

厚生労働科学研究委託費  
(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)

(委託業務題目)

「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・  
治療法の確立に関する研究

(H26-新興実用化-一般-019)

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 森川 茂  
(国立感染症研究所)

平成27(2015)年3月

## 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究 .....	1
森川 茂（国立感染症研究所獣医科学部）	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. プロジェクトの研究総括 .....	9
森川 茂（国立感染症研究所獣医科学部）	
2. 中東呼吸器症候群（MERS）のリスク評価と診断法 .....	13
松山州徳（国立感染症研究所 ウイルス第二部）	
3. ニパウイルス感染症の血清診断法 .....	19
加来義浩（国立感染症研究所 獣医科学部）	
4. コウモリレオウイルスのゲノム情報と診断法 .....	29
下島昌幸（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
5. イシククル(Issyk-kul)熱の診断法と疫学 .....	35
福土秀悦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
6. 新規ブルセラ属菌の遺伝子情報と診断法 .....	43
今岡浩一（国立感染症研究所 獣医科学部）	
7. 新規カプノサイトファーガ属菌の遺伝子情報と診断法 .....	55
鈴木道雄（国立感染症研究所 獣医科学部）	
8. 野兔病弱毒株の作出とワクチン効果 .....	67
宇田晶彦（国立感染症研究所 獣医科学部）	
III. 学会等発表実績 .....	75
III. 研究成果の刊行物・別刷 .....	77

## I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（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）

委託業務成果報告（総括）

「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究

（H26-新興実用化-一般-019）

業務主任者： 森川 茂 国立感染症研究所獣医科学部長

研究要旨：多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。しかし、これらには重篤で重要なウイルス感染症や細菌感染症がある。本研究では、6ヶ月と短期間の研究であるため、ポイントを絞って「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得るための研究を行い、以下の成果を得た。1) 中東呼吸器症候群(MERS)はアラビア半島全域で新興した重篤な MERS コロナウイルス(MERS-CoV)による急性呼吸器感染症で、ヒトコブラクダを感染源動物とする。本研究ではヒト、ラクダ以外の動物にも容易に感染することから、MERS-CoV の種特異性は低いと考えられた。ブタは感受性が高いため中東外の国で養豚場などに MERS-CoV が浸淫すると、ブタを感染源として流行が起きる可能性がある。現在開発された MERS の遺伝子診断法は、動物感染によりウイルスに変異が生じても対応可能であることも確認された。2) マレーシア、バングラデシュ、インドに加えてフィリピンでも流行が確認されたニパウイルス感染症は、ニパウイルスによる神経症状、呼吸器症状を主徴とし致死率が高いコウモリを感染源とする。これまでに整備されている遺伝子診断、中和試験に加えて、組換え抗原による IgG, IgM 抗体検出法 (ELISA, IF) 及び陽性対照サル血清を作製した。3) コウモリレオウイルスはヒトの重篤な急性呼吸器感染症の原因となり、東南アジアで感染者が発生しているがこれまで診断法がなかった。組換えウイルス蛋白質を用いた抗体検出系、保存性の高い領域を標的とする遺伝子診断法を開発した。4) イシククル熱はダニ媒介性ウイルス感染症で、中央アジアで流行している。国内のダニから分離されたイシククルウイルスの遺伝子配列を決定し、遺伝子診断法を開発した。遺伝子診断法は、患者の診断だけでなく、国内のダニ等におけるウイルス浸淫度を調査することに応用できる。5) カエルから分離された新規ブルセラ属菌 2 株のほぼ全塩基配列を決定した。既知のブルセラ属菌と遺伝的に異なる新規ブルセラ属菌の *B. inopinata* と同様、カエル由来株は既知のブルセラ属菌と遺伝的に異なること、これらの novel ブルセラ属菌間でも遺伝的にそれぞれ距離があったことからカエルが novel ブルセラ属菌の宿主の一つであると考えられる。これらを識別可能な遺伝子検査法を開発した。6) イヌ、ネコの咬傷等により感染するカプノサイトファーガ属菌感染症患者から、*C. canimorsus* とは遺伝的に異なる新規菌株が 3 株分離された。これらは、*C. canimorsus* とは DNA hybridization で 12~15%と新



菌種であった。全遺伝子配列を決定した結果、3株は同一菌株であり、*Capnocytophaga* 属の新菌種であった。得られた遺伝子配列情報から PCR 法による鑑別診断系を確立した。  
7) バイオテロ対策上も極めて重要な野兎病菌には、生ワクチンがロシア、米国で開発されているが病原性復帰が大きな問題である。新規病原性遺伝子として同定した *pdpC* 遺伝子を KO した野兎病菌を用いて、その生ワクチンとしての有効性を検証した。

業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名：

松山州徳（国立感染症研究所 ウイルス第二部）、加来義浩（国立感染症研究所 獣医科学部）、下島昌幸（国立感染症研究所 ウイルス第一部）、福士秀悦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）、今岡浩一（国立感染症研究所 獣医科学部）、鈴木道雄（国立感染症研究所 獣医科学部）、宇田晶彦（国立感染症研究所 獣医科学部）

A. 研究目的：

多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため、「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。本研究では、動物由来ウイルス感染症と動物由来細菌感染症に関して以下の研究を行い、これら「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得ることを目的とする。

MERS: 中東で新興したコロナウイルスによる新興感染症で本年4月には急激に患者数が増加し、国内では指定感染症（病原ウイルスは特定3種）に指定された。MERS コロナウイルスは複数の動物に感受性がある。これらの動物由来細胞で継代培養して遺伝子変異がおきるかを調べ、変異による遺伝子検査法への影響が想定される場合には、事前に対応可能な遺伝子検査系を開発する。

ニパウイルス感染症: マレーシア、バングラディッシュ等以外に、本年4月にフィリピンでニパウイルス感染症の発生が確認

された。サルのニパウイルス特異的 IgM 抗体を作製し、IgM 抗体検出系を確立する。  
ネルソンベイオルソレオウイルス感染症: コウモリのレオウイルス (PRV) による重篤な呼吸器感染症であるが、診断法が開発されていない。そこで、PRV 遺伝子検査法と抗体検査法を確立する。

イシククル (Issyk-kul) 熱: クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに近縁なイシククルウイルスによる感染症で高熱・頭痛を主徴とし、キルギスタン・タジキスタンに常在する。昨年、イシククルウイルスと非常に近縁なウイルスが分離され、国内にも同種のウイルスが常在する可能性が示唆された。本研究では、遺伝子診断法・血清診断法を開発し、国内の人や動物の疫学、ダニの分子疫学を行う手法を確立する。

ブルセラ症: 近年、新種のブルセラ属菌が種々の動物や人から分離されている。人からの分離株は無尾類由来菌と遺伝的に近縁と考えられる。そこで、愛玩用無尾類から分離したブルセラ属菌の遺伝子配列を決定し、新規遺伝子診断法、鑑別法を開発する。

カブノサイトファーガ感染症: イヌ、ネコの口腔内常在菌による重症敗血症で、近年患者数が増加している。カブノサイトファーガカニモルサスと遺伝的に異なる同種菌が分離されたことから、これらの遺伝子、生物学的解析を行う。

野兎病: 野兎病菌の新規病原性遺伝子 KO 株を作製した。本株のワクチンとしての有用性を、病原性解析、強毒株チャレンジ防御能を解析して明らかにする。

## B. 研究方法：

各業務項目の委託業務成果報告の研究方法来に詳細を記載した。

## C. 研究結果：

### 1) 中東呼吸器症候群 (MERS) のリスク評価と診断法：

2012 年に中東で新興した MERS は 2014 年 4 月に急激に患者数が増加し、日本国内では 2 類感染症に指定された。MERS コロナウイルスは、中東とアフリカ全域のヒトコブラクダに蔓延していることから、容易には排除できない。ヒトは、ラクダからの直接感染以外に、ヒト-ヒト感染、ラクダ以外の動物を介した感染が疑われており調査が続けられている。本研究から、特にブタ、ウサギ、サル由来の細胞に MERS コロナウイルスが効率良く感染することがわかった。サル細胞での継代によりウイルスの細胞侵入に関わる部位に遺伝子変異が見られたが、他の細胞での継代培養では変異は認められなかった。このことから、MERS コロナウイルスは宿主に対する種の壁が低く様々な動物由来細胞に感染できるが、それぞれの動物細胞における選択圧は低く遺伝子変異は起こり難いと考えられた。また、現行の遺伝子検査法に影響を及ぼすような変異ではないことから、試験法の改良の必要性はなかった。

### 2) ニパウイルス感染症の血清診断法：

ニパウイルス (NiV) 感染症は、1998-99 年のマレーシアで新興感染症として発生した後、バングラデシュ、インドで発生し、2014 年にはフィリピンでも流行が確認された。国内での患者発生はないが、アジア・アフリカ各地で、自然宿主のオオコウモリから NiV 抗体が確認されてい

ることから NiV は広範囲に分布すると考えられる。NiV 感染症の感染拡大の阻止には発症初期の迅速診断がきわめて重要となる。国立感染症研究所では、シュードタイプによる代替中和試験、不活化した NiV 抗原による IgG-ELISA は確立しているが、IgM 検出系は確立していない。そこで、組換え NiV-N 蛋白質をカニクイザルに免疫して IgM 陽性対照血清、IgG 陽性対照血清を作製した。また、組換え NiV-N 蛋白質を用いて IgM 抗体検出系、IgG 抗体検出系を開発し、作製した IgM、IgG 陽性対照血清を用いて評価した。その結果、組換え抗原を用いた IgM-ELISA、IgG-ELISA が開発された。また、NiV-N 蛋白質を恒常的に発現する HeLa 細胞を樹立し、これを用いた蛍光抗体法による IgM、IgG 抗体検出法も開発した。

### 3) コウモリレオウイルスのゲノム情報と診断法：

近年、コウモリレオウイルス Pteropine orthoreovirus (PRV) によるヒトの呼吸器疾患 (PRV 感染症) がマレーシアおよびインドネシアにおいて新興し、日本国内への輸入例も 1 例発生した。ヒトからヒトへの感染事例も知られており、国内で流行を起こすことも懸念される。PRV 感染症の診断法が確立されていないことから、PRV の遺伝子検査法と抗体検査法を確立することを目的とした。遺伝子検査法では PRV の遺伝子配列情報を比較し、保存性の高い S2 segment 内にプライマーを設計し、遺伝子検出系を開発した。抗体検査法では、複数ある PRV 株のウイルス蛋白質のアミノ酸配列を比較し、保存性が高い major outer capsid (MOC) 蛋白質を抗原に用いることとした。組換えバキュロウイルスにより発

現した組換え MOC 蛋白質を抗原とした ELISA を開発した結果、日本への輸入症例の回復期血清の IgG 抗体を効率よく検出できた。

#### 4) イシククル(Issyk-kul)熱の診断法と疫学：

イシククル熱は高熱、頭痛、筋肉痛を主徴とする、ダニあるいは蚊媒介性のイシククルウイルスによる感染症で、中央アジア（タジキスタンなど）で患者が報告されているがウイルス学的に詳細な解析がなされていない。2011年、国内で採取されたコウモリマルヒメダニからイシククルウイルスと遺伝的に非常に近縁なウイルスがダニから分離され、国内にもイシククルウイルスまたは近縁ウイルスが常在することが示唆された。本研究では、国内で分離されたイシククル様ウイルスの全遺伝子配列を決定し、感受性細胞を同定した。また、リアルタイム PCR による遺伝子検出法を確立し、患者発生時の診断法として、また国内のダニおよびイシククル様ウイルスの分子疫学を行う手法としても有用である。

#### 5) 新規ブルセラ属菌の遺伝子情報と診断法：

既知のブルセラ属菌とは異なる新種のブルセラ属菌 *B. inopinata* が患者から同定されているがその起源は不明である。近年、カエル類から新規ブルセラ属菌が相次いで分離された。本研究では2株のカエル由来ブルセラ属菌の全遺伝子配列を決定した。その結果、Classic species(*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. neotomae*)、

Marine species (*B. ceti*, *B. pinnipedialis*) と Novel species のげっ歯類由来 *B. microti* は単一クレードを形成し、カエル分離株は、*B. microti* 以外の Novel species、*B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2、*B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 と別のクレードを形成した。また、遺伝子配列情報を基にカエル由来ブルセラ属菌特異的遺伝子検出法を開発した。

#### 6) 新規カプノサイトファーガ属菌の遺伝子情報と診断法：

イヌ・ネコに咬傷・搔傷を受けた際に感染する *Capnocytophaga canimorsus* 感染症の重症敗血症例3例から *C. canimorsus* とは遺伝子的に異なる菌株が分離された。この新規 *Capnocytophaga* 属菌の全遺伝子配列を決定した。また、生物学的解析を行った。その結果、新規 *Capnocytophaga* 属菌3菌株は、*C. canimorsus* との DNA-DNA ハイブリッド形成試験において、同一菌種の基準である相同値 70%以上を大きく下回る 12~15%であった。さらに 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子の相同値、また各種の生理・生化学的性状および理化学分析の結果から、3株同士は同一菌種であり、*Capnocytophaga* 属の新菌種であると考えられた。新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的な 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子を標的とする PCR 法を開発し、*C. canimorsus* を含む既知の *Capnocytophaga* 菌種との鑑別診断法を確立した。

#### 7) 野兎病弱毒株の作出とワクチン効果：

野兎病菌は非常に高い感染性を示し、致死率も高いことから、生物兵器として使用

されることが懸念されている。日本国内では、2008年に5症例報告されたのみであるが、動物の疫学的調査から国内にも以前広範囲に病原菌が存在していることが分かっている。野兎病菌のワクチンは、かつて米国で実験従事者用の生ワクチンが用いられたが病原性復帰等の問題から現在では用いられていない。ロシアでは、旧ソ連時代に開発された生ワクチンがある。これら以外に、野兎病菌のワクチンはない。そこで、既に我々が作製した新規病原性遺伝子(*pdpC* 遺伝子)を挿入破壊によりKOした野兎病菌株(*pdpC* 株)の生ワクチン効果を検証した。*pdpC* 株は、マウスに対する病原性を消失しているがカニクイザルでの病原性は不明である。そこで、カニクイザルに *pdpC* 株を感染させたところ弱毒化が確認された。サルに強毒株を感染させると、2頭いずれも野兎病を発症し致死性的であった。一方、*pdpC* 株感染3週間後に強毒株を接種すると、2頭中1頭が非致死性的野兎病を発症したが、1頭は発症しなかった。いずれも3週間生存した。この結果から、カニクイザルにおいて *pdpC* 株は生ワクチンとして有効であることが示唆された。今後、*pdpC* 株の接種量、接種回数、有効免疫期間等の検討が必要である。

#### D. 考察：

多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため、「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。本研究では、動物由来ウイルス感染症と動物由来細菌感染症に関して以下の研究を行い、これら「顧みられない動物由来感染症」の

制御に繋がる成果を得ることを目的とした。なお、本研究は6ヶ月と短期間の研究であるため、ポイントを絞って「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得るための研究を行なった。その結果、1) MERS-CoV はヒトコブラクダ、ヒト以外動物にも感受性を有するものが多く、その種特異性は低いと考えられた。ブタは感受性が高いため中東外の国で養豚場などに MERS-CoV が浸淫すると、ブタを感染源として流行が起きる可能性がある。一方、国立感染症研究所で開発された MERS の遺伝子診断法は、動物感染によりウイルスに変異が生じても対応可能であることも確認された。2) マレーシア、バングラデシュ、インドに加えてフィリピンでも流行が確認されたニパウイルス感染症に関して、これまでに整備されているウイルス遺伝子診断、中和試験に加えて、組換え抗原による IgG, IgM 抗体検出法 (ELISA, IF) 及び陽性対照サル血清を作製した。3) コウモリレオウイルスはヒトの重篤な急性呼吸器感染症の原因となり、東南アジアで感染者が発生しているがこれまで診断法がなかった。今回、組換えウイルス蛋白質を用いた抗体検出系、保存性の高い領域を標的とする遺伝子診断法が開発された。4) イシククル熱はダニ媒介性ウイルス感染症で、中央アジアで流行している。国内のダニから分離されたイシククル様ウイルスの遺伝子配列を決定し、高感度な遺伝子診断法を開発した。遺伝子診断法は、患者の診断だけでなく、国内のダニ等におけるウイルス浸淫度を調査することに応用できる。5) カエル由来新規ブルセラ属菌2株のほぼ全塩基配列を決定した。既知のブ

ルセラ属菌と遺伝的に異なる新規ブルセラ属菌の *B. inopinata* と同様、カエル由来株は既知のブルセラ属菌と遺伝的に異なること、これらの novel ブルセラ属菌間でも遺伝的にそれぞれ距離があったことからカエルが novel ブルセラ属菌の宿主の一つであると考えられた。これらを識別可能な遺伝子検査法も開発した。6) カプノサイトファーガ属菌感染症患者から分離された、新規菌株 3 株の性状と遺伝子配列解析を行った結果、これら 3 株は同一菌株であり、*C. canimorsus* とは異なる新菌種であった。これらの鑑別診断可能な PCR 法を開発した。7) 野兔病菌の新規病原性遺伝子として同定した *pdpC* 遺伝子を KO した野兔病菌株を用いて、その生ワクチンとしての有効性が検証された。

これらの研究成果は、目的に合致するものであり、今後の実用化に向けてさらに詳細な検討が必要であるが、当初の目標は達成できた。

#### E. 結論

- 1) MERS-CoV はラクダ、ヒト以外動物にも感受性を有する動物が多く、その種特異性は低いと考えられた。国立感染症研究所で開発された MERS の遺伝子診断法は、動物感染によりウイルスに変異が生じても対応可能であることを確認した。
- 2) ニパウイルス感染症の血清診断に用いられる IgG, IgM 抗体検出法 (ELISA と IF) を組換え抗原を用いて開発した。また、陽性対照血清として、組換え抗原免疫サル血清を作製した。
- 3) コウモリレオウイルス感染症の組換えウイルス蛋白質を用いた抗体検出系と遺伝子診断法を開発した。

- 4) イシククル熱はダニ媒介性ウイルス感染症で、中央アジアで流行している。国内のダニから分離されたイシククル様ウイルスの遺伝子配列を決定し、高感度な遺伝子診断法を開発した。遺伝子診断法は、患者の診断だけでなく、国内のダニ等におけるウイルス浸淫度を調査することに応用できる。
- 5) カエル由来ブルセラ属菌株は既知のブルセラ属菌と遺伝的に異なること、最近分離同定された novel ブルセラ属菌との間でも遺伝的にそれぞれ距離があることから、カエルが novel ブルセラ属菌の宿主の一つであると考えられた。これらを識別可能な遺伝子検査法も開発した。
- 6) カプノサイトファーガ属菌感染症患者から *C. canimorsus* とは異なる新菌種を分離・同定した。これらの鑑別診断可能な PCR 法を開発した。
- 7) *pdpC* 遺伝子を KO した野兔病菌株が生ワクチン候補株として有用であることが示された。

#### F. 健康危険情報

MERS は国内では輸入症例の報告はない。ニパウイルス感染症は、2014 年にフィリピンで初めて流行した。コウモリレオウイルスによる急性呼吸器感染症は、2006 年以降東南アジアでの感染による患者発生が 7 回報告され、家族内感染も起きている。タジキスタン等の中央アジアで流行しているイシククル熱の病原ウイルスに非常に近縁なウイルスが国内で分離・同定されたが、患者は確認されていない。新規ブルセラ属菌がカエルより分離された。これによる患者発生は報告がない。カプノサイトファーガ属菌感染症患者 3 名から *C. canimorsus* とは異なる新菌種を分離・同定した。野兔病は北米で

は強毒型による患者が発生しているが、国内では患者は2008年以降発生がない。

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。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



## II. 業務委託成果報告（業務項目）



### 別紙 3

厚生労働科学研究委託費（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）

委託業務成果報告（業務項目）

「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究

（H26-新興実用化-一般-019）

### プロジェクトの研究総括

担当責任者： 森川 茂 国立感染症研究所獣医科学部長

研究要旨：多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。しかし、これらには重篤で重要なウイルス感染症や細菌感染症がある。本研究では、6ヶ月と短期間の研究であるため、ポイントを絞って「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得るための研究を行なった。業務主任者は、プロジェクトの研究総括として、これらの研究の方針を個別に担当責任者と協議し、研究の方針と進め方を決定した。また、短期間の研究を効率良く推進するため、担当責任者に研究協力者を配置して、期間内に研究成果が出るよう調整した。その結果、当初の研究目的を達成できた。

#### A. 研究目的：

多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため、「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。本研究では、動物由来ウイルス感染症と動物由来細菌感染症に関して以下の研究を行い、これら「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得ることを目的とする（図1）。業務主任者は、プロジェクトの研究総括として、これらの研究の方針を個別に担当責任者と協議し、研究の方針と進め方を決定し、気管内に研究成果が得られるよう調整した。

#### B. 研究方法：

各業務項目の推進にかかる打合せと研究の進め方を協議し、プロジェクトの取りまとめを行った。なお、各委託業務項

目毎の研究方法に関しては、各委託業務成果報告の研究方法に詳細を記載した。

#### C. 研究結果：

各委託業務項目の研究方針が決定され、短期間のうちに研究目的、方針に沿った研究が適切に実施された。各項目の研究成果は以下の各委託業務成果報告に記載した。新種のブルセラ属菌、カプトサイトファーガ属菌の全遺伝子配列決定に関しては、次世代シーケンサー Miseq（illumina 社）による解析を実施したが、研究協力者として奥谷晶子、木村昌伸（国立感染症研究所獣医科学部）、吉河智城（同ウイルス第一部）の協力を得た。また、組換えニパウイルス抗原の作成・精製には、朴ウンシル、木村昌伸（国立感染症研究所獣医科学部主任研究官）らの協力を得た。これらの協力により期間内

に研究を遂行できた。

#### D. 考察：

多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため、「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。本研究は、研究期間6ヶ月と限定されたことから、研究対象とした感染症は、MERS等の公衆衛生上重要だが診断法・実態把握等が十分ではない感染症であり、かつ国内で発生するリスクがあるか実際に発生している感染症を選択し対象とした。また、研究計画が6ヶ月で可能とするため、ポイントを絞って「顧みられない動物由来感染症」の制御に繋がる成果を得るための研究を行なった。業務主任者は、プロジェクトの研究総括として、これらの研究の方針を個別に担当責任者と協議し、研究の方針と進め方を決定した。また、短期間の研究を効率良く推進するため、担当責任者に必要に応じて研究協力者を配置して、期間内に研究成果が出るよう調整した。その結果、当初の研究目的を達成できた。

これらの研究成果は、目的に合致するものであり、今後の実用化に向けてさらに詳細な検討が必要であるが、当初の目標は達成できた。

これらの成果により、1) MERS コロナウイルスが、動物に感染して遺伝子変異が導入されても、現行の遺伝子検査法で対応可能であることが確認された。2) ニパウイルス感染症の輸入症例が発生した場合に、複合的な診断検査が可能となった。3) コウモリレオウイルス感染症の遺伝子診断法、血清診断法が確立され、疑い患者の検査を可能とした。4) イシククルウイルス感染症の遺伝子診断法が開発された。5) 新たに同定されたカエ

ル由来新規ブルセラ属菌の鑑別診断が開発され疑い患者の検査が可能となった。

6) 患者から分離された新規カプノサイトファーガ属菌の鑑別診断が開発され、患者の検査が可能となった。7) 野兔病の新規生ワクチン候補の有効性が明らかになった。

#### E. 結論

多くの動物由来の新興・再興感染症は散発的に患者が発生するため、「顧みられない動物由来感染症」として公衆衛生的にも臨床的にもあまり重視されていない。これらの内、特に重要と考えられる感染症に関してポイントを絞った研究計画を作成し、期間内に当初の研究計画に沿った成果を得ることができた。詳細は、各委託業務成果報告に詳細を記載した。

#### F. 健康危険情報

MERS は国内では輸入症例の報告はないが、中東などでの患者発生は現在も終息していない。ニパウイルス感染症は、2014年にフィリピンで初めて流行した。コウモリレオウイルスによる急性呼吸器感染症は、2006年以降東南アジアでの感染による患者発生が7回報告され、家族内感染も起きている。タジキスタン等の中央アジアで流行しているイシククル熱の病原ウイルスに非常に近縁なウイルスが国内で分離・同定されたが、患者は確認されていない。新規ブルセラ属菌がカエルより分離された。これによる患者発生は報告がない。カプノサイトファーガ属菌感染症患者3名から *C.canimorsus* とは異なる新菌種を分離・同定した。野兔病は北米では強毒型による患者が発生しているが、国内では患者は2008年以降発生がない。

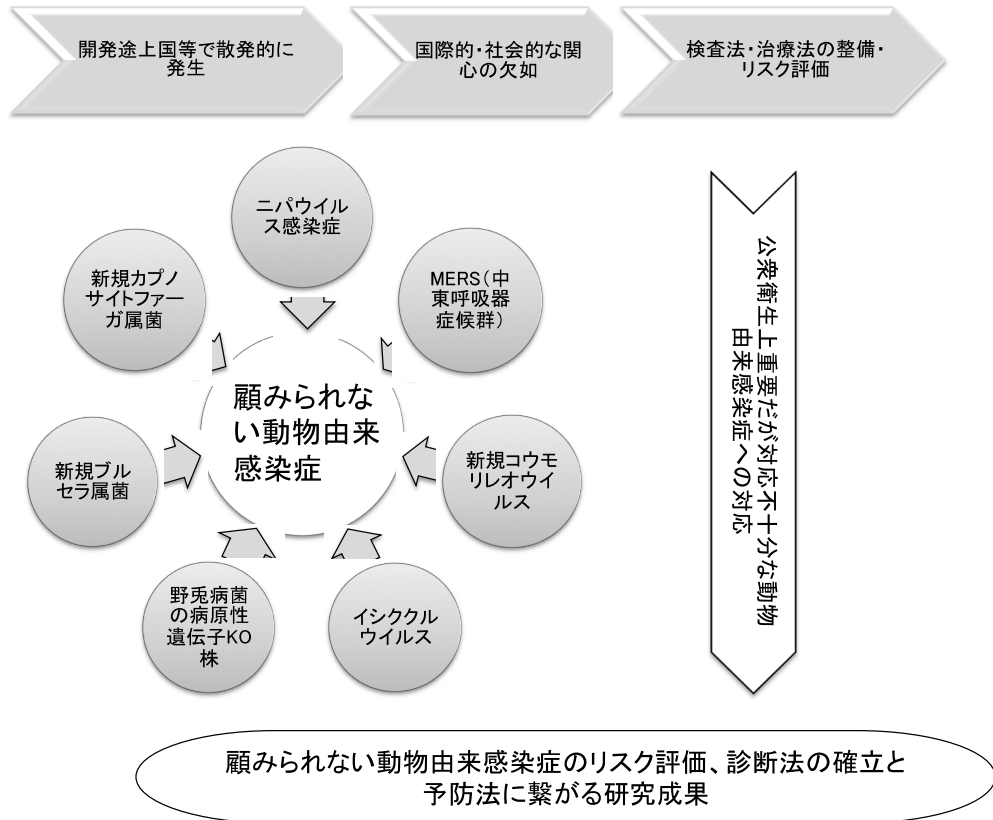
G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1. 「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究のスキーム



## 中東呼吸器症候群（MERS）のリスク評価と診断法

担当責任者： 松山州徳 国立感染症研究所 ウイルス第三部四室長

研究要旨：2012年に中東で新興した MERS コロナウイルスは2014年4月には急激に患者数が増加し、日本国内では2類感染症に指定された。このウイルスは中東とアフリカ全域のヒトコブラクダに鼻風邪の病原体として蔓延していることが明らかとなっており、簡単には排除できない病原体であることがわかってきた。ほとんどの感染者はラクダ接触歴が無いことから、ヒトからヒトへ不顕性感染している可能性と、ヒトとラクダ以外の動物が媒介している可能性が疑われており、調査が続けられている。本研究において、様々な動物由来の培養細胞を使った実験では、特にブタ、ウサギ、サル由来の細胞にこのウイルスがよく感染することがわかった。サル由来の細胞では、ウイルスの細胞侵入に関わる部位に遺伝子変異が見られたが、現行の遺伝子検査法に影響を及ぼすような変異は見られなかった。本研究の結果から MERS コロナウイルスは宿主に対する種の壁が低く、様々な動物由来細胞によく感染でき、それぞれの動物細胞における選択圧は低く、遺伝子変異は起こり難いと考えられる。現行のリアルタイム PCR 検査法を変更する必要は無いと考えられる。

### A. 研究目的：

中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）はヒトに感染して重症の肺炎を引き起こす。アラビア半島全域で散発的な発生がみられるが、昨年4月には急激に患者数が増加し（1ヶ月に500人以上）、日本国内では2類感染症に指定された。今までに MERS-CoV が検出された動物は、ヒトとコウモリとヒトコブラクダである。コウモリについては、サウジアラビアのコウモリ（*Taphozous perforatus*）から MERS-CoV と同一の 190nt の遺伝子断片が検出されているが、コウモリとヒトの直接

の接触は少なく、ヒトへの感染源であるとは考え難い。ヒトコブラクダについては、中東とアフリカの広範囲に棲息する大多数の個体から MERS-CoV に対する抗体が検出されている。それぞれの患者発生地域でヒトから見つかるウイルス遺伝子の特徴と、ラクダから見つかるウイルス遺伝子の特徴が一致することから、ラクダが感染源の一つで有ることは、疑いのない事実である。ラクダの出産から哺乳の時期である冬季にラクダの鼻腔や咽頭からウイルスが検出されることが多く、ヒトへはラクダとの接触やラクダミルクを飲むことによ

って感染すると考えられている。しかし、ほとんどの感染者はラクダ接触歴が無いこともわかっている。症状の無い感染(不顕性感染)者も多く見つかり、感染に気づかないうちにヒトからヒトへウイルスが広がっている可能性が疑われている。一方、MERS-CoV はヒトとラクダだけでなく、サル、ウマ、ウサギ、ブタ、コウモリ等が感染可能であることが、ウイルス受容体(DPP4)の配列情報と培養細胞での感染実験からと予想されており(図2)、これらの動物に定着し蔓延する可能性がある。そこで、本研究では日本に棲息する種々の動物の細胞で継代したウイルスの遺伝子変異を調べ、動物種により変異の入り方に違いが生じるかどうかを明らかにする。また、変異により、現在の遺伝子検査法(PCR、LAMP)への影響が想定される場合には、事前に対応し遺伝子検査系を改良する。

#### B. 研究方法：

ウサギ及びブタの上気道細胞培養：

ウサギ(JWメス、SPF、500-600g)の上気道を細かく切り分け、2mmサイズの破片を専用培地(Lifeline cell tech, LM-0007)の中で一週間培養し、カルチャープレート(IWAKI、4810-010)に浸出してくる細胞を二週間培養、トリプシンで剥離し、気相液相界面培養器具(Greiner, Thin Certs-TCC Inserts 24 well)の中でレチノイン酸入り培地で2週間培養した。得られた細胞にMERS-CoV(EMC strain)を10の2乗PFU感染させて1日後、培地中のウイルスの感染価をVERO/TMPRSS2細胞を用いて調べた。同様の操作をブタの気道(東京芝浦臓器株式会社より購入)を用い、専用培地(Promocell、C-21070)中で培養した。種々の細胞への感染実験：

表2に示した様々な動物由来細胞株を準備し、100PFUのMERS-CoV(EMC strain)を感染させ、24時間後の培地中のウイルス価を調べた。ウイルス価の測定にはVERO/TMPRSS2細胞(MERS-CoVの感染後に明確な細胞融合を示す)を用いた。

動物由来細胞株では数回の継代を行い、ウイルスを回収した。表2に書いた継代回数後、遺伝子配列を解析したが、遺伝子検査に影響する部位であるN遺伝子、E遺伝子、ORF1a遺伝子、及び病原性に影響する部位であるS遺伝子を調べた。

#### C. 研究結果：

サルに由来する細胞ではMERS-CoVは非常によく増殖し、1000倍以上のウイルス価の上昇が見られた。またブタとウサギ由来細胞でも100倍以上のウイルス増殖が見られた。この時、これらの細胞での細胞変性効果は見られなかった。イヌとハムスターとマウス由来の細胞には全く感染しなかった。感受性の高い細胞において、MERS-CoVを数代継代し、上記のN、E、ORF1a、Sの遺伝子配列を調べたところ、Vero細胞で継代したウイルスのS遺伝子に変異が見られた。この変異はスパイク蛋白の膜融合に関わる部位であるため、ウイルスの性質が変わる可能性があり、今後解析する予定である。この変異による現行の遺伝子検査法への影響は無い。

ヒト由来細胞であるCalu-3細胞とHBTE細胞に、MERS-CoVはよく感染したが、HeLa細胞へは全く感染しなかった。HeLa細胞はMERS-CoVのレセプターを発現していないため、MERSが感染しないことは既に報告されているので、MERS-CoV非感受性のコントロール細胞として用いた。

特にウイルス増殖が高いウサギとブタについて、動物検体から上気道細胞を分離し、感染実験をおこなった。100PFUのMERS-CoVを感染させたウサギの上気道細胞（気相液相界面培養）から培地を回収し、ウイルス価を測定したところ、11,000PFUのウイルスが検出され、100倍程度のウイルス価の上昇が見られた（表1、図2）。この時、上気道細胞での細胞変性効果は見られなかった。気相液相界面に至っていない単層培養のブタ上気道細胞では、感染後一日目で32,000PFUのウイルスが検出された（図2）。これら細胞で継代されたウイルスのN、E、ORF1a、Sの遺伝子配列に変異は見られなかった（表1）。

#### D. 考察：

MERS-CoVはブタとウサギの細胞で十分感染できることが解った。MERS-CoVはヒトとラクダ以外の動物にも容易に感染できることから、MERS-CoVの感染宿主の種特異性が低いことを再確認できた。この感染症が日本で蔓延する可能性として、ブタを宿主とし、ブタの中に蔓延する場合が考えられる。現在アメリカ大陸と東アジアのブタで流行しているPEDV（ブタ流行性下痢症ウイルス）もコロナウイルスの一種であるが、排除することが極めて難しい病原体である。MERS-CoVがPEDVと同様にブタで蔓延した場

合、終息させることの難しさが懸念される。

またMERS-CoVはマウスやラット等の小動物に感染しないため、動物実験ができず、治療薬やワクチンの効果を確認することができない。本研究はブタとウサギを用いる感染実験の可能性をはかるものでもある。

#### E. 結論

本研究の結果から、日本に棲息する動物のうち少なくともウサギとブタには、呼吸器にMERS-CoVが感染する可能性があることが示唆された。また、MERS-CoVは宿主に対する種の壁が比較的 low、様々な動物由来細胞に効率よく感染できるが、その反面それぞれの動物細胞に感染しても選択圧はかからず、遺伝子変異は起こり難いと考えられる。このため、動物に感染したMERS-CoVを検出するために、現行のリアルタイムPCR検査法を変更する必要は無いと考えられる。

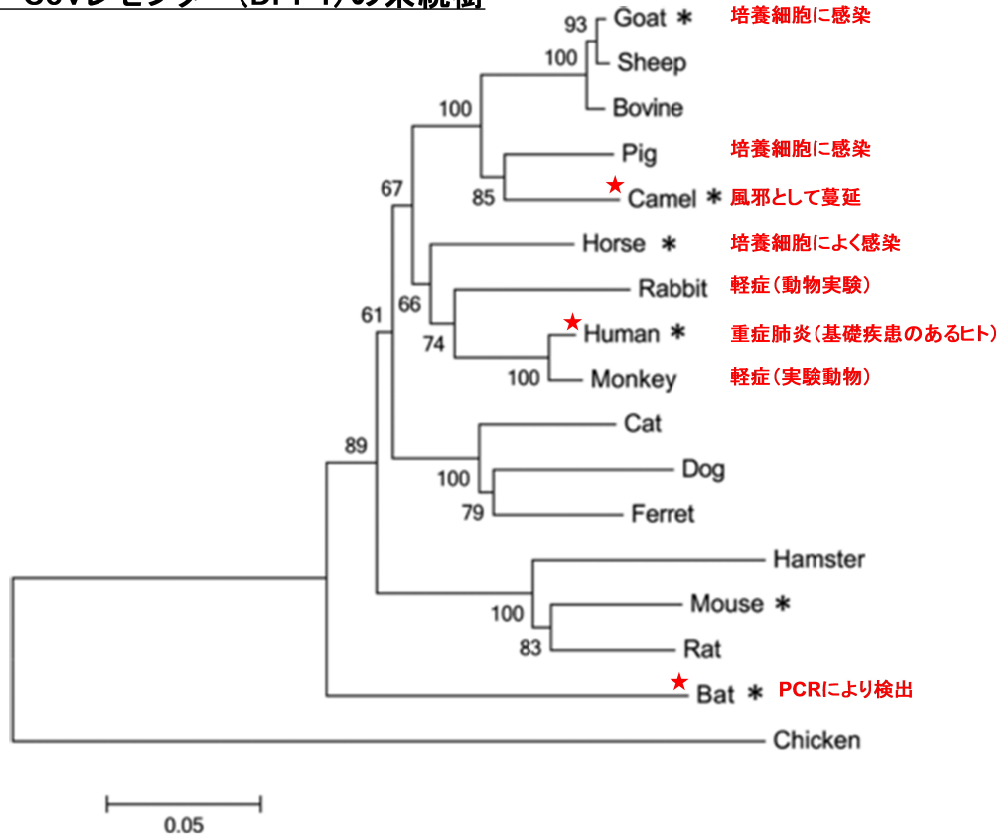
#### F. 研究発表

無し

#### G. 知的所有権の取得状況

無し

## MERS-CoVレセプター(DPP4)の系統樹



**図1 様々な動物の MERS-CoV レセプター(DPP4)系統樹と MERS-CoV の感染可能性**

上の系統樹の中で、星印をつけた動物は実際に MERS-CoV の感染が確認され、文字で注釈を入れた動物は感染する可能性がある。



## 上気道細胞の気相液相界面培養

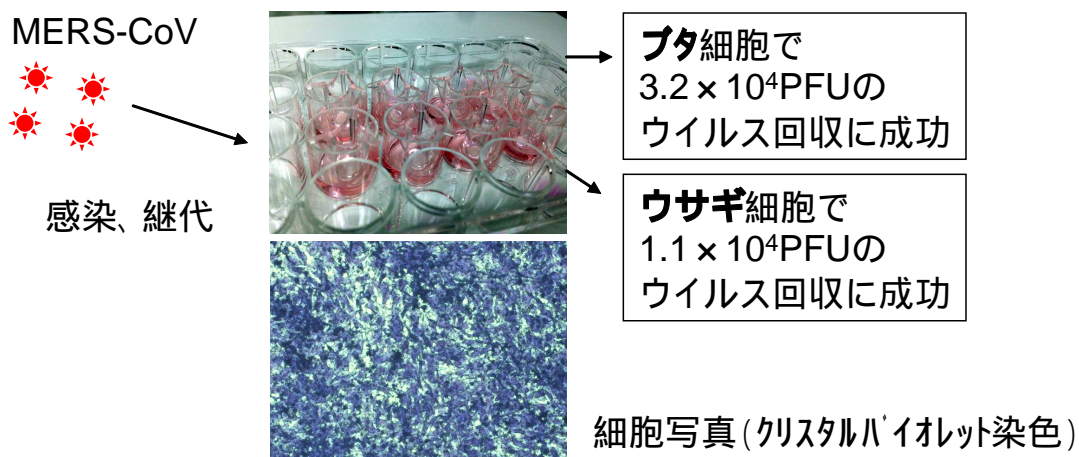


図2. フタ及びウサギ由来細胞への MERS-COV 感染実験

100PFU の MERS-CoV を感染させたウサギとフタの上気道細胞(気相液相界面培養)から培地を回収し、ウイルス価を測定したところ、100 倍程度のウイルス価の上昇が見られたが細胞変性は見られなかった。

表1. 様々な動物由来細胞でのMERS-CoVの継代によるウイルスの変化

動物種	細胞名	由来組織	ウイルス価 log10 PFU/mL ± SD	継代回数	遺伝子変異	検査系への影響 (PCR,LAMP)
ヒト	Calu-3	気道	6.2 ± 0.7	5	ND	無
ヒト	HeLa	子宮	ND	0	-	-
ヒト	HBTE(初代上気道)	上気道	5.7 ± 0.8	5	ND	無
サル	Vero	腎臓	6.6 ± 0.8	5	24499C A	無
サル	LLC-MK2	腎臓	6.2 ± 0.1	5	ND	無
フタ	初代上気道	気道	4.5 ± 0.4	1	ND	無
フタ	PK-15	腎臓	5.3 ± 0.8	5	ND	無
ウサギ	初代上気道	気道	4.0 ± 0.2	2	ND	無
ウサギ	RK-13	腎臓	4.5 ± 0.6	2	ND	無
イヌ	MDCK	腎臓	ND	0	-	-
ハムスター	BHK	腎臓	ND	0	-	-
マウス	DBT	脳	ND	0	-	-
マウス	NIH-3T3	皮膚	ND	0	-	-

ND: 未検出, -: データ無し



厚生労働科学研究委託費（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）

委託業務成果報告（業務項目）

「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究

（H26-新興実用化-一般-019）

## ニパウイルス感染症の血清診断法

担当責任者： 加来 義浩 国立感染症研究所獣医科学部

研究協力者： 朴ウンシル、木村昌伸 国立感染症研究所獣医科学部

研究要旨：ニパウイルス（NiV）感染症は、1998-99年のマレーシアで新興感染症として発生した後、バングラデシュ、インドで発生している。2014年にはフィリピンでも流行が確認された。国内での患者発生はないが、アジア・アフリカ各地で、自然宿主のオオコウモリから NiV 抗体が確認されていることから NiV は広範囲に分布すると考えられる。NiV 感染症の感染拡大の阻止には発症初期の迅速診断がきわめて重要となるが、NiV は国際的には BSL4 病原体に指定されているため、患者発生国では実験室診断が行えない状況である。国立感染症研究所では、シュードタイプによる代替中和試験、不活化した NiV 抗原による IgG-ELISA は確立しているが、IgM 検出系は確立していない。そこで本課題では、組換え NiV-N 蛋白質をカニクイザルに免疫して IgM 陽性対照血清、IgG 陽性対照血清を作製した。また、組換え NiV-N 蛋白質を用いて IgM 抗体検出系、IgG 抗体検出系を開発し、作製した IgM、IgG 陽性対照血清を用いて評価した。これまで、IgG-ELISA は、豪州の研究機関から分与された不活化 NiV 抗原を用いていたが、今課題により、組換え抗原を用いた IgM-ELISA、IgG-ELISA が開発された。また、NiV-N 蛋白質を恒常的に発現する HeLa 細胞を樹立し、これを用いた蛍光抗体法による IgM、IgG 抗体検出法も開発した。

### A. 研究目的：

ニパウイルス（NiV）感染症は、1990年代後半にマレーシアで発生した新興ウイルス感染症で、神経症状、呼吸器症状を主徴とし致死率が高い。ワクチンや治療法がないことから、国際的には BSL4 病原体として分類されている。2014年4月にフィリピン・ミンダナオ島で原因不明の脳炎の流行があり、これまでに7名が死亡している。国立感染症研究所は、豪州家畜衛生研究所とともに、フィリピン熱帯医学研究所の要請を受けて病原体の探索を行った結果、血清検査および遺伝子検査により、本流行の原因が NiV であることを明

らかにし、マレーシア、バングラデシュ、インドに加えてフィリピンも NiV 感染症発生リスクがあることを初めて明らかにした。これまで血清検査の確定診断としては、BSL4 施設において感染性ウイルスを用いた中和試験が実施されてきたが、現在ではシュードタイプ VSV を用いた中和試験も BSL2 施設で実施可能である。しかし、発症後に中和抗体価が上昇するまでに 2-3 週間程度かかることから、発症初期の血清診断では中和抗体を検出できないことがある。また無症候感染や潜伏感染する例もあることから、中和抗体の存在は必ずしも直近の NiV 感染を示唆するものではな

い。このため、発症初期の血清診断には、IgM 抗体の検出が不可欠となる。IgM 検出系としては、これまでに IgM capture ELISA が海外では開発されている。感染研でも同法の導入を検討したが、結果の評価に必要な IgM 陽性対照ヒト患者血清が確保できていないため、現在までに IgM 検出系は整備されていない。一方、感染症法の改正により、4 類感染症であるニパウイルス感染症は地方衛生研究所（地方衛研）でも検査対応をすることが求められることから、地方衛研でも実施可能な迅速診断法を整備する必要が生じた。そこで本研究では、ヒトと血清学的に強い交差性が確認されているマカク属のサルに対して、NiV 蛋白質を免疫し、NiV 特異的 IgM 抗体ならびに IgG 抗体を作製した。さらに、得られた血清を、ヒト患者血清の代替となる陽性対照として利用し、組換え NiV-N 蛋白質を用いた高感度・高特異性の IgM および IgG 検出系を確立することを目指した。将来的には、確立した診断法を、国内での診断基盤の強化のみならず、フィリピンを含むニパウイルス感染症の発生リスクがある国々に供与し、国際的な本症の診断能力の向上に貢献することが期待される。

## B. 研究方法：

### 1) NiV-N 蛋白質の発現・精製：

NiV-N 遺伝子を挿入したバキュロウイルス発現用トランスファーベクター NiV-N/pFastBac HTc を出発材料として、以下の手順で NiV-N 蛋白質の大量発現および精製を行った。NiV-N/pFastBac HTc は、豪州家畜衛生研究所（Australian Animal Health Laboratory; AAHL）の Linfa Wang 博士より分与されたものであり、NiV-N 遺伝子の N 末端に His タグが付加されるように設計されている。このベクターより、Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen) を用いてバキュロウイルスを作製し、これを昆虫細胞に接種して、感染細胞から NiV-N 蛋白質を抽出・精製した。一連の流

れを以下に示す。

NiV-N/pFastBac HTc を Bacmid 保有大腸菌株 DH10Bac に導入し、アンピシリン 100 $\mu$ g/ml を含む LB プレートで一晩培養する。

得られたコロニーから組換え Bacmid DNA を抽出する。

PCR により、Bacmid DNA に NiV-N 遺伝子が挿入されていることを確認する。

得られた組換え Bacmid DNA を昆虫細胞 Sf9 に導入し、CPE が生じたら上清を回収し、これを P1 ウイルス（AcMNPV-NiV-N/P1）とする。

P1 ウイルスを Sf9 細胞に接種し、CPE が生じたら上清を回収し、これを P2 ウイルス（AcMNPV-NiV-N/P2）とする。

P2 ウイルスを、T25 フラスコの昆虫細胞 Tn5 に接種し、55 時間後に細胞を回収し、遠心する。

得られたペレットを 10ml の 1% NP40/PBS で溶解し、氷中で 10 分間静置する。

6,000rpm で 10 分間遠心し、得られたペレットを 1ml の 2M urea, 1% NP40/PBS で溶解する。

超音波処理を 20 秒間行う。

遠心し、上清を回収する。

His-Bind Kit (Novagen) のプロトコールに沿って、上清に Ni-NTA ビーズ (Qiagen)

を加える。4 で 4 時間転倒混和する。

4 で 4 時間転倒混和後、His-Bind Kit を用

い、Ni-NTA ビーズから NiV-N を回収する。また、バキュロウイルス発現 NiV-N を抗原に用いた ELISA において、陰性対照の固相化抗原として用いている delta-P 蛋白質も、delta-P 発現バキュロウイルスを用いて、上記の ~ の手順で作製した。

### 2) サルへの NiV-N 免疫：

カニクイザル雄 2 頭に対し、以下の手順で NiV-N 蛋白質を免疫した。Day 0 に、プレ採血を行った後、初回免疫として、NiV-N 蛋白質 2mg を含む抗原液とアジュバント (TiterMax Gold) を混合し、背側の 5 か所に皮下投与した。初回投与後、Day5、7、9、11、13、15 に各頭の橈側皮静脈または大腿静脈より採血を行った。このうち、Day5、7、9、11、13、15 については抗体価の推移を調べることを目的として 0.5ml ずつ採血し、Day 15 については 30ml ずつを採血した。

(倫理面への配慮)

カニクイザルの免疫作業は、ハムリー株式会社 筑波研究センター 試験研究所にて実施された。試験計画書については、同社の倫理委員会により承認を受けている。

### 3) 抗体価の測定:

継続的に得られたサル血清に対して、IgG および IgM を以下の手順で測定した。

#### i) NiV 感染 Vero 細胞 / 非感染 Vero 細胞 lysate を抗原に用いた IgG 検出 ELISA :

被検血清としてサル No.1、No.2 の Day 0、5、7、9、11、13、15 血清 (1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400 希釈)、陽性対照血清として抗 NiV-N ウサギ血清 (1:1000 希釈) を用いた。血清の希釈には、20% Blocking-one [ナカライ]/0.05% Tween 20 添加 PBS(-) (PBS-T) を使用した。

ELISA 用プレート (Nunc, Maxisorp) に、PBS(-)で 1:1000 に希釈した NiV 感染 Vero 細胞 lysate (NP40 で可溶化後、ガンマ線照射により不活化) と、NiV 非感染 Vero 細胞 lysate (同様に作製) を 50 $\mu$ l/ウェル添加する。

4 で一晩静置し、固相化する。

PBS-T で 1 回洗浄する。

ブロッキング液 (20% Blocking-one/DW ) を 100 $\mu$ l/ウェルずつ添加する。

37 で 1 時間反応後、PBS-T で 3 回洗浄する。

被検サル血清および陽性対照ウサギ血清を 100 $\mu$ l/ウェルずつ添加する。

37 で 1 時間反応後、PBS-T で 4 回洗浄する。

2 次抗体として、サル被検血清反応ウェルには HRP 標識抗ヒト IgM 抗体を、ウサギ陽性対照血清反応ウェルには HRP 標識抗ヒト IgM 抗体を重層する。

37 で 1 時間反応後、PBS-T で 4 回洗浄する。

基質液 (ABTS) を 100 $\mu$ l/ウェルずつ添加する。

室温で 60 分間反応させる。その間、定期的に ELISA プレートリーダーで OD<sub>405</sub> を測定する。

#### ii) バキュロウイルス発現 NiV-N を抗原に用いた ELISA :

被検血清としてサル No.1、No.2 の Day 0、5、7、9、11、13、15 血清 (1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400 希釈)、陽性対照血清として抗 NiV-N ウサギ血清 (1:1000 希釈) を用いた。血清の希釈には、20% Blocking-one [ナカライ]/0.05% Tween 20 添加 PBS(-) (PBS-T) を使用した。

#### ii-a) IgG 検出 ELISA :

ELISA 用プレート (Nunc, Maxisorp) に、PBS(-)で 1:250 に希釈したバキュロウイルス発現 NiV-N を 100 $\mu$ l/ウェルを添加する。陰性対照ウェルにバキュロウイルス発現 delta-P を 100 $\mu$ l/ウェル添加する。

4 で一晩静置し、固相化する。

PBS-T で 1 回洗浄する。

ブロッキング液 (20% Blocking-one/DW )

を 100 $\mu$ l/ウェルずつ添加する。

37 で 1 時間反応後、PBS-T で 3 回洗浄する。

被検サル血清および陽性対照ウサギ血清を 100 $\mu$ l/ウェルずつ添加する。

37 で 1 時間反応後、PBS-T で 4 回洗浄する。

2 次抗体として、サル被検血清反応ウェルには HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を、ウサギ陽性対照血清反応ウェルには HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を重層する。

37 で 1 時間反応後、PBS-T で 4 回洗浄する。

基質液 (ABTS) を 100 $\mu$ l/ウェルずつ添加する。

室温で 30 分間反応させる。その間、定期的に ELISA プレートリーダーで OD<sub>405</sub> を測定する。

#### ii-b) IgM 検出 ELISA

上記 IgG ELISA と同様に行う。ただし、2 次抗体として、サル被検血清反応ウェルには HRP 標識抗ヒト IgM 抗体を、ウサギ陽性対照血清反応ウェルには HRP 標識抗ヒト IgM 抗体を重層する。

#### iii) 間接蛍光抗体法 (IFA) :

NiV-N 蛋白質発現プラスミド NiV-N/pKS336 を、transfection 試薬 XtremeGENE (ロシュ) を用いて、HeLa-W229 細胞に導入した。導入 5 日後の細胞をトリプシンで消化後、洗浄し、適当数の細胞を 14 穴ガラススライドに固着させ、アセトン固定を行った。これを抗原スライドとして用い、以下のプロトコールで IFA を実施した。被検血清としてサル No.1、No.2 の Day 0 および Day 15 血清、陽性対照血清として抗 NiV-N ウサギ

血清を用いた。

被検サル血清 (1:10, 1:50 希釈)、陽性対照ウサギ血清 (1:50, 1:200 希釈) を NiV-N 発現スライドに重層する。

37 で 1 時間反応後、PBS で洗浄する。

2 次抗体として、サル被検血清反応ウェルには FITC 標識抗ヒト IgM 抗体を、ウサギ陽性対照血清反応ウェルには FITC 標識抗ヒト IgM 抗体を重層する。2 次抗体液には、0.002% evansblue を加え、カウンターステインを行った。

37 で 1 時間反応後、PBS で洗浄する。

蛍光顕微鏡で観察する。

#### C. 研究結果 :

##### 1) NiV-N 蛋白質の大量発現および精製 :

上述の方法で得られた精製 NiV-N について、精製過程で得られた蛋白質液を SDS-PAGE に供し、クマシー染色を行ったところ、約 60kDa のバンドが確認された (図 1)。ウサギ抗 NiV-N 血清を用いて Western blotting を行ったところ、同様の分子量のバンドが検出されたことから (data not shown)、この蛋白質が NiV-N と推測された。

##### 2) NiV-N 抗体の確認

i) NiV 感染 Vero 細胞 / 非感染 Vero 細胞 lysate を抗原に用いた IgG 検出 ELISA :

NiV 感染 Vero 細胞抗原ウェルの OD<sub>405</sub> から、非感染 Vero 細胞抗原ウェルの OD<sub>405</sub> を差し引いて得られた値を、グラフにプロットした (図 2)。サル No.1, No.2 とともに、Day 9 以降の血清において、Day 0 血清と比較して OD<sub>405</sub> の著しい上昇が認められた。サル No.1 のほうが、No.2 に比べて OD<sub>405</sub> の上昇幅は大きかった。

ii) バキュロウイルス発現 NiV-N を抗原に用

いた ELISA :

ii-a) IgG 検出 ELISA :

各経過血清について、NiV-N 抗原(+)ウェルの OD<sub>405</sub> から、NiV-N 抗原(-)ウェルの OD<sub>405</sub> を差し引いた値を算出した。全経過血清が ELISA プレートリーダーの測定上限値 (OD<3.5) 以下に収まっている最低血清希釈 (サル No.1 では 1:6,400、No.2 では 1:1,600) について、得られた結果をグラフにプロットした (図 3)。サル No.1, No.2 ともに、Day 11 以降の血清において、Day 0 血清と比較して OD<sub>405</sub> の著しい上昇が認められた。サル No.1 のほうが、No.2 に比べて OD<sub>405</sub> は高かった。

ii-b) IgM ELISA :

1:100 希釈血清について、NiV-N 抗原(+)ウェルの OD<sub>405</sub> から、NiV-N 抗原(-)ウェルの OD<sub>405</sub> を差し引いて得られた値を、グラフにプロットした (図 4)。サル No.1 血清だが、Day 11 以降の血清において、Day 0 血清と比較して OD<sub>405</sub> の上昇が認められた。一方、サル No.2 では OD<sub>405</sub> の上昇は認められなかった。また、サル No.1 においても、1:200, 1:800, 1:3200 希釈においては、OD<sub>405</sub> の上昇は確認できなかった。

iii) 間接蛍光抗体法 (IFA) :

サル血清 No.1, No.2 (Day 15) および、陽性対照ウサギ血清反応ウェルにおいて、複数の細胞の細胞質内に蛍光性の顆粒が認められた (図 5)。一方、サル血清 No.1, No.2 (Day 0) では、同様の顆粒は観察されなかった。サル血清 (Day 15) では 1:10, 1:50 希釈の双方で顆粒が観察されたが、1:50 のほうがバックグラウンドの蛍光が低く、Day 0 血清とのちがいは明瞭であった。また Day 15 血清においては、サル No.1 のほうがサル No.2 と比べて、蛍光顆粒を有する細胞数が多かった。

D. 考察 :

本症のように、致死率が高く、治療法も確立

していない感染症の疑い例が発生した場合、迅速診断がきわめて重要になる。このため、血清学的には、IgG や中和抗体よりも発症初期の段階で惹起される IgM 検出系の意義はきわめて高い。一部の諸外国では、NiV の IgM capture ELISA 系を開発し、診断に応用しており、上述の 2014 年におけるフィリピンでの流行の際も、AAHL では IgM capture ELISA を実施して、患者 1 名より IgM 抗体を検出した。国立感染症研究所でも、かねてより同検査系の導入を検討してきたが、結果の評価に必要な IgM 陽性対照血清が確保できなかったことから、これまでに IgM 検出系は整備されていない。本症において、特異性の高い IgM 陽性対照血清の確保がきわめて困難であるのは、主に以下の 2 つの理由による。1) 患者血清は、発症中期～後期に採血されることが多いことから、保存されている患者血清中には IgM よりも多くの IgG が含まれている。2) これまでの本症の患者数は、全世界の累計で約 500-600 人程度のみであるうえ、発症初期に採血された患者はきわめて少ない。このような状況から、IgM 陽性対照ヒト血清が大量に確保できる可能性は今後も非常に低いと考え、本課題ではヒト抗体と抗原性が強く交差するマカク属のカニクイザルより IgM 陽性対照血清を得ることを目的に、NiV-N 蛋白質を大量に精製して免疫抗原とし、サル抗血清を作製した。

NiV-N 蛋白質の作製には、バキュロウイルスベクターを利用した。大腸菌由来と異なり、糖鎖付加の点でウイルス由来と近い抗原性状が得られること、哺乳細胞由来に比べて大量の蛋白質が得られることがその理由である。本課題では AAHL より分与された NiV-N 遺伝子を挿入したバキュロウイルス発現用トランスファーベクター NiV-N/pFastBac HTc から、バキュロウイルス AcMNPV-NiV-N を作出し、NiV-N 蛋白質の大量発現を行った。これらをかニクイザル 2 頭に 2mg ずつ接種し、Day 5, 7,

9, 11, 13, 15 に採血を行った。経時的に得られたサル血清における抗 NiV-N 抗体 (IgM, IgG) の推移は、既存あるいは新規の複数の方法で検出した。まず 1:100 に希釈した各血清に対して、既存の方法である NiV 感染 Vero 細胞 / 非感染 Vero 細胞 lysate を抗原に用いた IgG 検出 ELISA を行ったところ、経時的な OD 値の上昇が認められ、サル No.1 のほうが No.2 よりも若干 OD 値は高かった。これらの抗原を用いた IgG 検出 ELISA は国際獣疫事務局の病原体検出マニュアルにも記載されていることから、得られた結果には一定の信頼性がある。しかし従来から、数%の偽陽性反応を伴うこと、NiV 感染細胞 lysate / 非感染細胞 lysate 中の蛋白質量に差があると結果を正しく判定できないことなどが指摘されていた。また上記の抗原は AAHL の BSL4 施設で培養・不活化されたものであることから、BSL4 施設が稼働していない国々では生産できないという課題があった。このため、BSL2 以下で生産が可能な組換え蛋白質を抗原とした抗体検出系の構築が待たれていた。

そこで、今回得られたバキュロウイルス発現 NiV-N を用いて、新たに IgG および IgM 検出 ELISA を構築し、サル経過血清からの NiV-N 特異抗体の検出に利用した。陰性対照抗原には Delta-P 発現バキュロウイルス感染 Tn5 細胞を、NiV-N 発現細胞 lysate と同様に処理して得られた蛋白質液を用いた。IgG 検出時と IgM 検出時で 2 次抗体を使い分けた (HRP 標識ヤギ抗ヒト IgG または抗ヒト IgM 抗体) ほかは、基本的なプロトコールは同様にした。IgG 検出 ELISA では、サル No.1 では 1:100 ~ 1:6,400 希釈で、サル No.2 では 1:100 ~ 1:1,600 希釈で、Day15 までに抗体の上昇が確認された。サル No.1 のほうが No.2 に比べて抗体価が高いという結果は、上述の NiV 感染 Vero 細胞 / 非感染 Vero 細胞 lysate を抗原に用いた IgG 検出 ELISA と同様であったが、感度は NiV-N 抗原を用いた本法のほうがはるかに高

かったことから、今後、迅速な IgG 検出系として有望であると期待できる。

IgM 検出 ELISA では、サル No.1 血清の 1:100 希釈で Day11, 15 において OD 値が上昇していたが、No.2 では OD 値の上昇が確認できなかった。上記の IgG 検出 ELISA の結果から、サル No.1 のほうが NiV-N 特異抗体価が高いことが予想されていたことから、本 IgM ELISA の結果も整合性がとれているとはいえる。しかし一般的に、抗原を直接プレートにコートするよりは、抗ヒト IgM 抗体を用いた capture ELISA 形式のほうが感度・特異性が上がると考えられていることから、将来的には IgM capture ELISA 形式を採用することにより、サル No.2 においても IgM が検出できる可能性は十分にあると考えられた。

さらに、サル経過血清中の IgM については、IFA でも検出を試みた。IFA は NiV-N を transient で発現させた HeLa W229 細胞をアセトンで固定したものを、抗原として利用した。今回は、transfection の 5 日後の細胞を用いた。一般的にパラミクソウイルスの N 蛋白質を哺乳細胞で発現させた場合、細胞質に蛍光性の顆粒として出現することが知られており、本 NiV-N 導入細胞にサル No.1/No.2 の Day 15 血清を反応させた場合も、同様の蛍光性顆粒が認められた。これらは非特異蛍光とは区別がしやすく、容易に診断できることから、地方研等でも利用価値が高いと考えられる。今回は、transfection 5 日後の細胞を IFA に用いた。通常、transient 発現系において蛋白質の発現が最大となるのは、transfection の 2-3 日後であることから、必ずしも最善の条件ではなかったが、Day 15 血清染色ウェルでは比較的容易に蛍光性顆粒を観察することができた。今回用いている発現ベクター pKS336 は、プラスタサイジン抵抗性遺伝子を有することから、プラスタサイジン存在下で 1 週間以上培養することで、NiV-N 発現を選択的に得ることが可能である。将来的には NiV-N 発現細胞を選択的



に増殖させたあとで、IFA 用抗原として調製することで、より質の高い IgM または IgG 検出資材となることが期待できる。

本課題では、バキュロウイルス発現 NiV-N 蛋白質をカニクイザルに免疫して得られた経過血清から、既存・新規の複数の検出系で NiV-N 特異的 IgG, IgM を検出した。新規の検査系として NiV-N 抗原固相化プレートを用いた IgG 検出および IgM 検出 ELISA と、NiV-N 発現 HeLa W229 細胞を利用した IFA を構築した。IgM 検出系については、今回複数の方法で IgM 抗体が検出できたことから、当初の目的通り、得られた血清(とくにサル No.1, Day 15 血清)は陽性対照血清として利用できることが確認された。今後はこれらを活用し、IgM capture ELISA を含めた、より高感度・高特異性の抗体検出系の構築を進める。

なし

2 口頭発表

なし

#### E. 結論

バキュロウイルスベクターを用いて発現させた NiV-N 蛋白質を精製し、これを免疫原として利用し、サルの免疫を行った。Day 0, 5, 7, 9, 11, 13, 15 に得られた経過血清から、既存・新規の複数の検出系で NiV-N 特異的 IgG, IgM の上昇を確認した。新規の検査系として NiV-N 抗原固相化プレートを用いた IgG 検出および IgM 検出 ELISA と、NiV-N 発現 HeLa W229 細胞を利用した IFA を構築した。得られた IgM 陽性サル血清は、現況では確保がきわめて困難な NiV-IgM 陽性ヒト血清のかわりに、各種 IgM 検出系の陽性対照となることから、より高感度・高特異性の抗体検出系の構築に活用できる。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

1 論文発表



図 1

### バキュロウイルスによるNiV-Nの発現 およびNi-NTAビーズを用いた精製

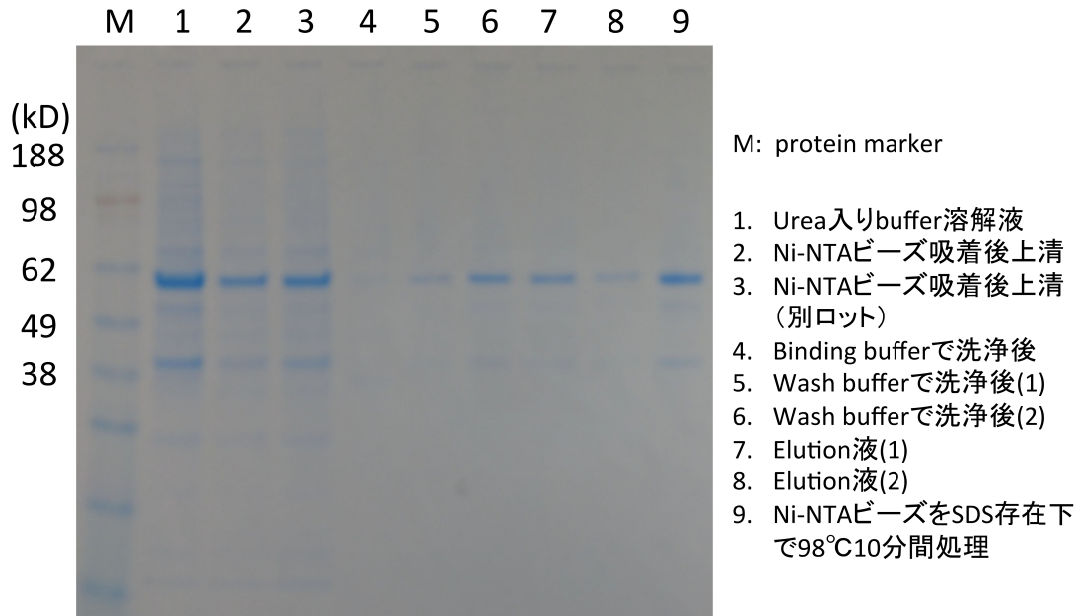


図 2

### NiV感染Vero細胞 / 非感染Vero細胞lysateを 抗原に用いたIgG検出ELISA

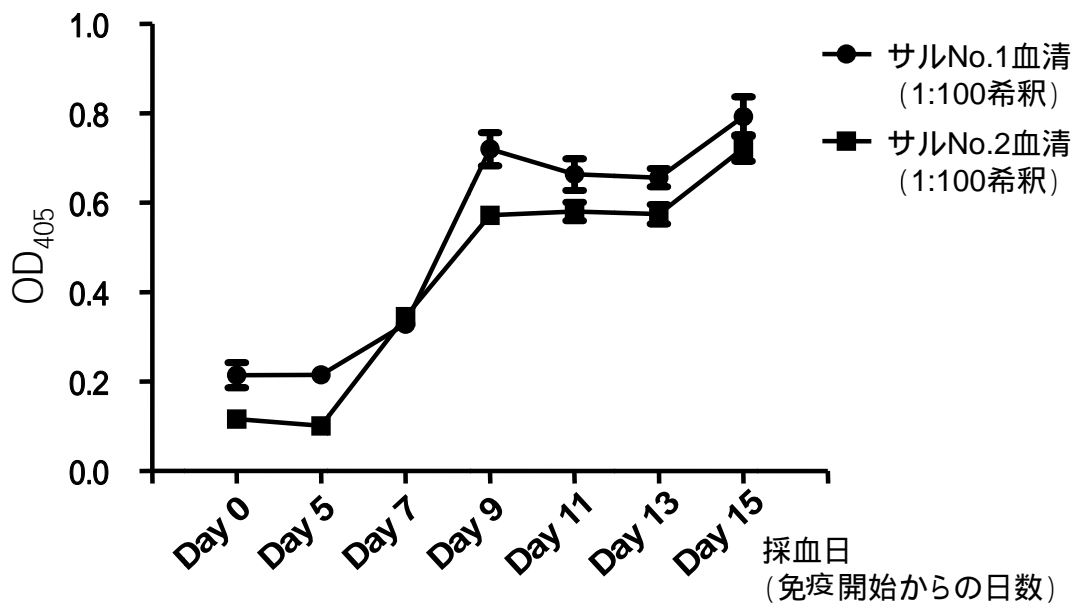


図3 バキュロウイルス発現NiV-Nを抗原に用いたIgG検出ELISA

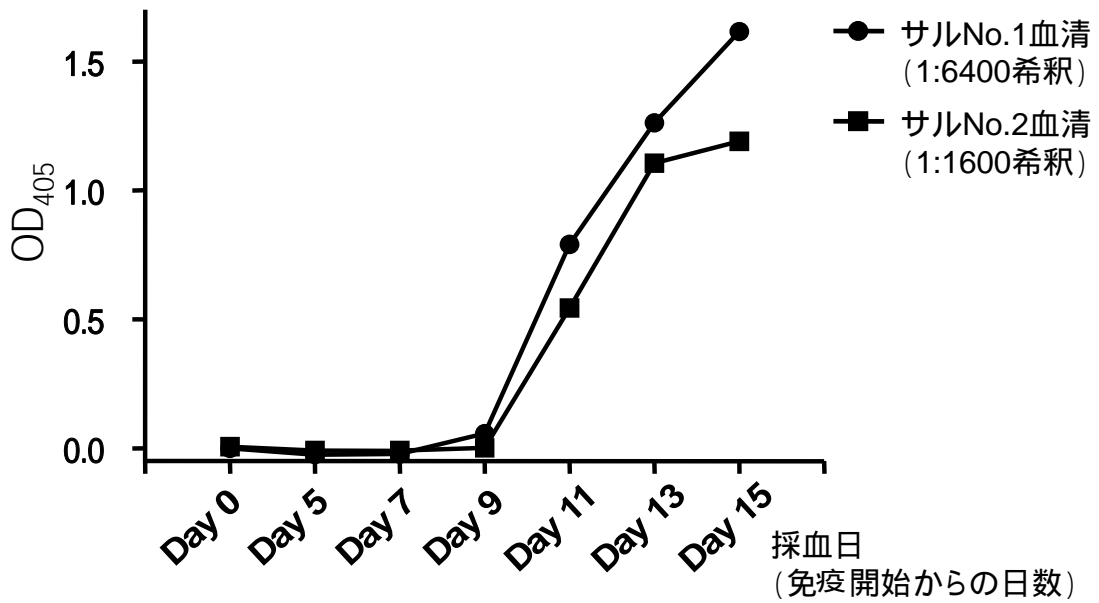


図4 バキュロウイルス発現NiV-Nを抗原に用いたIgM検出ELISA

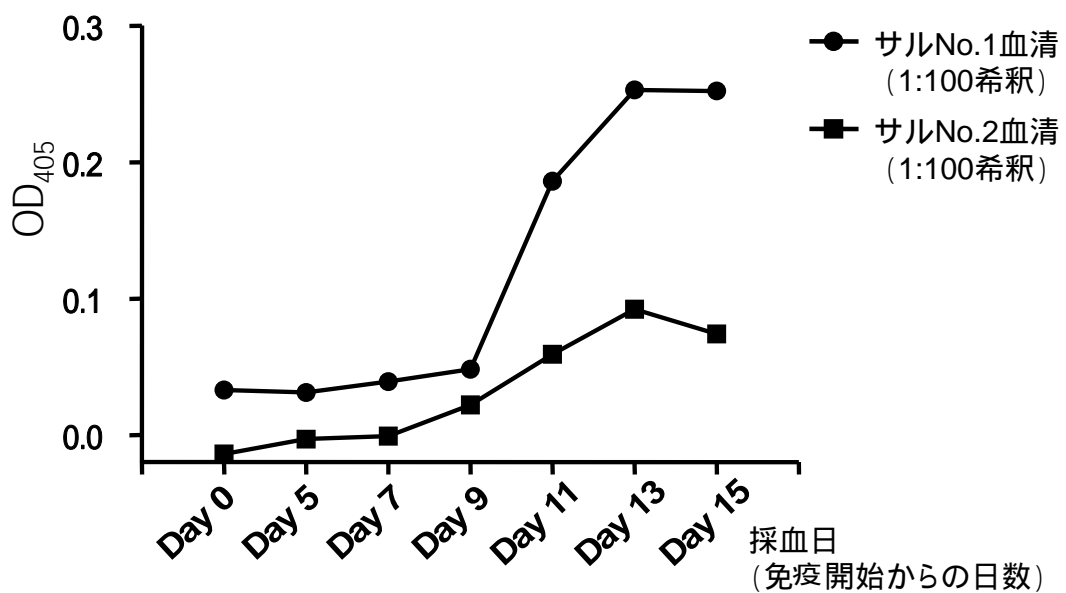
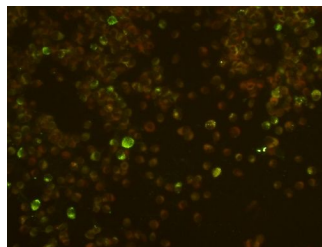
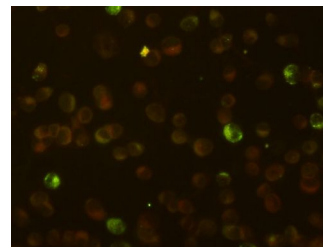


図 5

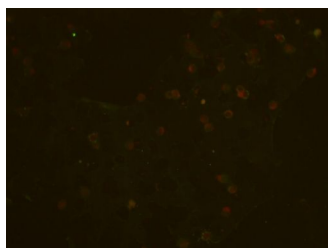
NiV-N発現 HeLa W229細胞  
を用いた間接蛍光抗体法  
(IFA)



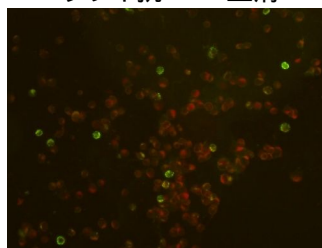
ウサギ抗NiV-N血清



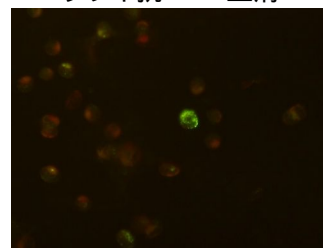
ウサギ抗NiV-N血清



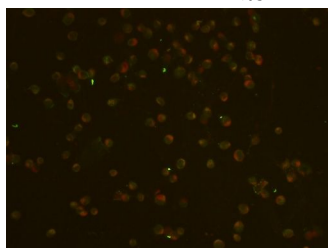
サルNo.1 プレ血清



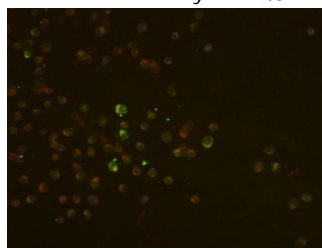
サルNo.1 Day15血清



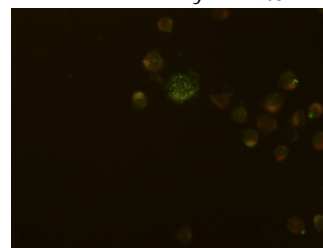
サルNo.1 Day15血清



サルNo.2 プレ血清



サルNo.2 Day15血清



サルNo.2 Day15血清

倍率 200倍

倍率 400倍

## コウモリレオウイルスのゲノム情報と診断

担当責任者： 下島昌幸 国立感染症研究所 ウイルス第一部第一室長

研究要旨：近年、コウモリが持つレオウイルス Pteropine orthoreovirus (PRV) によるヒトの呼吸器疾患 (PRV 感染症) がマレーシアおよびインドネシアにおいて少数ながら認められ、うち 1 例は日本国内への輸入例となっている。ヒトからヒトへの感染事例も知られており、国内で流行を起こすことも懸念される。PRV 感染症の診断法はなく、本研究では PRV の遺伝子検査法と抗体検査法を確立することを目的とした。遺伝子検査法では輸入例由来のウイルスも含め遺伝子情報を比較し、保存性の高い S2 segment 内にプライマーを設計した。抗体検査法では、複数ある PRV 株の配列を比較し、保存性が高いことが判明した major outer capsid (MOC) 蛋白質を抗原に用いることとした。組換え MOC 蛋白質をバキュロウイルス発現系で大量発現させた。発現 MOC 蛋白質を抗原とした ELISA 系の構築を行なったところ、日本への輸入例の回復期血清が良好な反応性を示す抗体検出系を構築できた。これら遺伝子検出系・抗体検出系は PRV の診断と疫学的知見の蓄積に役立ち、流行地の適切な対処を可能とすると考えられる。

### A. 研究目的：

コウモリ由来レオウイルス Pteropine Orthoreovirus (PRV) は 1960 年代にオーストラリアの食果コウモリから初めて分離された。培養細胞において巨細胞を形成するなど哺乳類レオウイルス Mammalian Orthoreovirus (主に小児に風邪や下痢を起こす) とは異なる性状を持ち、中和の交差反応も示さなかった。マレーシアや中国の食果コウモリからも PRV は見出されている。

今世紀に入り、PRV による成人の呼吸器疾患が相次いで報告された。いずれもマレーシア在住もしくはインドネシアのバリ

島への訪問歴があり、多くでコウモリとの接点があるため、マレーシアやインドネシアのコウモリを宿主とする本ウイルスがヒトに感染し呼吸器疾患を引き起こしたと考えられる。家族が遅れて類似の症状を示していることから、ヒトからヒトへ伝播しうるウイルスである。2007 年にはバリ島を訪問した日本人成人男性が発熱・咳・咽頭痛を示し帰国後入院し、PRV の感染であることが判明した。このような例は他にインドネシアを訪問し香港で発症した 3 例があり、PRV は輸入感染症をも起こすウイルスと言える。マレーシアでは患者発生地域で抗体調査が行われ、住民の約 13%

が抗体陽性であり、認識はされていないものの PRV が蔓延しているものと考えられる。

今のところ発生件数・患者数ともに多くはないが、ヒト ヒト感染を起こす呼吸器疾患であることから、PRV による大きな流行が将来発生することが懸念される。現在 PRV (感染症) の診断法はないため、PRV の遺伝子検出法と抗体検出法の構築を行ない、PRV 感染症の発生時に迅速かつ適切に対処できる体制をとれるようにすることを目的とした。

#### B. 研究方法：

##### 遺伝子検出法：

PRV の S2 segment 全長として Genbank に登録されている AF059718 (Nelson Bay virus)、AY357731 (Pulau reovirus)、EU448335 (Kampar orthoreovirus) 及び AB521794 (Miyazaki-Bali/2007) の配列情報を比較した。

##### 抗体検出法：

Major outer capsid protein (MOC) は PRV の株間で保存性が高く、ヒト由来株間で 96% 以上の一致を示す (図 1)。MOC にポリ His タグを付加した cDNA をバキュロウイルス発現系のトランスファーベクターに組み込み、組換えバキュロウイルスを作製した。組換えバキュロウイルス感染 Tn5 細胞を 1% NP40 バッファーで溶解し、不溶画分を 4M Urea バッファーでの洗浄の後、8M Urea バッファーでの洗浄の際の上清を精製 MOC とした。精製 MOC を Titer Max Gold をアジュバントとしてウサギに皮下接種し、ウサギ抗 MOC 血清を得た。

精製 MOC を PBS で希釈し、ELISA 用プレートを一晚 4 でコーティングした。あるいは Tn5 細胞の溶解液を PBS で希釈

し、ELISA 用プレートのコーティングに用いた。洗浄後 5% スキムミルクでブロッキングし、ヒト血清あるいはウサギ血清 (100 倍、400 倍、1600 倍、6400 倍希釈したもの) もしくはマウス抗 His タグ抗体 1 $\mu$ g/ml を反応させた。洗浄後各種抗 IgG-HRP 二次抗体を反応させた。洗浄後、ABTS で発色させ、吸光度 OD を測定した。ヒト血清には PRV 感染症の日本輸入例の急性期および回復期の血清、健康人の血清を非働化したものを用いた。ウサギ血清には上述の MOC 血清あるいは免疫前の血清を非働化して用いた。

#### C. 研究結果：

##### 遺伝子検出法：

PRV の S2 segment 全長として Genbank に登録されている AF059718 (Nelson Bay virus)、AY357731 (Pulau reovirus)、EU448335 (Kampar orthoreovirus) 及び AB521794 (Miyazaki-Bali/2007) の配列情報をもとに保存性の高い領域から検出プライマー Nelson Bay Reo-S2-35-Fw (5-CCA CGA TGG CGC GTG CCG TGT TCG A-3) Nelson Bay Reo-S2-339-Rv (5-ACG TAG GGA GGC GCA CGA GGT GGA-3) を作製した。

##### 抗体検出法：

バキュロウイルス発現系において MOC 蛋白質は不溶性を示し、His タグを標的とした精製法は不適切であった。Urea を用いたところ 8M Urea バッファーには溶解性を示したため、4M Urea バッファーで不溶画分を洗浄し、8M Urea バッファーでの液体部分を回収した。SDS ゲル電気泳動ののち Coomassie 染色したところ単一のバンドが検出され、このバンドは WB で His タグ配列を有することが確認された (図 2)。つまり高濃度の Urea

を用いての精製が可能であることが分かった。

精製 MOC 蛋白質を PBS で階段希釈し、MaxiSorp plate のコーティングを行った。ブロッキングには 5% スキムミルクを用いた。一次抗体としてマウス抗 His タグ抗体を用いたところ、コーティングに用いる MOC 蛋白質の量は 100ng/ml で十分であることが判明した。このコーティング量のもと、次に一次抗体としてウサギ抗 MOC 血清を用いたところ、良好な反応性（高い OD 値）が認められた。一方で免疫前の血清では OD 値は低いものであり、MOC 蛋白質の検出を反映しているものと考えられた。Tn5 細胞の溶解液でも同様の実験を行ったところ良好な反応性が見られ、一方コントロールのパキウロウイルス感染 Tn5 細胞溶解液の場合の反応性は明らかに低いものであった（図 3）。

Tn5 細胞溶解液を抗原とした ELISA で、一次抗体として PRV 感染症の日本輸入例の急性期および回復期の血清を用いたところ、急性期での反応性はほとんど認められなかったが、回復期血清では良好な反応性を示した。健常人血清の中では反応性を示すものは認められなかった（図 4）。

#### D. 考察：

遺伝子検出系では、高度に保存され遺伝子検出に適したプライマー領域を見つけ出すことが出来た。培養したウイルスや患者検体からの検出の可否や非特異の有無、感度の如何等の検討が必要である。抗体検出系では当初精製抗原で ELISA 系の構築を始めたが、精製前の細胞溶解液でも低いバックグラウンドと十分高い反応性が認められた。準備の簡素化を考え

ると細胞溶解液で抗体検出は十分行えると言える。

#### E. 結論

コウモリレオウイルス PRV の遺伝子検出用のプライマー設計を行った。また PRV に対する抗体検出系を確立した。

#### F. 健康危機情報

コウモリレオウイルスによる急性呼吸器感染症は、2006 年 2 回（マレーシア、いずれも家族内感染あり）、2007 年 2 回（バリ島からの帰国者、香港と日本）、2009 年 1 回（バリ島からの帰国者、香港）、2010 年 2 回（バリ島からの帰国者、香港とマレーシア、家族内感染あり）と東南アジアでの感染が毎年発生している。

#### G. 研究発表

無し

#### H. 知的所有権の取得状況

無し



図1: PRVヒト由来株のMOCおよびCAPのアミノ酸配列比較

ヒト由来 Pteropine Orthoreovirus		右上: Major outer capsidの株間の一致(アミノ酸%)						
		Miyazaki	HK46886	HK50842	Kampar	Sikamat	Melaka	HK23629
左下: Cell attachment proteinの 株間の一致 (アミノ酸%)	Miyazaki	-	99.4	99.2	96.7	98.3	98.1	99.2
	HK46886	100.0	-	99.2	96.9	98.3	98.0	99.2
	HK50842	99.4	99.4	-	97.2	98.6	98.3	98.9
	Kampar	93.7	93.5	92.9	-	96.7	97.5	96.6
	Sikamat	57.1	56.2	56.5	55.6	-	98.6	98.0
	Melaka	57.3	56.4	56.7	56.1	96.3	-	97.8
	HK23629	56.2	56.2	55.6	56.5	67.3	66.4	-

図2: PRV MOC蛋白質の発現と精製

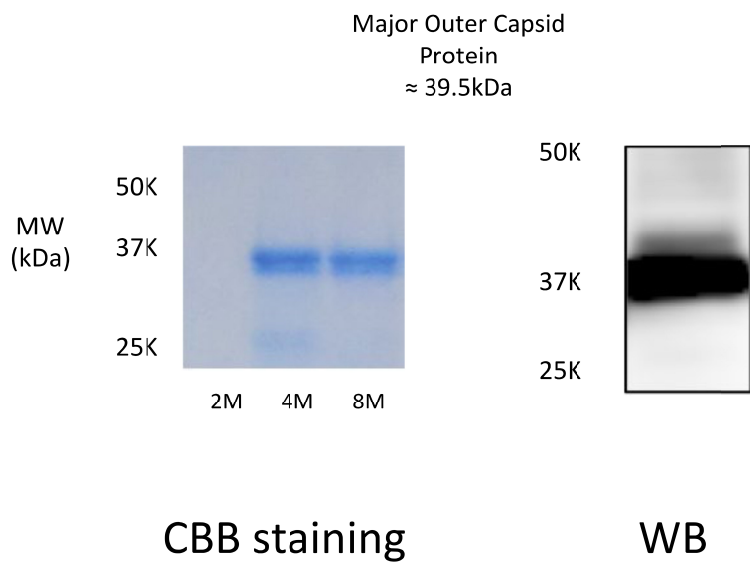


図3: バキュロウイルス感染細胞への免疫ウサギ血清の反応性

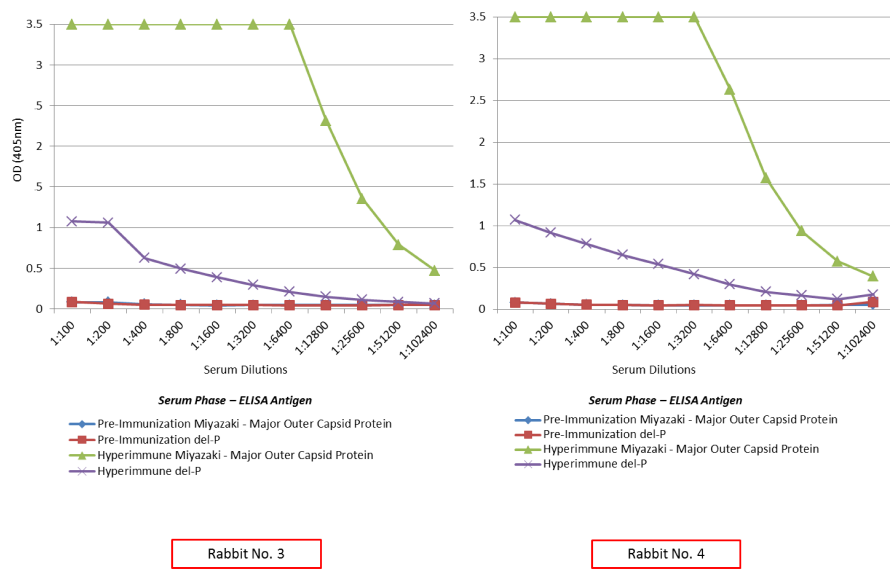
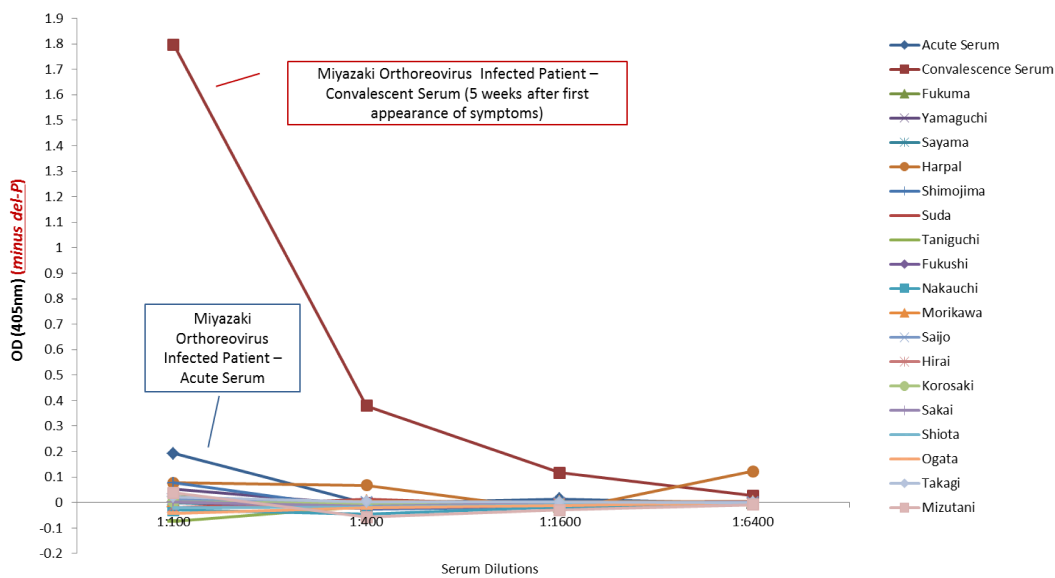


図4: バキュロウイルス感染細胞へのヒト血清の反応性





## イシククル（Issyk-kul）熱の診断法と疫学

担当責任者： 福士秀悦 国立感染症研究所 ウイルス第一部主任研究官

研究協力者： 須田遊人、下島昌幸 国立感染症研究所 ウイルス第一部

研究要旨：イシククル熱は高熱、頭痛、筋肉痛を主徴とする、ダニあるいは蚊媒介性のイシククルウイルスによる感染症で、中央アジア（タジキスタンなど）で患者が報告されている。2011年、国内で採取されたコウモリマルヒメダニからイシククルウイルスと近縁なウイルスがダニから分離され、国内にも類似のウイルスが常在する可能性が示唆された。本研究では、国内で分離されたイシククル様ウイルスの増殖性と遺伝的特徴を明らかにした。また、国内のダニおよびイシククル様ウイルスの分子疫学を行う手法を確立するため、リアルタイム PCR による遺伝子検出法を確立した。

### A. 研究目的：

イシククル熱はダニあるいは蚊媒介性のイシククルウイルスによる感染症で、中央アジア（タジキスタンなど）で患者が報告されている。1982 から 1985 年にかけてコウモリの捕獲などの野外活動で 34 人がイシククル熱を発症している。主な症状は、熱（39-41℃、3-8 日間）、頭痛(80%)、めまい(50%)、せき・筋肉痛(30%)、吐き気・嘔吐（25%）、その他、発疹、腹痛、眼痛などである。死亡例は確認されていない。1970 年以降、イシククルウイルス及び近縁のウイルスがキルギスタン、タジキスタン、マレーシアなどでコウモリ、野鳥、ダニ、蚊から分離されている。また、ヒトの血清学調査からイラン、アフガニスタン、インド、パキスタンなどにもウイルスが存在すると考えられている。我が国でも 2011 年にコウモリマルヒメダニからイシククルウ

イルスに近縁なウイルス（イシククル様ウイルス）が分離された。イシククルウイルスはクリミア・コンゴ出血熱ウイルスと同じブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される。このため、イシククルウイルスおよび近縁なウイルスがヒトに重篤な感染症を起こす可能性も否定できない。今回分離されたウイルスがヒトに感染性を示すのか、また、我が国にどの程度分布しているのか明らかにする必要がある。本研究では、国内で分離されたイシククル様ウイルスの増殖性と遺伝的特徴を明らかにした。また、国内のダニおよびイシククル様ウイルスの分子疫学を行う手法を確立するため、リアルタイム PCR による遺伝子検出法を確立した。

### B. 研究方法：

1) 我が国で分離されたイシククル様ウ

ウイルスを各種培養細胞に接種し、それぞれの細胞における増殖性を比較した。

- 2) ウイルス培養上清からイシククル様ウイルスを精製し、次世代シーケンサーによりウイルス遺伝子を解析した。
- 3) イシククル様ウイルスの遺伝子配列をもとに検出用プライマー、プローブを作製し、リアルタイム PCR 法を構築した。

#### C. 研究結果：

- 1) イシククル様ウイルスを各種培養細胞に接種し、24, 48, 72 時間後の培養上清中のウイルス量を算出し、それぞれの培養細胞における増殖性を比較した(図1)。Vero、Huh7、SW13 細胞等で効率のよいウイルス増殖がみられた。
- 2) ウイルス培養上清からイシククル様ウイルスを精製し、次世代シーケンサーにより M セグメントの一部を除くほぼ全領域の塩基配列を決定した。イシククル様ウイルスはナイロウイルス属のなかでもイシククルウイルスに近縁であることが明らかになった(図2)。
- 3) イシククル様ウイルスの遺伝子配列をもとに S<sub>1</sub>M および L 遺伝子検出用プライマー、プローブを作製し(図3)、リアルタイム PCR 法を構築した。また、それぞれのターゲット領域を含む部分を PCR で増幅し、スタンダード DNA とした。One-step RT-PCR および、Two step PCR で各スタンダード DNA を 1-10 コピー以上の感度で検出可能であった。本方法により、イシククル様ウイルス培養上清から抽出した RNA およびこれを用いて逆転写反応で作

製した cDNA を検出可能であった(図4および5)。

#### D. 考察：

2011 年に我が国で、コウモリマルヒメダニからイシククル様ウイルスが分離された。イシククルウイルスはこれまで、ヒトに熱性の疾患を引き起こすことが知られている。イシククル様ウイルスあるいは、これらに近縁なウイルスが日本に常在することが示唆されるため、これらのウイルスの性状解析および、分子疫学、血清疫学的手法を確立することが必要である。本研究では、我が国で分離されたイシククル様ウイルスの増殖性を、各種培養細胞を用いて明らかにした。ヒトおよびサル由来培養細胞でウイルスが増殖可能であったことから、このウイルスはヒトに感染性をもつことが示唆される。

イシククル様ウイルスが分離されたコウモリマルヒメダニは国内では、北海道から九州、沖縄まで分布することが知られており、人家付近に生息するコウモリ類に寄生する。マルヒメダニによるヒト刺症例も報告されていることから、このダニによりイシククル様ウイルス(あるいはその他の病原体)が媒介される可能性もある。本研究で開発したリアルタイム PCR による遺伝子検出法により、イシククル様ウイルスがどの程度、広範囲に存在するのか明らかにする予定である。また、今後、血清疫学を進めていくため、イシククル様ウイルスの抗原を用いた ELISA を構築する予定である。

#### E. 結論

- 1) 本研究で、イシククル様ウイルスの各種培養細胞での増殖性と遺伝的特徴を明らかにした。

- 2) イシククル様ウイルスの遺伝子配列をもとに検出用プライマー、プローブを作製し、リアルタイム PCR 法を構築した。
- 3) 今後、イシククル様ウイルスの分子疫学、血清疫学を進めていく必要がある。

#### F. 健康危機情報 特になし

#### 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ブ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. 知的所有権の取得状況

無し

図1) イシククル様ウイルスの各種培養細胞における増殖性

細胞	由来	ウイルス増殖
Vero	アフリカミドリザル腎	+ + +
Vero E6	アフリカミドリザル腎	+ + +
Huh7	ヒト肝細胞	+ + +
SW13	ヒト副腎皮質	+ + +
U2OS	ヒト骨肉腫	+ +
TB1-Lu	コウモリ肺	+ +
Jurkat	ヒトT細胞	+
Daudi	ヒトB細胞	-
C6/36	ヒトスジシマカ	+ / -

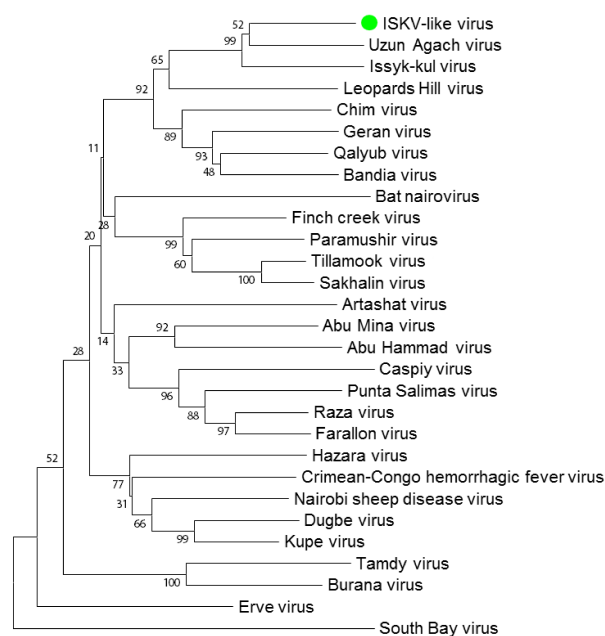


図2) イシククルウイルス(Issyk-kul virus)、イシククル様ウイルス (ISKV-like virus)および、近縁ウイルス(プニヤウイルス科ナイロウイルス属)の分子系統樹(L遺伝子の部分配列より作製)



### 3) Primer and Probe

like-S probe	FAM-CGGAGAGATGCGTATGGATT-TAMRA
like-S forward	CCAGTGTGCTCAACTGGAGA
like-S reverse	CCTCACCCATCCTACATGCT
like-M probe	FAM-CACCCAGATGTACAGTGCTGA-TAMRA
like-M forward	TGAACCAAAGACGAGCACAG
like-M reverse	CAGGACCCTTCAGACCATGT
like-L probe	FAM-TGTGCTTAATGGCTGTGGAG-TAMRA
like-L forward	CAGGACAAGATGCTGACGAA
like-L reverse	GACTTTGGGGTGTGGTGCT

図4) One Step RT-PCRによるイシクル様ウイルス遺伝子の検出

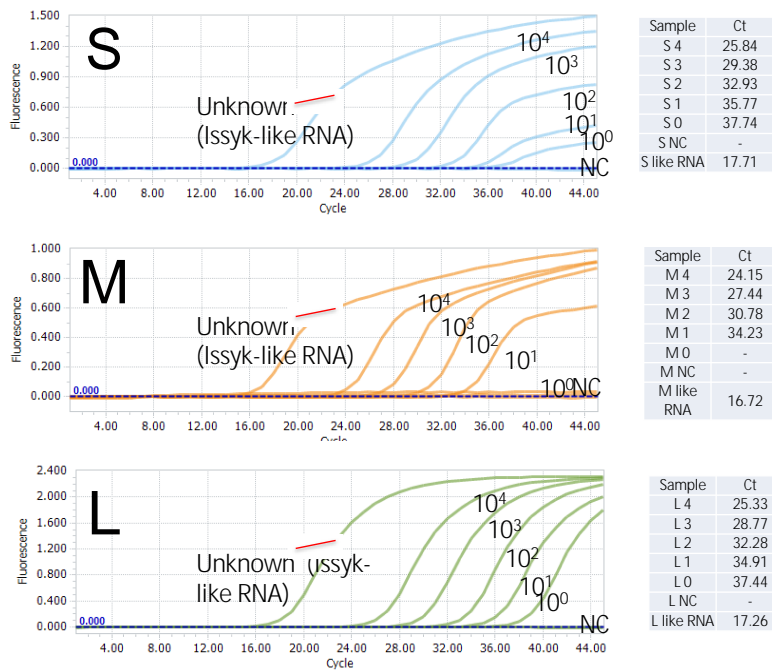
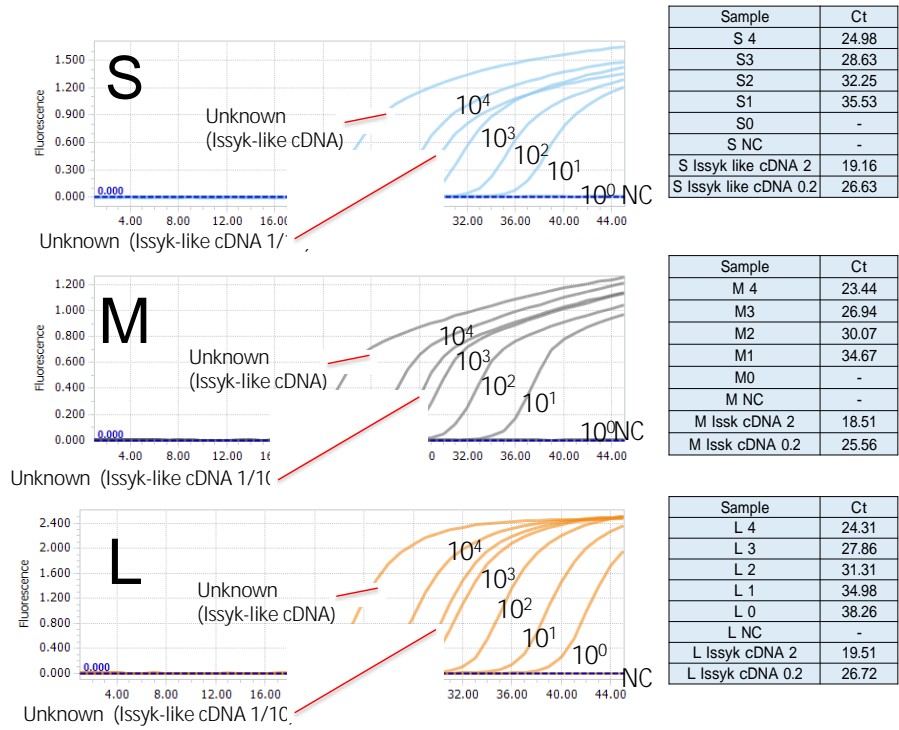


図5) Two Step PCRによるイシクル様ウイルス遺伝子の検出





## イシククル（Issyk-kul）熱の診断法と疫学

担当責任者： 福士秀悦 国立感染症研究所 ウイルス第一部主任研究官

研究協力者： 須田遊人、下島昌幸 国立感染症研究所 ウイルス第一部

研究要旨：イシククル熱は高熱、頭痛、筋肉痛を主徴とする、ダニあるいは蚊媒介性のイシククルウイルスによる感染症で、中央アジア（タジキスタンなど）で患者が報告されている。2011年、国内で採取されたコウモリマルヒメダニからイシククルウイルスと近縁なウイルスがダニから分離され、国内にも類似のウイルスが常在する可能性が示唆された。本研究では、国内で分離されたイシククル様ウイルスの増殖性と遺伝的特徴を明らかにした。また、国内のダニおよびイシククル様ウイルスの分子疫学を行う手法を確立するため、リアルタイム PCR による遺伝子検出法を確立した。

### A. 研究目的：

イシククル熱はダニあるいは蚊媒介性のイシククルウイルスによる感染症で、中央アジア（タジキスタンなど）で患者が報告されている。1982 から 1985 年にかけてコウモリの捕獲などの野外活動で 34 人がイシククル熱を発症している。主な症状は、熱（39-41℃、3-8 日間）、頭痛（80%）、めまい（50%）、せき・筋肉痛（30%）、吐き気・嘔吐（25%）、その他、発疹、腹痛、眼痛などである。死亡例は確認されていない。1970 年以降、イシククルウイルス及び近縁のウイルスがキルギスタン、タジキスタン、マレーシアなどでコウモリ、野鳥、ダニ、蚊から分離されている。また、ヒトの血清学調査からイラン、アフガニスタン、インド、パキスタンなどにもウイルスが存在すると考えられている。我が国でも 2011 年にコウモリマルヒメダニからイシククルウ

イルスに近縁なウイルス（イシククル様ウイルス）が分離された。イシククルウイルスはクリミア・コンゴ出血熱ウイルスと同じブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される。このため、イシククルウイルスおよび近縁なウイルスがヒトに重篤な感染症を起こす可能性も否定できない。今回分離されたウイルスがヒトに感染性を示すのか、また、我が国にどの程度分布しているのか明らかにする必要がある。本研究では、国内で分離されたイシククル様ウイルスの増殖性と遺伝的特徴を明らかにした。また、国内のダニおよびイシククル様ウイルスの分子疫学を行う手法を確立するため、リアルタイム PCR による遺伝子検出法を確立した。

### B. 研究方法：

1) 我が国で分離されたイシククル様ウ

ウイルスを各種培養細胞に接種し、それぞれの細胞における増殖性を比較した。

- 2) ウイルス培養上清からイシククル様ウイルスを精製し、次世代シーケンサーによりウイルス遺伝子を解析した。
- 3) イシククル様ウイルスの遺伝子配列をもとに検出用プライマー、プローブを作製し、リアルタイム PCR 法を構築した。

#### C. 研究結果：

- 1) イシククル様ウイルスを各種培養細胞に接種し、24, 48, 72 時間後の培養上清中のウイルス量を算出し、それぞれの培養細胞における増殖性を比較した(図1)。Vero、Huh7、SW13 細胞等で効率のよいウイルス増殖がみられた。
- 2) ウイルス培養上清からイシククル様ウイルスを精製し、次世代シーケンサーにより M セグメントの一部を除くほぼ全領域の塩基配列を決定した。イシククル様ウイルスはナイロウイルス属のなかでもイシククルウイルスに近縁であることが明らかになった(図2)。
- 3) イシククル様ウイルスの遺伝子配列をもとに S<sub>1</sub>M および L 遺伝子検出用プライマー、プローブを作製し(図3)、リアルタイム PCR 法を構築した。また、それぞれのターゲット領域を含む部分を PCR で増幅し、スタンダード DNA とした。One-step RT-PCR および、Two step PCR で各スタンダード DNA を 1-10 コピー以上の感度で検出可能であった。本方法により、イシククル様ウイルス培養上清から抽出した RNA およびこれを用いて逆転写反応で作

製した cDNA を検出可能であった(図4および5)。

#### D. 考察：

2011 年に我が国で、コウモリマルヒメダニからイシククル様ウイルスが分離された。イシククルウイルスはこれまで、ヒトに熱性の疾患を引き起こすことが知られている。イシククル様ウイルスあるいは、これらに近縁なウイルスが日本に常在することが示唆されるため、これらのウイルスの性状解析および、分子疫学、血清疫学的手法を確立することが必要である。本研究では、我が国で分離されたイシククル様ウイルスの増殖性を、各種培養細胞を用いて明らかにした。ヒトおよびサル由来培養細胞でウイルスが増殖可能であったことから、このウイルスはヒトに感染性をもつことが示唆される。

イシククル様ウイルスが分離されたコウモリマルヒメダニは国内では、北海道から九州、沖縄まで分布することが知られており、人家付近に生息するコウモリ類に寄生する。マルヒメダニによるヒト刺症例も報告されていることから、このダニによりイシククル様ウイルス(あるいはその他の病原体)が媒介される可能性もある。本研究で開発したリアルタイム PCR による遺伝子検出法により、イシククル様ウイルスがどの程度、広範囲に存在するのか明らかにする予定である。また、今後、血清疫学を進めていくため、イシククル様ウイルスの抗原を用いた ELISA を構築する予定である。

#### E. 結論

- 1) 本研究で、イシククル様ウイルスの各種培養細胞での増殖性と遺伝的特徴を明らかにした。

- 2) イシククル様ウイルスの遺伝子配列をもとに検出用プライマー、プローブを作製し、リアルタイム PCR 法を構築した。
- 3) 今後、イシククル様ウイルスの分子疫学、血清疫学を進めていく必要がある。

#### F. 健康危機情報 特になし

#### 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ブ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. 知的所有権の取得状況

無し

図1) イシククル様ウイルスの各種培養細胞における増殖性

細胞	由来	ウイルス増殖
Vero	アフリカミドリザル腎	+ + +
Vero E6	アフリカミドリザル腎	+ + +
Huh7	ヒト肝細胞	+ + +
SW13	ヒト副腎皮質	+ + +
U2OS	ヒト骨肉腫	+ +
TB1-Lu	コウモリ肺	+ +
Jurkat	ヒトT細胞	+
Daudi	ヒトB細胞	-
C6/36	ヒトスジシマカ	+ / -

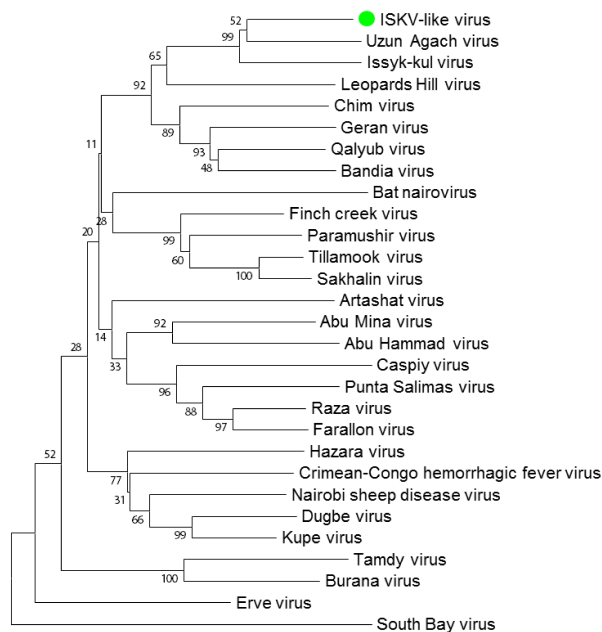


図2) イシククルウイルス(Issyk-kul virus)、イシククル様ウイルス (ISKV-like virus)および、近縁ウイルス(ブニヤウイルス科ナイロウイルス属)の分子系統樹(L遺伝子の部分配列より作製)



### 図3) Primer and Probe

like-S probe	FAM-CGGAGAGATGCGTATGGATT-TAMRA
like-S forward	CCAGTGTGCTCAACTGGAGA
like-S reverse	CCTCACCCATCCTACATGCT
like-M probe	FAM-CACCCAGATGTACAGTGCTGA-TAMRA
like-M forward	TGAACCAAAGACGAGCACAG
like-M reverse	CAGGACCCTTCAGACCATGT
like-L probe	FAM-TGTGCTTAATGGCTGTGGAG-TAMRA
like-L forward	CAGGACAAGATGCTGACGAA
like-L reverse	GACTTTGGGGTGTGGTGCT

図4) One Step RT-PCRによるイシクル様ウイルス遺伝子の検出

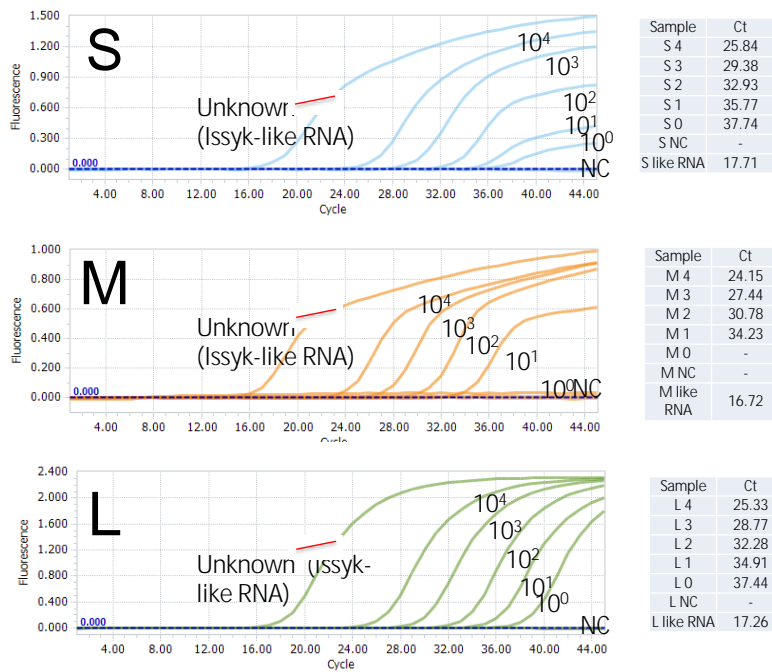
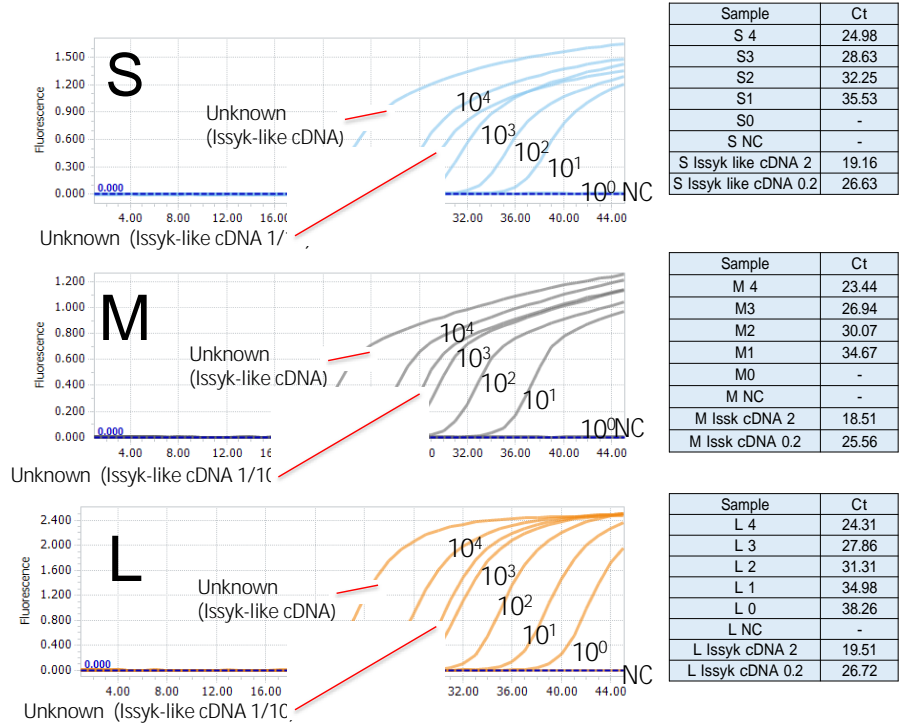


図5) Two Step PCRによるイシクル様ウイルス遺伝子の検出





### 別紙 3

厚生労働科学研究委託費（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）

委託業務成果報告（業務項目）

「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究

（H26-新興実用化-一般-019）

## 新規ブルセラ属菌の遺伝子情報と診断法

担当責任者： 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： 木村昌伸、奥谷晶子、鈴木道雄、朴ウンシル 国立感染症研究所獣医科学部

吉河智城 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨: 21 世紀に入り新種のブルセラ属菌の発見・報告が相次いでいる。そのような中、2012 年には、無尾類より新たなブルセラ属菌が分離され、患者より分離された *B. inopinata* と近縁であることが報告された。我々は国内の愛玩用無尾類よりブルセラ属菌の遺伝子検出と菌分離を実施し、イエアメガエル、デニスフロッグからそれぞれ 1 株、計 2 株の新規ブルセラ属菌を分離した。

本研究では、これら新規ブルセラ属菌の全ゲノム解析を行い、旧来のブルセラ属菌と比較し、得られた遺伝子情報に基づき遺伝子診断法、鑑別法を開発することを目的としている。

まず、2 株のカエル由来ブルセラ属菌（A105 株、A141 株）について、次世代シーケンサー-Miseq を用いて各々の全ゲノム情報を得た。得られた Contig について Gene annotation を行い、さらに、*B. melitensis* のゲノム配列を対照として遺伝子地図を作成した。次に、遺伝子タイピングに用いられる 9 座の遺伝子について全遺伝子配列を決定し、他のブルセラ属菌と比較し、ホモロジー解析と系統樹解析を実施した。その他、ブルセラ属菌で保存性の良い 16S rRNA 遺伝子および病原性遺伝子群である *virB* 遺伝子についても解析を行った。Classic species (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. neotomae*)、Marine species (*B. ceti*, *B. pinnipedialis*) と Novel species の *B. microti* は単一のクレードを作ることが明らかとなり、カエル分離株 2 株 (A105、A141) は、*B. microti* 以外の Novel species、*B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2、*B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 と第 2 のクレードを構成していた。さらに、通常の 9 座遺伝子タイピングでは対応できていなかった、主として Novel species のブルセラ属菌間についても、その遺伝子的差異を明らかにした。

PCR を用いた特異的遺伝子検出法を開発するため、9 座の全遺伝子配列について、Classic species 等との一塩基変異部位を複数箇所特定し、センス、アンチセンスとも、その変異部位が 3'末端にくるようなプライマーセットを設計した。設計した数種のプライマーセットのうち 3 セットが特異的増幅を示したが、中でも *glk* 遺伝子を標的としたプライマーセットは非常に特異性、増幅効率が良好であった。カエル由来ブルセラ属菌特異的遺伝子検出法が開発された。

## A . 研究目的

ブルセラ属菌 (*Brucella* spp. ) は、世界中の多くの国と地域で未だ主要な人獣共通感染症であるブルセラ症 ( brucellosis ) の起炎菌である。そのなかで、ヒト患者も多く主要なものとしては、病原性の順に *B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*、*B. canis* の 4 菌種が知られている。

ブルセラ属菌は、19 世紀のクリミア戦争時代に英国軍兵士の間で流行したマルタ熱 ( 波状熱 ) の原因菌として、1887 年、Sir David Bruce により *B. melitensis* ( 自然宿主 : ヤギ、ヒツジ ) が最初に分離され、次いで、*B. suis* ( ブタ、1914 年 )、*B. abortus* ( ウシ、水牛、1918 年 )、*B. ovis* ( ヒツジ、1953 年 )、*B. neotomae* ( げっし目、1957 年 )、*B. canis* ( イヌ、1968 年 ) が発見・報告されてきた。その後、新たな菌の報告はしばらく無かったが、1997 年に海棲哺乳類から *B. maris* ( 現在は、*B. ceti* ( クジラ、イルカ ) および *B. pinnipedialis* ( アザラシ ) ) が報告されると、21 世紀に入り、*B. microti* ( アカギツネ、common voles、土壌、2008 年 )、*B. inopinata* ( BO1 株、患者由来、2010 年 )、*B. inopinata*-lik ( BO2 株、患者由来、2010 年 )、その他、未分類ではあるが *B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 ( いずれもげっし目 )、*B. sp.* NVSL 07-0026 ( バブーン )、など新たな発見が続いている ( 表 1 )。

そのような中、2012 年には、独、米の異なるグループにより無尾類 ( カエル ) に由来する新たなブルセラ属菌が相次いで分離された。遺伝子解析の結果、これらはブルセラ症患者から分離され、未だ自然宿主が不明である *B. inopinata* BO1 および BO2 に最も近縁とされた。我が国にも種々の外

国産無尾類が輸入されており、また、国内ブリーダーによる外来種の生産個体と合わせて、愛玩用として流通・販売されている。そこで、我々は外国産および在来種の無尾類より、ブルセラ属菌の遺伝子検出と菌分離を試み、輸入外国産カエル 2 種から新規ブルセラ属菌 2 株 ( A105、A141 株 ) を分離した。

本研究では、これら新規ブルセラ属菌の全ゲノム解析を行い、旧来のブルセラ属菌と比較すること、また、得られた遺伝子情報をもとに、遺伝子診断・鑑別法を開発することを目的とした。

## B . 研究方法

### 1 . 全ゲノムシーケンス :

国内 2 カ所の両生類飼育施設で、それぞれ飼育されていたイエアメガエル (*Litoria caerulea*) とデニスフロッグ (*Rhacophorus dennysi*) から分離された 2 株のブルセラ属菌 ( A105 株、A141 株 ) を研究に用いた。

これら 2 株より、それぞれ DNA を抽出し、次世代シーケンサー Miseq ( illumina 社 ) で各々の全ゲノム配列情報を得た。Miseq により得られた Contig について、微生物アノテーションツールである MiGAP ( Microbial Genome Annotation Pipeline、<http://www.migap.org> ) を用いて Gene annotation を行った。さらに、さらに、ブルセラ属の基準株である *B. melitensis* bioover 1 strain 16M ( NCBI accession number : CP007763、CP007762 ) のゲノム配列を対照として遺伝子地図 ( 塩基配列地図 ) を作成した。地図作成には、GView Server ( <https://server.gview.ca> ) を使用した。

## 2 . 16S rRNA 遺伝子解析 :

A105 株および A141 株のアノテーション後の配列情報から、16S rRNA 遺伝子全長 1492bp について、GenBank に登録されているブルセラ属菌の相同配列と NJ 法で系統樹解析を行った。アウトグループとしてブルセラ属に最も近縁の *Ochrobactrum* 属菌、2 種 (*O. anthropi*、*O. intermedium*) の相同配列を用いた。

## 3 . 多座遺伝子解析 (MLSA) :

近年、ブルセラ属菌の遺伝子タイピング法として多座遺伝子解析法 (*Brucella* MLSA 9、Whatmore et al. 2007) が行われている。同法ではハウスキーピング遺伝子 9 座の、それぞれ、約 500bp の部分配列を連結して解析することで家畜ブルセラ菌、イヌブルセラ菌、海棲哺乳類由来ブルセラ菌の全株を 27 のシーケンスタイプ (ST) として識別することができる。しかし、近年になって発見された *B. inopinata* などには対応していないため、カエル由来株に対し MLSA 9 を用いた場合、いくつかの配列は、定法では増幅が困難であることが判明した。我々は、A105 株および A141 株について、MLSA9 で用いられる 9 座の遺伝子の全配列を決定し、16S rRNA 遺伝子と同様に、GenBank に登録されているブルセラ属菌の相同配列、9 座それぞれ単独、および 9 座連結 (concatenate 12,353, bp) として NJ 法で系統樹解析を行った。

## 4 . 型分泌機構遺伝子解析 :

細胞内寄生性をもつブルセラ属菌は、宿主細胞へ侵入後、型分泌機構 (T4SS) を介して、直接エフェクタータンパク質を輸

送することが知られている。このブルセラ属菌の主要な病原因子である T4SS の構成遺伝子である *virB* 遺伝子群 (*virB1* ~ *virB11*) は、ゲノム中に隣接して配列し、属内で高度に保存されている。*virB* 遺伝子群 (pathogenicity island、12,353bp) について、A105 株および A141 株と他のブルセラ属菌の相同配列を NJ 法により解析した。

## 5 . 遺伝子診断法の開発 :

ブルセラ属菌の遺伝子検出には、*B. abortus* 細胞表面タンパクの 31kDa 抗原 BCSP31 をコードする遺伝子 (*bcs31*) 内の 224 bp の領域を標的とした PCR が最も広く用いられている。これは、全てのブルセラ属菌に保存されている。我々は、通常、*bcs31* (1 組) に *omp31* (1 組) および *omp2* 遺伝子領域 (2 組) を標的としたプライマー計 4 組を組み合わせることで、ヒトに感染する主要 4 菌種を特定している。ただ、A105 株および A141 株は、*B. suis* と同様の反応性を示し、区別ができない。そこで、全配列が明らかとなったハウスキーピング遺伝子 9 座について、他のブルセラ属菌と比較を行い、一塩基変異部位を複数箇所特定した。その部位について GC 含量や Tm 値を検討しながら、センス、アンチセンスとも、その変異部位が 3' 末端にくるようにプライマーセットを設計した。PCR は、puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) を用い、GeneAmp PCRSystem9700 (Applied Biosystems) で実施した。

## C . 研究結果

### 1 . 全ゲノムシーケンス :

図1に概要を示す。遺伝子地図から、リファレンス株との比較で、カエル株2株の配列に数カ所大きなギャップが見られたものの、ほぼ全ての遺伝子の配列が決定された。

## 2. 16S rRNA 遺伝子解析:

アウトグループの *Ochrobactrum* 属菌に対し、ブルセラ属は、大きく2つのクレードに分かれた。第1のクレードは、Classic species (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. neotomae*)、Marine species (*B. ceti*, *B. pinnipedialis*) と Novel species の *B. microti* から構成され、第2のクレードは、*B. microti* 以外の Novel species、*B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2、*B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 (げっし目) とカエル分離株2株 (A105、A141) で構成されていた (図2)。2つのクレード内での配列のホモロジーは高い (Classic・Marine クレード 99.9~100%、Novel クレード 99.7~100%) が、両クレード間ではやや低かった (99.5~99.6%) (表2)。

## 3. 多座遺伝子解析 (MLSA):

9座の連結配列 (12,353bp) の系統樹を図3-1に、*aroA* (1,353bp)、*cobQ* (1,452bp)、*dnak* (1,914bp)、*gap* (1,008bp)、*glk* (1,032bp)、*gyrB* (2,442bp)、*int-hyp* (312bp)、*omp25* (646bp)、*trpE* (2,196bp) の各遺伝子のNJ法による系統樹を図3-2~5に示す。

12,353bpの連結系統樹では、16S rRNA 遺伝子と同様に、ブルセラ属は2つのクレードからなった。すなわち、Classic species、Marine species と *B. microti* で構成されるクレードと、カエル分離株 (A105、A141)

と *B. inopinata* を含む Novel species の2番目のクレードである。クレード内の株間のホモロジーは、Classic・Marine クレード内で高く、Novel クレード内では、それよりも低くなっていた。また、総じて、16S rRNA 遺伝子よりもホモロジーは低い値を示した (表3)。9遺伝子座、それぞれ単独配列の解析では、*glk*、*gap* ではきれいに2クレードに分かれた (図3-2)。一方、*cobQ*、*trpE* では *B. inopinata* BO1 (図3-3)、*aroA*、*dnak* では A105 (図3-4)、*omp25*、*int-hyp* では A141 (図3-5)、*gyrB* では *B. inopinata*-like BO2 が、Classic・Marine クレード寄りとなっており、2クレードに分かれるもの一様ではなく、バリエーションが認められた。

## 4. 型分泌機構遺伝子解析:

*virB* 遺伝子群 (11,818bp) の解析結果は、16S rRNA 遺伝子、9座の連結配列と同様に Classic species、Marine species と *B. microti* でクレードが形成された。しかしながら、*B. inopinata* BO1 と *B. inopinata*-like BO2 は、最も離れて独立したクレードを形成し、カエル分離株 (A105、A141) は *B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 とともにクレードを形成した (図4)。

## 5. 遺伝子診断法の開発:

*glk*、*cobQ*、*dnak* を標的にしたプライマーセットが、ヒトに感染しうる主要4菌種 (*B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*、*B. canis*) およびブルセラ属菌に近縁な *Ochrobactrum* 属菌と反応せず、カエル分離株 (A105、A141) とのみ特異的に反応した。このうち、*cobQ* は異なるサイズではあるがエキストラバ

ンドが見られ、dnak は増幅効率がやや劣っていた。一方、glk を標的にした物は、最も増幅効率が良く、エキストラバンドも認められなかった(図5)。本プライマーセットは、センス、アンチセンスの3'末端側が、それぞれ「g t」「gagg caga」と「プリン塩基 ピリミジン塩基」の変異を反映しており、これが良い結果をもたらしたと考えられる。以上のことから、glk を標的とした本プライマーセットが、カエル由来ブルセラ属菌の有用な特異的遺伝子診断・鑑別法になることが明らかになった。

#### D. 考察

16S rRNA 遺伝子 (1,492bp) による系統解析では、カエル株 (A105, A141)、*B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2、齧歯類株 (*B. sp.* 83/13, *B.sp.* NF2653) は、家畜ブルセラ、イヌブルセラ、マリンプルセラ、*B.microtti* のクレードに対し、別クレードを形成した。しかし 9 遺伝子座の連結配列 (12,353bp) による解析では、家畜ブルセラを含むクレードは、再現されたが、それ以外の菌種は、カエル株 (A105, A141)、*B. inopinata*-like BO2、齧歯類株 (*B. sp.* 83/13, *B.sp.* NF2653) のクレードと *B. inopinata* BO1 のみからなるクレードの2つに分かれた。さらにブルセラ属の主要な病原因子とされる 型分泌機構の遺伝子である *virB* 遺伝子 (11,818bp) の解析結果では、家畜ブルセラを含むクレードは、16S rRNA 遺伝子、9 座連結配列同様にふたたび再現されたが、ノーベルブルセラについては、家畜ブルセラクレードから離れて、それぞれ進化的に遠い系統関係を示す結果になった。とくに *B. inopinata* BO1、*B.*

*inopinata*-like BO2 は、他のブルセラ属菌と離れて2株でアウトグループを形成した。

遺伝子系統解析では、より多くの遺伝子座のより長い配列を用いることで収斂現象などのノイズの影響を抑えて、より正しい系統発生を再現できることが知られている。本研究の解析結果では、家畜ブルセラ、イヌブルセラ、マリンプルセラ、*B.microtti* からなる単系統クレードは、どの配列を用いた解析でも比較的強固に維持されており、それらの菌種の進化的な近縁性は、十分に示されたと考える。また、ノーベルブルセラのなかで、どちらもオーストラリア在来の野生齧歯類分離株である *B. sp.* 83/13 と *B.sp.* NF2653 については、本研究において用いた全ての配列のホモロジーが 100%を示したことから同一菌種である可能性が示されたと考える。しかし、カエル分離株、A105, A141 については、どの配列を用いた解析でもそれぞれが異なっていた (*virB* 遺伝子群で 97.2%)。さらに、未だ自然宿主が見つかっていないヒトブルセラ症由来の *B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2 と我々のカエル株 (A105, A141) を含むノーベルブルセラグループについては、解析に用いる遺伝子配列の違いにより、異なる系統発生が再現される結果となった。

本研究に用いた輸入野性外国産カエルの分離株は、それぞれ異なる飼育施設で飼われていた原産地も種も異なるカエル (オセアニア原産のイエアメガエル・*Litoria caerulea* と東南アジア原産のデニスフロッグ・*Rhacophorus dennysi*) から分離されている。それぞれの施設で同時期に飼育されていた在来種と外国産のカエルからは、ブ



ブルセラ属菌は、分離されていないため、我々の分離株 2 株は、それぞれの宿主のカエルが輸入前より保有していたと考えられる。異なる地域の異なる種のカエルが異なるブルセラ属菌の宿主となっている可能性がある。*B. Inopinata* の自然宿主を特定するためには、カエル株を含むノーベルブルセラ菌種の系統発生を正しく再現する必要がある、さらに多くの遺伝子座、より長い配列を用いた解析が必要であろう。

#### E . 結論

愛玩用無尾類から分離したブルセラ属菌の全遺伝子配列を決定し、それを基に即特異的遺伝子検出法を開発した。

#### G . 研究発表等

##### 1 . 論文発表等

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

##### 2 . 学会発表等

( 1 ) 木村昌伸, 宇根有美, 朴ウンシル, 鈴木道雄, 森川茂, 今岡浩一. 無尾類(カエル)に由来するブルセラ属菌の分離と解析. 第 13 回爬虫類・両生類の臨床と病理のための研究会ワークショップ, 相模原, 2014 年 11 月

H . 知的財産権の出願・登録状況なし。

表1.ブルセラ属菌

種	宿主動物	ヒトへの感染・発症
<b>Classic species</b>		
<i>B. melitensis</i>	山羊、めん羊、ラクダ	あり（最も一般的で重要）
<i>B. abortus</i>	牛、水牛、エルク	あり（次に重要）
<i>B. suis</i>	ブタ、いのしし、トナカイ、カリブー	あり
<i>B. canis</i>	犬（イヌ科）	あり（近年、報告数が増加傾向）
<i>B. ovis</i>	めん羊	報告無し
<i>B. neotomae</i>	げっ歯目	報告無し
<b>Marine species</b>		
<i>B. ceti</i>	クジラ、イルカ	2例の患者報告あり。実験室感染例も報告あり
<i>B. pinnipedialis</i>	アザラシ、アシカ	
<b>Novel species</b>		
<i>B. microti</i>	ハタネズミ、（土壌）	報告無し
<i>B. inopinata</i>	不明、（カエル？）	株名BO1、BO2の2例の報告あり
<b>(Future species)</b>		
<i>B. sp. 83/13</i> および <i>B. sp. NF2653</i>	げっし目	報告無し
<i>B. sp. NVSL 07-0026</i>	バブーン	報告無し

表2. 16S rRNA 遺伝子のホモロジー

Sequence entity Matrix		Classic · Marine species								Novel species								
		<i>B. melitensis</i> 16M	<i>B. suis</i> 1330	<i>B. abortus</i> 2308	<i>B. canis</i> RM6/66	<i>B. ovis</i> ATCC25840	<i>B. neotomae</i> 5K33	<i>B. ceti</i> Cudo	<i>B. pinnipedialis</i> B2/94	<i>B. microti</i> CCM4915	<i>B. inopinata</i> BO1	<i>B. sp.</i> BO2	A105	A141	<i>B. sp.</i> 83/13	<i>B. sp.</i> NF2653	<i>O. anthropi</i> ATCC49188	<i>O. intermedium</i> LMG3301
16S rRNA DNA (1,492bp)																		
Classic · Marine species	<i>B. melitensis</i> 16M	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. suis</i> 1330	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. abortus</i> 2308	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. canis</i> RM6/66	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. ovis</i> ATCC25840	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. neotomae</i> 5K33	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.995	0.995	0.995	0.995	0.994	0.994	0.985	0.987
	<i>B. ceti</i> Cudo	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. pinnipedialis</i> B2/94	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. microti</i> CCM4915	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
Novel species	<i>B. inopinata</i> BO1	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.995	0.996	0.996	0.996	1	0.999	1	0.998	0.998	0.983	0.991	
	<i>B. sp.</i> BO2	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.995	0.996	0.996	0.996	1	0.999	1	0.998	0.998	0.983	0.991	
	A105	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.999	0.999	0.997	0.997	0.982	0.991		
	A141	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.995	0.996	0.996	0.996	1	1	0.999	0.998	0.998	0.983	0.991	
	<i>B. sp.</i> 83/13	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.994	0.995	0.995	0.995	0.998	0.998	0.997	0.998	1	0.981	0.99	
	<i>B. sp.</i> NF2653	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.994	0.995	0.995	0.995	0.998	0.998	0.997	0.998	1	0.981	0.99	
<i>O. anthropi</i> ATCC49188	0.986	0.986	0.986	0.986	0.986	0.985	0.986	0.986	0.986	0.983	0.983	0.982	0.983	0.981	0.981	0.98		
<i>O. intermedium</i> LMG3301	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.987	0.988	0.988	0.988	0.991	0.991	0.991	0.991	0.99	0.99	0.98		

表 3. 9 座連結配列のホモロジー

Sequence entity Matrix		Classic • Marine species									Novel species					O.anthropi W13P3 O.intermedium LMG3301		
		B.melitensis 16M	B.suis 1330	B.abortus 2308	B.canis RM6/66	B.ovis ATCC25840	B.neotomae 5K33	B.ceti Cudo	B.pinnipedialis B2/94	B.microti CCM4915	B.inopinata BO1	B.sp. BO2	A105	A141	B.sp. 83/13			B.sp. NF2653
Classic • Marine species	B.melitensis 16M	0.997	0.998	0.997	0.994	0.997	0.997	0.997	0.998	0.998	0.984	0.985	0.982	0.982	0.984	0.983	0.855	0.854
	B.suis 1330	0.997	0.998	0.999	0.994	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.985	0.985	0.983	0.983	0.984	0.984	0.857	0.855
	B.abortus 2308	0.998	0.998	0.997	0.997	0.994	0.998	0.998	0.998	0.998	0.984	0.985	0.983	0.983	0.984	0.984	0.856	0.855
	B.canis RM6/66	0.997	0.999	0.997	0.997	0.997	0.997	0.998	0.998	0.998	0.984	0.985	0.983	0.982	0.984	0.984	0.856	0.855
	B.ovis ATCC25840	0.994	0.994	0.994	0.994	0.995	0.994	0.995	0.995	0.995	0.981	0.982	0.98	0.98	0.981	0.981	0.854	0.853
	B.neotomae 5K33	0.997	0.998	0.998	0.997	0.995	0.998	0.998	0.998	0.998	0.985	0.985	0.983	0.983	0.984	0.984	0.856	0.855
	B.ceti Cudo	0.997	0.998	0.998	0.997	0.994	0.998	0.999	0.998	0.998	0.985	0.985	0.983	0.983	0.984	0.984	0.856	0.855
	B.pinnipedialis B2/94	0.997	0.998	0.998	0.998	0.995	0.998	0.999	0.999	0.999	0.985	0.986	0.984	0.983	0.985	0.985	0.856	0.856
	B.microti CCM4915	0.997	0.998	0.998	0.998	0.995	0.998	0.998	0.999	0.999	0.985	0.985	0.984	0.983	0.985	0.984	0.856	0.855
Novel species	B.inopinata BO1	0.984	0.985	0.984	0.984	0.981	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.984	0.984	0.986	0.985	0.856	0.856
	B.sp. BO2	0.985	0.985	0.985	0.985	0.982	0.985	0.985	0.986	0.985	0.985	0.985	0.986	0.987	0.986	0.985	0.856	0.855
	A105	0.982	0.983	0.983	0.983	0.98	0.983	0.983	0.984	0.984	0.984	0.985	0.985	0.984	0.983	0.985	0.856	0.855
	A141	0.982	0.983	0.983	0.982	0.98	0.983	0.983	0.983	0.983	0.984	0.986	0.985	0.985	0.985	0.985	0.856	0.855
	B.sp. 83/13	0.984	0.984	0.984	0.984	0.981	0.984	0.984	0.985	0.985	0.986	0.987	0.984	0.985	0.999	0.985	0.856	0.855
B.sp. NF2653	0.983	0.984	0.984	0.984	0.981	0.984	0.984	0.985	0.984	0.985	0.986	0.983	0.985	0.999	0.985	0.856	0.855	
O.anthropi W13P3	0.855	0.857	0.856	0.856	0.854	0.856	0.856	0.856	0.856	0.856	0.856	0.856	0.856	0.856	0.856	0.915		
O.intermedium LMG3301	0.854	0.855	0.855	0.855	0.853	0.855	0.855	0.856	0.855	0.856	0.855	0.855	0.855	0.855	0.855	0.915		

図 1 . カエル分離株 2 株 ( A105、 A141 ) と B. melitensis 16M の遺伝子地図

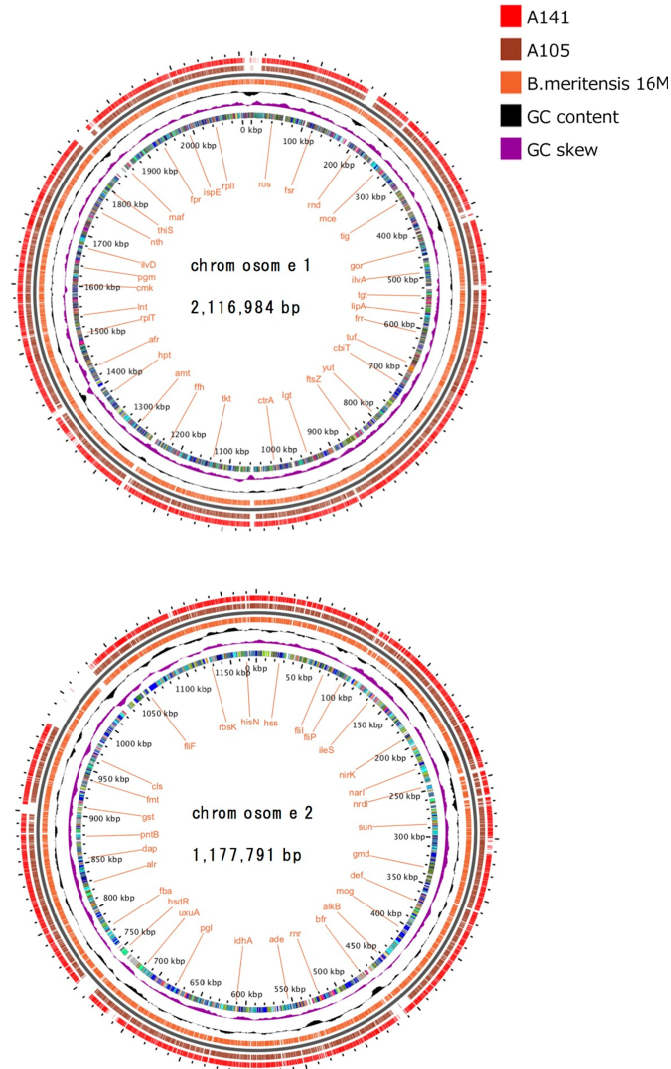


図 2 . 16S rRNA 遺伝子の系統樹解析

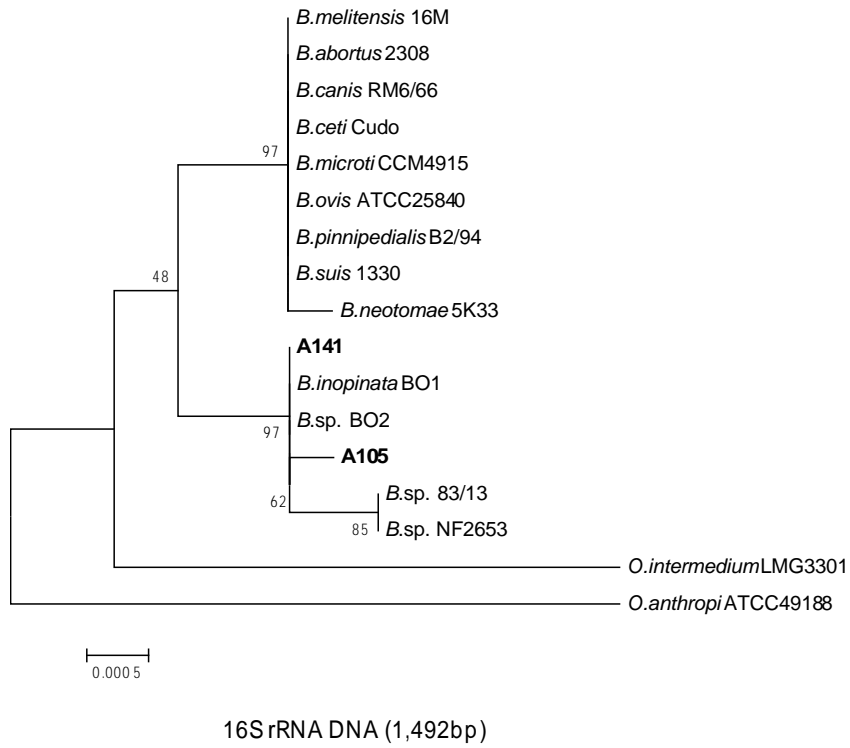


図 3 . 多座遺伝子解析

図 3 - 1 . 9 座連結配列による系統樹解析

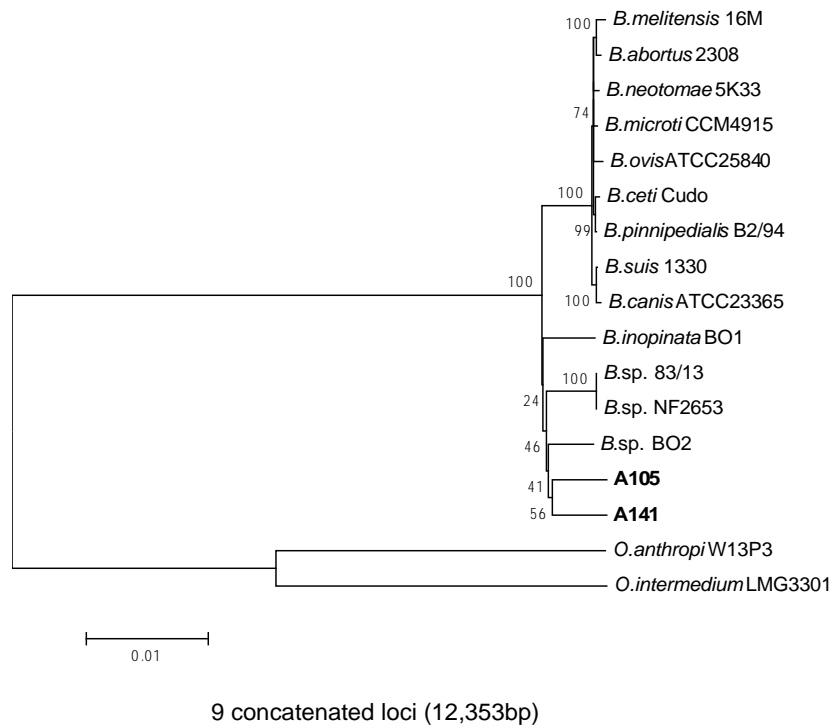


図 3 - 2 . glk 遺伝子の系統樹

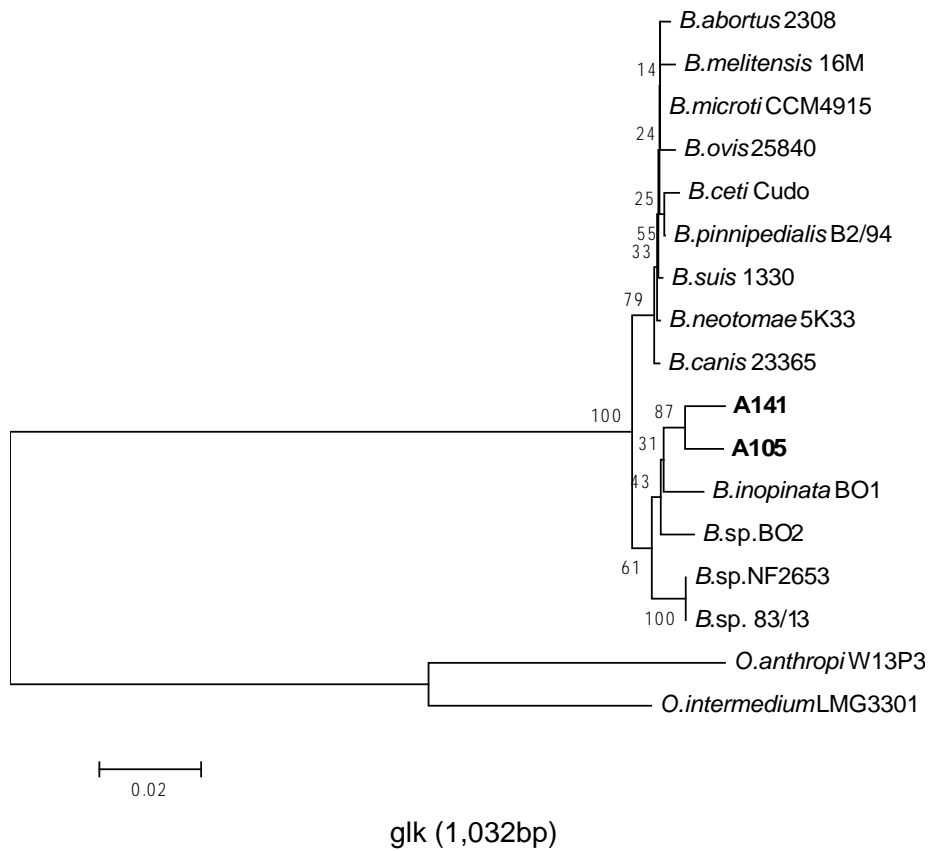


図 3 - 3 . *cobQ* 遺伝子の系統樹

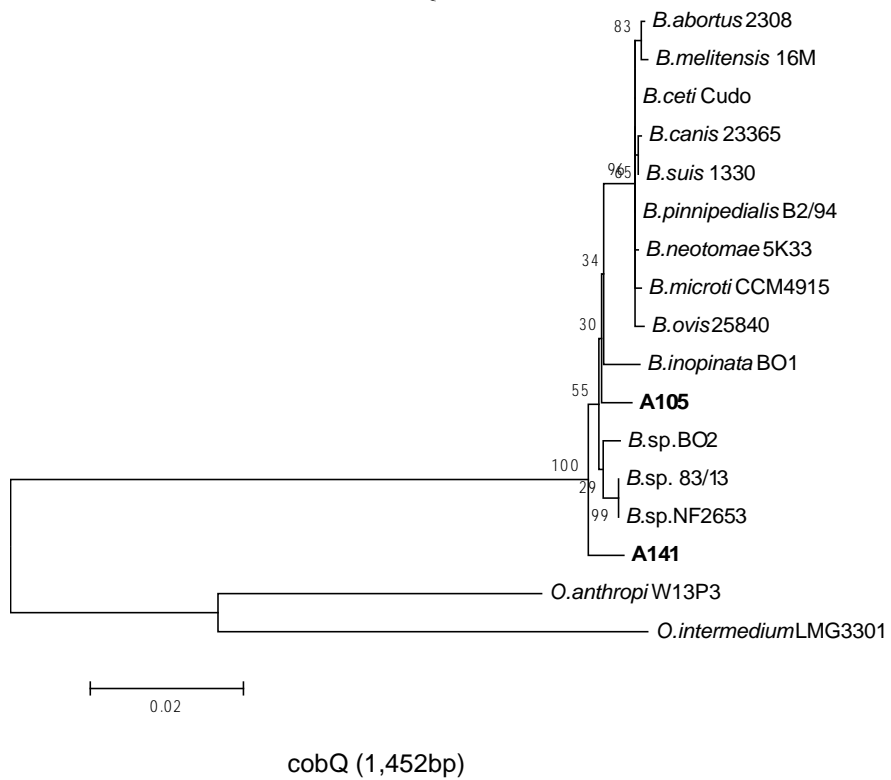


図 3 - 4 . *aroA* 遺伝子の系統樹

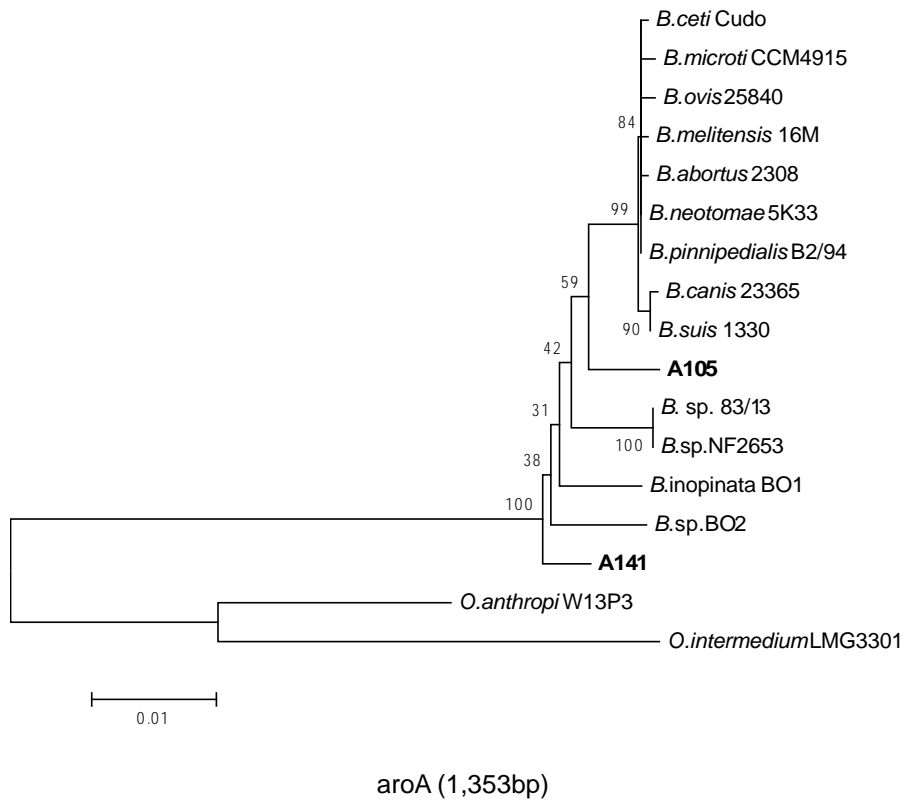


図 3 - 5 . omp25 遺伝子の系統樹

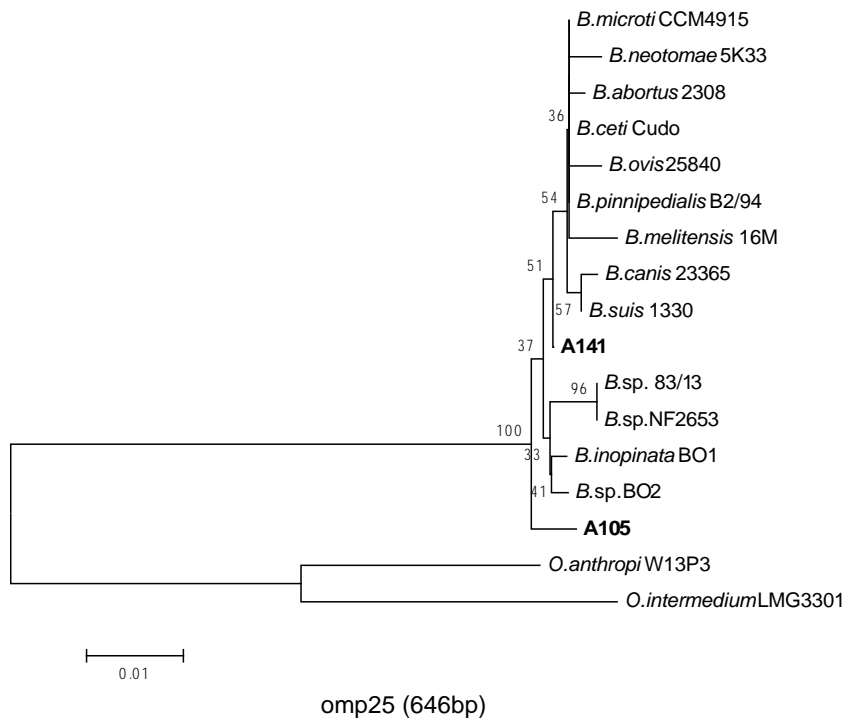
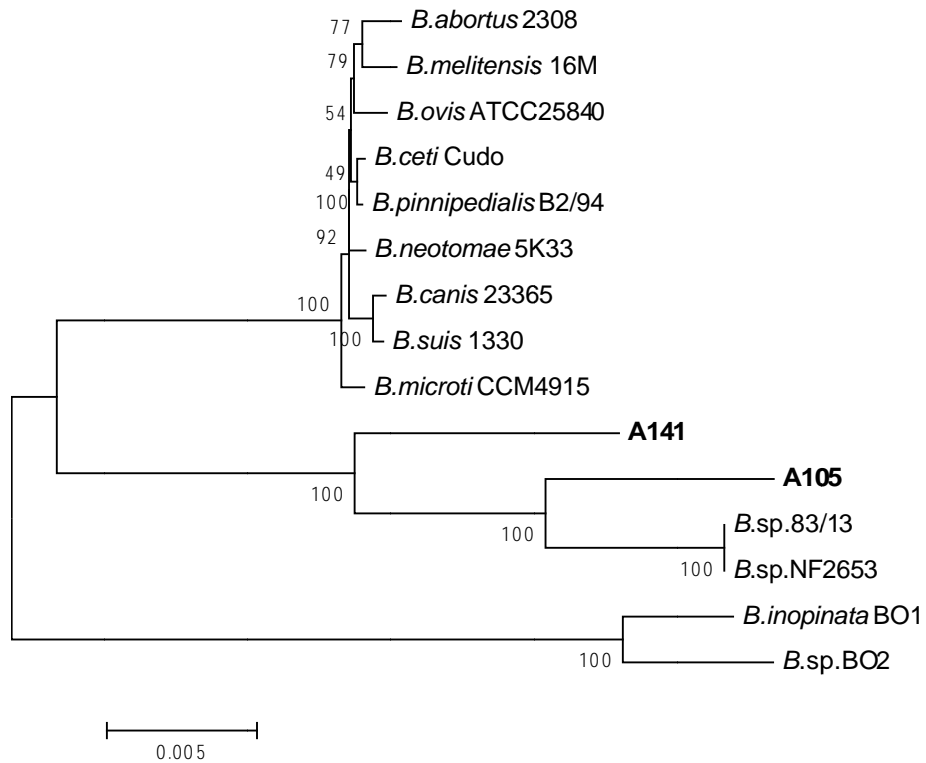
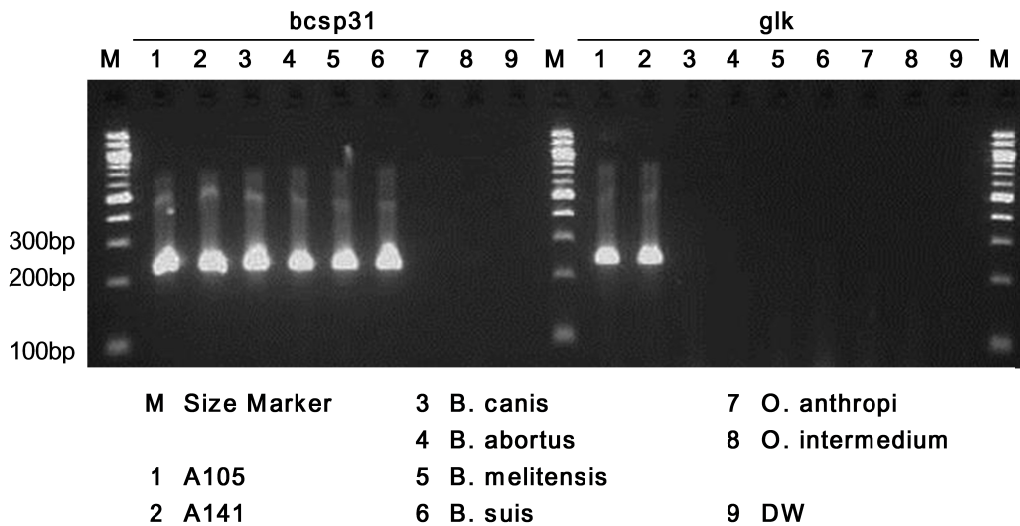


図 4 . virB 遺伝子群の系統樹解析



Type IV secretion system (T4SS) pathogenicity island (11,818bp)

図5 . 無尾類由来ブルセラ属菌特異的遺伝子検出法(PCR)の開発



### 別紙 3

厚生労働科学研究委託費（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）

委託業務成果報告（業務項目）

「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究

（H26-新興実用化-一般-019）

### 新規カプノサイトファーガ属菌の遺伝子情報と診断法に関する研究

担当責任者 鈴木 道雄 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究協力者 今岡 浩一、木村 昌伸、奥谷 晶子 国立感染症研究所 獣医科学部

研究要旨：イヌ・ネコに咬傷・搔傷を受けた際に感染する *Capnocytophaga canimorsus* 感染症の症例情報収集を行う中で、同感染症疑いの重症敗血症例 3 例から *C.canimorsus* とは遺伝的に異なる菌株が分離された。本研究では、この新たな致死性の敗血症原因菌である新規 *Capnocytophaga* 属菌について、全ゲノム解析を含む遺伝子解析および生物学的解析を行い、その性状を明らかにするとともに、鑑別診断法の開発を行った。その結果、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 菌株は、新菌種の提唱において最も決定的なデータとなる近縁種との DNA-DNA ハイブリッド形成試験において、同一菌種の基準である相同値 70% 以上を大きく下回る 12~15% であった。さらに 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子の相同値、また各種の生理・生化学的性状および理化学分析の結果を総合的に考慮して、3 株同士は同一菌種であること、かつ *Capnocytophaga* 属の新菌種であると考えられた。全ゲノム解析においては、3 株それぞれのドラフトゲノムを作成した。リファレンスゲノムとした近縁種 *C. canimorsus* Ce5 株に対するリードマッピングにおけるマッピング率は、同一菌種の *C. canimorsus* 基準株の約 60% に対し、20% 前後と低かった。各コンティグのアノテーションによって、鉄獲得性因子やノイラミニダーゼなどの病原性関連遺伝子を同定した。16s rRNA および *gyrB* 遺伝子をターゲットとした、PCR 法による特異的検出法の開発では、それぞれの遺伝子について、*C.canimorsus* を含む既知の *Capnocytophaga* 菌種には反応せず、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株を特異的に検出する鑑別診断法を確立した。

#### A. 研究目的：

カプノサイトファーガ属菌 (*Capnocytophaga* spp.) はヒトおよびイヌ・ネコの口腔内に常在するグラム陰性桿菌である。現在 8 菌種が知られており、うち 6 菌種はヒトの口腔内常在菌で、イヌおよびネコは *C. canimorsus*、*C. cynodegmi* の 2 菌種を保菌している（表 1）。いずれもヒトに病原性を有するが、公衆衛生上特に重要なのは *C. canimorsus* で、イヌやネコ

に咬傷や搔傷（以下、咬搔傷）を受けた際に感染するほか、傷口をなめられるなど非咬搔傷性の接触感染もある。発熱のほか、敗血症、多臓器不全、播種性血管内凝固症候群（DIC）など、局所症状がみられないまま、急激に強い全身症状が現れることが多いのが特徴である。敗血症を発症したときの致死率は約 30% に達する。

我々はこれまでに、*C. canimorsus* の特異的検出法の開発を行い、国内のイヌの 74%、



ネコの 57%が *C. canimorsus* を保菌していること明らかにし、また、国内の患者発生状況の調査によって、50 例を超える *C. canimorsus* 感染症例を把握してきた。その約 9 割が重症の敗血症例であり、国内症例の致死率も約 25%と、救命救急医療の環境が整ったわが国においても、依然救命の難しい感染症であることが明らかとなった。

さらに、この調査・研究の過程で、従来の *C. canimorsus* 特異的 PCR 検出系では陰性となる、遺伝子的に異なる新菌種と思われる新規 *Capnocytophaga* 属菌による敗血症例 3 例(うち死亡 1 例)が見い出された。本研究は、イヌ・ネコを感染源動物とすることが推測される、この新たな致死性敗血症原因菌について、遺伝子解析や生物学的解析を行い、鑑別診断法を開発することを目的として遂行した。

## B. 研究方法：

敗血症患者由来新規 *Capnocytophaga* 属菌の生物学的解析

国内で *C. canimorsus* 感染疑いの敗血症例から分離された 3 株の新規 *Capnocytophaga* 属菌臨床分離株を解析に供した。菌が分離された症例は 2011 年の 1 例 (HP40001 株) と 2014 年の 2 例 (HP20001 株、HP33001 株) であり、症例のプロファイルは表 2 に示した。

### 1. 理化学分析

HP40001 株と *C. canimorsus* 基準株 ATCC35979 株、HP40001 株と *C. cynodegmi* 基準株 ATCC49044 株の組み合わせで、1 対 2 の DNA-DNA ハイブリッド形成試験をマイクロプレート法によって行った。

### 2. 遺伝子解析

16S rRNA および *gyrB* 遺伝子のそれぞれ 1500bp 弱の領域を増幅して塩基配列

を決定し、結果を近縁種のデータと比較して近隣結合法 (NJ 法) による分子系統解析を行った。さらに、次世代シーケンサー Miseq (illumina 社) を用いて全ゲノムを解析し、得られたリードの de novo アセンブリを行うとともに、国立遺伝学研究所の解析ツール MiGAP を用いて、得られたコンティグに対するアノテーション付与を行った。また、ゲノムデータベース上の *C. canimorsus* Cc5 株の全ゲノム情報をリファレンスとしたリードマッピングを行った。

### 3. 生理・生化学的性状試験

オキシダーゼテスト、カタラーゼテストを常法に従って行った。また、生化学的性状試験の各項目を ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」(日水製薬)、API20A および APIZYM(シスメックス・バイオメリュー)の各検査キットを用いて調べた。

### 4. PCR による新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的検出法の確立

シーケンスデータを元に 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子をターゲットとしたプライマー群を設計し、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株と *Capnocytophaga* 既存菌種基準株を用いて各プライマーの組み合わせによる検出の特異性を検討、鑑別診断に有用なプライマーセットを選定した。PCR は puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) を用い、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) で行った。

## C. 研究結果：

### 1. 理化学分析

DNA 塩基組成測定では、G+C 含量が約 35% であり、*Capnocytophaga* 属の特徴(34~44%)と一致した(表 3-1)。

HP40001 株を代表株として行った、菌種の分類において最も決定的な指標となる DNA-DNA ハイブリッド形成試験の結果は、同一菌種の基準となる相同値 70% 以上に対して、対 *C. canimorsus* 基準株で相同値 12~15%、対 *C. cynodegmi* 基準株で相同値 12~13% という結果であり、HP40001 株は新菌種であると判断された (表 3-2)。

## 2. 遺伝子解析

2011 年にネコ搔傷敗血症例から分離された菌株 (HP40001) および本年度、*C. canimorsus* 感染疑いの敗血症例 2 例 (うち死亡 1 例) から分離された 2 株 (HP20001、HP33001 の計 3 株は、*C. canimorsus* 基準株に対して 16S rRNA で 96.9~97.0%、*gyrB* 遺伝子で 75.5~75.6% と低い相同値を示し、またデータベース上には *C. canimorsus* および *C. cynodegmi* よりも類似した配列が存在しなかった (表 4-1)。一方、この 3 株同士は 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子ともに塩基配列の相同値が 99% 以上であり、系統解析の結果、この 3 菌株は同一菌種であり、かつ *Capnocytophaga* 属の新菌種である可能性が高いと判断された (表 4-2、図 1-1、1-2)。全ゲノム解析を行った結果、HP20001 株ではコンティグ数 245、平均コンティグサイズ 11.0kb、N50 (コンティグ長の加重平均) = 18.5kb、HP33001 株ではコンティグ数 572、平均コンティグサイズ 4.8kb、N50 = 7.3kb、HP40001 株ではコンティグ数 2140、平均コンティグサイズ 1.1kbp、N50 = 1.7kb のドラフトゲノムデータが得られた (表 5-1)。リファレンスとして *C. canimorsus* Ce5 株の完全ゲノム情報を用いリードマッピングを行ったところ、同一条件設定で *C. canimorsus* 基準株 ATCC35979 が約 61% のマップ率だったの

に対して、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株は 17~24% のマップ率と低く、これは *C. cynodegmi* 基準株 ATCC49044 株の約 22% と同程度で、*Capnocytophaga* 属菌 3 株は *C. canimorsus* とはゲノムレベルで他菌種相当の差異があることが示唆された (表 5-2、図 2-1)。

各コンティグに対するアノテーションでは、*C. canimorsus* が保有し病原性に関わるとされるノイラミニダーゼや、宿主体内での鉄獲得に関わる因子など、新規 *Capnocytophaga* 属菌の病原性に関わる可能性のある遺伝子が同定された。

## 3. 生理・生化学的性状試験

*Capnocytophaga* 既存菌種と同様、二酸化炭素要求性で、大気中濃度の CO<sub>2</sub> では全く生育せず、5% CO<sub>2</sub> 存在下では良好に生育した。

オキシダーゼおよびカタラーゼ試験はともに陽性で、イヌ・ネコが保菌する *C. canimorsus* および *C. cynodegmi* と同様の性質を示した (これに対してヒト保有の 6 菌種はいずれも陰性)。各試験項目における 3 株間の差異は HP20001 株がマルトース分解陽性を示した点のみで、生化学的性状は 3 株ともほぼ一致した (表 6)。

*C. canimorsus* との鑑別点としては、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株がいずれも -グルタミルアミノペプチダーゼ陽性であったのに対し、*C. canimorsus* は基準株および国内臨床分離株 28 株はいずれも陰性であり、病院検査室で実施できる同定試験における鑑別点と考えられた。

## 4. PCR による新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的検出法の確立

16S rRNA 遺伝子をターゲットとした検出では、プライマー F1 と R2 のセットが、*gyrB* 遺伝子をターゲットとした検出

では F2 と R2 のセットが、特異性、感度においてそれぞれ最も良好な結果を示した。両プライマーセットを用いた PCR では、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株はいずれも陽性となり（図 3-1）、最も近縁な *C. canimorsus* および *C. cynodegmi* を含む既存菌種はいずれも陰性となった（図 3-2）。

#### D. 考察：

*C. canimorsus* 感染症について調査を継続する中で情報の得られた、1 例の死亡例を含む 3 例の *C. canimorsus* 感染疑いの敗血症例から分離された菌株は、既知の *Capnocytophaga* のいずれの菌種とも異なるプロファイルを有しており、新菌種であることが示唆されたことから、本研究において詳細な解析を実施した。

分類学上の新菌種を提唱するためには、所定の性状解析が必要であるため、DNA-DNA ハイブリッド形成試験や生理・生化学的性状解析等の各種の詳細な解析を実施した。その結果、これら 3 株を同一の新菌種として正式な提唱するために十分なデータが得られた。

ゲノム解析では、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株のドラフトゲノムを作成することができた。*Capnocytophaga* 属菌はリファレンスに利用できるデータが乏しく、まだこれから既存菌種を含めて多くの菌株のゲノムデータを蓄積して将来的な詳細な解析の土台を作る段階であるが、今回の解析で、鉄獲得性因子など病原性因子を含む遺伝子の同定がある程度できたことで、今後、発症メカニズムの解析に利用できるデータが得られた。

新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株は、検査時に *C. canimorsus* 検出系では 16S rRNA 遺伝子検出 PCR 陽性、*gyrB* 遺伝子検出 PCR 陰性となるため、既知の *C.*

*canimorsus* と PCR の検査結果に差は認められるが、新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的に陽性を検出する PCR 検査系を確立する必要性から、今回の解析によって得られたデータを元に 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子をターゲットとしたプライマーを設計することにより、新規 *Capnocytophaga* 属菌両遺伝子のみを特異的に検出する PCR 法による鑑別診断系が確立された。

今後の課題としては、現在 3 例のみが把握されている新規 *Capnocytophaga* 属菌による患者発生状況を継続的に調査し、実態を解明することをはじめ、これまでの 3 症例には、いずれもネコ咬傷歴やイヌとの接触歴があり、イヌ・ネコから感染したことが推測されたものの、直接的証拠はないことから、イヌ・ネコの保菌状況について、調査することがまず必要と考えられる。

これらの調査には、今回確立した PCR による鑑別診断法が極めて有用となる。さらには、今回解析した菌株のゲノム情報を元にした病原遺伝子の検索や発症メカニズムの解析、また臨床分離株を収集して薬剤感受性試験や生化学的性状試験を実施し、抗菌薬の選択や検査室の菌種同定システムへの情報提供を行うなど診断・治療に貢献できる可能性のある課題が多くある。

また、新規 *Capnocytophaga* 属菌は日常生活に身近なイヌ・ネコが保菌していることが推測されることから、医療関係者のみならず、一般市民に対しても、積極的なアウトリーチ活動を通じて情報の周知を図っていくことが重要と考えられる。

#### E. 結論

いずれも重症の敗血症例から分離された、新菌種と考えられる *Capnocytophaga*

属菌分離株について、遺伝子的、生物学的に詳細な解析を行った。また、得られたデータを元に、PCR による鑑別診断法を開発した。これらのデータや検査法は、今後の病原性解析、また臨床検査や感染源動物調査に有用と考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表等

なし。

2. 学会発表等

(1) 入江由美, 山磨達郎, 須賀原亮, 鈴木道雄, 今岡浩一. 新菌種と思われる *Capnocytophaga* 属による敗血症の一例. 第 26 回日本臨床微生物学会総会, 東京, 2014 年 1 月

H. 知的所有権の取得状況

無し

表1. *Capnocytophaga*属菌の自然宿主、生化学的性状、病原性

菌種名	常在する宿主	カタラーゼ オキシダーゼ	病原性
<i>C. ochracea</i>			
<i>C. gingivalis</i>			
<i>C. sputigena</i>	ヒト	陰性	歯周病、時に心内膜炎など
<i>C. haemolytica</i>			
<i>C. granulosa</i>			
<i>C. leadbetteri</i>			
<i>C. canimorsus</i>	イヌ・ネコ	陽性	発症は稀だが重症化、敗血症時の致死率30% 主に咬傷部位の局所感染、稀に全身感染
<i>C. cynodegmi</i>			

表2. 新規*Capnocytophaga*感染症例のプロファイル

	発生年	年齢	性別	感染経路	主症状	転帰	菌分離	分離株
症例1	2011年	49歳	男性	ネコ搔傷	敗血症	回復	血液	HP40001
症例2	2014年	67歳	女性	ネコ咬傷	敗血症	回復	血液	HP20001
症例3	2014年	82歳	女性	イヌとの接触	敗血症	死亡	血液	HP33001

表3-1. 新規*Capnocytophaga*属菌のDNA塩基組成分析

	新規 <i>Capnocytophaga</i> 属菌		
	HP20001	HP33001	HP40001
DNA G+C含量(%)	34.9	35.3	35.3

表3-2. 新規*Capnocytophaga*属菌HP40001株に対する*C. canimorsus*基準株ATCC35979株および*C. cynodegmi*基準株ATCC49044株のDNA-DNAハイブリダイゼーション相同値(%)

固定側		プローブ(標識DNA)側		
		HP40001	ATCC35979	ATCC49044
新規 <i>Capnocytophaga</i> 属菌	HP40001	100	12	12
<i>C. canimorsus</i>	ATCC35979	14	100	-
<i>C. cynodegmi</i>	ATCC49044	12	-	100

表4-1. 新規*Capnocytophaga*属菌の16S rRNAおよびgyrB遺伝子シーケンスの相同値(%)

菌株名		<i>C. canimorsus</i> 基準株		<i>C. cynodegmi</i> 基準株	
		16S rRNA	gyrB	16S rRNA	gyrB
症例1	HP40001	97.01	75.59	97.01	77.57
症例2	HP20001	96.94	75.54	96.94	77.57
症例3	HP33001	96.94	75.52	96.94	77.89

表4-2. 新規 *Capnocytophaga* 属菌3株間での16S rRNAおよびgyrB遺伝子塩基配列の相同値 (%)

		16S rRNA		
		HP20001	HP33001	HP40001
	HP20001		99.7	99.7
gyrB	HP33001	99.6		99.5
	HP40001	99.6	99.4	

図 1-1. 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統樹 (NJ 法)

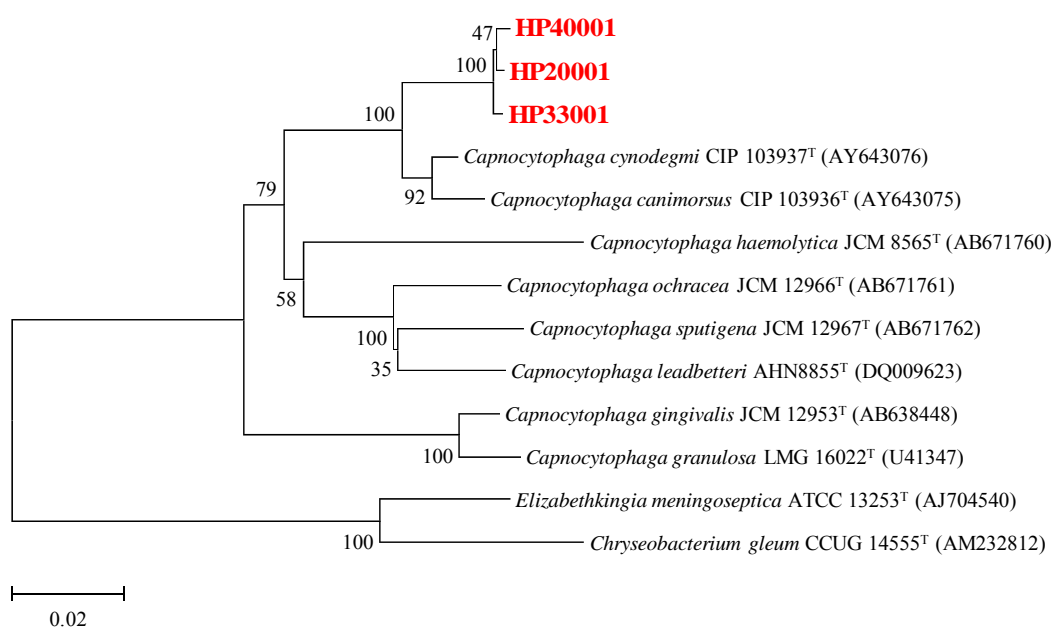


図 1-2. gyrB 遺伝子配列に基づく分子系統樹 (NJ 法)

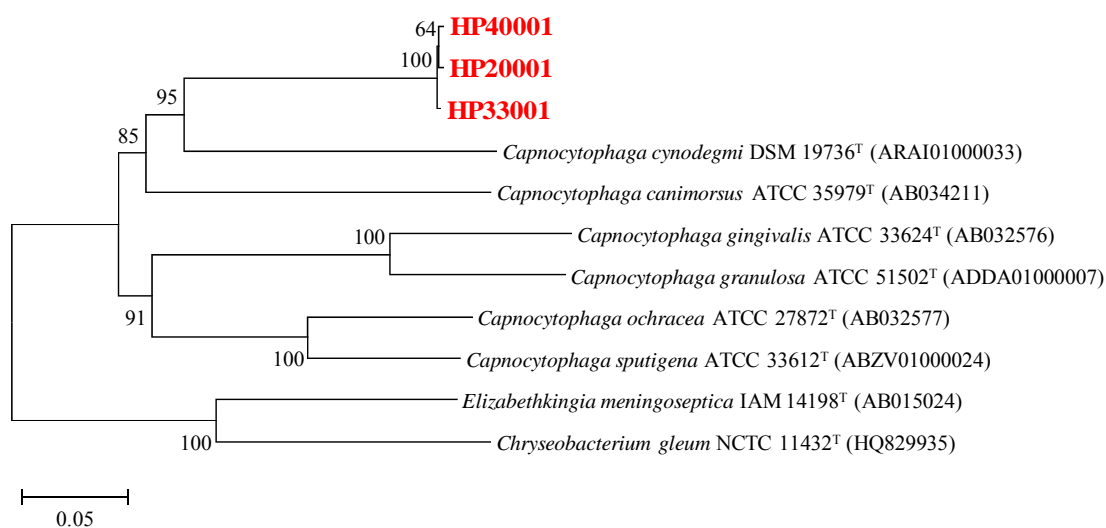


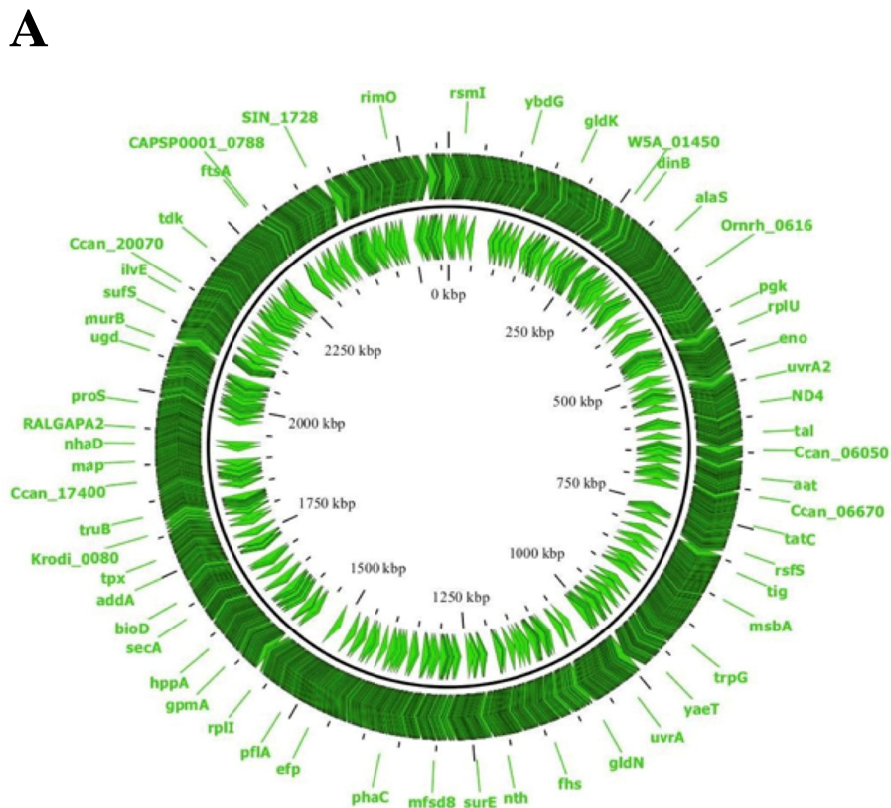
表5 - 1. 新規 *Capnocytophaga* 属菌ドラフトゲノムのプロフィール

	HP20001	HP33001	HP40001
コンティグ数	245	572	2,140
平均コンティグサイズ (bp)	10,967	4,831	1,054
全長 (bp)	2,687,034	2,763,210	2,255,296
N50 (bp)	18,545	7,291	1,696

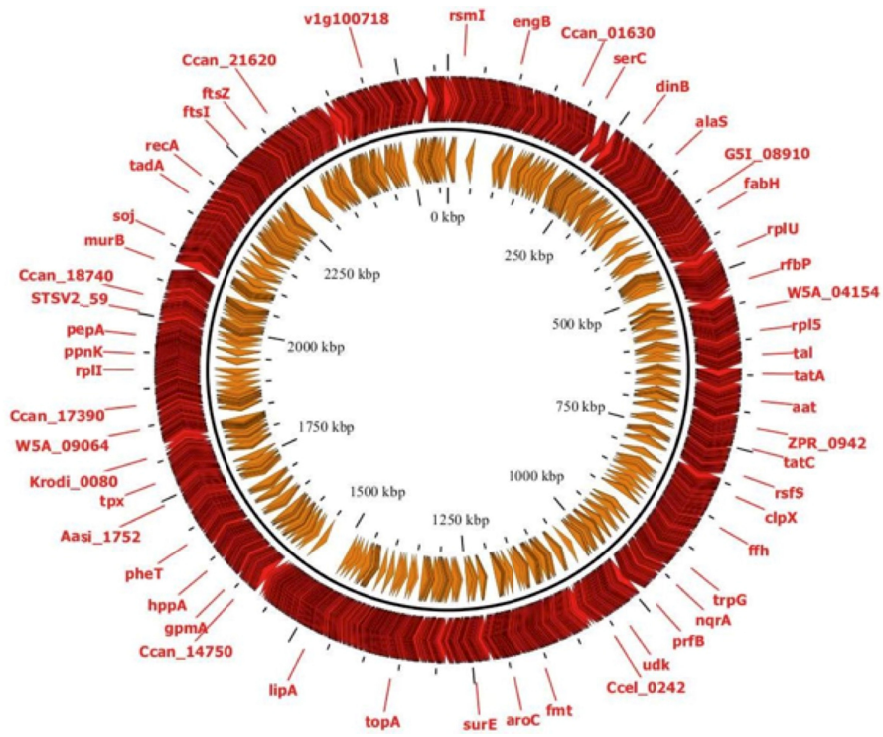
表5 - 2. 新規 *Capnocytophaga* 属菌3株のリファレンスゲノム *C. canimorsus* Cc5株 (GenBank: CP002113.1) に対するリードマッピング

表5 - 2. 新規 <i>Capnocytophag</i>	新規 <i>Capnocytophaga</i> 属菌			<i>C. canimorsus</i>	<i>C. cynodegmi</i>
	HP20001	HP33001	HP40001	ATCC35979	ATCC49044
マッピングされたリード数	740,554	2,096,261	504,561	1,975,310	618,511
全リード数	3,549,646	8,890,360	2,905,932	3,242,056	2,781,738
リードのマッピング率 (%)	21	24	17	61	22

図 2-1. 新規 *Capnocytophaga* 属菌の遺伝子地図 (A: HP20001 株、B: HP33001 株、C: HP40001 株)



**B**



**C**

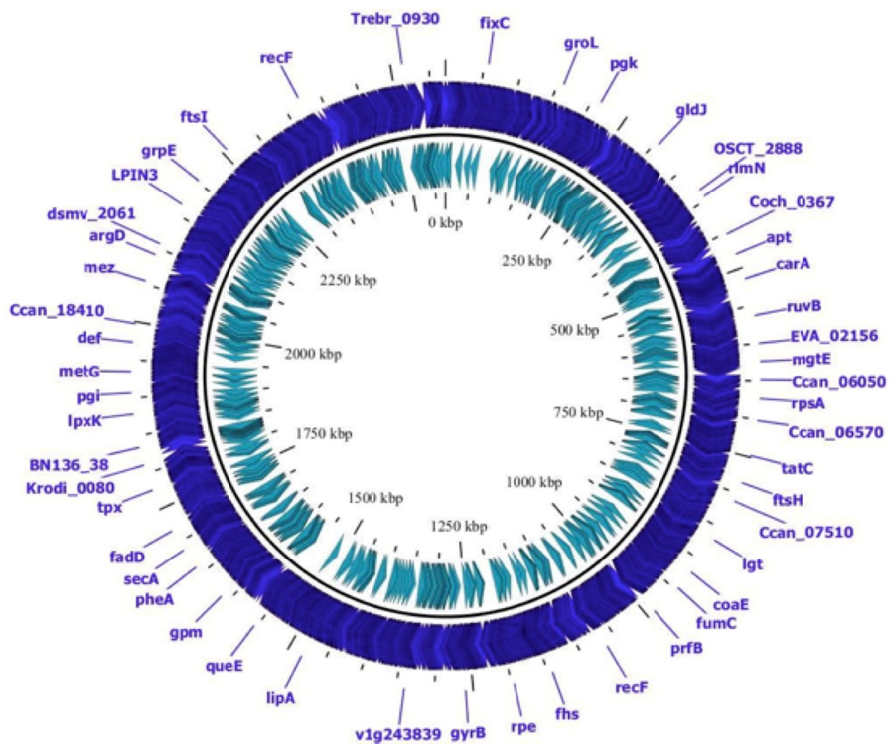
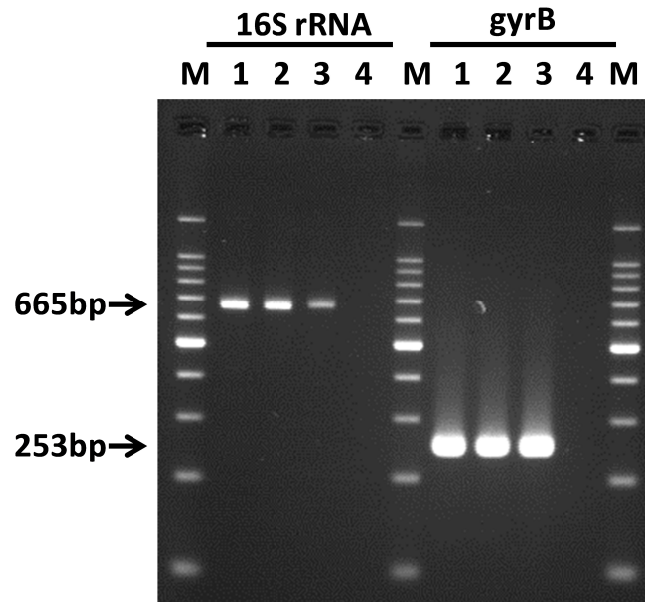




表6. 新規CapnocytophagaとCapnocytophaga属既知種の  
生理・生化学的性状および化学的性状比較

	新規 <i>Capnocytophaga</i> 属菌		
	HP20001	HP33001	HP40001
25 °Cでの生育	-	-	-
40 °Cでの生育	+	+	+
好気条件下での生育	-	-	-
溶血性	-	-	-
インドール産生	-	-	-
ウレアーゼ活性	-	-	-
エスクリン加水分解	-	-	-
硝酸塩還元	-	-	-
オキシダーゼ反応	+	+	+
カタラーゼ反応	+	+	+
酸性フォスファターゼ	+	+	+
アルカリフォスファターゼ	+	+	+
グルタミルアミノペプチダーゼ	+	+	+
ロイシンアリルアミダーゼ	+	+	+
バリンアリルアミダーゼ	+	+	+
シスチンアリルアミダーゼ	+	+	+
酸産生			
グルコース	-	-	-
マルトース	+	-	-
フルクトース	-	-	-
マンノース	-	-	-
マンニトール	-	-	-
トレハロース	-	-	-
サッカロース	-	-	-
ラクトース	-	-	-
キシロース	-	-	-
グリセリン	-	-	-
ラフィノース	-	-	-
ソルビトール	-	-	-
ラムノース	-	-	-

図 3-1 新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的遺伝子検出法 (PCR) -1



M: サイズマーカー

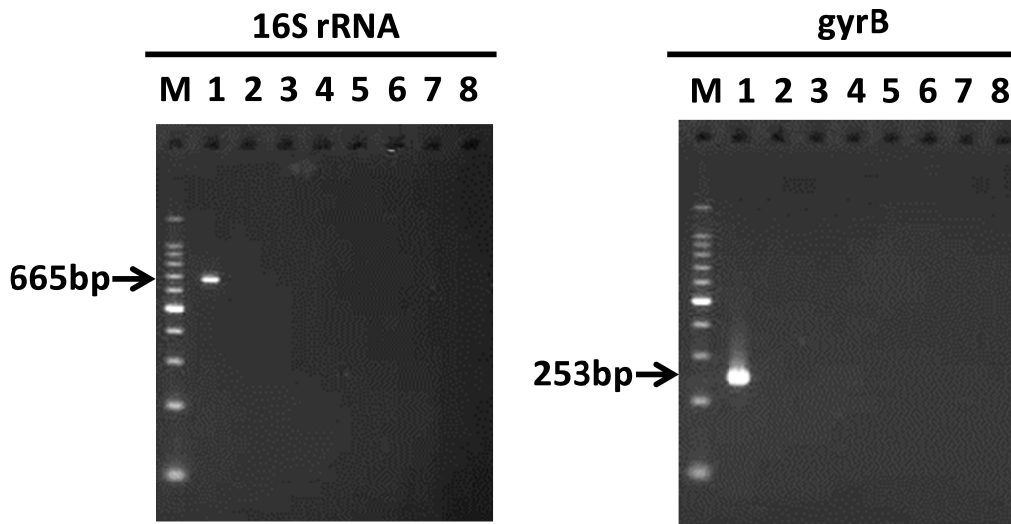
1: HP20001株

2: HP33001株

3: HP40001株

4: 蒸留水のみ

図 3-2 新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的遺伝子検出法 (PCR) -2



M: サイズマーカー

1: *Capnocytophaga* sp. nov.

2: *C. canimrosus*

3: *C. cynodegmi*

4: *C. ochracea*

5: *C. gingivalis*

6: *C. sputigena*

7: *C. haemolytica*

8: *C. granulosa*



### 別紙 3

厚生労働科学研究委託費（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）

委託業務成果報告（業務項目）

「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究

（H26-新興実用化-一般-019）

## 野兔病弱毒株の作出とワクチン効果

担当責任者： 宇田晶彦 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究協力者： 田徳雨、堀田明豊、朴ウンシル、森川茂 国立感染症研究所獣医科学部、

網康至 国立感染症研究所動物管理室、

永田典代、岩田奈緒子、鈴木忠樹 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨：野兔病菌 (*Francisella tularensis*) はヒトや動物に対して非常に高い感染性と致死性を有する事から、生物兵器として使用される可能性が懸念されている。しかし日本において、野兔病菌のワクチン株は未だ選定されていない。そこで、マウスに対する病原性を消失している野兔病菌 *pdpC* 遺伝子破壊株 (*pdpC* 株) がワクチンとして有効か否かを検証する事を目的とした。2 頭のカニクイザル (*Macaca fascicularis*) に生食接種 3 週間後に野兔病菌強毒株 (SCHU P9 株) を接種したところ 4 日目に野兔病を発症し、7 日目および 11 日目に重篤化した為に安楽殺を行った。一方、2 頭のカニクイザルに生食接種 3 週間後に *pdpC* 株を接種しても発症はしなかった。そこで、*pdpC* 株で免疫した 3 週間後に強毒株を接種したところ、2 頭中 1 頭が非致死性の野兔病を発症したが、2 頭共に 3 週間生残した。この結果から、カニクイザルにおいて *pdpC* 株はワクチンとして有効である可能性が示唆された。また、C57BL/6J マウスについても同様の試験を行った。しかし *pdpC* 株で免疫しても、強毒株接種後のマウス生存率は 20%であった。マウスは野兔病菌に対して非常に感受性の高い動物として知られている事から、免疫回数や接種量等の検討が更に必要と考えられた。以上の結果から、野兔病菌 *pdpC* 株はワクチンとして有効である可能性が示唆されたものの、更に検討を要する事が明らかとなった。

### A. 研究目的：

野兔病菌 (*Francisella tularensis*) は非常に高い感染力と致死率を有するグラム陰性桿菌で、日本および諸外国においてバイオテロ対策上重要性の高い菌の一つとして分類されている。

野兔病菌に感染した野兔病患者は、米国および北欧において毎年 100 例以上の患者が報告されている。日本では終戦直後には毎年 50 例以上の患者が報告されていたが、最近 10 年では 2008 年に千葉県、青森県、和歌山県が

ら 5 例報告されたのが最後で、日本国内では近年では稀な感染症となっている。

野兔病菌感染防御に最も有効な手段はワクチン接種である事が知られており、旧ソ連では弱毒生ワクチン (RV 株)、米国の一部では実験室のバイオハザード対策として弱毒生ワクチン (LVS 株) が使用されている。しかし、これらの生ワクチン株は人工培地継代によって得られた弱毒株であることから病原性復帰が容易に起こり得ると指摘されており、実際にそれを疑う様な事例も発生している。

一方、日本では野兎病菌のワクチン株すら選定されていない。

これまでに我々は、野兎病菌の高い病原性の1つは pdpC 遺伝子に規定され、pdpC 遺伝子にイントロン (915bp) を挿入した遺伝子破壊株 ( $\Delta$ pdpC 株) は、マウスに対する病原性を消失する事を明らかにしてきた。この  $\Delta$ pdpC 株はイントロンが挿入されているため、病原性復帰の可能性が極めて低いと推測される。そこで、本申請では野兎病菌  $\Delta$ pdpC 株がワクチンとして有効か否かをカニクイザルとマウスを用いて検討する事を目的とした。

## B. 研究方法：

### 野兎病菌株

野兎病菌強毒株 (SCHU P9) は chemically defined medium (CDM) で2日間培養した後に10%グリセロール溶液に浮遊させ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保管した。野兎病菌 pdpC (弱毒) 株は TargeTron Gene Knockout System (シグマ社) および pKEK1140 プラスミド (Appl Environ Microbiol. 2008; 74(9): 2619-2626.) を用いて作出した。この pdpC 株も上記と同様に使用するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保管した。これらの培養は、biosafety level (BSL) 3 で取り扱った。

### カニクイザル

実験に使用した6頭のカニクイザルは国立感染症研究所実験用霊長類調整委員会から供給された。2頭のカニクイザルに  $10^6$  CFU/1 mL の野兎病菌 pdpC 株を皮下接種にて免疫し、その3週間後に  $1 \times 10^6$  CFU/1 mL の野兎病菌強毒株を経気道接種した (Animal No. B1 および B2)。対照として、4頭のカニクイザルに生理的食塩水を皮下接種した後、 $1 \times 10^6$  CFU/1 mL の野兎病菌 pdpC 株 (Animal No. A1 および A2) または強毒株 (Animal No. A3 および A4) を経気道接種した。カニクイザルの健康状態は6週間にわたって毎日観察した。カニクイザルの体重測定、直腸体温測定、および採血は免疫0、

2、4、7、10、14、21日目および菌接種2、4、7、10、14、17、21日目にケタラールによる麻酔下で実施した。採取した血液は多項目自動血球計算装置 vetscan (Abaxis 社) にて解析を行った。また、野兎病を発症して横臥したカニクイザルまたは生残したカニクイザルはキシラジン/ケタラール混合麻酔下で全採血を行い、安楽殺を行った。これらのカニクイザルを用いた感染実験は国立感染症研究所資源調整委員会及、同動物実験委員会の承認を受け ABSL3 で実施した。

### マウス

7週齢のマウス (C57BL/6J) は日本 SLC から購入した。これらのマウスに  $10^6$  CFU/100  $\mu\text{L}$  の野兎病菌 pdpC 株又は対照として生理的食塩水を皮下接種し、その3週間後に野兎病菌強毒株を  $100 \text{LD}_{50}$  ( $= 5 \times 10^3$  CFU/10  $\mu\text{L}$ ) 経鼻接種した。合計6週の間、毎日健康状態の確認および体重測定を行った。なお、マウス感染実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を受け ABSL3 で実施した。

## C. 研究結果：

### カニクイザルにおける野兎病菌の病原性確認試験

これまでに、野兎病菌強毒株および pdpC 株のマウスに対する病原性の差異については知見の集積が有ったが、カニクイザルにおける病原性の差異については不明であった。そこで、両株のカニクイザルにおける病原性に関する検討を行った。

生食を皮下接種した3週間後に pdpC 株を経気道接種した2頭のカニクイザル (Animal No. A1 および A2) は、菌接種後2~3日目に軽度の食欲不振が見られたが、体重減少 (図1B 黒線)、体温 (図1C 黒線)、行動および多項目自動血球計算装置 vetscan (Abaxis 社) の結果に異常は認められなかった (図2)。解剖時の肉眼所見では、Animal No. A1 において

肺の一部に体色が認められたが、その他に顕著な変化は見られなかった。

一方で、生食を皮下接種して3週間後に強毒株を経気道接種した2頭のカニクイザル (Animal No. A3 および A4) は、致死的な野兔病を発症したので安楽殺を実施した。

Animal No. A3 は、菌接種2日目以降に持続的な40以上の発熱 (図1C 赤線) および血小板数の減少 (図2)、4~7日目に激しい咳及びうずくまる時間が長くなり行動力の減退が認められた。更に、7日目には鼻血および横臥が見られたので、安楽殺を即日実施した。解剖時の体重は、強毒株接種前と比較して2.2%減少に留まっていた (図1B 赤線)。解剖の肉眼所見において、肺の縮退と癒着、胸水 (~15mL) および腹水 (~50mL) の貯留が観察されたが、野兔病菌の主な増殖臓器である脾臓、リンパ節や肝臓には顕著な病変は認められなかった。

Animal No. A4 は、菌接種2~10日目までの発熱と11日目の低体温 (図1C 赤線)、4~7日目に激しい咳、11日目に鼻血および横臥を確認したことから安楽殺を実施した。体重は、菌接種前と比較して解剖時には10%減少していた (図1B 赤線)。血液検査の結果では Animal No. A3 と同様の傾向を示したが、その変動幅は大きかった (図2)。解剖時の肉眼所見は、胸水および腹水の貯留が若干観察された程度であったが、肺においては病変が顕著に表れ、退縮、癒着および肺水腫が見られた (図1D)。脾臓漿膜の広範において野兔病菌コロニーとそれに誘引された白血球集団と思われる2~3mm程度の白色斑点が多数確認された (図1E)。また、体表リンパ節では、顕著な腫脹及びその断面で黒色斑が認められた。野兔病菌の主な増殖の場である肝臓においては、黄茶色に変色していた。また、脳全体にやや浮腫気味で、前頭葉の髄膜の一部が白色を呈し、脳底において3mm程度の出血巣が確認され、軽度の脳炎が疑われた。また、7~11日目の咽

頭拭い液から、野兔病菌の生菌が分離された。以上の結果から、野兔病菌強毒株を接種したカニクイザルは致死的な野兔病を発症したが、pdpC株接種群は健常であった。このことから、野兔病菌強毒株とpdpC株の病原性は、カニクイザルとマウスにおいて差異が無い事が明らかとなった。

#### カニクイザルにおける pdpC 株のワクチン効果

2頭のカニクイザルの鼠蹊部に pdpC 株を皮下投与し、免疫を行った。免疫2~7日目に鼠蹊リンパ節の腫脹が認められたが、食欲等の健康状態に異常は認められなかった。免疫3週間後に強毒株を経気道接種した2頭のカニクイザル (Animal No. B1 および B2) は各々異なる病態を示したが、2頭共に3週間生残した。Animal No. B1 は、強毒株接種後に野兔病を疑う症状を全く示さなかった。強毒菌接種21日目に解剖を実施した結果、肺右後葉の気管分岐部周辺で1mm程度程度の出血斑が認められ、気管分岐部周辺が灰色~淡褐色で脱色していたが、その他に著変は無かった。

Animal No. B2 は、pdpC株免疫時には無症状であったが、強毒株接種後2~10日目に40以上の発熱 (図1C)、2~13日目に食欲減退、6日目に咳及びうずくまる時間が長くなり行動力の減退が認められ、7日目にはヘマトクリットの上昇で確認される脱水症状が見られた (図2)。また、体重は接種前と比較して10日目には18%減少が見られたが (図1B)、致死感染群 (Animal No. A3 と A4) と比較してヒトに対する反応性は良好であった。14日目以降の食欲および行動力の回復と共に低調ながら体重が維持され、最終的には3週間生残した。多項目自動血球計算装置による解析の結果、菌接種4~7日目に抹消血からの白血球数と血小板数の減少が認められた (図2)。病理解剖肉眼所見は、肺前葉、中葉、後葉および副葉が灰色に変色し、癒着していた。特

に右後葉は広範にかけて灰色から淡褐色を呈し、脱縮が見られた。脾臓は腫大しその断面は粗造だったが、肝臓に変化は無かった。右腎臓の背側面に 0.5cm×1cm の被膜下出血を認めた。

この結果から、カニクイザルにおいて pdpC 株免疫は強毒株感染による致死性を回避する効果が認められた。

#### マウスにおける pdpC 株のワクチン効果

生食を皮下接種 3 週間後に強毒株を経鼻接種したマウスは、菌接種 4 日後から顕著な体重減少が確認され、5 日目に 50% が死亡し、8 日目までに全て死亡した(図 3)。一方、pdpC 株で免疫したマウスは 6 日目に 50% が死亡したが、20% のマウスは 3 週間生存した(図 3)。この実験条件下において、マウスに対する pdpC 株のワクチン効果は限定的である可能性が示唆された。

#### D. 考察：

野兎病菌強毒株を接種したマウスは、接種菌量に依存して野兎病発症の日数に差が見られるものの、食欲不振から生じる 25% 以上の体重減少を示した後、死亡する事は既に知られていた。一方で、我々が作出した pdpC 遺伝子欠損 (pdpC) 株は、マウスに対して病原性を全く示さない事は以前報告した。本研究では、この野兎病菌 pdpC 遺伝子破壊株 (pdpC 株) のワクチン効果についてカニクイザルとマウスを用いて検討を行った。実験開始当初は野兎病発症による致死性とカニクイザルの体重減少は相関すると考えていた。しかし図 1B で示したように、野兎病の重症化は体重減少と相関は見られるものの、致死性と一致しなかった。その他にヘマトクリットおよび血小板減少も同様に、致死性とは一致しなかった。そこで我々は、カニクイザルの横臥を野兎病発症による安楽殺の指標とした。

これまでに、5 CFU の野兎病菌強毒株を含むエアロゾルを吸引したアカゲザル (*Macaca mulatta*) は、感染 7~11 日目に死亡するとの報告されている。本研究では、バイオテロによる強毒株暴露を想定し、致死量をはるかに超える強毒株 ( $10^6$  CFU) をカニクイザルの気道に接種した。pdpC 株で免疫したカニクイザルは 3 週間生存したが、無免疫の強毒株接種対照群は接種 7 および 11 日目に安楽殺した(図 1A)。この結果から、pdpC 株はワクチンとして有効であることを示している。特に通常の感染では、 $10^6$  CFU のような大量の野兎病菌の暴露は考えられないため、より低力価の強毒株のチャレンジ試験ではより有効性が確認できると思われる。

一方で、マウスにおけるワクチン効果は限定的であった(図 3A)。野兎病菌の実験動物モデルとしてマウスが多用されているが、野兎病菌への感受性が非常に高い事も知られている。マウスに対して 2 回あるいは 3 回の pdpC 株による免疫を実施すれば、強毒株感染時の野兎病発症を抑制は可能であると考えられる。本研究で得られた結果を踏まえて、今後マウスに対する免疫方法について検討を必要である事が考えられた。

#### E. 結論

カニクイザルにおいて野兎病菌 pdpC 株はワクチンとして有効であったが、マウスにおいては更に検討を要する事が明らかとなった。

#### F. 健康危機情報

無し

#### G. 研究発表

無し

#### H. 知的所有権の取得状況

無し

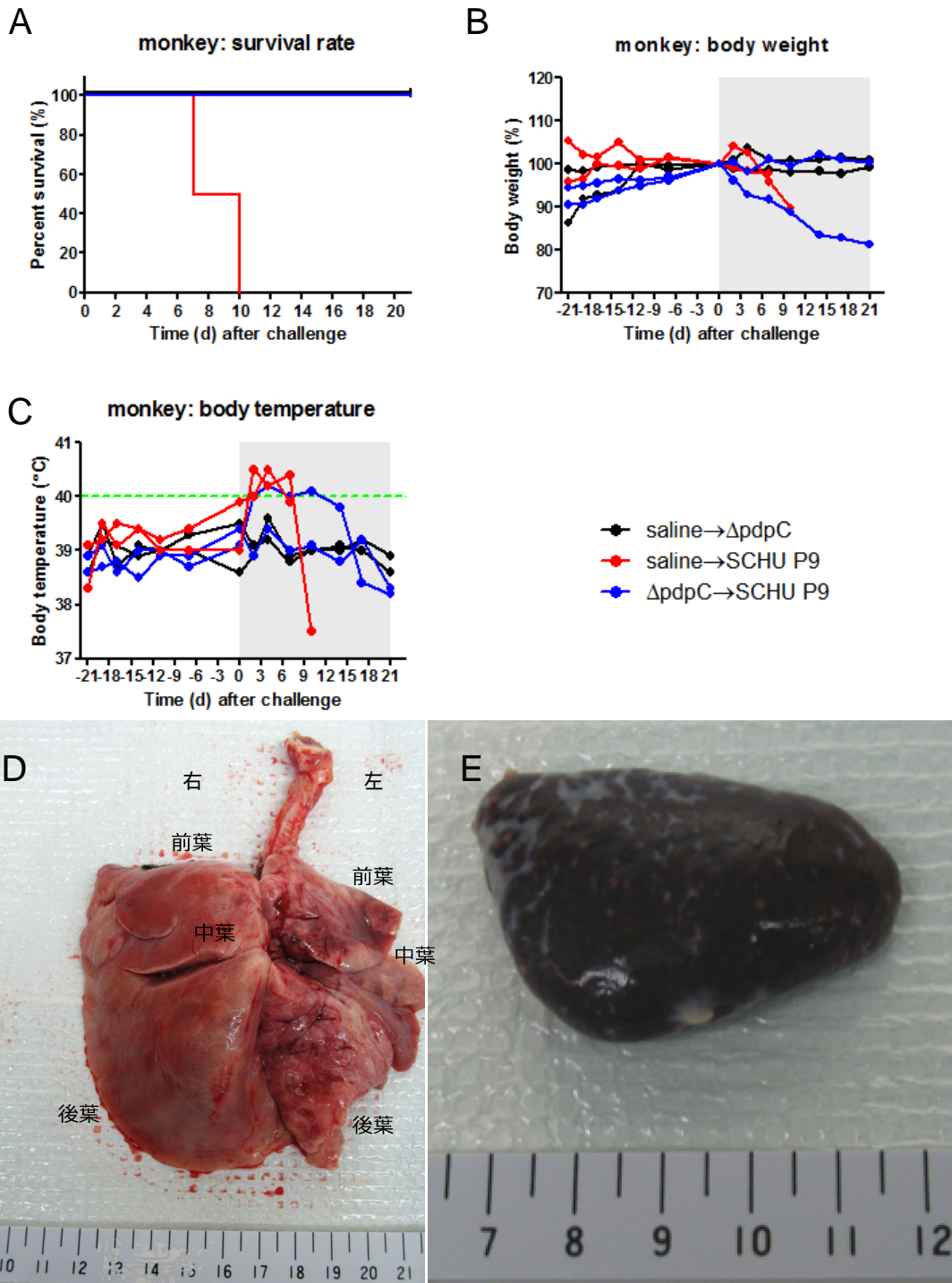


図1. カニクイザルにおける野兎病菌の病原性とワクチン効果 (A-C) 野兎病菌 pdpC株で免疫 (42d強) し、致死的な量の毒株接種 (率0d) したカニクイザルの生存率 (A)、体重変動 (B)、および直腸体温 (C) を示した (青線 食対照と接着生食種野兎病菌強毒株 (赤赤線) または pdpC株 (黒線) を接種したカニクイザルの動向も示後)。(D-E) 生食種強毒株接種による野兎病を発症したカニクイザル (Animal No. A4) の肺および脾臓の写真を示す。



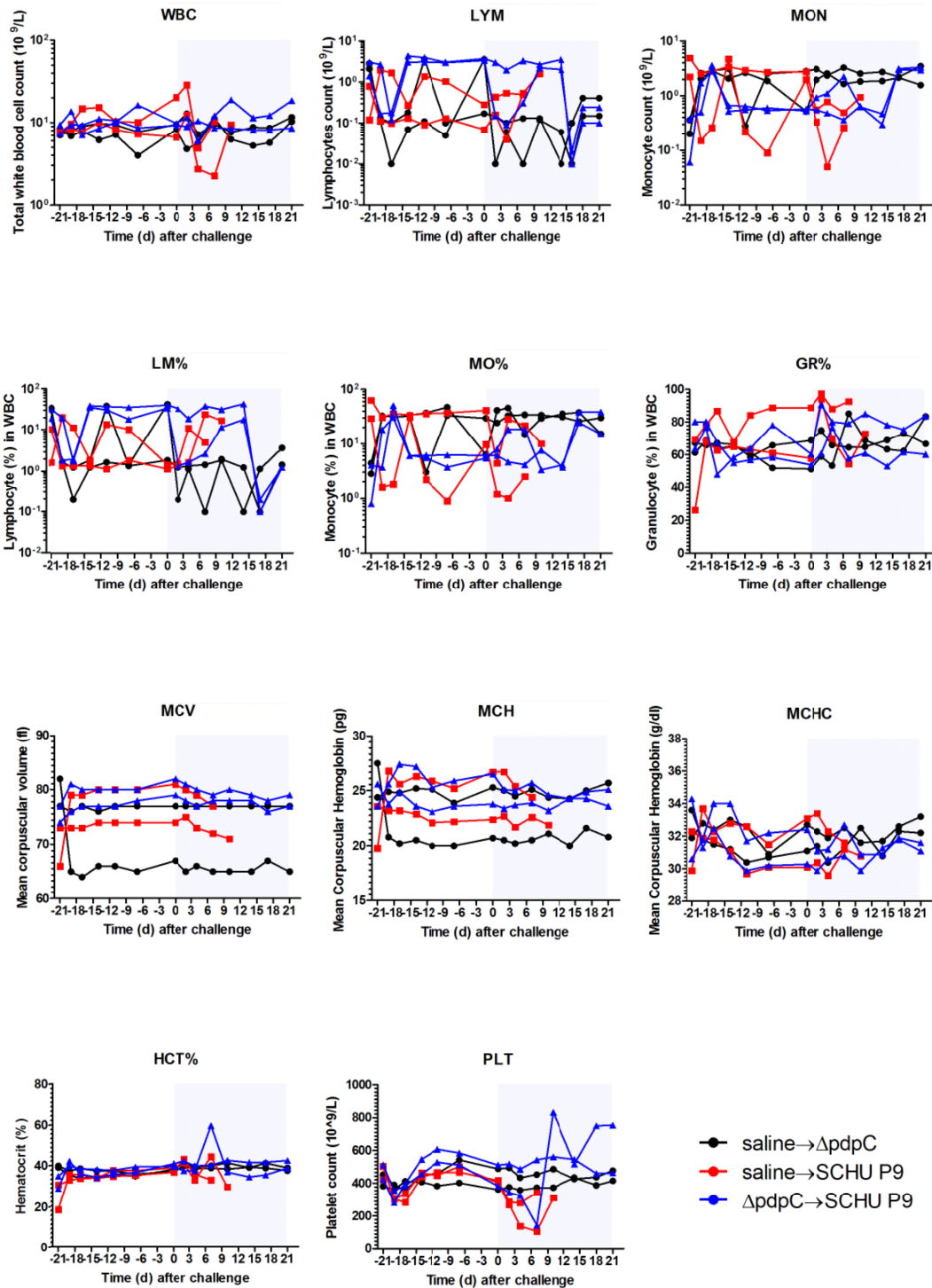


図2. カニクイザルにおける野兎病菌接種後の血液学的変動。野兎病菌 $\Delta$ pdpC株で免疫(-21d)し、致死的な量の強毒株接種(0d)したカニクイザルにおける抹消血中の白血球数(WBC)、リンパ球数(LYM)、単球(MON)、リンパ球の割合(LM%)、単球の割合(MO%)、顆粒球の割合(GR%)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、ヘマトクリット(HCT%)、血小板数(PLT)を示した(青線)。対照として生食接種後野兎病菌強毒株(赤線)または $\Delta$ pdpC株(黒線)を接種したカニクイザルの動向も示した。

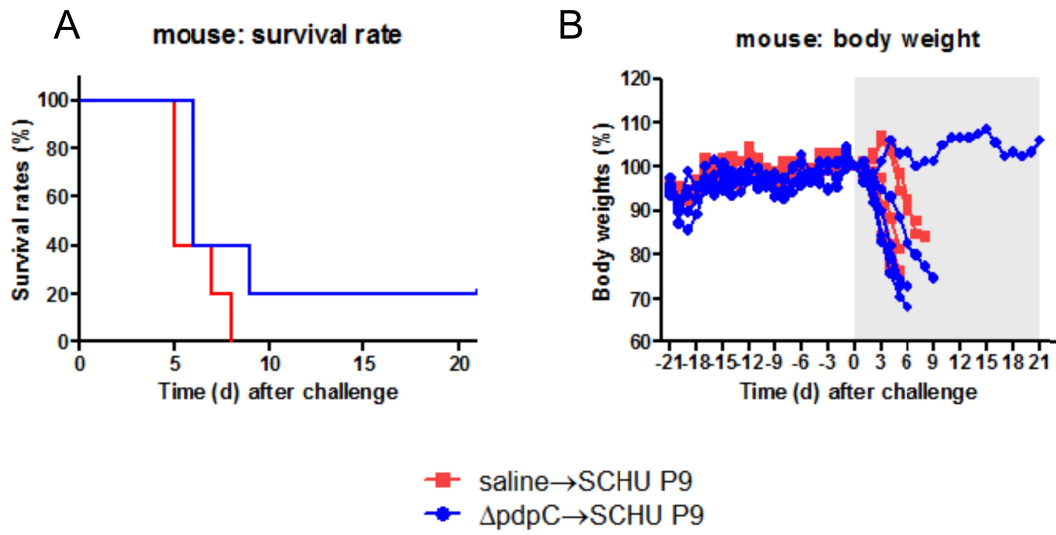


図3. マウスに対する野兔病菌の病原性とワクチン効果。野兔病菌 $\Delta$ pdpC株で免疫し、致死的な量の強毒株接種したマウスの生存率 (A) および体重変動 (B) を示した (青線)。対照として生食接種後野兔病菌強毒株 (赤線) を接種したマウスの動向も示した。



### III. 学会等発表実績

## 様式第 19

### 学会等発表実績

委託業務題目「「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究」

機関名：国立感染症研究所

#### 1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
フィリピンのコウモリからのブ テロパインオルソレオウイルス の分離（口頭発表）	6) 谷 怜、堀本泰介、J oseph Masangkay、Puentepina Rberto Jr.、大松勉、永田典代、江川和 孝、福岡藍子、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	第62回日本ウイルス学会 学術集会	2014.11	国内
無尾類(カエル)に由来するブル セラ属菌の分離と解析	木村昌伸、宇有美、 糖シル、 鈴木道雄、森茂、 剛一	第13回爬虫類・両生類の 臨床と病理のための研究 会ワークショップ	2014.11	国内

（注1）発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

（注2）本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 様式第19

### 学会等発表実績

委託業務題目「「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究」

機関名：国立感染症研究所

#### 2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
ブルセラ症 - 特集・人獣共通感染症の新しい知見	今岡浩一、木村昌伸	臨床と微生物（42(1): 27-32, 2015、近代出版）	2015	国内

（注1）発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

（注2）本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。