

と併せると、野生齧歯類は、多くの注意すべき寄生物を保有しており、これらの動物の取り扱いには十分注意する必要がある。

まだ、全ての検査結果がでてはいないが、今回の調査では、非常に感染性の強いあるいは致死的な感染症の病原体を保有している動物はほとんどなかった。しかし、今回、アメリカで齧歯類からサル痘がヒトに感染・流行した事例で、その感染源と考えられたアフリカヤマネと同じロットが日本に輸入された。このアフリカヤマネを輸入した業者は、本調査班が動物の購入を依頼した A 業者で、この A 業者は予め、調査班が購入予約をしていたアフリカヤマネを他のルートで販売していた。また、腎ハンタウイルスについても、エリアによって抗体陽性率に大きな差があり、汚染地域では、20～30%の動物が抗体を保有しているとされ、今回購入した動物がたまたま非汚染エリアで捕獲されたものであったということで、安全な動物であるということではない。

現在、国内発生のないペストについても、計上されたものだけでも、マダガスカル 1001～2500 人/年、モザンビーク 501～750 人/年、タンザニア 251～500 人/年、ザンビア 101～250 人/年とアフリカ諸国を中心として、多くの患者が発生している一方で、これらの国から多くの種類の野生齧歯類が愛玩用として検疫を受けずに輸入されている。今回の調査では、アフリカ産野生齧歯類として、3種類の動物を選択した。この中には、ペストの患者数が最も多いマダガスカル原産のゼブラマウスも含まれていた。しかし、アフリカ産齧歯類を感染源とするサル痘がアメリカで発生したことによる行政処置により、動物の輸入が止められ、今回は検査が出来なかった。今回、検査したアフリカヤマネやフトオアレチネズミは、ペストに対する抗体を保有はしていなかったが、1回の検査では、その実態を明らかに出来ないことや、実際、多くの患者が発生している国々から、野生齧歯類の輸入

を続けることは、いつ何時にでもペストが侵入する危険性が高い。

いずれにしても、輸入される動物の感染症に対する危険性の実態はこれまで明らかにされておらず、そのリスク評価も十分になされていない。今後も調査を継続し全容を明らかにする必要がある。

#### E. 結論

日本に本来存在しない血清型のレプトスピラが高率に特定の種類の齧歯類から分離されたことから、今後も調査を続行し、的確なリスク評価を行った上で、野生齧歯類の輸入に対し何らかの方策を立てる必要がある。

#### F. 研究危険情報

国内では、今まで確認されていない血清型のレプトスピラが輸入動物から分離された。

#### G. 研究発表

なし（「輸入げっ歯類のレプトスピラ保有状況と *gyrB* 解析による血清型推定法の開発」と言う表題で、研究協力者増澤俊幸が 2004 年春に開催される日本細菌学会に発表予定）

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

表 1 年間疾病別・国別患者数

1年あたりの患者総数	ベスト	野兎病	レプトスピラ	ハンタウイルス肺	腎症候性出血熱	リンパ球性脈絡髄膜炎
7501～10000					ロシア	
5001～7500	カザフスタン					
2501～5000			ブラジル		中国	
1001～2500	マダガスカル		中国、タイ、インド、カザフスタン、ロシア		フィンランド	
751～1000			フランス、ベルギー			
501～750	モザンビーク		キューバ			
251～500	タンザニア、マラウイ	フィンランド、スペイン	スロバキア、ハワイ、アメリカ、ニカラグア、ルーマニア		スウェーデン	
101～250	ベトナム、ザンビア	スウェーデン、チェコ、アメリカ、ハンガリー、ロシア、トルコ	ウクライナ、ニューカレドニア、オーストラリア、コスタリカ、グアドループ、レユニオン、イラン	アルゼンチン	韓国、ベルギー、ギリシャ	
76～100		セルビアモンテネグロ	ポルトガル、仏領ギアナ	チリ	ノルウェー、台湾	
51～75	コンゴ共和国		韓国、マレーシア、イタリア、ニュージールランド、タヒチ、ホンジュラス、バルバドス、ベネズエラ		ドイツ	
26～50	ナミビア、中国		シンガポール、イギリス、ドイツ、ラトビア、チエコ、ハンガリー、メキシコ、ドミニカ共和国	ブラジル、ハラグアイ、パナマ	スイス	
11～25	ペルー、ウガンダ	イタリア	オランダ、ポーランド、フィジー、北マリアナ諸島、エルサルバドル、エクアトル、アルゼンチン、アゾレス諸島、リトアニア	アメリカ	クロアチア、ウズベキスタン	
0.1～10	ジンバブエ、アメリカ、モンゴル、ラオス、エクアドル、ラオス、ブラジル、カザフスタン、インドネシア、ポリビア	ノルウェー、ドイツ、デンマーク、スロベニア、ポーランド、スロベニア	イスラエル、デンマーク、アイランド、スイス、エストニア、スロベニア、パラオ、ミクロネシア連邦、カナダ、グアテマラ	カナダ、ペルー、ポリビア、ウルグアイ	スロベニア、ハンガリー、ペラルーシ、香港、ブルガリア、エストニア、ラトビア、ボスニアヘルツェゴビナ	カナダ、アルゼンチン

表2 年間動物種別・国別輸入数

1年あたりの輸入頭数	ハム、モル、プシ・リス、 チンチラ以外の齧歯類 (2001～2002)	全ての齧歯類 (2001～2002)	ハムスター (2001～2002)	リス (2001～2002)	モルモット (2001～2002)	チンチラ (2001～2002)	プレーリードッグ (2001～2002)	鳥類 (1997～2002)	ウサギ (1997～2002)	フェレット (2001～2002)
10001～	アメリカ	オランダ、チエコ、 中国、アメリカ、 韓国	オランダ、チエコ、 韓国	中国			アメリカ	台湾、中国、 パキスタン、香港、 韓国、ベルギー、 オランダ、 マレーシア		アメリカ
7501～10000										ニュージーランド
5001～7500	パキスタン	パキスタン						フランス	オランダ	
2501～5000		タイ	アメリカ、タイ			オランダ		インドネシア、 ロシア、マリ、 ギニア、アメリカ		
1001～2500	中国、エジプト、オランダ	カナダ、 ニュージーランド、 フランス、 エジプト、	ニュージーランド、 フランス		カナダ			南アメリカ、 ミャンマー、 シンガポール、 タンザニア、 ベトナム、 イギリス、 モナコ	アメリカ	カナダ
751～1000		台湾	台湾					フィリピン		
501～750	トーゴ	トーゴ		カナダ						
251～500	カナダ、インドネシア	インドネシア		アメリカ			カナダ	ベルギー、ドイツ、 ニュージーランド、 チエコ、 ニカラガ、 オーストラリア、 メキシコ、		
101～250	フランス、レバノン、 ドイツ	レバノン、 マレーシア、ドイツ		オランダ	オランダ			カメルーン、 トーゴ、 ウズベキスタン、 カナダ、 アラブ首長国、 ウクライナ、タイ、 モザンビーク、 スリナム	チエコ、 中国、カナダ	チエコ
76～100				マレーシア	アメリカ	チエコ		ブラジル、 ブルネイ、 アルゼンチン	ドイツ	オランダ
51～75	ウクライナ	ウクライナ						パラグアイ、 マダガスカル、 ガイアナ	韓国	

表3 野生げっ歯類の種類、原産地、国内での流通状況

検査	和名	学名/英名	原産地	取り扱い業者数	価格
★	ピグミージェルボア (=バルチスタンコミットビネズミ)、 ミユビコミットビネズミ	<i>Salpingotulus michaelis</i>	アフリカ、中近東、 ロシア	5	¥9,800~19,800
	ザンナアフリカオニネズミ、アフリカオニネズミ	<i>Cricetomys gambianus</i>	アフリカ	4	¥29,000~29,800
★	アフリカヤマネ	<i>Grathiuus murinus=Claviglis murinus</i>	アフリカ	4	¥3,980~7,500
	コビトハツカネズミ、ピグミーマウス、 アフリカドワーフマウス、アフリカチビネズミ	<i>Mus minutoides</i>	アフリカ	1	
	オオミユビトビネズミ、グレーター(ミユビ)トビネズミ	<i>Jaculus orientalis</i>	アフリカ、中近東	3	¥8,900~12,800
	カイロゲマウス、カイロゲネズミ	<i>Acomys cahirinus=A.nesiotes</i> = <i>A.cineraceus=Mus cahirinus</i>	アフリカ、中近東	1	
	ヒメミユビトビネズミ、トビネズミ、アフリカトビネズミ、 ジェルボア、エジプトトビネズミ、サバクトビネズミ	<i>Jaculus jaculus=J.deserti=Mus jaculus</i>	北アフリカ、南西アジア	3	¥9,800
○	ゼブラマウス、アフリカンゼウラマウス、 ホシクサマウス	<i>Lemniscomys striatus</i>	セネガル、タンザニア、 モロッコ	3	¥4,000
	デブスナネズミ	<i>Psammomys obsus</i>	アフリカ、中近東	1	¥15,000
★	ファットテールジャービル、フトオアレチネズミ、 オフトアレチネズミ、マカロニマウス、 フトオスナネズミ	<i>Pachyuromys duprasi</i>	アフリカ	3	¥3,980~8,900
	フォレストラット(=オオバネズミ)、 アフリカオオバネズミ、ラッデオオバネズミ	<i>Uranomys ruddi</i>	アフリカ	1	
	ヨツユビトビネズミ	<i>Allactaga tetradactyla</i>	アフリカ	1	
○	コタケネズミ	<i>Cannomys badius</i>	ネパール東部、ビルマ、 タイ	6	¥15,000~29,800
	フィンレイソリス	<i>Callosciurus finlaysoni</i>	東南アジア	1	
	マレーリス	<i>Callosciurus sp</i>	東南アジア、中国	2	
	ミケリス、プレボストリス	<i>Callosciurus prevosti</i>	東南アジア	4	¥25,800~45,000
	ワキスジリス	<i>Callosciurus phayrei</i>	ミャンマー	1	
★	キタリス、エソリス、リス、ユーラシアリス、 ヨーロッパリス、ユーラシアアカリス	<i>Sciurus vulgaris orientalis</i>	シベリア、日本、朝鮮	3	¥13,800~19,800
★	シマリス、トラフネズミ、カラフトシマリス、リス、 シベリアシマリス、トラネズミ	<i>Tamias sibiricus</i>	ヨーロッパ、ロシア、 中国、日本	5	¥1,980~6,800
○	ステップレミング、ソウゲンタビネズミ	<i>Lagurus lagurus</i>	ウクライナ、モンゴル	0	
★	タイリクモモンガ、エゾモモンガ、 ヨーロッパモモンガ、シベリアモモンガ、 ユーラシアモモンガ、オオモモンガ	<i>Pteromys volans</i>	ヨーロッパ、ロシア、 中国、日本、朝鮮	4	¥12,800~19,000
	ダウリアハタリス	<i>Spermophilus dauricus</i>	中国北部、モンゴル、 ロシア	0	
	ヨーロッパオオヤマネ	<i>Glis glis</i>	ヨーロッパ、トルキスタン、 ロシア、イラン	3	¥18,000
	アメリカアカリス、アカリス、ホクベイアカリス	<i>Tamiasciurus hudsonicus</i> = <i>Sciurus vulgaris var.hudsonicus</i>	アメリカ	2	¥50,000
	アメリカモモンガ	<i>Glaucomys volans</i>	アメリカ	5	¥9,800~19,000
	オオミミトビネズミ	<i>Euchoreutes naso</i>	ユーラシア、北米	2	¥15,800
★	コロンビアジリス	<i>Spermophilus colombianus</i>	北米	2	¥25,000
	シリアアカリス			1	
	タイワンリス、ハイガシラリス、タカサコリス	<i>Callosiurus erythraeus taiwanensis</i>	台湾	2	
○	チビネズミ(チビコメネズミ?)	<i>Oryzomys minutus</i>	南米	1	
	トウブシマリス	<i>Tamias stictus</i>	北米	1	
	ドワーフバングマウス			1	
○	ハタリス(=ジリス類)	<i>Spermophilus spp.</i>		1	
	ホワイトシマリス			1	
	ホワイトリス	<i>Callosciurus finlaysoni</i>		1	
	メキシコジリス	<i>Spermophilus mexicanus</i>	北米	1	
	ヨーロッパカヤネズミ	<i>Micromys minutus</i>		2	
	ヨーロッパジェントリーヤマネ	<i>Scrdtvs.avellanarius.sp</i>	ヨーロッパ	1	
	ラオスシマリス			1	
★	リチャードソンジリス、ワイオミングジリス	<i>Spermophilus richardsoni</i>	北米	6	¥3,980~23,000
★	ジュウサンセンジリス	<i>Spermophilus tridecemlineatus</i>	北米	4	¥9,800~19,800

★ 検査した種類

○ 購入予定であったが入手できなかった種類

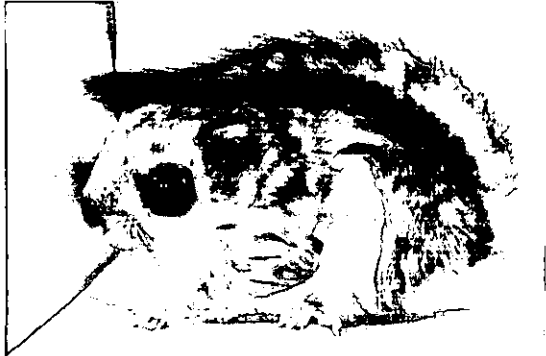
表4 野生齧歯類の和名、英名、原産国、検査数、購入状況

和名	学名/英名	原産国	購入先						
			A業者			B業者			
			匹数	輸出国	野生種/ 健康証	匹数	輸入日	輸出国	野生種/ 健康証
ビグミージェルボア	<i>Salpingotulus michaelis</i>	アフリカ、中近 東、ロシア	20	パキスタン	WC/あり	19			
アフリカヤマネ	<i>Graphiurus murinus=Clavigilis murinus</i>	アフリカ	0			10	5月30日	USA	WC/あり
フトオアレチネズミ	<i>Pachyeuromys duprasi</i>	アフリカ	5	エジプト	WC/あり	0			
キタリス、エゾリス	<i>Sciurus vulgaris orientalis</i>	シベリア、朝鮮	0			10	5月21日	中国	WC/あり
シマリス	<i>Tamias sibiricus lineatus</i>	ヨーロッパ、ロシ ア、中国	10	中国	WC/あり	10	6月12日	中国	WC/あり
タイリクモモンガ、 エゾモモンガ	<i>Pteromys volans</i>	ヨーロッパ、ロシ ア、中国、朝鮮	10	中国	WC/あり	10	6月12日	中国	WC/あり
コロンビアジリス	<i>Spermophilus columbianus</i>	北米	0			10	5月15日	USA	WC/あり
リチャードソンジリス	<i>Spermophilus richardsonii</i>	北米	10	USA	WC/あり	10	5月13日	USA	WC/あり
ジュウサンセンジリス	<i>Spermophilus tridecemlineatus</i>	北米	10	USA	WC/あり	0			
9種類			65			79			

脚注：野生種WC



アフリカヤマネ (*Graphiurus murinus=Claviglis murinus*) イゾリス (*Sciurus vulgaris orientalis*)



タイリクモモンガ (*Pteromys volans*)



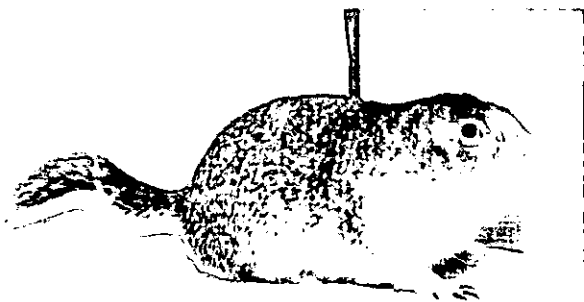
リチャードソンズリス (*Spermophilus richardsonii*)



シマリス (*Tamias sibiricus lineatus*)



ジユウサンセンズリス (*Spermophilus tridecemlineatus*)



コロンビアズリス (*Spermophilus columbianus*)



フトアレチネズミ (*Pachyruromys duprasi*)



ピクミーゼルホア (*Salpingotulus michaelis*)



ゼブラマウス (*Lemiscomys barbarus*)



チビネズミ (*Oryzomys minutus?*)



コタケネズミ (*Cannomys badius*)



ハタリス (*Spermophilus spp*)

## Bウイルスの潜伏感染に関する分子疫学的研究 輸入カニクイザル・三叉神経節潜伏Bウイルスの動態

分担研究者 本藤 良 日本獣医畜産大学獣医学部 教授  
協力研究者 落合由嗣・植田富貴子 日本獣医畜産大学獣医学部 助手・助教授  
大屋智香・吉川泰弘 東京大学大学院農学生命科学研究科 院生・教授

### 研究要旨

Simian herpes B virus(SHBV)感染・輸入カニクイザル左右三叉神経節(TG:各1/2)11検体より抽出したDNAを検体として、SHBV-Us内に局在し株間で変動するE領域(421bp)をPCR増幅領域とした、PCR-Microplate・Hybridization(P-M・H)法で潜伏SHBVゲノムコピー数を定量化し、その動態を比較した。

1) 10倍段階希釈した1pg~100agのB-pDNAを鋳型として、P-M・H法を行うことにより、蛍光単位のSHBVゲノムコピー数に対する標準曲線が得られ、定量が可能であった。本法によるSHBVゲノムコピー数の検出限界(感度)は、約102コピーであった。

2) 標準曲線に基づいて、各TG抽出DNA中のSHBVゲノムコピー数を定量した。この結果、SHBV感染・輸入カニクイザルTGにおいて、約104.8~106.6コピーのSHBVゲノムの局在で潜伏感染が起り得ていることが示唆された。

### A. 研究目的

Simian herpes B virus(SHBV)は、初感染後、後根神経節に潜伏感染を起こす。三叉神経節(TG)潜伏SHBVが再活性化すると、ウイルスが唾液中に排出されヒトへの感染源となることで重要である。これまでに、SHBV-Us内のC領域(641bp)およびE領域(421bp)のPCR増幅領域には株間で変動する領域が局在することを明らかにした。また、PCR-Microplate・Hybridization(P-M・H)法による特異SHBVゲノムの検出と同定法を開発し、SHBV感染・輸入カニクイザルの三叉神経節(左右)には35%から50%の割合でウイルスが潜在していることを明らかにしてきた。

今年度は、これまでに得られた成績を基にして、SHBV感染カニクイザルのTGにおける潜伏SHBVゲノムコピー数をP-M・H法で定量化し、TG潜伏SHBVの動態を知ることが目的として解析を試みた。

### B. 研究方法

1. 検体: 解析に用いた検体の概要を表1. に示した。中国から輸入したカニクイザルの内、SHBVに対する抗体が陽性で感染の明らかな

サルを含む、A群(10頭)およびB群(20頭)からB群(♂11頭、♀9頭)を選択し、その左右三叉神経節から潜伏SHBVゲノムの検出された11検体の抽出DNAを対象にした。また、対象サルの末梢血・パフィコートでのP-M・H法による解析ではSHBVゲノムが検出されないことからウイルス非活性化個体群(図1)と考えられた。

2. P-M・H法のターゲット領域: 用いたターゲット領域を図2. に示した。SHBVゲノムの検出に高い特異性を持つ、SHBVゲノム上のUs領域内に局在するC(641bp)とE(421bp)領域を用いた。単純ヘルペスウイルス(HSV)の増幅では、1型、2型を共通して検出できる、DNAポリメラーゼをコードする領域の330bpをターゲットにして、その特異性を確認した。

3. P-M・H法による定量化: 定量法は図3. に示した本藤らの方法に準じて実施した。PCRによるゲノムの検出にはE領域を、ピオチン標識・DNAプローブとして、HSVと相同性が低く特異性の高いC領域のPCR増幅DNA断片を用いた。コピー数既知の標準株(SHBV・SMHV株のUs4からUs6を含む2.6kbpプラスミドDNA)と検体の各希釈DNAを鋳型として、P-M・Hを同時に実施し、得られた標準曲線に対比して、コピー数を概算した。



○倫理面への配慮：実験に用いたカニクイザルの解剖には麻酔による安楽死で配慮した。

## C. 研究結果

### 1. P-M・H法による定量化

コピー数既知の標準株DNA (1pg~100ag) および検体 (B16R) の各希釈DNAを鋳型として、P-M・H法による解析を試みた。その結果を図4. に示した。標準株DNAの成績から、蛍光単位のSHBVゲノムコピー数に対する標準曲線を得ることができた。その標準曲線に検体での蛍光単位を対比することにより、検体中のSHBVゲノムコピー数を概算することが可能であった。また、P-M・H法によるSHBVゲノムコピー数の検出限界(感度)は、約102コピーであった。

### 2. 輸入カニクイザル三叉神経節における潜伏SHBVの動態

SHBV感染・輸入カニクイザル左右三叉神経節(TG:各1/2)11検体より抽出したDNAを検体として、潜伏SHBVの動態をP-M・H法で解析した。その結果を表2. に示した。解析対象とした抗体陽性のSHBV感染・輸入カニクイザルB群のTGにおいて、約104.8~106.6コピーのSHBVゲノムの局在で潜伏感染が起り得ていることが示唆された。

以上、SHBVは、初感染後、後根神経節に潜伏感染を起こす。三叉神経節潜伏SHBVが再活性化することにより、感染性のウイルス粒子が唾液中に排出され、ヒトへの主要な感染源となることで重要である。本研究において、SHBV潜伏感染の状態にあるカニクイザルの三叉神経節に局在するSHBVゲノムのコピー数を明らかにしたことは、潜伏感染SHBVの再活性化によるヒトへの感染様式を解析する上で重要な基礎的知見となり得るものと考えられる。

## D. 考察

SHBV感染ザルの多くは不顕性感染の経過をとり、後根神経節に潜伏感染を起こす特性がある。その潜伏ウイルスがストレスや免疫低下などの要因により再活性化を繰り返す。この過程において、三叉神経節に潜伏したウイルスの再活性化により、口腔内粘膜、唾液、結膜などからウイルスが分泌され、咬傷や引っかき傷などの接触感染がヒトへの主要感染源となり得ることで重要である。感染ザルでは軽症であるが、ヒトに感染すると致死的な脳脊髄炎症状を引き

起こし、致命率は約50%とされている。

初感染後の三叉神経節への潜伏感染に関する解析により、SHBV感染カニクイザルの両側および片側による三叉神経節での潜伏感染が35%から50%潜在することが明らかにされた(厚生労働科学研究費・新興再興感染症研究事業:吉川班・平成14年度報告書)。この事実は、SHBVに感染したサルで三叉神経節に潜伏感染を起こし得る確率は、単純計算で35%から50%であると推測される。これより、三叉神経節に潜伏感染を起こしているサルで、ヒトへの感染源となり得る確率は多くても約50%と推測されることになる。しかしながら、その潜伏ウイルスの再活性化が起り得なければウイルスは分泌されないため、ヒトへの感染源にはなり得ないものと考えられる。従って、三叉神経節・潜在SHBVの動態を把握することは、その再活性化について解析する上で重要な知見となる。

今年度は、これまでに得られた成績を基にして、SHBV感染カニクイザルの三叉神経節における潜伏SHBVゲノムコピー数をP-M・H法で定量化し、三叉神経節潜伏SHBVの動態を解析した。その結果、SHBV感染・輸入カニクイザルの三叉神経節において、約104.8~106.6コピーのSHBVゲノムの局在で潜伏感染が起り得ていることを明らかにした。このことは、今後の潜伏感染SHBVの再活性化によるヒトへの感染様式およびリスク評価を解析する上で重要な基礎的知見となり得るものと考えている。今後さらに症例を蓄積して、感染の様式に関する解析を進める予定である。

## E. 結論

PCR-Microplate・Hybridization(P-M・H)法で潜伏Simian herpes B virus(SHBV)ゲノムコピー数を定量化し、その動態を比較解析した。

1. P-M・H法によるSHBVゲノムコピー数の検出限界は、約102コピーであった。

2. SHBV感染・輸入カニクイザルの三叉神経節において、約104.8~106.6コピーのSHBVゲノムの局在で潜伏感染が起り得ていることを明らかにした。

## F. 健康危険情報

諸外国における本感染症のヒトでの発生状況を見ると、現在までに少なくとも40数例が報告されている。そのなかには潜伏ウイルスの再活性化とみられる再発症例や2次感染例も含まれて

いる。現在まで、本邦での感染症の発生例は報告されていないが、ウイルス感染等の実験にサル類の使用が増加していることに加えて、最近ではペットや動物園などの展示サルからヒトへの感染なども懸念されていることで、その類別診断法の確立と感染様式の解析が重要である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Chika OYA, Yoshitsugu OCHIAI, Takashi TAKANO, Yojiro TANIUCHI, Fukiko UEDA, Yasuhiro YOSHIKAWA, Ryo HONDO.  
Specific detection and identification of herpes B virus by a PCR microplate hybridization assay.  
J. Clin. Microbiol. (in press).
- 2) Chika OYA, Yoshitsugu OCHIAI, Takashi TAKANO, Yojiro TANIUCHI, Akikatsu FUJIMA, Fukiko UEDA, Yasuhiro YOSHIKAWA, Ryo HONDO.  
Epidemiological study on the herpes B virus infection in seropositive cynomolgus monkeys by a PCR microplate hybridization assay.  
J. Clin. Microbiol. (submitted)

### 2. 学会発表

- 1) 小柳寿文、大屋智香、落合由嗣、植田富貴子、吉川泰弘、本藤良。Bウイルス感染のDNA診断と分子疫学に関する基礎的研究(5)輸入カニクイザルにおける三叉神経節潜伏Bウイルスの動態。  
第137回日本獣医学会発表予定(2004)

抗体陽性カニクイザル・バファイアコートからのBウイルスゲノムの検出  
 2) C領域・ピオチン標識DNAプローブによる microplate-hybridization

図1.

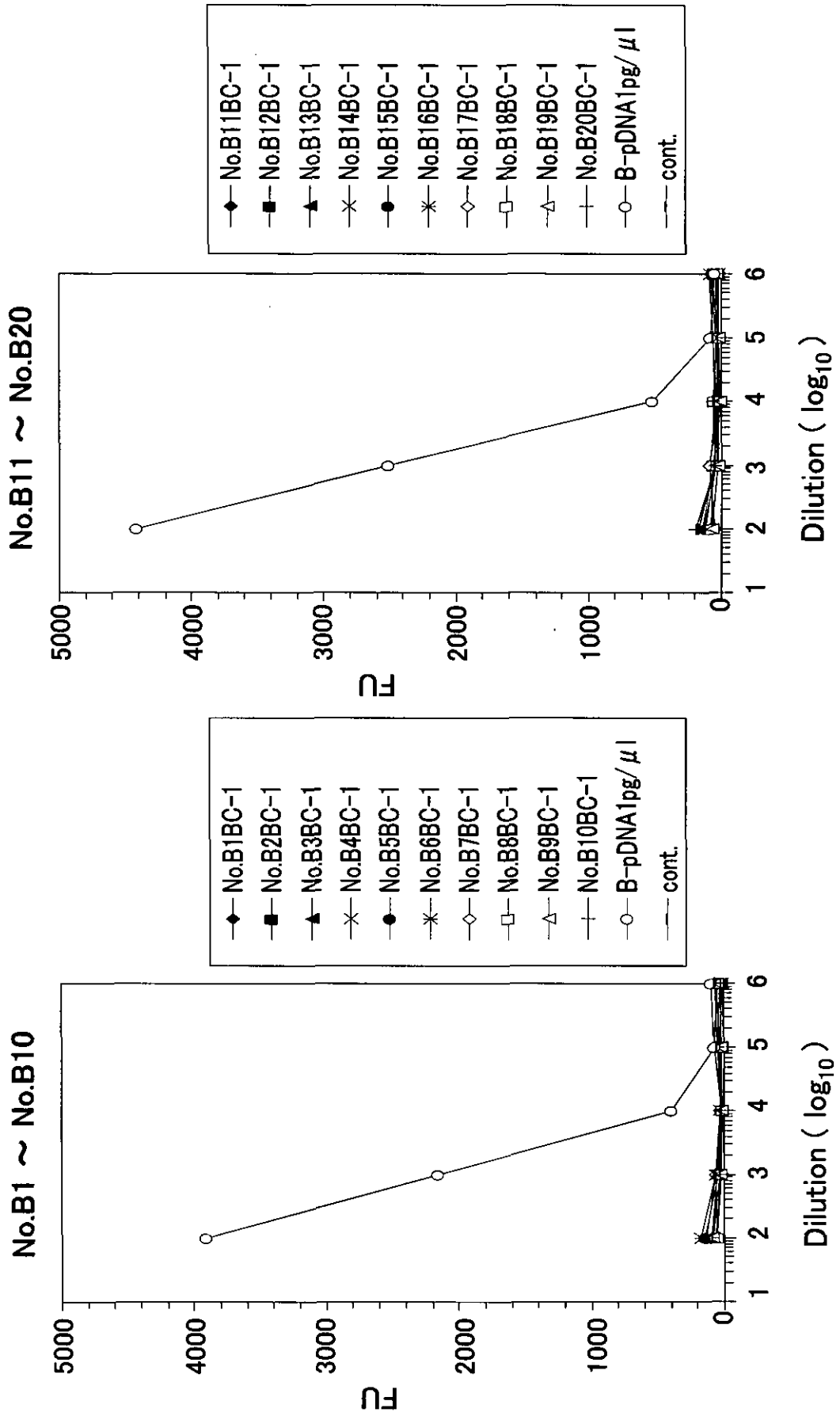
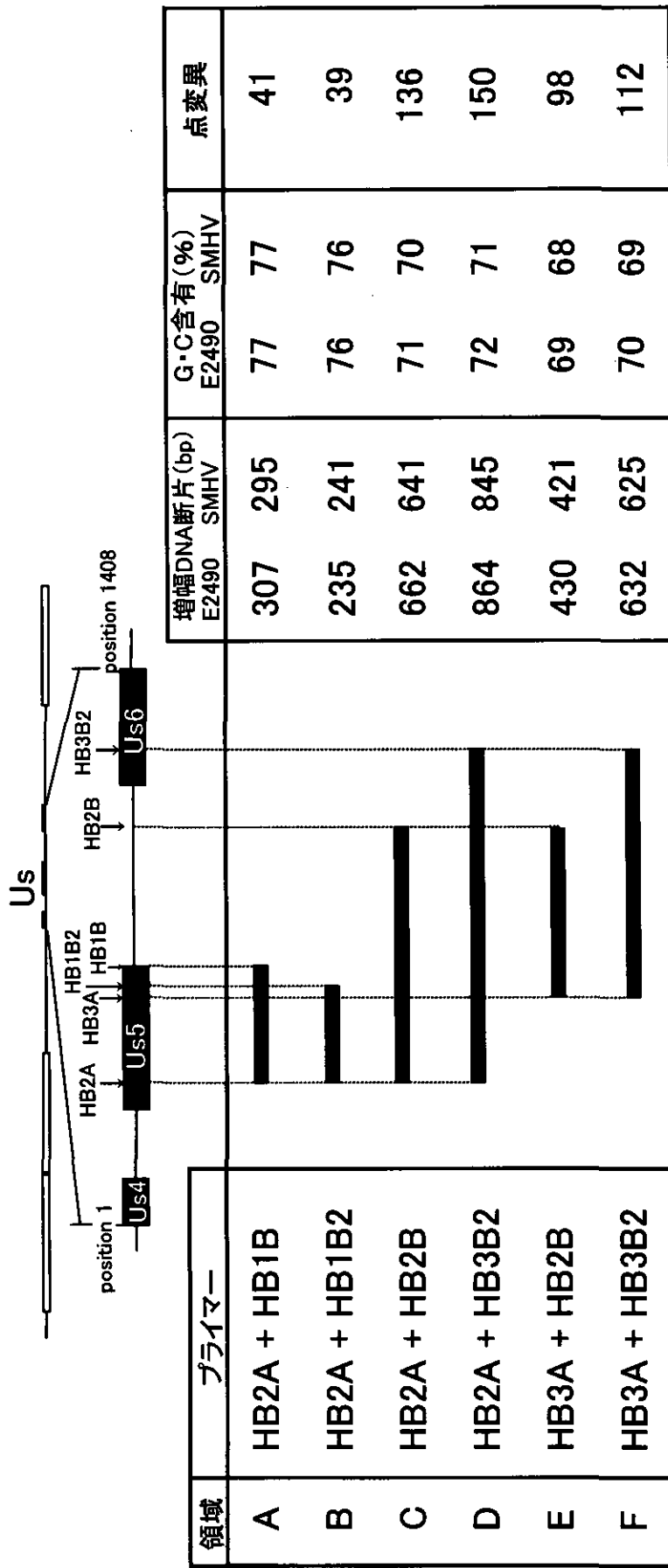


図2.

PCR - Microplate-hybridization 法のターゲット領域

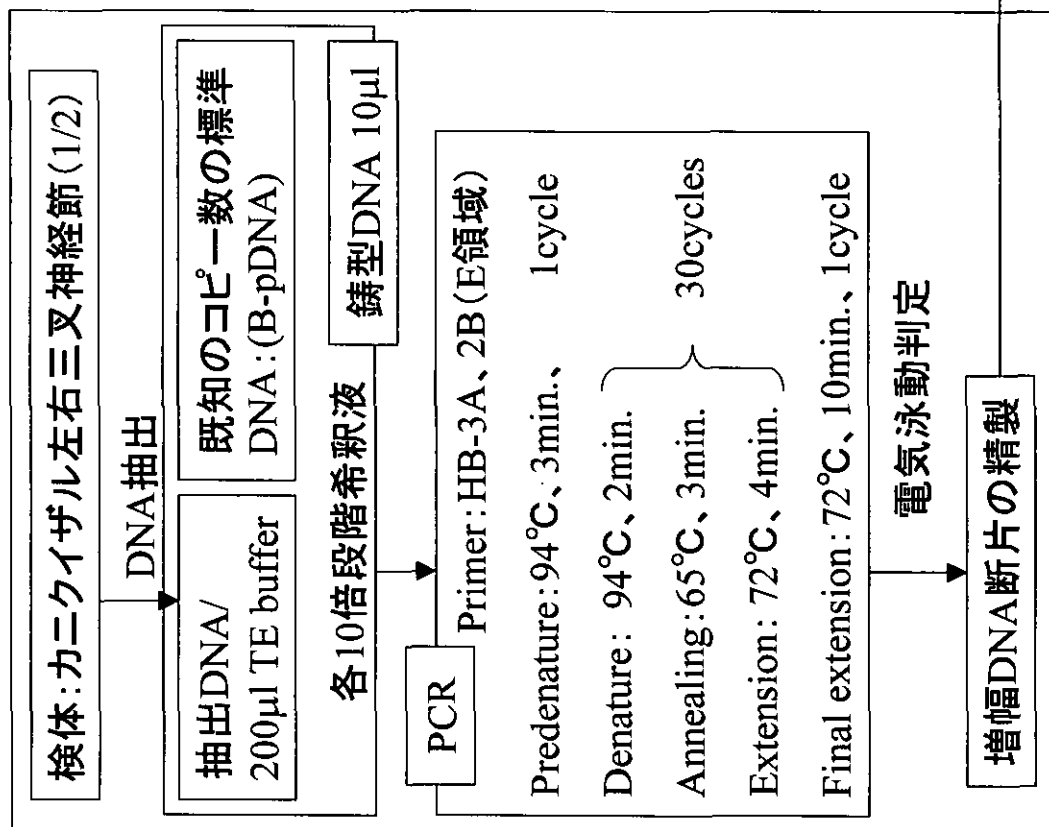


Smith et al., *J. Virol.* 72, 1998

<プライマー配列>

- HB2A : 5'-CCGGCTCGCCACGGACACCA-3'
- HB3A : 5'-CCTGCACCGGTGCTGTAGACG-3'
- HB1B : 5'-TCGGGGTACCGGTAGACG-3'
- HB1B2 : 5'-CGTCTACAGCACCGGTGCAGG-3'
- HB2B : 5'-ATCGCGCGGACCGATCGT-3'
- HB3B2 : 5'-TCAGGACCGCTCCACCGCA-3'

### 図3. 1. 定量PCR法



### 2. microplate hybridization法

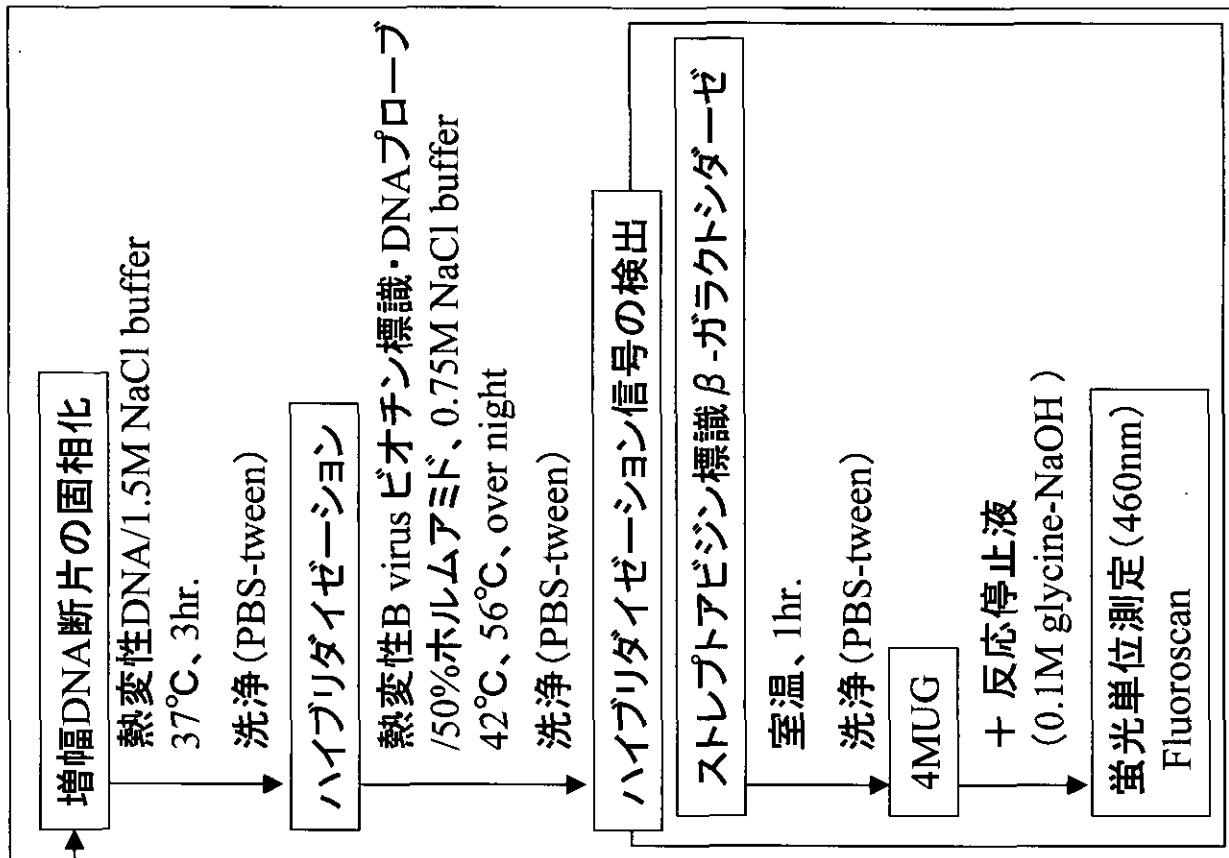
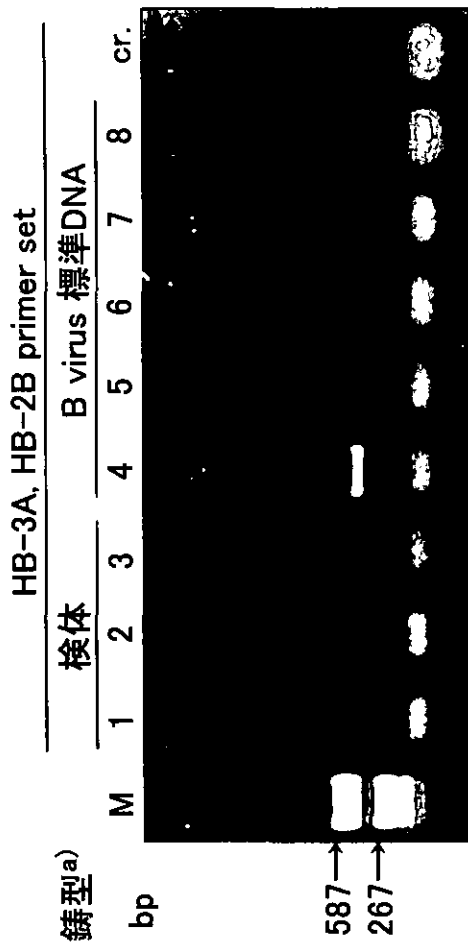


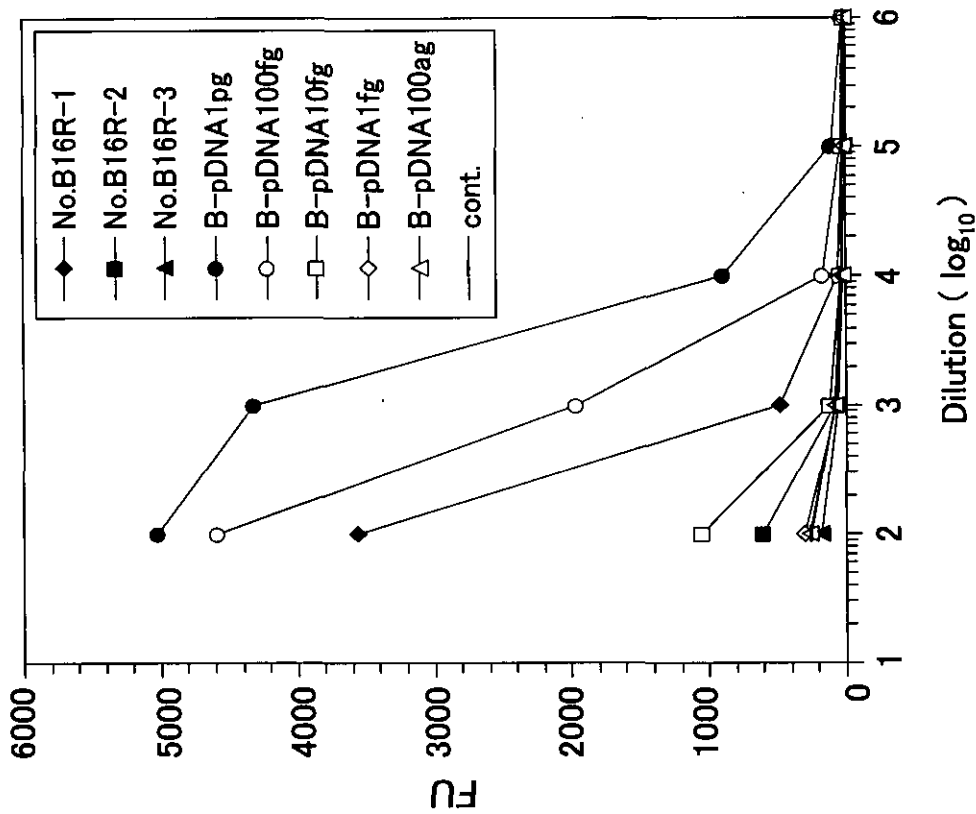
図4.

カニクイザル三叉神経節における潜伏Bウイルスゲノムコピー数の定量法

1) 定量PCR



2) Microplate hybridization



Probe; B virus C region biotin-labeled DNA  
 probe Hybridization temperature : 56°C

a) 検体; No.B16R-TG抽出DNA・10倍段階希釈液

( 1; 10<sup>-1</sup>, 2; 10<sup>-2</sup>, 3; 10<sup>-3</sup> )

B virus 標準DNA; pBlueSK+2.6kbSMH 10倍段階希釈液  
 ( 4; 1pg, 5; 100fg, 6; 10fg, 7; 1fg, 8; 100ag )

M; サイズマーカー, cr.; PCR-control,

b) PCR condition: 1) predenaturation 94°C, 3分  
 2) denaturation 94°C, 2分 } 30cycles  
 3) annealing 65°C, 3分  
 4) extension 72°C, 4分  
 5) final extension 72°C, 10分

表1. 抗体陽性カニクイザルの三叉神経節における潜伏Bウイルスゲノムの保有状況

検体 (A群:10頭, B群:20頭)

No.	ID	sex	weight (kg)	left TG	right TG
A1	C933697	M	4.67	-	-
A2	C938179	M	4.99	+	+
A3	C948031	M	4.01	-	-
A4	C943501	M	3.85	-	-
A5	C943901	M	4.22	-	-
A6	C937954	F	3.59	+	-
A7	C937992	F	3.24	-	+
A8	C950488	F	2.96	-	-
A9	C950654	F	3.53	-	+
A10	C967140	F	3.25	-	+
B1	96C0819	M	3.65	-	-
B2	96C0527	M	2.90	+	+
B3	97C0123	M	3.05	-	+
B4	96C0389	M	2.45	-	+
B5	97C0633	M	2.50	-	-

No.	ID	sex	weight (kg)	left TG	right TG
B6	96C0129	M	3.30	-	-
B7	96C0627	M	3.20	-	-
B8	96C0743	M	2.85	-	-
B9	96C0115	M	3.10	+	+
B10	96C0558	F	3.00	-	-
B11	96C0576	F	3.15	-	-
B12	96C0220	F	2.90	-	+
B13	96C0304	F	2.60	-	-
B14	96C0384	F	2.60	+	+
B15	96C0306	F	2.35	-	-
B16	96C0296	F	2.65	+	+
B17	C965546	F	3.00	-	-
B18	C967547	F	2.55	-	-
B19	C965285	M	3.05	-	-
B20	C965411	M	3.25	-	-

表2.

カニクイザル三叉神経節における潜伏Bウイルスゲノムコピー数

No.	ID	sex	body weight (kg)	Right TG	Left TG
B2	96C0527	M	2.90	$10^{5.6}$	$10^{5.8}$
B3	97C0123	M	3.05	$10^{5.3}$	$<10^2$
B4	96C0389	M	2.45	$10^{6.2}$	$<10^2$
B9	96C0115	M	3.10	$10^{4.9}$	$10^{6.4}$
B12	96C0220	F	2.90	$10^{4.8}$	$<10^2$
B14	96C0384	F	2.60	$10^{5.9}$	$10^{5.2}$
B16	96C0296	F	2.65	$10^{6.3}$	$10^{6.6}$

a) copies / TG



## 輸入動物が媒介する動物由来感染症の実態把握及び防御対策に関する研究

### 「アルゼンチン出血熱の血清診断法の開発」

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)  
Victor Romanowski (アルゼンチンラプラタ国立大学)

研究要旨：一類感染症に分類されるエボラ出血熱、マールブルグ病、ラッサ熱、クリミア・コンゴ出血熱の実験室診断法の開発を昨年度までの研究で行った。南米には、ラッサ熱ウイルスに近縁なアレナウイルス科に属し、レベル4病原体に分類されるフニン (Junin) ウイルス、マチュポ (Machupo) ウイルス、ガナリト (Guanarito) ウイルス、サビア (Sabia) ウイルスによるアルゼンチン出血熱、ボリビア出血熱、ベネズエラ出血熱、ブラジル出血熱があり、総称して南米アレナウイルス出血熱と呼ばれる。今年度は、アルゼンチン出血熱の血清診断法を開発した。

#### A. 目的と意義：

南米アレナウイルス出血熱 (アルゼンチン出血熱、ボリビア出血熱、ベネズエラ出血熱、ブラジル出血熱) は、ラッサ熱と類似したウイルス性出血熱で、本研究班で対象とする感染症の中で最も重要な感染症の一つである。これらの原因ウイルスは、アレナウイルス科の新世界アレナウイルスのフニン (Junin) ウイルス、マチュポ (Machupo) ウイルス、ガナリト (Guanarito) ウイルス、サビア (Sabia) ウイルスで、いずれもレベル4に分類される。このため、BSL4実験室が稼働していない日本ではウイルス培養が出来ず、これまで診断体制が全く整備されていない。本研究では、アルゼンチン出血熱の原因であるフニンウイルスの核蛋白 (NP) を組換え蛋白として発現精製し、血清診断法を開発することを目的とした。

#### B. 材料と方法：

##### 1) フニンウイルス NP の精製：

アルゼンチン、ラプラタ大学より分与されたフニンウイルス NP 発現組換えバキュロウイルス感染昆虫細胞からの組換えフニンウイルス NP の精製を行った。これまでの、ラッサウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎 (LCM) ウイルスの組換え NP の精製の経験から、組換

えアレナウイルス NP は、NP40 で可溶化できず、高濃度の Urea でのみ可溶化できることが判明しているため、1% NP40 処理した細胞の不溶性分画を 1M 毎に Urea 濃度をあげて超音波処理した可溶分画を SDS-PAGE により解析して、至適精製法を検討した。

##### 2) 血清：

ウサギ免疫血清は、それぞれ精製組換えラッサウイルス、LCM ウイルス NP、フニンウイルス NP を Inject Alum をアジュバントに用いて4回免疫して作製した。患者血清は、ラッサ熱患者血清 (CDC および東大医科研より分与)、アルゼンチン出血熱血清 (ラプラタ大学より分与) を用いた。

##### 3) ELISA：

それぞれ精製組換えラッサウイルス、LCM ウイルス NP、フニンウイルス NP を抗原に用いて IgG-ELISA を行った。いずれも、ポリヘドリン遺伝子をノックアウトしたバキュロウイルス感染細胞から、同様に調整した抗原を陰性抗原として用い、NP 抗原コートウェルの OD<sub>405</sub> から陰性抗原の OD<sub>405</sub> を引いた値を算出し、Net OD<sub>405</sub> とした。

#### C. 結果：

##### 1) フニンウイルス NP の精製：

組換えバキュロウイルス感染細胞からの組

換えフニンウイルス NP の精製を検討した結果、組換えフニンウイルス NP は、1% NP40 存在下で不溶性で 2M Urea 存在下でも大部分が不溶性であった。3M Urea 以上の濃度では徐々に可溶化できた。また、6M Urea では大部分が可溶化できることが明らかになった。この性質は、ラッサウイルスや LCM ウイルスの組換え NP が 6M Urea 存在下でも不溶性で、8? 10M Urea 存在下で可溶化できるのと比べて異なっていた。大部分の昆虫細胞由来蛋白は、1% NP40 による処理と 2M Urea による処理で可溶化できるため、これらの前処理のあと 6M Urea 処理により 95%純度の組換えフニンウイルス NP が精製できた (図 1)。組換えラッサウイルス、LCM ウイルス NP は、1% NP40 による処理と 2M Urea による処理後に 8M Urea 処理により精製した。

## 2) ELISA :

精製した組換えラッサウイルス、LCM ウイルス NP、フニンウイルス NP を抗原に用いて IgG-ELISA を行った ELISA を行った結果、抗ラッサウイルス NP ウサギ抗体は、LCM ウイルス NP に対しては、ラッサウイルス NP に対して 1/4 から 1/32 の抗体価を示し強く交叉反応したが、フニンウイルス NP とは、ラッサウイルス NP に対して 1/512 から 1/1024 以下の抗体価しか示さず殆ど抗原性に交叉が見られなかった。抗 LCM ウイルス NP ウサギ抗体は、ラッサウイルス NP に対しては、LCM ウイルス NP に対して 1/16 の抗体価を示し強く交叉したが、フニンウイルス NP とは、LCM ウイルス NP に対して 1/2048 以下の抗体価しか示さず殆ど抗原性に交叉が見られなかった。一方、抗フニンウイルス NP ウサギ抗体は、フニンウイルス NP に対してラッサウイルス NP、LCM ウイルス NP のいずれに対しても 1/32 の抗体価を示し強く交叉した (表 1)。次に、ラッサ熱患者血清、アルゼンチン出血熱患者血清を用いて同様に ELISA を行った結果、ラッサ熱患者血清 4 検体は、フニンウイルス NP とは反応しなかったが、LCM ウイルス NP とは、ラッサウイルス NP に対して 1/64 の抗体価を示しやや交叉した。一方、アルゼンチン出血熱患者血清 2 検体は、フニンウイルス NP としか反応しなかった (表 2)。

## D. 考察 :

フニンウイルスは、マチュポ、ガナリト、サビアウイルスと共に、アレナウイルス科の新世界グループの系統 B に属し、2 分節からなる一本鎖の (-) 鎖 RNA をゲノムとするエンベロープウイルスである。ウイルス構造蛋白には、GP (G1, G2), NP, L 蛋白があり、最も多量に含まれるのが核蛋白である NP である。ウイルスは野生齧歯類を宿主動物とし、持続感染動物の血液、体液、尿中に排泄され、ヒトへの感染源となる。アルゼンチン出血熱は、毎年、穀物の収穫期に outbreak が報告されていて、流行地が首都ブエノスアイレス近郊であるため、輸入感染症としての危険性は、他の南米アレナウイルス出血熱のポリビア出血熱、ベネズエラ出血熱、ブラジル出血熱と比べて高いと考えられる。

我々は、既にラッサウイルスと LCM ウイルスの NP を組換え蛋白として種々の系で発現し、血清診断法を開発している。ラッサウイルスと LCM ウイルスは、旧世界グループのアレナウイルスに属し互いに近縁であるため抗原性の交叉が強く、血清診断には注意を要する。しかし、両ウイルスの NP 抗原に対する反応の強さを比較することにより、どちらのウイルスに感染したかを特定できる。一方、本研究によって、1) 新世界アレナウイルスと旧世界アレナウイルスは、抗体によっては交叉する (特に、新世界アレナウイルスであるフニンウイルス NP に対するウサギ高度免疫血清が旧世界アレナウイルスであるラッサウイルスや LCM ウイルスの NP と強く交叉した)。2) それぞれのウイルスによる患者血清では交叉が若干認められることがあるが、それほど強くはないことが明らかとなった。これらの結果から、ラッサウイルス、LCM ウイルス、フニンウイルスの NP に対する反応性を比較することにより、いずれのウイルスに対する抗体であるかを特定できるため、アルゼンチン出血熱の疑いがある検体の血清診断は可能であることが明らかになった。

今後の課題として、それぞれのウイルスの NP の抗原性の交叉する部位を明らかにして、それぞれのウイルス特異的な組換え NP を発現精製した ELISA を開発する必要がある。また、ELISA 法では原理的に非特異反応を皆無

にすることができないため、フニンウイルス NP を発現した HeLa 細胞による蛍光抗体法による血清診断を作製する必要がある。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.* 10(1):83-7.
- 2) 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. *Journal of Virological Methods,* 108: 111-116.
- 3) 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,* 130(3):533-9.
- 4) Tang Q, Saijo M, Zhang Y, Asiguma M, Dong T, Han L, Shimayi B, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2003) A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever diagnosed with recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems. *Clinical and Diagnostic Laboratory immunology* 10(3):489-91.
- 5) 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.
- 6) 森川 茂 (2003) : ラッサウイルス 日本臨床 61 巻増刊号 3 (通巻 821 号) 539? 543
- 7) 森川 茂 (2003) : フィロウイルス 日本臨床 61 巻増刊号 3 (通巻 821 号) 544? 5
- 8) 森川 茂 (2003) : マールブルグ病、総合臨床 (増刊 : 感染症診断・投薬ガイド) Vol 52, 601-604
- 9) 森川 茂 (2003) : ウイルス性出血熱のその検査、モダンメディア、第 49 巻第 4 号、103-109
- 10) Ikegami, T., Niikura, M., Saijo, M., Miranda, M.E., Calaor, A.B., Hernandez, M., Acosata, L.P., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2003) Antigen-capture Enzyme-linked Immunosorbent Assay that specifically detects Reston Ebola Virus nucleoprotein. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.,* 10: 552-557
- 11) Lee BH, Yoshimatsu K, Maeda A, Ochiai K, Morimatsu M, Araki K, Ogino M, Morikawa S, Arikawa J. (2003) : Association of the nucleocapsid protein of the Seoul and Hantaan hantaviruses with small ubiquitin-like modifier-1-related molecules. *Virus*

- Res., 98(1):83-91.
- 12) T. Sakamoto, H. Ushijima, S. Okitsu, E. Suzuki a, K. Sakai, S. Morikawa, and W. E. G. Muller (2003) : Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and reporter gene. J. Virol. Meth. 114 159-166
  - 13) 森川 茂(2004):ウイルス性出血熱、アニムス、第9巻第1号、15-20
  - 14) Nikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Saijo, M., Kurane, I., and Morikawa, S. (2004): Modification of Endothelial Cell Functions by Hantavirus : Extension of TNF-alpha-induced hyper-permeability of hantavirus-infected endothelial cell monolayers. Arch. Virol. in press
  - 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003年10月, 京都.
  - 4) 板村繁之、二宮愛、西藤岳彦、森川茂、西條政幸、小田切孝人、倉根一郎、田代真人. RT-PCR法による重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスの検出感度の検定. 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003年10月, 京都.
  - 5) 西條政幸、森川茂、前田秋彦、倉根一郎. 急性期クリミア・コンゴ出血熱患者におけるウイルス血症と液性免疫応答. 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003年10月, 京都.
  - 6) 鈴木映子、岩坂正和、上野照剛、林京子、巽正志、森川 茂、沖津祥子、牛島廣治. HIV-1の cell to cell fusionにおける gp41-mediated fusion. 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003年10月, 京都.

## 2. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得:該当なし

## 3. 学会発表

- 1) 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
- 2) 板村繁之、森川茂、田代真人. 重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスの感染性とゲノムの不活化. 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003年10月, 京都.
- 3) 森川茂、板村繁之、西藤岳彦、西條政幸、小田切孝人、倉根一郎、田代真人. 重症急性呼吸器症候群(SARS)の血清診断法.