

表2. 内科系・外科系の内訳

	神戸				福岡			
内科系	内科	81	小児科	30	内科	57	小児科	18
	消化器	13	放射線科	1	消化器	10	神経内科	1
	循環器	12	透視	1	循環器	7	精神科	2
	呼吸器	3	神経内科	1	呼吸器	4	透視	1
	内分泌	3	健康管理室	1	感染症	2	健康管理科	1
	アレルギー	1	和漢診療	1	内分泌	1	行政	2
	血液	1	行政	1	血液	1		
	国際内科	1						
			(151)				(107)	
外科系	外科	39	耳鼻咽喉科	4	外科	22	救急部	3
	皮膚科	27	泌尿器科	3	皮膚科	15	脳外科	2
	眼科	11	脳外科	2	整形外科	12	血管外科	1
	産婦人科	10	救急部	3	眼科	10		
	整形外科	6	心臓外科	1	産婦人科	6		
				(106)				(71)

() : 小計

表3. 診療経験年数

診療経験年数(年)		~5	~10	~15	~20	~25	~30	~35	~40	41~	回答なし
神戸	内科系(n=151)	1	4	13	32	24	20	16	11	25	5
	外科系(n=106)	0	3	9	19	17	25	9	16	7	1
福岡	内科系(n=107)	1	2	14	24	17	10	11	16	10	2
	外科系(n=71)	1	2	7	11	14	11	8	8	9	0

表4. 疑似診断疾病の診断状況

(内科系) (回答医師数 191名 302症例)

疾病名	診断方法	診断方法					小計
		臨床経過で	検査で確定 できず	その他**	記憶なし	回答なし	
1. 赤痢		31	50	2	5	9	97
2. オウム病		32	29	3	6	2	72
3. つつが虫病		17	16	4	1	3	41
4. マラリア		10	19	5	2	1	37
5. 日本脳炎		5	11	1	0	4	21
6. エキノコックス症		5	1	0	0	3	9
7. HFRS*		1	4	0	1	0	6
8. Q熱		1	2	1	1	0	5
ライム病		1	3	0	1	0	5
10. デング熱		0	2	1	1	0	4
狂犬病		1	3	0	0	0	4
12. 炭疽		0	0	0	0	1	1

* Hemorrhagic fever with venal syndrom : 腎症候性出血熱

** (鑑別診断のため, 他科で確定, 治療診断, 状況証拠から, 患者申告)

(外科系) (回答医師数 75名 121症例)

疾病名	診断方法	診断方法					小計
		臨床経過で	検査で確定 できず	その他**	記憶なし	回答なし	
1. 赤痢		16	15	2	0	5	37
2. つつが虫病		9	7	1	1	1	19
3. マラリア		4	5	5	1	1	15
4. オウム病		7	5	1	0	1	14
5. 日本脳炎		6	4	0	2	0	13
6. ライム病		4	5	1	1	0	10*
7. 狂犬病		1	4	0	0	0	5
エキノコックス症		2	1	1	1	0	5
9. HFRS		1	0	0	0	0	1
デング熱		1	0	0	0	0	1
炭疽		1	1	0	0	0	1*

* 重複回答各1例

** (鑑別診断のため, 他科で確定して後療法, 治療診断, 患者申告)

表 5. 確定診断疾病の診断状況(回答医師数 64名 80症例)

疾病名	診断方法	病原体確定	遺伝子検出	抗体検査	その他	記憶なし	小計
		1. 赤痢	25	1			
2. オウム病		3		18	1*	1	23
3. つつが虫病		1		9	2**		12
4. マラリア		9	1				10
5. デング熱				4			4
6. エキノコックス症		1***			2***		3
7. ライム病				1			1
日本脳炎		1					1

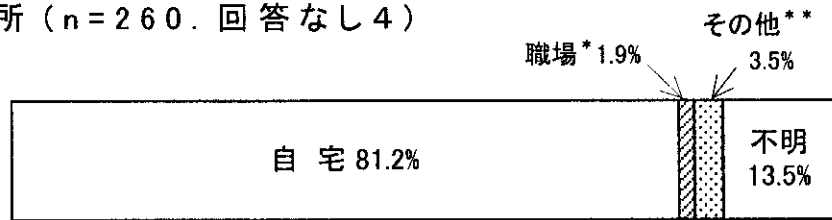
*インコ死亡、家族2人発症、治療診断

**刺口と臨床経過

***肝腫瘍による手術後の病理診断と便虫卵検査

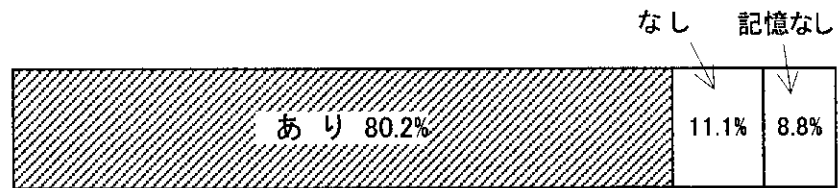
図 3. ペット動物が感染源となった症例の分析 (264 件)

i. 感染した場所 (n=260. 回答なし4)

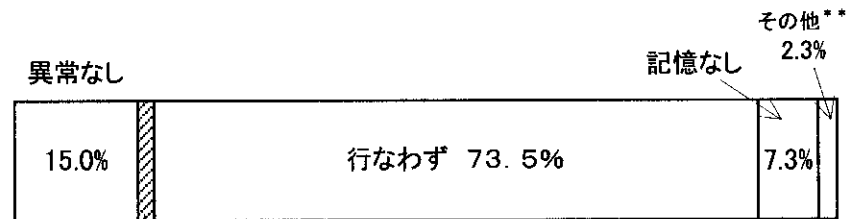


* ペットショップ勤務 3件、獣医師 1件、職場のペット 1件
 ** 学校、保育園、公園、病院、隣家等

ii. 診療区による感染源となったペット動物の確認 (n=262. 回答なし2)



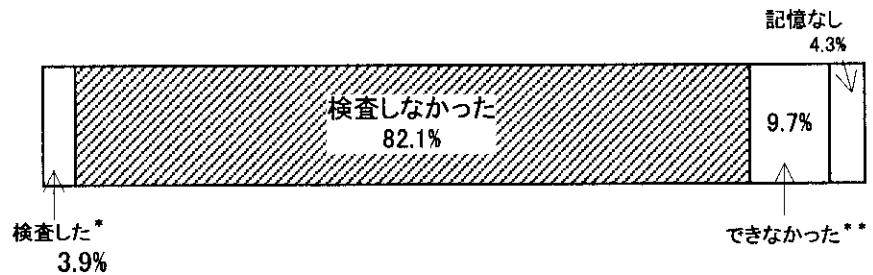
iii. 周囲の人々への健康調査 (n=260. 回答なし4)



異常あり*2.0%

* 患者と同症状
 ** 患者一人ぐらし、転医にて不明

iv. 感染源となったペット動物の検査 (n=257. 回答なし7)



* 獣医師からの連絡あり 1件を含む
 ** ペット死亡の 7例を含む

図 4. ズーノージスを疑った時の獣医師との協力 (n=401、回答なし34)

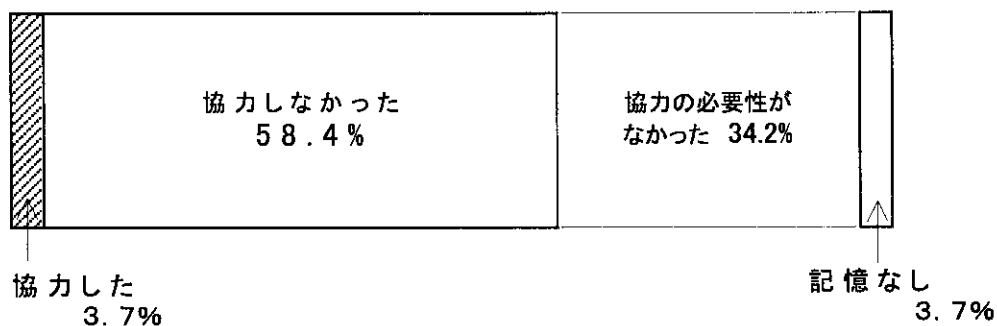
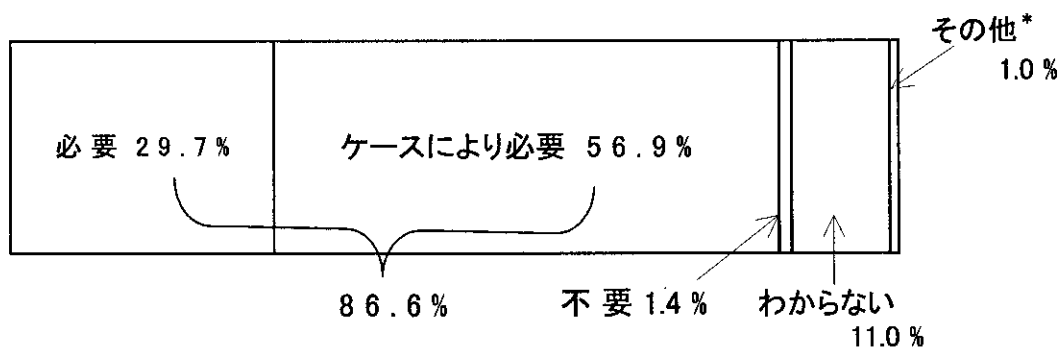


図 5. 今後ズーノージスを疑うか. 診断した時. 獣医師との協力は必要か (n=418, 回答なし17)



- * その他の意見
- ・保健所の指示を受けたい
 - ・犬猫以外のペットは犬猫病院以外のどこと連携するのか
 - ・ズーノージス治療のしっかりした病院を育成してほしい
 - ・人もペットもともに治療したらよい

表 6. 動物種別ペット由来感染症の報告状況（動物咬傷は除く）

（内科系）

ペット動物	確定診断の感染症 (n)	疑似診断の感染症 (n)
オウム・インコ ハ ト	オウム病 (21)	オウム病 (32)
	クリプトコッカス肺炎・脳炎 (6)	クリプトコッカス肺炎 (1)
ネ コ	ネコひっかき病 (12)	ネコひっかき病 (14)
	トキソプラズマ症 (2)	皮膚真菌症 (2)
	ケルススとくそう (1)	トキソプラズマ症 (1)
イ ヌ	キャンピロバクター感染症 (2) (腸炎、細菌性心内膜炎)	ジアルジア症 (1)
	犬回虫症 (2)	フィラリア症 (1)
	トキソプラズマ症 (1)	皮膚真菌症 (1)
		イヌ疥癬 (1)
ミドリガメ 金 魚	サルモネラ感染症 (8)	サルモネラ感染症 (5)

n: 症例数

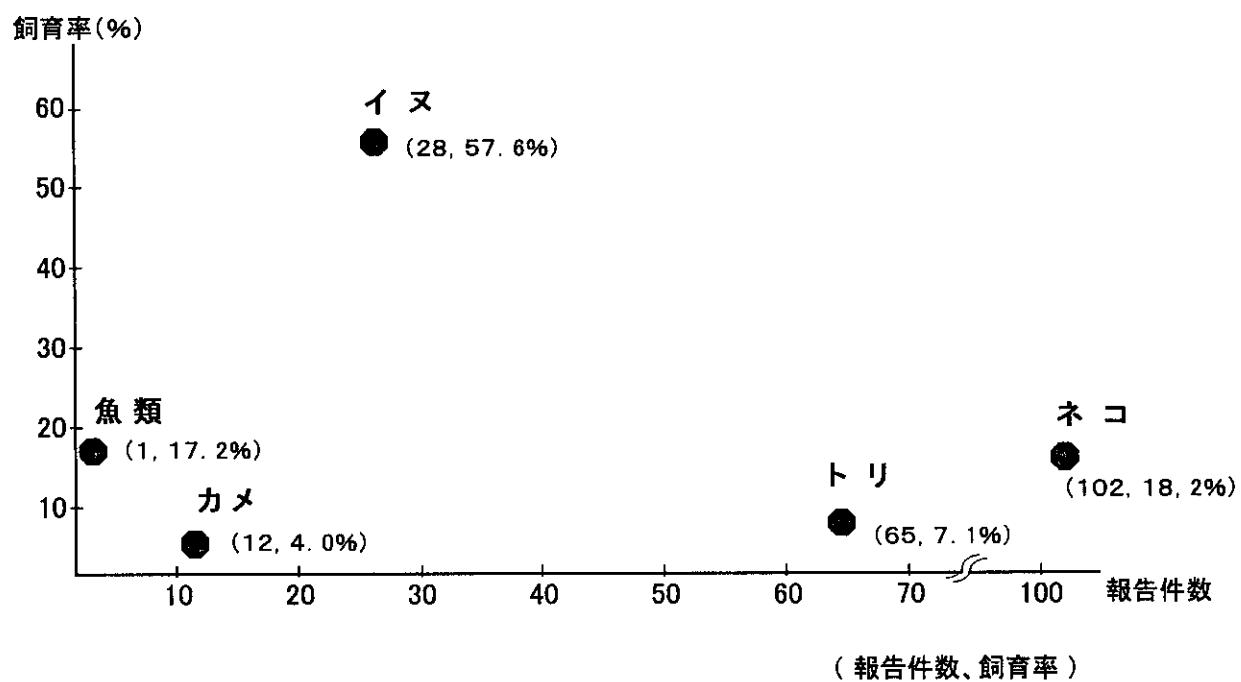
（外科系）

ペット動物	確定診断の感染症 (n)	疑似診断の感染症 (n)
ネ コ	ネコひっかき病 (21)	ネコひっかき病 (12)
	皮膚白癬症 (M.canis) (14)	トキソプラズマ症* (9)
	トキソプラズマ症 (9)	皮膚白癬症 (3)
	ダニ症 (1)	
	頑癬 (1)	
イ ヌ	皮膚白癬症 (7)	トキソプラズマ症 (1)
	犬回虫症 (3)	犬回虫症 (1)
	トキソプラズマ症* (3)	皮膚白癬症 (1)
	犬小包子菌症 (1)	トキシカラ (1)
	頑癬 (1)	
オウム・インコ ブ タ	オウム病 (2)	オウム病 (3)
		トキソプラズマ症 (1)

*眼トキソプラズマ症を含む(1例、2例)

n: 症例数

図 6. ペット飼育率とペット由来感染症報告件数の相関



分担研究報告書

透析患者およびそ族捕獲作業従事者のHFRS(腎症候性出血熱)、LCM (リンパ球性脈絡膜髄膜炎)ウイルス抗体保有状況

分担研究者 : 内田 幸憲 (神戸検疫所長)
協力研究者 : 井村 俊郎、橋本 智、鎌倉 和政、林 昭宏
(神戸検疫所)
森川 茂 (国立感染症研究所ウイルス第1部)

研究要旨 :

全国の港湾地域および市街地において、HFRSウイルス抗体陽性のそ族が1975年以降、継続的に存続している。今回は市街地にて捕そ作業に従事している人々および現在、透析を受けている腎症患者に同意のうえHFRSウイルス抗体および LCMウイルス抗体を測定した。HFRSウイルス抗体測定は間接蛍光抗体法および血球凝集抑制試験にて行い、LCMウイルス抗体測定はIgG ELISA法を行った後、間接蛍光抗体法にて確定した。測定しえた 135名の LCMウイルス抗体は全員陰性と判定された。HFRSウイルス抗体は捕そ作業従事者28名は全員陰性であったが、透析患者 224名中3名(1.34%)が陽性であった。今後、さらに検査対象者を増やし、陽性者の個別経過を検討することが望まれた。

A. 研究目的 :

これまでに全国の港湾地域および数カ所の大都市市街地に生息するネズミ族がHFRSウイルスに広範囲に高率に感染していることを報告してきた。我が国では1960年頃の大阪梅田熱事件、1989年を最後とした医学生物系研究機関でのHFRSウイルス感染の報告以来、人への健康被害の報告はない。その他、1982～1984年の厚生科学研究(班長 国立予防衛生研究所 北村 敬 外来性ウイルス室長)報告書には予研血清銀行保存血清(1971～1981年分)5,078検体、東京湾労働者血清 732例および一般都民 530名のHFRSウイルス抗体保有率が報告されている。(32倍以

上を陽性として陽性率を算出するとそれぞれ0.53%、2.73%、0.19%となる。)一方、HFRSウイルス感染症例は欧米諸国で1991年以降、報告数が増えている。今回は腎透析患者およびそ族捕獲作業従事者のHFRSウイルスおよびLCMウイルスに対する抗体保有調査を行い、その感染実態を少しでも明らかにすることを目的とした。

B. 研究対象及び方法 :

1. 血清の採取および健康調査表(図1)

A、B病院の主治医の了承のもと図1に示す協力依頼を透析患者1人1人

渡し、協力の得られる患者 224名から署名を得た。協力了承の承諾書及び検体番号は主治医の元に残し、我々は検体番号標識血清を主治医より受け取った。A病院の透析患者96名には、HFRSウイルス抗体測定について、B病院の透析患者 128名にはHFRSおよびLCMウイルス抗体測定について主治医を通じて了承を得た。また、C地域およびD市においてネズミ族捕獲作業に従事している28名に対しても同様の文章での検査承諾書および年齢、勤務期間、勤務内容、これまでの健康診断における異常の有無についても問診した。プライバシーの保護のため健康調査表の保管者と血清検査を行う者とは別々とした。

2. HFRSウイルス抗体測定

1) 赤血球凝集抑制試験 (HI試験)

(図2、図3)

HFRSウイルスをVero E6細胞に接種し、2週間後に感染上清液中のウイルス粒子を超遠心法にて沈殿させた。得られたウイルス粒子をアセトン処理し、HA抗原とした。(図2) 次いで、96穴マイクロプレート内でHA抗原とガチョウ赤血球を37℃、1時間反応させて、反応液の至適pHとHA価を求めた。次に、被検血清を冷アセトンで2回抽出し、さらにガチョウ赤血球で吸収して非特異的反応物を除去した。8単位のHA抗原を使用し、段階希釈した被検血清と抗原をマイクロプレート内で37℃、1時間反応させた。その後、0.33%ガチョウ赤血球を加え、37℃、30分反応させ、完全に凝集阻止を示す最大希釈倍数をその血清のHI抗体価とした。10倍以上を陽性と判定した。(図3)

2) 間接蛍光抗体法 (IFA法) (図4)

国立感染症研究所より分与された実験

室ラット由来のSeoul型SR-11株を抗原とし、Vero E6細胞に14日間感染させ、アセトン固定したものを抗原スライドとして使用した。二次抗体としてCAPPLE社製のFLTC標識抗ヒトIgGヤギ抗体を使用し、希釈倍率32倍以上のものを抗体陽性とした。

3. LCMウイルス抗体測定

LCMウイルス抗体測定は国立感染症研究所に依頼して行った。

1) IgG ELISA法

組み換えバキュロウイルス (AcLCMV-NP) 感染Tn5細胞の1%NP40/PBSの不溶分画を2 M urea/PBSで処理し、その不溶分画を8 M urea/PBSで可溶化したものを抗原とした。対照抗原としては、polyhedrin欠失バキュロウイルス感染Tn5細胞から同様に処理したものをを用いた。抗原価は、抗LCMV-NP ウサギ血清を用いたbox titrationにより決定した。スクリーニングには、100倍希釈血清検体を用いてIgG-ELISAを定法により行った。LCMV-NP抗原に対するOD値から対照抗原に対するOD値を引いた値が0.2以上を示したものを、ELISAにより再検し、さらに蛍光抗体法により確認検査を行った。

2) 間接蛍光抗体法

組み換えLCMV-NP発現HeLa細胞：pKS336ベクター (外来遺伝子の発現をEFBOSプロモーターで行い、SV40プロモーターによりblastocidin耐性遺伝子を発現するベクター) のBamHI siteにLCMV NP遺伝子をサブクローニングした。このプラスミドをトランスフェクトしたHeLa細胞からblastocidin S塩酸塩耐性細胞をクローニングし、LCMV NP発現HeLa細胞を得た。この細胞を14穴スライドガラスにスポットし、乾燥後、アセトン固定したものを

蛍光抗体法用抗原とした。

上記抗原を用いて定法により間接蛍光抗体法を行った。

C. 結果：

1. 透析患者の背景（表1）

A病院、B病院の協力に同意した患者の背景を表1に示す。2つの病院から224名（男性137名、女性87名）の同意が得られた。年齢分布は15歳から90歳に及びその平均年齢は60歳であった。また、主治医の臨床診断による原疾患の内訳は慢性糸球体腎炎165名（73.7%）、糖尿病性腎症38名（17.0%）が主なものであった。

2. ネズミ族捕獲作業（表2）

1地域1市でネズミ族捕獲作業従事者28名の協力が得られた。すべて男性で年齢分布は26歳から62歳、平均年齢は42歳であった。ネズミ族捕獲従事期間は1年から33年に分布し、平均従事期間は12年であった。捕獲従事期間中の健康診断で3名が異常を指摘されていた。その内訳はタンパク尿2名、微少血尿1名であったが、いずれも再検査では陰性であったと回答した。

3. HFRSウイルス抗体保有状況（表3）

ネズミ族捕獲作業従事者28名のHFRSウイルス抗体は全て陰性であった。A、B病院224名の透析患者血清のHFRSウイルス抗体は3名が陽性（陽性率1.34%）であった。3名の抗体陽性者の抗体価（IFA、HI）は、それぞれ（256、40）（256、40）（32、10）であった。

4. LCMウイルス抗体保有状況（表4）

135検体の内、一時スクリーニングで11検体がOD値が0.2以上を示した。しか

し再検では、腎透析患者#65, 68, 82が100倍希釈でOD値0.22, 0.24, 0.24を示したが、いずれも蛍光抗体法では陰性（1：10倍未満）であった。このIgG ELISAは、蛍光抗体法の10倍以上の感度があるが、ヒト陽性検体が無いため、Cut off値の正確な設定が出来ていない。そのため、3検体がOD値0.2以上を示したと考えられるが、蛍光抗体法で陰性であることから、被験検体すべてがLCMV抗体陰性であると考えられる。

5. HFRSウイルス抗体陽性者の背景（表5）

主治医の了承のもとに知りえた患者背景を表5に示す。症例1、2、3の年齢、性別、臨床診断は表5のとおりである。

症例1の透析に至る経過は、50歳頃に蛋白尿、尿糖を指摘されていたが、特に加療は受けなかったようである。53歳時に糖尿病と診断されたが軽度のものであったようで、その後の検査データも不明である。57歳頃には蛋白尿、高血圧の指摘を受け65歳からは腎不全状態となる。加療を受けるも改善せず68歳から透析が開始される。蛋白尿発現当時の状況は前医に確認する必要があるが今回の報告には間に合わなかった。ただ、本人は港湾関連企業に勤務していたことがあるとのことであった。

症例2の透析に至る経過は、42歳時に糖尿病発症し、食事療法は不良であったようである。60歳から高血圧発症、63歳から蛋白尿出現、65歳時、浮腫の出現とともに腎不全状態となり透析が開始された。前医は3カ所ほどあり、詳細は不明であるが症例2も港湾関連企業に勤務したことがあるとのことであった。

症例3の経過は不明な点が多いが52歳から高血圧、78歳から透析が開始されて

いる。21歳時にネズミに咬まれたことがあるとのことであった。

D. 考察：

これまで国内においてのHFRS患者の発生は、医学・生物系研究機関のような特殊環境下での発生を除いて問題となったのは、1960年代の大阪梅田熱と称された119名の患者発生と2名の死亡例であった。それ以後、HFRS発生の報告はないようである。1982～1984年の調査研究による報告では血清銀行保存血清（1971～1981年分）の検査で、北海道地区を除く全国7ブロックの地区においてHFRSウイルス抗体検査を行い、その抗体保有率（ここでは32倍以上を陽性として保有率を再計算した）は、東北地区1.34% 関東地区0.46% 中部地区0.51% 近畿地区0% 中国地区0.41% 四国地区0.56% 九州地区0.50%と報告した。そして、当時、東京湾埋め立て地において野ネズミのHFRSウイルス感染が高率となっていた近辺で働いていた東京湾埋め立て地従業員の血液検査において抗体保有率は2.73%（32倍以上陽性者）一般都民の抗体保有率は0.19%であった。また、腎透析患者283名の抗体検査での抗体保有率は1.06%とも報告している。

これまでのハンタウイルス感染症または腎症候出血熱に関する教科書的記述では、外国、日本を問わず、急性期症状に関する記載のみで慢性経過に関する記載はない。先の調査研究（1982～1984年）で測定されたHFRSウイルス抗体価も、我々が測定した抗体価も持続感染によるものか感染後の抗体産生継続によるものか、現状では判断するものは何もない。今回の3症例の個別解析は十分ではないが、症例1、症例2は腎症発症前に港湾関連企業に勤務していたらしい。そして症例1は糖尿病は軽度であり、慢性的経

過で透析に移行しているが症例2は重症糖尿病が先行して腎不全に移行している。症例3は経過が不明瞭であり、透析開始57年前にネズミに咬まれたという既往があるのみである。全国の港湾地域や市街地でHFRSウイルス感染ネズミ族が高率で発見され続けているにもかかわらずネズミ族捕獲作業従事者や捕そ作業に従事している検疫所職員の血清検査（28名+58名、計86名）でHFRSウイルス抗体価陽性者が発見されない現状からみて、今後、もう少し症例を増やし検討をすすめる必要があるものと思われる。

LCMウイルス抗体測定について、その測定法は十分信頼度の高いものである。今回の測定数135検体すべてで陰性であると判定したが、1991年米国バルチモアからの報告では1,149名の検査を行い54名（4.7%）が陽性であったとのことである。我が国ではネズミ族の感染実態もいまだ不明であるが、今後HFRSウイルス抗体の測定とあわせ、人、ネズミ族の抗体保有調査を継続する必要があると思われる。

E. 結論：

ネズミ族捕獲従事者28名 透析患者224名についてHFRSウイルス抗体測定およびLCMウイルス抗体測定（7名+128名、計135名）を行った。この中で、透析患者3名のHFRSウイルス抗体が陽性であったが、このことが慢性腎不全の引き金になったか否かは現状では全く不明である。今後はLCMウイルス抗体測定を含め、人およびネズミ族の検査を継続する必要があると判断した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 内田幸憲、井村俊郎、竹嶋康弘：

神戸市および福岡市医師会会員への動物
由来感染症（ズーノーシス）に関するア
ンケート調査、感染症学会誌 75 (4)
2001 (印刷中)

2) 青木英雄、水田英生、鈴木荘介、
内田幸憲他：全国の港湾地域におけるネ
ズミのハンタウイルス抗体調査、獣医公
衆衛生研究 2000 3(8) 19-22

3) 内田幸憲：感染症新法と輸入感染
症、兵庫県医師会医学雑誌 2000 42(3)
18-24

図2. HFRSV 検査法

HI (赤血球凝集抑制試験)

○HA抗原の作製

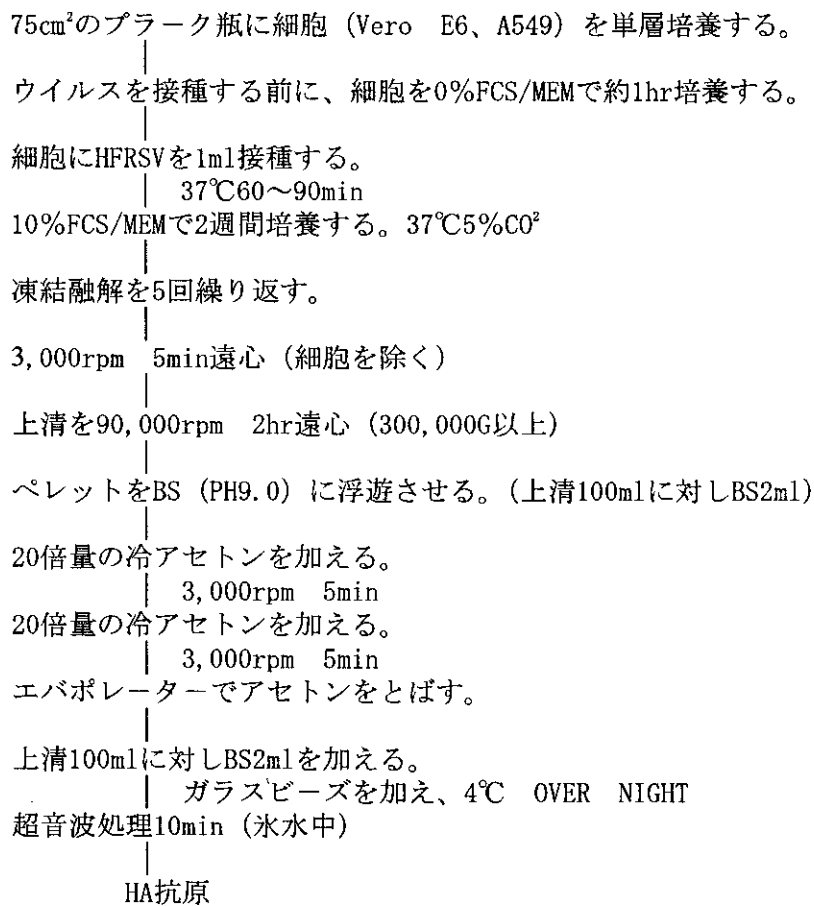


図3. ○H A 試験 (8単位の抗原調製) HFRSV至適pH5.8~6.2

HA抗原を0.4%EABSで2倍段階希釈する。
|
プレートに希釈した抗原を25 μ lずつ滴下する
|
0.4%EABSを25 μ lずつ滴下する
|
各pHのVADを2.3mlと8%RBC0.1mlを混ぜ、50 μ lずつ滴下する
|
37 $^{\circ}$ C 60min静置 判定 (8単位を求める)

○H I 試験

被検血清のアセトン処理 (血清0.2ml+アセトン4ml)
|
pH9.0 BS2mlに浮遊させる (10倍希釈)
| 4 $^{\circ}$ C over night
被検血清にRBCを加え、非特異凝集素を吸着させる (4 $^{\circ}$ C、30min)
|
マイクロプレート上で被検血清を0.4%EABS 25 μ lで希釈する
|
8単位の抗原25 μ lを血球対照以外の全てのwellに加える
|
37 $^{\circ}$ C 1hr
|

4 $^{\circ}$ C 1hr

|

同時に (二次定量) を行う 8単位の抗原を原液~32倍まで希釈する25 μ l 0.4%EABSを25 μ l加える

|
至適pHのVAD 2.3mlと8%RBC 0.1mlを混ぜ、50 μ lずつ滴下する
|
37 $^{\circ}$ C 1hr
|
判定

図4. IFA (間接蛍光抗体法)

○抗原スライドの作製 (スポット培養法)

75cm²のプラーク瓶に細胞 (Vero E6、A549) を単層培養する。

ウイルスを接種する前に、細胞を0%FCS/MEMで約1hr培養する。

細胞にHFRSVを1ml接種する。

37°C 60~90min

10%FCS/MEMで2週間培養する。

37°C 5%CO₂

0.25%トリプシン/0.02%EDTA/PBS(-)で細胞を剥がす。

非感染細胞についても同様に細胞を剥がす。

細胞が剥がれたら、PBS(-)で細胞を洗う。細胞を半分にする。(3回洗浄を行う)

3,000rpm 5min

5%FCS/MEMをそれぞれに70mlずつ入れる。(約5.0×10⁴個/ml)

感染細胞と非感染細胞が2:1になるように浮遊液を調製する。

湿潤箱に滅菌したスポットスライド (24well)

をのせ、細胞浮遊液を各wellに10μlずつ滴下する。

37°Cで1日培養し、細胞を伸展させる。

(スポット乾燥法)

培養液をパスツールで取り除き、PBS(-)で洗浄する。

PBS(-)をそれぞれに70ml入れ、感染細胞と非感染細胞が2:1の浮遊液を調製する。各wellに10μl滴下し、風乾する。

安全キャビネットの中で約10~20分乾燥させる。

冷アセトンで10分間固定し、風乾させる。

使用時まで-80°Cで保存。

IFA (間接蛍光抗体法)

被検血清をPBS(-)で段階希釈する。

スポットスライドのWellに10μl滴下する。

湿潤箱に入れ、37°C 40~60min (一次反応)

PBS(-)で5分、3回洗浄する。

スポットスライドが乾燥しないうちに、FITC標識抗体を10μl滴下する。

湿潤箱に入れ、37°C 40~60min (二次反応)

PBS(-)で5分、3回洗浄し、乾かす。

グリセリン:PBS(-)=1:1で封入する。

蛍光顕微鏡で判定 (32倍以上陽性)

陽性細胞には細胞質内の顆粒状の特異蛍光 (ドット抗原) が認められる。

図 1. 腎不全の治療を受けておられる方へ

腎症候性出血熱（HFRS）の病原体であるハンタウイルスとリンパ球性脈絡髄膜炎（LCM）の病原体であるLCMウイルスに対する抗体価の調査を目的に血清の提供をお願いしています。これらの病気の特徴は以下のとおりです。

『腎症候性出血熱』

- ◎病原体はハンタウイルスと呼ばれるウイルス疾患
- ◎感染したネズミに咬まれたり排泄物に接触することによりヒトに感染
(乾燥した尿による空気感染も考えられている)
- ◎東欧・北欧（軽症型）から極東アジア（重症型）にかけて広く分布
- ◎発熱・腎障害が主な症状だが重症例では出血を伴うものもある
- ◎日本では軽症～中等度までのものが主流で入院・治療を伴わないものが多い
- ◎軽症型ではごく軽度の発熱・蛋白尿・血尿のみ
- ◎潜伏期間は10～30日

『リンパ球性脈絡髄膜炎』

- ◎病原体はLCMウイルスと呼ばれるウイルス疾患
- ◎ハツカネズミは唾液・糞尿・乳などで感染するがヒトへの感染経路は不詳
- ◎世界中に広く分布していると考えられる
- ◎インフルエンザ様の症状を示すものと脈絡髄膜炎・脳炎まで進むものがある。
- ◎無症状で終ることが多く、致死率は低い
- ◎潜伏期間は5～6日

この用紙は主治医の先生の手元で保管され、主治医の先生が番号を付けられて血清を供して下さるシステムになっており、個人名が出ることはありません。検査結果につきましては主治医の先生を通じてお知らせさせていただきます。(採血量：5ml)

◎調査に協力して頂けますか。該当するものに○印をお願い致します。

はい

いいえ

(『はい』の方は署名をお願いします)

平成12年度厚生科学研究：新興・再興感染症研究事業

『輸入動物が媒介する動物由来感染症の実態把握及び防御対策に関する研究』

分担研究者

神戸検疫所長：内田 幸憲

主治医

表 1. 透析患者の背景

施設	協力患者数	性別 (人数)	平均年齢 (分布)	原 疾	患 (人数)
A 病院	96	男性 (56)	59.75 (31-85)	慢性系球体腎炎	(39)
				糖尿病性腎症	(14)
		腎硬化症	(2)		
		腎結核	(1)		
B 病院	128	女性 (40)	63.23 (31-90)	慢性系球体腎炎	(27)
				糖尿病性腎症	(6)
		のう包腎症	(3)		
		腎硬化症	(3)		
B 病院	128	男性 (81)	59.14 (24-79)	S L E 腎症	(1)
				慢性系球体腎炎	(61)
		糖尿病性腎症	(15)		
		のう包腎症	(3)		
B 病院	128	女性 (40)	59.26 (15-83)	I g A 腎症	(1)
				腎盂腫瘍	(1)
		慢性系球体腎炎	(38)		
		慢性腎不全	(3)		
B 病院	128	女性 (40)	59.26 (15-83)	糖尿病性腎症	(3)
				のう包腎症	(1)
		両側水腎症	(1)		
		不明	(1)		

表 2. ネズミ族捕獲作業従事者の背景

地域	協力者数	性別	平均年齢 (分布)	従事期間 (平均)	備 考
C 地域	21	男	42.43 (26-62)	1-33年 (13.3)	一過性タンパク尿 2名 一過性血尿 1名
D 市	7	男	39.57 (33-44)	2-20年 (8.00)	—

表 3. HFRS ウイルス抗体保有状況

対 象	検 査 数	陽性数	陽性率	備 考 (抗体価)	
ネズミ族捕獲作業従事者	2 8	0	0 %		
透 析 患 者	男性	5 6	0	0 %	
	A 病 院				
	女性	4 0	0	0 %	
	男性	8 1	2	2.47%	I F A 法 256倍 256倍
B 病 院					
女性	4 7	1	2.13%	32倍	10倍
透 析 患 者 小 計	2 2 4	3	1.34%		

表 4. LCM ウイルス抗体保有状況

対 象	検 査 数	陽性数	陽性率
ネズミ族捕獲作業従事者	7	0	0
B 病 院 透 析 患 者	1 2 8	0	0

表 5. HFRS ウイルス抗体陽性者の背景

症 例	1	2	3
年 齢	70 歳	68 歳	79 歳
性 別	男	男	女
臨 床 診 断	慢性系球体腎炎	糖尿病性腎症	慢性腎不全
合 併 症 (発症年齢) 既 往 症	高血圧(57歳) 蛋白尿(57歳) 糖尿病(53歳)	糖尿病(42歳) 高血圧(60歳)	高血圧(52歳) 脳梗塞(78歳) 心不全(79歳)
腎 症 初 期 症 状	蛋白尿(50歳) 尿 糖 (50歳)	蛋白尿(63歳) 浮 腫 (65歳)	?
腎 不 全 年 齢	65 歳	65 歳	
透 析 開 始 年 齢	68 歳	65 歳	
HFRSウイルス抗体価	I F A 256倍 H I 40倍	I F A 256倍 H I 40倍	I F A 32倍 H I 10倍
備 考			21歳時 ネズミに咬まれる

分担研究報告書

Bウイルス感染の遺伝子診断と分子疫学に関する基礎的研究 PCR・Microplate-Hybridization法の条件設定とその応用

分担研究者 本藤 良 日本獣医畜産大学獣医畜産学部 教授

研究要旨： Bウイルスには初感染の後に潜伏感染を起こす特性がある。その潜伏ウイルスの再活性化と発病との起因関係を究明するには、DNA診断法によるウイルスゲノムの検出だけではなく、その消長からの動態を解析する必要がある。今年度は、PCR法にMicroplate-Hybridization法を併用して、微量検体中からのウイルスゲノムの検出と同時にそのコピー数を定量する簡便な”定量PCR法”を開発した。また、本法に用いたBウイルスゲノム上のターゲット領域（A：295 bp、C：641bp）は、 α ヘルペスウイルス亜科に属する単純ヘルペスウイルスとの相同性も少なく、特異性の高いことから、感染症例でのその実用性を明らかにした。

A. 研究目的

Bウイルス (simian herpes B virus: SHBV) 感染の診断や疫学の領域に、分子生物学的手法を取り入れた、いわゆるDNA診断および分子疫学的な解析が試みられてきている^{1, 2)}。特に、検体からDNAを抽出し、それをもとに特異ウイルスゲノムを検出して診断根拠とするポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) 法が主流をなしている。PCRによる診断法は、微量の検体から設定したゲノム領域のDNA断片を必要量増幅し、電気泳動あるいはハイブリダイゼーション法でゲノムの検出を行う手法である。診断の簡便迅速化、高感度化、検体の微量化で利点がある。しかしながら、Bウイルスには初感染の後に潜伏感染を起こす特性がある。その潜伏ウイルスの再活性化と発病との起因関係を究明するには、DNA診断法によるウイルスゲノムの検出だけではなく、その消長からの動態を解析する必要がある。

本研究では、PCR法にMicroplate-Hybridization法を併用して、微量検体中からのBウイルスゲノムの検出と同時に、そのコピー数を定量する、簡便な”定量PCR法”を開発し、サル類の感染状況やストレス等の外因による個体内での再活性化の解析と分子疫学的解析に必要な条件設定の確立およびその実用性を図ることを目的とした。

B. 研究方法

1. PCR・Microplate-Hybridization法のターゲット領域^{1, 2)}

定量PCR法に用いる領域を図1. に示した。Smith, A., ら³⁾による、糖蛋白をコードする領域 (ORF, Us4;gG, Us5;gJ, Us6;gD) の全塩基配列を基に、Bウイルス・ゲノム上で、サル・サイトメガロウイルス (simian cytomegalo virus; SCMV)、ヒト・サイトメガロウイルス (human cytomegalovirus; SCMV)、単純ヘルペスウイルス-1型、2型 (herpes simplex virus; HSV-1, 2) の対応するゲノムと相同性の低い領域、およびウイルス分離株間での多型性を示す領域を考慮して、新たにPCR増幅領域を設定した6領域のなかから、A、Cの2領域を選択した。

A領域 (HB2A: HB1B, 295bp) の特性は、E2490, SMHVの株間で欠損と挿入が局在し、増幅断片に12bpのサイズの違いがあり、G・C含有量は77%で41点の点変異が局在することから、株間での多型性を示す領域である。PCRでの増幅効率も高く、SHBV・DNAで特異的に増幅され、HSV-1型、2型およびHCMVとSCMVでは増幅されない領域で、DNA診断や分子疫学的解析に最適な領域である (図2. 参照)。

C領域 (HB2A: HB2B, 641bp) の特性は、E2490, SMHVの株間で欠損と挿入が局在し、増幅断片に21bpのサイズの違いがあり、G・C含