

厚生科学研究費

新興・再興感染症研究事業

野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症の
予防、診断及び疫学に関する研究

平成 13 年度 総括報告書

平成 14 (2002) 年 3 月

主任研究者 高 島 郁 夫
北海道大学大学院獣医学研究科

目 次

I. 総括研究報告	
野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症の予防、 診断及び疫学に関する研究	1
高島郁夫	
II. 分担者研究報告	
1. 野生齧歯類及びダニ類に由来する病原体の病原性	9
岩崎琢也	
2. ダニ媒介脳炎ウイルスの遺伝子解析に関する研究	13
水谷哲也	
3. ハンタウイルス感染症の疫学的研究と抗ハンタウイルス剤の 作用機序の解析	17
荻和宏明	
4. ハンタウイルス感染症の診断法の開発に関する研究	23
有川二郎	
5. バベシア感染症の開発と疫学的研究	27
辻 正義	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	39

総括研究報告書

野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症の予防、
診断及び疫学に関する研究

主任研究者 高島郁夫 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

研究要旨

ダニ媒介脳炎についてはロシアイルクーツク地区に新種のシベリア型ダニ媒介脳炎ウイルスが分布しており、極東型のウイルスより病原性が強いことを明らかにした。これらの近年流行しているダニ媒介脳炎ウイルスに対してヨーロッパ型のワクチンが効果があることが判った。リバビリンとラクトフェリンがハンタウイルスに有効であることが判明した。ハンタウイルスの組換え核タンパクを用いた ELISA による精度の高い鑑別血清診断法を開発した。さらにダニ媒介性脳炎とハンタウイルス感染症の患者の病理組織学的所見の特徴を明らかにした。ヒトのバベシア感染症初発例の感染源は不顕性感染者の輸血によること、病原巣動物はアカネズミであることを示した。

研究分担者

岩崎琢也・長崎大学・教授
水谷哲也・北海道大学・助手
苅和宏明・北海道大学・助教授
有川二郎・北海道大学・教授
辻 正義・酪農学園大学・助教授

実施する。さらにこれらの感染症の発症機序を解明し、ワクチン（ダニ媒介脳炎）による予防法を確立する。

D. 研究目的

ダニ媒介脳炎、ハンタウイルス感染症とバベシア症について、精度の高い診断法を確立し、疫学調査を実施し、国内の汚染地の特定とヒトにおける感染状況の解明に努める。またロシアシベリア、極東地区における疫学調査を

E. 研究方法

遺伝子組換え技術を用いてウイルス抗原を発現させ、この抗原を用いた ELISA による血清学的診断法を確立する。国内およびロシアにおいて疫学調査を実施し、マダニ類、野生げっ歯類および患者から病原体を分離する。患者の病理組織学的検索を行う。病原体の遺伝子の塩基配列を決定し、系統樹解析を行う。ダニ媒介脳炎ウイルスの

既存のワクチンの効果を評価する。

(倫理面への配慮)

ヒトの血清と剖検材料の採取はインフォームドコンセントに基づき行い、成績の公表は氏名を伏せて実施する。本研究における動物実験は各研究機関に属する動物実験委員会に計画を申請し、承認を得た後に実施する。ウイルスを用いた実験は P-3 実験室において行う。

C. 研究結果

ダニ媒介脳炎：シベリアと極東ロシアに分布するダニ媒介脳炎ウイルス株の性状を解析した。この結果、極東型ウイルスに加え新しいシベリア型ウイルスの存在が明らかとなった。シベリア型ウイルスは極東型ウイルスよりマウスに対する病原性が強かった。ダニ媒介脳炎ウイルスヨーロッパ型のワクチンを近年流行しているシベリア型および極東型のウイルスに対して有効か否か調べた。本ワクチンが極東型およびシベリア型の流行株に対して有効であることが、ヒトの中和抗体産生とマウスにおける防禦試験において示された。ダニ媒介脳炎死亡患者の剖検において脳においてウイルス性脳炎の特徴的な病理組織学変化を確認した。

ハンタウイルス感染症：牛由来のラクトフェリンとリバビリンの *in vitro* と *in vivo* における抗ハンタウイルス作用について調べた。リバビリンはウイルス感染後に作用点を持ち、ラクト

フェリンはウイルスの細胞への吸着時に作用することが判明した。ハンタウイルスの組換え核タンパクを用いた血清学的鑑別診断法を開発を試みた。異なる血清型のウイルス核タンパクの各種切断物をバキュロウイルス系を用いて発現させ抗原とした ELISA 法による抗体測定に応用したところ異なる血清型ウイルスの感染を鑑別できることが判明した。ロシアにおけるハンタウイルス感染死亡者の剖検では腎臓の髄質に壊死病巣が観察された。

バベシア症：日本で最初のヒトのバベシア症の感染源を決定するため研究を行った。患者へ血液が献血された不顕性感染者の血液から人血液に改変した SCID マウスを用いてバベシア原虫を分離し感染源を明らかにした。さらに血液献血者の居住地周辺のアカネズミからバベシア原虫を分離し病原巣動物を同定した。疫学調査から北海道、千葉県、滋賀県、兵庫県、島根県および徳島県など日本の広範な地域からバベシア原虫が分離された。

D. 考察

ダニ媒介脳炎(TBE)についてはこれまで不明であったロシアイルクーツク地区における TBE ウイルスの亜型がシベリア型であることが今回初めて明らかとなった。従来から知られていた TBE ウイルス極東型との生物学的性状の差を明らかにするため、抗原性と病原性について検討を加えた。シベリア型ウイルスは単クローン性抗体に対す

る反応性が極東型ウイルスと少し異なっていた。また病原性はシベリア型ウイルスの方が極東型ウイルスより強かった。次に予防対策の構築のため、ヨーロッパ型ウイルスの既存のワクチンについて近年流行しているシベリア型および極東型 TBE ウイルスに対する効果を判定したところ、ヒトにおける中和抗体産生およびマウスにおける防禦の両方で効果を示した。従ってロシア極東地区、シベリア地区に旅行する日本人へのヨーロッパ型ワクチンの接種が推奨される。

ハンタウイルス感染症では各血清型のウイルス感染を鑑別できる、ELISA による血清診断法を確立した。本法を用いて、複数の血清型のウイルスが流行している地域の患者における感染ウイルス型の診断および病原巣動物の野ネズミを用いた疫学調査を効率的に実施できる。牛由来ラクトフェリンとリバビリンの *in vitro* と *in vivo* の抗ハンタウイルス作用について調べた。ラクトフェリンはウイルスが細胞に侵入する前に作用し、リバビリンは細胞に侵入した後に作用することが判明した。ハンタウイルスのワクチンがほとんどの流行国では実用化されていない現状においてこれら化学物質の治療薬としての実用化が期待される。

バベシア感染症ではヒトの日本における初発例の感染源を不顕性感染した献血者の血液と確定した。さらに献血者の居住地周辺の野ネズミ（アカネズミ）を捕獲したところバベシア原虫が

分離されたので、アカネズミを病原巣動物と認定した。さらに日本各地において流行地を特定するために、日本各地において野ネズミを捕獲し、バベシア原虫の分離と型別を実施した。調査を実施した北海道、千葉県、滋賀県、島根県、徳島県のすべてにおいてバベシア原虫が分離された。このことは日本全国広範にバベシア原虫が分布していることを示す。分離したバベシア原虫の遺伝子型では日本に神戸型と稲別型の2種が存在し、稲別型が主流であることが示唆された。この成績から輸血に関連したバベシア感染への対応としては、流行地において医師と輸血患者に対して輸血による感染リスクを周知させることが重要と考えられる。

E. 結論

ダニ媒介脳炎についてはロシアイルクーツク地区に新種のシベリア型ダニ媒介脳炎ウイルスが分布しており、極東型のウイルスより病原性が強かった。これらの近年流行しているダニ媒介脳炎ウイルスに対してヨーロッパ型のワクチンが効果があることが判った。リバビリンとラクトフェリンがハンタウイルスに有効であることが判明した。ハンタウイルスの組換え核タンパクを用いた ELISA による精度の高い鑑別血清診断法を開発した。ヒトのバベシア感染症初発例の感染源は不顕性感染者の輸血によること、病原巣動物はアカネズミであることを示した。さらにバベシア原虫は日本で広範に分布してい

ることが判明した。

F. 健康危険情報

ダニ媒介脳炎；2001年に61歳の日本人男性オーストリアのザルツブルグに滞在中にダニ媒介性脳炎に罹患し死亡した。ダニ媒介脳炎はウイルス感染マダニの吸血により罹患する致死率の高い（最大30%）ウイルス性感染症である。この事例から、今後ヨーロッパやロシアなどのダニ媒介性脳炎の流行地を旅行する日本人に対して本疾患の疫学情報と予防法を通知するとともに現在許可されていないワクチンを旅行者に早急に利用できるようにする必要がある。本情報は平成14年1月23日付で通報済みであり、ウイーン大学ウイルス学研究所の Franz Heinz 教授から入手した。

バベシア感染症；本研究において、わが国初のバベシア症例が不顕性感染キャリアーからの輸血感染事故により起きたこと、および、国内の野鼠（特にアカネズミ）の間にバベシア原虫が蔓延しレゼルポアとなっていることが確定的となった。マダニ常在地のハイリスクグループを対象とした血清疫学調査において、1.8%程度の抗体陽性者が認められた。これらの多くは過去に不顕性感染を経験したものと考えられるが、抗体価は低く原虫も分離されなかったことから実際にバベシア原虫の持続な感染キャリアーである可能性は低いと思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takashima, I., Hayasaka, D., Goto, A., Kariwa, H. and Mizutani, T.: Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) and phylogenetic analysis of TBE viruses in Japan and Far Eastern Russia. *Jpn. J. Infect. Dis* 54 : 1-11, 2001
- 2) Hayasaka, D., Ivanov, L., Leonova, G.N., Goto, A., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H. and Takahima, I.: Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and Far-eastern Asia. *J. Gen. Virol.* 82: 1319-1328, 2001
- 3) Hayasaka, D., Goto, A., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H. and Takashima, I. : Evaluation of European tick-borne encephalitis virus vaccine against recent Siberian and Far-eastern subtype strains. *Vaccine* 19: 4774-4779, 2001
- 4) 高島郁夫：ウイルス性脳炎，化学療法の領域，17: 57-66, 200
- 5) Ando Y, Iwasaki T, Terao K, Nishimura H, Tamura S: Conjunctivitis following

- Conjunctivitis following accidental exposure to influenza B virus/Shangdong/07/97. *J Infect* 42: 223-224, 2001.
- 6) Hagiwara Y, Iwasaki T, Asanuma H, Sato Y, Sata T, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Effects of intranasal administration of cholera toxin (or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain. *Vaccine* 19: 1652-1660, 2001.
- 7) Hagiwara Y, Tsuji T, Iwasaki T, Kadowaki S, Asanuma H, Chen Z, Komase K, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Effectiveness and safety of mutant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT H44A) as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* 19: 2071-2079, 2001
- 8) Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Harashima A, Hatano I, Suzuki Y, Yoshii K, Yoshii T, Nomoto A, Kurata T: Comparison of neuropathogenicity of poliovirus type 3 in transgenic mice bearing the poliovirus receptor gene and cynomolgus monkeys. *Vaccine* 19: 3201-3208, 2001
- 9) Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, Suga K, Kito H, Iwasaki T, Kurata T, Tanaka T, Saito Y, Asano Y: Fatal acute myocarditis in an infant with human herpesvirus 6 infection. *J Clin Pathol.* 54(10): 792-795, 2001
- 10) Inagaki-Ohara K, Iwasaki T, Watanabe D, Kurata T, Nishiyama Y: Effect of the deletion of US2 and US3 from herpes simplex virus type 2 on immune responses in the murine vagina following intravaginal infection. *Vaccine* 20: 98-104, 2002
- 11) Ando Y, Terao K, Narita M, Suzuki S, Oguchi Y, Kojima A, Sata T, Kurata T, Iwasaki T: Quantitation of cytomegalovirus (CMV) genome in aqueous humor of patients with CMVretinitis *Jap J Ophthalmology* (in press)
- 12) Hasegawa H, Kadowaki S, Watanabe I, Aizawa H, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T, Sata T: Persistent infection of influenza virus in irradiated mice and its prevention by intranasal

- vaccination. *Vaccine*, 20:1050-1057, 2002
- 13) Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Miyamura T, Sata T, Iwasaki T: Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. *J Med Virol* (in press)
- 14) Araki, K., Yoshimatsu, K., Ogino, M., Ebihara, H., Lundkvist, A., Kariwa, H., Takashima, I. and Arikawa, J. : Truncated Hantavirus Nucleocapsid proteins for serotyping Hantaan, Seoul, and Dobrava hantavirus infections. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 2397-2404, 2001
- 15) Arikawa, J., Yoshimatsu, K. and Kariwa, H. : Epidemiology and epizootiology of hantavirus infection in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 54(3), 95-102, 2001
- 16) 有川二郎 「ハンタウイルス肺症候群」 *分子呼吸器病* 5(3)、48(224)-55(231)、2001
- 17) 有川二郎「腎症候性出血熱」、*化学療法の領域* 17(5)、5(853)-9(857) 、 2001
- 18) Wei, Q., Tsuji, M., Zamato, A., Hkohsaki, M., Matsui, T., Shiota, T., Teleford III, S. R., Ishihara, C. Human babesiosis in Japan: isoaltion of *Babesia microti*-like parasites from an asymptomatic tranfusion donor and from a rodent from an area where babesiosis is endemic. *J. Clin. Microbiol.* 39(6), 2178-2183, 2001
- 19) Tsuji, M., Wei, Q., Zamoto A., Morita, C., Arai, S., Shiota, T., Fujimagari, M., Itagaki, A., Fujita, H., Ishihara, C. Human babesiosis in Japan: epizzotologic survey of rodent reservoir nad isolation of new type of *Babesia microti*-like parasite. *J. Clin. Microbiol.* 39(12), 4316-4322, 2001

2.学会発表

- 1) 早坂大輔、後藤明子、好井健太郎、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルスシベリア型および極東型の病原性の比較とワクチンの効果：第131回日本獣医学会、府中(2001, 4)
- 2) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明子、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス

- 組み換え蛋白の作成と抗原性状の解析：第 131 回日本獣医学会、府中(2001,4)
- 3) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明子、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスのワクチンの評価と組み換え蛋白の作成：第 36 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、和倉(2001, 5)
- 4) Takashima, I., Yoshii, K., Hayasaka, D., Goto, A., Mizutani, T., Kariwa, H. : Evaluation of tick-borne encephalitis virus vaccine and production of recombinant viral protein: Thirty-fifth Joint Working Conference On Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Chevy Chase, Honolulu (2001, 8)
- 5) 早坂大輔、グリットサン タマラ、アーネスト グールド、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルス Oshima 株の感染性 cDNA クローンの作製：第 132 回日本獣医学会、盛岡(2001, 10)
- 6) 早坂大輔、Tamara Gritsun, Ernest A Gould、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBE)型極東型の感染性 cDNA クローンの作製：第 37 回日本ウイルス学会北海道支部総会、札幌 (2001, 10)
- 7) 早坂大輔、Tamara Gritsun, Ernest A Gould、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス(北海道)株の感染性 cDNA クローンの作製：第 49 回日本ウイルス学会、大阪 (2001, 11)
- 8) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明子、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス組み換え蛋白を用いた ELISA による血清学的診断法の開発：第 49 回日本ウイルス学会、大阪 (2001, 11)
- 9) Lee B. H., 吉松組子、荒木幸一、荻野倫子、土屋公幸、有川二郎：各種齧歯類免疫グロブリンの交差反応性の比較：第 48 回日本実験動物学会総会 (日本実験動物科学技術大会 2001) 横浜 (2001.5)
- 10) 荻野倫子、海老原秀喜、Lee, B. H., 荒木幸一、吉松組子、有川二郎：ハンタウイルス糖蛋白 (G1/G2) を外套したシュードタイプ VSV の作製と安全で迅速な中和試験への応用：第 49 回ウイルス学会総会 大阪 (2001.11)
- 11) Araki, K., Ogino, M., Sjolander, K. B., Lundkvist, A., Ebihara, H., Kariwa, H., Takashima, I., Yoshimatsu, K.,

Arikawa , J. : Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping of Hantaan Seoul and Dobrava virus infections: The 5th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus pulmonary Syndrome (HPS), and Hantaviruses Annecy (France) (2001.6)

- 12) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Araki, K., Ogino, M., Sjolander, K. B., Lundkvist, A., Ebihara, H., Kariwa, H. and Takashima, I. : "Application of truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping of human and rodent sera." US-Japan Cooperative Medical Science Program, 35th Joint Working Conference on Viral Diseases, Hawaii, USA (2001. 8)

H. 知的財産の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

野生齧歯類及びダニ類に由来する病原体の病原性

（代表研究者：高島郁夫）

分担研究者 岩崎琢也（国立感染研・感染病理部、長崎大・熱帯医学研）

協力研究者 佐藤由子・佐多徹太郎・倉田 毅・山口和克

（国立感染研・感染病理部、杏林大・病理）

研究要旨 野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症の原因となっている病原体の病原性を明らかにする目的で、人体ならびに齧歯類の組織病理材料の検討を開始した。初年度(2001年4月より2002年3月)はロシア極東地域の人体剖検例の組織学的ならびにウイルス病理学的解析を行った。臨床的に腎症候性出血熱あるいはダニ媒介脳炎が疑われた症例を対象とした。剖検組織の組織学的解析において、腎症候性出血熱患者の1例では、腎、肺、肝、脳組織を検討する機会が得られたが、組織学的に有意の変化は腎組織のみに局在し、間質の浮腫と単核細胞の浸潤、腎尿細管の変性が主たる変化であった。尿細管腔内に蛋白円柱も認められ、尿細管の吸収障害の存在も指摘された。さらに、境界鮮明な壊死性変化も腎髄質内に認められたが、この成因は不明であった。ハンタウイルスを認識する単クローン抗体を用いて免疫組織学的にハンタウイルスの局在を検討したが、ウイルス抗原は検出できなかった。ダニ媒介性脳炎が疑われた2例ではウイルス感染を示唆する血管周囲の単核細胞浸潤、神経細胞の脱落、変性が認められたが、封入体形成のような特徴的な細胞変化は認められなかった。また、免疫組織学的にウイルス抗原も検出できなかった。このように、ロシア極東地域の剖検例ではウイルス抗原を検出することが困難であり、この理由が①標本作製時の方法論的問題に起因するのか、②使用した抗ウイルス抗体では検出できない型のウイルスであるのか、③死亡時ウイルスが体内より駆逐され、検出レベル以下の段階出会ったのかは、今年度の解析では決定することができなかった。今後、この点を追求しながら、さらにウイルス病理学的解析を行っていく予定である。

A. 研究目的

野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症のうち、本分担研究では主としてウイルス感染症を対象とし、これらの疾病の人体における病原性を組織病理学的に解析し、病原体の感染病理の解明、診断的方法の確立を目的とする。さらに、新規のウイルスが発見された場合にはその病原性の特異性についても検討を行う。

対象とする感染症は衛生状態が改良され、齧

歯類と人類のある程度の住み分けが行われている本邦においては比較的例外的な存在と推定され、事実、近年の報告数は非常に限られている。しかし、稀少疾患の診断は日常診療においては意外と困難であることが多く、見過ごされている可能性も依然としてある。

一方、ロシア極東地域においては、野外の自然環境が非常に保持され、そのため、住民と齧歯類の遭遇する機会が残されている地域が存在している。本研究においては、これらの自然

保存地域において、齧歯類・ダニ類に由来する病原体により死亡したと推定された症例を対象とし、ウイルス病理学的診断を行い、さらにこの診断を補助する方法の開発を試みる。

B. 研究方法

臨床検体の収集：ロシア極東地域において剖検前診断として、腎症候性出血熱、あるいはダニ媒介性脳炎が疑われた剖検症例を対象とした。

症例 1 49 才男性、初夏に発症し、発症後 2 週で、急性腎不全で死亡。血清学的に腎症候性出血熱関連のウイルス感染が疑われている。

症例 2 67 才男性、初夏発症例、数度のダニ咬傷歴を有している。発熱で発症し、4 病日より意識混濁、痙攣、呼吸困難、発症 10 日で死亡した。

症例 3 22 才男性、森林労働者、初夏発症例、ダニ咬傷歴を有している。発熱で発症し、無気力となり、2 病日より首を持ち上げる困難となり、3 病日より上肢・体躯の筋力低下、さらに、呼吸困難状態に陥り、補助呼吸装置を装着したが、発症 18 日目に死亡した。

組織学的解析 上記症例の緩衝ホルマリン固定組織をパラフィン包埋し、薄切切片を作製し、hematoxylin-eosin 染色を行った。中枢神経組織については Kluver-Barrera 染色を、腎組織については PAS, Masson trichrome 染色を行った。

さらに、ダニ媒介脳炎ウイルスについては北大大学院獣医学研究科高島郁夫博士より提供された抗 TBE 単クローン抗体を使用し、ハンタウイルスの解析には抗ハンタウイルス単クローン抗体を使用して、それぞれのウイルス抗原の有無とその局在を検討した。免疫組織学的解析には LSAB-HRP (DAKO) を使用し、DAB を基質とし、核染色は必要に応じて hematoxylin あるいは methylgreen を用いた。

C. 研究結果

1. ハンタウイルス感染が疑われた症例 1.

腎、肺、肝、脳組織の各ホルマリン固定組織材料を組織学的に検討したところ、有意の変化は腎組織のみに局在していた。腎実質では間質の浮腫が著明であり、巣状に単核細胞の浸潤と腎尿細管の変性が認められた。間質内では軽度に線維化も生じていた。尿細管腔内には蛋白円柱も認められ、尿細管の吸収障害の存在も窺われた。さらに、境界鮮明な壊死性変化も腎髄質内に認められた。

ハンタウイルスを認識する単クローン抗体を用いて免疫組織学的にハンタウイルスの局在を検討したが、ウイルス抗原は検出できなかった。なお、比較においた陽性コントロールの陽性所見は確認されている

2. TBE 感染が疑われた症例 2,3.

ダニ媒介性脳炎が疑われた 2 例ではウイルス脳炎の組織学的所見である、血管周囲の単核細胞浸潤、神経細胞の脱落、変性が認められた。単純ヘルペス・サイトメガロウイルス脳炎で見られるような核内封入体あるいは麻疹等で見られる細胞質内封入体、さらには HIV 脳症で見られる多核巨細胞形成のような特徴的な細胞変化は認められなかった。神経細胞の脱落は小脳の Purkinje 細胞の脱落が目立っていた。免疫組織学的にダニ媒介性脳炎ウイルス抗原は検出できなかった。

D. 考察

現時点で腎症候性出血熱を引き起こすハンタウイルスとして、ハンタン型、ドブラバ型、ソウル型、プーマラ型の 4 種類が報告されている。一方、腎症候性出血熱の組織学的変化については倉田毅の総説 (川俣順一編:腎症候性出血熱:感染・病理・予防、医歯薬出版、1987) に詳しく記載されている。しかしながら、剖検組織の解析が容易であることより、主として強毒型のハンタンウイルスについての病理なら

びに動物組織材料の変化が検討されてきた。弱毒のプーマラ型等の組織所見は腎生検等の検討を除き、十分に解明されていない。

今年度解析した症例においてはウイルス学的解析は現在、北海道大学大学院獣医学研究科 莉和宏明博士により遂行されており、この結果と併せて最終的に判断するべきである。組織学的には尿細管障害を伴う間質性腎炎の組織像が主体であり、糸球体障害が主病変とは考えにくい。ハンタウイルスは血管内皮細胞を主たる標的細胞としていることが示唆されているが、今回の解析では内皮細胞の障害を示す変化ははっきりしなかった。

ダニ媒介脳炎のうち、ロシア春夏脳炎の組織学的変化も十分に確立していない。今回、解析した2例は、初夏に発症し、臨床的にダニ咬傷歴を有し、かつ発熱と神経症状を主体とした臨床症状があり、かつ、極東地域の研究所においてウイルス抗原の存在が凍結組織において確認されている。この病理学的所見は典型的ウイルス性脳炎の組織像であり、本邦においては日本脳炎との鑑別が問題となる。最終的にはウイルス分離、ゲノム検出、あるいは特異抗原の検出によりダニ媒介脳炎の診断が可能となる。これらの2例では検出できなかったのは高島博士らが開発した単クローン抗体は、マウスの実験感染ではウイルス抗原を検出できることが確認されている。

このように、ロシア極東地域の剖検例ではウイルス抗原を検出することが困難であった。この理由が①標本作製時の方法論的問題に起因するのか、②使用した抗ウイルス抗体では検出できない型のウイルスであるのか、③死亡時ウイルスが体内より駆逐され、検出レベル以下の段階出会ったのかは、今年度の解析では決定することができなかった。今後、検討していく必要がある。

E. 結論

ロシア極東地域ではダニ媒介性脳炎ならびにハンタウイルスによる腎症候性出血熱患者が存在していることが確認できた。これらの症例において組織所見のみより、感染したウイルスの同定は困難な状況であるが、今後、この点を追求しながら、さらにウイルス病理学的解析を行っていくことが必要である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ando Y, Iwasaki T, Terao K, Nishimura H, Tamura S: Conjunctivitis following accidental exposure to influenza B virus/Shangdong/07/97. *J Infect* 42: 223-224, 2001.
- Hagiwara Y, Iwasaki T, Asanuma H, Sato Y, Sata T, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Effects of intranasal administration of cholera toxin (or Escherichia coli heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain. *Vaccine* 19: 1652-1660, 2001.
- Hagiwara Y, Tsuji T, Iwasaki T, Kadowaki S, Asanuma H, Chen Z, Komase K, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Effectiveness and safety of mutant Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT H44A) as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* 19: 2071-2079, 2001.
- Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Harashima A, Hatano I, Suzuki Y, Yoshii K, Yoshii T, Nomoto A, Kurata T: Comparison of neuropathogenicity of poliovirus type 3 in transgenic mice bearing the poliovirus receptor gene and cynomolgus monkeys. *Vaccine* 19: 3201-3208, 2001.
- Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, Suga K, Kito H, Iwasaki T, Kurata T, Tanaka T, Saito Y, Asano Y: Fatal acute myocarditis in an infant with human herpesvirus 6 infection. *J Clin Pathol.* 54(10): 792-5, 2001.
- Inagaki-Ohara K, Iwasaki T, Watanabe D, Kurata T, Nishiyama Y: Effect of the deletion of US2 and US3 from herpes simplex virus type 2 on immune responses in the murine vagina following intravaginal infection. *Vaccine* 20: 98-104, 2002.

Ando Y, Terao K, Narita M, Suzuki S, Oguchi Y, Kojima A, Sata T, Kurata T, Iwasaki T: Quantiation of cytomegalovirus (CMV) genome in aqueous humor of patients with CMVretinitis Jap J Ophthalmology (in press)

Hasegawa H, Kadowaki S, Watanabe I, Aizawa H, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T, Sata T: Persistent infection of influenza virus in irradiated mice and its prevention by intranasal vaccination. Vaccine , 20:1050-7, 2002

Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Miyamura T, Sata T, Iwasaki T: Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. J Med Virol (in press)

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担者研究報告

ダニ媒介脳炎ウイルスの遺伝子解析に関する研究

分担研究者 水谷哲也 北海道大学大学院獣医学研究科 助手

研究要旨

ロシアシベリア地区と極東地区に分布するダニ媒介脳炎(TBE)ウイルスの型、抗原性状および病原性について調べた。シベリア地区のイルクーツク周辺には新種のシベリア型 TBE ウイルスと比較して抗原性が異なり、マウスにおける病原性が強いことが判明した。

A. 研究目的

本研究ではシベリアと極東ロシアにおいて 1999 年に分離した TBE ウイルス株の亜型の分布状況を調べた。TBE ウイルスは系統樹解析により、亜型に分類され、単クローン性抗体による抗原性状が調べられた。さらに、これらの TBE ウイルス株のマウスモデルにおける病原性が比較された。

B. 研究方法

1999 年にロシアのイルクーツク、ハバロフスクおよびウラジオストクで採集したマダニ類から哺乳マウス脳内接種法により TBE ウイルスを分離した。分離した TBE ウイルス株の E-タンパク遺伝子の塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。分離 TBE ウイルスの抗原性を単ク

ローン性抗体への反応性により比較した。ウイルス株の病原性をマウスへの 1000FFU 皮下接種と 10FFU 脳内接種により比較した。

C. 研究結果

TBE ウイルス各株の抗原性が、単クローン性抗体を用いた蛍光抗体法により調べられた。極東型 TBE ウイルスは用いた単クローン性抗体に対してすべて反応したが、イルクーツクから分離した 6 株は TBE ウイルスにフラビウイルス特異的、ダニ媒介性フラビウイルス特異的単クローン性抗体に反応したが、TBE ウイルス特異的単クローン性抗体に反応せず、抗原性の違いが示された。

TBE ウイルスの E-タンパク遺伝子の塩基配列を用いて系統樹解析を

行った。極東型のハバロフスク、ウラジオストックおよび日本の TBE ウイルスは一つのクラスターを形成したのに対して、イルクーツクのウイルス株はシベリア型のバジリチュンコ株とともに明らかに異なるクラスターを形成した。従ってイルクーツク周辺には TBE ウイルスシベリア型が分布していることが判明した。

イルクーツクで分離されたシベリア型 TBE ウイルスと極東型 TBE ウイルスの病原性をマウスにおいて比較した。1000FFU のウイルスの皮下接種ではイルクーツク株では 0～20% の生存率であり、極東型の生存率の 40～50% より明らかに低かった。10FFU のウイルスの脳内接種ではイルクーツク株は他の株に比べ 2～3 日早期に死亡した。これらの成績はイルクーツク株が極東株に比べてマウスに対する病原性が強いことが判明した。

D. 考察

今回の研究より極東型 TBE ウイルスと明らかに異なるシベリア型 TBE ウイルスがイルクーツク周辺に分布していることが判明した。一方、ウラジオストックとハバロフスクから分離された TBE ウイルスはすべて極東型に分類された。系統樹解析の成績から、シベリア型 TBE ウイルスはヨーロッパ型ウイルスより極東型ウイルスに近いことが判った。そのことはシベリア型ウイルス

と極東型ウイルスがヨーロッパ型ウイルスより遅い時期に祖先ウイルスから分岐したことを示している。

今回調べられた TBE ウイルスシベリア型と極東型株間にマイナーな抗原性の差異が単クローン性抗体により明らかとなった。この差は多分 E-タンパクの 243 番目のアミノ酸の変異によると推察された。

シベリア型 TBE ウイルスイルクーツク株は極東型 TBE ウイルスに比べマウスにおける病原性が強かった。従って今後これらのシベリア型株に対する予防対策として市販のヨーロッパ型 TBE ウイルスワクチンの効果を評価する必要がある。

E. 結論

ダニ媒介脳炎についてはロシアイルクーツク地区に新種のシベリア型ダニ媒介脳炎ウイルスが分布しており、極東型のウイルスより病原性が強かった。これらの近年流行しているダニ媒介脳炎ウイルスに対してヨーロッパ型のワクチンが効果があることが判った。リバビリンとラクトフェリンがハンタウイルスに有効であることが判明した。ハンタウイルスの組換え核タンパクを用いた ELISA による精度の高い鑑別血清診断法を開発した。ヒトのバベシア感染症初発例の感染源は不顕性感染者の輸血によること、病原巣動物はアカネズミであることを示した。

F. 健康危険情報

2001年に61歳の日本人男性がオーストリアのザルツブルグに滞在中にダニ媒介性脳炎に罹患し死亡した。ダニ媒介性脳炎はウイルス感染マダニの吸血により罹患する致死率の高い(最大30%)ウイルス感染症である。この事例から、今後ヨーロッパやロシアなどのダニ媒介性脳炎の流行地を旅行する日本人に対して本疾患の疫学情報と予防法を通知するとともに現在許可されていないワクチンを旅行者に早急に利用できるようにする必要がある。ウイーン大学ウイルス学研究所のFrarz Heinz教授からの情報による。本情報は平成14年1月23日付で通報済みである。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takashima, I., Hayasaka, D., Goto, A., Kariwa, H. and Mizutani, T.: Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) and phylogenetic analysis of TBE viruses in Japan and Far Eastern Russia. *Jpn. J. Infect. Dis* 54 : 1-11, 2001
- 2) Hayasaka, D., Ivanov, L., Leonova, G.N., Goto, A., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H. and Takahima, I.: Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and Far-eastern Asia. *J. Gen.*

Virol. 82: 1319-1328, 2001

- 3) Hayasaka, D., Goto, A., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H. and Takashima, I. : Evaluation of European tick-borne encephalitis virus vaccine against recent Siberian and Far-eastern subtype strains. *Vaccine* 19: 4774-4779, 2001
- 4) 高島郁夫 : ウイルス性脳炎, 化学療法の領域, 17: 57-66, 2001

2. 学会発表

- 1) 早坂大輔、後藤明子、好井健太郎、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫 : ダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルスシベリア型および極東型の病原性の比較とワクチンの効果 : 第131回日本獣医学会、府中(2001, 4)
- 2) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明子、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫 : ダニ媒介性脳炎ウイルス組み換え蛋白の作成と抗原性状の解析 : 第131回日本獣医学会、府中(2001,4)
- 3) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明子、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫 : ダニ媒介性脳炎ウイルスのワクチンの評価と組み換え蛋白の作成 : 第36回日本脳炎ウイルス生態学研究会、和倉(2001, 5)
- 4) Takashima, I., Yoshii, K., Hayasaka, D., Goto, A., Mizutani, T., Kariwa, H. :

Evaluation of tick-borne encephalitis virus vaccine and production of recombinant viral protein: Thirty-fifth Joint Working Conference On Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Chevy Chase, Honolulu (2001, 8)

- 5) 早坂大輔、グリットサン タマラ、アーネスト グールド、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルス Oshima 株の感染性 cDNA クローンの作製：第 132 回日本獣医学会、盛岡 (2001, 10)
- 6) 早坂大輔、Tamara Gritsun、Ernest A Gould、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBE)型極東型の感染性 cDNA クローンの作製：第 37

回日本ウイルス学会北海道支部総会、札幌 (2001, 10)

- 7) 早坂大輔、Tamara Gritsun、Ernest A Gould、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス(北海道)株の感染性 cDNA クローンの作製：第 49 回日本ウイルス学会、大阪 (2001, 11)
- 8) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明子、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス組み換え蛋白を用いた ELISA による血清学的診断法の開発：第 49 回日本ウイルス学会、大阪 (2001, 11)

H. 知的財産の出願・登録状況
なし

野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染所の予防、診断及び疫学に関する研究

ハンタウイルス感染症の疫学的研究と抗ハンタウイルス剤の作用機序の解析

分担研究者 苺和 宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 助教授

研究要旨

本研究では中国の寧夏回族自治区でげっ歯類の捕獲調査を行い、ハンタウイルスの抗体検査を実施した。捕獲された 409 匹のげっ歯類のうち、セスジネズミ(19/191)とハントウアカネズミ(1/13) が抗体を保有していた。これらのセスジネズミの感染ウイルス型を組み換え抗原を用いた ELISA で調べたところ、いずれも Hantaan 型の感染を受けていることが明らかになった。また、本ウイルスに対する抗ウイルス作用を有する牛のラクトフェリン(LF)とリバビリン (Rbv) の作用機序について解析した。培養細胞におけるウイルスの複製に対する作用では LF はウイルス接種前に作用させた時にのみ効果が現れるのに対し、Rbv はウイルス接種後に効果的であった。乳のみマウスを用いた *in vivo* の実験では、LF のウイルス接種前投与 LF の前投与と Rbv の接種後投与はいずれも生存率を有意に上昇させることが判明した。

A. 研究目的

腎症候性出血熱 (HFRS) は、ハンタウイルスによって引き起こされるウイルス性人獣共通感染症である。本症は世界中に分布しており、臨床的には高熱、出血症候と腎機能障害を主徴とする重篤な疾患である。本ウイルスの病原巣動物は野生げっ歯類であり、現在有効なワクチンが存在しないことから、疫学的情報を得ることが本症の予防対策や公衆衛生の向上のために重要となる。また、本症に対する有効な抗ウイルス剤の開発も重要な課題である。本研究では、中国の寧夏回族自治区でげっ歯類のハンタウイルス抗体調査を行うとともに、抗ハンタウイルス活性を有する Rbv と LF のウイルス複製阻害機序について解析した。

B. 研究方法

1. 被検血清

1999 年に中国寧夏回族自治区で捕獲された 409 例のげっ歯類から濾紙法によって採取された血清につき、蛍光抗体法(IFA)と酵素抗体法(ELISA)によりハンタウイルス抗体を測定した。

2. IFA

ハンタウイルス感染 VeroE6 細胞を抗原として用い、げっ歯類の血清を反応させた後、FITC 標識 protein G で染色してハンタウイルスの細胞質内抗原が検出される血清の最高希釈倍するの逆数を IFA 抗体価とした。

3. ELISA

IFA で抗体の検出された血清につき、パキ

ユウウイルスで発現させたハンタウイルスの組み換えヌクレオキャプシド(NP)を抗原として用いた ELISA によりハンタウイルスの感染型を推定した。用いた抗原は Hantaan ウイルスの NP 全長を発現させたもの(HTNV-whole)と Hantaan ウイルス、Seoul ウイルスおよび Dobrava ウイルスのそれぞれ型特異的抗原である HTNV-rNP50、SEOV-rNP50、および DOB V-rNP50 である。

4. 抗ハンタウイルス剤

Ribavirin (Rbv: ヤマサ醤油)と牛ラクトフェリン (LF: 和光純薬) につき、*in vitro* と *in vivo* で抗ハンタウイルス作用の機序を解析した。

5. フォーカス形成阻止試験

単層培養した Vero E6 細胞にウイルス接種前に 400 µl/ml の LF を 37℃ で 1 時間処理し、LF を捨てた後ウイルスを接種した。また、ウイルス接種後に 100 µl/ml の Rbv を作用させた。これらの薬剤で処理した感染細胞をカルボキシメチルセルロース添加培地中で 48 時間まで培養し、メタノールで固定後、IFA で染色してウイルスのフォーカスを数えた。

6. Northern blot 解析

ハンタウイルスの S 遺伝子の +鎖と -鎖を標的とした Northern blot 解析を行った。感染前後の様々な時期に Rbv を Vero E6 細胞に処理し、感染 5 日目の RNA を抽出して Rbv がハンタウイルス RNA 合成のいずれの段階を抑制するのかについて調べた。

7. 共焦点顕微鏡

LF と Rbv を処理したハンタウイルス感染細胞を一定時間後に固定し、モノクローナル抗体を用いてそれぞれウイルスエンベロープ蛋白(G2)と NP を染色し、細胞内でのウ

イルス蛋白の発現状況を観察した。

8. 致死的なハンタウイルス感染マウスモデルを用いた *in vivo* での薬剤評価試験

ハンタウイルス感染によって、93%が死亡するマウスの系を用いて両薬剤の評価を行った。出生後 2 日以内の乳のみマウスに LF を 40mg/kg と 160mg/kg ウイルス接種 1 日前に皮下投与し、ウイルスを皮下接種後 25 日目まで生存を観察した。また、Rbv はウイルス接種後 1 時間後に 25mg/kg と 50mg/kg を皮下接種し、同様に観察した。

C. 研究結果および考察

1. 中国の寧夏回族自治区でげっ歯類の捕獲調査を行い、ハンタウイルスの抗体検査を実施した。捕獲された 409 匹のげっ歯類のうち、セスジネズミの約 10% (19/191) とハントウアカネズミの約 8% (1/13) が抗体を保有していた。IFA 抗体陽性のセスジネズミ血清について、さらに感染ウイルス型を組み換え抗原を用いた ELISA で調べたところ、HTNV-whole 抗原もしくは HTNV-rNP50 抗原に対して強く反応したことから、これらのネズミが Hantaan 型のウイルスに感染していたことが明らかになった。本地区は HFERS の流行地域であることが知られていたが、強毒型の Hantaan 型がセスジネズミに保持され、本種がこの地区における HFERS の病原巣動物となっていることが判明した。今回得られた成績は今後、本地区で HFERS の予防対策を策定する上で、有用な情報であると思われる。
2. LF と Rbv の抗ハンタウイルス活性の作用機序をまず *in vitro* で解析した。ハンタウイルスのフォーカス形成はウイルス接種