



9.

PCR法によるBウイルス・ゲノムの増幅領域 D領域: BV/HB-2A、HB-3B2 (845bp)

1 50 100 101 150 200 201 250 300 301 350 400 401 450 500 501 550 600 601 650 700 701 750 800 801 850 900 901 926

```

E2490 CCGCGCTCGGCAACGGACACCAAGCCGCCACCGTGCGCCGCGCAACTCCACCAACGGCAACTCCACCGCCGCGG
20620
16293
12930
7709642
7709609
9400371
* SMHV
E90-136
1504-11
Kumquat
101 150 200
E2490 A CCGTAGCCGGCAGCGCCGCCGCCACCAAGCGGGGCCCGCCGCCCAACTCGAGGTCGTGCCCGAGACTCCAGCCCGTTCCTCCCGTGGACTTGGCC
20620
16293
12930
7709642
7709609
9400371
* SMHV
E90-136
1504-11
Kumquat
201 250 300
E2490 CTCCCGCGGTGATCGGGGGCCCTCTCGCGCTGACCTGGCCGCCATGAGCGCCGCGCCCTCCTGCACCGGTGCTGTGACGCGCCGCCCGCGCGGGGGC
20620
16293
12930
7709642
7709609
9400371
* SMHV
E90-136
1504-11
Kumquat
301 350 400
E2490 GCCACGCGCCGCTACGTCTACGCGTGAACCCGCGAC-CCCACCCCGCCGCGGTGCTTCCGGTCCGA--CAATAAAC-GGTGATTTAATCGATT
20620
16293
12930
7709642
7709609
9400371
* SMHV
E90-136
1504-11
Kumquat
401 450 500
E2490 ATTCCGGTTCGTGCTCTGTGTGGGG--TGGGGTGCATGTGGTGGGGGAGGGATGGGAGGCGGAAATGGAAAAAGGAAGGAAAGGGTGGCGAG
20620
16293
12930
7709642
7709609
9400371
* SMHV
E90-136
1504-11
Kumquat
501 550 600
E2490 GAACGACGTGCCGCAAGCCGCAAGCGCGGGGGTGGGTGGCGGAC--GCGCGGGGCAATGTCGCCGTACCTGCCGCCCGGGAAACGCGCTTGGGA
20620
16293
12930
7709642
7709609
9400371
* SMHV
E90-136
1504-11
Kumquat
601 650 700
E2490 TGACTCATCGGG-AGGAG-SGTCAACGACGCTTTGTCTTTAAAAAGCCGGGGCCACGCAGGGGCCCGGACACCGACGATCGGTCCGGCGCGC
20620
16293
12930
7709642
7709609
9400371
* SMHV
E90-136
1504-11
Kumquat
701 750 800
E2490 GATTCCC-GCGGACGCGCTTTCTTCTCATCGGCCCGGTTTCGTCGAGAGGCGCGCTCCTCCTCCCGCTCATCGCCCA-----
20620
16293
12930
7709642
7709609
9400371
* SMHV
E90-136
1504-11
Kumquat
801 850 900
E2490 ---GAGCTTCGG-CTCGGAGACGGATGGGGCCGGCATCGCCGCGTTCGCTGCTGCTGCGTGGCGTTGCGCTGCCCGCTCCGCGGGGGGGCGCA
20620
16293
12930
7709642
7709609
9400371
* SMHV
E90-136
1504-11
Kumquat
901 926
E2490 GTACGTCGCGGTGGAGCGGTCCTGAI
20620
16293
12930
7709642
7709609
9400371
* SMHV
E90-136
1504-11
Kumquat

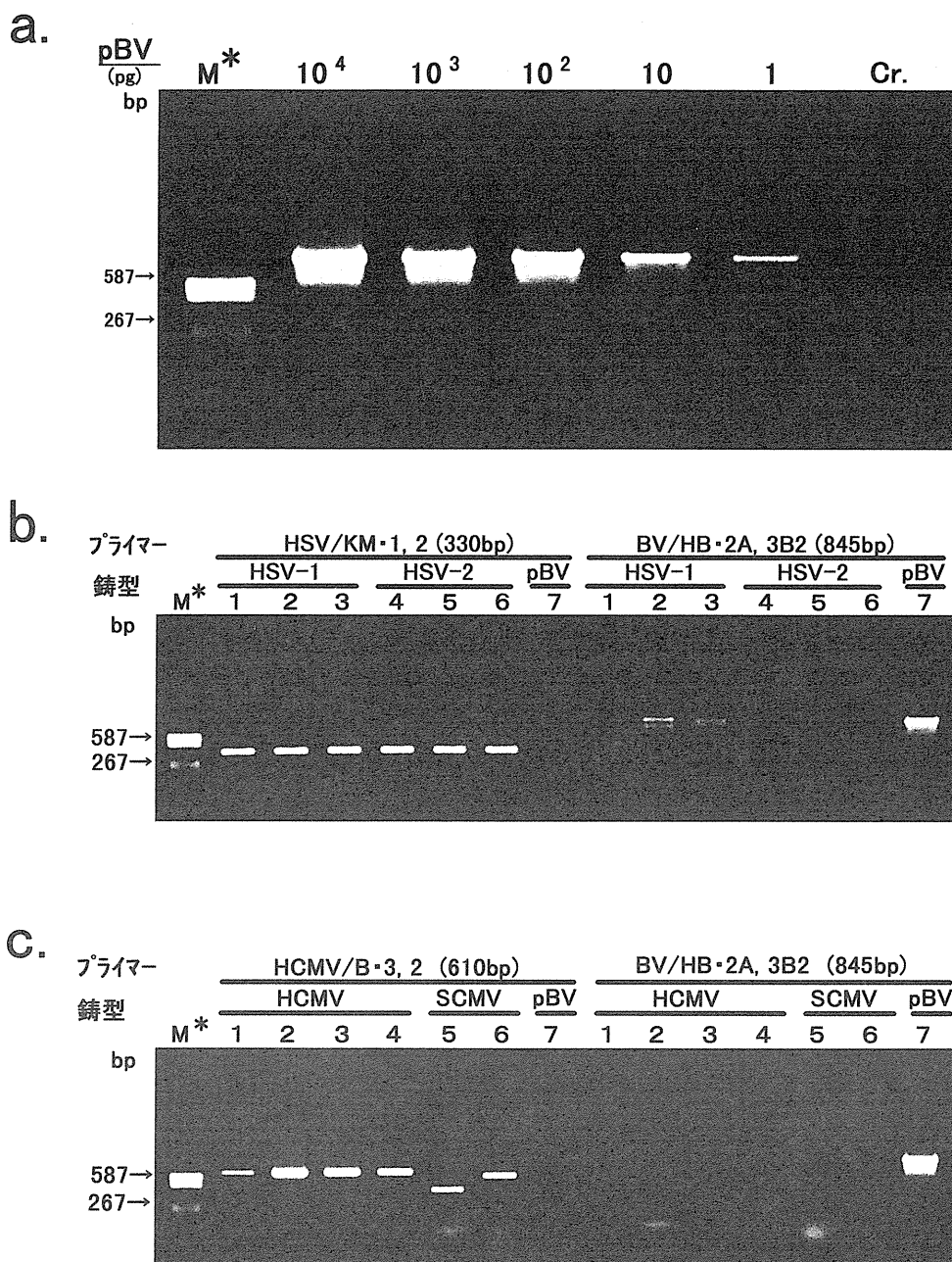
```

• Smith et al. J.Virol. 72, 1998
* Strain SMHV: Bennett et al. J. Gen. Virol., 73, 1992

領域	増幅DNA断片		G・C含有(%)		点変異
	E2490	SMHV	E2490	SMHV	
D	864bp	845bp	72	71	150

図 10.

PCR法によるBウイルスゲノムの検出
D : BV/HB-2A, 3B2プライマー (845bp)の増幅効率と特異性



- a.増幅効率: pBV(pBlueSK+2.6Kbp)/Bウイルス・プラスミドDNA/b:7, c:7
 b.HSV-1, 2型との特異性: HSV-1・DNA/1(K8)、2(K200)、3(198)
 HSV-2・DNA/4(79-29)、5(27)、6(111)
 c.HCMV,SCMVとの特異性: HCMV・DNA/1(Towne/pDNA)、2(AD₁₆₉)、3(KH)、4(OK-1)
 SCMV・DNA/5(68-1)、6(1090K)

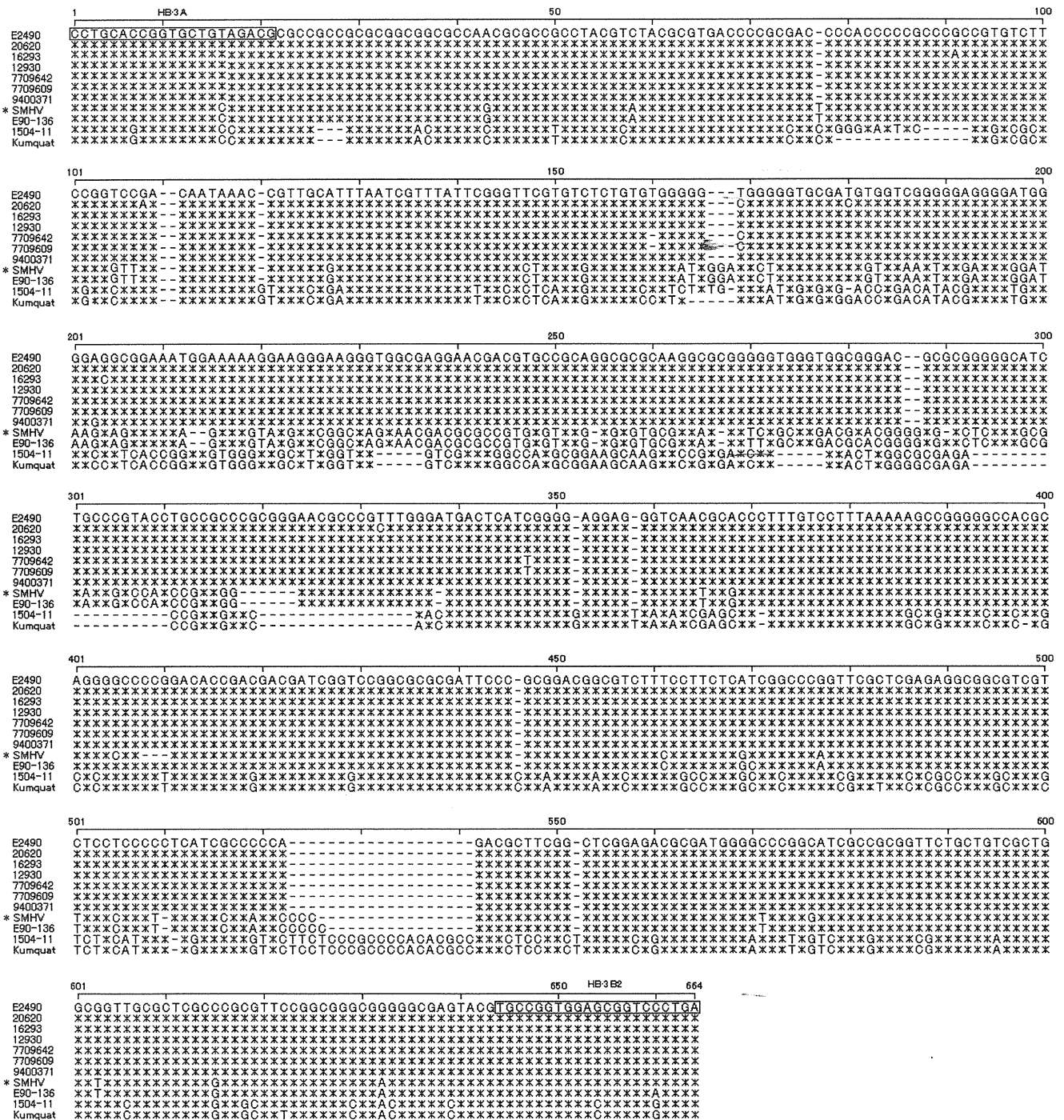
*.M: サイズマーカー

PCRの条件: 1)熱変性; 94°C 2分、2)アニーリング; 58°C 3分、
 3)伸張; 72°C 4分、4)サイクル; 30回

図 11.

PCR法によるBウイルス・ゲノムの増幅領域

F領域: BV/HB-3A、HB-3B2 (625bp)



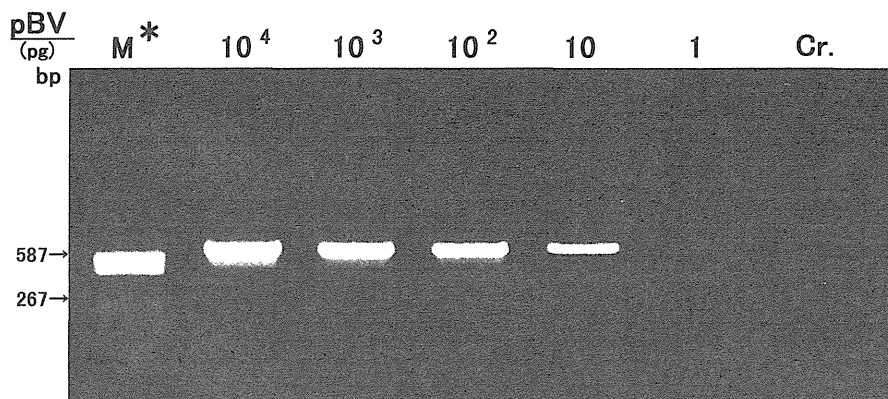
• Smith et al. J.Virol. 72, 1998
 • Strain SMHV: Bennett et al. J. Gen. Virol., 73, 1992

領域	増幅DNA断片		G+C含有 (%)		点変異
	E2490	SMHV	E2490	SMHV	
F	632bp	625bp	70	69	113

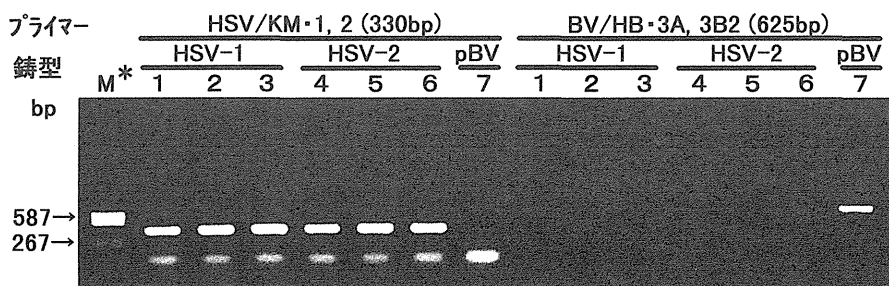
図12.

PCR法によるBウイルスゲノムの検出
 F : BV/HB-3A, 3B2プライマー (625bp)の増幅効率と特異性

a.



b.



c.



a.増幅効率:pBV(pBlueSK+2.6Kbp)/Bウイルス・プラスミドDNA/b:7, c:7

b.HSV-1, 2型との特異性:HSV-1・DNA/1(K8)、2(K200)、3(198)
 HSV-2・DNA/4(79-29)、5(27)、6(111)

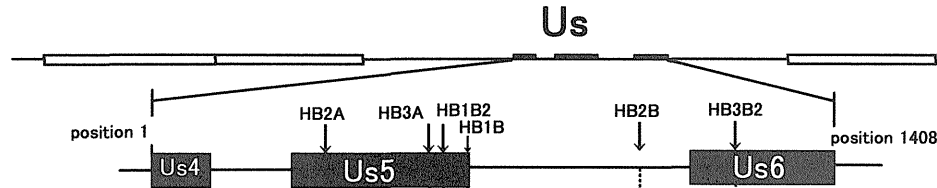
c.HCMV,SCMVとの特異性:HCMV・DNA/1(Towne/pDNA)、2(AD₁₆₉)、3(KH)、4(OK-1)
 SCMV・DNA/5(68-1)、6(1090K)

*.M: サイズマーカー

PCRの条件: 1)熱変性; 94°C 2分、2)アニーリング; 55°C 3分、
 3)伸張; 72°C 4分、4)サイクル; 30回

図13.

Bウイルスの遺伝子診断と分子疫学 結論: PCR増幅領域の特性と応用



領域	プライマー	増幅DNA断片(bp)		G・C含有(%)		点変異
		E2490	SMHV	E2490	SMHV	
A	HB2A + HB1B	307	295	77	77	41
B	HB2A + HB1B2	253	241	76	76	39
C	HB2A + HB2B	662	641	71	70	136
D	HB2A + HB3B2	864	845	72	71	150
F	HB3A + HB3B2	632	625	70	69	113

1. DNA診断

- 1) PCR法: A, B, C, F領域(複数)
- 2) ネステッドPCR法:
 - ① A領域のPCR産物 + B領域
 - ② C領域のPCR産物 + A, B領域
 - ③ D領域のPCR産物 + A, B, C領域
 - ④ F領域のPCR産物 + C領域

2. 分子疫学

- 1) 制限酵素切断解析: C, D領域
- 2) シーケンシング解析: B, C領域
- 3) DNAプローブ: A, C領域
- 4) 定量PCR: A, C領域

人獣共通原虫感染症に関する研究

分担研究者 神山恒夫 国立感染症研究所

研究要旨

バベシア症がわが国に潜在的に存在していたか否かを調べるために血清疫学調査を行った。千葉県下で1985年に採取した健常人血清1335検体を対象に*B. microti*原虫に対する抗体保有率を間接蛍光抗体法によって調べた。用いた原虫は1999年にわが国で初めて報告されたバベシア症患者由来株、1984年および1999年にそれぞれ滋賀県および北海道で捕獲された野生ネズミから分離された原虫株である。その結果、強陽性例14検体（1.05%）、陽性例12検体（0.9%）、および他の方法によって確認の必要がある疑陽性例3検体（0.22%）が認められた。この成績は従来わが国では報告されていなかった人バベシア症が、不顕性感染として存在していたことを示している。また、抗体陽性率は米国東部のバベシア感染高リスク地域に比べて低率ではあるが、これまで顕性例が報告されなかった事実を考慮すると予想以上の高い割合と考えられる。

分担研究者 神山恒夫
国立感染症研究所
獣医科学部 室長

捕獲されたアカネズミが高率にバベシア原虫に感染していたこと、類似のダニ媒介感染症であるライム病やリケッチア症が存在していることから、バベシア症についても新しい人獣共通感染症として調査・研究を行う必要性が指摘されている。

A. 研究目的

サル類を宿主とする人獣共通感染症にはマラリアをはじめとして20数種類にもおよぶ原虫疾患が含まれる。バベシア症はマラリア原虫類似の赤血球寄生原虫（*Babesia microti*）による人獣共通感染症で、自然宿主とされる野ネズミ類からダニを介してヒトに感染する。世界各地で患者の発生が報告されているが、従来わが国では患者は確認されていなかった。ヒトは原虫を保有しているダニに咬まれた後、軽度の発熱等を呈した後2週間から2カ月で自然治癒するが、発症せず感染を自覚しない場合も多いと考えられている。このような感染者では原虫は長い期間血液中に存在し、その間に健常者として献血を行う例が知られている。これが原因となる輸血による発症では、輸血患者には免疫不全者や高齢者が多いため、悪性マラリアに似た症状を現して重症化する症例が多い。アメリカではこのような輸血感染例の存在が十数年前から報告されており、警戒すべき人獣共通感染症として取り扱われている。

一方、これまでわが国では患者発生の報告はなかった。しかし、1984年には関西地区で

このような状況下で、1999年わが国で最初の患者が確認された。これは不顕性患者血液による輸血感染であった。

本研究では、バベシア症がわが国に潜在的に存在していたか否かを調べるために、過去に集められた血清を対象として抗体調査を行った。これはわが国で最初のバベシア症の血清調査である。

B. 研究方法

血清：1985年前後に千葉県下の数カ所で健常者を対象に採血を行って得られた総計1335検体の血清を用いた。これら血清は千葉県衛生研究所の許可を得て使用した。

原虫抗原：三種類の*B. microti*原虫を用いた。すなわち、1984年に京都府立医大塩田らによって滋賀県の野ネズミから分離され*B. microti*様原虫としてハムスターを用いて継代されてきた原虫（京都株）、1999年に辻らによって北海道の野ネズミから分離され、SCIDマウスを用いて継代されてきた*B. microti*原虫（北海道株）、および1999年に辻らによってわが国最初のバベシア症患者から分離されSCIDマウスを用

いて継代されてきた *B. microti* 原虫（神戸株）である。

間接蛍光抗体法：継代動物から得た感染赤血球をスライドグラスに塗抹し、アセトン固定して間接蛍光抗体抗原とした。抗体価の測定はアメリカで標準的に行われている方法に準じて行った。原虫に対する反応と、感染赤血球に対する反応を観察し、1:25 希釈を陽性限界とした。

C. 研究結果

表 1 に各原虫株を抗原とした場合の抗体陽性率の成績のまとめを示す。いずれかの株にのみ陽性反応を示す血清、および複数の原虫株に陽性反応を示す血清が認められた。この反応性の違いについては現在調査中である。全体としては 1335 件対中 26 検体、2.0% が明らかな陽性反応を示した。また 3 検体、0.22% が擬陽性であった。擬陽性血清についてはほかの方法によって反応性を確認中である。

陽性率と血清提供者の年齢、性別および居住区域に大きな特徴は認められなかった（表 2、3）。

D. 考察

バベシア原虫は 1988 年に発見されて以来、動物の感染症として問題とされてきた。1957 年にヒトのバベシア感染例が最初に報告され、人獣共通感染症として認識されるようになった。

B. microti による患者の発生は世界各地で散発的に認められ、北米東海岸に汚染地域がある。患者発生が報告される地域は中国、台湾など、世界の各地に拡大傾向にある。ヒトのバベシア症は通常は自覚することなく耐過する例が多く、北米では汚染地域の健常者における抗体陽性率は 3-5% に達すると報告されている。これら、発症を自覚しない不顕性感染者が供血者として輸血感染の原因となった例も多い。また、高齢者や脾臓摘出者等を中心に重症・致死的経過をたどる症例も問題とされている。発症・防御の機序等に関する知見はきわめて限られている。

わが国では 1999 年に最初のバベシア症患者が輸血感染例として発生し、今後野外での感染ネズミや媒介ダニとの接触や、輸血による本原虫感染の再発が危惧されている。しかし、わが国におけるバベシア原虫の生態は、野ネズミ、媒介ダニ、および人のいずれの点についても十分には明らかにされていない。

本研究では、患者の発生報告を受けて、バベシア症がわが国に潜在的に存在していたか

否かを調べるために、過去に集められた血清を対象として抗体調査を行った。抗体調査の対象とした地域は、従来ダニ咬傷が比較的多いとされていたことから、バベシア抗体の検出率が高いと予想された地域であった。

その結果、調査区域の健常人におけるバベシア抗体陽性率は当初の予想以上の高率であることが明らかになった。抗体陽性者の年齢分布、および居住区による抗体陽性率には際だった相関は認められなかった。

検体によって分離株に対する反応性に相違が認められたが、わが国で分離された原虫と北米分離株とが分子疫学的に異なることも明らかになっているので、分離原虫株間の病原性と抗原性の関連性を検討中である。

E. 結論

1999 年、人バベシア症の顕性患者がわが国で初めて確認された。これを受けて血清疫学的調査を行ったところ、わが国に以前から人バベシア症が存在していたことが明らかとなった。抗体陽性率は米国東部の *B. microti* 感染高リスク地域で報告されている陽性率に比べて低率ではあるが、これまで顕性例が報告されなかった事実を考慮すると予想以上の高い割合といえる。さらに調査地域等を広げて感染リスクを明らかにする必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyahira, Y., Kobayashi, S., Takeuchi, T., and Kamiyama, T. Induction of CD8+ T cell-mediated protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *International Immunology* 11:133-141, 1999.
2. Tsutsui, N., and Kamiyama, T. Transforming growth factor β -induced failure of resistance to infection with blood-stage *Plasmodium chabaudi* in mice. *Infection and Immunity*, 67: 2306-2311, 1999.
3. Jung, C.-G., Kamiyama, T., and T. Agui, T. Elevated apoptosis of peripheral T lymphocytes in diabetic BB rats. *Immunology* 98:590-594, 1999.
4. Yamamoto, K., Ito, K., Koura, M., and Kamiyama, T. An increased susceptibility of UB-B irradiated mice to infection with *Plasmodium chabaudi*. *Infection and Immunity*, in press.

表 1 異なる国内分離株に対する抗体陽性数

内訳	陽性数 (%)		
	強陽性 (1:100=<)	陽性 (1:25=<)	擬陽性
京都株のみに陽性	0	1	0
北海道株のみ	4	3	0
神戸株のみ	2	6	3
京都株 + 北海道株	1	0	0
京都株 + 神戸株	0	1	0
北海道株 + 神戸株	3	1	0
京都株 + 北海道株 + 神戸株	4	0	0
合計	14 (1.05)	12 (0.90)	3 (0.22)

表 2 抗体陽性者の年齢分布 (強陽性検体)

年齢	検査数	陽性数		
		男性	女性	合計 (%)
21-40	72	0	0	0
41-50	279	2	2	4 (1.43)
51-60	400	1	1	2 (0.5)
61-70	156	2	2	4 (2.56)
70<	81	0	3	3 (3.7)
不明	347	0	1	1 (0.29)
合計	1335	5	9	14 (1.05)

表 3 居住地区別の抗体陽性率 (強陽性検体)

市町	検査数	陽性数		
		男性	女性	合計 (%)
TA 市	399	3	0	3 (0.75)
TO 町	298	0	2	2 (0.67)
KA 市	224	0	1	1 (0.45)
IS 町	96	0	0	0
OT 町	318	2	6	8 (2.50)
合計	1335	5	9	14 (1.05)

