

20020599

厚生労働科学研究費

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 14 年度 総括報告書

平成 15 (2003) 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

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

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

北海道で分離されたダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルス Oshima 株の病原性を遺伝子レベルで調べた。Oshima 株の弱毒化に関与する E-タンパク質の部位を特定できた。さらに Oshima 株の遺伝子組み換え抗原を作出し、敏感度と特異度に優れた IgG-ELISA による血清診断法を開発した。今回極東ロシアで検出されたハントウアカネズミと患者由来ハンタウイルスはいずれも Amur 型のウイルスに最も関連が深かった。このことより極東ロシアではこれまで知られていたセスジネズミ由来のウイルスとは系統学的に明らかに異なるウイルスがハントウアカネズミを宿主として存在しており、このウイルスが人に重篤な HFRS を引き起こすことが明らかになった。ハンタウイルスの感染ウイルスのグループの鑑別が可能な血清診断法を確立した。ユーラシア大陸極東地域の野生げっ歯類についてバベシア原虫の保有状況を調査した結果、北米型の *Babesia microti* がこの地域に広く分布していることが判明した。わが国の媒介マダニに関して野外調査を行い、わが国において穂別型および北米型の *Babesia microti* 様原虫を媒介するベクターはそれぞれヤマトマダニおよびシニツェマダニである可能性が示唆された。

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

A. 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。

B. 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、系統樹解析と病原性の解明を行う。

（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：北海道で分離された TBE ウイルス Oshima 株の病原性を遺伝子レベルで解析するとともに ELISA による血清診断法を開発した。変異株 Oshima cl-1 は BHK-21 細胞において親株より大きなプラックを形成した。マウスにおける皮下接種による神経侵入性毒力は、Oshima cl-1 は親株より弱かった。Oshima cl-1 のウイルス血症の力価は親株の 1/100 と低かった。

Oshima cl-1 のエンベロップ蛋白のアミノ酸置換は電荷の変化に関係していた。Oshima cl-1 の BHK-21 細胞における感染性はグリコサミノグリカンにより親株に比べ著しく阻害された。

VLPs を用いた ELISA IgG テストと中和試験との比較を患者血清 95 検体について行ったところ敏感度は 98.8%、特異性は 100% であった。さらに日本脳炎の患者血清はすべて陰性であった。

ハンタウイルス感染症：極東ロシアにおいてハンタウイルスの疫学調査を実施した。抗体陽性ハントウアカネズミと重症の腎症候性出血熱患者から PCR によりハンタウイルス遺伝子が検出された。これらの遺伝子塩基配列を解析した結果、ハントウアカネズミ由来の配列と患者由来の配列は相同性が非常に高く (79.6%)、以前にアムール型と報告されていた配列に最も近かった (94.3%)。これらのことは極東ロシアでハントウアカネズミが重症の腎症候性出血熱の病原巣動物であることを示している。

バベシア原虫感染症：ユーラシア大陸極東地域の野生げっ歯類についてバベシア原虫の保有状況を調査した結果、北米型の *Babesia microti* がこの地域に広く分布していることが判明した。これとは対照的に、わが国ではこれまで、北米型とは抗原性・遺伝的性状の異なる穂別型および神戸型の *Babesia microti* 様原虫のみが検出されていた。しかし、北海道で

より詳細な野外調査を行った結果、道東地方で捕獲された野鼠から北米型の *Babesia microti* が検出された。わが国は穂別型、神戸型、北米型の3種類の原虫が共存するという他の国では見られない特殊な状況にあることが明かとなったため、疫学調査ならびに血清診断に当たっては迅速簡便な原虫型別法の開発ならびに複数の原虫型に対応できるシステムづくりが重要と考えられた。さらに、媒介マダニについても野外調査を行い、わが国において穂別型および北米型の *Babesia microti* 様原虫を媒介するベクターはそれぞれヤマトマダニおよびシュルツェマダニである可能性が示唆された。

D. 考察

1993年北海道上磯町で日本で初めてのダニ媒介性脳炎の患者が発見された。その後の我々の疫学調査で原因のTBEウイルス Oshima 株が患者発生地区のおとりの犬から分離された。TBEウイルス Oshima 株の病原性の分子基盤を明らかにすることにより、脳炎発症機序の解明だけでなく、生ワクチンの開発に有用な情報が得られる。Oshima 株の BHK-21 細胞に適応した変異株 Oshima cl-1 株は神経侵入性毒力が親株より低かった。この弱毒化の機序としてエンベロープ蛋白のドメインIIにおける1ヶ所のアミノ酸の置換が末梢でのウイルス増殖の低下と、ウ

イルス血症のレベルの減少に致り、その結果ウイルスが脳内に侵入できなかったことが考えられた。これは Oshima cl-1 が体内に多量存在するグリコサミノグリカン様物質にトラップされたためと考えられた。

これまで特異的なTBEの診断法として中和試験が用いられて来た。今回は生ウイルスによらない安全で、敏感度と特異度に優れた血清診断法としてVLPsを用いたELISAの開発を試みた。開発したIgG-ELISAは敏感度と特異度に優れた血清診断法であることが判明した。

これまで極東ロシアは腎症候性出血熱(HFRS)の流行地として考えられて来たが、ハンタウイルスの遺伝子解析や病原巣動物についての報告はほとんどない。今回極東ロシアの沿海州において野ネズミと患者死亡例の両方からハンタウイルスRNAの増幅に成功し、比較することができた。その結果からハントウアカネズミが重症の腎症候性出血熱の病原性動物であると結論づけることができた。今回検出したハンタウイルスの配列はこれまで Amur 型として報告されていた配列に高い相同性を示し、これらはハンターウイルス系統の亜型に属することを提唱する。

今回のユーラシア極東アジアでの調査の結果、この地域には北米型の *Babesia microti* が広く分布していることが判明したが、このことはこれまで日本では穂別型および神戸型の *Babesia microti* 様原虫のみが検出さ

れていたこと対照的であった。しかし、日本の中でも北海道は第4氷河期にユーラシア大陸と陸続きであったことから、大陸に存在するものと同種の野鼠が分布し、それらが北米型の原虫を保有している可能性が考えられた。そこで、北海道内でさらに多数の野鼠の捕獲調査を行いバベシア原虫の分離を試みた。その結果、道東地方に限局して北米型の *Babesia microti* が存在することが判明した。ヒトバベシア症の流行地である米国北東部に分布するものと同じ遺伝子型の原虫が道東地方に限局して見つかったことは、この地域の住民がハイリスクにある可能性を示唆するため、早急な血清疫学調査が必要であろう。

E. 結論

TBE ウイルス Oshima 株のエンペロープ蛋白のドメイン II のアミノ酸の1ヶ所の置換がマウスにおける本株の神経侵入性毒力の低下に関与することが示された。TBE ウイルスの VLPs を抗原として用いた IgG-ELISA は敏感度と特異度に優れた血清診断法であった。セスジネズミ由来のウイルスとは系統的に明らかに異なるウイルスがハントウアカネズミを宿主として存在しており、このウイルスが人に重篤な HFRS を引き起こすことが明らかになった。3種類のハントウウイルスの組み換え NP を用いてハントウウイルス感染症の wide-range

の ELISA を確立した。ユーラシア大陸極東地域の野鼠には、北米型の *B. microti* が広範囲にわたり検出された。北海道および淡路島で、ヤマトマダニからのみかなり高頻度に穂別型原虫が検出された。また、北米型原虫は道東地方で収集されたごく少数のシュルツェマダニのみから検出された。

F. 健康危険情報

ヒトバベシア症の流行地である米国北東部に分布するものと同じ遺伝子型の原虫が道東地方に限局して見つかったことから、この地域がハイリスクである可能性が懸念される。この地域の住民を対象とした血清疫学調査を行う必要性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Goto, A., Hayasaka, D., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H., and Takashima, I. : Genetic and biological comparison of tick-borne encephalitis viruses from Hokkaido and Far-Eastern Russia. Jpn. J. Vet. Res. 49 : 297-307, 2002
- 2) Goto, A., Hayasaka, D., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H. and Takashima, I. : A BHK-21 cell culture-adapted tick-borne encephalitis virus mutant is attenuated for neuroinvasiveness.

- Vaccine (in press), 2003
- 3) Yoshii, K., Hayasaka, D., Goto, A., Obara, M., Araki, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L.I., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I.: Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens expressed in mammalian cells for serodiagnosis of tick-borne encephalitis. *J. Virol. Methods* 108(2):171-179.
 - 4) 苅和宏明 プニヤウイルス－ウイルスと宿主の相互関係・ハンタウイルスとげっ歯類の共進化－ウイルス 52:61-67. 2002
 - 5) Lokugamage, K., Kariwa, H., Hayasaka, D., Cui, B.Z., Iwasaki, T., Lokugamage, N., Ivanov, L.I., Volkov, V.I., Demenev, V.A., Slonova, R., Kompanets, G., Kushnaryova, T., Kurata, T., Maeda, K., Araki, K., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.: Genetic characterization of hantaviruses transmitted by the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*), Far East Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 8:768-76. 2002
 - 6) 有川二郎 「腎症候性出血熱、ハンタウイルス肺症候群」 小児科診療 65(12): 79(2091)-82(2094) 、2002
 - 7) Arai S., Tsuji M., Kaiho I., Murayama H., Zamot A., Wei Q., Okabe N., Kamiyama T., and Ishihara C. Retrospective seroepidemiological survey for human babesiosis in an area in Japan where a tick-borne disease is endemic. *J. Vet. Med. Sci.* 65 : 335-340, 2003.
 - 8) Okabayashi T., Hagiya J., Tsuji M., Ishihara C., Satoh H., and Morita C. Detection of *Babesia microti*-like parasite in filter paper-absorbed blood of wild rodents. *J. Vet. Med. Sci.* 64(2):145-147, 2002.
 - 9) Cho S.-H., Kim T.-S., Lee H.-W., Tsuji M., Ishihara C., Kim J.-T., Wee S.-H., and Lee C.-G. Identification of newly isolated *Babesia* parasites from cattle in Korea by using the Bo-RBC-SCID mice. *Korean J. Parasitol.* 40:33-40, 2002.

2.学会発表

- 1) 後藤明子、早坂大輔、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：BHK-21細胞に適応したダニ媒介性脳炎ウイルスの生物性状：第133回日本獣医学会、川崎(2002, 3)後藤明子、早坂大輔、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：BHK-21細胞に適応したダニ媒介性脳炎ウイルスの生物性状：第37回日本脳炎ウイルス生態学研究会、別府(2002,7)
- 2) Hayasaka, D., Gritsun, T. S., Ueki, T., Yoshii, K., Takashima, I., Yoshii, K., Goto, A., Mizutani, T., Kariwa, H.,

- Iwasaki, T., Gould, E. A., and Takashima, I.: Infectious cDNA clone of tick-borne encephalitis virus far-eastern subtype strain Oshima: Thirty-sixth Joint Working Conference on Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Matsumoto (2002, 7)
- 3) 好井健太郎、後藤明子、小原真弓、植木智隆、早坂大輔、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス粒子放出抑制に関する解析：第 134 回日本獣医学会、岐阜 (2002、9)
- 4) 後藤明子、好井健太郎、早坂大輔、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス神経侵入性弱毒変異株のマウス体内での動態：第 134 回日本獣医学会、岐阜(2002, 9)
- 小原真弓、好井健太郎、早坂大輔、苺和宏明、高島郁夫：北海道におけるダニ媒介性脳炎ウイルスの血清疫学調査：第 134 回日本獣医学会、岐阜(2002, 9)
- 5) 後藤明子、好井健太郎、早坂大輔、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス変異株のマウスにおける病原性解析：第 50 回日本ウイルス学会、札幌 (2002, 10)
- 6) Lokugamage Nandadeva, 苺和宏明、水谷哲也、Lokugamage Kumari、宮本大伸、荒木幸一、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：Puumala virus infection in different species of experimental rodents：第 133 回日本獣医学会 川崎 (2002. 4)
- 7) 後藤明子、早坂大輔、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：BHK-21 細胞に適応したダニ媒介性脳炎ウイルスの生物性状：第 133 回 日本獣医学会 川崎 (2002. 4)
- 8) 荒木幸一、吉松組子、Lee Byoung-Hee、苺和宏明、高島郁夫、有川二郎：げっ歯類でのハンタウイルス持続感染成立メカニズム：第 134 回 日本獣医学会 岐阜 (2002. 9)
- 9) 好井健太郎、後藤明子、小原真弓、植木智隆、早坂大輔、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス粒子放出抑制に関する解析：第 134 回 日本獣医学会 岐阜 (2002. 9)
- 10) 後藤明子、好井健太郎、早坂大輔、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス神経侵入性弱毒変異株のマウス体内での動態：第 134 回 日本獣医学会 岐阜 (2002. 9)
- 11) 小原真弓、好井健太郎、後藤明子、早坂大輔、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：北海道におけるダニ媒介性脳炎ウイルスの血清疫学調査：第 134 回 日本獣医学会 岐阜 (2002. 9)
- 12) 白戸憲也、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：RT-PCR RFLP 法によ

- る西ナイル熱ウイルス (WNV) の診断法の開発：第 134 回 日本獣医学会 岐阜 (2002. 9)
- 13) 小林正之、水谷哲也、江下優樹、江波修、山盛徹、後藤明子、赤穂芳彦、三好洋嗣、苺和宏明、桑原幹典、高島郁夫：ヒトスジシマカ由来細胞の培養細胞、C6/36 における大腸菌に対する反応：第 134 回 日本獣医学会 岐阜 (2002. 9)
- 14) 好井健太郎、後藤明子、小原真弓、植木智隆、早坂大輔、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：prM 蛋白の変異によるダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス粒子分泌抑制：日本ウイルス学会 札幌 (2002. 10)
- 15) 後藤明子、好井健太郎、早坂大輔、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：BHK-21 細胞に適応したダニ媒介性脳炎ウイルス変異株のマウスにおける病原性：日本ウイルス学会 札幌 (2002. 10)
- 16) 白戸憲也、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：RT-PCR RFLP 法による西ナイル熱ウイルス (WNV) の診断法の開発：日本ウイルス学会 札幌 (2002. 10)
- 17) 荒木幸一、吉松組子、Lee Byoung-Hee、苺和宏明、高島郁夫、有川二郎：げっ歯類におけるハンタウイルスの持続感染とウイルス特異的 CD8T 細胞応答：日本ウイルス学会 札幌 (2002. 10)
- 18) Lokugamage Nandadeva, 苺和宏明、Lokugamage Kumari、萩谷友洋、宮本大伸、岩佐真宏、荒木幸一、吉松組子、有川二郎、水谷哲也、高島郁夫：Puumala virus infection in different species of experimental rodents: 日本ウイルス学会 札幌 (2002. 10)
- 19) Kariwa, H. Miyamoto, D., K., Araki, K., Lokugamage, K., Hayasaka, D., Cui, B.Z., Lokugamage, N., Ivanov, L.I., Slonova, R., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.: Serological study in patients of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Far East Russia: U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 36th Joint Working Conference on Viral Diseases. Matsumoto (2002. 7)
- 20) Hayasaka, D., Gritsun, T. S., Ueki, T., Yoshii, K., Goto, A., Mizutani, T., Kariwa, H., Iwasaki, T., Gould, E. A., Takashima, I.: Infectious cDNA clone of tick-borne encephalitis virus Far-Eastern subtype strain Oshima: U.S.-Japan Cooperative Medical

- Science Program 36th Joint Working Conference on Viral Diseases. Matsumoto (2002. 7)
- 21) Kariwa, H., Lokugamage, K., Hayasaka, D., Cui, B.Z., Iwasaki, T., Lokugamage, N., Ivanov, L.I., Volkov, V., Demenev, V., Slonova, R., Kompanets, G., Kushnaryiva, T., Kurata, T., Maeda, K., Araki, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.: Genetic characterization of a novel hantavirus carried by the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*) and variability of viruses existing in East Asia: 12th International Congress of Virology. Paris (2002. 7)
- 22) Takashima, I., Hayasaka, D., Kariwa, H., Goto, A., Yoshii, K., Mizutani, T., Ivanov, L.I. Leonova, G.: Distribution and characterization of tick-borne encephalitis virus in Siberia and Far Eastern Region: 12th International Congress of Virology. Paris (2002. 7)
- 23) Arikawa, J., Ogino, M., Ebihara, H., Lee, B.H., Araki, K., Lundkvist, A., Kawaoka, Y., Yoshimatsu, K. : Use of VSV pseudotypes bearing Hantaan or Seoul virus envelope proteins in a rapid and safe neutralization test. : 第4回 中日ウイルス学会, 昆明市, 中国 (2002.6)
- 24) Ogino, M., Yoshimatsu, K., Ebihara, H., Araki, K., Lee, B.H., Arikawa, J. : The Envelope Glycoproteins (G1 and G2) of Hantaan Virus on Cell Surface are Responsible for Cell Fusion.: US-Japan Cooperative Medical Science Program, 36th Joint Working Conference on Viral Diseases, Matsumoto, Japan (July 16-18, 2002)
- 25) Arikawa, J., Ogino, M., Ebihara, H., Yoshimatsu, K., Araki, K., Lee, B.H. : Application of VSV Pseudotypes Bearing Hantaan or Seoul Virus Envelope Proteins as a Rapid and Simple Neutralization Test.: International Union Microbiological Societies World Congresses, XII th International Congress of Virology, Paris (France) (July-Aug. 2002)
- 26) 座本 綾、辻 正義、石原 智明. 北海道のトガリネズミに寄

- 生する *Babesia microti* 様原虫.
第 133 回日本獣医学会総会、
川崎市、2002 年 3 月 28~30
日.
- 27) 辻 正義、魏 強、小野 憲一
郎、石原 智明. "*Babesia microti*
" Munich 株の分類学的位置づ
け. 第 133 回日本獣医学会総
会、川崎市、2002 年 3 月 28
~30 日.
- 28) 千葉 美智留、座本 綾、辻 正
義、村山晴香、石原 智明. 道
東地方で見つかった北米型の
Babesia microti. 第 134 回日
本獣医学会総会、岐阜市、2002
年 9 月 19~21 日.
- 29) 川淵 貴子、関谷 尚絵、辻 正
義、石原 智明. *Babesia microti*
穂別株の主要抗原の cDNA クロ
ーニング. 第 134 回日本獣医
学会総会、岐阜市、2002 年 9
月 19~21 日.
- 30) 岩部 幸枝、辻 正義、石原 智
明. *Babesia microti* 神戸株に
対するモノクローナル抗体の作
出. 第 134 回日本獣医学会総
会、岐阜市 2002 年 9 月 19~
21 日.
- 31) 座本 綾、辻 正義、魏 強、
石原 智明. 日本の *Babesia*
microti 様原虫の媒介ダニの検
索. 第 134 回日本獣医学会総
会、岐阜市 2002 年 9 月 19~
21 日.
- 32) 座本 綾、辻 正義、趙 信衡、
金 東洙、申二鉉、石原 智明.
韓国の野鼠に寄生する *Babesia*
microti の疫学調査. 第 134 回
日本獣医学会総会、岐阜市、
2002 年 9 月 19~21 日.
- 33) 辻 正義、座本 綾、魏 強、
石原 智明. β -tubulin 遺伝子
を標的とした *Babesia microti*
群原虫の型特異的 PCR の開発.
第 134 回日本獣医学会総会、
岐阜市、2002 年 9 月 19~21
日.
- H. 知的財産の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

野生げっ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）

人体ならびに動物に及ぼす病原性解析：

ダニ媒介性脳炎ならびに腎症候性出血熱

組織病変における CD68 陽性マクロファージの局在

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

（国立感染研・感染病理部）

研究要旨 野生げっ歯類及びダニ類に由来する病原体が人体に及ぼす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を解析している。初年度はロシア極東地域の人体剖検例について組織学的ならびにウイルス病理学的解析した。これらの例では病変自体は観察されたが、ウイルス抗原は免疫組織学的に陰性であった。昨年度のウイルス抗原陰性の背景として、①病理標本作製の過程で抗原性を喪失、②これらの症例が急性期を過ぎていてウイルス抗原が消失、③組織内に存在する抗原が微量であった可能性があり、今年度は①の解析の対象とした病理組織標本の抗原性の維持に焦点をあて、非ウイルス抗原の検出について検討を行った。取り上げたのはマクロファージ系細胞のマーカーである CD68 と T 細胞マーカーである CD3 を検討した。その結果、T 細胞マーカーは検出されなかったが、CD68 は検出された。このことはこれらの組織標本では、一部の抗原は失活するが、不活化されない抗原も存在することが示され、今後このような抗原を認識する抗ウイルス抗体が必要とされる。また、腎症候性出血熱と診断された例の腎組織では、CD68 抗原陽性細胞が間質のみに検出されたことより、過去の腎症候性出血熱例との局在の検討も行った。その結果、以前の例では糸球体と間質の両者に陽性細胞が認められ例が多かったが、ときに間質のみに認められる症例もあり、これらが感染したウイルスの病原性の違い、感染時期に由来するか今後の問題点である。

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で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、稀少感染症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、見落とされている可能性も依然としてある。

発展途上国においては、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てきた。

昨年度はダニ媒介性脳炎ならびに腎症候性出血熱と診断された例の剖検時に採取されたホルマリン固定組織において、病変自体は観察されたが、これらの例は他のウイルス学的方法によりそれぞれのウイルス感染が確認されているにもかかわらず、ウイルス抗原は免疫組織学的に陰性であった。ウイルス抗原陰性の可能性として、①病理標本作製の過程で抗原性を喪失、②これらの症例が急性期を過ぎていてウイルス抗原が消失、③組織内に存在する抗原が微量であった可能性がある。検索した剖検例は現地で調整したホルマリン固定液で固定された後に、パラフィン包埋されている。免疫組織学的解析において固定に使用されるホルマリンが非常に大きく影響することが知られており、今年度は①の解析の対象とした病理組織標本の抗原性の維持に焦点をあて、非ウイルス抗原の検出について検討を行った。取り上げたのはマクロファージ系細胞のマーカーである CD68 と T 細胞マーカーである CD3、B 細胞マーカーである CD19 を検討した。免疫組織学的にウイルス抗原の有無について検討を行った。さらに国立感染症研究所感染病理部に登録されている腎症候性出血熱の病理標本において検討とすることにした。

CD68 抗原は 110 kDa の糖鎖を有した膜蛋白で、主としてライソゾームに局在し、PG-M1 ならびに KP-1 抗体により検出できる。PG-M1 を用いることによりライソゾームを有したマクロファージの局在を明らかにできる。これらの細胞として、肝臓の Kupffer 細胞、脾の赤脾髄、肺胞、消化管粘膜固有層、骨髄のマクロファージが挙げられる。しかし、PG-M1 は KP-1 抗体と異なり、顆粒球は陰性である。また、抗原呈示細胞である表皮内の Langerhans 細胞、リンパ節・リンパ装置の濾胞樹枝状細胞は陰性である。一方、反応性リンパ炎に出現するマクロファージ起源の推定されている plasmacytoid T cell も陽性となる。

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。

さらに、国立感染症研究所感染病理部に登録されている腎症候性出血熱例の剖検時に採取され、ホルマリン固定された腎組織も解析した。

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、分子生物学的にハンタウイルスゲノムの存在が確認された。

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。剖検時の脳組織の ELISA 検査で TBE ウイルス抗原陽性。

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。剖検時の脳組織の ELISA 検査で TBE ウイルス抗原陽性。

国立感染症研登録例：腎症候性出血熱と診断された 8 例の剖検時採取されたホルマリン固定腎組織のパラフィン薄切切片も検索の対象とした。

組織学的解析 上記症例のパラフィン薄切切片を作製し、hematoxylin-eosin 染色を行った。

CD68 抗原の検索にはマウス単クローン抗体 PG-M1 (M0876, DAKO)を、CD3 陽性 T 細胞の検討にはウサギポリクローナル抗体 (A0452, DAKO)を、CD20/cy 陽性 B 細胞の検討にはマウス単クローン抗体 L26 (M0755, DAKO)を使用した。結合した一次抗体の検出には LSAB-HRP (DAKO)を用い、DAB を基質とし、核染色は必要に応じて hematoxylin あるいは methylgreen で染

色した。

C. 研究結果

1. TBE 感染例

昨年度報告したようにダニ媒介性脳炎が疑われた2例は典型的なウイルス脳炎の組織像をしめした。ウイルスの神経障害の結果として生じる神経細胞の脱落と変性、宿主の免疫応答と考えられている血管周囲の単核細胞浸潤が認められた。この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。

血管周囲の単核細胞の性状を明らかにする目的でT細胞、B細胞、マクロファージの細胞表面マーカーの免疫組織学的解析を行った。その結果、T細胞マーカーとB細胞マーカーは陰性であったが、CD68陽性のマクロファージが多数認められた。このマクロファージは血管周囲の単核細胞と中枢神経組織実質内の壊死性病変に見出された。症例により異なりが存在したが、CD68陰性の単核細胞も存在し、これらはリンパ系細胞と推定されたが、マーカー検索では判定できなかった。

2. 腎症候性出血熱例

昨年度報告したように、私たちがロシア極東地域の剖検例で観察できた腎組織病変は間質を主体とした単核細胞浸潤と尿細管腔内の蛋白円柱の存在であり、これらは尿細管障害を主体とする腎障害がこれらの例において存在していたことを強く示唆する。一方、糸球体の形態学的変化は観察されず、この例では糸球体障害は引き起こしていなかったと推定された。

この例で単核細胞の表面マーカーの解析を行ったところ、TBE例と同様にT細胞・B細胞の表面マーカー陽性細胞は検出されず、CD68陽性のマクロファージのみが認められた。このマクロファージは小さな梗塞巣を主体に、間質に認められたが、糸球体内には極く少数の細胞

のみ認められた。

一方、感染研に登録されている腎症候性出血熱の剖検8例の腎組織の解析でも、腎組織内に浸潤する単核細胞はCD68陽性のマクロファージが大多数を占めており(7例)、T細胞・B細胞マーカー陽性のリンパ球は認められなかった。また、明らかに固定が不良の1例ではすべて陰性であった。

CD68陽性のマクロファージは1例を除き(6例)、糸球体と間質の両方に検出できたが、1例ではロシア例と同様に主として間質のみに存在していた。

D. 考察

剖検ならびに生検・手術組織の病理学的解析では固定が非常に重要であり、固定不良の組織では種々の抗原の検出が容易でなくなる。今回の解析でも明らかのように、単核細胞であるマクロファージ・Tリンパ球・Bリンパ球、さらにはNK細胞の表面マーカー解析でも、マクロファージのマーカーであるCD68は使用したPG-M1単クローン抗体では比較的容易に検出できるのに対し、Tリンパ球・Bリンパ球の表面マーカーは、CD68陰性の単核細胞が組織内に観察されるのにも関わらず検出できなかった。したがって、我々が使用している抗ウイルス抗体も、組織の固定状況に応じて、抗原が存在するにも関わらず陰性になってしまう可能性がある。この点を解決するためには、不完全な固定でも変性しがたい抗原決定基を認識する抗体の作製が望ましい。

腎症候性出血熱を引き起こすハンタウイルスには、ハンタン型、ドブラバ型、ソウル型、プーメラ型の4種類が存在し、その臨床症候の違いも報告されている。私たちが解析したロシアの1剖検例では、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、糸球体障害は形態学的には明らかでなく、CD68陽性

マクロファージの存在様式も一致している。一方、感染研登録例での解析では少ないものの糸球体にマクロファージが確実に存在しており、糸球体障害が存在していたことが明らかである。ウイルスが尿細管のみを障害する場合と、糸球体と尿細管を障害する場合には臨床像が異なることが容易に理解できるが、感染したウイルスの違いによるのかどうかは今後検討していく必要がある。

ダニ媒介脳炎のうち、脳内に浸潤する単核細胞の大多数はマクロファージ系の細胞であり、とくに脳実質内の神経細胞の脱落巣では多数存在していた。このような病変の同定にはCD68の免疫組織学的解析は有用であり、とくに小さな病変の同定には便利である。

E. 結論

今回の解析で明らかとなったことは、私たちが解析できる病理標本の固定は非常に重要であり、かつ、残念なことに今まで入手してきた人体病理標本はそれほど固定が良好ではない。このことを解決するには、固定状態の影響をあまり受けない抗体を樹立することであり、来年度はこの点について検討しながら、ウイルス病理学的解析を行っていく。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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*. 2002; 20: 1050-7.
2. Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, Iwasaki T,

Hasegawa H, Sato Y, Shimada S, Nanno M, Matsuoka Y, Ohwaki M, Iwakura Y, Suzuki Y, Aizawa C, Sata T, Kurata T, Tamura S.

Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J Immunol*. 2002;168:2930-8.

3. Yoshikawa T, Asano Y, Akimoto S, Ozaki T, Iwasaki T, Kurata T, Goshima F, Nishiyama Y. Latent infection of human herpesvirus 6 in astrocytoma cell line and alteration of cytokine synthesis. *J Med Virol*. 2002; 66:497-505.
4. Ando Y, Terao K, Narita M, Oguchi Y, Sata T, Iwasaki T: Quantitative analyses of cytomegalovirus genome in aqueous humor of patients with cytomegalovirus retinitis. *Jpn J Ophthalmol* 46: 254-260, 2002
5. Ishikawa K, Ando Y, Narita M, Shinjoh M, Iwasaki T: Cytomegalovirus retinitis during immunotherapy for common variable immunodeficiency. *J Infect* 2002; 44: 55-56
6. 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* 67: 207-216, 2002
7. Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Taya C, Sato Y, Li J, Nagata N, Yonekawa H, Koike S: Comparison of neuropathogenicity of poliovirus in two transgenic mouse strains expressing human poliovirus receptor with different distribution patterns *J Gen Virol* 83: 1095-1105, 2002
8. Nakamura H, Tamura S, Watanabe I, Iwasaki T, Yodoi J: Enhanced resistancy of thioredoxin-transgenic mice against influenza virus-induced pneumonia. *Immunol Lett* 2002; 82: 165-170

G. 知的所有権の取得状況

なし

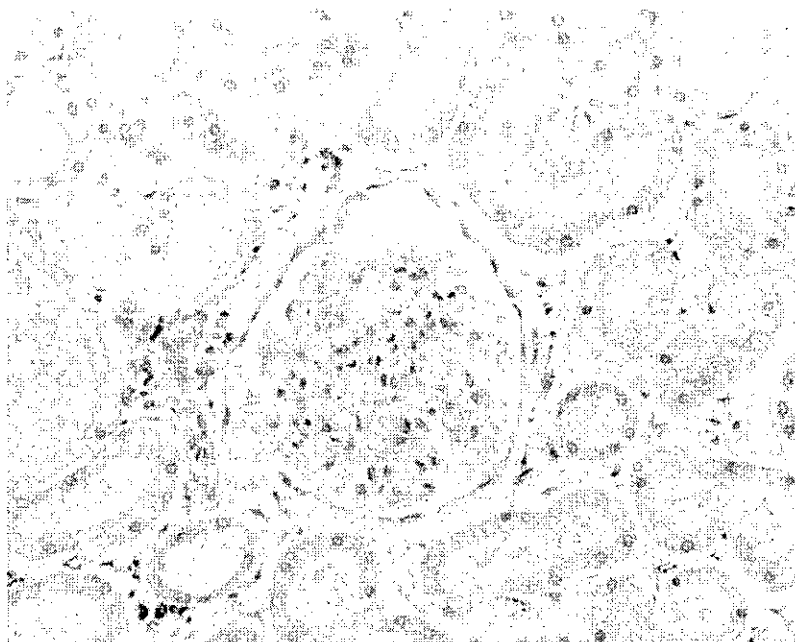


図1 昨年度報告したロシア極東地域の剖検例：腎、CD68 染色
間質に陽性細胞の浸潤を認めるが、糸球体内には認められない。

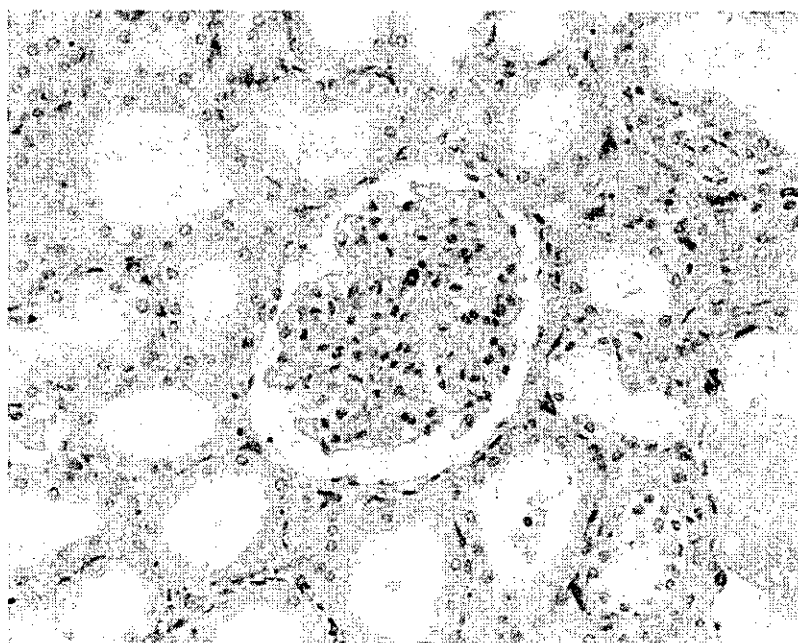


図2 国立感染症研に登録されている腎症候性出血熱剖検例：腎、
CD68 染色。間質と糸球体内に陽性細胞の浸潤を認める。

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

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

北海道で分離されたダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルス Oshima 株の病原性を遺伝子レベルで調べた。Oshima 株の弱毒化に関与する E-タンパク質の部位を特定できた。さらに Oshima 株の遺伝子組み換え抗原を作出し、敏感度と特異度に優れた IgG-ELISA による血清診断法を開発した。

A. 研究目的

本研究では 1995 年に北海道で分離した TBE ウイルス Oshima 株と同じ極東型の TBE ウイルス Sofjin 株の全塩基配列を比較し、病原性の違いについての分子基盤を明らかにしようとした。さらに TBE ウイルス Oshima 株の BHK 細胞へ適応した変異株について、病原性、生物性状および遺伝子配列を親株と比較し TBE ウイルスにおける神経侵入性毒力の本体を解明しようとした。また TBE ウイルス Oshima 株のウイルス様粒子を遺伝子組換え技術を用いて哺乳動物細胞に発現させ、ELISA による血清診断法の開発に応用した。

B. 研究方法

TBE ウイルス Oshima 株と Sofjin 株感染マウス脳からウイルス RNA を抽出し、この RNA から RT-PCR 法により cDNA を作成した。これを鋳型にしたダイレクトシーケンシング法によって両株の塩基配列を決定し、推定アミノ酸を比較した。さらに両株の BHK-21 細胞における増殖を比較した。

TBE ウイルス Oshima 株を BHK 細胞に 5 代継代して得た変異株 (Oshima cl-1 株) と親株について遺伝子 DNA 塩基配列を比較するとともに、培養細胞での増殖状態、マウスへの毒力について比較した。

TBE ウイルス Oshima 株の膜蛋白(prM)とエンベロープ蛋白(E)を組み込んだプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクトし、産生され

るウイルス様粒子(VLPs)を抗原とした ELISA による血清診断法の開発を行った。

C. 研究結果

Oshima 株のブラックサイズは Sofjin 株よりも小さかった。また Oshima 株の BHK21 細胞でのウイルス産生量、ウイルスタンパク合成量、ウイルス RNA 合成量はともに Sofjin 株より低かった。遺伝子解析では Oshima 株と Sofjin 株のアミノ酸に 1.4%の違いが認められた。

変異株 Oshima cl-1 は BHK-21 細胞において親株より大きなブラックを形成した。マウスにおける皮下接種による神経侵入性毒力は、Oshima cl-1 は親株より弱かった。Oshima cl-1 のウイルス血症の力価は親株の 1/100 と低かった。Oshima cl-1 のエンベロップ蛋白のアミノ酸置換は電荷の変化に関係していた。Oshima cl-1 の BHK-21 細胞における感染性はグリコサミノグリカンにより親株に比べ著しく阻害された。

VLPs を用いた ELISA IgG テストと中和試験との比較を患者血清 95 検体について行ったところ敏感度は 98.8%、特異性は 100%であった。さらに日本脳炎の患者血清はすべて陰性であった。

D. 考察

1993 年北海道上磯町で日本で初めてのダニ媒介性脳炎の患者が発見された。その後の我々の疫学調査で原因の TBE ウイルス Oshima 株が患者発生地区のおとりの犬から分離された。TBE ウイルス Oshima 株の病原性の分子基盤を明らかにすることにより、脳炎発症機序の解明だけでなく、生ワクチンの開発に有用な情報が得られる。

Oshima 株と強毒の Sofjin 株を比較したところ、Oshima 株は BHK 細胞での増殖が遅かった。さらに Oshima 株と Sofjin 株には 1.4%のアミノ酸配列の違いが存在し、さらに詳細に比較すると E タンパクよりも NS タンパクのアミノ酸の差が毒力の違いに関連している可能性が示唆された。

Oshima 株の BHK-21 細胞に適応した変異株 Oshima cl-1 株は神経侵入性毒力が親株より低かった。この弱毒化の機序としてエンベロップ蛋白のドメイン II における 1ヶ所のアミノ酸の置換が末梢でのウイルス増殖の低下と、ウイルス血症のレベルの減少に致り、その結果ウイルスが脳内に侵入できなかったことが考えられた。これは Oshima cl-1 が体内に多量存在するグリコサミノグリカン様物質にトラップされたためと考えられた。

これまで特異的な TBE の診断法として中和試験が用いられて来た。

今回は生ウイルスによらない安全で、
敏感度と特異度に優れた血清診断法
として VLPs を用いた ELISA の開
発を試みた。開発した IgG-ELISA
は敏感度と特異度に優れた血清診断
法であることが判明した。

E. 結論

TBE ウイルス Oshima 株のエン
ペロープ蛋白のドメイン II のアミノ
酸の 1ヶ所の置換がマウスにおける
本株の神経侵入性毒力の低下に関与
することが示された。さらにこのア
ミノ酸置換によりウイルスが体内で
グルコサミノグリカン様物質にトラ
ップされウイルス血症の低下と神経
侵入性毒力の減少に致ったと考えら
れた。TBE ウイルスの VLPs を抗原
として用いた IgG-ELISA は敏感度と
特異度に優れた血清診断法であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Goto, A., Hayasaka, D., Yoshii, K.,
Mizutani, T., Kariwa, H., and
Takashima, I. : Genetic and biological
comparison of tick-borne
encephalitis viruses from Hokkaido
and Far-Eastern Russia. *Jpn. J. Vet.
Res.* 49 : 297-307, 2002

- 2) Yoshii, K., Hayasaka, D., Goto, A.,
Obara, M., Araki, K., Ivanov, L.,
Mizutani, T., Kariwa, H. and
Takahima, I.: Development of
enzyme-linked immunosorbent
assay using recombinant antigens
expressed in mammalian cells for
serodiagnosis of tick-borne
encephalitis. *J. Virol. Methods.* (in
press), 2003
- 3) Goto, A., Hayasaka, D., Yoshii, K.,
Mizutani, T., Kariwa, H. and
Takashima, I. : A BHK-21 cell
culture-adapted tick-borne
encephalitis virus mutant is
attenuated for neuroinvasiveness.
Vaccine (in press), 2003

2. 学会発表

- 1) 後藤明子、早坂大輔、水谷哲也、
苅和宏明、高島郁夫 : BHK-21 細
胞に適応したダニ媒介性脳炎ウイ
ルスの生物性状 : 第 133 回日本
獣医学会、川崎(2002, 3)
- 2) 後藤明子、早坂大輔、水谷哲也、
苅和宏明、高島郁夫 : BHK-21 細
胞に適応したダニ媒介性脳炎ウイ
ルスの生物性状 : 第 37 回日本脳
炎ウイルス生態学研究会、別府
(2002,7)
- 3) Hayasaka, D., Gritsun, T. S., Ueki,
T., Yoshii, K., Takashima, I.,
Yoshii, K., Goto, A., Mizutani, T.,

Kariwa, H., Iwasaki, T., Gould, E. A., and Takashima, I.: Infectious cDNA clone of tick-borne encephalitis virus far-eastern subtype strain Oshima: Thirty-sixth Joint Working Conference on Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Matsumoto (2002, 7)

- 4) 好井健太郎、後藤明子、小原真弓、植木智隆、早坂大輔、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス粒子放出抑制に関する解析：第 134 回日本獣医学会、岐阜（2002、9）
- 5) 後藤明子、好井健太郎、早坂大輔、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：

ダニ媒介性脳炎ウイルス神経侵入性弱毒変異株のマウス体内での動態：第 134 回日本獣医学会、岐阜(2002, 9)

- 6) 小原真弓、好井健太郎、早坂大輔、苺和宏明、高島郁夫：北海道におけるダニ媒介性脳炎ウイルスの血清疫学調査：第 134 回日本獣医学会、岐阜(2002, 9)
- 7) 後藤明子、好井健太郎、早坂大輔、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス変異株のマウスにおける病原性解析：第 50 回日本ウイルス学会、札幌(2002, 10)

H. 知的財産の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（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

極東ロシアにおけるハンタウイルス感染症の疫学的研究

分担研究者 荻和 宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 助教授

研究要旨

ハンタウイルスはげっ歯類を病原巣動物として自然界に分布し、人が感染すると腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)などの重篤な疾病を引き起こす。本研究では極東ロシアのウラジオストック近郊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 122 匹のげっ歯類のうち、4 例のハントウアカネズミ(4/70)と 1 例のセスジネズミ(1/39)が抗体を保有していた。これらの抗体陽性げっ歯類から遺伝子増幅法(PCR)によりのウイルスの M 遺伝子と S 遺伝子の検出を試みたところ、2 例のハントウアカネズミで PCR 陽性となった。増幅された遺伝子の塩基配列を決定したところ、これら 2 例はいずれの遺伝子においても互いに 99%以上の配列が一致していた。また、様々な既知のハンタウイルスの配列と比較すると、Hantaan 型の標準株である HTN 76-118 株とは M 遺伝子が 83%と比較的低い一致率を示すのに対し、HFRS 患者から検出された Amur 型というハンタウイルスとは 94%以上の一致率を示した。また、沿海州で HFRS により死亡した患者の臓器について病理学的検索を行ったところ、腎臓にのみ病理学的な変化が見られた。すなわち、間質に単核球の浸潤と皮質の尿細管に変性がみられ、尿細管中には尿円柱なども観察された。本例ともう 1 例の HFRS 患者からハンタウイルスの M 遺伝子が検出され、それらの塩基配列を決定したところ、ハントウアカネズミ由来のウイルスや Amur 型ウイルスと 94%以上の一致率を示した。しかし、Hantaan 型の標準株とは 84%と低い一致率を示した。またウイルス遺伝子の系統樹解析を行ったところ、今回検出されたハントウアカネズミと患者由来ウイルスはいずれも Amur 型のウイルスに最も関連が深く、1 つのウイルス群を形成していた。また、セスジネズミが病原巣動物となっている Hantaan 型ウイルスは Amur 型ウイルスとは明らかにことなるウイルス群に属