

Hayasaka et al (2004)の論文を参照されたい。なお、このウイルスの鋳型は渡島株である。具体的には図 1 に示した方法で 3 種類の RNA レプリコンを作製した。O-IC はウイルスゲノム RNA を鋳型とし、信頼度の高い酵素を用いて 1 回の RT-PCR 反応を行い、pBR322 プラスミドに組換えて作製した。この O-IC の感染性はこの組換えプラスミドを鋳型として作製した RNA を BHK 細胞に形質導入する *in vitro* の解析で、感染性のウイルスが出現することにより確認した。さらにこのウイルスをマウスに脳内接種することにより *in vivo* の病原性も確認している。

RNA レプリコンの作製：C、prM、E の一部の構造遺伝子を欠落したウイルスゲノムの塩基配列を有する組換え体作製を試みた。この構造遺伝子を欠落させるためウイルスゲノムの nt-26-242、2295-2554、2554-3956 を RT-PCR 法を用いて増幅した。この時プライマーには制限酵素認識サイトを、さらに 5' 端には SP6 プロモーターの塩基配列を挿入した。これらの増幅産物はつなぎ合わせ pGEM-3 プラスミドに挿入し、図 1 で示した pGEM3-del.CprME を作製した。この組換えプラスミドは構造蛋白の C₃₈-E₄₂₁ の領域を欠落している。さらに制限酵素 NotI ならびに AgeI でこの挿入断片を切り出し、O-IC と組換え、これらの構造遺伝子を欠落する Oshima REP を作製した。この RNA レプリコン cDNA プラスミドの大腸菌における安定性について塩基配列を解析することにより確認した。

RNA レプリコンの遺伝子発現の *in vitro* の解析：レプリコン cDNA を挿入断片の 3' 端の SpeI で切断し、SP6 RNA polymerase を用いて *in vitro* transcription を行った。得られた RNA を BHK 細胞に electroporation し、24 時間、48 時間、96 時間後に間接蛍光抗体法により、ウイルスの非構造遺伝子の発現を検討

した。使用した一時抗体は抗 Langat ウイルス抗体で、二次抗体は Alexa Fluor 532 ヤギ抗マウス IgG 抗体(Molecular Probe x 500)であり、confocal scanning system TCS SP2 (Leica) を用いて観察した。

その結果、導入後 48 時間でウイルス抗原を検出できた。抗原は細胞質に局在し、細顆粒状に陽性で核周囲ではやや少量であった。抗原陽性細胞の形態は陰性細胞と区別できなかった。感染 96 時間後においても明らかな CPE を認めることなく抗原陽性細胞が認められた。

RNA レプリコンの 3'UTR には種々の遺伝子の挿入が可能であり、ここでは蛍光色素 GFP と NEO の遺伝子を挿入した結果をしめす。BHK 細胞に Oshima REP-GFP を導入後蛍光抗体法を用いて解析したところ、これらの細胞では両者（ウイルス並びに導入遺伝子）の発現が観察され、このような遺伝子導入が可能であることが判明した。そこで、GFP の代わりに Neomycin 耐性遺伝子 NEO を挿入し、BHK 細胞に導入後 G418 の存在下で培養を持続させた。この条件では NEO 遺伝子を保持している細胞のみが生存できる。5-7 日おきに 1:5 の割合で継代培養を続け、導入 30 日後に間接蛍光抗体法でウイルスの非構造遺伝子の発現を検討したところ、すべての培養細胞の細胞質が陽性となり、また明らかな CPE は観察されないことが判明した。この細胞について抗 Langat ウイルス血清を用いた Western ブロット解析を行ったところ、非構造蛋白の存在と構造蛋白の欠落が確認された。また、この遺伝子発現が RNA レプリコンに由来し、プラスミド DNA に由来していないことを確認するために、培養細胞より核酸を抽出し、逆転写酵素存在下と非存在下でのウイルスゲノムを標的とする PCR を行ったところ、RT-PCR のみが陽性となることより、確認できたと判断した。

C. 考察

本研究ではダニ媒介性脳炎ウイルスの RNA レプリコンの作製を行い、樹立することができた。この RNA レプリコンを BHK 細胞に導入した際、ウイルス粒子の構成蛋白は産生されずに非構造蛋白質のみが発現する。ダニ媒介性脳炎ウイルスの非構造蛋白質遺伝子は上述したように NS1 から NS5 までの 7 種類が存在するが、これらの遺伝子が発現しても、明らかな CPE が出現しないことも判明した。このことはウイルス粒子産生能が非常に弱い感染細胞では明らかな変性・壊死を伴わない場合があることが示唆され、これまで TBE のマウス感染実験において、神経系組織以外の感染病変を見いだすことができなかったことが説明されると考える。このウイルスに罹患した宿主において、どうして中枢神経系組織のみにウイルス性髄膜炎あるいは脳炎病変が成立するかは未だに解明されていない重要な点であり、また皮下に接種されたウイルスが中枢神経系に血行性あるいはリンパ行性に到達する過程においては感染細胞の存在が必須である。

RNA レプリコンを用いることによりウイルスの非構造遺伝子を標的とした抗ウイルス剤の開発が容易になると考えている。また、Oshima-REP-NEO を用いて非構造遺伝子を持続的に発現する細胞株が樹立されたことは、この細胞を用いて 1 回のみ感染が成立する人工的なウイルス disable infectious particle の作製も可能である。このような特定の細胞のみでウイルス複製が可能な TBE の人工的なウイルス作製も可能となる。

E. 結論

RNA レプリコンはウイルスの非構造遺伝子の機能の解析において有用となるばかりでなく、今後の抗ウイルス剤・ワクチン開発においても重要な存在となることが期待さ

れる。また、TBE ウイルスの非構造遺伝子発現細胞が形態学的に変化が生じないことも TBE の発症病理を解明する上で重要な知見である。

参考文献

1. Agapov EV et al. Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12989-94
2. Behrens SE et al. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol* 1998; 72: 2364-72
3. Blight KJ et al. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290: 1972-4
4. Campbell MS et al. Infectious cDNA clones of Langat tick-borne flavivirus that differ from their parent in peripheral neurovirulence. *Virology* 2000; 269: 225-37
5. Corver J et al. Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. *J Virol* 77: 2265-70
6. Hagino-Yamagishi K, Nomoto A. In vitro construction of poliovirus defective interfering particles. *J Virol* 1989; 63: 5386-92
7. Kaplan G, Racaniello VR. Construction and characterization of poliovirus subgenomic replicons. *J Virol* 1988; 62: 1687-96
8. Khromykh AA, Westaway EG. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J Virol* 1997; 71: 1497-505
9. Pang X et al. Development of Dengue virus type 2 replicons capable of prolonged expression in host cells. 2001; *BMC Microbiol* 1: 18
9. Shi PY et al. Construction and characterization of subgenomic replicons of New York strain of West Nile virus. *Virology* 2002; 296: 219-33
10. Tzeng WP et al. Rubella virus DI RNAs and replicons: requirement for non-structural proteins acting in cis for amplification by helper virus. *Virology* 2001; 289: 63-73

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Iihara K, Yamaguchi K, Nishimura Y, Iwasaki T, Suzuki K, Hirabayashi Y. Spontaneous regression of malignant lymphoma of the breast. *Pathol Int.* 2004 Jul;54(7):537-42.
2. Hayasaka D, Yoshii K, Ueki T, Iwasaki T, Takashima I. Sub-genomic replicons of Tick-borne encephalitis virus. *Arch Virol.* 2004 Jun;149(6):1245-56.
3. Iwasaki T, Inoue S, Tanaka K, Sato Y, Morikawa S, Hayasaka D, Moriyama M, Ono T, Kanai S, Yamada A, Kurata T. Characterization of Oita virus 296/1972 of Rhabdoviridae isolated from a horseshoe bat bearing characteristics of both lyssavirus and vesiculovirus. *Arch Virol.* 2004 Jun;149(6):1139-54.
4. Lokugamage K, Kariwa H, Lokugamage N, Iwasa M, Hagiya T, Araki K, Tachi A, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Iwasaki T, Takashima I. Comparison of virulence of various hantaviruses related to hemorrhagic fever with renal syndrome in newborn mouse model. *Jpn J Vet Res.* 2004 Feb;51(3-4):143-9.
5. Hayasaka D, Gritsun TS, Yoshii K, Ueki T, Goto A, Mizutani T, Kariwa H, Iwasaki T, Gould EA, Takashima I. Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol.* 2004 Apr;85(Pt 4):1007-18.
6. Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Sato Y, Hatano I, Harashima A, Suzaki Y, Yoshii T, Hashikawa T, Sata T, Horiuchi Y, Koike S, Kurata T, Nomoto A. A poliomyelitis model through mucosal infection in transgenic mice bearing human poliovirus receptor, TgPVR21. *Virology.* 2004 Mar 30;321(1):87-100.
7. Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, Shimizu H. Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *J Gen Virol.* 2004 Oct;85(Pt 10):2981-9.
8. Hasegawa H, Katano H, Tanno M, Masuo S, Ae T, Sato Y, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T. BCL-6-positive Human Herpesvirus 8-associated Solid Lymphoma Arising from Liver and Spleen as Multiple Nodular Lesions. *Leuk Lymphoma.* 2004 Oct;45(10):2169-72.
9. Watanabe K, Kikuchi M, Ohno A, Taha Mohamed R, Nara T, Ubalee R, Senba M, Iwasaki T, Chen H, Aoki Y, Hirayama K. The miniature pig: a unique experimental model for *Schistosoma japonicum* infection. *Parasitol Int.* 2004 Dec;53(4):293-9.
10. Iwasaki T, Itamura S, Nishimura H, Sato Y, Tashiro M, Hashikawa T, Kurata T. Productive infection in the murine central nervous system with avian influenza virus A (H5N1) after intranasal inoculation. *Acta Neuropathol (Berl).* 2004 Oct 8; 108: 485-92
11. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H. Naturally Acquired *Plasmodium knowlesi* Malaria in Human, Thailand. *Emerg Infect Dis* 2004; 10 (12): 2211-3

G. 知的所有権の取得状況

なし

Fig.1

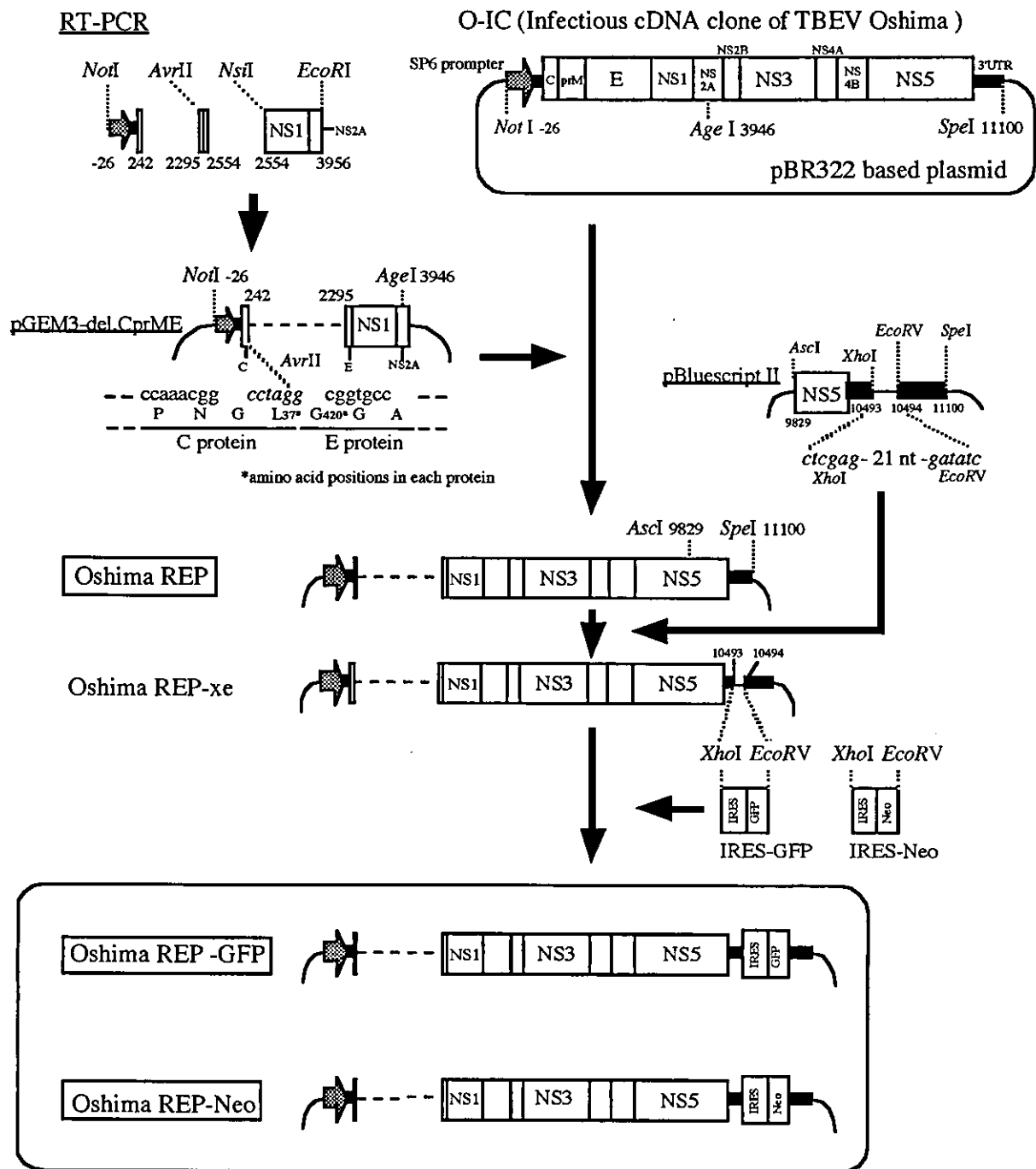


Fig. 2 A. Oshima REP, anti-Langat



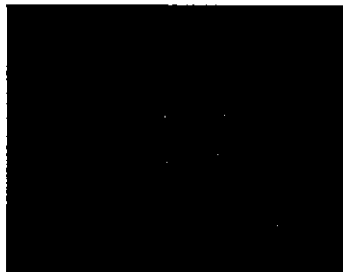
Oshima REP, DIC



B. Oshima REP-GFP, anti-Langat



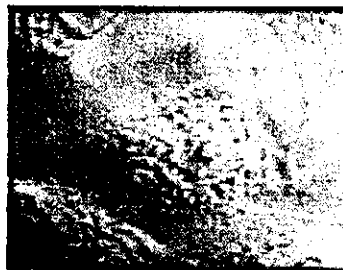
Oshima REP-GFP, EGFP



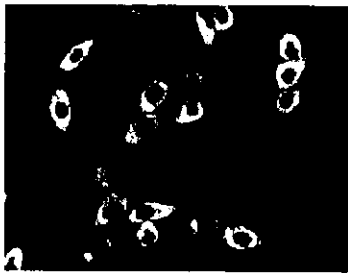
Oshima REP-GFP, merge



Oshima REP-GFP, DIC



C. Oshima REP-Neo, anti-Langat



Oshima REP-Neo, DIC



BHK, anti-Langat



BHK, DIC



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

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

分担研究項目：バベシア症の診断法の開発と疫学

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：わが国で近年野生化したアライグマにおける *Babesia microti* 様原虫の保有状況を調査した。北海道中西部で捕獲された 372 頭のうち脾腫を認めた 24 頭についてバベシア原虫の 18S rRNA 遺伝子を標的とした nested PCR を行い原虫検出を試みた。24 頭中の 2 頭が PCR 陽性となり、それらの DNA 塩基配列を調べたところ、米国のアライグマから検出された *B. microti* 様原虫のそれと同一であった。したがって、今回検出された *B. microti* 様原虫は米国から持ち込まれたもので、その感染サイクルはすでに北海道の一部の地域で定着しているものと考えられた。

A. 研究目的

Babesia microti は野生げっ歯類を主な自然宿主とする赤血球寄生原虫で、ヒトのバベシア症の主要な病原体としても知られている。ヒトにおける主な流行地は、米国北東部で、この地域ではシロアシマウス (*Peromyscus leucopus*) とシカマダニ (*Ixodes scapularis*) の間でバベシア原虫の感染サイクルが成立しており、ヒトはキャンプやハイキング等の野外活動中にマダニに刺されることにより偶発的に感染する。

わが国でも、1999 年に国内初のヒトバベシア症例が見つかり、レゼルボアとなる野生動物および媒介マダニに関する

野外疫学調査が我々のグループを中心に進められている。現在までの研究で、わが国には米国のものとはタイプの異なる日本固有の *B. microti* 様原虫（穂別タイプおよび神戸タイプ）が分布していること、穂別タイプが国内優占種であること、アカネズミ (*Apodemus speciosus*) が最も高頻度に原虫を保有しレゼルボアとしての中心的役割を担っていること、および、*Ixodes ovatus* や *Ixodes persulcatus* が媒介マダニであることなどが判明している。アカネズミ以外の野生げっ歯類としては、エソヤチネズミ、ミカドネズミ、ハタネズミ、また、食虫目のトガリネズミからも *B. microti* 様原

虫が分離あるいは検出されている。

これらの野ネズミ類（野生小型哺乳動物）から検出されるバベシア原虫は、いわゆる「狭義の *Babesia microti*」とその地理的変異種（あるいは亜種）として一括されるべきものであるのに対し、近年、米国では「広義の *Babesia microti*」と呼ばれる従来から知られているものとは進化系統的に若干隔たりのある *B. microti* 様原虫がアライグマ、キツネ、スカンクなどの食肉目（ネコ目）動物から続々と報告されるようになった。また、スペイン西部ではイヌにおける新たなバベシア症の流行が問題となっており、その病原体は米国のアライグマに寄生するものと非常に近縁な原虫であることが報告されている。

アライグマ (*Procyon lotor*) は北米大陸原産の動物であるが、日本にも 30 年余り前からペットとして多数輸入されており、現在では、北海道、神奈川県、岐阜県などで野生化している。特に北海道では、ここ 10 年程の間に個体数が爆発的に増加し、農作物への経済的被害に加え外来種による在来種の駆逐など生態系にも深刻な影響が出ている。北海道庁は 1999 年にアライグマ対策行動計画を策定し有害動物駆除に乗り出した。本研究において我々は、札幌市近郊で捕獲されたアライグマの血液材料を入手する機会に恵まれたので、バベシア原虫の保有状況を調べた。

B. 研究方法

調査対象としたアライグマは、2004 年 6 月から 11 月までの間に北海道中西部で捕獲され、酪農学園大学獣医学部野生動物医学センターに搬入されたものである。搬入個体は麻酔薬の過剰投与により安楽死させ、体重、性別、妊娠、脾臓の大きさ、吸血マダニの有無などを調べるとともに血液および組織材料の採取を行った。脾臓腫大の認められた個体の血液から DNA を抽出し、*B. microti* の 18SrRNA 遺伝子に特異的なプライマーを用いて nested PCR（標的領域 252bp）を行った。陽性検体については、18SrRNA 遺伝子のほぼ全長（1684 bp）を再度増幅し、プラスミドベクターにクローニング後 DNA 塩基配列の決定を行った。

C. 研究結果

捕獲されたアライグマの総数は 374 頭で、地域別の捕獲個体数の内訳は札幌 90 頭、江別 42 頭、北広島 77 頭、馬追丘陵（長沼、栗山、由仁）34 頭、夕張 8 頭、穂別 38 頭、追分 12 頭、鶴川 26 頭、苫小牧 45 頭であった。これらのうち剖検時に脾臓の腫大が認められたものは 25 頭（6.6%）で、それらの内訳は札幌 4 頭、江別 4 頭、北広島 5 頭、馬追丘陵 6 頭、追分 1 頭、苫小牧 4 頭であった。これら 25 頭の血液材料から DNA を調整し、*B. microti* の 18SrRNA 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。そ

の結果、2検体(8%)で陽性バンドが検出され、いずれも馬追丘陵で捕獲された個体のものであった。これら2検体から原虫の18SrRNA遺伝子塩基配列のほぼ全長(1684 bp)を再度増幅しシーケンシングを行ったところ、両者から同一の塩基配列(accession no. AB197940)が得られ、それらは米国のアライグマから検出された*B. microti*様原虫のもの(accession no. AY144701)と完全に一致していた。PCR陽性2個体中の1頭からは、血液塗沫標本の顕微鏡観察で赤血球に寄生するバベシア原虫を確認できた。これらのアライグマ個体に寄生していたマダニは*Ixodes ovatus*, *Ixodes persulcatus* および *Ixodes tanuki* であった。北海道の一部の地域では、これらのマダニのいずれかと野生化したアライグマの間で*B. microti*様原虫の感染サイクルが既に確立している可能性が高いと考えられた。

D. 考察

アライグマは1970年代からわが国に輸入され始め、1985年頃にペットとして販売ピークを迎えた。北海道におけるアライグマの最初の野生化は、1979年に恵庭市内において10頭程度の飼育個体は逃亡し、近郊の酪農地帯に定着したのが始まりと言われているが、その後もペットの逃亡や放逐が続き生息域を拡大させていったと考えられている。ただ、

実際に野生化したアライグマの個体数が爆発的に増加し、農作物被害や在来種駆逐等の問題が表面化したのは比較的最近のことで、事実、北海道庁が駆除対策に乗り出したのは1999年からである。米国由来のアライグマが日本で野生化した時期と今回我々が検出した*B. microti*様原虫の感染サイクルが成立・定着した時期との関係は、興味ある問題である。しかし、残念ながらこの点を過去に遡って検証する手段がないことから正確な推定は不可能である。ただ、この原虫は一旦宿主に感染するとほぼ生涯にわたって持続感染することが知られているので、わが国へ輸入・放逐されたアライグマの一部の個体が持続感染状態にあり、それらが原虫の供給源となったと想像される。すなわち、米国のアライグマが保有していた原虫が媒介能のある北海道のマダニと接触を持ったことが感染サイクル成立の端緒となった可能性が高いと考えられる。いずれにせよ、媒介マダニを特定することが今後の重要課題となろう。

本研究で検出された*B. microti*様原虫の18SrRNA塩基配列と類似の配列は米国のキツネやスカンクなどからも検出されている。これらのバベシア原虫が注目されるきっかけとなったのはスペイン西部におけるイヌのバベシア症の集団発生である。これは明らかな新興感染症で、病原体は当初タイレリア原虫の一種と報告されたが、後に、18SrRNAの解析から

*B. microti*のグループに属し、米国のアライグマに寄生する原虫と非常に近縁であることが判明した。欧州でも米国からペットとして輸入されたアライグマが野生化しており、それらが保有していた *B. microti* 様原虫が現地のマダニ (*Ixodes hexagonus*) に馴化する過程でイヌへの感染性を有する原虫に変異したのではないかと疑われている。したがって、わが国においても、アライグマの持ち込んだ *B. microti* 様原虫がイヌやキツネの間に感染を拡大させている可能性がないか今後監視を強める必要がある。

これまでにヒトへの起病性が確認されているのは、いわゆる「狭義の *B. microti*」に属するものだけであり、今回アライグマから検出されたような「広義の *B. microti*」に属する原虫のヒトに対する病原性については不明である。しかし、ごく最近我々は「広義の *B. microti*」に属するが完全な別種として扱われている *Babesia rodhaini* がヒト赤血球に容易に感染することを見い出している。このことは *B. microti* グループの系統に属する原虫全体が宿主の“種の壁”を超える潜在的能力をもっている可能性を示唆している。

E. 結論

近年わが国での野生化が問題となっている外来種であるアライグマから *B. microti* 様原虫を検出した。本原虫の

18SrRNA 遺伝子の塩基配列は、米国のアライグマから検出・報告されているものと完全に一致した。したがって、今回わが国で検出された *B. microti* 様原虫は米国から持ち込まれたもので、その生活環はすでに国内の一部で定着しているものと推定された。アライグマの持ち込んだ *B. microti* 様原虫がキツネやイヌの間に感染を拡大させている可能性がないか今後監視する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zamoto A., Tsuji M., Kawabuchi T., Wei Q., Asakawa M., and Ishihara C. U.S.-type *Babesia microti* isolated from small wild mammals in Eastern Hokkaido, Japan. J. Vet. Med. Sci. 66(8):919-926, 2004.
- 2) Zamoto A., Tsuji M., Wei Q., Cho S.-H., Shin E.-H., Kim T.-S., Leonova G. N., Hagiwara K., Asakawa M., Kariwa H., Takashima I., Ishihara C. Epizootiologic survey for *Babesia microti* among small wild mammals in northeastern Eurasia and a geographic diversity in the beta-tubulin gene sequences. J. Vet. Med. Sci. 66(7):785-792, 2004

- 3) Inokuma H., Tsuji M., Kim S.J., Fujimoto T., Nagata M., Hosoi E., Arai S., Ishihara C., and Okuda M. Phylogenetic analysis of *Theileria* sp. from sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Vet. Parasitol.* 120(4):339-345, 2004.
- 4) Kawahara M, Rikihisa Y, Isogai E, Takahashi M, Misumi H, Suto C, Shibata S, Zhang C, and Tsuji M. Ultrastructure and phylogenetic analysis of 'Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(5):1837-1843, 2004.
- 5) Watanabe M, Okuda M, Tsuji M, and Inokuma H. Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi prefecture and surrounding areas of Japan. *Vet. Parasitol.* 124(1-2):101-107, 2004.
- 3) 辻 正義、岡 秀樹、高橋弥生、石原 智明. *Babesia rodhaini* のヒト赤血球 順化と弱毒化の関連性. 第 138 回日本 獣医学会 札幌市 2004 年 9 月 10~ 12 日.
- 4) 中嶋留衣、辻 正義、石原智明. *B. microti* およびゲノム解析の進んだ真 核生物の CCT-etha 遺伝子の構造比較、 第 138 回日本獣医学会 札幌市 2004 年 9 月 10~12 日.
- 5) 川淵貴子、辻 正義、石原智明. *Babesia microti* Ho6 リピート配列の分離株別 マーカーとしての有用性. 第 138 回日 本獣医学会、札幌市、2004 年 9 月 10 ~12 日.
- 6) 新井 智、田原研司、板垣朝男、松田 裕朋、辻 正義、石原智明、岡部信彦. ダニ媒介性疾患の流行している島根県 で確認された Anaplasmataceae の遺 伝子、第 138 回日本獣医学会、札幌市、 2004 年 9 月 10~12 日.
- 7) 萩原喜久美、久保正法、納谷裕子、児 玉正義、大橋和彦、小沼 操、萩原克郎、 辻 正義、石原智明、岸川正剛. In vitro 系におけるウシ血液由来接着培養細胞 内で培養された *Theileria orientalis* の 超微形態学的観察. 第 138 回日本獣医 学会、札幌市、2004 年 9 月 10~12 日.
- 8) 辻 正義、桑原さと子、西田あつみ、 石原智明. *Babesia rodhaini* のヒト赤

2. 学会発表

- 1) 辻 正義. わが国におけるヒトのバベ シア症. 第 52 回日本輸血学会、札幌 市、2004 年 6 月 23~25 日.
- 2) 辻 正義. 動物由来感染症；東アジア におけるヒトのバベシア症. 台湾との 合同シンポジウム；動物の感染症と検 疫、札幌市、2004 年 10 月 20~21

血球への順化とそれに伴う毒力変化.
第137回日本獣医学会、藤沢市、2004
年4月2～4日.

- 9) 座本 綾、辻 正義、石原智明. ヤマト
マダニからの種別型 *B. microti* 様原虫
の分離. 第137回日本獣医学会、藤沢
市、2004年4月2～4日.
- 10) Malaika Watanabe、猪熊 壽、奥田 優、
辻 正義、Seroepidemiological study
of canine ehrlichial infections in
Yamaguchi Prefecture and surrounding

areas. 第137回日本獣医学会、藤沢
市、2004年4月2～4日.

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

回帰熱の診断と疫学－回帰熱ボレリアの抗原解析

分担研究者 福長 将仁 福山大学薬学部 教授

研究要旨：回帰熱ボレリア菌体表層蛋白は、ボレリア抗原変換の本体である。感染初期に発現する菌体表層抗原蛋白のひとつ (VmpP) 遺伝子をクローン化して、発現蛋白を精製、ウサギ免疫血清から抗体を得た。ついでこの特異抗体を用いてVmpP抗原のエピトープを解析した。まずVmpP抗原を30アミノ酸断片に切り、GST融合蛋白として発現、ウェスタンブロット解析により反応領域を限定、反応陽性断片をさらに細かく区切り、最終的にエピトープを15アミノ酸残基にまで絞り込んだ。その結果、アミノ酸一次配列からの推定立体構造のループ領域がエピトープとなっていることが示唆された。もう一つの抗体反応領域はC末端部分で、ライム病ボレリア菌体表層蛋白OspCの推定エピトープと一致した。

A. 研究目的

回帰熱 (relapsing fever) は人畜共通感染症で、ヒトのほかウシやトリに病原性を示す種もある。媒介節足動物はシラミまたはダニ (*Ornithodoros moubata*) で、衛生状態不良な地域に流行する。感染はベクターダニが宿主を刺咬する際、唾液とともに病原体ボレリア (*Borrelia duttonii*) が宿主体内に侵入しおこる。感染約1週間後、菌血症による頭痛、筋肉痛、関節痛、咳などを伴う発熱、悪寒がおこる。発熱期は3～7日間続き、このときボレリアが血液中に検出されるが、発症に伴い病原体表層抗原に対する体液性免疫が働き、ボレリアは血中から消失、無熱期に入る。しかし4～10日後には

再び発熱期を迎え、病態は発熱期と無熱期を3～7回繰り返しながら次第に軽快していく。この特徴的な発熱と解熱の回帰は、宿主の免疫機構による攻撃から逃れた一部のボレリアが抗原変換を起こし、再び血液中で増殖するためである。

シラミ媒介性の回帰熱に比較してダニ媒介性のものの致死率は概して低い。しかし、我々の調査地域であるタンザニア中部での感染者のほとんどは5歳以下の乳幼児で、慢性的な栄養不足と相まって致死率は高く(第2位)、この年齢層の最大の死亡原因である。これまで、殺虫剤によるダニの駆除、就寝時ネットを使用してダニ刺咬防止などが試みられたがいずれも効果を上げるに至っていない。

また、頻繁に抗原変換を起こすために有効なワクチンも無い。

回帰熱ボレリアにおける抗原変換は菌体表層蛋白 (variable major protein, Vmp) 遺伝子が、プラスミド分子内または分子間組換えにより起こる。遺伝子は約 1kbp で蛋白分子量 33~36 kDa の Vlps (variable large proteins)、約 600bp (22~23 kDa) の Vsps (variable small proteins) の二つのファミリーがある。本研究目的は、ボレリアの病原性すなわち抗原変換メカニズムにおける菌体表層蛋白の抗原構造を解明すること、さらに初期発現蛋白のエピトープを持つ感染防御ワクチンを創製することである。

B. 研究方法

1. PCR 法による VmpP 遺伝子作成
遺伝子上 N 末端からそれぞれ 15 番目のシステイン、34 番目、58 番目のセリンを開始コドンとしたセンスプライマーと C 末端部分のアンチセンスプライマーを用い、シグナル蛋白部分含まない蛋白遺伝子を作成した。
2. GST 融合蛋白発現
ついで組み換えプラスミドを作成、大腸菌内で発現させた GST 融合蛋白は菌体を超音波破碎して調整、さらに Glutathione Sepharose 4B カラムに吸着、PBS で洗浄後、スロンピンを添加して GST を切断、目的蛋白を溶出した。
3. 抗 VmpP 抗体作成
ウサギに、精製蛋白を complete freund adjuvant (DIFCO) と混合し

たものを皮内注射、2 週間後背部に再接種して追加免疫を行った。さらに 2 週間後、前回と同様に皮下注射、1 週間後ウサギの耳深静脈から血液を採取、抗血清を得た。抗 VmpP 抗体はプロテイン G カラムで精製してエピトープ解析に用いた。

4. 抗原断片の作成

VmpP 塩基配列をもとにプライマーを作成して、VmpP 蛋白のそれぞれの末端が 5 アミノ酸ずつ重複するような 30 アミノ酸ごとの断片を 13 個作成した。これらを GST 融合蛋白として発現させ、ウェスタンブロッティングにより確認、密度は電気泳動画像解析ソフトウェア Intelligent Quantifier (Bio Image) を用い定量、抗 VmpP 抗体と各断片の反応性を確認した。反応が強い断片についてさらに 15 アミノ酸ずつ 3 断片に区切り、同様に GST 融合蛋白として発現させ定量後、ウサギ抗 VmpP 抗体との反応性を確認した。

C. 研究結果

VmpP 遺伝子を断片化し、それぞれ発現させた 13 のペプチドのうち 5 断片 [f3 (65-94aa)、f6 (140-169aa)、f9 (215-244aa)、f11 (265-294aa)、f13 (315-355aa)] が抗体に対して反応した。この陽性断片をさらに 15 アミノ酸ごとに細分化して抗原性を確認した。

その結果、それぞれの蛋白断片のうち f3-b (73-87aa)、f6-c (155-169aa)、f9-b (223-237aa)、f11-c (280-294aa)、

f13-d (342-355aa) に強いシグナルが認められた。この 15 アミノ酸残基からなる断片のうち、一次構造から推定される立体構造において蛋白の外部ループ領域に相当するものは f9-b の (226-228aa) であった。また f13-d (342-355aa) にも強いシグナルが得られたが、この領域 (345aa から C 末端まで) の立体構造は推定できなかつた。

D. 考察

すでに立体構造が報告されているライム病ボレリアの表層蛋白 VlsE や OspC では α らせん構造に可変領域が確認され、この領域がエピトープであろうとされている。このことから、本反応で陽性の 5 断片 (30aa) は α らせん構造をとる可能性が高い。一般にエピトープは約 5-8 個のアミノ酸で構成されるので、これら反応陽性断片をさらに細分化、GST 融合蛋白として発現させた。ついで抗体との反応性を確認して、それぞれ 15 アミノ酸にまで抗原部位を絞り込んだ。すでに立体構造が報告されているライム病ボレリア菌体表層蛋白 OspA はダニ中腸内で発現し、宿主感染時に温度変化を感知して発現量が低下、かわりに OspC がアップレギュレートされる。この OspA の構造は主にアンチパラレルな β 鎖で構成され、C 末端の外側に位置する可変領域がエピトープと考えられている。OspC の立体構造は OspA と対照的で、主に α らせん構造で構成され、回帰熱ボレリア菌体表層蛋白 Vsp はアミノ酸配列の類似性から OspC と似た立体構造

をとるものと考えられる。OspC の C 末端領域は細胞膜から露出し、末端の 10 アミノ酸 (PVVAESPCKP) が抗原エピトープになっているので、VmpP も同様に f13-d が抗原エピトープとなっている可能性が高い。

現在、ライム病ボレリア感染に有効なワクチンとして OspA が感染予防に使用されているが、回帰熱ボレリアに有効なワクチンはない。これは回帰熱ボレリアが宿主感染時に多様な抗原性を示すことが原因である。今後、エピトープ同定や共通抗原の探索とあわせて、Vmp 蛋白の X 線構造解析を進めていく。立体構造解析と、生物学的なエピトープ解析データを比較しながら、回帰熱ボレリアの抗原変換メカニズムの解明、さらには回帰熱に対する有効なワクチンの開発にもつなげていく計画である。

E. 結論

回帰熱ボレリア抗原蛋白 VmpP のエピトープ解析を行って、15 アミノ酸残基まで絞り込むことが出来た。抗体に強く反応する領域は推定立体構造において、f9-b (226-228aa、外部ループ領域に相当) と f13-d (342-355aa、C 末端領域) であった。

F. 健康危険情報

回帰熱は 4 類感染症に指定されているが戦後国内での発症例はない。しかしながら、近年都市部の路上生活者にコロモジラミが増加し、いったん回帰熱ボレリアが国内に持ち込まれるや流行する素地

がある。このため回帰熱流行地域からの帰国者やげっ歯類、貨物に紛れての病原体保有ダニの持ち込みを防止しなければならない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Mitani H., Talbert A. & Fukunaga M. New World relapsing fever *Borrelia* found in *Ornithodoros porcinus* ticks in central Tanzania. *Microbiol. Immunol.*, 48(7):501-505, 2004.

2) Shao R., Aoki Y., Mitani H., Tabuchi N., Barker SC. & Fukunaga M. The mitochondrial genome of soft ticks have an arrangement of genes that has remained unchanged for over 400 million years. *Insect Mol. Biol.*, 13(3):219-224, 2004.

3) Shao R., Barker SC., Mitani H., Aoki Y. & Fukunaga M. Evolution of duplicate control regions in the mitochondrial genomes of metazoa: a case study with Australasian *Ixodes* ticks. *Mol. Biol. Evol.*, 22(3):620-629, 2005.

4) Shao R., Mitani H., Barker SC., Takahashi M. & Fukunaga M. Novel mitochondrial gene content and gene arrangement indicate illegitimate inter-mtDNA recombination in the chigger mite, *Leptotrombidium pallidum*. *J. Mol. Evol.*, 60(6), in press, 2005.

2. 学会発表

1) 田淵紀彦、岩切大輔、三谷春美、福長将仁. 回帰熱ボレリア *Borrelia duttonii* Ly 株 recA 遺伝子の同定および発現. 第 77 回日本細菌学会総会. 大阪市、2004 年 4 月.

2) 三谷春美、福長将仁. フトゲツツガムシ (*Leptotrombidium pallidum*) ミトコンドリア遺伝子構成ーダニ類との比較. 第 12 回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー. 鹿児島県屋久島、2004 年 6 月.

3) Shao R., Barker SC., Mitani H. & Fukunaga, M. Mitochondrial gene arrangements of Acari and their phylogenetic utility. NRCPD/COE/BRAIN - Obihiro International Symposium. 帯広畜産大学、帯広市、2004 年 8 月.

4) Shao R., Mitani H., Barker SC., Takahashi M. & Fukunaga M. Novel organization of the mitochondrial genome of a chigger mite: implications on Acari phylogeny and mtDNA recombination. XXII International Congress of Entomology, Brisbane, Australia, August 2004.

5) 友田幸一郎、田淵紀彦、福長将仁. 回帰熱ボレリア表層蛋白抗原のエピトープ解析. 第 57 回日本細菌学会中国・四国支部総会. 広島市、2004 年 10 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況なし。

(別添 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 |
|--|---|----------------|-----|-----------|------|
| Yoshii, K., Konno, A., Goto, A., Nio, J., Obara, M., Ueki, T., Hayasaka, D., Mizutani, T, Kariwa, H., Takashima, I. | Single point mutation in tick-borne encephalitis virus prM protein induces a reduction of virus particle secretion. | J. Gen. Virol. | 85 | 3049-3058 | 2004 |
| Araki, K., Yoshimatsu, K., Lee, B-H, Okumura, M., Kariwa, H., Takashima, I., Arikawa, J. | Age-dependent hantavirus-specific CD8+ T-cell responses in mice infected with Hantaan virus. | Arch. Virol. | 149 | 1373-1382 | 2004 |
| Hayasaka, D., Gritsun, T. S., Yoshii, K. Ueki, T., Goto, A., Mizutani, T., Kariwa, H., Iwasaki, T., Gould, E. A., Takashima, I. | Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of Tick-borne encephalitis virus. | J. Gen. Virol. | 85 | 1007-1018 | 2004 |
| Hayasaka, D., Yoshii, K., Ueki, T., Iwasaki, T., Takashima, I | Sub-genomic replicons of Tick-borne encephalitis virus. | Arch. Virol. | 149 | 1245-1256 | 2004 |
| Araki K, Yoshimatsu K, Lee B-H, Okumura M, Kariwa H, Takashima I, 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 |
| Lokugamage, K., Kariwa, H., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Iwasa, M. A., Hagiya, T., Akaki, K., Tachi, A., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I. | Genetic and antigenic characterization of the Amur virus associated with hemorrhagic fever with renal syndrome. | Virus Research | 101 | 127-134 | 2004 |

(別添 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 |
|---|--|-------------------|------------|-------------|------|
| Iwasa, M. A., Kariwa, H., Cui, B. Z., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Hagiya, T., Mizutani, T., Takashima, I. | Modes of hantavirus transmission in a population of <i>Clethrionomys rufocanus bedfordiae</i> inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses. | Arch. Virol. | 149 | 929-941 | 2004 |
| Lokugamage, K., Kariwa, H., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Iwasa, M. A., Hagiya, T., Akaki, K., Tachi, A., Mizutani, T., Yashimatsu, K., Arikawa, J., Iwasaki, T., Takashima, I. | Comparison of virulence of various hantaviruses related to hemorrhagic fever with renal syndrome in newborn mouse model. | Jpn. J. Vet. Res. | 51 | 3-4 | 2004 |
| Lokugamage, N., Kariwa, H., Lokugamage, K., Iwasa, M. A., Hagiya, T., Yoshii, K., Tachi, A., Ando, A., Fukushima, H., Tuchiya, K., Iwasaki, T., Araki, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Tetsuya, T., Osawa, K. Sato, H. Takashima, I. | Epizootiological and epidemiological study of hantavirus infection in Japan. Microbiol. | Immunol. | 48 | 843-851 | 2004 |
| Ogino, M., Yoshimatsu, K., Ebihara, H., Araki, K., Lee, B. H., Okumura, M., Arikawa, J. | Cell fusion activities of Hantaan virus envelope glycoproteins. | J. Virol. | 78 (19) | 10776-10782 | 2004 |
| Okumura, M., Yoshimatsu, K., Araki, K., Lee, B. H., Asano, A., Agui, T., Arikawa, J. | Epitope analysis of monoclonal antibody E5/G6, which binds to a linear epitope in the nucleocapsid protein of hantaviruses. | Arch. Virol. | 149 | 2427-2434 | 2004 |

(別添 5-3)

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|---|--|---------------------|----|-----------|------|
| Andoh, M., Nagaoka, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H., and Hirai, K. | Comparison of Japanese Isolates of <i>Coxiella burnetii</i> by PCR-RFLP and Sequence Analysis. | Microbiol. Immunol. | 48 | 971-975 | 2004 |
| Hotta, A., Zhang, G. Q., Andoh, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K. | Use of monoclonal antibodies for analyses of <i>Coxiella burnetii</i> major antigens. | J. Vet. Med. Sci. | 66 | 1289-1291 | 2004 |
| Andoh M, Naganawa T, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K: | In vitro susceptibility to tetracycline and fluoroquinolones of Japanese isolates of <i>Coxiella burnetii</i> . | Microbiol. Immunol. | 48 | 661-664 | 2004 |
| Maruyama, S., Izumikawa, K., Miyashita, M., Kabeya, H., Mikami, T., Yamanouchi, H., Sasaki, E., Yoshida, H., Izumikawa, K. | First isolation of <i>Bartonella henselae</i> type I from a cat-scratch disease patient in Japan and its molecular analysis. | Microbiol. Immunol. | 48 | 103-109 | 2004 |
| 丸山総一 | 猫ひっかき病 | モダンメチア | 50 | 203-211 | 2004 |
| Horisaka, T., Fujita, K., Iwata, T., Nakadai, A., Okatani, A. T., Horikita, T., Taniguchi, T., Honda, E., Yokomizo, Y., Hayashidani, H. | Sensitive and specific detection of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> by loop-mediated isothermal amplification. | J. Clin. Microbiol. | 42 | 5349-5352 | 2004 |
| Iwata, T., Une, Y., Okatani, A.T., Kneko, S., Namai, S., Yshida, S., Horisaka, T., Horikita, T., Nakadai, A., Hayashidai, H. | <i>Yersinia enterocolitica</i> Serovar O:8 Infection in Breeding Monkeys in Japan | Microbiol Immunol | 49 | 1-7 | 2005 |

(別添 5-4)

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|--|---|---------------------|--------|---------|------|
| Zamoto, A., Tsuji, M., Kawabuchi, T., Wei, Q., Asakawa, M., Ishihara, C. | U.S.-type Babesia microti isolated from small wild mammals in Eastern Hokkaido, Japan. | J. Vet. Med. Sci. | 66 | 919-926 | 2004 |
| Zamoto, A., Tsuji, M., Wei, Q., Cho, S.-H., Shin, E.-H., Kim, T.-S., Leonova, G. N, Hagiwara, K., Asakawa, M., Kariwa, H., Takashima, I., Ishihara, C. | Epizootiologic survey for Babesia microti among small wild mammals in northeastern Eurasia and a geographic diversity in the beta-tubulin gene sequences. | J. Vet. Med. Sci | 66 | 785-792 | 2004 |
| Watanabe, M., Okuda, M., Tsuji, M., Inokuma, H. | Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi prefecture and surrounding areas of Japan. | Vet. Parasitol. | 124 | 101-107 | 2004 |
| Shao, R. Aoki, Y. Mitani, H. Tabuchi, N. Barker, S.C., Fukunaga, M. | The mitochondrial genomes of soft ticks have an arrangement of genes that has remained unchanged for over 400 million years. | Insect Mol Biol | 13 | 219-224 | 2004 |
| Mitani, H., Talbert, A., Fukunaga, M. | New World relapsing fever Borrelia found in Ornithodoros porcinus ticks in central Tanzania. | Microbiol. Immunol. | 48 | 501-505 | 2004 |
| Shao, R., Barker, S. C., Mitani, H., Aoki, Y, Fukunaga, M. | Evolution of duplicate control regions in the mitochondrial geneomes of metazoa: a case study with Australasian Ixodes ticks. | Mol. Biol. Evol. | 22 (3) | 620-629 | 2004 |

IV. 研究成果の刊行物別冊