と系統樹解析 .第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜 (2013. 9)

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. *B. divergens*のシカにおける分布

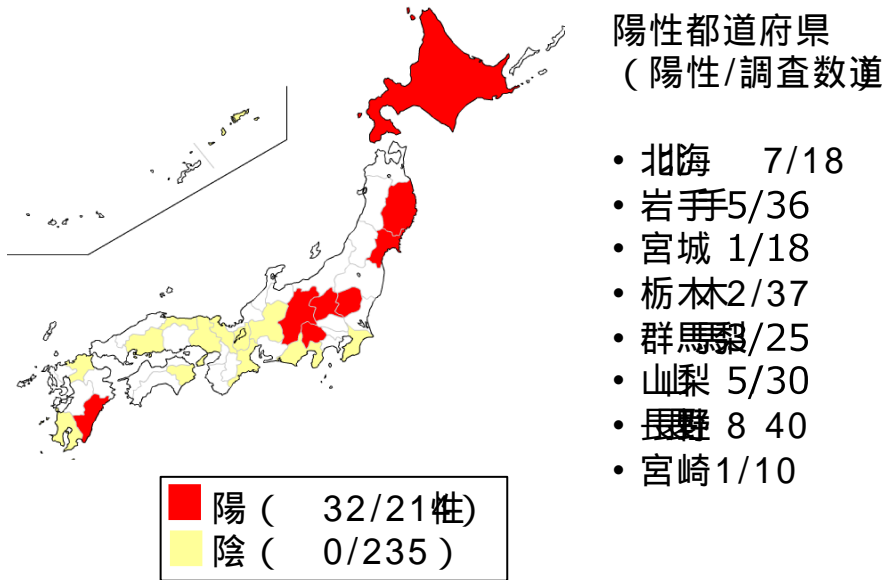


図2. 18S rRNA にもとづく系統樹

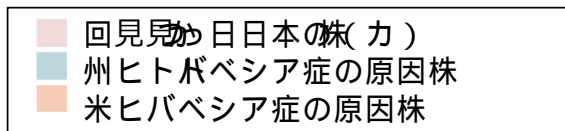
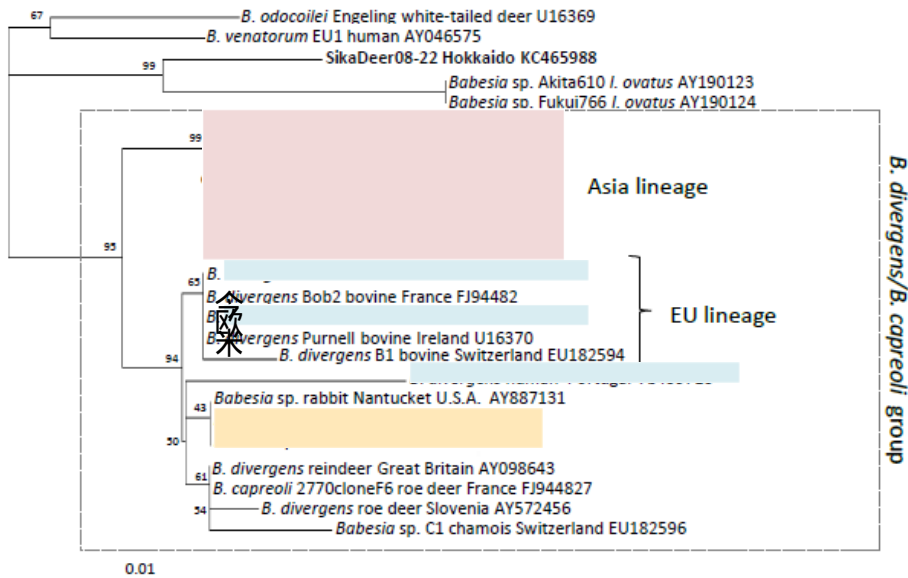


図3. シルツマダニから分離された  
*B. microti* U.S.-lineageの抗原性状

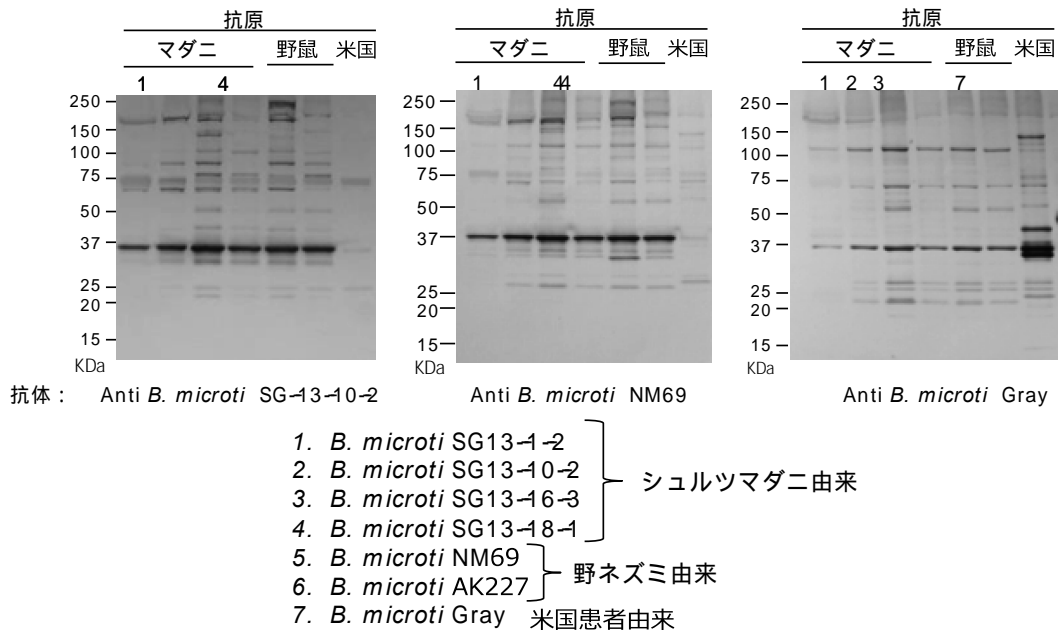


表1 シ由来 *B. divergens*と欧州及び米国者由来株間の塩基配列列同

遺伝子マーカー	シカ由来 <i>B. divergens</i> との相同性 (%)		
	SikaDeer	<i>B. divergens</i>	<i>Babesia</i> sp. MO1
	日本	欧州	米国
<i>rDNA</i> (1,567bp)	99.7-10	99.2-9.5	99.2-9.5
<i>α-tubulin</i> (900bp)	99.9-10	98.0-9.1	98.1-9.2
<i>CCT7</i> (1,622bp)	98.7-9.9	96.5-9	N.D.

マの集効率率率とシュルツマダニのB				. microti US-lineage 陽性率率		
採集地 (採集効率率)	マダニ全種			シュルツマダニ		
	採集数	採集時間 (分)	採集効率率 (匹数/ 分)	調査数	PCR 陽性 感染率率(%)	
浦幌町 1	387	160	2.4	111	1	0.9
帯広市 3	111	50	2.2	33	7	21.2
浦幌町 2	67	40	1.7	9	1	11.1町
上土幌 1	137	80	1.7	47	3	6.4
帯広市 2	88	60	1.5	28	0	0
帯広市 1 町	35	40	0.9	5	0	0
上土幌 2	35	60	0.6	20	0	0
合計	860	490	1.8	253	12	4.7

### 3 シルツマダニ からの *B. microti* US-lineage 分離

採集地	分離した マダニ数	PCR陽性数	分離数	陽性率率(%)
浦幌町 2 町	2	0	0	0
上土幌 来	16	2	2	12.5
帯広市 3	23	3*	2	8.7
合計	41	5*	4	9.8

\*分離出なかった1 検体を含む

表4 日本のシュルツマダニ由来*B. microti* 株と野ネズミ由来株及び国外株との塩基配列との比較

遺伝子 マーカー	長さ(bp)	<i>B. microti</i> US-lineage (株名、国)					
		NM69 北海道 (野ネズミ)	Korea 8 韓国	VL63 ロシア	Gray 米国	HK ドイツ	XJ1637 中国新疆
<i>18S rRNA</i>	1,552	100%	100%	100%	100%	99.87%	99.87%
		0*	0	0	0	2	2
<i>β-tubulin</i>	1,079 (intron+exon)	100%	99.63%	99.54%	98.89%	96.94%	97.13%
		0	4	5	12	33	31
<i>CCT7</i>	2,142 (intron+exon)	100%	99.63%	99.81%	98.55%	96.63%	96.40%
		0	8	4	31	72	77

\*置換(in/del 含む)塩基数



### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Eun-Sil Park, Michio Suzuki, Masanobu Kimura, Keiji Maruyama, Hiroshi Mizutani, Ryuichi Saito, Nami Kubota, Tetsuya Furuya, Tetsuya Mizutani, Koichi Imaoka, Shigeru Morikawa. Identification of a natural recombination in the F and H genes of feline morbillivirus. *Virology*, 2014, 468-470: 524-531
2. Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular stomatitis virus. *J Virol*. 2014, 88(13):7317-7330.
3. Yanagihara R, Gu S H, Arai S, Kang H J, Song J W. Hantaviruses: Rediscovery and new beginnings. *Virus Research*. 187:6–14. 2014
4. Bennett S N, Gu S H, Kang H J, Arai S, Yanagihara R. Reconstructing the evolutionary origins and phylogeography of hantaviruses. *Trends in Microbiology*. 8:473-482. 2014
5. Gu S H, Lim B K, Kadjo B, Arai S, Kim J A, Nicolas V, Lalis A, Denys C, Cook J A, Dominguez S R, Holmes K V, Urushadze L, Sidamonidze K, Putkaradze D, Kuzmin IV, Kosoy M Y, Song J W, Yanagihara R. Molecular phylogeny of hantaviruses harbored by insectivorous bats in Côte d'Ivoire and Vietnam. *Viruses*. 6:1897-1910. 2014
6. Hamamoto N, Uda A, Tobiume M, Park C-H, Noguchi A, Kaku Y, Okutani A, Morikawa S, Inoue S. Association between RABV G Proteins Transported from the Perinuclear Space to Cell Surface Membrane and N-glycosylation of the Sequon at Asn204. *Jpn J Infect Dis*. 2015, *in press*.
7. Yoshikawa R, Okamoto M, Sakaguchi S, Nakagawa S, Miura T, Hirai H, Miyazawa T. Simian Retrovirus 4 Induces Lethal Acute Thrombocytopenia in Japanese Macaques. *J Virol*. 2015, *in press*.
8. Shimoda H, Saito A, Noguchi K, Terada Y, Kuwata R, Akari H, Takasaki T, Maeda K. Seroprevalence of Japanese encephalitis virus infection in captive Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Primates*. 2014 Jul; 55(3): 441-445.
9. Hara Y, Terada Y, Yonemitsu K, Shimoda H, Noguchi K, Suzuki K, Maeda K. High prevalence of hepatitis E virus in wild boar in Yamaguchi Prefecture, Japan. *J Wildlife Dis* 2014; 50(2):378–383.
10. Terada Y, Minami S, Noguchi K, Mahmoud H.Y.A.H., Shimoda H, Mochizuki M, Une Y, Maeda K. Genetic characterization of coronaviruses from domestic ferrets in Japan. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20(2): 284-287.

11. 鍬田龍星, 杉山弘樹, 下田 宙, 前田 健「蚊が保有・媒介するウイルス感染症」(総説). Jpn J Vet Parasitol. 13(2); 91-101
12. 米満研三、服部志保、鈴木准子、浜崎千菜美、下田 宙、前田 健「ニホンイノシシのウイルス感染症」兵庫県におけるニホンイノシシの管理の現状と課題(兵庫県森林動物研究センター研究部編集) 第8章 p93-105, 2014
13. 前田 健: 「イヌジステンパーウイルスの今」Companion Animal Practice 2014. Apr: 298: 47-50 (緑書房)
14. Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi T, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Oikawa Y, Honda T, Gokuden M, Tsunoda T, Turumi M, Ando S, Andoh M, Sato K, Kawabata H. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial 16S rDNA gene. Medical Entomology and Zoology. 65(1): 13-21, 2014.
15. Oda S, Kabeya H, Sato S, Shimonagane A, Inoue K, Hayashidani H, Takada N, Fujita H, Kawabata H, Maruyama S. Isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* 1B/O:8 in from *Apodemus* mice in Japan. Journal of Wildlife Diseases 51(1): 260-264, 2015.
16. 忽那賢志、川端寛樹、志賀尚子、氏家無限、竹下望、早川佳代子、加藤康幸、金川修造、大曲貴夫. 日本人2例目となる回帰熱症例. 感染症学雑誌. 2014; 88: 713-714.
17. 河野智美、佐野哲也、椴山昭光、須藤正之、山本明彦、小宮貴子、梅原成子、青木佳代、石川和彦. 滋賀県のイヌ・ネコにおけるジフテリア毒素産生性コリネバクテリウム・ウルセランスの保菌状況. 滋賀県衛生科学センター所報. 2014; 49: 5-8.
18. Zamoto-Niikura A, Tsuji M, Qiang W, Hirata H, Nakajima R, Morikawa S, et al. Field survey and molecular analysis of *Babesia microti* group. In: Ltd. iP, editor. Epidemiology II -Theory, Research and Practice 1st ed: iConcept Press Ltd.; in press
19. Zamoto-Niikura A, Tsuji M, Imaoka K, Kimura M, Morikawa S, Holman PJ, et al. Sika deer carrying *Babesia* parasites closely related to *B. divergens*, Japan. Emerg Infect Dis. 20(8): 1398-400, 2014
20. Taharaguchi, M., Takimoto, K., Zamoto-Niikura, A., Yamada, Y. K.. Effect of weak Acid hypochlorous solution on selected viruses and bacteria of laboratory rodents. Exp Anim, 63; 141-147, 2014.