

することが明らかになった。したがって今回の研究により、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。今後ハントウアカネズミもハンタウイルスの病原巣動物として注目していく必要があると考えられる。

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。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ハンタウイルス抗体調査を行うとともに、ロシア沿海州で HFRS に罹患して死亡した患者の病理学的検索を行った。また、げっ歯類と患者材料からウイルス遺伝子を検出して塩基配列を決定し、既知のハンタウイルスのものと比較した。

B. 研究方法

1. 被検血清

1999 年に極東ロシアのウラジオストック近郊でげっ歯類の疫学調査を実施した。この際捕獲された 122 例のげっ歯類から採取され

た血清につき、蛍光抗体法 (IFA) 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数の逆数を IFA 抗体価とした。

3. HFRS 患者の臓器材料の病理学的検索

ロシア沿海州で HFRS に罹患して死亡した患者の臓器材料をホルマリン固定後パラフィン封埋して型の如く HE 染色を行い、病理学的検索を行った。また、抗ハンタウイルスマウス血清により組織化学的手法によって組織中のハンタウイルス抗原の確認を試みた。

3. 遺伝子増幅法 (PCR) によるウイルス遺伝子の検出

IFA にて抗体陽性となったげっ歯類の肺および HFRS 患者からの臓器材料を Isogen (Nippon Gene)

により乳化し、全 RNA を抽出した。ウイルスの M および S 遺伝子を標的として逆転写反応後、PCR を実施した。

4. ウイルス遺伝子の塩基配列の決定
増幅された PCR 産物は pCR2.1 ベクター (Invitrogen) にクローニングし、PRISM Dye Sequencing Kit (Applied Biosystems) により塩基配列の決定を行った。

C. 研究結果および考察

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、ハントウアカネズミの 5.7% (4/70) とセスジネズミの 2.5% (1/39) が抗体を保有していた。抗体陽性のげっ歯類について、さらに PCR 法にて遺伝子検出を試みたところ、2 例のハントウアカネズミから M および S 遺伝子が検出された。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、極東ロシアの 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。さらに、今回沿

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。しかし、腎臓の組織中のウイルス抗原の存在は確認できなかった。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 つのウイルスグループを形成していた。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することが明らかになった。

極東ロシアは HFRS の流行地域であることが知られていたが、これまでどのげっ歯類が HFRS の病原巣動物となっているかほとんど明らかにされていなかった。今回の

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。今後ハントウアカネズミもハントウイルスの病原巣動物として注目していく必要があると考えられる。

D. 結論

今回得られた成績は今後、本地区で HFRS の予防対策を策定する上で、有用な情報を提供するものと思われる。さらに、ハントウアカネズミは東アジアの広大な地域や日本の北海道にも分布しており、これらの地域でもハントウアカネズミ由来のウイルスによる HFRS の発生状況について調査する必要があると思われる。特にわが国のハントウアカネズミにおける本ウイルスの保有状況について緊急の疫学調査が必要となった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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. 2003

2) Mizutani, T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Inanami, O., Yamamori, T., Goto, A., Aki, Y., Miyoshi, H., Miyamoto, H., Kariwa, H., Kuwabara M., and Takashima I. :Characterization of JNK-like protein derived from a mosquito cell line, C6/36. *Insect Mol. Biol. Insect Mol. Biol.* 12(1):61-66. 2003

3) 荻和宏明 プニヤウイルス - ウイルスと宿主の相互関係・ハントウイルスとげっ歯類の共進化 - ウイルス 52(1):61-67. 2002

4) Yahara, Y., Ohkubo, Y., Kariwa, H., Takashima, I.: Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescent antibody (IFA) test for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibody in pigs from conventional farms. *J. Vet. Med. Sci.* 64(7):583-588. 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(8):768-76. 2002
- 6) Goto, A., Hayasaka, D., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I.: Genetic and biological comparison of tick-borne encephalitis viruses from Hokkaido and far-eastern Russia. *Jpn. J. Vet. Res.* 49(4):297-307. 2002
2. 学会発表
- 1) 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）
- 2) 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）
- 3) 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）
- 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、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）
- 7) 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）
- 8) 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)
- 9) 苺和宏明、杉山誠：新興・再興感染症の疫学：第 134 回 日本獣医学会 岐阜 (2002. 9)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 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：日本ウイルス学会 札幌 (2002. 10)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) H. Kariwa, H. Miyamoto, K. Araki, K. Lokugamage, D. Hayasaka, B.Z. Cui, N. Lokugamage, L.I. Ivanov, R. Slonova, T. Mizutani, K. Yoshimatsu, J. Arikawa, I. Takashima：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)
- 16) D. Hayasaka, T. S. Gritsun, T. Ueki, K. Yoshii, A. Goto, T. Mizutani, H. Kariwa, T. Iwasaki, E. A. Gould, I. Takashima: 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)

- 17) H. Kariwa, K. Lokugamage, D. Hayasaka, B.Z. Cui, T. Iwasaki, N. Lokugamage, L.I. Ivanov, V. Volkov, V. Demenev, R. Slonova, G. Kompanets, T. Kushnaryiva, T. Kurata, K. Maeda, K. Araki, K. Yoshimatsu, J. Arikawa, I. Takashima: 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)
- 18) I. Takashima, D. Hayasaka, H. Kariwa, A. Goto, K. Yoshii, T. Mizutani, L.I. Ivanov, G. Leonova: Distribution and characterization of tick-borne encephalitis virus in Siberia and Far Eastern Region: 12th International Congress of Virology. Paris (2002. 7)

G. 知的財産権の出願・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

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 (HTNV)、 Puumala, (PUUV), Sin Nombre virus (SNV))の核蛋白(NP)を大腸菌およびバキュロウイルスを発現ベクターとして昆虫細胞中に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グループ ct 鑑別が可能であった。すなわち、ネズミ亜科、ハタネズミ亜科、アメリカネズミ亜科由来のハンタウイルスいずれに罹患したかを感染個体の血清を用いて診断することが可能となった。また、食虫類由来のハンタウイルスである Thottapalayam virus (TPMV)の抗原性の解析を行った結果、げっ歯類由来のハンタウイルスとは抗原性が大きく異なることが明らかとなった。これらの抗原を用いることで、広い範囲のハンタウイルス感染症を漏らすことなくスクリーニングする事が可能となる。

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。また SinNombre virus はアメリカネズミ亜科のげっ歯類によって媒介されるhpsの原因ウイルスである。HTN および SEO および DOB はネズミ亜科のげっ歯類、そして PUU はハタネズミ亜科のげっ歯類によって媒介される。このように、感染したウイルスのグループおよび血清型を確認することは媒介げっ歯類の

特定につながるため公衆衛生上重要である。また、SNV は日本では確認されていないが、外来感染症である HPS を摘発するために血清診断法の確立は急務である。

3つのグループのウイルスは互いに抗原性が大きく相違し交差反応性が低いことから、ハンタウイルス感染症の血清診断を行うためには少なくとも3種類の抗原が必要であると考えられる。

そこで、本研究では、HTNV、PUUV および SNV の核蛋白(NP)がそれぞれ主要抗原であることを利用して、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、病原性との関連は不明であるが、食虫目のスunksより分離されたハ

ンタウイルス Thottapalayam virus (TPMV)が報告されている。このウイルスの抗原性、交差反応性を免疫血清および単クローン性抗体を用いて明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

「抗原」: HTNV、PUUV および SNV の NP の全長 (アミノ酸 429-433 : 全長抗原) をプラスミドベクターを用いてヒスチジンタグ融合タンパクとして大腸菌に、あるいは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。また、NP の N 末端の 1-154 アミノ酸を削除したもの (155-C 末端 : 155 抗原) をバキュロウイルスベクターで発現させた。

「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、HTNV、PUUV および SNV それぞれ ct 感染血清を用いて ELISA を行った。ヒスチジン-NP はニッケルキレートカラムを用いて粗精製しプレートに直接固相化した。

「患者血清、免疫血清」: HTNV/SEOV に感染した中国・韓国・日本の患者血清、PUUV に感染したスウェーデン、フィンランドの患者血清、SNV に感染した北米の患者血清を用いた。HTNV, SEOV, PUUV を接種したウサギ血清、SNV rNP を免疫したウサギ血清、TPMV を接種したラット血清および HTNV, PUUV に対するおよそ 50 種類のマウス単クローン性抗体を用いた。

(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、米国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無い。各種免疫血清の採血は、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無いと判断された。

C. 研究結果

HTNV、PUUV および SNV の全長抗原は大腸菌抗原、バキュロウイルス抗原の何れも HTNV、PUUV および SNV 患者、ホモの組み合わせの感染血清に高い反応性を示した。しかし、大腸菌抗原は陰性血清へも高い反応を示すことがあり、さらなる精製法の検討が必要であると考えられた。HTNV、PUUV および SNV 抗原は、交差反応性は著しく低いことが明らかとなった。バキュロウイルスを用いた capture ELISA を用いることで3つのグループのハンタウイルス感染症をスクリーニングできることが示された。また PUUV と SNV の間では若干の交差反応性があり、多くの PUUV に対する単クローン性抗体が SNV NP に対しても反応性を示し、高い抗体価を示す SNV 患者血清では PUUV 抗原とも反応した。そこで昨年度の成果に基づいて PUU155 と SNV155 抗原を用いて鑑別抗原の評価も試みた。その結果 PUU155 は SEO155、DOB155 と同様に完全に特異的な反応を示した。しかしながら SNV155 は HTN155 と同

様にその抗原性を失っておりホモの感染血清に対しても反応性が低かった。この結果はこれまでにネズミ亜科由来ウイルスで示したように (Araki et al 2001) 各グループ内での鑑別診断抗原を N 末端を削除することで用意することが可能であることを示していると考えられる。

新たなハンタウイルスのバリエーションとして TPMV について単クローン性抗体を用いて抗原性の解析を行ったところ、外被タンパク GP の一部にのみ交差反応が認められ、NP に関しては全く交差反応性を示さなかった。この結果はげっ歯類由来のハンタウイルス抗原では TPMV 感染を検出できないことを示している。今後、ハンタウイルス感染スクリーニング抗原として食虫目由来抗原の必要性について検討する必要があると考えられる。

D. 考察

NP には、HTNV、PUUV および SNV に共通なエピトープがごくわずかしが存在せず、全てのハンタウイルス感染症を血清学的に摘発するためには 3 種類の抗原が必要であった。この抗原を用いた wide-range ELISA で罹患ウイルスの grouping を実施した後、N 末端を削除した鑑別抗原を用いた serotyping ELISA を行うことで正確かつ迅速な診断が可能となると考えられる。

E. 結論

本研究によって、3 種類の組み換え NP を用いてハンタウイルス感染症の wide-range の ELISA を確立した。さらに、TPMV を抗原に加えることにより、より広範囲

な本症の疫学的調査研究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) Lokugamage K, Kariwa H, Hayasaka D, Cui BZ, Iwasaki T, Lokugamage N, Ivanov LI, Volkov VI, Demenev VA, Slonova R, Kompanets G, Kushnaryova T, Kurata T, Maeda K, Araki K, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J and Takashima I, : "Genetic Characterization of Hantaviruses Transmitted by the Korean Field Mouse (*Apodemus peninsulae*), Far East Russia." *Emerging Infectious Diseases*, 8(8):768-776, Aug.,2002

2) 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

2. 学会発表

1) Arikawa J, Ogino M, Ebihara H, Lee BH, Araki K, Lundkvist A, Kawaoka Y and 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)

2) Ogino M, Yoshimatsu K, Ebihara H, Araki K, Lee BH and Arikawa J : The Envelope Glycoproteins (G1 and G2) of Hantaan Virus on Cell Surface are

Responsible Viral proteins for Cell Fusion. : US-Japan Cooperative Medical Science Program, 36th Joint Working Conference on Viral Diseases, Matsumoto, Japan (July 16-18, 2002)

3) Arikawa J, Ogino M, Ebihara H, Yoshimatsu K, Araki K and Lee BH : 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)

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

なし

3. その他

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

（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

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、媒介マダニに関し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。

A. 研究目的

昨年度までの本研究において、1999年に見つかった国内初のヒトバベシア症例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。わが国における野生動物レゼルポアを特定するため、野鼠を対象とした野外疫学調査を行った結果、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つの型の *Babesia microti* 様原虫（穂別型と神戸型）が存在し、前者は全国的に野鼠の間に広く分布していること、後者は兵庫県淡路島に限局して存在すること、および、アカネズミがバベシア原虫のレゼルポアであることなども判明した。穂別型および神戸型の *B. microti* 様原虫は、病気の流行地である米国北東部に分布する北米型原虫（狭義

の *B. microti*) と遺伝的には近縁であったが抗原性が大きく異なることから別種である可能性も否定できなかった。本年度は日本とその近隣地域に分布するバベシア原虫の関連性を探るため、ユーラシア大陸にまで調査地域を拡大するとともに、国内についてもさらに詳細な調査を行った。また、わが国のバベシア原虫を媒介するマダニに関しては全く情報がなかったため、マダニの収集とバベシア原虫の検出を試みた。

B. 研究方法

1) 小型野生動物の捕獲調査

韓国内の 8 カ所で捕獲した野生げっ歯類 4 種 154 個体の血液材料は、韓国 NIH の趙信衡、金東洙および申二鉉博士らによって集められたもので、血液ろ紙に採取され乾燥保存サンプルとして当研究室に搬入された。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提供された。韓国および極東ロシアの血液材料からは 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。原虫の型別は穂別型、神戸型および北米型のそれぞれの β -tubulin 遺伝子に特異的なプライマーセットを用いた型特異的 PCR によって行うとともに、rRNA および β -tubulin 遺伝子の塩基配列を決定すること

により最終的な確認を行った。

北海道で野生げっ歯類および食虫目類 6 種 141 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。トガリネズミからの原虫分離にはスナネズミも用いた。

2) ヒトの血清疫学調査

千葉県の高熱・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。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。間接蛍光抗体陽性検体については、さらにウエスタンブロットを行い特異抗体の存在を確認した。

3) マダニの調査

北海道内の 5 ケ所（穂別、幌延、大雪、網走、根室）と淡路島で行い、植生からの旗ざり法により合計 835 匹のマダニを採取した。種の同定は形態的特徴にもと

づいて行った。

各採取地域ごとに同種のマダニ 3~5 匹程度をプールし、SDS-Proteinase K 溶液中でホモジェナイザーを用いてよくすりつぶした後、フェノール法で DNA 抽出を行った。バベシア原虫の検出は、*B. microti* の rRNA に特異的なプライマーを用いた nested PCR により行った。型別は穂別、神戸および北米型原虫の β -tubulin 遺伝子にそれぞれ特異的なプライマーセットを用いた型特異的 PCR によって行った。

C. 研究結果

1) 日本およびユーラシア大陸極東地域に分布するバベシア原虫に関する調査

a. 野生動物調査における血液ろ紙の有用性

これまでの野外調査ではバベシア原虫の分離に重点が置かれていたため、新鮮血液の採取が必要であった。しかし、DNA によるバベシア原虫の検出・型別が可能となり血液材料は必ずしも新鮮である必要がなくなった。そこで、より大規模で広範囲な野外調査を容易するため、血液ろ紙を用いたシステムの導入を検討した。過去に北海道の野鼠から採取され血液ろ紙として乾燥保存されていた検体から DNA を抽出し、*Babesia microti* の SSUrRNA 遺伝子の PCR 検出を試みた。97 検体のうち 29 検体 (アカネズミ 22 匹、

エゾヤチネズミ 4 匹) が陽性であった。

このことから血液ろ紙が野外疫学調査に非常に有用であること、および、アカネズミに加えてエゾヤチネズミもレゼルボアとなることが判明した。

b. ユーラシア大陸極東地域の野鼠に寄生する *Babesia microti* に関する疫学調査

韓国内の 8 カ所で 4 種の野生げっ歯類 154 個体 (セスジネズミ *Apodemus agrarius* 146, ハントウアカネズミ *Apodemus peninsulae* 2, コウライヤチネズミ *Clethrionomys regulus* 2, チョウセンジネズミ *Crocidura lasiura* 4) を捕獲し、それらの血液を血液ろ紙検体として乾燥保存した。これらを日本に搬入し、*Babesia microti* 特異的 18S リボゾーム RNA 遺伝子塩基配列ならびに特異抗体の検出を試みた。17 の陽性検体 (11%) が見つかри、それらの塩基配列を解析したところ、すべてが北米型であることが判明した。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 32 頭、セスジネズミ 28 頭、タイリクヤチネズミ 4 頭、シマリス *Tamias sibiricus* 2 頭、ヨシハタネズミ *Microtus fortis* 2 頭の計 68 検体についても、バベシア原虫の検出を試みた。4 検体 (5.9%; タイリクヤチネズミ 2 検体 およびセスジネズミ 2 検体) が陽性で、すべてが北米型であった。一方、日本に存在する神戸型および穂別型の原虫は全く検出されなかつ

た。北米型の原虫が北米大陸だけでなくユーラシア大陸北東部に広く分布すること、および、わが国に分布する穂別および神戸型原虫が日本の固有種である可能性が示唆された。

c. 道東地方で見つかった北米型の *Babesia microti*

我々がこれまでに国内で行った野外疫学調査において北米型の原虫が分離・検出されたことはなかった。しかし、日本の中でも北海道は、かつてユーラシア大陸と陸続きであったため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ところ、3株の北米型 *B. microti* を分離することに成功した。これら3株はそれぞれエゾヤチネズミ、ミカドネズミ、アカネズミ由来で、いずれも道東地方で捕獲されたものであった。わが国で分離された北米型原虫 (NM69株) と米国で分離された Gray 株をウエスタンプロット法で解析したところ、互いにヘテロの抗血清に対してわずかに交差反応が認められるのみで、同じ北米型 *B. microti* でも抗原的な多様性が見られることが判明した。また、 β -tubulin 遺伝子の塩基配列解析においても地域的な多様性が認められ、系統樹解析において日本の分離株は極東ロシアおよび韓国に存

在する北米型 *B. microti* と近縁であることが示された。

d. 北海道のトガリネズミから分離された *Babesia microti* 様原虫

Babesia microti は一般に小型の野生げっ歯類を宿主とするが、北海道の森林にげっ歯類と並んで数多く棲息する食虫目の動物であるトガリネズミからも *B. microti* 様原虫が検出されることを我々は発見した。しかし、トガリネズミ血液材料をハムスターへ接種する従来の方法では原虫を分離することができなかった。そこで、ハムスターに替えてスナネズミを用いるなど原虫分離方法を工夫することで初めて原虫分離に成功した。トガリネズミからの分離株の抗原性および遺伝的性状を調べた結果、これまでにげっ歯類 (アカネズミおよびエゾヤチネズミ) から分離された穂別型原虫の性状と一致し、両者は同一種と判断された。げっ歯類だけでなく食虫目の野生動物もバベシア原虫のレゼルポアとしての役割を果たす可能性が示唆された。

2) 過去の保存ヒト血清を対象とした抗体調査

わが国の野鼠には日本固有のタイプのバベシア原虫が主に検出され、既に全国的に広く分布している状況が明らかとなった。このことから、国内初のヒトバベシア症例が発見された 1999 年よりずっ

と以前から、すでにバベシア症はヒトの間にも広まっていたが、検出されずただけである可能性が考えられた。そこで、過去の保存血清を対象とした抗体調査を行った。1985年に千葉県のだニ媒介性疾患（紅斑熱）流行地域の住民から採取された1,335検体のヒト血清について抗体検査を行ったところ、陽性率は約1.3%で、神戸型よりも穂別型のバベシア原虫に対する陽性者が多かった。この成績から、わが国には17年も前から既にヒトのバベシア症が存在したことが判明しただけでなく、未だヒトからの原虫分離報告はないものの、ヒトでの感染が主として穂別型原虫によって起きていることが推察された。

3) 媒介マダニに関する野外疫学調査

北海道内の5ヶ所と淡路島で、旗ずり法により植生からのマダニ採取を行った。合計835匹のマダニが得られ、内訳はヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) 652匹、シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) 577匹、(*Ixodes turdus*) 23匹、(*Haemaphysalis flava*) 89匹、(*Haemaphysalis douglasi*) 25匹であった。これらのマダニ数匹をプールしたものからDNAを調製し、PCRにより原虫の検出を試みた。*B. microti* rRNA特異的プライマーを用いたPCRで陽性であった50検体について、さらに*B. microti* β -tubulin特異的プライマーを用いてPCR

を行ったところ、ヤマトマダニ36検体(6.3%)およびシュルツェマダニ2検体(0.3%)が陽性であった。これら33の陽性検体について、神戸型、穂別型、北米型の各 β -tubulinに特異的なプライマーを用いた型特異的PCRを行ったところ、ヤマトマダニの31検体は全てが穂別型、シュルツェマダニの2検体は共に北米型であった。神戸型の原虫はどのマダニからも検出できなかった。以上の結果から、わが国における穂別型および北米型の*Babesia microti*様原虫の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

ヒトのバベシア症は、動物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、同じマダニ (*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40例以上が確認されている。一方、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ごく最近に至るまで全くなかった。ところが、1999年に輸血

に起因する国内初のバベシア症例が兵庫県神戸市で見つかった。以来、我々のグループは、本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などを行い、日本国内におけるバベシア症の実態把握に勤めてきた。本年度は、わが国の近隣地域に調査範囲を拡大し、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べることを重点課題とした。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。本研究により、わが国

には穂別型、神戸型および北米型の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判明した。これら3者は抗原性および遺伝的性状が異なるため、原虫の検出や同定、特異抗体の検出などを調べるプロセスが非常に複雑なものとなった。したがって、疫学調査ならびに血清診断の効率化を図るためには、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診断システムづくりが重要になると思われた。

ヒトのバベシア症は、通常、野生動物の保有するバベシア原虫をマダニがヒトへ媒介することによって起きる。本病の流行地である米国北東部では、シカマダニ (*Ixodes scapularis*) がベクターであることが判明しているが、このマダニは日本には存在しない。そこで、わが国に存在するマダニについてバベシア原虫保有状況を調べた。調査は北海道と淡路島で行った。北海道はマダニが多く、穂別型および北米型の両者が共存する。淡路島は国内初の輸血バベシア症例に関与した血液提供者の居住地であることに加え、穂別型および神戸型の両者が共存する場所である。調査の結果、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。したがって、これらのマダニが穂別型およ

び北米型原虫のベクターである可能性が示唆された。今回の調査では、神戸型原虫を保有するマダニは全く検出されなかったため、どのマダニが神戸型のベクターであるのか不明である。しかし、ヤマトマダニについては、神戸型の原虫を保有していた野鼠が捕獲された場所と同じ所で多数収集したにもかかわらず、穂別型のみしか検出されていないことから、ベクターである可能性は低いと思われた。

E. 結論

ユーラシア大陸極東地域で捕獲された野鼠についてバベシア原虫保有状況を調べた結果、北米型の *B. microti* が広範囲にわたり検出されることが判明したが、日本に存在する穂別型および神戸型の *B. microti* 様原虫は一例も検出されなかった。北海道において野鼠の捕獲調査を行った結果、道東地方に限局して北米型の *B. microti* が検出されたが、わが国の北米型分離株はヒトバベシア症の流行地である米国北東部の分離株とは抗原性がかなり異なっていた。北海道および淡路島の植生から収集したマダニのバベシア原虫保有状況を調べた結果、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。神戸型の原虫を保有するマダニは検出されなかった。

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) 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 (3): 335-340, 2003.

2) 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.

3) 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(1):33-40, 2002.

2. 学会発表

1) 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.

2) 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.

3) 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.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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	巻名	ページ	出版年
Goto, A., Hayasaka, D., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H., 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
Goto, A., Hayasaka, D., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I.	A BHK-21 cell culture-adapted tick-borne encephalitis virus mutant is attenuated for neuroinvasiveness.	Vaccine	(in press)		2003
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	171-179.	2003
苅和宏明	ブニヤウイルス - 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
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 (<i>Apodemus peninsulae</i>), Far East Russia.	Emerg. Infect. Dis.	8	768-76	2002
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	2091-2094	2002

(別紙 5-2)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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
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	145-147	2002
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