

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2005 年度～2008 年度

課題番号：17255009

研究課題名（和文）

日本と北ユーラシアのウイルス性人獣共通感染症の比較疫学的研究

研究課題名（英文）

Comparative epidemiological study of viral zoonoses in Japan and Northern Eurasia

研究代表者

高島郁夫 (TAKASHIMA IKUO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：30002083

研究成果の概要：

近年、国内外で問題となっているウイルス性人獣共通感染症のうち、侵入または流行の危険性があり、重篤に経過し致死率が高いウエストナイル熱、ダニ媒介性脳炎およびハンタウイルス感染症について診断法を開発し、疫学調査を実施し、分離ウイルスの性状解析を行った。

ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスの遺伝子鑑別診断法としてリアルタイム PCR 法を開発した。さらに準ウイルス粒子とウイルス様粒子を用いた血清学的な鑑別診断法を開発した。極東ロシアの野鳥の中和抗体を測定したところ、91 羽中 15 羽(16.5%)にウエストナイル特異的な中和抗体が検出されたことから、極東ロシアの野鳥間にウエストナイルウイルスの流行していることが示唆された。

ダニ媒介性脳炎については準ウイルス粒子を用いたヒトおよび野ネズミ用の抗体検出 ELISA を開発した。本 ELISA を用いて国内各地の野ネズミ血清について抗体調査を実施したところ、島根県の野ネズミ 58 検体中 2 検体がダニ媒介性脳炎ウイルス特異抗体陽性となり、新しいウイルス汚染地が特定された。

ハンタウイルス感染症では、ウイルス核タンパクを対象にしたヒトおよび野ネズミの抗体検出 ELISA および抗原検出 ELISA を開発した。この抗体検出 ELISA を用いてタイのレプトスピラ感染症を疑われた患者に、ハンタウイルス抗体陽性例を検出したため、ハンタウイルス感染症と症状の関連が示唆された。ロシアのボルガ川流域のサマラ市において、野ネズミの疫学調査を行い、流行中のウイルスは Puumala 型のハンタウイルスであることを明らかにした。北海道の中川町と当別町においてエゾヤチネズミの疫学調査を行い、ハンタウイルスの野ネズミ集団内では、オスがメスよりも有意に高い感染率を示すことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2006年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2007年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
総計	32,400,000	9,720,000	42,120,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：ウイルス、人獣共通感染症、疫学

1. 研究開始当初の背景

ウエストナイル熱：ウエストナイル熱は致死率 10%にも及ぶ蚊により媒介されるウイルス性人獣共通感染症である。近年世界各地でウエストナイル熱の人と馬での流行（脳炎の死亡例）が発生し問題となっている。本症は 1999 年にはアメリカ大陸では初めてニューヨーク州で流行し、その後流行は拡大し 2003 年にはほとんどの州に及び、計 9,377 名の患者が確認された。ウエストナイル熱は 1999 年にロシアのボルガ川流域にも流行が確認され、その後流行は拡大し、極東ロシアのウラジオストックでも死亡鳥類からのウイルス検出の報告がある。日本とロシアとは地理的に近く、渡り鳥又は頻繁な交流を介したウイルスの侵入が懸念されている。

ダニ媒介性脳炎：ダニ媒介性脳炎は致死率 30%にも及ぶウイルス性人獣共通感染症で、マダニ類がベクター、野生げっ歯類が病原巣動物となり自然界で病原巣を形成している。我々は北海道において人のダニ媒介性脳炎の症例を発見し、原因ウイルスを分離した。本病はロシアおよび中央ヨーロッパ各国で計 10,000 人前後の患者が発生している。2003 年には日本人旅行者がオーストリアにて本病に罹患し、死亡した。従って毎年流行

国における本病の正確な疫学情報を収集し、海外旅行者に提供する必要がある。

ハンタウイルス感染症：ハンタウイルス感染症には腎症候性出血熱（致死率 10%）とハンタウイルス性肺症候群（致死率 40%）が知られている。世界中で多くのげっ歯類が本ウイルスを保有し、人にハンタウイルス感染症を媒介する。近年これまで知られていなかった強毒ハンタウイルスが次々と発見された。ユーラシア大陸から野生げっ歯類が毎年 7 万頭以上検疫なしでペットとして輸入されており、これを介した強毒のハンタウイルス感染症の侵入の危険性が大きい。

2. 研究の目的

本研究は、近年国内外で問題となっているウイルス性人獣共通感染症のうち、侵入または流行の危険性があり、重篤に経過し致死率が高いウエストナイル熱、ダニ媒介性脳炎およびハンタウイルス感染症について診断法を開発し、それらの流行国において疫学調査を実施し、流行地の特定、流行しているウイルスの性状解明、およびウイルスの感染環の解明を行う。

得られる成績を基にこれらの感染症の侵入と流行の防止および流行地を旅行する日

本人の感染防止を計る。

### 3. 研究の方法

#### 1) 診断法の開発

ウエストナイル熱：ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスを鑑別するリアルタイム PCR を用いた遺伝子診断法とウイルス様粒子を用いた中和試験法を開発する。

ダニ媒介性脳炎：ダニ媒介性脳炎ウイルスの準ウイルス粒子(SPs)を遺伝子組み換え技術を用いて作出し、この準ウイルス粒子を抗原として、ダニ媒介性脳炎ウイルス特異的な IgM、IgG 抗体を検出するヒト用の ELISA 血清診断法を開発する。さらに準ウイルス粒子を用いて野ネズミ用の IgG ELISA 血清診断法を開発する。

ハンタウイルス感染症：ハンタウイルスの核蛋白質(NP)を標的とした抗原検出用 ELISA と核タンパクを用いた血清診断用 ELISA を開発する。

#### 2) 疫学調査

ロシア、及びタイにおいて野生鳥類および野ネズミ類を捕獲し、血液と主要臓器を採集するとともに患者血清を採集する。野生鳥類についてはウエストナイルウイルスについて抗体調査とウイルス検出を実施する。野ネズミ材料については、ハンタウイルスに対する抗体調査とウイルス遺伝子検出とウイルス分離を行う。

国内の複数の地域で野ネズミを捕獲し、血清と臓器を採集する。これらの材料につきダニ媒介性脳炎ウイルスとハンタウイルスについて抗体検出、ウイルス遺伝子検出およびウイルス分離を実施する。

#### 3) ウイルスの性状解析

ダニ媒介性脳炎ウイルス：ウイルスの E-タンパクの糖鎖付加がウイルス粒子の細胞外への放出に与える影響を調べる。

ウエストナイルウイルス：ウイルスの E-

タンパクの糖鎖の有無がマウスのマクロファージ中でのサイトカイン産生に与える影響について調べる。

ハンタウイルス：分離されたウイルスの遺伝子塩基配列を決定し、流行ウイルスの血清型を特定する。

### 4. 研究成果

ウエストナイル熱：ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスの遺伝子検出による鑑別診断法としてリアルタイム PCR 法を開発した。本法により、0.1PFU のウエストナイルウイルスを検出でき、日本脳炎ウイルスとの鑑別が可能であった。準ウイルス粒子とウイルス様粒子を用いて日本脳炎ウイルスとウエストナイルウイルスを血清学的に鑑別できる診断法を開発した。極東ロシアのウラジオストック市とハバロフスク市周辺において野鳥を捕獲し、中和抗体を測定したところ、91羽中15羽(16.5%)にウエストナイルウイルス特異的な中和抗体を検出した。これにより極東ロシアの野鳥の間にウエストナイルウイルスの汚染が広がっていることが示唆された。ウエストナイルウイルス New York 株について、マウス腹腔マクロファージにおけるサイトカイン産生を強毒株と弱毒株で比較したところ、TNF $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の発現が増強されており、ウエストナイルウイルスの毒力に関連していることが示唆された。PCR による迅速なウエストナイルウイルスレプリコンの作出法を開発した。

ダニ媒介性脳炎：準ウイルス粒子を用いたヒト用の血清診断法はダニ媒介性脳炎ウイルス特異的な IgM および IgG を検出可能で、IgG-ELISA は中和試験と比較して敏感度 98.8%、特異度 100%であった。準ウイルス粒子を用いた野ネズミ用 ELISA を用いて国内の血清疫学調査を実施したところ、島根県の 58 検体中 2 検体がダニ媒介性脳炎ウイル

ス特異抗体陽性となり新しいウイルス汚染地が特定された。北海道で分離されたダニ媒介性脳炎ウイルスの細胞外への分泌に、E-タンパクの糖鎖付加が関与していることが示された。ダニ媒介性脳炎ウイルスのレプリコンを内包したウイルス様粒子を分泌させることに成功し、さらに緑色蛍光物質やネオマイシン耐性遺伝子をレプリコンに組み込む、ウイルス様粒子内にパッケージングできたので、外来遺伝子の導入と発現が可能となった。

ハンタウイルス感染症：ハンタウイルスの核タンパクを対象としたヒトおよび野ネズミの抗体検出 ELISA および抗原検出 ELISA を開発した。この抗体 ELISA を用いてタイの不明熱患者血清の抗ハンタウイルス抗体の検査を行ったところ、レプトスピラ症を疑う患者で抗体陽性例が見出され、ハンタウイルス感染症と症状の関連が示唆された。ロシアボルガ川流域のサマラ市において野ネズミの疫学調査を行い、ヨーロッパヤチネズミに 68 匹中 6 匹に ELISA 抗体陽性例を検出した。さらに臓器中のウイルス遺伝子の解析から、流行中のウイルスは Puumala 型のハンタウイルスであることを明らかにした。北海道の中川町と当別町の森林でエゾヤチネズミの疫学調査を行い、ハンタウイルスの野ネズミ集団内では、オスがメスよりも有意に高い感染率を示すことを明らかにした。

#### 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 21 件)

1) (査読有) Yoshii K, Goto A, Kawakami K, Kariwa H, Takashima I. : Construction and application of chimeric virus-like particles of tick-borne encephalitis virus and mosquito-borne Japanese

encephalitis virus. : J. Gen. Virol. 89, 200-211, 2008

2) (査読有) Nakamura I, Yoshimatsu K, Lee BH, Okumura M, Taruishi M, Araki K, Kariwa H, Takashima I, Arikawa J: Development of a serotyping ELISA system for Thailand virus infection. : Arch. Virol. 153, 1537-1542, 2008

3) (査読有) Abu Daud NH, Kariwa H, Tkachenko E, Dzagurnova T, Medvedkina O, Tkachenko P, Ishizuka M, Seto T, Miyashita D, Sanada T, Nakauchi M, Yoshii K, Maeda A, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I: Genetic and antigenic analyses of a Puumala virus isolate as a potential vaccine strain. : Jpn. J. Vet. Res. 56, 151-165, 2008

4) (査読有) Maeda J, Takagi H, Hashimoto S, Kurane I, Maeda A: A PCR-based protocol for generating West Nile virus replicons: J. Virol. Methods 148, 244-252, 2008

5) (査読有) Abu Daud NH, Kariwa H, Tanikawa Y, Nakamura I, Seto T, Miyashita D, Yoshii K, Nakauchi M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I: Mode of Infection of Hokkaido Virus (Genus Hantavirus) among Grey Red-Backed Voles, *Myodes rufocanus*, in Hokkaido, Japan. : Microbiol. Immunol. 51, 1081-1090, 2007

6) (査読有) Okumura M, Yoshimatsu K, Kumperasart S, Nakamura I, Ogino M, Taruishi M, Sungdee A, Pattamadilok S, Ibrahim IN, Erlina S, Agui T, Yanagihara R, Arikawa J: Development of serological assays for Thottapalayam virus, an insectivore-borne Hantavirus.

Clin. Vaccine Immunol. 14, 173-181, 2007

- 7) (査読有) Pattamadilok S, Lee BH, Kumperasart S, Yoshimatsu K, Okumura M, Nakamura I, Araki K, Khoprasert Y, Dangsupa P, Panlar P, Jandrig B, Kruger DH, Klempa B, Jakel T, Schmidt J, Ulrich R, Kariwa H, Arikawa J: Geographical distribution of hantaviruses in Thailand and potential human health significance of Thailand virus. : Am. J. Trop. Med. Hyg. 75, 994-1002, 2006
- 8) (査読有) Shirato K, Miyoshi H, Kariwa H, Takashima I: The kinetics of proinflammatory cytokines in murine peritoneal macrophages infected with envelope protein-glycosylated or non-glycosylated West Nile virus. : Virus Res. 121, 11-16, 2006
- 9) (査読有) Obara M, Yoshii K, Kawata T, Hayasaka D, Goto A, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of tick-borne encephalitis using subviral particles. : J. Virol. Methods. 134, 55-60, 2006
- 10) (査読有) Shirato K, Miyoshi H, Kariwa H, Takashima I: Detection of West Nile virus and Japanese encephalitis virus using real-time PCR with a probe common to both viruses. : J. Virol. Methods. 126, 119-125, 2005

[学会発表] (計 61 件)

- 1) Takashima I, Murata R, Hashiguchi K, Kariwa H: A seroepidemiological study of a West Nile virus infection among wild birds in Far East Russia and the

relationship between glycosylation of the virus : XIVth International Congress of Virology, Istanbul (2008, 8, 12)

- 2) Kariwa H, Miyashita D, Hernandez CS, Romero-Almaraz ML, Ramos C, Seto T, Murata R, Abu Daud NH, Ishizuka M, Nakauchi M, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I : Epidemiological investigation of hantavirus infection in rodents from Mexico : XIVth International Congress of Virology, Istanbul (2008, 8, 12)
- 3) Maeda A, Maeda J, Ma H, Ke C -W, Takagi H, Takashima I, Kurane I : Epidemiological study on Flaviviruses in Guangdong province, China : 42nd Joint Viral Diseases Panels Meeting, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Nagasaki (2008, 5, 26)
- 4) Takashima I, Shirato K, Goto A, Kariwa H: Viral envelope glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. : 13<sup>th</sup> International Congress of Virology. San Francisco, U.S.A. (2005, 7, 26)
- 5) Kariwa H, Lokugamage K, Lokugamage N, Miyamoto H, Iwasa MA, Hagiya T, Araki K, Tachi A, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I: Genetic and antigenic characterization of hantavirus isolates in Amur and Far East genotypes. : 13<sup>th</sup> International Congress of Virology. San Francisco, U.S.A. (2005, 7, 26)

[図書] (計 4 件)

- 1) Maeda A, Maeda J, Murata R, Akiyama M, Kariwa H, Takashima I, Kurane I: Differential sero-diagnosis of flaviviruses using sub-viral particles and virus-like particles: Animal Viruses. Ed. Maeda A, In press, 2009
- 2) Ma H, Ke C -W, Maeda J, Takashima I, Kurane I, Maeda A: Epidemiological study of Flaviviruses in Guangdong province, China, 2005-2007: Animal Viruses. Ed. Maeda A, In press, 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高島 郁夫 (TAKASHIMA IKUO)  
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授  
研究者番号：30002083

### (2) 研究分担者

菊和 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

前田 秋彦 (MAEDA AKIHIKO)  
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授  
研究者番号：70333359

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

### (3) 連携研究者

なし