

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：10101  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2009～2012  
 課題番号：21405035  
 研究課題名（和文） わが国とアメリカ大陸のウイルス性人獣共通感染症の流行阻止のための研究  
 研究課題名（英文） Study for preventing epidemic of viral zoonoses in Japan and the American Continents  
 研究代表者  
 苅和 宏明（KARIWA HIROAKI）  
 北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授  
 研究者番号：70224714

研究成果の概要（和文）：メキシコのげっ歯類から3種類の新規ハンタウイルスを検出した。各種ハンタウイルス感染の検査に応用可能な抗体検出法を開発した。メキシコのハンタウイルスのヌクレオキャプシド(NP)に対して作出されたモノクローナル抗体6種類のうち5種類はげっ歯類を宿主とするハンタウイルスに対して広く反応した。ウエストナイルウイルスのE蛋白上の糖鎖の有無がニワトリのヒナにおける病原性発現に大きな影響を与えることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Three novel hantaviruses were detected in Mexican rodents. The antibody detection method for various hantavirus infections was developed. Five of six monoclonal antibodies to nucleocapsid protein (NP) of Mexican hantavirus were broadly reacted with NPs of rodent-borne hantaviruses. Glycosylation of West Nile virus E protein made great influence in the pathogenesis in chicks infected with West Nile virus.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：農学A

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症、ハンタウイルス、ウエストナイルウイルス、げっ歯類、鳥類

### 1. 研究開始当初の背景

アメリカ大陸には危険度の高いウイルス性人獣共通感染症が流行している。特に、米国などで流行しているウエストナイル熱とハンタウイルス感染症はわが国に侵入する危険性があり、感染すると重篤化しやすく致死率も高いため、侵入に対する備えが必要である。しかし、アメリカ大陸における両感染症の流行状況に関する情報は限られている。また、これらの感染症の侵入時や流行時に実

施される多検体検査に適した診断法は確立されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、ウイルス性人獣共通感染症のうち、わが国に侵入または流行の危険性があり、重篤化しやすく致死率も高いウエストナイル熱とハンタウイルス感染症について、それらの流行国において疫学調査を実施し、得られた情報を予防対策の立案に利用しよう

とするものである。また、簡便な診断法を開発することにより、流行調査の実施を容易にすることも目指している。

1) 診断法の開発：ウエストナイルウイルスやハンタウイルスは自然界の多種類の動物に感染する。したがって各種動物を対象とした疫学的研究の遂行や、検査機関での検査のための抗体や抗原検出法の開発を行う。

2) 疫学調査：ウエストナイル熱と HPS についてメキシコにおいて疫学調査を実施する。流行地域の特定や感染動物種等の情報を収集する。野生鳥獣を捕獲し、集められた材料は日本に持ち帰り、抗体測定やウイルス遺伝子の検出を行う。

3) 原因ウイルスの性状解析：検出されたウイルスについて遺伝子配列を決定し、既知のウイルスの遺伝子と比較する。

### 3. 研究の方法

#### 1) メキシコにおける疫学調査

2006年にメキシコ国内でげっ歯類の予備的な疫学調査を実施し、捕獲されたげっ歯類の約13%でハンタウイルス抗体が検出されることが判明した。そこで、メキシコのげっ歯類の調査をさらに継続し、げっ歯類の保有するウイルス遺伝子の解析を行った。また、感染げっ歯類のチトクロームb遺伝子の塩基配列をもとに、ハンタウイルスの病原巣動物となるげっ歯類種の特定を試みた。

#### 2) ハンタウイルスの抗体検出系の開発

ハンタウイルスには多くのウイルス型が存在し、各種ウイルス間で抗原性に著しい多様性のあることが知られている。また各種のげっ歯類が本ウイルスを保有するため、動物種を問わない多検体用の簡便で高感度な診断法の開発が望まれていた。そこで人に病原性を有する3種類のハンタウイルスの核蛋白質を混合して抗原とし、げっ歯類の血清中の抗体を検出するELISA系の開発を試みた。

#### 3) メキシコのハンタウイルスに対するモノクローナル抗体の作製

メキシコのハンタウイルスの組換えヌクレオキャプシド蛋白質に対するモノクローナル抗体の作出を試みた。

#### 4) ウエストナイルウイルスの鳥類における病原性発現機序の解明

ウエストナイルウイルスは鳥類と蚊をそれぞれ自然宿主と媒介動物として自然界で感染環を形成している。人や馬などが本ウイルスに感染するとしばしば脳炎や高熱を発するが、鳥類は感染しても通常は無症状のまま経過する。しかし、1999年に分離されたウエストナイルウイルスのニューヨーク株はカラスなどの鳥類に対して強い病原性を有することが知られている。ニューヨーク株がなぜ鳥類に対して強い病原性を発揮するのかについては未だに十分な解析がなされて

いない。そこで、ニューヨーク株からプラッククローニングによって得られた強毒株と弱毒株をニワトリのヒナに接種することにより、病原性発現に関連するウイルス側の因子の特定を試みた。また、ウエストナイルウイルス感染鳥類は多臓器不全で死亡することが知られているが、死亡原因を詳細に解析するために、各種臓器中のウイルス量とサイトカインの発現状況を調べた。

### 4. 研究成果

#### 1) メキシコにおけるハンタウイルス感染の疫学調査

2006年と2007年のメキシコ国内での調査で得られたげっ歯類の検体について、ウイルスのS遺伝子とげっ歯類のチトクロームb遺伝子の配列を決定した。これらの遺伝子の解析によりメキシコで新規のハンタウイルスが3種類検出され、これらをMontano、Carrizal、およびHuitzilac virusesと名付けた。これらのウイルスのうち、Montano virusとCarrizal virusが、それぞれ*Peromyscus beatae*と*Reithrodontomys sumichrasti*を宿主とすることが明らかになった。また、異なったウイルスが、宿主以外のげっ歯類種にも感染していることが判明した。感染げっ歯類の肺乳剤をシリアンハムスターやVero E6細胞へ接種することにより、ウイルス分離を試みたが、ウイルスは分離できなかった。

#### 2) ハンタウイルス感染症の診断法の開発

ハンタウイルスはげっ歯類を自然宿主として世界中に分布しており、人に感染することで腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)といったハンタウイルス感染症を引き起こす。本研究では、ハンタウイルスの血清型やげっ歯類の種にとらわれない抗原検出法と抗体検出法の開発を試みた。

抗原検出法としては各種ハンタウイルスに広い交差反応性を示すモノクローナル抗体E5/G6を用いてハンタウイルスの核蛋白質(NP)を検出するELISAを構築した。本抗原検出ELISAにより、Hantaan virus(HTNV)、Seoul virus(SEOV)およびPuumala virus(PUUV)の感染細胞とウイルス液中のNPを濃度依存的に検出できた。またPUUVに実験感染させたシリアンハムスターの肺において、感染後7日目、14日目の個体からもNPを検出できた。

抗体検出法としては、系統的に離れた3種類のハンタウイルスの組換えNPを混合して抗原として用いることで、広範囲の抗ハンタウイルス抗体の検出に対応可能なELISAを構築した。本ELISAにより、感染げっ歯類血清中や免疫ウサギ血清中のHTNV、SEOV、PUUV、Amur virusおよびSin Nombre virusのNPに

対する抗体を検出できた。PUUV を実験感染させたシリアンハムスターでは、感染後 14 日目以降の個体より抗体を検出できた。また、様々な種類の野生げっ歯類の血清を検体として抗体検出 ELISA を実施したところ、IFA と比較して敏感度、特異度がいずれも 95%以上となり、非常に信頼性の高い抗体検出法であることが判明した。

以上のことから今回構築したハンタウイルスの抗原検出法と抗体検出法がげっ歯類を対象としたハンタウイルス感染の診断法として有用であることが示された。

### 3) メキシコのハンタウイルスに対するモノクローナル抗体の作出

メキシコのハンタウイルスの一種である Montano virus の NP に対してモノクローナル抗体を作出し、メキシコのウイルスやその他のウイルスに対する反応性を比較した。その結果、作出された 6 種類の抗体のうち 5 種類はメキシコの 3 種類のウイルスに対して反応するだけでなく、南北アメリカ大陸、ヨーロッパ、およびアジア由来のげっ歯類を宿主とするハンタウイルスに対しても広く反応した。したがって、Montano virus のヌクレオキャプシドタンパク質は多種類のハンタウイルスに共通して存在する抗原領域を保有することが判明した。しかし、トガリネズミを宿主とするハンタウイルスである Thottapalayam virus に対しては、いずれの抗体も反応しなかった。本研究で作出された 6 種類のモノクローナル抗体は、いずれも核蛋白質の N 末端の非連続的なアミノ酸配列を認識していることが判明した。

### 4) ウエストナイル熱の病原性発現機序の解明

ウエストナイルウイルスの鳥類における病原性発現機序についてウエストナイルウイルスを感染させたニワトリのヒナをモデルに病態を解析した。ウエストナイルウイルスの E 蛋白上糖鎖付加株と糖鎖欠損株を 2 日齢のニワトリに接種したところ、糖鎖付加株がヒナに致死的な感染を引き起こしたのに対し、糖鎖欠損株ではほとんど病原性を示さなかった。臓器ごとのウイルス量を測定したところ、糖鎖付加株は血中および心臓、脾臓、腎臓などの臓器において高い力価のウイルスが検出された。したがって、ウエストナイルウイルスの E 蛋白上の糖鎖の有無がニワトリのヒナにおける病原性発現に大きな影響を与えることが判明した。しかし、糖鎖付加株を接種したニワトリヒナ群と糖鎖欠損株接種群の間で各種サイトカインの応答に差は見られなかった。

これによりウエストナイル熱とハンタウイルス感染症の流行阻止のための貴重な情

報と手段が得られた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 44 件)

1. Seto T, Yoshii K, Kariwa H. (11 名; 1, 9, 11 番目): Infection of Hantaan virus strain AA57 leading to pulmonary disease in laboratory mice. *Virus Res.* 163: 284-290, 2012, 査読有
2. Kariwa H, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J (18 名; 1, 15, 16, 17 番目): Genetic diversity of hantaviruses in Mexico: Identification of three novel hantaviruses from Neotominae rodents. *Virus Res.* 163: 486-494, 2012, 査読有
3. Kariwa H, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K (14 名; 1, 11, 12, 13 番目): Isolation and characterization of hantaviruses in far East Russia and etiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in the region. *Am J Trop Med Hyg*, 86: 545-553, 2012, 査読有
4. Yoshii K, Kariwa H, Takashima I (7 名; 1, 6, 7 番目): The Conserved Region in the PrM Protein Is a Critical Determinant in the Assembly of Flavivirus Particles. *J Gen Virol*, 93: 27-38, 2012, 査読有
5. Saasa N, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Kariwa H (14 名; 1, 9, 11, 12, 14 番目): The N-terminus of the Montano virus nucleocapsid protein possesses broadly cross-reactive conformation-dependent epitopes conserved in rodent-borne hantaviruses. *Virology*, 428: 48-57, 2012, 査読有
6. Saasa N, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Kariwa H (16 名; 1, 11, 13, 14, 16 番目): Ecology of hantaviruses in Mexico: Genetic identification of rodent host species and spillover infection. *Virus Res*, 168: 88-96, 2012, 査読有
7. Sanada T, Kariwa H, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K (12 名; 1, 2, 9, 10, 11 番目): Development of a diagnostic method applicable to various serotypes of hantavirus infection in rodents. *J Vet Med Sci*, 74: 1237-1242, 2012, 査読有
8. Sanada T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Kariwa H (8 名; 1, 5, 6, 7, 8 番目): Isolation of Hokkaido virus, genus Hantavirus, using a newly

- established cell line derived from the kidney of the grey red-backed vole (*Myodes rufocanus bedfordiae*). J Gen Virol, 93: 2237-2246, 2012, 査読有
9. 好井健太朗, 山崎翔子, 持舘景太, 莉和宏明, 高島郁夫: 2008年北海道におけるダニ媒介性脳炎ウイルスの分離と性状解析. 獣医畜産新報, 65:377-378, 2012, 査読無
  10. Yoshii K, Kariwa H, Takashima I (6名; 1, 4, 6番目): Construction of an infectious cDNA clone for Omsk hemorrhagic fever virus, and characterization of mutations in NS2A and NS5. Virus Res. 155: 61-68, 2011, 査読有
  11. Yoshii K, Kariwa H, Takashima I (15名; 1, 14, 15番目): Epizootiological Study of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Japan. J Vet Med Sci, 73: 409-412, 2011, 査読有
  12. Seto T, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Kariwa H (20名; 1, 15, 16, 18, 20番目): An Efficient in vivo Method for the Isolation OF Puumala Virus in Syrian Hamsters and the Characterization of the isolates from Russia. J Virol Methods, 173: 17-23, 2011, 査読有
  13. Ikawa-Yoshida A, Yoshii K, Kariwa H (6名; 1, 2, 5番目): Development of ELISA system for tick-borne encephalitis virus infection in rodents. Microbiol Immunol, 55: 100-107, 2011, 査読有
  14. Murata R, Yoshii K, Kariwa H (8名; 1, 3, 4番目): Seroprevalence of West Nile Virus in Wild Birds in Far Eastern Russia Using a Focus Reduction Neutralization Test. Am J Trop Med Hyg, 84: 461-465, 2011, 査読有
  15. Sanada T, Kariwa H, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K (9名; 1, 2, 6, 7, 8番目): Puumala virus infection in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) resembling hantavirus infection in natural rodent hosts. Virus Res, 160: 108-119, 2011, 査読有
  16. Takano A, Yoshii K, Kariwa H (6名; 1, 2, 5番目): Construction of a replicon and an infectious cDNA clone of the Sofjin strain of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. Arch Virol, 156: 1931-1941, 2011, 査読有
  17. Totani M, Yoshii K, Kariwa H and Takashima I: Glycosylation of the Envelope Protein of West Nile Virus Affects Its Replication in Chicks. Avian Diseases, 55: 561-568, 2011, 査読有
  18. Omori-Urabe Y, Yoshii K, Kariwa H (5名; 1, 2, 4番目): Needle-free jet injection of DNA and protein vaccine of the Far-Eastern subtype of Tick-borne encephalitis virus induced protective immunity in mice. Microbiol Immunol, 55: 893-897, 2011, 査読有
  19. 莉和宏明, 好井健太朗, 高島郁夫: ダニ媒介性脳炎、公衆衛生、75: 36-38, 2011, 査読無
  20. 好井健太朗, 持舘景太, 莉和宏明, 高島郁夫: 日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査、獣医畜産新報、64: 801-803, 2011, 査読無
  21. Murata R, Yoshii K, Kariwa H (10名, 1, 7, 8番目): Glycosylation of the West Nile Virus envelope protein increases in vivo and in vitro viral multiplication in birds. Am J Trop Med Hyg, 82: 696-704, 2010, 査読有
  22. Yoshii K, Kariwa H, Takashima I (6名; 1, 4, 6番目): Construction of an infectious cDNA clone for Omsk hemorrhagic fever virus, and characterization of mutations in NS2A and NS5. Virus Res, 155:61-68. 2011, 査読有
  23. Yoshii K, Kariwa H, Takashima I (15名; 1, 14, 15番目): Epizootiological Study of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Japan. J Vet Med Sci 73:409-412. 2011, 査読有
  24. 好井健太朗, 莉和宏明, 高島郁夫: ダニ媒介性脳炎, 北海道獣医師会雑誌, 54: 2-7, 2010, 査読無
  25. 村田亮, 好井健太朗, 莉和宏明, 高島郁夫: ウエストナイルウイルスの鳥類における増殖性と極東ロシアでの抗体調査, 獣医畜産新報, 63: 208-209, 2010, 査読無
  26. Kariwa H, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J (20名; 1, 17, 18, 19番目): Epidemiological study of hantavirus infection in the Samara Region of European Russia. J Vet Med Sci 71:1569-1578, 2009, 査読有
  27. Yoshii K, Kariwa H, Takashima I (8名; 1, 7, 8番目): Establishment of a neutralization test involving reporter gene-expressing virus-like particles of tick-borne encephalitis virus. J. Virol. Methods. 161: 173-176, 2009, 査読有
- 他 17 件

〔学会発表〕(計 111 件)

- 1) 好井健太郎、ダニ媒介性フラビウウイルスの病態発現機序、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012. 11. 13、グランキューブ大阪 (大阪)
- 2) 好井健太郎ら、ダニ媒介性フラビウウイルスによる中枢神経系障害に関わるウイルス因子の同定、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012. 9. 15、岩手大学 (盛岡)
- 3) Kariwa H, et al., Isolation and characterization of hantaviruses from wild rodents and epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in Russia. THE 9th JAPAN-CHINA INTERNATIONAL CONFERENCE OF VIROLOGY. 2012. 6. 13. Hokkaido University (Sapporo)
- 4) Kariwa H, et al., Epidemiology of Hantavirus Infection in Russia and the Establishment of Animal Model for Hantavirus Infection. Mini-symposium on Emerging and Re-emerging Viral Diseases in Asia. 2012. 6. 20. B-ConPlaza (Beppu)
- 5) Yoshii K. et al., Critical Determinant of Neurologic Disease of Tick-borne Flaviviruses: 46th Joint Working Conference on Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program. 2012. 6. 20. B-ConPlaza (Beppu)
- 6) 好井健太郎ら、野生マウス由来 *Oas* 遺伝子座導入コンジュニックマウスにおけるダニ媒介性脳炎ウイルスの神経病原性の解析。第 152 回日本獣医学会、2011. 9. 19、大阪府立大学 (堺)
- 7) Kariwa H, et al., Isolation and characterization of hantaviruses from wild rodents and epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in Russia. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011. 9. 15. Sapporo Convention Center (Sapporo)
- 8) Yoshii K, et al., Construction and characterization of chimeric virus between tick-borne encephalitis virus and Omsk hemorrhagic fever virus. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011. 9. 15. Sapporo Convention Center (Sapporo)
- 9) 好井健太郎、寸田祐嗣、苅和宏明、Michael R. Holbrook、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎／オムスク出血熱のキメラウイルスの作成と性状解析。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010. 11. 7、阿波銀ホール (徳島)
- 10) 好井健太郎ら、ダニ媒介性脳炎／オムスク出血熱のキメラウイルスの作成と性状解析、第 150 回日本獣医学会。2010. 9. 16、帯広畜産大学 (帯広)
- 11) Kariwa H, et al., Isolation of Amur and Hantaan viruses from wild rodents and the epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in Far East Russia. U. S.-Japan Cooperative Medical Science Program 44<sup>th</sup> Joint Working Conference on Viral Diseases. 2010. 6. 29., Hokkaido University (Sapporo)
- 12) Kariwa H, et al., Isolation of Amur and Hantaan viruses from wild rodents and the epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in Far East Russia. VIII International Conference on HFRS, HPS and Hantaviruses. 2010. 5. 21., Divani Palace Acropolis, Athens (Greece)
- 13) Kariwa H, et al., Development of diagnostic methods applicable to various serotypes of hantavirus infections. 43<sup>rd</sup> Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative medical Science Program, 2009. 7. 21., Wistar Institute, Philadelphia, (Pennsylvania, USA)
- 14) 好井健太郎ら、オムスク出血熱ウイルスの感染性 cDNA の構築、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009. 10. 26、都市センターホテル (東京)
- 15) 好井健太郎ら、オムスク出血熱ウイルスの感染性 cDNA の構築、148 回日本獣医学会学術集会、2009. 9. 27、とりぎん文化会館 (鳥取)

他 96 件

〔図書〕(計 3 件)

- 1) Kariwa H, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J (12 名, 1, , 8, 9, 10 番目): Epidemiology of hantavirus infection: Hokkaido virus and its mode of infection among the gray red-backed vole, *Myodes rufocanus*. In Animal Viruses edited by A. Maeda, Transworld Research Network, Karela, India. 2010, pp23-45
- 2) Takashima I, Kariwa H, and Shirato K.: West Nile fever. In Animal Viruses edited by Maeda A. Transworld Research Network, Karela, India. 2010, pp67-74
- 3) Yoshii K, Kariwa H, and Takashima I. Tick-borne encephalitis. In Animal Viruses edited by Maeda A. Transworld Research Network, Karela, India. 2010, pp75-87

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荻和 宏明 (KARIWA HIROAKI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：70224714

### (2) 研究分担者

有川 二郎 (ARIKAWA JIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10142704

好井 健太郎 (YOSHII KENTARO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：50421988

森松 組子 (MORIMATSU KUMIKO)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90220722