

前に 400 $\mu\text{l/ml}$ の LF を 37°C で 1 時間処理すると、対照に比べ 15% にまで低下した。ウイルス接種後に 100 $\mu\text{l/ml}$ の Rbv を作用させるとフォーカス形成は対照の 2.5% まで阻害された。LF 前処理と Rbv 後処理の併用は完全にフォーカス形成を阻害した。ウイルス RNA の合成に対する Rbv の阻害作用について調べたところ、感染直後から 3 日目あるいはそれ以降まで培養液に加えた時のみ、+鎖と-鎖のウイルス RNA 両方の合成を阻害した。Rbv の感染前あるいは感染後 2 日目までの処理は全く抑制効果が見られなかった。ウイルスの糖蛋白 (G2) とヌクレオキャプシド (NP) の合成を共焦点顕微鏡で観察したところ、LF 前処理細胞において 24 時間目までは両蛋白の合成阻害がみられたが、48 時間後にはほとんど対照と同程度まで到達した。さらに、LF は 24 時間目まではウイルスの放出を阻害したが、48 時間後には阻害は見られなかった。一方、Rbv はウイルス蛋白の合成を全般的に阻害し、感染 24 時間目以降のウイルス放出をも阻害した。これらの成績は LF はウイルスの細胞への吸着を阻害するのに対し、Rbv はウイルスの RNA 合成を阻害することを示唆している。

3. LF と Rbv の *in vivo* の実験では、ハンタウイルスを接種したマウスの 7% しか生存しない乳飲みマウスの系で LF のウイルス接種前投与と Rbv の接種後投与の効果について検討した。LF の 40 と 160 mg/kg の接種前一回投与は生存率をそれぞれ 70% と 15% に上昇させ、LF の二回前投与ではそれぞれ 94% と 85% まで上昇した。Rbv の 25 と 50mg/kg の接種前投与は生存率をそ

れぞれ 68% と 81% に上昇させた。このことは LF と Rbv は *in vivo* におけるハンタウイルス感染にも有効であることを示している。

D. 結論

今回、ハンタウイルスの疫学調査を中国寧夏回族自治区において実施し、セズジネズミが本地区において HFERS の病原巣動物になっていることが明らかになった。また、最近我々によって開発された、組み換え NP を抗原とする ELISA を応用することにより、微量の血清でも抗体検出に加えて感染ウイルス型の推定が可能であることが判明した。また、LF と Rbv の抗ハンタウイルス剤としての評価を *in vitro* と *in vivo* において行ったところ、両剤とも明らかな抗ハンタウイルス活性を有していることが確認された。*in vitro* における様々な実験成績から LF はウイルスの細胞への吸着を阻害するのに対し、Rbv はウイルスの RNA 合成を阻害することが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kariwa, H., Cui, B.Z., Araki, K., Yoshimatsu, K., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Murphy, M.E., Mizutani, T., Arikawa, J., Fukushima, H., Xiong, H., Jiehua, C., Takashima, I.: Epizootiological survey of hantavirus among rodent species in Ningxia Hui Autonomous Province, China. *Jpn. J. Vet. Res.* 49(2):105-114. 2001
- 2) Murphy, M.E., Kariwa, H., Mizutanim T., Tanabe, H., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.: Characterization of *in vitro* and *in*

- vivo antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. *J. Vet. Med. Sci.* 63(6):637-645. 2001
- 2) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Kariwa, H.: Epidemiology and epizootiology of hantavirus infection in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 54(3):95-102. 2001
 - 3) Hayasaka, D., Goto, A., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I.: Evaluation of European tick-borne encephalitis virus vaccine against recent Siberian and far-eastern subtype strains. *Vaccine.* 14;19(32):4774-4779. 2001
 - 5) Araki, K., Yoshimatsu, K., Ogino, M., Ebihara, H., Lundkvist, A., Kariwa, H., Takashima, I., Arikawa, J.: Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Hantaan, Seoul, and Dobrava hantavirus infections. *J. Clin. Microbiol.* 39(7):2397-404. 2001
 - 6) Hayasaka, D., Ivanov, L., Leonova, G.N., Goto, A., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I.: Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia. *J. Gen. Virol.* 82(Pt 6):1319-1328. 2001
 - 7) Takashima, I., Hayasaka, D., Goto, A., Kariwa, H., 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):1-11. Review. 2001
2. 学会発表
- 1) 苺和宏明：日本と極東ロシアにおけるハantaウイルス感染の疫学：第 131 回 日本獣医学会 府中 (2001. 4)
 - 2) 早坂大輔、後藤明子、好井健太郎、水谷哲也、苺和宏明、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)
 - 3) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明子、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス組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)
 - 4) 座本綾、辻正義、魏強、石原智明、Slonova Raisa, Leonova Galina、苺和宏明、早坂大輔、高島郁夫：極東ロシアの野鼠からの *Babesia microti* の検出：第 131 回 日本獣医学会総会 府中 (2001. 4)
 - 5) 荒木幸一、吉松組子、荻野倫子、Lee Byoung Hee、苺和宏明、高島郁夫、有川二郎：ハantaウイルス感染マウスにおけるウイルス特異的 CD8+T 細胞応答：第 132 回 日本獣医学会 盛岡 (2001. 10)
 - 6) 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、苺和宏明、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)
 - 7) 苺和宏明：ウイルスと宿主の相互関係～ハantaウイルスとげっ歯類の共進化～：第 49 回 日本ウイルス学会総会 大阪 (2001. 11)
 - 8) 早坂大輔、Tamara Gritsun、Ernest A. Gould、水谷哲也、苺和宏明、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 日本ウイルス学会総会 大阪 (2001. 11)
 - 9) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明子、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス組換え蛋白を用いた ELISA によ

- る血清学的診断法の開発:第49回 日本ウイルス学会総会 大阪 (2001. 11)
- 10) 荒木幸一、吉松組子、荻野倫子、Lee Byoung Hee、荻和宏明、高島郁夫、有川二郎: ハンタウイルス感染症の免疫介在性病原性発現機構の解析: 第49回 日本ウイルス学会総会 大阪 (2001. 11)
- 11) Lokugamage K, Kariwa H, Takashima I, Maeda K, Hayasaka D, Cui BZ, Murphy ME, Lokugamage N, Ivanov LI, Volkov VI, Demenev VA, Slonova R, Leonova GN, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J. : Serologic and genetic characterization of a newly identified genotype of Hantavirus carried by the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*): 第49回 日本ウイルス学会総会 大阪 (2001. 11)
- 12) 宮本大伸、荻和宏明、ロクガマゲクマリ、早坂大輔、崔百忠、ロクガマゲナンダデバ、Ivanov, LI, Volkov VI, Demenev VA, Slonova R, Leonova GN, 水谷哲也、吉松組子、有川二郎、高島郁夫: 極東ロシアの腎症候性出血熱 (HFRS) 患者におけるハンタウイルスの抗体調査と遺伝子解析: 第49回 日本ウイルス学会総会 大阪 (2001. 11)
- 13) Koichi Araki, Michiko Ogino, Katarina Brus Sjolander, Ake Lundkvist, Hideki Ebihara, Hiroaki Kariwa, Ikuo Takashima, Kumiko Yoshimatsu, Jiro Arikawa: 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 June)
- 14) Hiroaki Kariwa, Kenji Maeda, Kumari Lokugamage, Daisuke Hayasaka, BZ, Cui, Michael E Murphy, Leonid I Ivanov, Vladimir I Volkov, Vladimir A Demenev, Raisa Slonova, Galina N Leonova, Tetsuya Mizutani, Kumiko Yoshimatsu, Jiro Arikawa, Ikuo Takashima: Ser-epizootiological survey and genetic analysis of hantavirus in Far Eastern Russia: The 5th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus pulmonary Syndrome (HPS), and Hantaviruses Annecy (France) (2001 June)
- 15) Ikuo Takashima, Kentarou Yoshii, Daisuke Hayasaka, Akiko Goto, Tetsuya Mizutani, Hiroaki Kariwa: Evaluation of tick-borne encephalitis virus vaccine and production of recombinant viral E-protein: U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 35th Joint Working Conference on Viral Diseases Honolulu (U.S.A.) 2001 August.
- 16) Hiroaki Kariwa, Kenji Maeda, Kumari Lokugamage, Daisuke Hayasaka, BZ Cui, Nandadeva Lokugamage, Leonid I Ivanov, Vladimir I Volkov, Vladimir A Demenev, Raisa Slonova, Galina N Slonova, Tetsuya Mizutani, Kumiko Yoshimatsu, Jiro Arikawa, Ikuo Takashima: Epidemiological survey and genetic analysis of hantaviruses in the Far East Russia: U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 35th Joint Working Conference on Viral Diseases Honolulu (U.S.A.) 2001 August.
- 17) Jiro Arikawa, Kumiko Yoshimatsu, Koichi Araki, Michiko Ogino, Katarina Brus Sjolander, Ake Lundkvist, Hideki Ebihara, Hiroaki Kariwa, Ikuo Takashima: Application of truncated hantavirus nucleocapsid protein for serotyping

of human and rodent sera: U.S.-Japan
Cooperative Medical Science Program 35th
Joint Working Conference on Viral Diseases
Honolulu (U.S.A.) 2001 August.

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

ハンタウイルス感染症の診断法の開発に関する研究

分担研究者 有川 二郎 北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設 教授

研究要旨：ハンタウイルス(Hantaan (HTN)、Seoul (SEO)、Dobrava (DOB))の核蛋白(NP)の N 末端 50 アミノ酸を削除してバキュロウイルスを発現ベクターとして作られた組み換え蛋白を抗原とする ELISA を開発した。本 ELISA では感染ウイルスの血清型の鑑別診断が可能であった。また、本法を種々のげっ歯類血清へ応用するため、各種げっ歯類免疫グロブリンの市販の検出用試薬（抗マウス、ラット、ハムスター、シカネズミ IgG および Protein A, G との交差反応性を比較した。

A. 研究目的

ハンタウイルス感染症は、げっ歯類媒介性の人獣共通感染症で、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)が知られている。ハンタウイルスのうち、Hantaan (HTN)、Seoul (SEO)、Dobrava (DOB)および Puumala (PUU)の少なくとも 4 つの血清型が HFRS の原因となる。HTN と DOB は重症型、SEO は中等度型そして PUU は軽症型の HFRS の原因となる。このように、血清型毎に重篤度が異なるため、HFRS 患者血清を用いた感染ウイルスの血清型鑑別を行うことが重要である。また、各血清型毎に媒介するげっ歯類種が特定されていることから、げっ歯類に感染したウイルスの血清型を確認することは予防上重要である。

PUU 型は他の血清型と抗原性が大きく相違

することから、血清学的に鑑別診断することが容易である。一方、HTN、SEO および DOB 感染血清では互いに強く交差することから中和試験でのみ鑑別が可能である。しかし、中和試験では感染性ウイルスを用いることおよび判定までに 1 週間以上必要であることが障害となっている。

そこで、本研究では、HTN、SEO および DOB の核蛋白(NP)に血清型特異的なエピトープが存在することを利用して、capture ELISA による安全かつ迅速な鑑別診断法開発を目的とした。

さらに、広く各種げっ歯類血清に本法を応用するために、各種げっ歯類免疫グロブリンの市販の検出用試薬（抗マウス、ラット、ハムスター、シカネズミ IgG および Protein A, G との交差反応性を比較した。

B. 研究方法

「抗原」: HTN、SEO および DOB の NP の全長 (アミノ酸 1-429 : 全長抗原)、NP の N 末端の 1-49 アミノ酸を削除したもの (50-429 : 50 抗原)、NP の N 末端の 1-154 アミノ酸を削除したもの (155-429 : 155 抗原) をバキュロウイルスベクター (AcNPV:BAC-TO-BAC GIBCO BRL) を用いて昆虫細胞 (High Five) に発現させた。

「capture ELISA」: モノクローナル抗体 E5/G6 (アミノ酸 166-175 を認識) を用いて抗原を固相化し、HTN、SEO および DOB それぞれの感染血清を用いて ELISA を行った。

「げっ歯類血清」: 19 属 29 種の齧歯類の血清または精製 IgG を用いた。

「交差反応性の解析」: ペルオキシダ-ゼ標識の市販 2 次抗体 (抗マウス IgG、抗ラット IgG、抗ゴールデンハムスター IgG、抗 Peromyscus leucopus IgG) および Protein A、Protein G の各種げっ歯類抗体との反応性を ELISA で比較した。

(倫理面からの配慮について)

用いた感染血清 (患者血清) は何れも、韓国、中国、スウェーデンの研究所から分与されたものである。当該研究所で既に研究目的で使用が認められているものであり、さらに無記名で分与されたものであることから、倫理面からの問題はない。げっ歯類血清の交差反応性解析のための各種げっ歯類からの採血は、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行った

ものであり、動物福祉の観点からも問題はな
いと判断された。

C. 研究結果

HTN、SEO および DOB の全長抗原は何れも HTN、SEO および DOB 感染血清全てに高い交差反応性を示した。しかし、HTN、SEO および DOB の 50 抗原は、何れもホモの組み合わせの感染血清に高い反応性を示した。SEO155 と DOB155 抗原もホモの感染血清に高い反応性を示したが、HTN155 抗原は何れの感染血清に対しても反応性が低かった。

表に示すような検出用試薬および 2 次抗体が推奨された。ネズミ亜科では同亜科に属するマウスやラットに対する 2 次抗体が全体に交差反応性が高かった。しかし、キヌゲネズミ亜科では抗ハムスター抗体はハムスター血清 (*M. auratus*) にのみ強く反応した。

表 : 解析したげっ歯類種と検出のために推奨される二次抗体又は検出試薬

亜科	種類	推奨2次抗体/試薬	
Murinae	<i>Acomys cahirinus</i>	抗 mouse	
ネズミ	<i>Apodemus argenteus</i>	抗 mouse, 抗 rat	
	<i>A. agrarius, A. peninsulae, A. semotus, A. speciosus, A. sylvaticus</i>	抗 mouse	
	<i>Bandicota indica</i>	抗 rat	
	<i>Millardia mertada</i>	抗 mouse	
	<i>Mus musculus, Mus m. molossinus</i>	抗 mouse	
	<i>R. argentiventer, R. exulans, R. norvegicus, R. rattus</i>	抗 rat	
	<i>Vandeleruia oleracea</i>	抗 mouse	
	Cricetinae	<i>Calomyscus mystax, Phodopus sungorus</i>	抗 mouse
	キヌゲネズミ	<i>Cricetulus migratorius</i>	抗 mouse, PA*
		<i>Cricetulus griseus</i>	PA, PG
<i>Mesocricetus auratus</i>		抗 Hamster	
<i>Phodopus campbelli</i>		抗 mouse, PA	
<i>Tscherskia triton</i>		PA	
Arvicolinae	<i>Clethrionomys rufocanus</i>	PA	
ハタネズミ	<i>Eothenomys smithii</i>	PG**	
	<i>Lagurus lagurus</i>	抗 mouse	
Sigmodontinae	<i>Sigmodon hispidus</i>	PA	
アメリカネズミ	<i>Peromyscus maniculatus</i>	抗 peromyscus, PG	
Gerbillinae	<i>Meriones unguiculatus</i>	抗 peromyscus	

PA*, Protein A; PG**, Protein G

D. 考察

NP の N 末端を削除することにより、HTN、SEO および DOB に共通なエピトープが失われ、相対的に血清型特異的エピトープに対する反応性が強くなることが確認された。しかし、HTN155 抗原では N 末端を削除し過ぎたために感染血清に対する反応性が低下したと考えられた。このため鑑別診断用抗原として 50 抗原が適していると考えられる。

各種齧歯類免疫グロブリンの交差反応性の比較では、必ずしもげっ歯類の系統分類に一致した免疫グロブリンの交差反応性だけではないことが明らかとなり、げっ歯類種の分類のみを指標に高い交差反応性を示す 2 次抗体を選定することはできないことが判明した。また Protein A および G の反応性は種によって多様であり、慎重な反応性の評価を行った上で使用することが望ましいと考えられた。

E. 結論

本研究によって、組み換え NP を用いたハンタウイルス血清型鑑別診断の ELISA が確立した。さらに、本解析系と各種齧歯類免疫グロブリンの交差反応性の比較成績を組み合わせることによって、げっ歯類媒介性の本症の疫学的調査研究へのより広範な応用が可能になると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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. *Journal of Clinical Microbiology* , 39, 2397-2404, 2001

2) Arikawa, J., Yoshimatsu, K. and Kariwa, H. : Epidemiology and epizootiology of hantavirus infection in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 54(3), 95-102, 2001

3) 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

4) 有川二郎「腎症候性出血熱」、化学療法領域 17(5)、5(853)-9(857)、2001

2. 学会発表

1) 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 4 8 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）

2) 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）

3) 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)

4) 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

なし

3. その他

なし

serotyping of human and rodent sera." US-Japan Cooperative Medical Science Program, 35th Joint Working Conference on Viral Diseases, Hawaii, USA (2001. 8)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

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
（分担研究項目：バベシア症の診断法の開発と疫学的研究）

分担研究者 辻 正義 酪農学園大学獣医学部実験動物学教室 助教授

研究要旨

わが国におけるバベシア症の実態を把握するため、野鼠の捕獲調査およびヒトの血清疫学調査を行った。北海道のアカネズミとエゾヤチネズミ および 千葉・滋賀・兵庫・徳島・島根県のアカネズミから 20 株のバベシア原虫を分離した。これらの原虫は、北米の *Babesia microti* と近縁ではあるが異なっており、rRNA 塩基配列から神戸タイプおよび穂別タイプの 2 種類に分類された。北海道および千葉県のダニ媒介性疾患発生地域で集められたハイリスクグループのヒト血清の 1.8% にバベシア原虫に対する特異抗体が検出された。以上のことから、わが国には、バベシア症の流行地である米国のものとはタイプの異なる 2 種類の *B. microti* 様原虫が存在し、それらに不顕性感染したヒトが既に相当数いるものと推測された。また、現行の間接蛍光抗体法に代わる信頼性・再現性に優れかつ多検体処理に適した血清診断法の開発を目指して、主要原虫抗原の遺伝子をクローニングを試みた。患者から分離された神戸株の cDNA ライブラリーから 8 種類の遺伝子が得られ、そのうち患者血清で最も強く認識される原虫抗原の遺伝子 (P1) の大腸菌での発現に成功した。組み換え P1 蛋白質を抗原とした ELISA 法を確立し、その有用性について検討中である。

A. 研究目的

ヒトの *Babesia microti* 感染症は、野鼠とマダニの間で保たれている原虫の感染サイクルの中へ偶発的にヒトが入ることによって起きる人獣共通伝染病である。病気の常在地である米国の北東部大西洋沿岸では、1968 年以降、年間数十例の発生が続いており、同じダニ (*Ixodes scapularis*) により媒介されるライム病やヒト顆粒球性エルリキア症とともに、新興感染症として警戒されている。輸血による感染事故も 20 例以上が確認

されている。わが国では、約 20 年前に滋賀県の野鼠に寄生するバベシア原虫についての報告があったものの、ヒトで起こり得る感染症としての認識は全くなかった。ところが、1999 年 5 月、国内初のバベシア症患者が兵庫県神戸市で見つかった。患者は高熱・関節痛・血色素尿症・貧血・脾腫など重篤な症状を示し、血液塗沫で多数の赤血球に熱帯熱マラリア原虫様の輪状体が認められたことから、一時はマラリアの可能性も疑われた。しかし、我々が原虫分離を行い、その rRNA

塩基配列から原虫同定を試みた結果、*B. microti* 様原虫の感染であることが判明した。患者には輸血の既往があり、関与した血液提供者8名中に1名の抗体陽性者が見つかったことから、輸血による感染事故であった可能性が指摘されていた。本研究の目的は、国内初症例に関与した血液提供者について追跡調査を行うとともに、ヒトの血清疫学調査および野生げっ歯類における原虫の保有状況調査を行い、わが国のバベシア症の実態把握することであった。また、バベシア症の血清診断法として現在一般に用いられている間接蛍光抗体法は、熟練者が行えば高感度で信頼性も高いが、顕微鏡観察による肉眼判定には労力と時間が必要で多検体処理には適さない。そこで、我々は、国内初のバベシア症患者からの分離株（神戸株）の cDNA クローニングを行い、組み換え蛋白質を抗原とした ELISA 法の開発を試みた。

B. 研究方法

1) 不顕性感染血液提供者の追跡調査

国内初症例の患者には発症前に輸血の既往があり、関与した8名の血液提供者の中の1名に高い抗体陽性価が認められた。この血液提供者（以下、ドナーと呼ぶ）がバベシア原虫キャリアーであるか否かを調べるため、ドナーから経時的に血液採取を行った。採血は兵庫県赤十字血液センターにおいてインフォームドコンセントのもとに行われた。血清特異抗体の検出は患者分離株（神戸株）を抗原とした間接蛍光抗体法により行った。

バベシア原虫の分離は、血液をヒト赤血球置き換え SCID マウスあるいは摘脾ハムスターに接種することにより行った。

2) 野生げっ歯類の捕獲調査

1999～2000年の間に、北海道・千葉県・滋賀県・兵庫県・島根県・徳島県で野生げっ歯類6種 112 個体をシャーマントラップを用いて捕獲した。バベシア原虫の検出は、血液塗沫および PCR により行った。特異抗体の検出には、抗原性状の異なる、神戸株（国内初患者由来）、穂別株（北海道のアカネズミ由来）および Gray 株（北米の患者由来）の3つを抗原とした間接蛍光抗体法により行った。原虫陽性のものについて、血液材料のハムスター接種によりバベシア原虫の分離を行った。

極東ロシアのウラジオストック近郊で捕獲した野生げっ歯類6種 68 個体の凍結血液材料は、北海道大学大学院獣医学研究科の高島郁夫教授より分与を受けた。中国新疆ウイグル自治区で捕獲された野生げっ歯類 20 種 165 個体の血液ろ紙検体は、酪農学園大学獣医学部の萩原克郎博士より分与を受けた。極東ロシアおよび中国新疆ウイグル自治区の血液材料からは DNA を抽出し、*B. microti* の rRNA に特異的なプライマーを用いた nested PCRにより原虫の検出を行った。

3) ヒトの血清疫学調査

千葉県の紅斑熱・つつがむし流行地で1985年に採集保存された一般健康人血清 1335 検体は、千葉県衛生研究所ウイルス室の海保郁夫博士より分与を受け

た。北海道日高地方のヒト血清 323 検体は、1997～1999 年の間にライム病の診断依頼を受けもので、北海道医療大学口腔衛生学教室の磯貝恵美子博士より分与を受けた。北海道十勝地方の不明熱およびマダニ咬傷例の新鮮ヒト血液 139 検体はひがし十勝病院の楊孝康医師から筆者の研究室にバベシア症の診断を依頼されたものである。これらの血清サンプルについて神戸株、穂別株 および Gray 株の 3 つを抗原とした間接蛍光抗体法により特異抗体の検出を行った。マダニ咬傷例および抗体陽性者の生血液 25 検体（採取後 2 週間以内のもの）については、ハムスター接種による原虫分離 および nested PCR による原虫検出も試みた。

4) バベシア原虫抗原の cDNA クローニング

国内初患者より分離した神戸株の感染赤血球から mRNA を調製し、定法に従って λ zap ライブラリーを作製した。発現蛋白質のイムノスクリーニングには、患者およびドナーの血清を用いた。患者とドナーの各血清を用いて一次スクリーニングされた 7 および 40 のブラックについてブラック精製と *in vivo* excision を行い、最終的に 6 および 22 のプラスミドクローンを得た。これらのクローンについて、cDNA インサートの 5'側および 3'側の数百ベースの塩基配列を決定した。同じ配列を含むもの同士をグループに分類した。各グループ内の最も長い cDNA クローンの全塩基配列を決定し、遺伝子解析を行った。

5) 組み換え抗原を用いた ELISA 法

cDNA クローン P1 の ORF を蛍光蛋白質 EGFP 遺伝子と結合させて大腸菌の発現ベクター pTrcHis (Invitrogen) に挿入し、融合蛋白質の発現を試みた。組み換え蛋白質の精製は、TALON Metal Affinity Resin (Clontech) を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより行った。精製組み換え蛋白質を 2 μ g/ml の濃度で 96 穴 ELISA プレートにコートし、抗原として使用した。ELISA は定法に従って行い、2 次抗体として 1,000 倍希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG+A+M (Protos ImmunoResearch) を用いた。

C. 研究結果

1) 不顕性感染血液提供者（ドナー）の追跡調査

国内初症例の患者には発症前に輸血の既往があり、関与した 8 名の血液提供者の中の 1 名に高い抗体陽性価が認められた。この血液提供者（以下、ドナーと呼ぶ）がバベシア原虫キャリアーであるか否かを調べるため、ドナーから経時的に血液採取を行い、摘脾ハムスターに接種による原虫分離試験を行うとともに、特異抗体価の推移を調べた。追跡調査は、1999 年 6 月 26 日から 2000 年 4 月 24 日まで、ほぼ 1 ヶ月間隔で行われた。この期間中、ドナーの健康状態は良好で、バベシア症の臨床症状は全く認められなかった。しかし、非常に高い血清抗体価（1:12,800～1:51,200）を維持して、

バベシア原虫も分離され続けた。しかし、nested PCR による血液からの *B. microti* DNA の検出では、結果が一定でなく、検出感度において、原虫分離試験に劣ることが判明した。ドナーからの分離原虫は、rRNA の塩基配列およびウエスタンブロットにおける主要抗原バンドパターンの点で患者からの分離株（神戸株）ものと完全に一致した。

2) わが国の野生げっ歯類の原虫保有状況

2000～2001 年の間に、北海道・千葉県・滋賀県・兵庫県・島根県・徳島県で捕獲した野鼠合計 112 頭についてバベシア原虫の保有状況を調査し、ハムスター接種によりバベシア原虫 20 株を分離することができた。小サブユニット rRNA 塩基配列を解析した結果、ドナーの居住地である兵庫県淡路島で分離された 2 株は、国内初の患者由来の原虫と同じ型（神戸タイプ）であったが、それら以外の 18 株の rRNA 塩基配列はすべて同一で、これまでに報告のない新型（穂別タイプ）であることが明かとなった。神戸タイプおよび穂別タイプの原虫は、いずれも北米の *B. microti*（北米タイプ）と互いに非常に近縁で、進化系統解析において 1 つのクラスターを形成したが、3 者は明らかに区別できる配列を有していた。これら 3 タイプの原虫の抗原性状は互いに大きく異なり、タイプが異なる原虫間では間接蛍光抗体法およびウエスタンブロット解析でわずかな交差反応が見られるのみであった。神戸タイプおよび穂別タイプの分離株はヒト赤血球

置き換え SCID マウスへの接種試験により、ヒト赤血球への感染性を有することが確認された。

3) 極東ロシアおよび中央アジアの野鼠からの *Babesia microti* の検出

ロシアのウラジオストック周辺で捕獲されたハントウアカネズミ *Apodemus peninsulae* 32 頭、セスジネズミ *Apodemus agararius* 28 頭、タイリクヤチネズミ *Clethrionomys rufocanus* 4 頭、シマリス *Tamias sibiricus* 2 頭、ヨシハタネズミ *Microtus fortis* 2 頭の計 68 検体について、*B. microti* rRNA 遺伝子を標的とした PCR 法によりバベシア原虫の検出を試みた。*C. rufocanus* 2 検体（50%）および *A. peninsulae*（6.3%）2 検体が陽性であった。これら 4 検体の rRNA 塩基配列はすべて同一で、北米タイプの原虫の配列と完全に一致したが、穂別および神戸タイプの原虫の配列とは異なっていた。中国新疆ウイグル自治区で捕獲された 20 種の野生齧歯類合計 165 検体についても同様の方法で原虫の検出を試みた。その結果、Fuwen および Kamash で捕獲されたステップレミング (*Lagurus luteus*) 2 検体から陽性シグナルが得られた。両者の塩基配列は同一で、北米タイプの配列とはほぼ完全に一致した。

3) ヒトの血清疫学調査

間接蛍光抗体法により血清抗体の検出を行った結果、千葉県の紅斑熱・つつがむし流行地で 1985 年に採集保存された一般健康人血清 1335 検体のうち、11

検体(0.82%) が穂別タイプに対して抗体陽性 (抗体価 1:100~1:3200)、3 検体(0.22%) が神戸タイプに対して抗体陽性 (抗体価 1:100~1:800) であった。北海道日高地方のライム病関連のヒト血清 323 検体の中で、12 検体 (3.7%) が穂別タイプに対して抗体陽性で、抗体価は 1:100~1:400 であった。神戸タイプおよび北米タイプの原虫に対して陽性のものはなかった。北海道十勝地方の不明熱およびマダニ咬傷例の新鮮ヒト血液 139 検体のうち、7 検体 (5.0%) が穂別タイプに対して抗体陽性で、抗体価は 1:100~1:800 であった。神戸タイプおよび北米タイプの原虫に対して抗体陽性のものはなかった。全体での抗体陽性率は 1.8% であった。マダニ咬傷例および抗体陽性者の生血液 25 検体 (採取後 2 週間以内のもの) については、摘脾ハムスター接種による原虫分離および nested PCR による原虫検出も試みたが、いずれの試験も全て陰性であった。

4) バベシア原虫抗原の cDNA クローニング

患者とドナーの各血清を用いて 1 次スクリーニングされた 7 および 40 のブラックについてブラック精製と *in vivo* excision を行い、最終的に 6 および 22 のプラスミドクローンを得た。これら 28 クローンについて、cDNA の両末端約 400bp の塩基配列を決定し、同じ配列を含むもの同士に分類したところ、8 つのグループに分けられた (グループ A が 9 クローン、グループ B, C および D

が各 4、グループ E が 2、グループ F, G および I が各 1)。各グループ内の最も長い cDNA クローンの全塩基配列を決定し、既知の遺伝子情報と比べた結果、グループ D と G が各々 β -globin と eIF5 であることが判明したが、それ以外については特に高い相同性を示すものは見つからなかった。グループ A と B に属するクローンは、ほとんどがドナー血清により選択されたものであったが、グループ C の 4 クローンは全て患者血清により選択されたものであった。グループ E の 2 クローンは、患者とドナーの各血清で 1 つずつ得られ、それらの発現蛋白質は両血清と強く反応した。グループ B と F の遺伝子には、特徴的なくり返し配列の存在が認められた。

5) 組み換え P1 蛋白質を抗原とした ELISA 法

上記で得られた 8 グループの遺伝子のうち、グループ E に属する cDNA クローン P1 は 1089bp の ORF を含み膜蛋白質の特徴を持った 39kDa の抗原 (P1) をコードしていた。この cDNA の ORF を蛍光蛋白質 EGFP 遺伝子と連結して大腸菌の系で発現を試みたところ、可溶性融合蛋白質の大量発現と精製に成功した。組換え P1 蛋白質は、ウエスタンブロット法で患者およびドナーの血清と強く反応した。組換え蛋白質を用いてドナー血清からアフィニティー精製した抗体、および、組換え蛋白質を免疫したマウスの抗血清は、共に神戸株の 43kDa 抗原を強く認識していた。この原虫抗原は、ウエスタンブロット法で患者および

ドナー血清によって最も強く認識される抗原であったことから、P1 は診断用抗原として適切と考えられた。組換え P1 蛋白質を抗原とした ELISA 法において、患者およびドナー血清は高い抗体価を示すことが確認された。

D. 考察

バベシア症はダニによって媒介されるバベシア属原虫の赤血球内増殖によって起きる疾病で、家畜や野生動物の被害が大きいことから、以前は、獣医学領域でのみ研究される疾病であった。ところが、1957 年に旧ユーゴスラビアで脾臓摘出を受けた農夫がウシ由来のバベシア原虫に罹患し急死したことが発表されて以来、ヨーロッパでは *B. divergens* によると思われる同様の症例が散発的に報告されるようになり、本症はヒトの疾患としても注目されるようになった。さらに米国では、1968 年以降、コネチカット州を中心に野鼠寄生の *B. microti* がヒト感染する例が高頻度（年間数十例）に発生し、同じくダニにより媒介されるライム病などとともに、人獣共通伝染病として警戒されている。また、最近になって米国の西部では、*B. microti* とは系統的に異なる WA-1, CA-1, MO-1 などと呼ばれるバベシア原虫が相次いでヒトから見つかり、新興種の出現として注目されている。本症の発生は地域性が顕著であり、米国とヨーロッパ以外の地域におけるヒトの症例はほとんどない。アジアでは、唯一、台湾でヒトの *B. microti* 感染の確定的な報告があるのみで、日本に

はこれまで存在しない病気とわれてきた。ただ、日本の野生動物に寄生する *B. microti* 様の原虫については塩田らの 20 年前の報告があり、調べた 9 種の小型げっ歯類のうち特にアカネズミ *Apodemus speciosus* に高い陽性率が認められていた。野生げっ歯類に寄生する *B. microti* に関しては、日本に限らず世界の様々な国々で報告が見られるが、にもかかわらず、ヒトへ感染はほとんど米国でのみ発生するのはなぜなのか、大きな謎である。

Babesia microti は、*in vitro* での培養ができないため、原虫の分離や培養は実験動物（ハムスターが一般的）への接種が唯一の方法である。我々の研究室では SCID マウスの循環血をウシの赤血球置き換える方法を世界で初めて開発し、本実験モデルを用いてウシのバベシアおよびタイレリア原虫に関する様々な研究を行ってきた。ヒト赤血球による SCID マウスの置き換えには、ウシの場合と比べはるかに困難であることが判明しているが、従来から用いてきた C.B-17scid マウスを新規に開発された NOD/scid マウスに変えることで、最近ようやく実用的な置き換えが可能となった。国内初のバベシア症患者からの原虫分離は、ヒト赤血球置き換えマウスをヒトバベシア症の研究に応用した最初の成功例であった。本研究でも、不顕性感染血液提供者からの原虫分離や野鼠由来のバベシア原虫がヒト赤血球に感染性を有することを証明するのに、本実験モデルは極めて有用であった。

野生げっ歯類の捕獲調査により、わが

国には rRNA 配列および抗原性状により区別可能な2タイプの *B. microti* 様原虫 (穂別タイプと神戸タイプ) が存在し、前者は日本全国の野鼠が保有する主要なタイプであること、後者は兵庫県淡路島に限局して存在すること、および、野生アカネズミ (北海道ではこれに加えてエゾヤチネズミも) バベシア原虫のレゼルポアであることが示された。これら2種類の *B. microti* 様原虫は、形態的にもリボゾーム RNA の塩基配列からも米国の *B. microti* (Gray 株) と酷似していたが、間接蛍光抗体法で3者の間にはわずかな交差反応しか認められず、日本の原虫は米国のものとは抗原性状が大きく異なることが判明した。このことは、国内初のバベシア症の発生が、海外の流行地からの病原体の侵入によるものではなかったことを裏付けると同時に、*B. microti* 標準株として広く用いられている米国分離株は日本での血清疫学調査に不相当であることを意味した。極東ロシアおよび中央アジアの野鼠からも、*B. microti* が検出されたが、すべて北米タイプであった。北米タイプの *B. microti* はヨーロッパでもその存在が報告されており、今回の結果と合わせると、北半球に広く分布しているタイプと考えられる。これに対し、日本で見られるタイプの原虫は極東ロシアおよび中央アジアの野鼠からは検出できず、わが国に存在する *B. microti* 様原虫 (穂別タイプと神戸タイプ) は共に日本固有種である可能性が示唆された。このことは、わが国におけるバベシア原虫のレゼルポアであるアカネズミ (*Apodemus speciosus*) が、日本

にのみ分布する固有種であることと関連するかもしれない。

本研究において、国内初の患者への輸血に用いられた血液の提供者8名の中から1名の抗体陽性者が特定され、このドナーから患者分離株と同じタイプのバベシア原虫が分離された。このドナーの居住地周辺で捕獲された野生アカネズミに同じタイプのバベシア原虫が検出された。これにより、国内初症例が不顕性感染キャリアーからの輸血感染事故であったこと、および、国内の野鼠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。北海道および千葉県のマダニが常在する地域の住民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であるが、抗体価は低く原虫分離も成功していない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考えられた。また、この陽性率は、いわゆるハイリスクグループに属すると考えられるヒトの血清を対象とした得られた数値で、都市部や田園地帯などマダニの少ない地域の住民での不顕性感染率については極めて低いと予想されるが、実態は全く不明である。輸血事故の再発防止の観点から、今後、より大規模な疫学調査を行い、危険地域の特定および正確な不顕性感染キャリアー数を把握することが急務と思われる。本研究において、バベシア原虫の主要抗原の遺伝子クローニングとその組み換え蛋白質発現に成功し、ELISA 法開発への道が開かれたことは、そのような大規模血清

疫学調査を容易にするであろう。

E. 結論

国内初のバベシア症患者は不顕性感染キャリアーから提供された血液の輸血が原因であったことが証明された。この不顕性感染キャリアーは追跡調査の期間中、全く無症状であったが、持続的に高い抗体価を示し原虫を保有し続けていた。わが国の野生げっ歯類の捕獲調査により、日本には rRNA 塩基配列および抗原性状により区別可能な 2 タイプの *B. microti* 様原虫（穂別タイプと神戸タイプ）が存在し、前者は日本全国の野鼠が保有する主要なタイプであること、後者は兵庫県淡路島に局限して存在すること、および、アカネズミ（北海道ではこれに加えてエゾヤチネズミも）がバベシア原虫のレゼルポアであることが判明した。マダニ常在地のハイリスクグループを対象としたヒトの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。輸血事故の再発防止のために、今後、より大規模な疫学調査を行い、危険地域の特定と正確な不顕性感染キャリアー数を把握することが急務と思われる。

F. 健康危険情報

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) Wei Q., Tsuji M., Zamoto A., Kohsaki M., Matsui T., Shiota T., Telford S. R. III, and Ishihara C. 2001. Human babesiosis in Japan: isolation of *Babesia microti*-like parasites from an asymptomatic transfusion donor and from a rodent from an area where babesiosis is endemic. *J. Clin. Microbiol.* 39(6): 2178-2183.

2) Tsuji M., Wei Q., Zamoto A., Morita C., Arai S., Shioyta T., Fujimagari M., Itagaki A., Fujita H., and Ishihara C. 2001. Human babesiosis in Japan: epizootiologic survey of rodent reservoir and isolation of new type of *Babesia microti*-like parasites. *J. Clin. Microbiol.* 39(12): 4316-4322.

2. 学会発表

1) 辻 正義、魏 強、座本 綾、新井 智、森田 千春、石原 智明. わが国で最近見つけたヒトのバベシア症患. 第 131 回日本獣医学会総会、東京都府中市、2001 年 4 月 2~4 日.

2) 魏 強、辻 正義、石原 智明. *Babesia*

microti の β -チュブリン遺伝子塩基配列に基づく進化系統解析. 第 131 回日本獣医学会総会、東京都府中市、2001 年 4 月 2~4 日.

3) 座本 綾、辻 正義、魏 強、石原 智明、Raisa Slonova、Galina Leonova、早坂 大輔、荻和 宏明、高島 郁夫. 極東ロシアの野鼠からの *Babesia microti* の検出. 第 131 回日本獣医学会総会、東京都府中市 2001 年 4 月 2~4 日.

4) 斉藤 あつ子、河合 敦子、Dantracool Anchalee、熊谷 俊一、塩田 恒三、辻 正義、石原 智明. 兵庫県下のヒトバベシア症の疫学調査 (第一報). 第 70 回日本寄生虫学会、山形県山形市、2001 年 4 月 4~6 日.

5) 関谷 尚絵、辻 正義、魏 強、石原 智明. *Babesia microti* 神戸株の主要抗原の cDNA クローニング. 第 132 回日本獣医学会総会、岩手県盛岡市、2001 年 10 月 6~8 日.

6) 村山 晴香、辻 正義、関谷 尚絵、石原 智明. *Babesia microti* 神戸株 P39 蛋白質の大腸菌での発現と血清診断への応用. 第 132 回日本獣医学会総会、岩手県盛岡市、2001 年 10 月 6~8 日.

7) 座本 綾、辻 正義、中尾 稔、魏 強、石原 智明. 道東地方のマダニから検出された *Babesia divergens* 様原虫. 第 132 回日本獣医学会総会、岩手県盛岡市、2001 年 10 月 6~8 日.

8) 西田あつみ、辻 正義、座本 綾、魏 強、石原 智明. アカネズミに見られた *Babesia microti* 様原虫と *Ehrlichia muris* の混合感染. 第 132 回日本獣医学会総会、岩手県盛岡市、2001 年 10

月 6~8 日.

9) 座本 綾、辻 正義、萩原 克郎、石原 智明、伊藤 守. 中央アジアの野鼠からの *Babesia microti* の検出. 第 132 回日本獣医学会総会、岩手県盛岡市、2001 年 10 月 6~8 日.

10) 辻 正義、村山 晴香、西田あつみ、石原 智明. *Babesia microti* Gray 株のヒト赤血球への感染能. 第 132 回日本獣医学会総会、岩手県盛岡市、2001 年 10 月 6~8 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

なし.

(別紙 5 -1)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takashima, I., Hayasaka, D., et al.	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
Hayasaka, D., Takahima, I, Mizutani, T., et al.	Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and Far-eastern Asia.	J. Gen. Virol.	82	1319- 1328	2001
Hayasaka, D., Takahima, I, Mizutani, T., et al.	Evaluation of European tick-borne encephalitis virus vaccine against recent Siberian and Far-eastern subtype strains.	Vaccine	19	4774- 4779	2001
高島郁夫	ウイルス性脳炎	化学療法の領域	17	57-66	2001
Araki, K., Arikawa, J. et al.	Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Hantaan, Seoul, and Dobrava hantavirus infections.	J. Clin. Microbiol.	39	2397- 2404	
Arikawa, J., Yoshimatsu, K., et al.	Epidemiology and epizootiology of hantavirus infection in Japan.	Jpn. J. Infect. Dis.	54	95-102,	2001
有川二郎	ハンタウイルス肺症候群	分子呼吸器病	5	48-55	2001
有川二郎	腎症候性出血熱	化学療法の領域	17	5-9	2001
Wei, Q, Tsuji, M., et al.	Human babesiosis in Japan: isolation of <i>Babesia microti</i> -like parasites from an asymptomatic transfusion donor and from a rodent from an area where babesiosis is endemic.	J. Clin. Microbiol	39	2178- 2183	2001
Tsuji, M., Wei, Q., et al.	Human babesiosis in Japan: Epizootiologic survey of rodent reservoir and isolation of new type of <i>Babesia microti</i> -like parasite.	J. Clin. Microbiol	39	4316- 4322	2001

別紙 5 -2

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wei, Q, Tsuji, M., et al.	Human babesiosis in Japan: isolation of <i>Babesia microti</i> -like parasites from an asymptomatic transfusion donor and from a rodent from an area where babesiosis is endemic.	J. Clin. Microbiol	39	2178-2183	2001
Tsuji, M., Wei, Q., et al.	Human babesiosis in Japan: Epizootiologic survey of rodent reservoir and isolation of new type of <i>Babesia microti</i> -like parasite.	J. Clin. Microbiol	39	4316-4322	2001

IV. 研究成果の刊行物・別刷