

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450438

研究課題名(和文) 新種のブニヤウイルスとラブドウイルスによる新興人獣共通感染症のリスク評価

研究課題名(英文) Risk analysis of emerging zoonotic viral diseases caused by recently identified bunyaviruses and rhabdoviruses

研究代表者

森川 茂 (MORIKAWA, Shigeru)

国立感染症研究所・獣医科学部・部長

研究者番号：00167686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：人獣共通感染症としての新興ウイルス感染症のリスクを評価した。2005年には国内の動物に感染していたことからSFTS患者が発見された2013年以前から不明発熱性疾患として患者発生があったと考えられる。比較的近縁なBhanjaウイルスは、未だ国内にウイルスが浸淫していないと考えられた。また、SFTSとBhanjaウイルスは血清学的にほとんど交差しなかった。SFTS患者は発生しているが、Bhanjaウイルスのリスクは国内においては殆どないと考えられる。Bas Congoウイルスと国内で分離されたOita、Fukuokaウイルスは分子系統樹解析から遺伝的に異なり、血清学的にも交差しなかった。

研究成果の概要(英文)：The risk of emerging virus infection as a zoonotic infection was evaluated in Japan. SFTSV was infected before 2005, so that SFTS, a first human case identified in Japan in 2013 was existed as unknown febrile illness. Bhanja virus, which is relatively related to SFTSV, was considered to be not immersed in the domestic virus yet in Japan. We found SFTS and Bhanja virus were serologically cross-reacted very little if any. The risk of Bhanja virus is considered to be very low in Japan. Domestic Oita virus and Fukuoka virus were differed genetically from Bas Congo virus by phylogenetic analysis and they did not cross-reacted each other serologically.

研究分野：新興ウイルス感染症、人獣共通感染症

キーワード：人獣共通感染症 新興ウイルス感染症

### 1. 研究開始当初の背景

研究申請時の平成 25 年の時点では、人獣共通感染症としての新興ウイルス感染症が相次いで発生した。2009 年には中国で重症熱性血小板減少症候群(SFTS)が発生し、2011 年に新種のプニヤウイルスが同定された。2004 年にはアフリカでウイルス性出血熱患者から新種のラプトウイルス( Bas-Congo ウイルス) が同定された。

### 2. 研究の目的

近年、新興ウイルス感染症の発生が相次いでいるが、大部分が人獣共通感染症である。2009 年には中国で発熱を伴う血小板減少症候群(SFTS)が発生し、米国でも同様の症例 2 例が報告された。また、アフリカでウイルス性出血熱患者から新種のラプトウイルス( Bas-Congo ウイルス) が同定された。SFTS の発生地とファトゲチマダニ媒介性から、SFTS ウイルスや近縁ウイルスが日本に存在する可能性がある。また Bas-Congo ウイルスに遺伝的に比較的近縁な Oita ウイルスがコウモリから分離されている。本研究では、これらや近縁なウイルスが日本にも分布するのかを解明し、公衆衛生上のリスク評価を行うことを目的とする。また、研究開始後に同定されたネコモルビリウイルスが他の動物にも感染しているかを調査し、類似ウイルスが存在するかを調べた。

### 3. 研究の方法

#### 1) SFTS ウイルスや近縁な Bhanja ウイルス抗体検出系の開発と動物の血清疫学：

SFTS・Heartland ウイルス群と遺伝的に近縁で、補体結合反応で血清学的交差のあると報告された Bhanja ウイルス群の抗体検出系の開発と疫学調査を実施した。当初の計画では、これらのウイルスの人工合成 GP 遺伝子を発現し、水疱口内炎ウイルスを用いたシュードタイプ(VSVp)を作製して抗体検査系を確立したが、研究開始後に SFTS ウイルスが国内患者から分離され、Bhanja ウイルス群が米国アルボウイルスバンクから供与を受けたため、ウイルスを用いて血清診断系を作製する方針に変更した。

SFTS ウイルスは感染細胞中の抗原量が最も多かった Huh7 細胞ライセートを用いて ELISA 抗原を作製した。蛍光抗体法(IF)は、持続感染 HeLa 細胞を樹立して用いた。また、感染細胞を一時的に酸性条件下で処理することによる細胞融合誘導により簡便にウイルス力価を測定する方法を確立した。Bhanja ウイルス群の Forecariah ウイルスと Palma ウイルスを米国から入手し、SFTS 抗原と同様に ELISA 抗原と IF 抗原を作製した。ただし、抗原の作製には Vero 細胞を用いた。Bhanja ウイルス群に対する特異抗体がないため、Forecariah ウイルスと Palma ウイルス(10<sup>6</sup>TCID<sub>50</sub>)をウサギ(日本白色種)2羽ずつに皮下接種した。

感染後 6 週間の血清を陽性対照血清とした。

#### 2) 国内のネコモルビリウイルスの動物における血清疫学：

研究開始後に同定された新規ウイルスであるネコモルビリウイルスがネコや他の動物にも感染しているかを調査し、類似ウイルスが存在するかを調べた。RT-PCR によりネコ腎組織、尿から遺伝子検出を試みた。ウイルスの N 蛋白遺伝子を人工合成し発現ベクターで HeLa 細胞に発現し IF 抗原とした。IF により血清疫学を実施した。

#### 3) Oita ウイルス及び近縁なラプトウイルスの感受性細胞の検索と感受性動物の検索：

Oita ウイルスは乳のみマウス脳でのみ増殖するため、これまで研究が進展していない。そこで、各種細胞に感染脳材料を接種して、感受性細胞を検索する。特に、他のラプトウイルスに感受性があることが知られているマウス神経芽腫由来 MNA 細胞およびハムスター肺由来 HmLu-1 細胞に注目して感受性を調べた。

#### 4) 次世代シーケンシングによる OITAV、FUKV のゲノム解析と N 遺伝子検出 realtime onestep RT-PCR 法：

OITAV、FUKV 粒子をショ糖密度勾配遠心法により簡易精製、Isogen II (ニッポンジーン社)を用いてウイルスゲノム RNA を抽出した。これを出発材料として、NEBNext Ultra RNA library Prep Kit for Illumina および NEBNext Multiple Oligos for Illumina (Index primers set 2) (Illumina 社)を用いて、cDNA ライブラリーを作製した。続いて、Miseq reagent kit nano v2 (Illumina 社)を用い、次世代シーケンサー-Miseq (Illumina 社)によりシーケンシングを行った。得られたリードについて、遺伝子解析用プログラム MePIC (感染研ゲノム情報センター提供) および MEGAN (チュービンゲン大学提供)を用いて、Megablast 解析および各リードの由来を解析した。同時に、Genomics Workbench (CLC bio 社)を用いて、Denovo sequencing を行い、contig を作成した。得られた contig からウイルスのゲノム構造を推測し、L 遺伝子領域について他のラプトウイルスと比較解析を行った。

プライマー設計プログラム Primer Express (ABI 社)を用いて、OITAV、FUKV-N 遺伝子にプライマーおよび Taqman プロブを設計し、realtime onestep RT-PCR 法を構築した。(i) 階段希釈した Oita-N あるいは Fukuoka-N cDNA、(ii) 階段希釈した各ウイルスより抽出した RNA を用いて、本法の検出限界を測定した。

#### 5) OITAV、FUKV 抗体検出 IF 法：

ハムスター肺由来 HmLu-1 細胞で増殖させた Oita ウイルス (10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml)、

Fukuoka ウイルス (10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/ml) をウサギ各 2 羽 (合計 4 羽) の耳静脈に各 1ml 接種した。接種後 27, 34, 48, 62 日目に採血を行い、中和試験により抗体価を測定した。70 日目に初回接種と同量のウイルスを追加接種し、82 日目に全採血した。

OITAV, FUKV をそれぞれ HmLu-1 細胞に接種し、翌日にトリプシン処理した細胞浮遊液を 14-well スライドガラスにスポット、乾燥し、アセトンで固定した。本抗原を用いた間接蛍光抗体法により、上記のウサギ抗血清の抗体力価を総適した。

5) 新種のプニヤウイルス (SFTS ウイルス、Heartland ウイルス)、新種モルビリウイルスと新種のラプトウイルス (Bas-Congo ウイルス) による新興ウイルス性人獣共通感染症のリスク評価

4. 研究成果

1) SFTS ウイルスや近縁な Bhanja ウイルス抗体検出系の開発と動物の血清疫学：

SFTS ウイルスに対する野生動物等の血清疫学調査は、過去に収集した血清を用いて調べた結果、2007 年にはシカ、イノシシ、イヌ、ウサギ、タヌキ等に陽性動物がいた。その後の前向き調査は、別の研究費の補助を受けて実施したが、多くの動物種が感染していることがわかった。一方、Bhanja ウイルス群のウイルスは補体結合反応で SFTS・Heartland ウイルス群と血清学的に交差するとの報告があったため、ウサギ免疫血清を用いて交差反応に関して解析した。その結果、IgG-ELISA では、SFTSV 抗体は Bhanja ウイルス群のウイルスとは全く交差しなかった。Bhanja ウイルス群のウイルスに対する抗体は SFTS ウイルスと交差するものと交差しないものがあった。交差の程度は弱かったが、Forecariah ウイルス感染ウサギ#2 は、比較的強く交差した。一方、IF では、SFTS・Heartland ウイルス群と Bhanja ウイルス群の間に血清学的交差が全く認められなかった (表 1)。

IgG-ELISA				IF			
Titers to	Forecariah	SFTS	Homo /hetero	Titers to	Forecariah	SFTS	Homo /hetero
Forecariah #1-6wpi	204,800	<100	>256	Forecariah #1-6wpi	5,120	<10	>512
Forecariah #1-4wpi	3,200	<100	>32	Forecariah #1-4wpi	160	ND	ND
Forecariah #1-2wpi	1,600	<100	>16	Forecariah #1-2wpi	ND	ND	ND
Forecariah #1-1wpi	100	<100	>1	Forecariah #1-1wpi	ND	ND	ND
Forecariah #2-6wpi	51,200	6,400	32	Forecariah #2-6wpi	5,120	<10	>512
Palma #3-6wpi	204,800	<100	>2048	Palma #3-6wpi	1,280	<10	>128
Palma #4-6wpi	25,600	<100	>256	Palma #4-6wpi	1,280	<10	>128
anti-SFTSV	<100	512,000	>5120	anti-SFTSV	<10	>6400	>640

Weak cross reaction, if any, was observed in Forecariah #2 rabbit serum. No cross reaction observed in IF test.

Forecariah, Palma : Forecariah, Palma virus感染ウサギ血清  
anti-SFTS : ウサギにSFTSV-NPをhypermimmunized

この結果から、動物の血清疫学で SFTS ウイルス抗体陽性であった検体は、Bhanja ウイルス群の対抗による交差ではないことがわかった。

一方、SFTS ウイルス抗体陽性を含む、シカ 434 頭、イノシシ 110 頭、イヌ 142 頭の血清を調べた結果、Bhanja ウイルス群の抗体保有動物は見いだせなかった。この結果は、国内には Bhanja ウイルス群は存在しないか、極めて分布が限定されると考えられた。

2) ネコモルビリウイルスの動物における血清疫学：

N 蛋白発現細胞による IF 試験で、ネコの 21%(21/100)が抗体陽性であった。年齢が高いほど抗体陽性率が高い傾向があったが有意差はなかった。遺伝子陽性は 29%で腎疾患を持つ個体に遺伝子陽性率が有意に高かった。このことからネコは約 3 割が感染していて多くは持続感染していることがわかった。また、腎疾患との関連が示唆された。ウイルス遺伝子の分子系統樹解析からは、ウイルスの地理的分布と遺伝子型には相関がないことがわかった。

一方、イヌではイヌジステンパーウイルス抗体陽性が 98%(75/78)で、2.5%(2/78)がネコモルビリウイルス抗体陽性であった。イヌジステンパーウイルス抗体陽性率が高いのはワクチン接種による抗体と考えられる。また、モルビリウイルス間での血清学的交差を調べた結果、麻疹ウイルスとイヌジステンパーウイルスは強く交差したが、ネコモルビリウイルスと麻疹ウイルス・イヌジステンパーウイルスとは血清学的に交差しなかった。この結果から、ネコモルビリウイルスまたは類似ウイルスはイヌにはほとんど感染していないこと、他のモルビリウイルスとは血清学的に交差しないことがわかった。

3) OITAV の感受性細胞の探索：

OITAV 感染乳のみマウス脳乳剤を、狂犬病ウイルスの感受性が高い MNA 細胞と、FUKV の増殖に使用している HmLu-1 細胞に接種したところ、感染後 2 日目までに CPE が観察されたことから、これらの細胞を用いて、シードウイルスを作製した。OITAV, FUKV で用いる細胞種を合わせるため、以降の実験については HmLu-1 細胞で増殖させたシードウイルスを用いた。シードウイルスの HmLu-1 細胞を用いて得られた力価は、OITAV は 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml、FUKV は 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/ml であった。

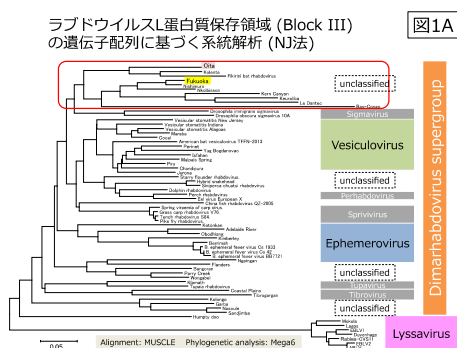
4) 次世代シーケンシングによる OITAV, FUKV の遺伝子配列解析と N 遺伝子検出 realtime one step RT-PCR 法：

illumine MiSe による次世代シーケンシングの結果、OITAV では 11,346base、FUKV では 10,850base の contig 配列が得られた。いずれも狂犬病ウイルスやその他主要なラプトウイルスと同様に 5 つの ORF があり、N, P, M, G, L に相当する蛋白質をコードし

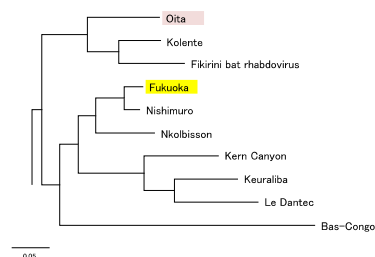
ていると推測された。

Bas-Congo ウイルスのゲノムで推測されているアクセサリー蛋白質等は確認されなかった。RNA polymerase である L 蛋白質の機能に必須と考えられ、ラプトウイルス間でよく保存されている「Block III」の約 136 残基のアミノ酸配列を用いて、OITAV, FUKV を含む 65 個のラプトウイルス配列の系統解析を行ったところ、両ウイルスは Dimarabdovirus-supergrout 内の属未分類のクラスターに含まれており、互いに比較的近縁にあたることがわかった(図 1A)。FUKV は 2008-09 年に和歌山県で採取されたイノシシ血清から分離された Nishimuro virus と最も近縁であった(図 1B)。

N 遺伝子を標的とする realtime one step RT-PCR 法を開発し、検出限界を測定したところ、Oita, Fukuoka とともに 0.6 コピー、Oita で感染価 0.04、Fukuoka で感染価 0.4 であった。



ラプトウイルスL蛋白質保存領域 (Block III) の遺伝子配列に基づく系統解析 (NJ法)



ラプトウイルスL蛋白質保存領域 (Block III) の遺伝子配列に基づく系統解析 (NJ法) (拡大)

### 5) OITAV, FUKV 抗体検出 IF 法 :

OITAV FUKV 接種 82 日後のウサギ血清の中和抗体価を測定したところ、OITAV 接種ウサギでは 2,560 倍および 1,280 倍、FUKV 接種ウサギでは 2,560 倍および 1,280 倍であった。OITAV, FUKV 両ウイルス間で交差反応は認められなかった。また、両ウイルスとも接種したウサギは、抗体が上昇したが臨床的に症状を示さなかったことから、両ウイルスとも静脈内接種ではウサギに病原性を示さないが無症候感染することがわかった。

OITAV, FUKV 感染 HmLu-1 細胞をトリプシン処理で浮遊細胞としてスポット、風乾後

にアセトン固定した抗原スライドとした。

OITAV FUKV 接種 82 日後のウサギ血清の IF 抗体価は、いずれも 40,960 倍と高力価であった。IF 法による抗体価はウイルス中和抗体価に比べて 20 倍近く高かったことから、高感度に特異抗体を検出でき血清疫学に有用と考えられた。また、OITAV, FUKV 両ウイルス間で、IF 法による血清学的交差反応は認められなかった。これらの成果から、OITAV, FUKV の抗原・抗体・遺伝子検出系が構築され、診断およびサーベイランス手法の技術的基盤が整備された。

### 6) 新種のプニヤウイルス (SFTS ウイルス、Heartland ウイルス)、新種モルビリウイルスと新種のラプトウイルスによる新興ウイルス性人獣共通感染症のリスク評価 :

人獣共通感染症としての新興ウイルス感染症のリスクを評価するため、新種のプニヤウイルス、新種モルビリウイルスと新種ラプトウイルスの遺伝的、疫学的解析を実施した。その結果、SFTS ウイルスは 2005 年には国内の動物に感染していたことから、SFTS 患者が初めて同定された 2013 年以前から国内にウイルスが存在していた。患者は不明発熱性疾患として以前から発生していたと想定される。遺伝的に比較的近縁な Bhanja ウイルス群のウイルスは、国内に抗体陽性動物が見つからなかったことから、未だ国内にウイルスが浸淫していないか極めて限局していると考えられた。また、血清学的にほとんど交差しないことがわかった。よって SFTS 患者は発生していて人獣共通感染症としてリスクが高いが、Bhanja ウイルス群のリスクは国内においては殆どないと考えられる。

研究開始後に香港でネコの新興ウイルスとして同定されたネコモルビリウイルスは国内でも 30%ほどのネコが感染していて多くは持続感染していた。また腎疾患との関連が示唆された。他のモルビリウイルスとは血清学的に交差しないことから、本ウイルスはモルビリウイルスとは別属のウイルスと考えられる。イヌにはほとんど抗体陽性がないことから、このウイルスあるいは類似ウイルスはネコに限局している可能性がある。ヒトへのリスクに関してはより調査が必要である。

新興ラプトウイルスである Bas Congo ウイルスと国内で分離された Oita, Fukuoka ウイルスは分子系統樹解析で異なるクラスターに属するウイルスであり、Oita, Fukuoka ウイルス同士も遺伝的に近縁ではないことがわかった。血清学的にも交差しなかった。これらの検査法が整備されたことからヒトへのリスクを評価するために、動物における感染状況を今後調査する必要がある。

### (倫理面への配慮)

本研究では、人に由来する材料は用いていない。また、野生動物等の材料は、害獣駆

除あるいは狩猟期に捕獲された動物に由来するため、国立感染症研究所の動物実験委員会の定める動物実験に該当しない。ウイルスのウサギ感染実験や免疫実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会の承認を得て実施された。

#### 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4件)

1. 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.* 2014, 52(9):3325-33.
2. Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, et al., Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Inf Dis.*, 2014, 209(6): 816-27.
3. Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Singh H, Suda Y, Shirabe K, Toda S, Shimazu Y, Nomachi T, Gokuden M, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, et. Al, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M. Phylogenetic and Geographic Relationships of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan. *J Infect Dis.* 2015,
4. Park ES, Suzuki M, Kimura M, Maruyama K, Mizutani H, Saito R, Kubota N, Furuya T, Mizutani T, Imaoka K, Morikawa S. Identification of a natural recombination in the F and H genes of feline morbillivirus. *Virology.* 2014, 468-470: 524-531
5. Park ES, Suzuki M, Kimura M, Mizutani H, Saito R, Kubota N, Hasuike Y, Okajima J, Kasai H, Sato Y, Nakajima N, Maruyama K, Imaoka K, Morikawa S. Epidemiological and pathological study of feline morbillivirus infection in domestic cats

in Japan. *BMC Vet Res.* 2016 Oct 11;12(1):228.

[学会発表](計8件)

1. Shigeru Morikawa. Current situation of SFTS in Japan. The 10th China-Japan- Korea Forum for Communicable Disease Control and Prevention. 1 Dec 2016, Beijing, China.
2. Shigeru Morikawa. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in Animals and Ticks in Japan. The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (CMSP) presents the 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID). 26-27 Jan 2015, Taipei, Taiwan
3. Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani, Tomoyuki Yoshikawa, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. The 16th International Congress of Virology. July 27 - August 1st, 2014. Montréal, Canada
4. 長田奈緒、濱崎千菜美、水野純子、米満研三、南昌平、楢田龍星、下田宙、高野愛、鈴木和男、森川茂、前田健. ヒトの重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス感染リスク評価における野生動物の重要性. 第159回日本獣医学会学術集会、平成28年9月6日 神奈川.
5. Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Yoshihiro Kaku, Park Eun Sil, Koichi Imaoka, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Prevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus antibodies in wild Japanese deer(日本ジカにおけるSFTSウイルス抗体保有状況). 第63回日本ウイルス学会学術集会、平成27年11月22日、福岡
6. Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Tomoki Yoshikawa, Yoshihiro Kaku, Eun-sil Park, Koichi Imaoka, Masayuki Saijo and Ken Maeda. Positive correlation between SFTS virus antibody positive rate in wild deer and number of SFTS patients. 第64回日本ウイルス学会学術集会、平成28年10月23日、札幌.
7. 朴ウンシル, 鈴木道雄, 木村昌伸, 丸山啓二, 水谷浩志, 斉藤隆一, 久保田菜美, 古谷哲也, 水谷哲也, 今岡浩一, 森川茂. 日本のネコにおける新規モルビリウイルス(feline morbillivirus, FMV)の疫学調査, 第157回日本獣医学会学術集会、平成26年9月1日, 札幌.
8. 加来義浩、奥谷晶子、河合康洋、野口章、

濱本紀子、梁瀬徹、加藤友子、新井智、井上智、森川茂、国内で分離された未分類のラブドウイルスの遺伝学的解析，第 157 回日本獣医学会 平成 26 年 9 月 1 日，札幌。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森川 茂 (MORIKAWA, Shigeru)  
国立感染症研究所・獣医科学部・部長  
研究者番号：00167686

### (2) 研究分担者

加来 義浩 (KAKU, Yoshihiro)  
国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官  
研究者番号：70392321

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )