

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS)
(英語) International Collaborative Research Program Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS)
- 研究開発課題名 : (日本語) オオコウモリを対象とした生態学調査と狂犬病関連及びその他のウイルス感染症への関与
(英語) Ecological studies on flying foxes and their involvement in rabies related and other viral infectious diseases
- 研究開発担当者 (日本語) 生命農学研究科 教授 本道栄一
所属 役職 氏名 : (英語) Professor Eiichi Hondo, Graduate School of Bioagricultural Sciences
- 実施期間 : 実施期間 : 平成28年4月1日 ~ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) オオコウモリを対象とした生態学調査と狂犬病関連及びその他のウイルス感染症への関与
開発課題名 : (英語) Ecological studies on flying foxes and their involvement in rabies related and other viral infectious diseases
- 研究開発分担者 (日本語) 本道 栄一
所属 役職 氏名 : (英語) Professor Eiichi Hondo, Graduate School of Bioagricultural Sciences

II. 成果の概要（総括研究報告）

本年度は、オオコウモリ (*Pteropus vampyrus*) の生態学調査を中心に行った。生態学調査は、西ジャワ州ガルット郡 Leuweung Sancang 保護区のおオコウモリ生息地にて 2016 年 5 月 11 日 - 25 日にかけて行った。危険な動物が数多く生息し、キャンプを張って終日観察することが安全面で問題があることから観察時間は毎日 7:00 から 17:00 とした。参加者は、日本側から本道、竹前、小林、飯田、Hengjan の 5 名、インドネシア側からは Pramono, Supratikno, Yuli, Basri, Eko の 5 名である。手法は、Scan sampling 法および Focal sampling 法によった。前者についてはクリアシート法により、基本的に 50 個体以上の群を抽出した。視界が狭いところでは 50 個体の確保が困難だったため、最低 30 個体以上かつ雌雄の個体が必ず含まれている場所を選んだ。1 時間ごとのセッションに分け、期間を通じて 800 頭のおオコウモリの行動観察を行った。Focal sampling 法では、雌雄 5 頭ずつのおオコウモリに対して 7 時間の行動観察を行った。おオコウモリの半数近くは ($46.9 \pm 10.6\%$) 睡眠行動をとっておらず活発に活動していた。おオコウモリ間での病原体の感染に関して、特筆すべきは以下の行動とその割合である、生殖行動 ($3.6 \pm 1.7\%$)、攻撃行動 ($2.4 \pm 1.7\%$)、木を伝った移動 ($2.3 \pm 1.6\%$)。また、Leuweung Sancang のおオコウモリ生息地では、おオコウモリと霊長類の接触が観察されたため、その日内回数、それによるおオコウモリ群の変化についても記録を行った。Ebony leaf monkey が、一日に 3.3 ± 0.5 回の割合でおオコウモリ群へ侵入した。また、それに伴って一日に 1.8 ± 0.3 回の割合でおオコウモリは生息地を変えた（都度、focal sampling に関しては観察個体を換えた）。さらに、地上 2.5

m のところに風速計、高度計、温度計、湿度計を設置し、各行動とこれら環境インデックスとの相関関係を算出した。以上のように、おオコウモリ群内に病原体が侵入した場合には、その感染が群内に速やかに拡散すると思われること、異種間、特に霊長類との接触が頻繁に起こっていること（姿は目にしななかったものの、おオコウモリの捕食者としてのカニクイザルが増加している）、おオコウモリの生息場の直下にはイノシシを含む様々な野生動物が通過している証拠があることから、おオコウモリの行動だけを見る限り、Garut 郡においては新たな感染症が出現するリスクが高いものと思われた。行動および環境との相関についてはすべて数値化してあるため、将来はこれらを使用して感染症出現シミュレーターが作成可能である。これら結果は、原著論文として学術雑誌へ投稿し、受理済みである。

次に、同おオコウモリ生息地を中心として、おオコウモリとヒトとの関係についてアンケート調査を行った。参加者は上述と同じである。Leuweung Sancang 自然保護区を中心に 150 名の住民に対し、一人 30 分 - 60 分かけて個人ごとの聞き取り調査方式で現状把握を行った。保護区内から 1km 以内、1-5 km 以内、5-10 km 以内の 3 区画に分け、それぞれの区域で 3-4 村 50 名ずつの個人を抽出した。当初男女同数を計画していたが、女性はほとんどおオコウモリに興味を持っていないことから、相手を男性に切り替えた。アンケート内容は、おオコウモリとヒトの接触、おオコウモリと家畜の接触、原因不明のヒトや家畜の死亡例、狂犬病等に関する住民の知識に対するものである。以下、代表的な結果のみ記述する。44.7% の住民が頻繁におオコウモリとの直接的な接触を持っていた。そのうち、95.8% がハンティングを主として行っており、34.7% は、食用としていた。4.9% はおオコウモリからの咬傷を避けるための手袋など personal protective equipment (PPE) を付けていたが、それ以外は素手で扱った。また、35.5% の住民が、おオコウモリが死んでいたり落下するのを目撃したことがあった。一方、ほとんどの住民がそれはまれな事例であると答えた。質問事項に点数を付け、総合得点によって知識度を 3 レベルに分けた。56.0% の住民が感染症に対してほとんど知識を持っておらず（最低レベル 1 狂犬病という名前は知っているが、狂犬病のイヌに咬まれても傷口を水で洗えば問題ないと思っているレベル。コウモリが危険な感染症を持っていることは全く知らない）、8.7% がレベル 3 の知識であった。一方、レベル 3 の知識であっても、狂犬病に感染したら抗生物質を飲めば治ると思っている回答者が多かった。以上の結果から、ガルット郡

の住民の狂犬病および関連感染症に関する知識は非常に低く、また、オオコウモリとの接触を頻繁に持っていることから、新興感染症が出現する潜在的なリスクは高いものと思われた。これらの結果は、国際学術雑誌に投稿した（審査中）

オオコウモリのもつ感染症に対する血清学的調査として96頭の捕獲したオオコウモリに対して血清学的調査を実施した。ELISA 技術を立ち上げるため、パイロット実験として日本脳炎やこれまで山口大で確立している様々なウイルスに対する血清学的調査を行い、インドネシア側 Ika, Basri, Supratikno の各氏への技術移転を行った。本研究に関するウイルスに関しては1例の二パウイルス陽性反応が検出された。

網羅的ウイルスゲノム解析については、ボゴール農科大学への機材導入の遅れのため実施していない。

日本国内

新規のウイルスが見つかったときに、それに対して迅速に抗体を作製するための迅速単クローン抗体作製技術の開発を行った。これまで、実験動物として我々が確立しつつある *Rousettus aegypticus* を用いて、そのリンパ球表面抗原 CD8 および CD4 に対する単クローン抗体を作製した。その過程で、ハイブリドーマのスクリーニングに迅速かつ正確な手法を開発した（シングルコロニーピックアップ法）。それによりハイブリドーマの維持にかかるコストを大幅に削減できること、最後の限界希釈が省けることから時間的にも大幅な削減が期待できる手法の開発に成功した。今後は、新規のウイルスが発見され次第、ウイルスに対する単クローン抗体を作製する。

山口大では、各種リッサウイルスに対する血清学的調査を実施するため、各リッサウイルスの組換えタンパク質を作製し、ELISA キットを作製した。また、国立感染症研究所を含むいくつかの研究機関から抗原を取得し、これらのいくつかについては日本国内の小型食虫コウモリ（ユビナガコウモリ）について実際の ELISA を実施した。それにより、日本国内のコウモリからも狂犬病様ウイルスおよび二パ様ウイルスに対する感染歴を検出した。

東京農工大では引き続き、Cocomo ソフトウェアによる様々な Multiplex PCR 用プライマーを開発し、その実効性について検証を行い、それが確認された。

Indonesia

Main activities this year were ecological studies on flying foxes (*Pteropus vampyrus*). Flying foxes, the genus *Pteropus* are considered viral reservoirs. Their colonial nature and long flight capability enhance their ability to spread viruses quickly. To understand how the viral transmission occurs between flying foxes and other animals, we investigated daytime behavior of the large flying fox (*Pteropus vampyrus*) in the Leuweung Sancang conservation area, Indonesia, by using instantaneous scan sampling and all occurrence focal sampling. The data were obtained from 0700 to 1700 hr, during May 11–25, 2016. Almost half of the flying foxes ($46.9 \pm 10.6\%$ of all recorded bats) were awake and showed various levels of activity during daytime. The potential behaviors driving disease transmission, such as self-grooming, mating/courtship, and aggression peaked in the early morning. Males were more active, and spent more time on sexual activities than females. No significant difference in time spent for negative social behavior between sexes. Positive social behaviors, especially maternal cares were performed only by females. Sexual activities and negative/positive social behaviors enable fluids exchange between bats, thus facilitate intraspecies transmission. Conflicts for living space between the flying foxes and the ebony leaf monkey (*Trachypithecus auratus*) were observed, and this caused daily roosting shifts of flying foxes. The ecological interactions between bats and other wildlife increase the risk of interspecies infection. This

study provides the details of the flying fox's behavior and its interaction with other wildlife in South-East Asia, that may help explain how pathogen spillover occur in the wild.

Flying foxes have been considered to be involved in the transmission of serious infectious diseases to humans. Using questionnaires, we aimed to determine the direct and/or indirect contacts of flying foxes in an Indonesian nature conservation area with domestic animals and humans living in the surrounding area. We surveyed 150 residents of 10 villages in West Java. Villages were classified into 3 groups: inside and/or within 1 km from the outer border of the conservation area, and 1–5 km or 5–10 km away from the reserve's outer border. Data were collected by direct interview using a structured questionnaire consisting of respondent characteristics (age, sex, occupation); histories of contacts between flying foxes and humans, dogs, and other domestic animals; and knowledge about infectious diseases, mainly rabies, in flying foxes. We found that flying foxes from the conservation often enter residential areas at night to look for food, especially during the fruit season. In these residential areas, flying foxes had direct contacts with humans and a few contacts with domestic animals, especially dogs. People who encounter flying foxes seldom used personal protective equipment such as leather gloves, goggles, and caps. The residents living around the conservation area mostly had poor knowledge about flying foxes and disease transmission. This situation shows that the population in this region is at a quite high risk for contracting infectious diseases from flying foxes.

Japan

The novel method to prepare monoclonal antibodies rapidly was developed, in case new viruses would be discovered in Indonesia. *Rousettus aegypticus* bats were used to prepare monoclonal antibodies against CD4 and CD8, which are the lymphatic cell surface antigens (*Rousettus* bats in Nagoya University have been applied them to prepare inbred strain of bats). The aim of this study were to shorten the time of screening of hybridomas, to make the accuracy of screening to go up, and to realize their cost-down (Single colony pick-up method). We achieved these objectives. We will start to prepare the monoclonal antibody against the viruses, which we try to isolate and identified, using our new method.

In Yamaguchi University, the recombinant proteins corresponding to lyssaviruses are prepared to make ELISA kit to detect the history of infections, that is, the serological studies. Also, they obtained several antigens against the viruses whose natural hosts were flying foxes from other research institutes including National Institute of Infectious diseases, Japan. To check if these antigens work well, actual ELISA test was performed using *Miniopterus fuliginosus* bats. Two bats showed positive for rabies-related and Nipah-related viruses.

In Tokyo University of Agriculture and Technology, the primers for multiplex PCR were continuously developed, the effectiveness has been confirmed.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2 件、国際誌 2 件)

1. Hengjan Yupadee, Didik Pramono, 竹前等、小林良祐、飯田敬介、安藤毅、Supratikno, Chaerul Basri, Yuli Sulistya Fitriana, Eko MZ Arifin, 前田健、Srihadi Agungpriyono, 本道栄一 インドネシア共和国西ジャワ州におけるジャワオオコウモリの行動 - 人間社会間での行動の差異 - 獣医畜産新報 70 巻 4 号 272–273 2017
2. 本道栄一、Yupadee Hengjan, 日名耕司、古本良 西表島におけるコウモリの特異な生態 獣医畜産新報 70 巻 4 号 270 - 271
3. Keisuke IIDA, Ryosuke KOBAYASHI, Yupadee HENGJAN, Nao NAGATA, Kenzo YONEMITSU,

Mitsuo NUNOME, Ryusei KUWATA, Kazuo SUZUKI, Kenji ICHIYANAGI, Ken MAEDA, Yasushige OHMORI, Eiichi HONDO. The genetic diversity of D-loop sequences in eastern bent-winged bats (*Miniopterus fuliginosus*) living in Wakayama Prefecture, Japan. J Vet Med Sci (in press)

4. Daytime behavior of *Pteropus vampyrus* in a natural habitat: the driver of viral **transmission** Yupadee Hengjan, Didik Pramono, Hitoshi Takemae, Ryosuke Kobayashi, Keisuke Iida, Takeshi Ando, Supratikno, Chaerul Basri, Yuli Sulistya Fitriana, Eko M.Z. Arifin, Yasushige Ohmori, Ken Maeda, Srihadi Agungpriyono, and Eiichi Hondo. J Vet Med Sci (in press)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. "Climate changes and emmerging infectious diseases", 口頭, Eiichi Hondo, International Symposium on Infectious Diseases and Climates (Bogor Agricultural University), 2016/8/3, 国外

2. "インドネシア共和国西ジャワ州におけるジャワオオコウモリの行動 - 人間社会間での行動の差異 -", 口頭, Hengjan Yupadee, Didik Pramono, 竹前等、小林良祐、飯田敬介、安藤毅、Supratikno, Chaerul Basri, Yuli Sulistya Fitriana, Eko MZ Arifin, 前田健、Srihadi Agungpriyono, 本道栄一, 国立感染症研究所戸山庁舎 (共用第1会議室), 2016/10/29, 第16回人と動物の共通感染症研究会 国内

3. "西表島におけるコウモリの特異な生態", 口頭, 本道栄一, Yupadee Hengjan, 日名耕司、古本良, 国立感染症研究所戸山庁舎 (共用第1会議室), 2016/10/29, 第16回人と動物の共通感染症研究会 国内

4. "Daytime behavior of *Pteropus vampyrus* and habitat sharing with *Trachypithecus auratus*: the possibility of disease transmission", 口頭, Y. Hengjan, D. Pramono, 竹前等, 小林良祐, K. Iida, T. Ando, S. Supratikno, C. Basri, Y. Fitriana, E. Arifin, Y. Ohmori, K. Maeda, S. Agungpriyono, E. Hondo, 第159回日本獣医学会学術集会 (日本大学), 2016/9/6, 国内

5. "The migration of eastern bent-winged bat, *Miniopterus fuliginosus* among its colonies", 口頭, Keisuke Iida, Ryosuke Kobayashi, Yupadee Hengjan, Nao Nagata, Kenzo Yonemitsu, Ryusei Kuwata, Kazuo Suzuki, Ken Maeda, Yasushige Ohmori, Eiichi Hondo, International Young Scientists' Symposium -Fusion of Science to Strengthen Young Scientist Capacity in Achieving the Global Health- (Bogor Agricultural University), 2016/11/29, 国外

6. "Quantitation of T-helper 1 cell (Th1 cell) and T-helper 2 cell (Th2 cell) from Flying Foxes (*Rousettus aegyptiacus*)", 口頭, Daorong Sila-on, Yupadee Hengjan, Ryosuke Kobayashi, Ken Maeda, Takuya Mizuno, Yasushige Ohmori, Eiichi Hondo, International Young Scientists' Symposium -Fusion of Science to Strengthen Young Scientist Capacity in Achieving the Global Health- (Bogor Agricultural University), 2016/11/29, 国外

7. "Daytime behavior of *Pteropus vampyrus* and habitat sharing with *Trachypithecus auratus*: the possibility of disease transmission between flying foxes and primates in Indonesia", 口頭, Yupadee Hengjan, Didik Pramono, Hitoshi Takemae, Ryosuke Kobayashi, Keisuke Iida, Takeshi Ando,

Supratikno, Chaerul Basri, Yuli Sulistya Fitriana, Eko M.Z. Arifin⁶, Yasushige Ohmori, Ken Maeda, Srihadi Agungpriyono, Eiichi Hondo, International Young Scientists' Symposium -Fusion of Science to Strengthen Young Scientist Capacity in Achieving the Global Health- (Bogor Agricultural University), 2016/11/29, 国外

8. "Regulation of the Endometrial Receptivity; How Is the Implantation Window Closed?", 口頭, Ryosuke Kobayashi, Jumpei Terakawa, Tsutomu Omatsu, Yupadee Hengjan, Tetsuya Mizutani, Yasushige Ohmori, Eiichi Hondo, International Young Scientists' Symposium -Fusion of Science to Strengthen Young Scientist Capacity in Achieving the Global Health- (Bogor Agricultural University), 2016/11/29, 国外

9. "Molecular interaction of *Toxoplasma gondii* RON complex and host cell cytoskeleton", 口頭, Hitoshi Takemae, International Young Scientists' Symposium -Fusion of Science to Strengthen Young Scientist Capacity in Achieving the Global Health- (Bogor Agricultural University), 2016/11/29, 国外

10. "Morphological study of cutaneous wound healing in mice", 口頭, Mei Muramatsu, Ryosuke Kobayashi, Yasushige Ohmori, Eiichi Hondo, International Young Scientists' Symposium -Fusion of Science to Strengthen Young Scientist Capacity in Achieving the Global Health- (Bogor Agricultural University), 2016/11/29, 国外

11. "ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL OF THE CRUDE EXTRACTS OF MORINGA OLEIFERA LAM., LANTANA CAMARA LINN., AND PTERIS ENSIFORMIS BURM. F. IN A DINITROCHOLOROBENZENE-INDUCED DERMATITIS IN ICR MICE", 口頭, Karla Cristine C. Doysabas, Helen A. Molina, International Young Scientists' Symposium -Fusion of Science to Strengthen Young Scientist Capacity in Achieving the Global Health- (Bogor Agricultural University), 2016/11/29, 国外

12. "Immunology of bats", 口頭, 小林良祐, International Symposium on Infectious Diseases and Climates (Bogor Agricultural University), 2016/8/3, 国外

13. "Daytime behavior of *Pteropus vampyrus* and habitat sharing with *Trachypithecus auratus*: the possibility of disease transmission among them", 口頭, Yupadee Hengjan, International Symposium on Infectious Diseases and Climates (Bogor Agricultural University), 2016/8/3, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. International symposium on infectious diseases and climates. 本 SATREPS プロジェクトによる主催 2016年8月3日 海外
2. International Young Scientists' Symposium in Bogor Agricultural University. 本 SATREPS プロジェクトによる主催 2016年11月29日 海外
3. タイトル:「科学に魅せられて」日時:平成28年11月9日 15:30~17:00 場所:福岡県立東筑高等学校 講演者:Srihadi Agungpriyono、本道栄一、小林良祐、Yupadee Hengjan、Karla Cristine Doysabas (全員講演) 国内

(4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS)

(英語) International Collaborative Research Program Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS)

研究開発課題名： (日本語) オオコウモリを対象とした生態学調査と狂犬病関連及びその他のウイルス感染症への関与

(英語) Ecological studies on flying foxes and their involvement in rabies related and other viral infectious diseases

研究開発担当者 (日本語) 名古屋大学生命農学研究科 教授 本道栄一

所属 役職 氏名： (英語) Professor Eiichi Hondo, Graduate School of Bioagricultural Sciences

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 次世代シーケンシングによるオオコウモリ由来ウイルスの解析

開発課題名： (英語) Analysis of novel and known viruses derived from flying foxes using next generation sequencer

研究開発分担者 (日本語) 水谷 哲也 農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター 教授

所属 役職 氏名： (英語) Tetsuya Mizutani Professor Research and Education Center for Prevention of Global Infectious Diseases of Animals Tokyo University of Agriculture and Technology

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 本道栄一 総括研究報告を参照。

本研究は、オオコウモリの生態学的調査、オオコウモリ由来ウイルスの分離とサーベイランスツールの開発、次世代シーケンシングを用いたオオコウモリ由来ウイルス解析の3つの柱からなっている。本年度の目的は、BSL3の稼働とともに、それらを用いた研究の遂行である。我々の分担は、オオコウモリ等から既知と未知のウイルスを網羅的に検出する技術の開発である。

これまでに取り組んできた Multiplex PCR 用プライマーについて分離されたウイルスなどを用いて有用性を示した。139 種類のウイルス属についてプライマーを設計したが（理論的には哺乳類を中心としたほぼすべてのウイルスを検出できる数）、一部のウイルス属については修正が必要なものがあることもわかった。Multiplex PCR のシステムを検証する過程で牛や豚の検体を収集し、直接次世代シーケンサーで解析したところ、コブウイルスなどの希少なウイルスが検出されたので論文として報告した。次にお Multiplex PCR のシステムについてコウモリの検体で検証する前に国内の様々な動物（牛や豚、エキゾチックアニマルなど）に感染しているウイルスについて方法を適用したところ、牛の糞便から Nebovirus や Nunnivirus など希少なウイルスが検出されたので、実際の検体についても本法の有用性が示された（オオコウモリの解析についてはボゴール農業大学において平成 29 年度に次世代シーケンサー稼働と同時に行う予定である）。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. Ito M, Kuroda M, Masuda T, Akagami M, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Naoi Y, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Ichimaru T, Mukono I, Ouchi Y, Yamasato H, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. (2017) Whole genome analysis of porcine astroviruses detected in Japanese pigs reveals genetic diversity and possible intra-genotypic recombination. *Infect Genet Evol.* 50: 38-48
2. Masataka Akagami・Mika Ito・Kazutaka Niira・Moegi Kuroda・Tsuneyuki Masuda・Kei Haga・Shinobu Tsuchiaka・Yuki Naoi・Mai Kishimoto・Kaori Sano・Tsutomu Omatsu・Hiroshi Aoki・Yukie Katayama・Mami Oba・Tomoichiro Oka・Toru Ichimaru・Hiroshi Yamasato・Yoshinao Ouchi・Junsuke Shirai・Kazuhiko Katayama・Tetsuya Mizutani・Makoto Nagai Complete genome analysis of porcine kobuviruses from feces of pigs in Japan (*Virus Genes* in press)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS)
(英語) International Collaborative Research Program Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS)
- 研究開発課題名：(日本語) オオコウモリを対象とした生態学調査と狂犬病関連及びその他のウイルス感染症への関与
(英語) Ecological studies on flying foxes and their involvement in rabies related and other viral infectious diseases
- 研究開発担当者 (日本語) 生命農学研究科 教授 本道栄一
所属 役職 氏名：(英語) Professor Eiichi Hondo, Graduate School of Bioagricultural Sciences
- 実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日
- 分担研究 (日本語) オオコウモリを対象とした生態学調査と狂犬病関連及びその他のウイルス感染症への関与
開発課題名：(英語) Ecological Studies on Flying Foxes and Their Involvement in Rabies-related and Other Viral Infectious Diseases
- 研究開発分担者 (日本語) 共同獣医学部 教授 前田 健
所属 役職 氏名：(英語) Yamaguchi University, Professor, Ken Maeda

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：名古屋大学・大学院生命農学研究科・本道栄一 総括研究報告を参照。

狂犬病ウイルスの血清疫学調査

本年度は、狂犬病感染の血清スクリーニング方法をボゴールに導入した。捕獲したコウモリ 52 頭の血清調査を実施したが、一頭も抗体陽性の個体は観察されなかった。今後もスクリーニング検査として実施する価値はあると思われる。ワクチン接種犬での有用性が示されていることから、イヌでのワクチン接種状況の調査にも使える方法である。

ウイルス分離のための基盤づくり

5 種類のコウモリ由来培養細胞を導入した。これらの細胞を用いてウイルス分離の準備中である。そ

れ以外に、アフリカミドリザル由来 Vero 細胞、ハムスター由来 BHK 細胞と HmLu-1 細胞の導入を行い、オオコウモリのサンプルからウイルス分離を開始した。現在までのところ、CPE は確認されていない。

狂犬病ウイルス以外のウイルス検査法の導入

国立感染症研究所で開発したヘンドラウイルス・ニパウイルスなどのヘニパウイルスのシンプルな抗体検出系をインドネシアに導入した。オオコウモリ 52 頭の検査を行った結果、一頭に高い抗体価を持つ陽性が疑われる個体が確認された。

北海道大学から分与していただいた 7 種類 Zaire ebolavirus, Sudan ebolavirus, Tai Forest ebolavirus, Bundibugyo ebolavirus, Reston ebolavirus, Marburg marburgvirus and Lloviu cuevavirus のフィロウイルスに対する発現プラスミドを用いた ELISA 系を導入する予定であった。しかし、国内での予備実験の結果、蛍光抗体法では十分使用できるが、ELISA に利用できるほどの発現量がないことが判明した。現在、間接蛍光抗体法あるいはイムノブロット解析での抗体検査法の有用性を検討している。

国内で我々が開発済みの日本脳炎ウイルス検査系、ゲタウイルス検査系、デングウイルス検査系、ジカウイルス検査系、ランガットウイルス検査系の導入を行った。抗日本脳炎ウイルス抗体価を保有しているオオコウモリが 80 頭中強陽性 2 頭、陽性 9 頭観察された。また、デングウイルス 2 型に高い抗体価を持つ個体が 1 頭認められた。

それ以外の感染症の血清疫学調査法の開発

狂犬病とともにコウモリ由来リッサウイルスが幾つか知られている。それらをスクリーニングするために、狂犬病ウイルス、Lagos Bat Lyssavirus、Duvenhage lyssavirus、European Bat Lyssavirus 1、European Bat Lyssavirus 2、Australian Bat lyssavirus の G 蛋白発現プラスミドの作成に成功した。現在、最後の Mokola virus の G 蛋白発現プラスミドを作成中である。また、狂犬病ウイルスの G 蛋白発現プラスミドを用いて発現解析を行った結果、間接蛍光抗体法での発現を確認できた。現在、予備実験的に ELISA を実施したが、こちらにもトランスフェクション細胞では発現量が少ないようである。

国内のキクガシラコウモリ由来ガンマヘルペスウイルスの全塩基配列の決定に成功した。このウイルスを用いた抗体検査系の準備も開始した。

国立感染症研究所よりコウモリ由来 E 型肝炎ウイルスの発現プラスミドを分与いただき、発現に成功した。発現量が少ないため ELISA には適していないことが判明し、ELISA 以外の抗体検査法の必要性が示唆された。

国内のコビナガコウモリより、1960 年代に報告があつて以降、報告のない Heramatsu ウイルスの分離に成功した。現在、Heramatsu ウイルスの性状解析を行っている。

国内のコビナガコウモリより 3 種類目となるコロナウイルスの遺伝子が検出された。現在、詳細に解析中である。

イヌの狂犬病の診断の類症鑑別法の導入

狂犬病の類症鑑別としてあげられる感染症は、同じく神経症状を引き起こす犬ジステンパーウイルスである。犬ジステンパーの診断系、ウイルス分離系を導入することにより、狂犬病の誤診をなくすることも重要となる。ちなみに我々は、犬ジステンパーの診断に関しては、すべての系を構築済みである。しかし犬の血清の回収がまだなので、本年度の導入は見送った。

Seroepidemiology of rabies virus infection

Procedure and materials of ELISA for detection of antibody against rabies virus were introduced to Bogor Agricultural University. The result of ELISA using 52 sera of Pteropus vampyrus showed no positive for antibody against rabies. This method is available for survey of rabies vaccination in dogs.

Introduction and preparation for virus isolation

Five cell lines originated from bats were introduced to Bogor Agricultural University. In addition, Vero cells, BHK cells and HmLu-1 cells were propagated in BSL-2 laboratory and started viral isolation from bat samples. Until now, we could not observe CPE on these cells.

Introduction of ELISA to detect antibody against the other viruses

ELISA to detect antibody against Nipah virus and Hendra virus were introduced from Japanese NIH to Bogor Agricultural University. The result of ELISA using 52 sera of Pteropus vampyrus showed that one bat possessed antibody against Nipah or Hendra viruses.

We are trying establishment of ELISA to detect antibody to filoviruses. Expression plasmids expressing glycoproteins of Zaire ebolavirus, Sudan ebolavirus, Tai Forest ebolavirus, Bundibugyo ebolavirus, Reston ebolavirus, Marburg marburgvirus and Lloviu cuevavirus were kindly provided by Dr. Takada (Hokkaido University). Our preliminary experiments indicated that expression of each antigens were confirmed by indirect immunofluorescent assay (IFA), but the amount of expressed proteins were not enough for ELISA. Therefore, we are planning to do IFA or immunoblot analysis for detection of antibody from bat sera.

ELISA for Japanese encephalitis virus, Getah virus, Dengue virus, Zika virus, Langkat virus were introduced into Bogor Agricultural University. Two of 80 bats were positive for JEV infection and eight were possibly positive. One bat has antibody to dengue virus.

Development of serological methods for detection of the other viruses

We are constructing expression plasmids encoding G protein of rabies virus, Lagos Bat Lyssavirus, Duvenhage lyssavirus, European Bat Lyssavirus 1, European Bat Lyssavirus 2, Australian Bat lyssavirus and Mokola virus. Our preliminary experiments indicated that expression of Rabies virus G protein was confirmed by IFA, but the amount of expressed protein seemed to be small for ELISA.

We determined complete genome sequence of Rhinolophus gammaherpesvirus 1, which is isolated from Rhinolophus ferrumequinum. Now we are establishing ELISA system for detection of antibody against this herpesvirus.

Expression plasmid encoding capsid protein of bat hepatitis E virus (HEV) were kindly provided by Japanese NIH. Our experiments indicated that expression of capsid protein of bat HEV was confirmed by immunoblot analysis, but the amount of expressed protein were too small. The other method for expression of capsid protein of bat HEV should be developed.

We succeeded in isolation of Heramatsu virus from Miniopterus fuliginosus in Japan. Now character of Heramatsu virus were analyzed.

Novel third coronavirus was detected from Miniopterus fuliginosus.

Introduction of diagnostic methods for differentiation from rabies

Canine distemper virus caused neurological diseases in dogs and the symptom is similar to rabies. So we have already established PCR and ELISA for detection of CDV infection.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1 件、国際誌 3 件)

1. Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of Pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. *Archives of Virology* 2017 1 (In press)
2. Hatta Y, Omatsu T, Tsuchiaka S, Katayama Y, Taniguchi S, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Eres E, Cosico E, Une Y, Yoshikawa Y, Maeda K, Kyuwa S, Mizutani T. Detection of Campylobacter jejuni in rectal swab samples from Rousettus amplexicaudatus in the Philippines. *Journal of Veterinary Medical Science* 2016 Sep 1;78(8):1347-50.
3. Katoh H, Kubota T, Ihara T, Maeda K, Takeda M, Kidokoro M. Infectious chimeric mumps viruses carrying the envelope proteins of African bat 2 mumps virus were efficiently neutralized by healthy human sera. *Emerging Infectious Disease* 2016 Apr;22(4):703-6.
4. 前田 健「グローバル化と人獣共通感染症」日本臨床 特集：【新興・再興感染症－グローバル化に伴う注目すべき感染症－】(日本臨床社)2016年74(21):1948-1955

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 前田 健「熱帯感染症の国内への侵入の可能性」山口大学中高温微生物研究センター・シンポジウム 2016/11/25 (山口市山口大学)
2. Ken Maeda, Nanami Hara, Nao Nagata, Ryusei Kuwata, Hiroshi Shimoda, Kazuo Suzuki, Srihadi Agungpriyono, Tetsuya Mizutani, Eiichi Hondo. Serological test to detect antibody against rabies virus (狂犬病ウイルスに対する抗体検出法の確立) 第64回ウイルス学会学術集会2017.10.25-27 札幌コンベンションセンター (北海道)
3. 小林知也、村上 晋、松郷宙倫、神木春彦、前田 健、堀本泰介「国内のモモジロコウモリ (*Myotis macrodactylus*) から分離された新規アデノウイルス」第159回日本獣医学会学術集会 2016年9月6-8日 日本大学 (神奈川県藤沢市)
4. 南 昌平、長田奈緒、米満研三、前田 健「アライグマ集団死の死因究明」第159回日本獣医学会学術集会 2016年9月6-8日 日本大学 (神奈川県藤沢市)
5. 前田 健、原 七海、長田奈緒、杉山弘樹、南 昌平、米満研三、Dung van Nguyen、下田 宙、Agungpriyono Srihadi、水谷哲也、本道栄一、前田 健「哺乳動物及び吸血節足動物におけるラブドウイルスの調査」第31回中国四国ウイルス研究会 2016年7月9-10日 鳥取大学 (鳥取)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 前田 健「動物が運ぶ病気について」山口大学中高温微生物研究センター病原微生物部門市民向けセミナー「動物が運ぶ病気から身を守ろう！」 2017/04/07 文部科学省情報ラウンジ (東京)
2. Ken Maeda「Virus hunting from animals」Seminar in Department of Veterinary Pathology, Microbiology & Parasitology, University of Nairobi (Kenya) 2017/2/22
3. 前田 健「古い感染症と新しい感染症：いま何が流行しているのか？～獣医の先生方に知って欲しいこと～」獣医内科学アカデミー 2017/02/18 神奈川県パシフィコ横浜
4. 前田 健「野生獣からの感染症」千葉県地域衛生対策技術連絡協議会 2017/02/13 千葉県君津市文化ホール
5. 前田 健「人と動物の共通感染症 (特に SFTS) とその対策について」「小動物臨床に係る共通感染症及びその他感染症に関する」平成 28 年度第 1 回小動物部会学術講習会 (福岡国際会議場) 平成 28 年 9 月 18 日 (日)
6. 前田 健「野生動物と家畜の共通感染症および人獣共通感染症について-E 型肝炎、節足動物媒介感染症、オーエスキー病、狂犬病を中心に-」群馬県畜産協会 (前橋テルサ、群馬県) 平成 28 年 9 月 11 日 (日)

(4) 特許出願

なし