

輸入動物由来人獣共通感染症の防疫対策としての狂犬病検査に関する研究

分担研究者：

神山恒夫、国立感染症研究所、獣医科学部、人獣共通感染症室、室長。

井上 智、国立感染症研究所、獣医科学部、人獣共通感染症室、主任研究官。

研究要旨

日本ではイヌのワクチン接種、イヌの検疫、野犬の取締を中心に狂犬病対策が行われてきたが、平成12年度から感染症新法の施行にともないイヌ以外にネコ、キツネ、アライグマ、スカンクが検疫の対照動物に加えられて海外からの輸入狂犬病対策が強化されることになった。狂犬病の国内への侵入と国内での狂犬病発生を阻止するために検疫とイヌに対する適切なワクチン接種の継続が大変重要なことは言うまでもない。

これ以外に、狂犬病の感染が疑われた動物が発見された場合に不用意にパニックとならず落ち着いて適切な対応を行うためには、簡便で安全な正しい検査方法を確立しておき狂犬病の検査を行えるようにしておくことが重要な課題である。平成12年度の報告では、狂犬病の診断と対策について豊富な経験と実績のある米国 CDC の協力を得て野生動物を含めた狂犬病の検査方法についてその導入と確立を行った。

そこで今年度は、狂犬病の発生を40年あまり経験していない日本の状況において求められる可能なかぎり生ウイルスを使用しない安全性の高い簡便な診断・検査法として、また、一般検査では新鮮材料が保存されることは少なく剖検後にホルマリン固定材料で病理検索が行われる状況に対応できるように、狂犬病ウイルスのリコンビナント核蛋白で作出した抗体を使用する免疫組織抗体法を確立した。

A. 研究目的

狂犬病の報告がない日本では可能なかぎり生ウイルスを使用しない安全性の高い簡便な診断・検査法が望まれる。また一方で、一般検査では新鮮材料が保存されることは少なく剖検後にホルマリン固定材料で病理検索が行われることが多い。そこで、狂犬病ウイルスのリコンビナント核蛋白の発現と精製を行ない検査に必要な免疫血清を安全かつ簡便に作出出来るようにするとともに、作出した免疫血清を利用してホルマリン固定材料を用いた免疫組織抗体法による狂犬病検査方法の確立を行った。

B. 研究方法

狂犬病検査に重要とされる狂犬病ウイルス核蛋白の構造遺伝子について CDC 分与株 (CVS-11) からのクローニングを行いリコンビナント核蛋白の作製を行った。

ウイルスゲノムの抽出は、MNA 培養細胞 (マウス神経芽種細胞) を用いて継代を行っている実験株 CVS-11 株から TRIzol reagents (Life Technologies 社製) を用いて行った。常法に従い、精製して Rnase フリーの蒸留水に回収したウイルスゲノムを Oligo-p(dT)15 プライマーと逆転写酵素 (a First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche 社製) を使用して 1 本鎖 DNA とした後に、狂犬病ウイルス (CVS-11 株) の核蛋白遺伝子 (N 遺伝子) に特異的なプライマー N5 [ACC GGA TCC ATG GAT GCC GAC AAG ATT] (5' 端に BamHI 制限酵素サイトを持つ) と プライマー N3 [ATT AAG CTT CTT ATG AGT CAC TCG AAT] (3' 端に HindIII 制限酵素サイトを持つ) を使用して PCR 法により N 遺伝子の遺伝子増幅を行った。

逆転写反応 (RT 反応) :

- (1) ウイルス RNA 溶液 10ul に逆転写用プライマー (10g) 1 μ l (10pmol) を加えて 95 °C、1 分間の加熱後に氷中で急速冷却を行った後に室温 (15-30 °C) とする。
- (2) ウイルス RNA と逆転写用プライマー混合液に順次 4 μ l の 5x 反応用バッファー、4 μ l の 2.5mM dNTP、1 μ l の RNasin、1 μ l の AMV RTase を加えて反応液の総量を 20 μ l とする。
- (3) 42 °C で 45 分間、95 °C で 5 分間の RT を行った。

PCR 反応 :

- (1) RT 反応終了溶液 1 μ l に順次 PCR 用 プライマー を各々 1 μ l (10pmol)、10x ExTaq Buffer を 5 μ l、dNTP Mixture を 4 ul、PCR System 酵素ミックス (2.6U/0.75 μ l) を 0.25ul 加えたのちに総量を蒸留水で 50 μ l として PCR 反応を行った。

PCR 反応は以下の条件で行った。

94°C、2分	鋳型 DNA の熱変性
----- 94°C、15秒	鋳型 DNA の熱変性
30回 60°C、30秒	鋳型 DNA のアニーリング
----- 72°C、2分	鋳型 DNA の伸長反応
72°C、7分	鋳型 DNA の伸長反応

PCR 増幅は ASTEC 社製「Program Control System PC707」を使用して行った。

増幅産物をアガロース電気泳動後、EtBr 染色を行い UV 照射によって目的遺伝子の存在を確認した。

合成プライマーにより PCR 増幅したフラグメントは、**BamHI** 制限酵素と **HindIII** 制限酵素で処理した後に DNA ligase (DNA Ligation Kit, TAKARA) を使用して QIAexpress pQE (QIAGEN) ベクターに組み込んだ。N 遺伝子をコードする遺伝子領域が組み込まれた pQE N9-5 プラスミドは TOYOBO 社製コンピテントセル (XL1-Blue) を使用して形質転換を行った。N 遺伝子の pQE プラスミドへの組込みは制限酵素処理法と PCR 法により確認を行った (図 1)。

pQE プラスミドへ組み込まれた N 遺伝子は、特異プライマーによってサイクルシーケンス (DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin-Elmer) を行った後に ABI PRISM 373A DNA Sequencing system (Perkin-Elmer) によりその全塩基配列を明らかにした。

pQE N9-5 プラスミドにより産生されたリコンビナント蛋白は、6xHis タグ標識蛋白 (His-NP) として発現され、Ni-NTA agarose を用いて native condition 下で蛋白の精製を行った。

精製 His-N は、コンプリートアジュバントを使用して 1 回、インコンプリートアジュバントを使用して 4 回の免疫を 4 週間間隔で行い His-N 蛋白に対する免疫血清を作製した。

免疫組織化学による狂犬病ウイルス抗原検出系の確立には CVS-11 株を脳内に感染させたマウス (BALB/c) から感染による症状を呈した時期に脳を採材してホルマリン固定後にパラフィン包埋を行い作製した組織材料を使用した。免疫組織法はビオチン化抗体と Streptoavidin-peroxidase を用いるダコ社の LSAB Kit で行った。

免疫組織染色 (図 1) :

- (1) パラフィン切片を、スライドが完全に浸漬する量の特級キシロールを入れた染色バットに浸漬する。

5 分間、時折、上下に動かす。バットを換えて、計 3 回繰り返す。脱パラフィンを行う。

- (2) 100%エタノールを入れた染色バット中に 5 分間、3 回繰り返す。次に 70%エタノールを入れたバット中に 5 分間浸漬、最後に蒸留水に浸漬して親水化する。
- (3) 0.3%過酸化水素メタノール溶液中に 30 分間、室温で浸漬する。
- (4) 蒸留水中にスライドを浸漬する。
- (5) 余分の水分をスライドから取り除き、切片を 0.25%トリプシン溶液でカバーし、37°C 30 分間静置する。
- (6) PBS(-)でトリプシンを洗い流す。
- (7) 5%正常ヤギ血清/PBS(-)で切片をカバーし、室温で 20 分間静置する。
- (8) 過剰の正常ヤギ血清を拭き取り、抗狂犬病ウイルス核タンパク抗体と 4°C にて 1 晩反応させる (検査に使用した抗体は 1 週間以内に使用する。使用抗体は 4°C に保存する)。
- (9) PBS(-)で抗体を洗い流し、充分量の PBS(-)を入れたバットに浸漬する。5 分間 3 回繰り返す。
- (10) LSAB キット中の 2 次抗体で 37°C、30 分間反応させる。
- (11) PBS(-)で抗体を洗い流し、充分量の PBS(-)を入れたバットに浸漬する。5 分間 3 回繰り返す。
- (12) LSAB キット中の酵素試薬と 37°C 30 分反応させる。
- (13) PBS(-)で抗体を洗い流し、充分量の PBS(-)を入れたバットに浸漬する。5 分間 3 回繰り返す。
- (14) 切片を LSAB キット中の過酸化水素水を加えた発色基質でカバーし、光学顕微鏡下で観察する。

必要に応じて、核染色を行う：水溶性封入剤を使用してカバーガラスで封入して鏡頭する。

C. 研究結果

pQE ベクターに挿入した N 遺伝子 (N9-5) の N 末端はマルチクローニングサイトに正しく組み込まれており、6xHis タグの塩基配列に続くフレームの読み枠にズレは見られなかった (図 2)。

His-NP とデータベースに登録された CVS 株 (ACCESSION: D42112) 間の核酸及びアミノ酸配列ホモロジーは各々 98.4% と 99.6% であり、アミノ酸の変異は 2 箇所 (117 及び 377 番目) でのみ見られた。

作出したリコンビナント N 蛋白の遺伝子配列とアミノ酸配列をデータベース検索したところ、これまでに報告されている狂犬病ウイルス野外株の遺伝子およびアミノ酸配列と大変ホモロジーが高いことが示された (図 3)。ホモロジー検索はデータバンクに登録されている野外株 16 株と実験株 5 株について行った (表 1)。N 遺伝子の核酸配列のホモロジー%の幅は、野外株で 86.9% から 88.7%、実験株で 90.2 から 99.6% であった。一方、N 蛋白のアミノ酸配列のホモロジー%の幅は、野外株で 97.3% から 98.7%、実験株で 96.0 から 99.6% であった。

His-NP で作出した特異抗体 (ウサギ免疫血清) はホルマリン固定脳組織中の狂犬病ウイルス (CVS-11 株) の核蛋白 (N 蛋白) と特異的に反応し、ウイルス抗原はいずれの場合も脳組織内の神経細胞に局限して観察された (図 4)。

D. 考察・課題

組み換え His-NP を用いて免疫組織抗体法に使用可能な狂犬病ウイルス核蛋白特異抗体の作出に成功した。

作出したリコンビナント N 蛋白の遺伝子配列とアミノ酸配列を遺伝子データベ

ース検索したところ、これまでに報告されている狂犬病ウイルス野外株の遺伝子およびアミノ酸配列と大変ホモロジーが高いことが示された。従って、作出したリコンビナントプラスミド (pQE N9-5 プラスミド) により発現される実験株 (CVS-11 株) の N 蛋白を使用して作製されたウサギ免疫血清 (抗狂犬病ウイルス N 蛋白抗体) は野外分離株の検出を十分に行いえることが予想された。

また、作製した抗狂犬病リコンビナント N 蛋白抗体がホルマリン固定後にパラフィン包埋された CVS-11 株感染マウス脳組織中のウイルス核蛋白に対して特異的に強く反応したことから、ホルマリン固定後にパラフィン包埋された狂犬病ウイルス感染動物の脳組織中の狂犬病ウイルス抗原を免疫組織化学により特異的に検出することが可能となった。

今後の課題としては、狂犬病検査の主たる対象動物であるイヌなどの感染脳組織についての免疫組織化学的な検討と、国外から輸入されるであろう狂犬病ウイルスの野外株や狂犬病類似ウイルスに対する検査方法の検討が残されている。

D. 研究発表

井上 智、岩崎琢也、佐藤由子、Mary E.G. Miranda、長谷川秀樹、小浦美奈子、神山恒夫、倉田 毅。狂犬病ウイルス (CVS-11 株) のリコンビナント核蛋白を利用した免疫組織抗体法の確立。第 131 回日本獣医学会、2001 年、4 月、東京

本井ゆり恵、牧野 敬、浅野 玄、小浦美奈子、神山恒夫、山田章雄、井上 智。組換え核蛋白を利用したアライグマの抗狂犬病ウイルス抗体検出系の検討。第 132 回日本獣医学会、2001 年、10 月、岩手

島崎洋子、井上 智、高橋周子、蒲生恒一郎、千田 恵、伊藤 治、衛藤真理子、

神山恒夫、牧江弘孝。国内動物用狂犬病ワクチンにより産生される抗体価の国際単位による評価。第132回日本獣医学会、2001年、10月、岩手

井上 智、本井ゆり恵、森本金次郎。狂犬病ウイルス（CVS-11株）の末梢感染に対する近交系マウス系統間の感受性差。第49回日本ウイルス学会、2001年、11月、大阪

本井ゆり恵、井上 智、佐藤由子、岩崎琢也、Alan Calaor、Mary E.G. Miranda、山田章雄。免疫組織化学的手法を用いた狂犬病診断法の実用化に関する研究。第49回日本ウイルス学会、2001年、11月、大阪

井上 智。狂犬病発生時の危機管理マニュアルの解説（1）マニュアルの概要及び検査について。平成13年度狂犬病予防等技術研修会、2001年、11月、東京（公衆衛生院講堂）

井上 智。日本の狂犬病の現状と危機管理マニュアルの概要。狂犬病国際シンポジウム、2001年、11月10日、東京（公衆衛生院講堂）

井上 智。日本の狂犬病の現状と危機管理マニュアルの概要。狂犬病国際シンポジウム、2001年、11月14日、北海道（ホテルポールスター札幌）

井上 智。日本の狂犬病の現状と危機管理マニュアルの概要。狂犬病国際シンポジウム、2001年、11月16日、北海道（神戸市勤労会館）

表 1. CVS-11 株とデータベースに登録されている実験株と野外株のN遺伝子核酸およびアミノ酸配列に対するホモロジー検索

Strains (origin)	^{a)} Accession No.	Homology (%)
CVS-11	N9-5	^{b)} 100 / 100
CVS	d42112	99.6 / 99.6
HEP	^{c)} Anzai et al.	ND / 98.9
RC-HL	ab009663	91.2 / 96.0
Nishigahara	ab010494	91.8 / 96.4
PV	m13215	92.5 / 97.8
Thailand (human)	N8738	88.7 / 96.9
Canada (red fox)	u03769	87.1 / 97.3
France (red fox)	af033905	87.1 / 98.4
Germany (red fox)	u42701	87.2 / 98.0
Estonia (raccoon dog)	u43432	86.9 / 98.2
Hungary (human)	u43025	87.5 / 98.4
Poland (raccoon dog)	u22840	87.3 / 98.2
Yugoslavia (red fox)	u42703	87.4 / 98.4
Algeria (dog)	u22643	87.5 / 98.2
Ethiopia (hyena)	u22637	87.5 / 98.7
South Africa (human)	u22633	87.2 / 98.2

a) : GeneBank database accession numbers

b) : Homology % of nucleic acids / amino acids

c) : Data from Anzai et al. Microbiol. Immunol., 41(3), 229-240, 1997

ND) : no data

図1. 免疫組織化学による狂犬病ウイルス特異抗原の検出手順

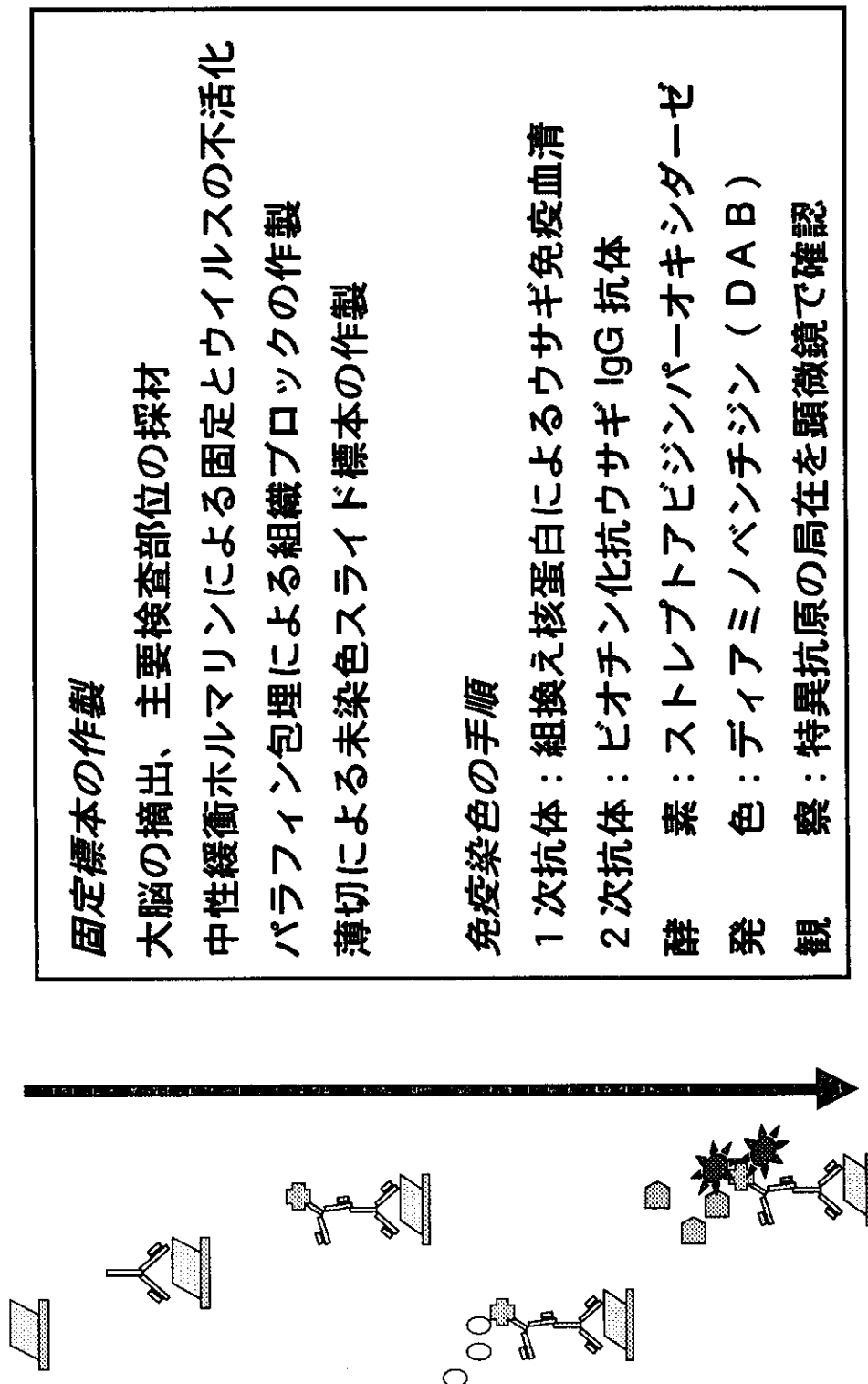
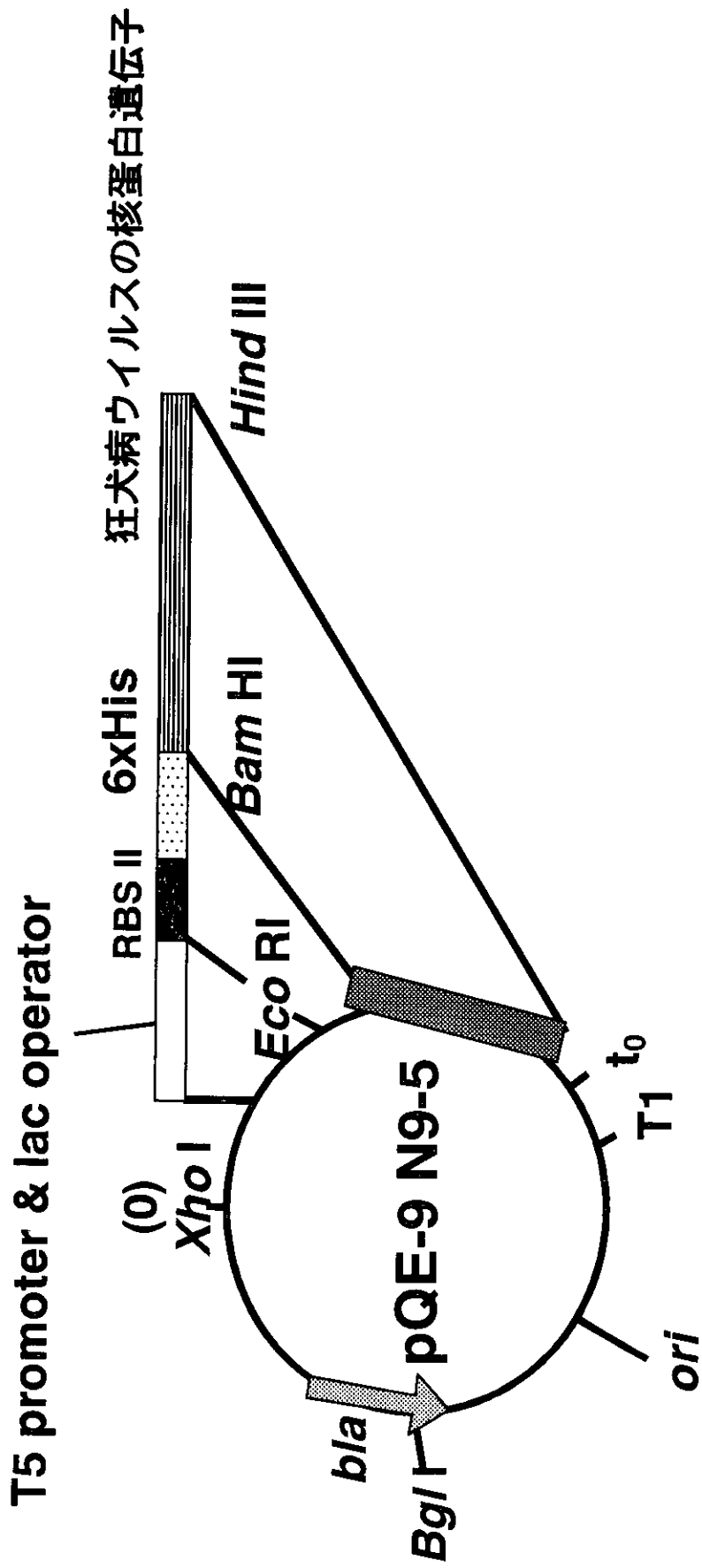


図2. 狂犬病検査に使用するウイルスの核蛋白発現系



組換え核蛋白：6個のヒスチジンをアミノ末端に持つ蛋白として大腸菌で発現

図3. 狂犬病ウイルス核蛋白のアミノ酸配列による分子系統樹
免疫組織化学で抗原検出を行ったウイルス株の分布

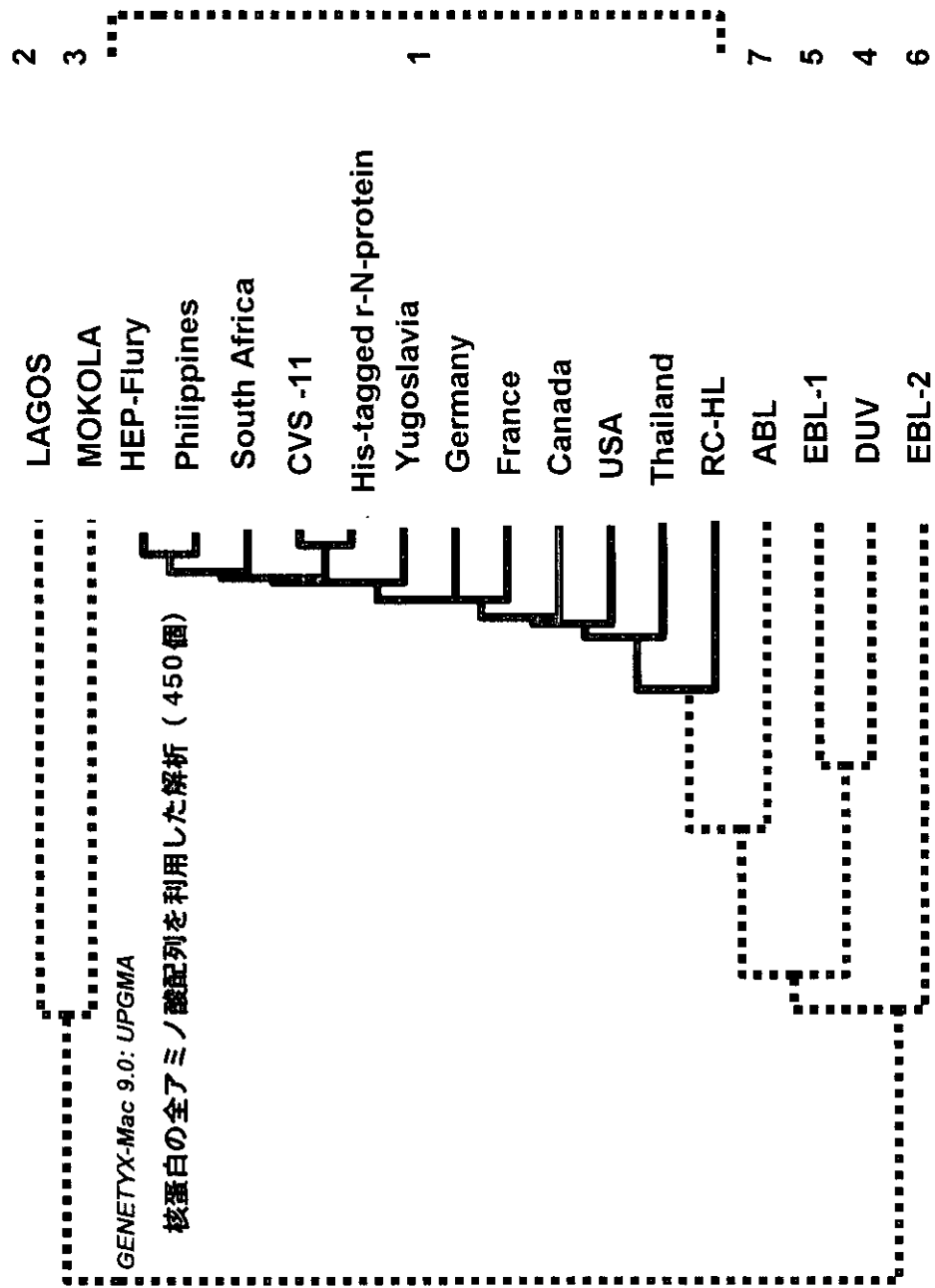
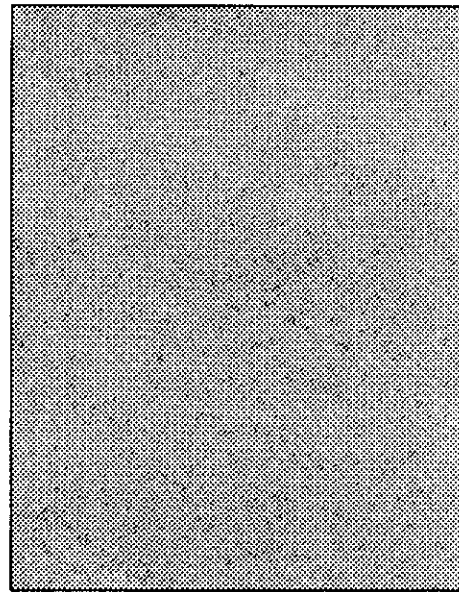
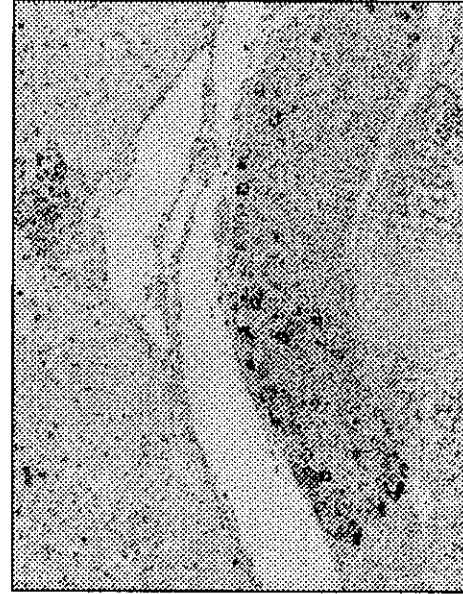


図4. 免疫組織化学による狂犬病ウイルス特異抗原の検出



非感染マウス脳



感染マウス脳

フォルマリン固定後にパラフィン包埋を行った狂犬病ウイルス(CVS-11株)感染マウス脳組織材料を組換え核蛋白ウサギ免疫血清を利用して免疫染色を行った組織像

中国のクリミアコンゴ出血熱ウイルスの M-segment RNA の Genetic diversity に関する研究

分担研究者 森川 茂 (国立感染症研究所ウイルス第 1 部外来性ウイルス室長)

協力研究者 西條政幸、倉根一郎 (国立感染症研究所)
唐 青 (中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所)

研究要旨：クリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) の流行地である中国新疆自治区が 1966～88 年の間に分離された 7 株の CCHF ウイルスの M-RNA の遺伝子配列を決定し比較検討した。M-RNA の全長は株によって異なり 5356 から 5377 塩基であった。Viral complementary sense に、株によって 1689～1697 アミノ酸からなる蛋白をコードしていた。分子系統学的解析から解析した 7 株の CCHF ウイルスは 3 つのグループに分類されたが、1 つのグループは他の中国株からなるグループよりもナイジェリア分離株に近縁であった。今回の解析から、中国新疆自治区の CCHF 流行地には、少なくとも 3 種類の CCHF ウイルスが存在することが明らかとなった。

A. 目的と意義：

クリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) ウイルスは、ブニヤウイルス科のナイロウイルス属に分類され 3 分節の(-)RNA をゲノムとする。k 感染症新法で規定される 1 類感染症の原因となるウイルス性出血熱なかでは、唯一アフリカ以外にも分布し、アジアでも毎年 CCHF の流行が報告されている。これまで、Nigeria 株の M-RNA の遺伝子配列のみが報告されているが、今回、中国の新疆ウイグル自治区で 1966～88 年の間に分離された 7 株の M-RNA の全遺伝子配列を決定して、比較検討した。これらの解析を通して、特定の流行地での CCHF ウイルスの動態を明らかにすることを目的とした。

B. 材料と方法：

中国の CCHF ウイルス 7 株 (Table1) の感染マウス脳から全 RNA を抽出した。ランダムヘキサマー p(dN)6 で 1st strand cDNA を作製した。ここまでの実験は、中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所において唐青博士との共同研究で行った。1st strand cDNA を鋳型として種々のプライマーを用いた PCR を行い、PCR 産物から direct sequence により塩基配列を決定した。得られた配列情報から新たなプライマーを作製し PCR を行いほぼ全長の塩基配列を決定した。

また、両末端の塩基配列は、RACE 法により増幅した PCR 産物から決定した。

C. 結果：

M-RNA は全長が 5356～5377bases で、株により若干の塩基数に違いが見られた。M-RNA には、(-)sense に 1689～1697 アミノ酸からなる ORF が存在し、G1/G2 のエンペロープ蛋白前駆体に相当すると考えられた。このうち、N 末端側の 250 アミノ酸からなる領域は、hypervariable で、Nigeria 株 10200 と比べて 28.4～71.8% のホモロジーしかなく、中国株間でも 22.4% しかホモロジーがない株があった (Table2-1)。一方、251 アミノ酸位から C 末端までの株間でのホモロジーは 82.1～99.5% で、比較的保存されていた (Table2-2)。

D. 考察：

CCHF ウイルスの M-RNA は、G1/G2 前駆体以外に NSm を N 末端にコードしている可能性があるが、NSm は血清学的には同定されていない。また、G1/G2 蛋白のサイズと近縁な Dugbe ウイルスの解析から考察すると、N 末端の hypervariable 領域は成熟型の G1/G2 には含まれないと考えられる。また、N 末端から NSm-G2-G1 の順にコードされていると考えられた。G1 相当領域の

N 末端上流 50 アミノ酸の部位にはシグナルペプチド様配列があるが、G2 相当領域にはシグナルペプチド様配列が存在せず、G2 上流 250 アミノ酸の ORF の N 末端にのみシグナルペプチド様配列が存在することから G2 の processing にはこのシグナルペプチドが利用されるという特異な機構を用いることが予想された。また、N 末端には、5つの翻訳開始コドンがあり、Rift Valley fever ウイルスの様に使用される開始コドンの位置により蛋白の processing が規定される可能性も示唆された。

中国の同一地域で分離されたウイルスと Nigeria 分離株 IbAr10200 で、M-RNA 配列から NJ 法による分子系統学的解析を行った結果、Nigeria 株と中国株は、別のクラスターを形成せず、中国株にも Nigeria 株により近縁なものも見られた。また、分離時期と genetic distance にも相関は見られなかった。今回の解析から、中国新疆自治区の CCHF 流行地には、少なくとも 3 種類の CCHF ウイルスが存在することが明らかとなった。今後、流行に関与するウイルス株の動態を調査することにより、これら複数のウイルス株がどの様に維持されているかを明らかにしたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo, M., Niikura, M., Morikawa, S., Meyer, R., Peters, C.J., Ksiazek, T.G., and Kurane, I. (2001) : Enzyme linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins J. Clin. Microbiol., 39(1):1-7.
- 2) Saijo, M., Niikura, M., Morikawa, S., and Kurane, I. (2001) Immunofluorescent method for detection of IgG antibody to Ebola virus using recombinant nucleoprotein expressed in HeLa cells by baculovirus vector. J. Clin. Microbiol., 39: 776 - 778
- 3) Niikura, M., Ikegami, T., Saijo, M., Kurane, I., Miranda, M.E., and Morikawa, S. (2001) : Ebola viral antigen-detection

enzyme-linked immunosorbent assay using a novel monoclonal antibody to nucleoprotein. J. Clin. Microbiol., 39: 3267 - 3271

- 4) Ikegami, T., Calao, A.B., Miranda, E.M., Niikura, M., Saijo, M., Kurane, I., Yoshikawa, Y., and Morikawa, S. (2001): Genome structure of Ebola Virus Subtype Reston: Differences Among Ebola Subtypes. Arch. Virol., 146: 2021 - 2027
 - 5) 森川 茂 (2001) : エボラ出血熱とマールブルグ病 日本獣医師会雑誌 (J. Jpn. Vet. Med. Assoc.), 54 (2): 152-154
 - 6) 森川 茂、西條 政幸、新倉 昌浩、倉根 一郎 (2001) : ウイルス性出血熱と我国における検査体制 ウイルス、51 (2): 215 - 224
 - 7) Saijo, M., Qing, T., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Sakai, K., Prehaud, C., Kurane, I., and Morikawa, S. (2002): Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G Antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. J. Clin. Microbiol., in press
 - 8) Saijo, M., Qing, T., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Prehaud, C., Kurane, I., and Morikawa, S. (2002): Recombinant Nucleoprotein based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for detection of Immunoglobulin G to Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. J. Clin. Microbiol., in press
 - 9) Morikawa, S., Qing, T., Xinqin, Z., Saijo, M., and Kurane, I. (2002): Genetic Diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus isolates in China. Virology, in press
- ### 2. 学会発表
- 1) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antibody detection system using its recombinant nucleoprotein: S.

- Morikawa, M. Saijo, M. Niikura, Q. Tang, and I. Kurane 6th International Conference on emerging infectious diseases in the pacific rim (Manila), 2001
- 2) ハンタウイルスの核蛋白(NP)とユビキチン様結合酵素 Ubc9 との結合様式:前田 秋彦、新倉 昌浩、西條 政幸、池上 徹郎、緒方もも子、倉根 一郎、森川 茂 第 132 回日本獣医学会、岩手、2001
 - 3) 1996 年のフィリピンのエボラウイルスレストン株流行施設内のサルにおける抗体保有状況:池上 徹郎、Calaor Alan B. Miranda Mary E. 新倉 昌浩、西條 政幸、緒方もも子、倉根 一郎、吉川 泰弘、森川 茂 第 132 回日本獣医学会、岩手、2001
 - 4) エボラウイルスサブタイプを区別できる単クローン性抗体の認識する核蛋白上のリニアエピトープ:新倉 昌浩、西條 政幸、池上 徹郎、倉田 毅、倉根 一郎、森川 茂 第 49 回日本ウイルス学会、大阪、2001
 - 5) エボラウイルスレストン株の組み換え核蛋白発現 HeLa 細胞を用いた IFA の有用性:池上 徹郎、新倉 昌浩、西條 政幸、緒方もも子、倉根 一郎、吉川 泰弘、森川 茂 第 49 回日本ウイルス学会、大阪、2001
 - 6) 組換え核蛋白を用いたクリミア・コンゴ出血熱(CCHF)の診断と中国における疫学的研究:西條 政幸、新倉 昌浩、前田 秋彦、池上 徹郎、倉根 一郎、森川 茂 第 49 回日本ウイルス学会、大阪、2001
 - 7) クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの M セグメント RNA の塩基配列:森川 茂、西條 政幸、倉根 一郎、森川 茂 第 49 回日本ウイルス学会、大阪、2001

Table 1. 中国の CCHF ウイルス株の由来

isolate	year of isolation	geographical origin	source
66019	1996	Bachu	patient
7001	1970	Bachu	patient
75024	1975	Aksu	patient
7803	1978	Bachu	patient
79121	1979	Bachu	long-eared Jerboa
8402	1984	Bachu	tick
88016	1988	Bachu	patient

Table 2-1. Identity within the variable region (1-250aa)/(1-812/839nuc)

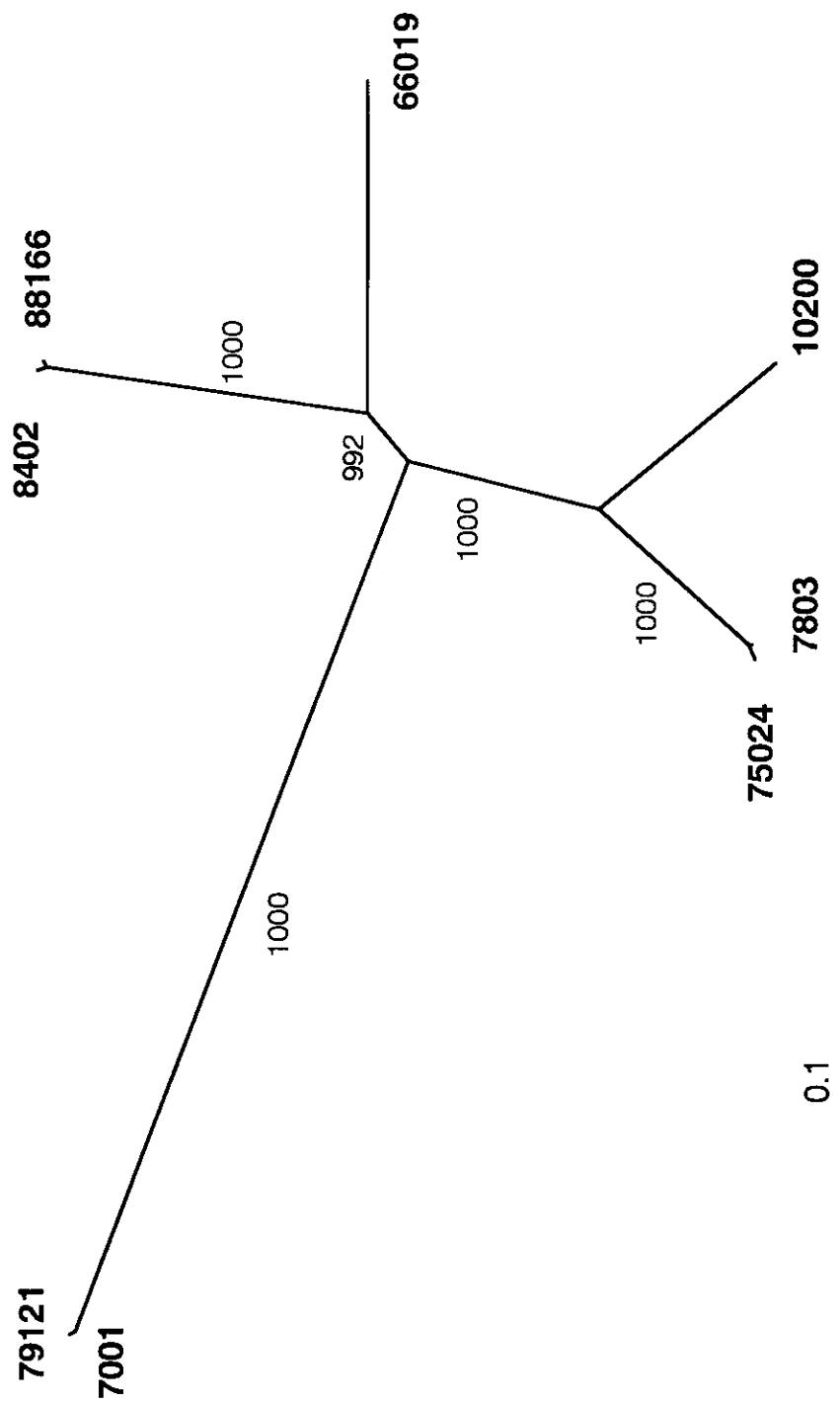
aa *	nuc **	10200	78024	7803	66019	8402	88166	7001	79121
10200			83.2	83.2	68.1	65.6	65.9	52.5	52.5
78024		71.8		98.8	68.2	66.8	66.8	52.1	52.1
7803		71.8	97.2		68.3	66.4	66.4	51.0	51.0
66019		46.5	48.0	48.8		73.5	73.5	51.7	51.7
8402		44.4	45.5	45.5	57.7		99.5	51.4	51.4
88166		44.8	45.9	45.9	58.5	99.2		51.3	51.3
7001		28.4	30.1	27.2	22.4	26.8	27.2		100
79121		28.4	30.1	27.2	22.4	26.8	27.2	100	

Table 2-2. Identity within the conserved region (251-1683aa)/(813/840-5360/5377nuc)

aa *	nuc **	10200	78024	7803	8402	88166	66019	7001	79121	Dugbe
10200			89.3	89.2	82.7	82.8	82.8	74.3	74.2	53.5
78024		94.7		99.5	83.5	83.4	83.2	74.2	74.1	53.4
7803		94.2	99.4		83.3	83.2	83.1	74	73.9	53.3
8402		92.4	93.5	93.0		99.6	85.7	75.1	74.9	53.7
88166		92.2	93.3	92.8	99.5		85.6	74.9	74.8	53.7
66019		91.2	92.3	91.8	93.5	93.2		74.9	74.9	53.2
7001		82.6	83.0	82.5	83.5	83.4	81.9		99.8	52.9
79121		82.4	82.6	82.1	83.2	83.1	81.7	99.5		52.9
Dugbe		37.3	36.6	36.5	37.5	37.5	37.0	36.9	36.9	

* % identity in amino acid, ** % identity in nucleotides

Figure 1 CCHF ウイルスの M-RNA 配列による分子系統樹



平成 13 年度厚生科学研究費補助金（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に関する研究

分担研究報告書

愛玩用爬虫類の Dermatophilosis に関する研究

主任：吉川 泰弘 東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学研究室

分担者：宇根 有美 麻布大学獣医学部病理学研究室

要旨

愛玩用として、輸入あるいは市販されていた各種爬虫類に人畜共通伝染病である *Dermatophilus* 属菌感染症を見出し、病理学的および細菌学的に検索した。動物輸入商の施設で飼育されていたトカゲ 3 種 4 匹、カメ 1 種 2 匹および都内ペットショップで販売されていたトカゲ 1 種 6 匹を対象とした。これらの爬虫類には、肉眼的に鱗の剥離、潰瘍、痂皮形成や肉芽形成などの多発性皮膚病巣が観察された。病原体は、痂皮や壊死組織内に蛇行、分岐、しばしば”railroad tracks” 形成を伴う好塩基性、Gram 陽性の細い糸状菌様細菌として観察された。培養により、遊走子形成、培地に食い込む、バラのつぼみ様の集落形成と硝酸塩還元能が確認された。これらのことから分離細菌は *D. chelonae* と考えられた。本研究によって国内で初めて、愛玩用爬虫類の Dermatophilosis の存在が明らかになった。ヒトにも感染する可能性のある Dermatophilosis の発生が見られたことは公衆衛生上問題があるものと考えられた。

研究目的

Dermatophilus congolensis は微好気性、放線菌類に属し、1 属 1 種と考えられている Gram 陽性、非抗酸性の分岐性菌糸発育をする細菌である。この *Dermatophilus congolensis* によって生じる急性、亜急性及び慢性の表在性皮膚疾患を Dermatophilosis といい、熱帯から亜熱帯地方を中心に世界中で発生している。宿主域は非常に広く、ヒトを始めとして牛、羊、馬などの草食獣、豚、野生動物、犬、猫、小型齧歯類および爬虫類にも感染する。日本では、牛で 2・3 の発生があるのみで、他の動物での発生は知られていない。

我が国では近年、愛玩動物への嗜好の変化、住宅事情の変化から、愛玩用爬虫類の需要が増え、毎年、約 200 万頭の爬虫類が輸入されている。今回、これらの愛玩用爬虫類にヒトに感染する可能性のある Dermatophilosis の発生を認めたので、その病理像を明らかにすることを目的として研究を行い、併せて、国内への新たな外来感染症の侵入の情報を公表することを目的とする。

材料と方法

動物貿易商から病性鑑定のために提供されたヨロイトカゲ（成獣）タンザニア産 2 匹、アルジェリアトカゲ（成獣）アルジェリア産 1 匹、プレートトカゲ（未成熟）マダガスカル産 1 匹、スミスセダカカメ（未成熟）パキスタン産 2 匹と、都内ペットショップで販売されていたクビワトカゲ（成獣・未成熟）アメリカ産 6 匹、計 5 種 12 匹を対象とした。

これらの動物を剖検し、皮膚を含む全身臓器を中性緩衝ホルマリンで固定後、常法に従い、パラフィンブロックを作成、薄切し、HE 染色、過ヨウ素酸シッフ染色、グロコット染色およびグラム染色を行った。また、クビワトカゲについては、一定期間飼育し、病勢の進行を観察するとともに、皮膚病変を細菌学的に検索した。各培養時期の細菌をネガティブ染色して透過型電子顕微鏡で観察した。さらに、皮膚病変を採取し、直接塗抹法による診断を試みた。分離培養した細菌をホルマリンで不活化し、モルモットに皮下に接種し、免疫染色用の一次抗体の作成を試みた。

結果

1. 発生状況 動物輸入貿易商の施設：輸入後間もなく、種々の爬虫類が皮膚病変を生じ、削瘦、衰弱、死亡するようになった。都内ペットショップ：このペットショップでは、多数のクビワトカゲを一括購入し、各支店に分配し、それぞれ商品として、展示、販売していた。皮膚病変を有するトカゲを直接、確認できたのは 1 支店のみであったが、この支店で販売されていた 6 匹すべてに皮膚病変が観察されたために、本研究のために全頭を購入した。その後、この支店は、あらたにクビワトカゲを導入、展示・販売していたが、このクビワトカゲにも同様の皮膚病変が観察された。なお、動物の導入は、他の支店からの移動と考えられるため、この時期に輸入されたクビワトカゲのロットには、広

く皮膚疾患が蔓延していた可能性があった。

2. 肉眼所見 ヨロイトカゲ：削瘦し、糞尿にて体が汚染、全身の皮膚に大小の皮膚潰瘍が散在していた。一部に小豆大の肉芽形成を伴うものもあった。指趾や尾先端の欠損が認められた。アルジェリアトカゲ、プレートトカゲ：鱗の剥離が全身に観察され、ときに肉芽形成を伴う潰瘍がみられた。スミスセダカカメ：頸部、四肢の皮膚に不整形、地図状の皮膚病変が多発し、表面に黄白色の偽膜様の滲出物が付着していた。クビワトカゲ：桃白色の粟粒大から小豆大の結節状の痂皮形成が全身に観察された。この結節を搔爬すると出血した。

3. 病理組織学的所見 クビワトカゲ以外のトカゲの組織学的変化がほぼ同様であった。

やや経過した病変と思われる変化が観察された。すなわち、病巣部の表皮は過形成性に肥厚し、痂皮底部では、痂皮を分界するように再生していた。痂皮は滲出物と壊死組織とから成っており、ヨロイトカゲでは、壊死した皮骨も含まれていた。なお、病変は鱗と鱗の間に形成される傾向があった。真皮から皮下織にかけて多数の組織球や偽好酸球が浸潤しており、皮骨の増生などが観察された。病原体は痂皮や壊死組織内にしばしば蛇行、分岐する、好塩基性、Gram陽性の細い糸状菌様細菌として観察された。これを拡大すると1 μm ほどの球菌状の小体が連鎖して2～6列に配列し” railroad tracks” を形成していた。グロコット染色で菌体は黒染した。クビワトカゲでは、新旧の病変が観察されたが、概ね他のトカゲより初期と思われる変化が観察された。すなわち、菌は表皮内に浸潤性に増殖し、表皮・真皮の壊死が高度で、偽好酸球などの炎症細胞浸潤も強く、痂皮形成を伴って結節状に皮膚表面に隆起していた。病原体は結節中心部の壊死組織内に存在した。スミスセダカカメでは、皮膚の壊死が高度で、真菌感染を随伴し、滲出傾向が強かった。

4. 微生物学的所見：

採取した痂皮を微好気下で血液寒天培地で培養したところ、3日目に培地内に食い込むように増殖する肌色の小集落ができ、3週間目には、バラのつぼみ様な特徴的集落が見られた。菌の生物学的性状は表1のとおりで、これらの菌は硝酸塩還元能を有し、36℃で、良く発育した。

5. 培養細菌の電子顕微鏡所見

培養6日目には、糸状菌様の菌体がみられ、18日目には、単極に叢毛状鞭毛を有する直径約2 μ の遊走子 Zoospore が観察された。

6. 経過観察

購入したクビワトカゲを、4カ月間飼育して病巣の変化を観察した結果、6匹のうち自然治癒した1匹を残してすべて斃死した。斃死したトカゲでは、病巣が拡大し、削瘦、衰弱して死亡した。

7. 簡易診断

トカゲより痂皮部を搔爬し、スライドガラスに圧扁塗抹し、無固定で、ギムザ染色をしたところ、特徴的な糸状菌様の菌体が容易に観察できた。

8. 免疫血清の作成と免疫染色

モルモットの皮下に5回の接種を行い、得られた抗体は、組織標本内の病原体によく反応した。作成した抗体を用いた免疫染色の条件は、ホルマリン固定、パラフィン切片を脱パラフィンし、無処置で、一次抗体の希釈倍率は400倍、4℃、一晚、反応させ、洗浄後、ポリマー試薬、DABで可視化した。

考察

Dermatophilosis とは、微好気性、放線菌類に属し、Gram 陽性、非抗酸性の分岐性菌糸発育をする *Dermatophilus congolensis* によって生じる急性、亜急性及び慢性の表在性皮膚疾患をいう。診断は、1) 臨床症状：特徴的な皮膚に限局する多発性の病変、羊では lumpy wool、牛では、strawberry foot-rot と表現される特徴的な肉眼像を呈する。2) 直接鏡検：病巣部（痂皮）の塗抹標本の直接鏡検による菌の確認、3) 菌の培養分離とその生物学的性状の確認、4) 病理組織像、さらに、あまり使われていない方法であるが、5) 動物接種：病巣部をウサギ、モルモット、ラット、鶏胚に接種、6) 抗体検査：直接凝集試験、間接血球凝集試験、補体結合反応、ゲル内沈降反応、対向免疫電気泳動法など、7) 抗原検査：塗抹標本を用いた蛍光抗体法、モノクローナル抗体を用いた免疫染色などがある。一般に1)と2)で容易に診断できるとされ、確定診断のためには、3)が必要である。模式図に示すように、菌糸は縦断列、横断裂で増殖し、断裂した菌は叢毛性鞭毛を形成して遊走子となるといった発育時期によって特徴的な形態を示すため、直接塗抹や病理組織検査で確定診断ができる。今回、爬虫類に観察された病変、病原体の形態（光顕的、電顕的）、培養所見は、過去に報告されている Dermatophilosis のそれと一致した。

Dermatophilosis は、熱帯から亜熱帯地方を中心に世界中で発生しており、特に降雨量の多い、湿度の高い、温かい地方で発生している。以前は