

- 日本ウイルス学会、横浜(2004, 11)
- 19) Kariwa H, Hagiya T, Miyamoto H, Lokugamage K, Lokugamage N, Tachi A, Tanikawa Y, Iwasa MA, Araki K, Ivanov LI, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Diversity of hantaviruses circulating in Far East Russia. The 40th Annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program. Kyoto, Japan. 2004, December
- 20) Lokugamage K, Kariwa H, Lokugamage N, Miyamoto H, Iwasa MA, Hagiya T, Araki K, Tachi A, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Genetic and antigenic characterization of Chinese hantavirus isolates related to Amur and Far East genotypes. The 40th Annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program. Kyoto, Japan. 2004, December
- 21) Goto A, Yoshii K, Obara M, Ueki T, Kariwa H, Takashima I. Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion. The 40th Annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program. Kyoto, Japan 2004, December
- 22) Yoshii K, Hayasaka D, Goto A, Kawakami K, Konishi E, Kariwa H, Takashima I. Establishment and application of packaging system of flavivirus replicon RNA into single-round infectious particles. The 40th Annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program. Kyoto, Japan 2004, December
- 23) Shirato K, Miyoshi H, Goto A, Ako Y, Ueki T, Kariwa H, Takashima I. Viral envelope protein glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. The 40th Annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program. Kyoto, Japan 2004, December

野生げっ歯類及び節足動物に由来する感染症の診断、疫学及び予防に関する研究

ハンタウイルス感染症の診断法の開発

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 (Thailand virus (THAIV), Thottapalayam virus (TPMV)の核蛋白(NP)をバキュロウイルスを発現ベクターとして昆虫細胞に発現させ、この組み換え NP を抗原とする ELISA を開発した。 THAIV はアジアに分布する Hantaan virus (HTNV)), Seoul virus (SEOV) 等と交差反応性を持つ。このため共通抗原領域の N 末端 49 アミノ酸を欠いた NP を発現させ交差反応性を解析したところ、HTNV, SEOV 患者と THAIV 感染患者の鑑別が可能であることが明らかとなった。TPMV NP は HTNV や SEOV と比べ、抗原性が大きく異なり、HTNV や SEOV の NP を ELISA プレートに固着させるために用いている単クローン抗体との反応性も欠いていた。そこでこの単クローン抗体の反応性を合成ペプチドを用いて詳細に検討し、この結果に基づいて TPMV NP に点変異を導入し単クローン抗体と結合するエピトープを合成した組み換え抗原を作成した。この抗原は他の型のハンタウイルス抗原と同様の手順でプレートに固着させることができる上に、TPMV 特異的な抗原性も保持していた。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し、鑑別診断することが可能となる。

A. 研究目的

ハンタウイルス感染症は、齧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。Hantaan (HTNV), Seoul (SEOV), Dobrava (DOBV)および Puumala (PUUV)の少なくとも4つの血清型が HFRS の原因となる。またこれまでの調査で Thailand (THAIV)も HFRS の原因となると考えられる。また Sin Nombre virus (SNV)はアメリカネズミ亜科の齧歯類

によって媒介される HPS の原因ウイルスである。HTNV, SEOV, DOBV, THAIV はネズミ亜科の齧歯類、そして PUUV はハタネズミ亜科の齧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齧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 を摘発するための血清診断システムもまた重要である。

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。そこで我々はこの3種類の組み換え抗原を用意し広い範囲のハンタウイルス感染症を診断するシステムを構築してきた。さらにこれらに加えて、食虫類由来のハンタウイルスが4番目のグループとして存在することが明らかとなってきている。インドの食虫類スルクスより分離された Thottapalayam virus (TPMV) である。分担者はこれまでに TPMV が齧歯類由来のハンタウイルスとは大きく抗原性が異なることを示してきた。また TPMV については研究が少なく、病原性との関連も明らかではない。そこで本研究では TPMV 血清診断法の確立を目的として、組み換え抗原の作成を行った。また、分担者はこれまでに同じアジア地区に生息する *Bandicota indica* が媒介する THAIV が HFRS の原因となりうる可能性について示してきた。THAIV 感染の実態をさらに明らかにするために、SEOV, HTNV 感染との簡易鑑別 ELISA を開発することを試みた。

B. 研究方法

抗原：HTNV, PUUV, SNV, THAIV, TPMV の NP の全長 (アミノ酸 429-433 : 全長抗原) をバキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞(High Five)に発現させた。また NP の N 末端の 49 アミノ酸を削除したもの (50-C 末端 : 50 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 を用いて

組み換え抗原を固相化し、ヒト血清中の抗ハンタウイルス抗体を ELISA 法で検出した。

合成ペプチド : E5/G6 抗体の結合特異性を明らかにするために結合領域のペプチドを既報のハンタウイルスについて合成し、その結合性を解析した。

患者血清 : HTNV/SEOV に感染した中国・韓国・日本の患者血清、THAIV に感染したタイの患者血清、PUUV に感染したスウェーデン・フィンランドの患者血清を用いた。TPMV を接種したマウス血清、HTNV, SEOV, PUUV を接種したウサギ血清、SNV rNP, TPMV rNP を免役したウサギ血清を用いた。

(倫理面からの配慮について)

用いた患者血清はいずれも韓国、中国、スウェーデンの研究所から分与されたものである。当該研究所ですで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ない。各種免疫血清の採血はいず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

これまでの結果から、組み換え抗原をバキュロウイルスベクターを用いた場合、ウイルス型特異的エピトープが効率よく再現できることがわかっている。そこで、THAIV の鑑別 ELISA をバキュロウイルスベクター発現抗原を用いて構築することを試みた。全長抗原を用いた ELISA の場合、THAIV 患者血清#277

は SEOV, HTNV, DOBV の全長抗原とも THAIV 抗原と同様に強く反応し、予想通り全長抗原では型別ができないことが明らかとなった。この血清は PUUV, SNV 全長抗原には反応性を示さなかった。次に 50 抗原を用いて ELISA を行ったところ、#277 の患者血清は THAIV の 50 抗原のみと強く反応し、HTNV, SEOV, DOBV の 50 抗原とはそれぞれ同程度に低く反応するのみであった。この結果から、これまで報告してきた HTNV, SEOV, DOBV の 50 抗原と同様に、THAIV の 50 抗原もウイルス型別 ELISA 抗原として有用であることが示された。

新たなハンタウイルスのバリエーションとして TPMV について検討してきた結果、TPMV の抗原性は GP の一部のみが保存され、NP に関しては全く交差反応性を示さないことを明らかにしてきた。ELISA 系において固相化に用いる E5/G6 との反応性を欠いていた。合成ペプチドを用いて、E5/G6 抗体の結合を解析したところ、2つのアミノ酸に変異を導入すれば結合性が回復すること、3つのアミノ酸に変異を導入すれば強い結合性が得られることが明らかとなった。そこで、TPMV NP の cDNA に部位特異的変異を導入し、E5/G6 結合性を持つ組み換え抗原を作成した。この抗原は E5/G6 との強い反応性を持ちながら、抗 TPMV 血清との反応性にも Wild type と比較して変化が無かった。これは主要抗原部位が N 末端と C 末端であること、E5/G6 の結合・改変部位が中央部であることから、導入した変異が polyclonal 抗体との結合に影響しなかったと考えられた。この抗原を用いて他の抗

原と同様の ELISA が可能となった。今後、TPMV のヒトへの感染状況、病原性を明らかにするために、スンクス生息領域(南アジア、東南アジア、沖縄他)の健常人・不明熱患者血清について、ELISA を用いたスクリーニングを検討する必要があると考えられる。

D. 考察

NP はハンタウイルスのイムノドミナント抗原ではあるが、共通エピトープに対する抗体はごくわずかしき誘導されず、すべてのハンタウイルス感染症を摘発するためには、従来の HTNV, PUUV, SNV に加えて TPMV の 4 種類の抗原が必要であると考えられる。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。今回 HTNV 関連ウイルスの中の THAIV 鑑別抗原を作成することに成功した。また、TPMV 診断 ELISA 系を構築しさらに診断体制を整えることができた。

E. 結論

本研究によって4種類の組み換え NP 全長抗原(HTNV, PUUV, SNV, TPMV)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 HTNV に反応した血清は 50 抗原(HTNV, SEOV, DOBV, THAIV)を用いることで ELISA で罹患ウイルスの型別が可能となった。P3 レベルの感染実験室を必要とする中和試験に比較して、簡便・迅速・安全な鑑別法であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Araki, K., Yoshimatsu, K., Lee, B.H., Kariwa, H., Takashima, I. and Arikawa, J.: "A New Model of Hantaan Virus Persistence in Mice: The Balance Between HTNV Infection and CD8+ T-Cell Responses." *Virology*, 322: 318-327 (2004)
- 2) Araki, K., Yoshimatsu, K., Lee, B.H., Okumura, M., Kariwa, H., Takashima, I. and Arikawa, J.: "Age-Dependant Hantavirus-Specific CD8+ T-Cell Responses in Mice Infected with Hantaan Virus." *Archives of Virology*, 149:1373-1382 (2004)
- 3) Ogino, M., Yoshimatsu, K., Ebihara, H., Araki, K., Lee, B.H., Okumura, M. and Arikawa, J.: "Cell Fusion Activities of Hantaan Virus Envelope Glycoproteins." *Journal of Virology*, 78(19):10776-10782 (2004)
- 4) Okumura, M., Yoshimatsu, K., Araki, K., Lee, B.H., Asano, A., Agui, T. and Arikawa, J.: "Epitope analysis of monoclonal antibody E5/G6, which binds to a linear epitope in the nucleocapsid protein of hantaviruses." *Archives of Virology*, 149:2427-2434(2004)
- 5) Lokugamage, N., Kariwa, H., Lokugamage, K., Iwasa, M. A., Hagiya, T., Yoshii, K., Tachi, A., Ando, S., Fukushima, H., Tsuchiya, K., Iwasaki, T., Araki, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Mizutani, T., Osawa, K., Sato, H. and Takashima,

I.: "Epizootiological and Epidemiological Study of Hantavirus Infection in Japan."

Microbiology and Immunology, 48(11):843-851(2004)

2. 学会発表

- 1) Yoshimatsu, K., Ogino, M., Lee, B.H., Araki, K., Okumura, M., Konno, A., Kariwa, H. and Arikawa, J.: "Studies on secretion of soluble recombinant envelope glycoproteins of Hantaan virus." The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004.6)
- 2) Araki, K., Yoshimatsu, K., Lee, B.H., Kariwa, H., Takashima, I. and Arikawa, J.: "A new model of Hantaan virus (HTNV) persistence in mice: the balance between HTNV infection and CD8+ T-cell responses." The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004. 6)
- 3) Okumura, M., Yoshimatsu, K., Lee, B.H., Araki, K. and Arikawa, J.: "Cell Tropism of Vesicular Stomatitis Virus(VSV) Pseudotypes bearing Hantaan or Seoul Virus envelope proteins." The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004. 6)
- 4) Lee, B.H., Yoshimatsu, K., Araki, K., Okumura, M. and Arikawa, J.: "Antibody Response of Mice

- Immunized with Pseudotyped Vesicular Stomatitis Virus incorporated Hantaan virus Envelope Glycoproteins." The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004.6)
- 5) Pattamadilok, S., Kumperasart, S., Yoshimatsu, K., Lee, B.H., Arikawa, J., Dangsupa, P. and Panla, P.: "Serological observation of Thailand virus infection in human and rodent in Thailand." The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004.6)
- 6) Kariwa, H., Hagiya, T., Miyamoto, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Tachi, A., Tanigawa, Y., Iwasa, M., Araki, K., Ivanov, L.I., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I.: "Diversity of Hantaviruses Circulating in Far East Russia." The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004.6)
- 7) Lokugamage, K., Kariwa, H., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Iwasa, M., Hagiya, T., Araki, K., Tachi, A., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I.: "Genetic and antigenic characterization of Chinese hantavirus isolates related to Amur and Far East genotypes." The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004.6)
- 8) Thang, T.T., Ninh, T.U., Yoshimatsu, K., Lee, B.H., Araki, K. and Arikawa, J.: "Serology hantavirus in human and rodent at Vietnam in 2003." The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004.6)
- 9) Schmidt, J., Jandrig, B., Khoprasert, Y., Klempa, B., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Meisel, H., Niedrig, M., Kruger, D.H., Jakel, T. and Ulrich, R.: "Detection of hantavirus-reactive sera in wild-trapped rodents from Thailand by newly developed immunological assays based on yeast-expressed Seoul virus nucleocapsid protein." The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004.6)
- 10) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Wang, H., Kariwa, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Lee, B.H., PattaMadilok, S., Kumperasart, S. and Takashima, I.: "Global Distribution of Hantavirus in Eurasian Continent - Relation between asian and European Hantaviruses." 4th Croatian Congress on Infectious Diseases with international participation, Opatija, Croatia (2004.10)
- 11) 吉松組子、荒木幸一、奥村恵、中村一郎、有川二郎：ハンタウイルス感染マウスにおける CD8+T 細胞エピトープの解析、第 52 回日本ウイルス学会 横浜 (2004.11)

12) 中村一郎、LEE Byoung-Hee、吉松組子、
奥村恵、荒木幸一、荻和宏明、有川二郎：
タイにおける Thailand 型ハンタウイルス感
染症の血清学的解析およびウイルス遺伝子
の解析、第 52 回日本ウイルス学会 横浜
(2004.11)

13) 奥村恵、吉松組子、LEE Byoung-Hee、荒
木幸一、中村一郎、有川二郎：シュードタ
イブウイルスによるハンタウイルスの細胞
トロピズムの解析、第 52 回日本ウイルス学
会 横浜 (2004.11)

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

分担研究報告書

野生げっ歯類およ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

Q熱の診断と疫学

分担研究者 福士 秀人 岐阜大学応用生物科学部獣医学講座教授

研究要旨：Coxiella 感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法を開発し、従来の方法に比べ非特異反応がほとんどない抗体検出法として確立した。我が国でこれまでに分離された *Coxiella burnetii* の遺伝子型が海外の *C. burnetii* とは異なることを明らかにした。これらの日本分離株について抗生物質感受性を評価し、海外の菌株において報告されているのと同様の感受性を持つことを明らかにした。これらの知見から、抗生物質感受性は海外における起因菌と同様であるが、我が国における Q 熱は固有の菌株による可能性が示された。今回、確立した方法により我が国における Q 熱の実態を明らかにすることが可能になる。

A. 研究目的

Q 熱は *Coxiella burnetii* を起因菌とする人獣共通感染症である。動物は軽症ないし不顕性感染し、乳中や尿に病原体を排出する。野外ではダニが媒介動物となっている。ヒトは病原体を含む病原体が含まれた粉塵の吸入や非加熱乳製品の摂食などにより感染し、インフルエンザ様症状から気管支炎、肝炎、髄膜炎、心内膜炎等の病態を示す。慢性型の心内膜炎の致死率は高いとされている。我が国では 4 類感染症に指定され、全数届け出感染症となっている。統計開始後は毎年 10 例から 20 例が届け出られている。しかしながら、血清学的診断法が確立されておらず、診断基準も曖昧のままになっている。また、諸外国では Q 熱の発生は家畜の流産や汚染畜産物の摂取など原因が明確な場合が多いが、我が国における Q 熱の発生原因は特定されない場合が多く、諸外国とは異なる疫学的様相を呈している。

そこで、本研究では、*Coxiella* 感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法を開発し、従来の方法に比べ非特異反応がほとんどない抗体検出法の確立を試みた。さらに、我が国でこ

れまでに分離された *Coxiella burnetii* の遺伝子型を海外の *C. burnetii* と比較した。また、これらの日本分離株について抗生物質感受性を評価した。

B. 研究方法

【間接蛍光抗体法】*C. burnetii* Nine Mile II 相菌を BGM 細胞で培養し、スライドガラス上に固定し、抗原とした。被検血清を PBS にリポソーム、界面活性剤を添加した希釈液で希釈した。37 度で 1 時間反応後、洗浄し、エバンスブルーを添加した 2 次抗体溶液を反応させた。反応終了後、洗浄し、観察した。

【PCR-RFLP】日本で分離された 72 株を用いた。分離株接種マウスおよび未接種マウス脾臓から DNA を抽出した。Icd (isocitrate dehydrogenase) 遺伝子増幅プライマー

(icd1/5 および icdN1/N2) および Com1 (コクシエラ外膜タンパク質) 遺伝子増幅用プライマー (OMP1/2) を用いた。増幅産物を制限酵素 AccII, PstI で切断しアガロースゲル電気泳動により切断像を調べた。また、pT7Blue ベクターに増幅産物をクローニングし、塩基配列解読を行った。

【抗生物質感受性試験】日本分離株4株を用いた。BGM細胞に接種後、抗生物質存在下で培養した。増殖が阻止された最小濃度をMICとした。用いた抗生物質はドキシサイクリン (DOXY), シプロフロキサシン

(CPFX), レボフロキサシン (LVFX), ガテフロキサシン (GFLX) およびモキシフロキサシン (MFLX) である。

(倫理面からの配慮について)

用いたヒト血清は以前の研究で既に研究目的での使用が認められており、また、無記名で扱われていることから倫理面での問題はない。各種免疫血清の採決は深麻酔下で全採血し安楽死したものであり、動物福祉の観点からも問題はない。

C. 研究結果

1. 間接蛍光抗体法

従来の方法で陽性および陰性と判定されたヒト血清を用い、希釈液の検討を行った。希釈液の組成により非特異反応がほぼ完全に除去されることが示された。また、今回の方法で陽性と判定された血清はすべて従来法でも陽性とされていたが、従来法の陽性血清の中には今回の方法で陰性と判定されたものもあった。陰性血清については両者の結果は一致した。

2. 日本分離株の性状解析

我が国で分離された *C. burnetii* の遺伝子型および抗原性を比較した。日本分離株72株中49株が慢性型の *icd* 遺伝子型を示した。塩基配列解読により特異的な塩基配列が見いだされた。また、アミノ酸配列は慢性型と同様であった。これらの結果から我が国の *C. burnetii* に遺伝的多様性が存在することが示唆された。

3. 日本分離株の抗生物質感受性

Q熱の化学療法の基礎として日本分離株のテトラサイクリンおよびフルオロキノロン系抗生物質感受性試験を行った。DOXY に対す

るMICは0.25から1.0 μ g/ml, MFLX, CPFX, LVFX, GFLX に対するMICはそれぞれ0.5から1.0 μ g/ml, 4.0から8.0 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 1.0 μ g/mlであった。

D. 考察

従来血清診断法では非特異的な反応が多かった可能性が示された。今後、例数を増やしさらに検討したいと考えている。我が国のコクシエラ菌に遺伝的な多様性がはじめて見いだされた。これらの多型性と病原性との関連性を明らかにする必要がある。とくに我が国におけるQ熱の疫学的状況は諸外国とかなり異なるとされており、こんかい見いだされた遺伝学的多型性との関連性が今後の課題となった。また、日本分離株の抗生物質感受性は治療の際、重要なデータであるが、今回の結果から海外と同様の感受性を有することがわかり、化学療法を実施する基礎を得ることができた。

E. 結論

ヒト血清における抗体価測定に適した希釈液を用いることにより非特異反応を抑えうることが示された。本方法を用いることによりQ熱の血清診断の精度が向上すると考えられる。我が国のQ熱の疫学は諸外国と異なることが示唆されている。今回の結果から日本分離株に多様性が見いだされ、この *C. burnetii* 遺伝子型と日本におけるヒトのコクシエラ症の症状および予後との関連性を解析する必要がある。日本分離株の抗生物質感受性は海外の *C. burnetii* と同様であったことから諸外国において実施されている化学療法を日本においても適用できると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Andoh M, Nagaoka H, Yamaguchi T, Fukushi H and Hirai K: Comparison of Japanese Isolates of *Coxiella burnetii* by PCR-RFLP and sequence Analysis. *Microbiology and Immunology*, 48(12): 971-975, 2004
- 2) Hotta A, Zhang G Q, Andoh M, Yamaguchi T, Fukushi H and Hirai K: Use of monoclonal antibodies for analyses of *Coxiella burnetii* major antigens. *Journal of Veterinary Medical Sciences*, 66(10): 1289-1291, 2004
- 3) Andoh M, Naganawa T, Yamaguchi T, Fukushi H and Hirai K: In vitro susceptibility to tetracycline and fluoroquinolones of Japanese isolates of *Coxiella burnetii*. *Microbiology and Immunology* 48(9): 661-664, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

わが国の野生アライグマにおける人獣共通感染症起因菌の感染状況とノミから感染したと思われる猫ひっかき病患者からの *Bartonella henselae* 初分離例

分担研究者 丸山総一 日本大学生物資源科学部 助教授

研究要旨：北海道（2000年）および神奈川県（2001年，2002年）で捕獲されたアライグマ 155頭，198頭について，バルトネラ症(*Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*)，野兎病(*Francisella tularensis*)，Q熱(*Coxiella burnetii*)，ライム病(*Borrelia garinii*, *B. afzeri*)，日本紅斑熱(*Rickettsia japonica*)，ツツガムシ病(*Orientia tsutsugamushi*)，ブルセラ症(*Brucella abortus*, *B. canis*)，およびトキソプラズマ症(*Toxoplasma gondii*)の各病原体感染状況を血清学的に検討した。北海道のアライグマでは，5頭(3.2%)に *O. tsutsugamushi* (全て Gilliam 株)，27頭(17.4%)に *T. gondii* の感染が見られた。神奈川県のアライグマでは 15頭(7.6%)に日本紅斑熱，33頭(16.7%)に *O. tsutsugamushi* (主に Kuroki 株)，39頭(19.7%)に *T. gondii* の感染が見られた。また，神奈川県の間体では *O. tsutsugamushi* の感染率に地域差が見られたが，北海道の陽性個体 5頭は，全て同一地域で捕獲されたものであった。北海道，神奈川県の間体とも，成獣の *R. japonica* および *O. tsutsugamushi* の感染率は幼獣のそれに比べ高かった。なお，*B. vinsonii*, *F. tularensis*, *C. burnetii*, *B. garinii*, *B. afzeri*, *B. abortus*, *B. canis* の抗体は全ての個体で陰性であった。以上から，アライグマは自然界におけるダニ媒介性の人獣共通感染症の分布を知る上で，有用な指標動物であると思われた。

さらに，多数のノミの寄生を受けた猫ひっかき病患者 (36歳，男性) の左鼠径リンパ節から *Bartonella henselae* を本邦で初めて分離した。患者の *B. henselae* 抗体価は 1:64 倍で，血液，摘出した鼠径リンパ節，および猫ノミから PCR 法で *B. henselae* DNA が検出された。また，リンパ節ホモジェネートから，90 個/g の *B. henselae* type I が分離された。制限酵素 *Not I* を用いたパルスフィールドゲル電気泳動法で分離 5 株のゲノム DNA を解析したところ，2 種類の異なるゲノムパターンが認められた。これより，該患者は 2 種類の *B. henselae* に感染していたことが判明した。また，猫ノミからも本菌の DNA が検出されたことから，ノミを介した感染の可能性も示唆された。

A. 研究目的

アライグマ (*Procyon lotor*) は北米大陸を原産とする野生ほ乳類であるが，わが国にペットとして輸入された個体が，放逐され各地で野生化し自然繁殖するようになった。野生化した個体は，日本固有の野生生物の生態系や人の生活に悪影響を及ぼすことから，社会的に問題視さ

れている。さらに，アライグマは北米では狂犬病の伝播に関わる野生動物として重要視されているが，わが国のアライグマにおける人獣共通感染症の罹患状況についてはほとんど不明の状態である。

本研究では，わが国のアライグマのバルトネラ症(*Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*)，野兎病

(*Francisella tularensis*), Q熱(*Coxiella burnetii*), ライム病(*Borrelia garinii*, *B. afzeri*), 日本紅斑熱(*Rickettsia japonica*), ツツガムシ病(*Orientia tsutsugamushi*), ブルセラ症(*Brucella abortus*, *B. canis*), およびトキソプラズマ症(*Toxoplasma gondii*) の各病原体の感染状況を血清学的に検討した。

猫ひっかき病の病原体である *B. henselae* は、猫間ではノミによって伝播されることが明らかとなっている。今回、ノミの多数寄生した猫を飼育している男性に猫ひっかき病が発生し、この患者のリンパ節から本邦で初めて *Bartonella henselae* を分離することに成功したので、その疫学とその分離株の性状について検討した。

B. 研究方法

【材料】

アライグマ血清：

2001年、2002年に神奈川県で捕獲された個体198頭(雄104, 雌94), 2000年に北海道で捕獲された個体155頭(雄55, 雌100)から採取した血清を用いた。

猫ひっかき病患者の材料：

患者は36才の男性で、受診時の2ヶ月前より猫を飼育しており、体温は37.1℃、両足には猫の引っかき傷が多数認められた。患者は掻痒を示し、全身に小豆大のビラン性紅斑が現れ、左鼠径リンパ節が鶏卵大、有痛性に腫脹していた。治療開始前の患者血清、血液、摘出したリンパ節ならびに飼育猫由来のノミを用いて *B. henselae* 抗体価、*Bartonella* DNA 検出、ならびに菌分離を行った。

【検査方法】

B. vinsonii subsp. *berkhoffii* 抗体は間接蛍光抗体法(IFA), *F. tularensis*, *B. abortus*, *B. canis* 抗体は菌凝集反応, *T. gondii* 抗体はラテックス凝

集反応(Toxo-check, EIKEN), *C. burnetii*, *B. garinii*, *B. afzeri*, *R. japonica*, *O. tsutsugamushi* (Gilliam, Karp, Kawasaki, Kuroki 株) 抗体はプロテインGを用いた酵素抗体法でそれぞれ測定した。

猫ひっかき病患者のリンパ節および患者の猫から採取したノミは、氷冷下で充分ホモジェナイズした。また、-70℃で保存した血液は、室温で融解後、1,800Gで75分間遠心分離した後、*Bartonella* 分離用に調整した medium199 を120μl 加え充分混和した。各試料は、5%兔血液寒天培地に塗抹後、35℃、5%CO₂ 下で、*B. henselae* の定量培養を行った。さらに、リンパ節とノミのホモジェネートと患者血液については、PCRによる *B. henselae* DNA 検出も試みた。患者血清の *B. henselae* 抗体価は IFA で測定した。分離株は PCR で同定すると共に、ゲノム性状はパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)を用いて解析した。

C. 研究結果及び考察

神奈川県のアライグマでは15頭(7.6%)に *R. japonica*, 33頭(16.7%)に *O. tsutsugamushi* (主に Kuroki 株), 39頭(19.7%)に *T. gondii* の感染が見られた。北海道のアライグマでは、5頭(3.2%)に *O. tsutsugamushi* (全て Gilliam 株), 27頭(17.4%)に *T. gondii* の感染が見られた。*O. tsutsugamushi* 陽性個体は、全て同一地域で捕獲されたものであった。これより、これまでツツガムシ病の発生のない北海道にも *O. tsutsugamushi* が分布している可能性が示唆された。さらに、神奈川県の一部にも *R. japonica* が広く分布している可能性が示唆された。

患者の *B. henselae* 抗体価は type I 株に対し 1:64 倍、type II 株に対し 1:128 倍であった。患者血液、ノミからは *Bartonella* は分離されな

ったが、PCR法で本DNAが検出された。また、患者リンパ節から90個/gの*Bartonella*様の菌が分離され、PCR法で*B. henselae*と同定された。以上から、本患者は*B. henselae*による感染でCSDを発症したものと診断された。また、制限酵素*Not I*を用いたパルスフィールドゲル電気泳動法で分離5株のゲノムDNAを解析したところ、2種類の異なるゲノムパターンが認められた。これより、該患者は2種類の*B. henselae*に感染していたことが判明した。また、猫ノミからも本菌のDNAが検出されたことから、ノミを介した感染の可能性も示唆された。

D. 結論

アライグマは自然界における人獣共通感染症の分布を知る上で、有用な指標動物であると思われた。

また、猫ひっかき病患者は同時に複数のゲノム性状を有する*B. henselae*に感染しうると共に、人の感染源となりうるネコノミの駆除も本症の予防上重要であると思われた。

E. 健康危険情報

- 1) これまでツツガムシ病の患者の報告のない北海道にも、本症の病原体が存在している可能性がある。
- 2) 都市近郊にも日本紅斑熱やツツガムシ病の病原体が分布している可能性がある。
- 3) ノミが猫ひっかき病のベクターとなる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jittapalpong, S., Sangvaranond, A., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., Khachaeram, W., and Maruyama, S. 2005. Seroprevalence

of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province, Thailand. *Vet. Parasitol.* 127: 17-22.

- 2) Verdida, R. A., Hara, O. A., Xuan, X., Fukumoto, S., Igarashi, I., Zhang, S., Dong, J., Inokuma, H., Kabeya, H., Sato, Y., Moritomo, T., Maruyama, S., Claveria, F., and Nagasawa, H. 2004. Serodiagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs by an improved enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated P50. *J. Vet. Med. Sci.* 66(12): 1517-1521.
- 3) Morita, Y., Maruyama, S., Kabeya, H., Boonmar, S., Nimsupan, B., Nagai, A., Kozawa, K., Nakajima, T., Mikami, T., and Kimura, H. 2004. Isolation and phylogenetic analysis of *Arcobacter butzleri* in ground chicken meat and environmental water in Japan and Thailand. *Microbio. Immunol.* 48(7):527-533.
- 4) Shinozaki, Y., Shiibashi, T., Yoshizawa, K., Murata, K., Kimura, J., Maruyama, S., Hayama, Y., Yoshida, H. and Nogami, S. 2004. Ectoparasites of the Pallas, *Callosciurus erythraeus*, introduced to Japan. *Med. Vet. Entomol.* 18:1-3.
- 5) Shinozaki, Y., Yoshizawa, K., Murata, K., Shiibashi, T., Kimura, J., Maruyama, S., Hayama, Y., Yoshida, H. and Nogami, S. 2004. The first record of sucking louse, *Neohaematopimus callosciuri*, infesting Pallas squirrels from Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 66(3): 333-335.
- 6) Maruyama, S., Izumikawa, K., Miyashita, M., Kabeya, H., Mikami, T., Yamanouchi, H., Sasaki, E., Yoshida, H., and Izumikawa, K.

2004. First isolation of *Bartonella henselae* type I from a cat-scratch disease patient in Japan and its molecular analysis. *Microbiol. Immunol.* 48(2):103-109.
- 7) Kabeya, H., Maruyama, S., Morita, Y., Ohsuga, T., Ozawa, S., Kobayashi, Y., Abe, M., Katsube, Y., and Mikami, T. 2004. Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 90(3): 303-308.
- 8) 鈴木幹啓, 西原秀宏, 柴田丈夫, 丸山総一(2004): 髄液中に*Bartonella henselae* DNAを検出した猫ひっかき病の1例. *小児科臨床* 57: 2131-2135.
- 9) 森田幸雄, 壁谷英則, 石岡大成, 阪脇廣美, 長井 章, 鈴木宣夫, 中林良雄, 丸山総一(2004): 家畜および市販ひき肉における*Arcobacter*, *Campylobacter*, *Salmonella*の分布状況. *日獣会誌*57:393-397.
- 10) 山内寛嗣, 泉川欣一, 久松貴, 良永倫子, 佐々木栄祐, 泉川公一, 早川友一郎, 原耕平, 丸山総一, 大谷博, 下川功(2004): 犬が感染源と考えられた*Bartonella henselae*感染症の1例. *感染症誌* 78(3): 270-273.
- 11) 丸山総一(2004): 猫ひっかき病, *モダンメディア* 50(9):203-211.
2. 学会発表
- 1) Sathaporn Jittapalpong, Nongnuch Pinyopanuwat, Wissanuwat Chimnoi, Soichi Maruyama, Philippe Brouqui, Hisashi Inokuma and Roger W. Stich. 2004. Serological Prevalence of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophila* in stray cats in Bangkok, Thailand. Joint international tropical medicine meeting, 2004. (29 November 1 December, 2004). Thailand (Bangkok).
- 2) Maruyama, S., Kabeya, H., Yanai, K., Kawanami, K., Morita, Y., Mikami, T. and Jittapalpong, S. 2004. Prevalence of *Bartonella* species among cats and dogs in Bangkok metropolitan areas, Thailand. The 4th International Conference on *Bartonella* as Emerging Pathogens (August 24, Sept1, 2004). Sweden (Uppsala)
- 3) Kabeya, H., Sase, M., Yamashita, M., Mikami, T., and Maruyama, S. 2004. Predominant Th2 immune responses against *Bartonella henselae* in naturally infected cats. The 4th International Conference on *Bartonella* as Emerging Pathogens (August 24, Sept1, 2004). Sweden (Uppsala)
- 4) Rodolfo Verdida, Olga Hara, 玄学南, 福本晋也, 猪熊壽, 壁谷英則, 佐藤雪太, 森友忠昭, 丸山総一, 長澤秀行(2004): Serodiagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs by an improved enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated P50. 第138回日本獣医学会 (北海道, 北大)
- 5) 岡西広樹, 梅原玉青, 神谷美沙子, 田崎泉美, 三澤昭裕, 壁谷英則, 丸山総一, 見上彪(2004): *Bartonella henselae*投与SPF猫における菌血症と分離株のゲノムDNAの推移. 第138回日本獣医学会 (北海道, 北大)
- 6) 梅原玉青, 岡西広樹, 壁谷英則, 丸山総一, 見上彪(2004): *Bartonella henselae*実験感染SPF猫における液性及び細胞性免疫応答. 第138回日本獣医学会 (北海道, 北大)
- 7) 山崎朗子, 碓屋美加子, 佐瀬真紀子, 壁谷英則, 丸山総一, 見上彪(2004): *Bartonella henselae*感染に対する猫及びマウスの免疫応答の相違について. 第138回日本獣医学会 (北海道, 北大)

- 8) 長田真理子, 佐多辰, 谷川力, 加藤行男, 壁谷英則, 丸山総一, 泉谷秀昌, 渡邊治雄, 黒木俊郎(2004): クマネズミから分離された *Salmonella Typhimurium* の毒力の比較. 第137回日本獣医学会 (神奈川, 日本大学)
- 9) 稲村嘉之, 高木恵美, 山下将哉, 田崎泉, 神谷美沙子, 三澤昭裕, 壁谷英則, 丸山総一, 見上彪(2004): *Bartonella henselae* 持続感染猫分離株のゲノムの多様性と主要抗原遺伝子解析. 第137回日本獣医学会 (神奈川, 日本大学)

G. 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

Yersinia enterocolitica および *Yersinia pseudotuberculosis* の迅速検出法に関する研究

分担研究者 林谷 秀樹 東京農工大学大学院共生科学技術研究部 助教授

研究要旨：病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* の検出に、近年開発された迅速かつ高感度な遺伝子診断法である LAMP（Loop-mediated isothermal amplification）法を応用し、これら病原性 *Yersinia* に特異的に存在する病原性遺伝子である *ail*、*inv* および *virF* を標的遺伝子としたプライマーを設計し、それらを用いた LAMP 法の検出感度や特異性を、PCR 法と比較しながら検討した。今回開発した LAMP 法では、供試した病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* のすべての菌株とも保有する標的遺伝子が特異的に増幅され、その検出感度は PCR 法に比べ約 10～100 倍高く、 $10^0\sim 10^1$ CFU の菌量でも検出が可能であった。また、病原性 *Y. enterocolitica* では 60 分間以内に、*Y. pseudotuberculosis* では 30 分間以内に検出することが可能であり、病原性 *Yersinia* のプラスミドに共通にコードされている *virF* を標的遺伝子とした場合も、これらの菌を 60 分間以内に検出することが可能であった。これらのことから、*ail*、*inv* および *virF* を標的遺伝子とした LAMP 法は、病原性 *Yersinia* を野生げっ歯類やそれを取り巻く環境から検出するための迅速で感度の高い遺伝子診断法になり得るものと思われる。

A. 研究目的

食中毒起因菌である *Yersinia enterocolitica* と仮性結核菌 *Yersinia pseudotuberculosis* は、腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌であり、代表的な人獣共通感染症原因菌として知られている。両者による感染症は総称してエルシニア症と呼ばれており、ヒトに発熱、下痢および腹痛を主徴とした胃腸炎を引き起こすことが多いが、時には関節炎、結節性紅斑、敗血症など重篤な症状となることも珍しくない。

自然界では野生げっ歯類が両菌種を高率に保菌し、自然界における主たるレゼルボアと考えられている。病原性 *Y. enterocolitica* ならびに *Y. pseudotuberculosis* の野生げっ歯類およびそれらを取り巻く環境における分布や生態を解明していくためには、これらの菌を迅速かつ高感度に分離する必要がある。そこで、本研究では病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* の野生げっ歯類における生態や疫学を解明していくための研究の一環と

して、これら病原体を迅速かつ高感度に検出するために、近年開発された LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法を応用し、最適な検出条件を設定するとともに、その検出感度や特異性について検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

供試菌株として、病原性 *Y. enterocolitica* 18 株、*Y. pseudotuberculosis* 21 株、非病原性 *Yersinia* 属菌 6 株およびその他のグラム陰性菌 10 株の計 55 株を用いた。

2. LAMP 法に用いるプライマーの設計および LAMP 法による DNA 増幅

病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* の染色体 DNA 上にそれぞれ特異的に存在する *ail* および *inv*、ならびに病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* のプラスミド DNA 上に共通して存在する *virF* の 3 つの病原性遺伝子を標的遺伝子とし、これらに特異的なプライマーを設計した。

LAMP 法は、供試菌株から分離した DNA について、試薬として DNA 増幅試薬キット (栄研化学) を、機器として Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-200 (テラメクス) を用い、63℃で 30-70 分間反応させて行った。なお、DNA の増幅の確認は、反応液の濁度を測定することで行った。また、同じ標的遺

伝子に対して PCR 法を実施し、LAMP 法との間で感度を比較した。

さらに、今回病原性 *Y. enterocolitica* ならびに *Y. pseudotuberculosis* を検出するために開発した LAMP 法が、実際に野外で応用できるか否かを検討するために、両菌種に感染して死亡したサル 15 匹 (リスザル 13 頭、オランウータン 1 頭およびアジルテナガザル 1 頭) の肝臓から、開発した LAMP 法を用いて標的遺伝子の増幅を行い、その有用性を検討した。

C. 研究結果

ail を標的遺伝子として LAMP 法を行った場合、*Y. enterocolitica* O:3、O:5,27 および O:9 は反応開始約 20 分後から、*Y. enterocolitica* O:4,32、O:8、O:13a,13b、O:18,13b、O:20 および O:21 では 40 分後から濁度の上昇が始まり、反応開始 60 分後には供試したすべての *Y. enterocolitica* において濁度が 0.4 以上となり、肉眼でも検出が可能となった。*inv* を標的遺伝子とした場合は、供試した *Y. pseudotuberculosis* 21 株すべてにおいて反応開始約 15 分後から濁度が上昇し、30 分後にはいずれも濁度が 0.4 以上となった。また、*virF* を標的遺伝子とした場合には、病原性プラスミドを保有していることが確認されている *Y. enterocolitica* O:3、O:4,32、O:5,27、O:8、O:9、O:13a,13b、O:18,13b、O:20 および O:21、ならびに *Y. pseudotuberculosis* 1b、2c、3、4b、

5b、6、7 および 10 の 17 株において、反応開始約 25 分後から濁度の上昇が始まり、60 分後にはいずれも濁度が 0.4 以上となった。一方、標的遺伝子を持たない菌株は、いずれの場合も全く濁度の上昇は起こらず、DNA の増幅はみられなかった。また、今回、開発した LAMP 法の検出感度は PCR 法と比較すると、約 10~100 倍高く、 $10^0\sim 10^1$ CFU の菌量でも検出が可能であった。

また、病原性 *Y. enterocolitica* または *Y. pseudotuberculosis* に自然感染して死亡したサルの肝臓を用いて、*ail*、*inv* あるいは *virF* を標的遺伝子として LAMP を行った場合、病原性 *Y. enterocolitica* の感染死亡例 (5 頭) では *ail* が、*Y. pseudotuberculosis* 感染死亡例 (15 頭) では *inv* が特異的に増幅され、これらに感染して死亡したいずれの場合も、*virF* が特異的に増幅された。しかし、病原性 *Yersinia* による感染以外の理由で死亡した例 (3 頭) ではいずれの標的遺伝子も増幅されなかった。

D. 考察

病原性 *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* の染色体 DNA 上にそれぞれ特異的にコードされている *ail* および *inv* を標的遺伝子として、今回設計したプライマーを用いて LAMP を行った結果、病原性 *Y. enterocolitica* では 60 分間以内に、*Y. pseudotuberculosis* では 30 分間以内に検出することが可能であった。また、病原性 *Yersinia*

のプラスミドにコードされている *virF* を標的遺伝子として LAMP を実施した場合も、病原性プラスミドを保有するこれらの菌を 60 分間以内に検出することが可能であった。いずれの場合も、検出感度は PCR 法より 10-100 倍高かった。さらに、臨床検体として病原性 *Y. enterocolitica* または *Y. pseudotuberculosis* に自然感染して死亡したサルの肝臓から、今回開発した LAMP 法で標的とする遺伝子の検出を試みたところ、いずれも標的とする遺伝子だけが特異的に検出された。これらの結果から、今回 *ail*、*inv* および *virF* を標的遺伝子として設計した LAMP のためのプライマーは、これら病原性 *Yersinia* を迅速かつ特異的に検出することが可能な有用なプライマーであることが示された。なお、病原性プラスミドはたびたび脱落することがあるため、病原性 *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* の検出する際には、それぞれ *ail* と *inv* を検出するだけでなく、病原性の有無も確認する意味で *virF* も標的遺伝子として合わせて検出するのが適当と思われる。

E. 結論

げっ歯類やそれを取り巻く環境から、病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* を迅速かつ高感度に検出することを目的に、LAMP 法を応用した結果、これら病原体を迅速かつ高感度に検出するための方法を開発することができた。本研究で得られた成績は、

今後これら病原性 *Yersinia* の野生げっ歯類の生態や疫学を解明し、これら病原体の人への感染予防対策を図る上で、優れた調査解析ツールになり得るものと考える。

なし
3. その他
なし

F.健康危険情報

なし

G.研究論文

1.発表論文

1)Horisaka,T., Fujita,K., Iwata,T., Nakadai,A., Okatani,A.T., Horikita,T., Taniguchi,T., Honda,E., Yokomizo,Y., and Hayashidani H.: Sensitive and specific detection of *Yersinia pseudotuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification. J.Clin.Microbiol. 42:5349-5352, 2004.

2)Iwata,T., Une,Y., Okatani,A.T., Kaneko,S., Namai,S., Yoshida,S., Horisaka,T., Horikita,T., Nakadai,A., and Hayashidani,H.: *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 infection in breeding monkeys in Japan. Microbiol.Immunol. 49: 1-7, 2005.

2.学会発表

なし

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

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

ダニ媒介性脳炎ウイルスの RNA レプリコン

(代表研究者：高島郁夫)

分担研究者 岩崎琢也（長崎大・熱帯医学研 国立感染研・感染病理部）

協力研究者 早坂大輔（長崎大・熱帯医学研）

高島郁夫（北海道大学大学院・獣医学・環境獣医科学講座）

研究要旨 ダニ媒介性脳炎ウイルスゲノムの構造蛋白遺伝子を欠損させた RNA レプリコン Oshima REP を作製し、さらに gfree fluorescent protein (GFP) 遺伝子を挿入した、Oshima REP-GFP、Neomycin 遺伝子を挿入した Oshima REP-Neo も作製した。これらの RNA レプリコンを導入した細胞ではウイルスゲノム上の非構造蛋白遺伝子が発現していることが間接蛍光抗体法ならびに western ブロット法により確認することができた。さらに G418 存在下での Oshima REP-Neo 導入細胞では明らかな細胞変性は観察されなかった。この RNA レプリコンはダニ媒介性脳炎ウイルスの *in vitro* における動態ならびに非構造蛋白を標的とする抗ウイルス剤の解析において有用となることが期待される。

A. 研究目的

野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症のうち、この分担ではウイルス感染症を主として対象とし、人体におよぼす病原性の組織病理学的解析、発症病理の解明、病理学的診断的方法の確立を目的として研究を行っている。

今年度は当研究室の早坂大輔博士が中心となって行っているダニ媒介性脳炎ウイルスの RNA レプリコンの研究について報告する。

フラビウイルスには黄熱ウイルス、デングウイルス、West Nile ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスなどの重要なヒト病原体が含まれ、ウイルスゲノムは positive-strand の一本鎖 RNA からなる。このゲノム上にはコア(C)、膜前駆蛋白(prM)、エンベロープ(E)の3種類の構造蛋白の遺伝子と7種類の非構造蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5)が存在し、これらの遺伝子群は1本の長い読み取り枠から校正

され、感染細胞内でウイルスゲノムの蛋白分解酵素により切断される。ウイルスゲノムの両端には特有の2次構造が存在し、これらは転写において重要な役割を有している。

近年、原核細胞のプラスミドに相応する有核細胞の細胞内でむき出しの核酸のまま増殖する subgenomic RNA レプリコンの技術が開発され、種々の RNA ウイルスに応用されている。蚊が媒介するフラビウイルスの Kunjin ウイルス、West Nile ウイルス、Dengue ウイルス、黄熱ウイルスそれぞれの RNA レプリコンが開発されてきたが、ダニが媒介するこのダニ媒介性脳炎ウイルスについては今回報告する極東型に関しては報告されていない。

B. 方法と結果

1. 鋳型：ダニ媒介性脳炎ウイルスの全長の感染性 cDNA クローン(O-IC)をもとに RNA レプリコンを作製した。この cDNA クローンの作製ならびにその性状については