

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

ブルセラ症の迅速診断法の開発および血清疫学について

分担研究者 神山 恒夫 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室長
協力研究者 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究要旨：感染症法で第4類に指定されているブルセラ症（Brucellosis）はブルセラ属菌（genus *Brucella*）による動物由来感染症で、未だに多くの感染者・感染動物の発生を見る世界的に重要な感染症のひとつである。国内での発生は近年まれであるが、輸入動物、食品から、または海外での感染が懸念される。今回、高感度・迅速診断法として、PCR法、およびライトサイクラーを用いた Real-time PCR法による *Brucella spp.* 遺伝子検出法の確立を試みた。ブルセラ属菌すべてを検出するプライマーとプローブを用いた方法を検討した結果、*B. abortus*、*B. canis* とともに1時間足らずで、反応チューブ中に約10個の菌であれば検出可能であることが示された。

A. 研究目的

感染症法で4類に指定されているブルセラ症（Brucellosis）はブルセラ属菌（genus *Brucella*）による動物由来感染症で、食料や社会・経済面で動物への依存度が高い国においては、未だに多くの感染者・感染動物の発生を見る世界的に重要な感染症のひとつである。ブルセラ属菌は、グラム陰性、偏性好気性短小桿菌で、芽胞や鞭毛を持たず細胞内寄生性を有する（Fig. 1A）。ヒトで感染報告があるのは *B. melitensis*（自然宿主：ヤギ、ヒツジ）、*B. abortus*（ウシ）、*B. suis*（ブタ）、*B. canis*（イヌ）の4菌種で、ほかに *B. ovis*（ヒツジ）、*B. neotomae*（齧歯類）、*B. maris*（海洋動物）があり、一般に動物では流産の原因となる。日本では、ヒトブルセラ症は *B. melitensis* と *B. abortus* 感染の散発例が過去に報告されている程度で、現在は両疾患については清浄化していると考えられるが、世界中では恒常的にヒト、動物ともに発生が報告（Fig. 1B）されている疾患であるため、海外からの侵入（輸入動物や輸入食品由来、海外での感染者の入国等）が懸念されている。しかしながら、現在の診断の中心は試験管内凝集反応であることから、

高感度・迅速診断法の開発が望まれる。また、*B. canis* については、1971年に輸入ビーグル犬によると思われる、繁殖コロニーでの発生があり全国に波及し、現在でも国内の犬の数%が感染していると考えられているにもかかわらず、イヌおよびヒトでの近年の感染状況は把握されていない。そこで、現在の *B. canis* 感染状況を把握するため、感染リスクの高いと思われる集団に属するヒトの血清学的検討を行った。また、迅速診断法として、PCR法、およびライトサイクラーを用いたリアルタイムPCR法による *Brucella spp.* 遺伝子検出法の確立を試みた。

B. 研究方法

- 1) 試験管内凝集反応による *B. abortus* および *B. canis* 特異的抗体の検出：血清中の特異的抗体を *B. abortus* 凝集反应用菌液（農業技術研究機構）および *B. canis* 凝集反應用菌液（北里研究所）を用いた試験管内凝集反応で検討した。ヒト血清は、某動物園職員15名（獣医師3名、飼育職9名、その他3名）について検討した。
- 2) PCR法によるブルセラ遺伝子の検出：ブルセラ属菌細胞表面タンパク（BCSP31）、

外膜タンパク (OMP-2)、リボゾーム RNA (16S rRNA) に特異的なプライマー (Table 1A、各々、B4/B5:224bp, JPF/JPR:192bp, F4/F2:904bp) を用いて PCR を行った。BCSP31 (Zerva L., et. al., J. Clin. Microbiol., 39:1661-1664, 2001) および 16S rRNA (Romero C., et. al., J. Clin. Microbiol., 33:615-617, 1995) はすべてのブルセラ属菌で検出されるが、JPF/JPR を用いたとき OMP-2 (Leal-Klevezas D.S., et. al., J. Clin. Microbiol., 33:3087-3090, 1995) は、*B. canis* および *B. suis* では検出されない。*B. canis* および *B. abortus* の遺伝子は、それぞれの凝集反応用菌液より Sepa-Gene (三光純薬) を用いてプロトコールに従い分離精製した。

3) Real-time PCR 法の設定と検出：すべてのブルセラ属菌がもつ BCSP31 を標的として、ライトサイクラー (ロシュ・ダイアグノスティック社) を用いた Real-time PCR 法の検討を行った。プライマーは B4/B5 を使い、その内部に 2 種類のハイブリダイゼーションプローブを設計した (Table 1B)。これは、増幅領域内に、互いに近接して (1 塩基の間隔をあけて) ハイブリダイズする 2 種の異なる蛍光プローブを用意し、この 2 種のプローブが近接してハイブリダイズしたときに初めて発する蛍光をモニターすることで、特異的 PCR 産物の検出を行う方法である。反応条件は 95°C, 10min- (95°C, 10sec.-60°C, 15sec.-72°C, 8sec.) × 40 cycle、サンプルは、*B. abortus* および *B. canis* の凝集反応用菌液から抽出した DNA を用いた。また、凝集反応用菌液は、*B. abortus* では約 6×10^{10} /ml、*B. canis* は約 1.2×10^9 /ml の菌数を持つ溶液になっている。そこで、上清中の遊離 DNA を洗浄により除去した後、 2×10^2 ~ 2×10^9 /ml の菌液 500ul を 100°C、10 分加熱処理し、遠心後の上清 5ul をライトサイクラーに用いた。この 5ul 中には、それぞれ $1 \sim 1 \times 10^7$ 個の菌由来の DNA が含まれている計算になる。

C. 研究結果

1) 試験管内凝集反応：ヒトの血清中の特異的抗体を *B. abortus* および *B. canis* 凝集反応用菌液を用いた試験管内凝集反応で検討した。*B. abortus* についてはすべての検体が陰性であった。一方、*B. canis* に関しては、15 名 (獣医師 3 名、飼育職 9 名、その他 3 名) のうち 3 名 (獣医師 2 名、飼育職 1 名) で、凝集価 1:160 ~ 1280 を示し、その抗体保有率は 20% と非常に高くなっていた。イヌ血清について検討したところ、その抗体保有率は約 4.6% であった (データは示さず)。

2) PCR 法：BCSP31 および 16S rRNA は *B. abortus* および *B. canis* で検出されたが、OMP-2 は *B. abortus* では検出されるものの、*B. canis* では検出されなかった (Fig. 2)。濃度依存性に検出されることから、凝集反応用菌液から分離した DNA を陽性対照として用いることができることがわかった。上記ヒト血清より Sepa-gene で分離した DNA を検体として PCR を行ったが、特異的バンドは検出されなかった (データは示さず)。

3) Real-time PCR 法：凝集反応用菌液より分離精製した *B. canis* 遺伝子を用いて実施したところ、用いたサンプルの濃度依存性に検出され、1 pg/反応チューブまで十分に検出可能であった (Fig. 3A)。また、希釈菌液を用いたときも、濃度依存性に検出され、1 反応チューブ内に 10 個の菌があれば検出可能であることが示された (Fig. 3B)。また、*B. abortus* に関しても用いたサンプルの濃度依存性に検出され、1 pg/反応チューブまで十分に検出可能であった (Fig. 4A)。希釈菌液を用いたときは、*B. canis* の時よりは若干感度が落ちたが、1 反応チューブ内に 100 個の菌があれば検出可能であることが示された (Fig. 4B)。また、DNA の組成 (塩基長や G-C contents の違い) により融解温度が異なることを利用した融解分析を行い、反応特異性 (産物の特異性) を検討したところ、*B. abortus* および *B. canis* いずれの系でも特異的な反応であ

った（データは示さず）。

D. 考察

ブルセラ属菌にヒトが感染したときの症状は、*B. melitensis* がもっとも重く、ついで *B. suis*、*B. abortus*、*B. canis* の順となる。通常、潜伏期は1～3週間であるが、時に数ヶ月になることもある。症状そのものに特異的なものはなく、軽症では単に風邪様の症状を示すが、他の熱性疾患と類似してはいるが、筋肉・骨格系に及ぼす影響が強く、全身的な疼痛、倦怠感を示す。発熱は主に午後から夕方に認められ、時に40度以上となることもあるが、発汗とともに朝には解熱する。このような発熱パターン（間欠熱）が数週間続いた後、症状の好転が1～2週間認められるが、再び発熱を繰り返す（波状熱）こともある。病気の期間は、数週間から数ヶ月に及ぶこともある。ブルセラ症は、もっとも頻度の多いのが、ブルセラに感染したヒツジ、ヤギ、ウシ、ラクダなどの、加熱（殺菌）処理していない生乳やチーズの飲食による感染である。また、酪農家、屠畜場・食肉加工場従業員、獣医師、ハンターなどが、感染動物（上記動物の他、ブタ、ヘラジカ、シカ、イノシシ、アザラシなど）やその死体・流産時の汚物などに接触することにより、皮膚の傷口や吸入により感染することがある。幸い、現在国内においては、ブルセラ症はほとんど認められない。しかしながら、世界中で患者の発生が認められ、全く減少する様子がないことから、今後、海外からの侵入（輸入動物由来、輸入食品、海外での感染者の入国等）が懸念される。2002年に東京で、イヌからによると思われるヒトの *B. canis* 感染が報告されたが、ブルセラ属菌は非常に感染しやすく、10～100個の菌数で感染しうるため、今後、輸入・在来両方のイヌもしくは野生動物からヒトへの *B. canis* 感染が増加するのではないかと、また、潜在的感染者が多数いるのではないかと考えられている。事実、イヌにおける感染率は、1970

年代に *B. canis* 感染が問題になった当時とほとんど変わらない結果が得られた。今回、ハイリスクと考えられるヒトの血清診断を行ったところ、獣医師では、2/3と非常に高い陽性率を示した。今後、さらに例数を増やして検討してみる必要があると考える。また、ペットからの感染も考えられるため、一般人についても検討し、潜在的感染者を把握する必要があると考えられた。今回、高感度・迅速診断法を開発する目的で Real-time PCR 法を検討した。ライトサイクラーでブルセラ属菌すべてを検出するプライマーとプローブを用いた方法を実施したところ、*B. abortus*、*B. canis* とともに1時間足らずで高感度に検出可能であることが示された。ただ、この方法では、*B. abortus*、*B. canis* の区別をつけることができないので、今後さらに精度を上げ、ブルセラ属菌の各菌種特異的な条件・検出法を開発していく必要があると思われる。また、試験管内凝集反応は、その感度、検出までの時間、煩雑さなどに問題があると考えられるので、より簡便で高感度な ELISA 法を開発する必要があると考えられた。

E. 結論

高感度・迅速診断法として、*B. abortus*、*B. canis* とともに検出可能なライトサイクラー (Real-time PCR 法) の応用を検討した。ハイブリダイゼーションプローブを用いた方法により、非特異的反応もほとんどなく、1時間足らずで、感度も試料中に10～100個の菌があれば検出可能である事を示した。非常に有効な検出法であると考えられるので、生物試料のみならず感染源になりうる食品等への微量混入を含め、確実に検出可能であるかどうか、さらに検証する必要があると思われる。また、試験管内凝集反応は、その感度および煩雑さに問題があると考えられるので、より簡便で感度の高い ELISA 法を開発する必要があると思われる。

F. 健康危害情報

今後、海外からのブルセラ症の侵入（輸入動物由来、輸入食品、海外での感染者の入国等）が懸念される。また、渡航者に対する注意喚起も必要である。

G. 研究発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1) ブルセラ特異的 PCR およびライトサイクラー用プライマー、ハイブリプロブシーケンス

A) PCR 用プライマーデザイン

BCSP31 (224 bp)	Forward (B4)	5'-Tgg CTC ggT TgC CAA TAT CAA
	Reverse (B5)	5'-CgC gCT TgC CTT TCA ggT CTg
OMP-2 (192 bp)	Forward (JPF)	5'-gCg CTC Agg CTg CgG ACg CAA
	Reverse (JPR)	5'-CCG AgC CAT TgC ggT Cgg TA
16S rRNA (904 bp)	Forward (F4)	5'-TCg AgC gCC CgC AAg ggT
	Reverse (R2)	5'-AAC CAT AgT gTC TCC ACT AA

B) ライトサイクラー用ハイブリプロブデザイン (BCSP31)

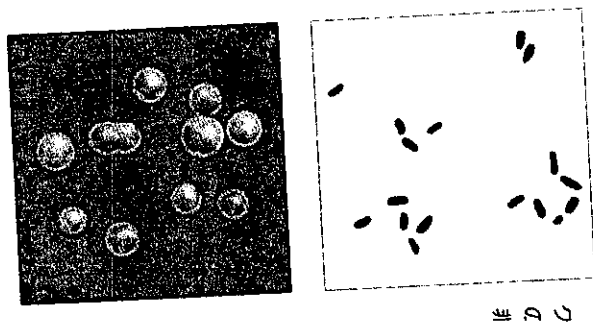
プライマー シーケンス	Forward	5' - TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3'	
	Reverse	5' - CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG-3'	
サイズ	224 bp	GenBank access number	M20404
ハイブリダイ ゼーション プローブ シーケンス	5' - CCTATAACGGCACGGGCCCTTTATGA-3' -Fluorescein		
	3' Label: Fluorescein		
	5' -LCRed640- GGCAAGGGCAAGGTGGAAGATTT-3' -phosphorylation		
全体配列	781 t g t c g a a t g g c t c g g t t g c c a a t a t c a a t g c g a t c a a g t c g g g c g c t c t g g a g t c c g g c		
プライマー	841 t t t a c g c a g t c a g a c g t t g c c t a t t g g g c c t a t a a c g g c a c g g c c t t t a t g a t g g c a a g		
ハイ ブリプローブ	901 g g c a a g g t g g a a g a t t t g c g c c t t c t g g c g a c g c t t a c c c g g a a a c g a t c c a t a t c g t t		
	961 g c g c g t a a g g a t g c a a a c a t c a a a t c g g t c g c a g a c c t g a a a g g c a a g c g t t t c g c t g		
	1021 g a t g a g c c g g g t t c t g g c a c c a t c g t c g a t g c g c g t a t c g t t c t t g a a g c c t a c g g c c t c		

Table 2) ヒト血清の *B. canis* 試験管内凝集反応

サンプル	凝 集 抗 体 価				合計	陽性率
	<1:160	1:160	1:320	1:640<		
ヒト血清	12	2	0	1	15	3/15 (20 %)
獣医師	1	1	0	1	3	2/3 (66.7 %)
飼育職	8	1	0	0	9	1/9 (11.1 %)
その他	3	0	0	0	3	0/3 (0 %)

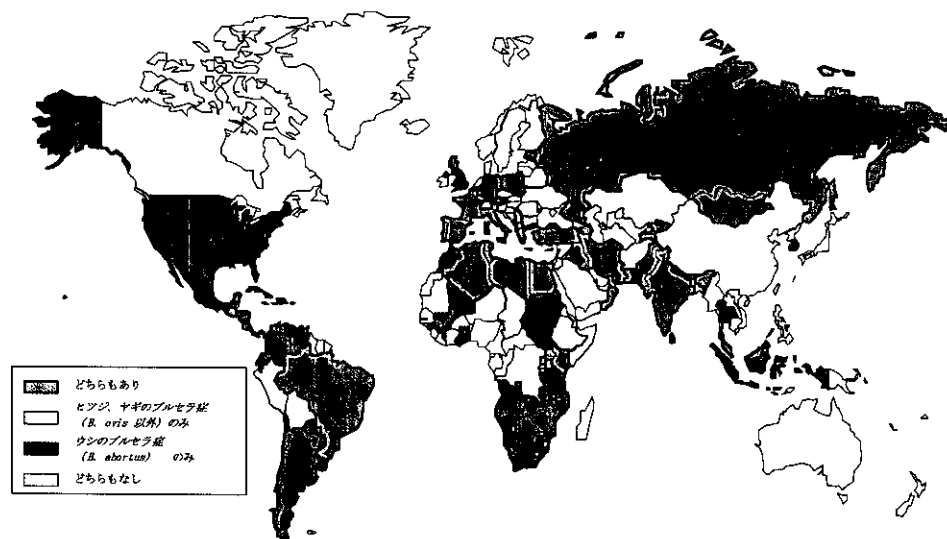
Fig. 1) ブルセラ症

A) ブルセラ菌 (*Bruceella abortus*)



(図解臨床細菌検査第2版、坂崎利一編、文光堂より)

B) ウシのブルセラ症 (*B. abortus*)、ヤギ・ヒツジのブルセラ症 (*B. ovis* 以外) の発生が報告された国・地域 (1999-2001年)



(国際獣疫事務局 (OIE)、Multiannual Animal Diseases Status より改変)

Fig. 2) *B. canis* の PCR

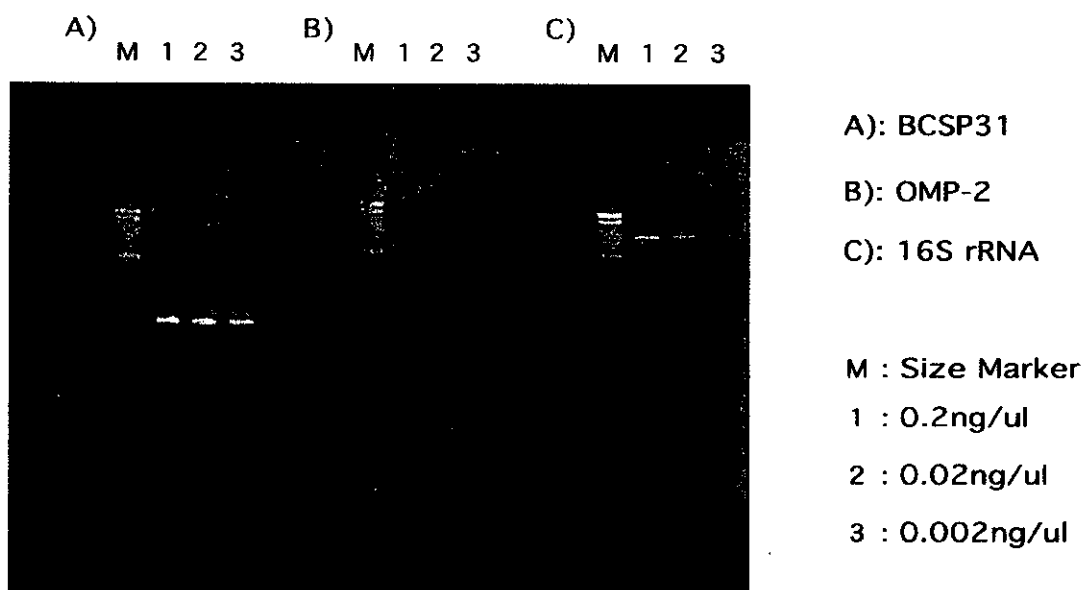
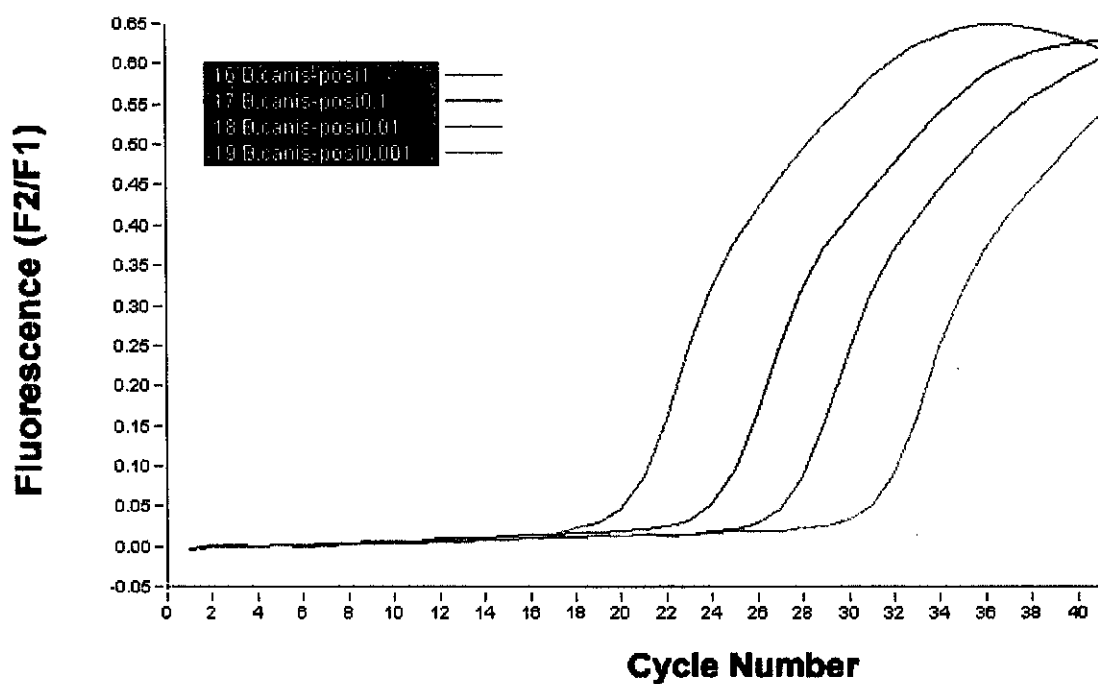


Fig. 3) ライトサイクラーを用いた *B. canis* 関連遺伝子 (BCSP31) の検出

A) 濃度既知の精製 DNA からの検出



B) 煮沸菌液からの検出

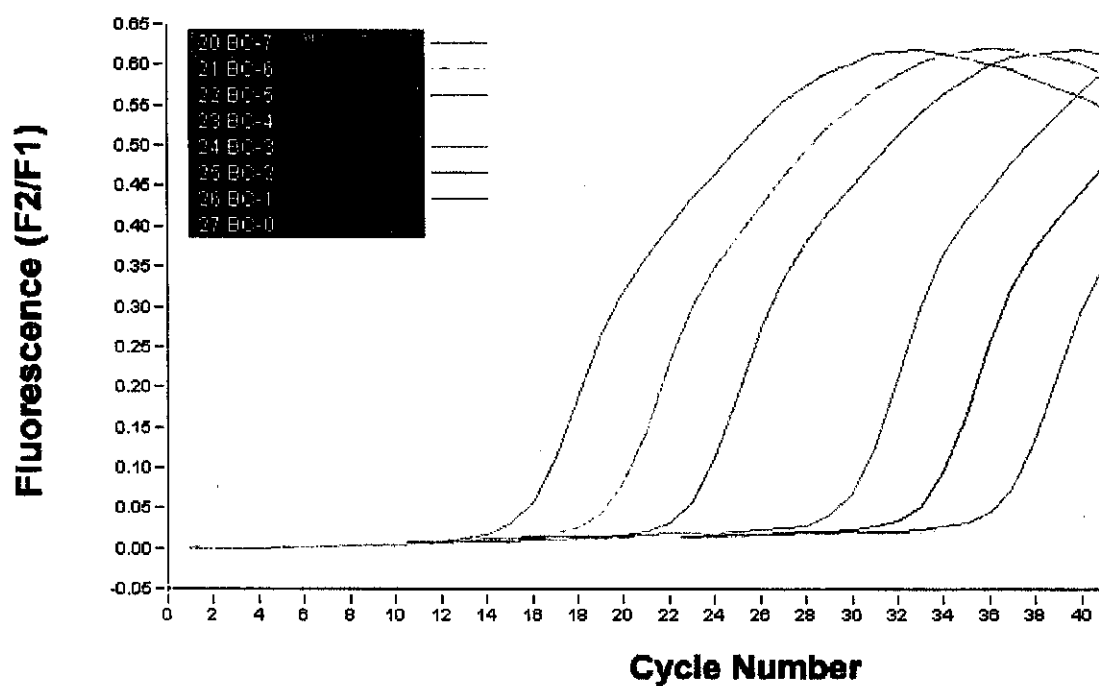
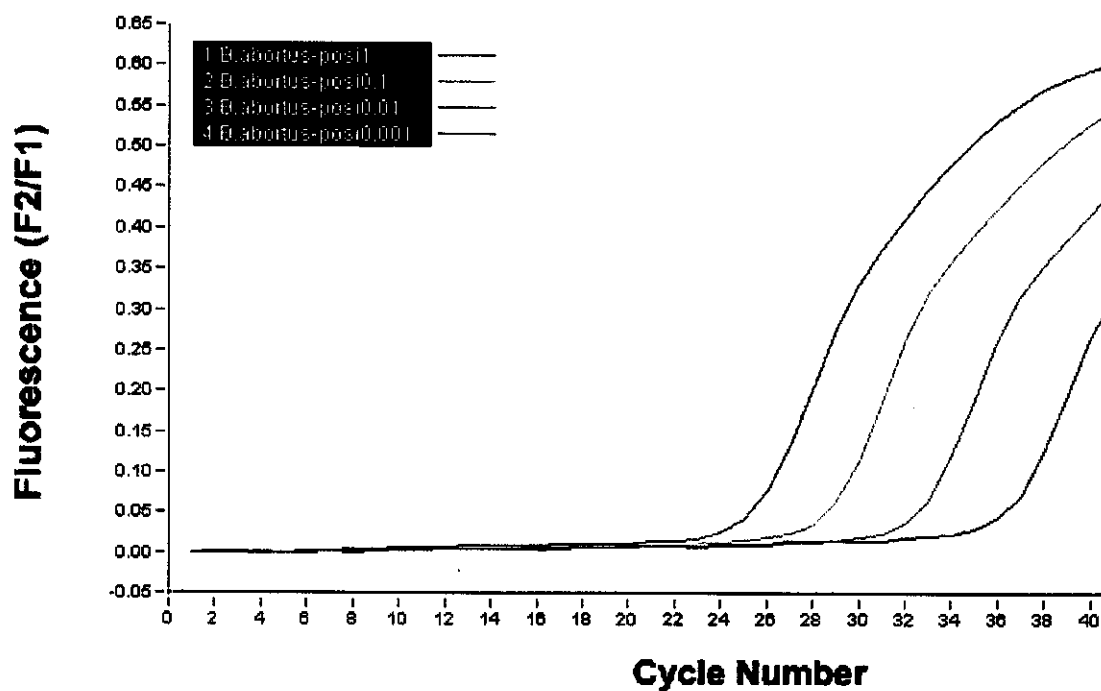
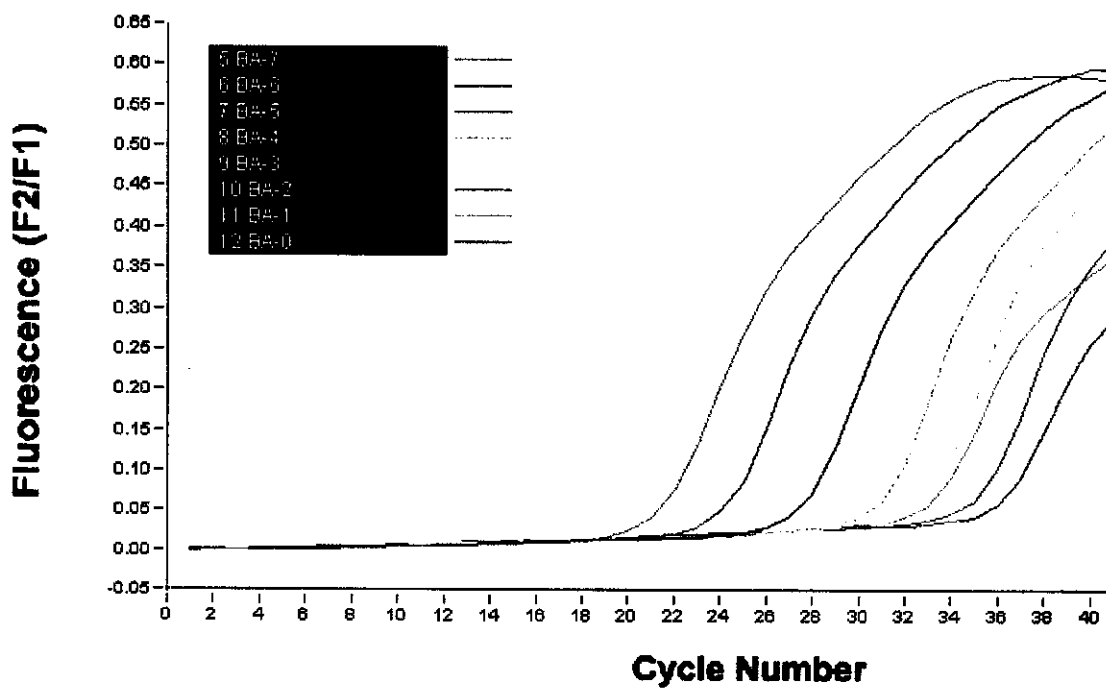


Fig. 4) ライトサイクラーを用いた *B. abortus* 関連遺伝子 (BCSP31) の検出

A) 濃度既知の精製 DNA からの検出



B) 煮沸菌液からの検出



翼手目由来のウイルス感染症の疫学的解明

分担研究者：吉川泰弘（東大院農学生命科学研究科）

協力研究者：大松勉（東大院農学生命科学研究科）

研究要旨：ルーセットオオコウモリの mtDNA の解析結果から a)大翼手亜目と小翼手亜目は同一の起源から分岐したと考えられ、b)霊長類や食虫目から進化したと言う説を支持するものではなく、偶蹄目や奇蹄目、食肉目と同じ起源を持つと考えられる。c)ヒナコウモリ上科群から小翼手亜目の各分類群が分岐し、d)大翼手亜目はキクガシラ、サシオコウモリ上科群と共通の祖先から分岐したと考えられた。e)ルーセットオオコウモリは大翼手目の中で最も早く分岐し、アフリカから東アジア・オーストラリアに広がった可能性が考えられた。また抗血清を作成しオオコウモリ IgG と他動物種 IgG の抗原エピトープについて検討した。交差性は5～20%までの低い値を示したのに対し、翼手目では、大翼手亜目・小翼手亜目共に95%以上の高い値を示した。近縁種と考えられている霊長目や食虫目とは、翼手亜目としての分岐に比べかなり以前に分岐したと考えられた。ルーセットオオコウモリ由来リンパ球を ConA 刺激により増殖させ、RT-PCR 法により CD4, CD8 の遺伝子について、cDNA Amplification Kit を用いて 5'-RACE および 3'-RAC 法をおこなって全長 cDNA の塩基配列の決定を進めている。オオコウモリから腎臓を無菌的に摘出し、0.25%トリプシン PBS で細胞を分離し経代培養した。条件検討として 0,1,2,5,10%FCS-DMEM を用いて条件検討を行った。また、一部を用いて PrV, CPIV の感受性について評価した。

A. 目的

熱帯雨林の開発や交通手段の発達に伴う発展途上国における変化は、人や動物およびそれらに寄生する病原微生物の生態系に著しい変化を与え、結果として、サル類やげっ歯類に由来するエボラ出血熱、マールブルグ病、ラッサ熱といった新興感染症の発生の原因となっていると考えられる。また、近年狂犬病やコウモリリッサウイルス感染症といった翼手目に由来する Zoonoses も世界的に問題となっている。それら以外の新興感染症においても翼手目の関与は否定できない。それにも関わらず、これまで翼手目を対象とした基盤研究は世界的にも欠落しており、翼手目の分類、生態、免疫機能、感染病原体等に関する包括的な研究はほと

んど行われていない。そこで、翼手目に由来する Zoonoses の疫学的解明のための基礎技術の開発を目的として、翼手目に関する基盤研究を行った。

B. 材料と方法

1) ミトコンドリア DNA(mtDNA)を用いたルーセットオオコウモリの系統解析：世界の哺乳類は約4,500種が知られており、その4分の1である約1000種が翼手目に属する。翼手目を大きく分けると、肉食性である大翼手亜目と主に食虫性である小翼手亜目に分類され、これら二つの亜目はともに飛翔を行う哺乳類であり形態学的・解剖学的な類似性からも単系統として広く受け入れられてきた。しかし近年、大翼手

亜目は小翼手亜目とは全く異なる進化を遂げた可能性も示唆されており、この二つの亜目が、全く別々の祖先から進化したという考えもある。このように、翼手目の分類において明確な答えはまだ出ていない。ここでは、大翼手亜目の中で唯一舌によるエコーロケーションを行うエジプトルーセットオオコウモリの mtDNA 塩基配列を用いて、大翼手亜目と小翼手亜目、さらに他動物種との関係を検索した。ルーセットオオコウモリの肝臓凍結材料から DNAzol(GIBCO BRL)を用いて抽出した mtDNA について、その塩基配列をショットガンシーケンス、もしくはダイレクトシーケンスを用いて決定した。また、他動物種の全長 mtDNA シーケンスデータをデータベースから検索し、今回得られたルーセットオオコウモリとともに系統学的検索を行った。

2) IgG の交差性から見た翼手目と他動物種の系統学的検索：疫学調査のためのコウモリ免疫グロブリンに対する特異抗体を作成した。また、オオコウモリ IgG 抗原エピトープの交差性から見た、他動物種 IgG との類似性について Competitive ELISA 法を用いて検索した。ルーセットオオコウモリの血清より分離したオオコウモリ IgG、及びそれより作成した抗オオコウモリ IgG ウサギ IgG、被検血清として霊長類 4 種、食虫目 2 種、大翼手亜目 2 種、小翼手亜目 1 種、げっ歯類 1 種の血清、Negative Control として FCS を用いて Competitive ELISA 法によりオオコウモリ IgG と他動物種 IgG との抗原エピトープの類似性について検索し、系統学的な解析を行った。

3) オオコウモリ CD4 および CD8 の cDNA 塩基配列の決定：翼手目の免疫機構解明の

ため、細胞性免疫を担う T 細胞、B 細胞の細胞表面抗原である CD4 および CD8 の塩基配列の決定を行った。ルーセットオオコウモリリンパ節由来 T 細胞、B 細胞を ConA 刺激により増殖させ、RT-PCR 法によりそれぞれの cDNA をとり、Marathon cDNA Amplification Kit を用いて 5'-RACE および 3'-RACE 法をおこなって全長 cDNA の塩基配列の決定を行った。

4) オオコウモリ腎臓由来初代培養細胞の作成とウイルス感受性の評価：翼手目のウイルス保持の可能性を検索するために腎臓由来初代培養細胞を作成し、そのセルライン化を計るとともにウイルス感受性について検索した。オオコウモリから腎臓を無菌的に摘出し、0.25%トリプシン PBS で細胞を分離し経代培養しセルライン化を計った。条件検討として 0,1,2,5,10%FCS-DMEM を用いて条件検討を行った。また、一部を用いて PrV, CPIV の感受性について評価した。

C・D、結果と考察

1) mtDNA の蛋白コード領域 13 種の塩基配列を用いた解析結果から、①大翼手亜目と小翼手亜目は別々の起源ではなく同一の起源から分岐した動物と考えられ、②それは霊長類や食虫目から進化したと言う説を支持するものではなく、偶蹄目や奇蹄目、食肉目と同じ起源を持つと考えられる。リボソーム RNA 塩基配列を用いた翼手目内における解析では、③ヒナコウモリ上科群から小翼手亜目の各分類群が分岐し、④大翼手亜目はキクガシラ上科、サシオコウモリ上科群と共通の祖先から分岐したと考えられた。また、⑤ルーセットオオコウモリは大翼手目の中で最も早く分岐したと考えられ、アフリカから東アジア・オーストラリ

アに向けて広がった可能性が考えられた。大翼手亜目に見られる霊長類に類似した視神経回路などの形態学的特徴は、食虫性から果食性へという変化に伴い、昆虫など運動性のある獲物の動きを暗闇でも探知できる超音波によるエコーロケーションではなく、果物等の定位の獲物を区別するための視覚が発達したために得られたのではないかと考えられた。

2) 各動物種血清の100倍希釈においてオオコウモリ IgG と他動物種 IgG の抗原エピトープの類似性について検討した。他動物種において、交差性は5から20%までの低い値を示したのに対し、翼手目では、大翼手亜目・小翼手亜目共に95%以上の高い値を示した。IgG の分子進化という観点から見ると大翼手亜目、小翼手亜目は近縁種で単系統であると考えられる。また、近縁種と考えられている霊長目や食虫目とは、翼手亜目としての分岐に比べかなり以

前に分岐したと考えられる。

3) 現在までに、CD4,CD8 はそれぞれ一部の塩基配列(約 2060,360)が決定した。今後、全長 cDNA 塩基配列を決定し、他動物種との比較を行っていく。

4) 細胞のセルライン化には至らなかった。培養条件としては 10%FCS-DMEM が適当であった。また、接種実験の結果、PrV を接種した培養細胞は感染後1日目からほぼすべての細胞の細胞死が観察された。CPIV 接種細胞では接種後3日目から CPE が観察された。また、CPIV については TCID50 の経時的な増加が見られた。

E. 研究発表

日本進化学会(中央大学 2002年8月)

大松勉、吉川欣亮、石井寿幸、久和茂、宇根有美、吉川泰弘

ミトコンドリア DNA 全塩基配列を用いた翼手目の系統解析

中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱の分子疫学

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で 1966～88 年の間に分離された CCHF ウイルス遺伝子の分子系統学的解析から、この地域の 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を明らかにした。また、CCHF ウイルス中国分離株の S-RNA の塩基配列から得られる分子系統樹は、M-RNA の配列から得られるものと同様であった。このことは型間で RNA 分節の入れ替えによる reassortant virus が容易には出現しないことを示唆する。2001 年の流行は、1966 年に分離されたウイルスと極めて近縁なウイルスによることが明らかとなった。1966 年と 2001 年に分離されたウイルスの S-RNA 遺伝子全長の配列の比較から、35 年間にウイルス遺伝子の変異がほとんど起きないことも明らかになった。

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。CCHF は感染症法で 1 類感染症に分類され、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。昨年度は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 (表 1) の M-RNA の全遺伝子配列を決定して比較検討した結果、この地域には、3 種類の CCHF ウイルスが存在することを明らかにした。今年度は、2001 年の CCHF の流行時に患者、ダニから RT-PCR により増幅された S 分節の遺伝子配列を決定し、流行に関与したウイルス型を同定することを目的とした。

B. 材料と方法：

中国の新疆ウイグル自治区の流行地 (図 1) で CCHF 流行期 (4 から 5 月) に、急性期の患者血清およびダニから 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。患者からの血液採取にあたっては、説明をし

同意を得た。1st strand cDNA を鋳型として種々のプライマーを用いて S-RNA 分節を標的とした PCR を行い、PCR 産物から direct sequence により塩基配列を決定した。

C. 結果：

1) 4 人の急性期の CCHF 患者から採取された血清から PCR 産物が得られた。流行地で採取されたダニ (*Hyalomma*) は、2～6 匹をプールして RNA 採取した。16 プールのダニ材料のうち 4 プールから PCR 産物が得られた。得られた S-RNA の PCR 産物の遺伝子配列を GenBank に登録されている CCHF ウイルスの部分配列と比較した結果、患者由来 4 検体、ダニ由来 4 検体いずれも 1966 年に新疆で分離された CCHF ウイルス 66012 株と同じ系統に属した。

2) 2002 年に、ロシア、英国のグループによる分子疫学調査で、M-RNA の部分配列による分子疫学調査報告がなされた。昨年度に決定された中国分離株の M-RNA 遺伝子配列をこれらのデータと NJ 法による分子系統学的解析を行った結果、中国の 2 株 (7001, 79121) はウズベキスタン分離株と、2 株 (8402, 88166) はパキスタン分離株と、2 株 (75024, 7803) はタジキスタン分離株と同じ系統に属した (図 2, 3)。

D. 考察：

昨年度の解析から、CCHF の流行地である中国新疆自治区で 1966~88 年の間に分離された CCHF ウイルスの遺伝子の分子系統学的解析から、この地域には、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。同地域での 2001 年の流行は流行地に存在する 3 種類の CCHF ウイルスのうち、1966 年の分離株 (66012 株) と同じ系統に属するウイルスによることが明らかになった。また、66012 株と 2001 年の流行の原因ウイルスの S-RNA 遺伝子全長の配列の比較から、35 年間でウイルス遺伝子の変異がほとんど起きないことが明らかになった。

また、CCHF ウイルス中国分離株の S-RNA の塩基配列から得られる分子系統樹は、M-RNA の配列から得られるものと同様であったことから、型間で RNA 分節の入れ替えによる reassortant virus が容易には出現していないことを示唆する。

一方、2002 年に、ロシア、英国のグループが報告したアジア各国に存在する CCHF ウイルスの部分 M-RNA 遺伝子配列と中国分離株の M-RNA 遺伝子配列を NJ 法により分子系統学的解析を行った (図 2)。その結果、3 種類の中国の CCHF ウイルスは、ウズベキスタン型、パキスタン型、タジキスタン型にそれぞれ属し、ロシアのクリミア半島周囲のウイルスのとは異なる系統に属することが明らかになった。新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスの遺伝的安定度から考察すると、この地域には、過去に周辺国から交易に関連してウイルスが持ち込まれたため 3 種類のウイルスが存在するものと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.*, 40: 372-375

2. Saijo M, Suzutani T, Niikura M, Morikawa S, Kurane I.(2002): Importance of C-terminus of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase for maintaining thymidine kinase and acyclovir-phosphorylation activities. *J. Med. Virol.*, 6(3): 388-93.

3. 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.*, 40: 1587-1591

4. Saijo M, Yasuda Y, Yabe H, Kato S, Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S.(2002): Bone marrow transplantation in a child with Wiskott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACV(r)) herpes simplex virus type 1: emergence of foscarnet-resistant virus originating from the ACV(r) virus. *J Med Virol.* 68: 99-104.

5. Niikura, M., Takamura, S., Kim, G., Kawai, S., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Li, T-C., Takeda, N., and Yasutomi, Y. (2002): Chimeric recombinant Hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology*, 293, 273-280

6. 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*, 296: 159-164

7. Ikegami, T., Miranda, M.E.G., Calaor, A.B., Manalo, D.L., Miranda, N.J., Niikura, M., Saijo,

- M., Une, Y., Nomura, Y., Kurane, I., Ksiazek, T.G., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2002): Histopathology of natural Ebola virus subtype Reston infection in cynomolgus macaques during the Philippine outbreak in 1996. *Exp. Anim.*, 51: 447-55.
8. Saijo M, Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Morikawa S, Kurane I.(2002): Genotypic and phenotypic characterization of the thymidine kinase of ACV-resistant HSV-1 derived from an acyclovir-sensitive herpes simplex virus type 1 strain. *Antiviral Res.* 56: 253-62.
9. 森川 茂 (2002) :天然痘 化学療法の領域 (Antibiotics & chemotherapy) 18 (3):343 - 346
10. Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, M.E.G., Calaor, A.B., Hernandez, M., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2002): Development of an immunofluorescence Method for the Detection of Antibodies to Ebola Virus Subtype Reston by Use of Recombinant Nucleoprotein-expressing HeLa cells. *Microbiol. Immunol.*, 46: 633-638.
11. Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. (2003): Analysis of linear B-cell epitopes of the nucleoprotein of ebola virus that distinguish ebola virus subtypes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jan;10(1):83-7.
12. Tang, Q., Saijo, M., Han, L., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Xinjung, W., Kurane, I., and Morikawa, S. (2003) Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays. *J. Virol. Metho.*, 108: 111-116.
13. Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, M.E.G., Calaor, A.B., Hernandez, M., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2003): Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. *Epidemiology and Infection*, in press.
14. Maeda, A., Lee, B-H., Yoshimatsu, K., Saijo, M., Kurane, I., Arikawa, J. and Morikawa, S. (2003): The Intracellular Association of the Nucleocapsid Protein (NP) of Hantaan Virus (HTNV) with Small Ubiquitin-Like Modifier-1 (SUMO-1) Conjugating Enzyme 9 (Ubc9). *Virology*, 305: 288-297.
2. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
- 特許取得：
- 1) 特願 2001-111478 (平成 13 年 4 月 10 日出願)：エボラウイルスを認識するモノクローナル抗体
- 2) 特願 2001-314854 (平成 13 年 10 月 12 日出願)：クリミア・コンゴ出血熱ウイルスを認識するモノクローナル抗体
- 1) 3) 出願委託中：レストンエボラウイルスを認識するモノクローナル抗体
3. 学会発表
- 1) Maeda A, Hee LB, Yoshimatsu K, Saijo M, Kurane I, Arikawa J, Morikawa S. The intercellular association of the nucleocapsid protein (NP) of Hantaan virus (HTNV) with small ubiquitin-like modifier (SUMO-1) conjugating enzyme 9 (UBC9). 36th Joint working conference on viral diseases, June, 2002, Matsumoto
- 2) Saijo M, Tang Q, Morikawa S, Maeda A, Kurane I. Recent outbreak of Crimean-

- Congo hemorrhagic fever in China. 36th Joint working conference on viral diseases, June, 2002, Matsumoto
- 3) Morikawa S, Tang Q, Xinqin Z, Saijo M, Kurane I. Genetic diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolates in China. 12th International Congress of Virology, July, 2002, Paris
 - 4) Saijo M, Tang Q, Hay L, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever using a recombinant viral nucleoprotein. 12th International Congress of Virology, July, 2002, Paris.
 - 5) Maeda A, Lee HB, Yoshimatsu K, Saijo M, Kurane I, Arikawa J, Morikawa S. The nucleocapsid protein (NP) of hantaan virus (HTNV) integrated with small ubiquitin-related modifier (SUMO)-1 conjugating enzyme (UBC9). 12th International Congress of Virology, July, 2002, Paris.
 - 6) 池上徹郎, 新倉昌浩, 西條政幸, 前田秋彦, 緒方もも子, 倉根一郎, 吉川泰弘, 森川茂. エボラウイルスレストン株を特異的に検出する抗原捕捉 ELISA の開発. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2002 年 10 月, 札幌.
 - 7) 前田秋彦, Lee Byoung-Hee, 吉松組子, 西條政幸, 緒方もも子, 有川二郎, 倉根一郎, 森川茂. ハンタウイルスの核蛋白質 (NP) と small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) 結合酵素 (Ubc9) との結合. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2002 年 10 月, 札幌.
 - 8) 西條政幸, 森川茂, 前田秋彦, 緒方もも子, 倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱の抗原検出 ELISA による診断の有用性と問題点. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2002 年 10 月, 札幌.
 - 9) 西條政幸, 森川茂, 前田秋彦, 緒方もも子, 倉根一郎. 中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱の分子疫学的解析. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2002 年 10 月, 札幌.
 - 10) 西條政幸, 唐青, 森川茂, 前田秋彦, 倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱に対するリバビリンによる治療経験. 第 13 回抗ウイルス化学療法研究会, 2003 年 1 月, 津田沼.

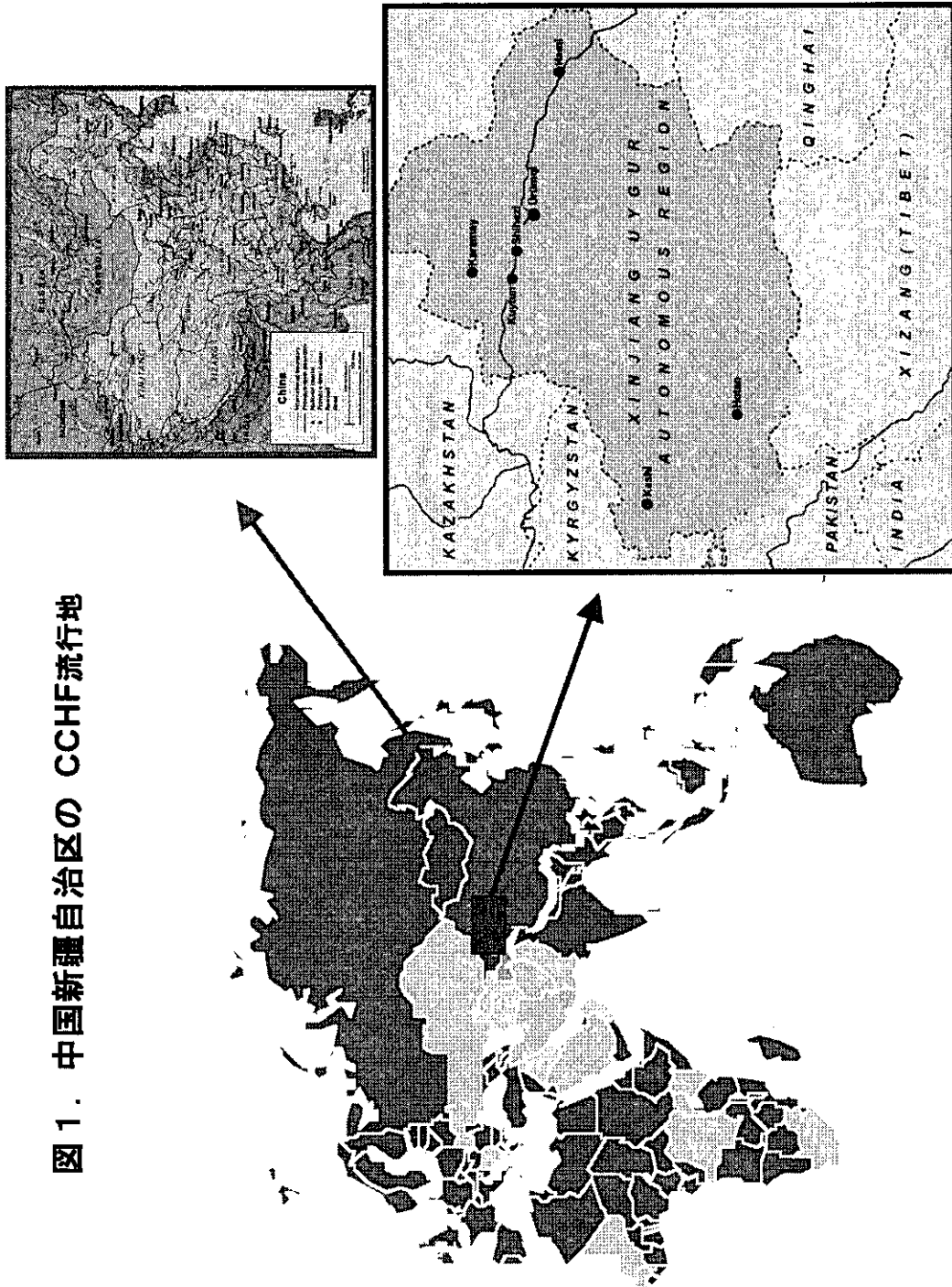


图 1. 中国新疆自治区の CCHF 流行地

表 1. 中国の CCHF ウイルス株の由来

分離株	分離年	分離地域	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

図2. CCHFウイルスの部分M-RNA配列による分子系統樹

