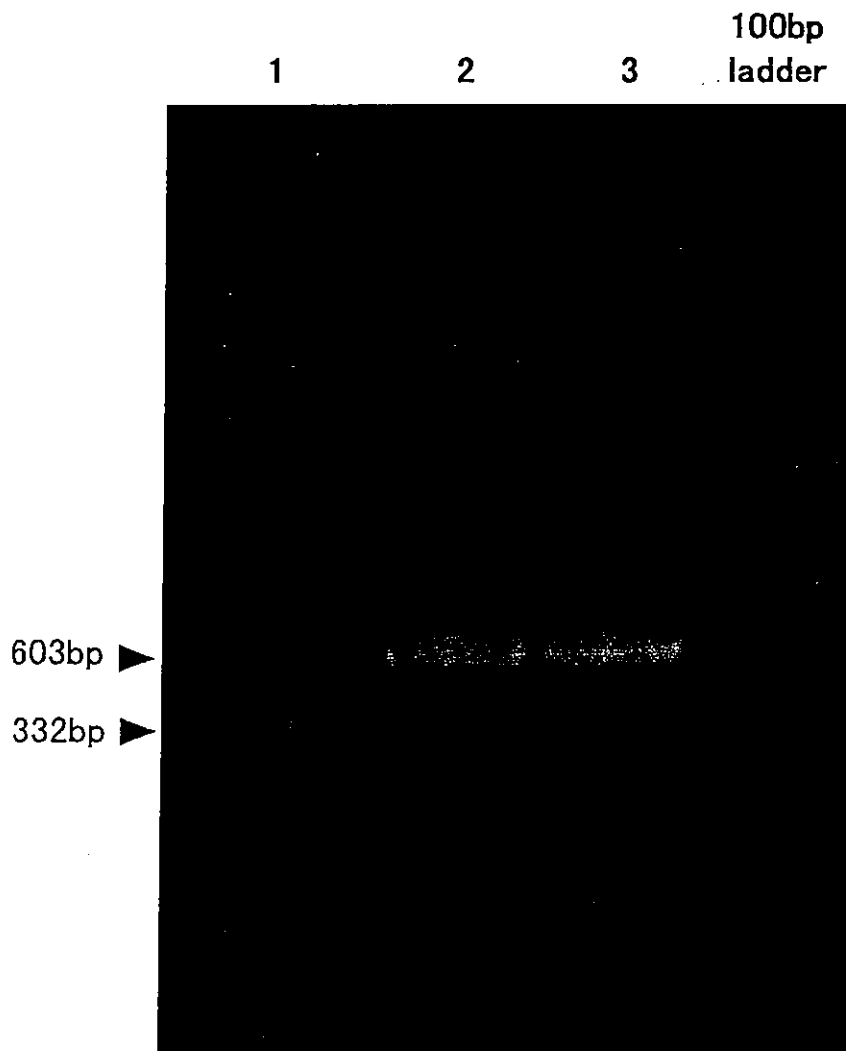


図3: 作出した陽性対照DNAのPCR産物泳動像
— *pag* 遺伝子 —



Lane 1: PAshort-pGEM
2: PA-pGEM
3: *E. coli* 16S rRNA 603bp

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

人獣共通感染症としてのパラミキソウイルス感染とその診断

(代表研究者:山田章雄)

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 安部優子、早坂大輔、森田公一 (長崎大・熱帯医学研)

佐藤由子、永田典代、佐多徹太郎 (国立感染研・感染病理部)

渡辺洋二、佐藤浩 (長崎大・先導生命研究支援センター)

西村秀一 (国立病院仙台医療センター)

Wong Kum Thong (マレーシア・クアラルンプール市・マラヤ大・医学部)

研究要旨 パラミキソウイルス科のウイルスを対象とし、人獣共通感染症を引き起こす可能性が指摘されている、あるいは考えられるウイルスを絞り込むためレスピロウイルス、ニバウイルスを主として、人体感染組織の診断に有用な抗体ならびに血清診断に必要な抗原を作製し、樹立した抗体を用いて、人体から分離されたウイルス、あるいはこれらのウイルスが感染している人体組織病変内の感染細胞の検出法を確立した。

A. 研究目的

本研究では人獣共通感染症の病理学的診断に必要な方法を開発し、実際の人体例での組織診断に適用し、さらに血清学的診断の応用することを目的としている。今年度はパラミキソウイルス科のウイルスを対象としてこれまで行ってきた研究について報告する。

オーストラリア北東部ヘンドラとマレー半島においてコウモリ由来の感染症が新興した。前者のアウトブレイクではウマ・ヒトを宿主とし、後者ではブタ・ヒトを宿主とした。感染したヒトが高率に致死の転機を示すことより全世界的に注目され、それぞれヘンドラウイルスとニバウイルスが分離され、パラミキソウイルス科に属し、これらのウイルスの抗原に交差性が存在することがウイルス学的に明らかにされた。おそらくは fruit bat が自然宿主とさらに 2004 年

にはバングラディッシュにおいてニバウイルス感染が再度出現し、新たな脅威をもたらした。一方、2001 年には新しいパラミキソウイルスとしてヒトメタニューモウイルスが分離された。

これらのウイルスの系統樹を図 1 に示す。近年、パラミキソウイルス科のウイルス分類はかなり変更している。問題とされたニバウイルス並びにヘンドラウイルスは麻疹ウイルス等のモルビリウイルス morbilliviruse とヒト

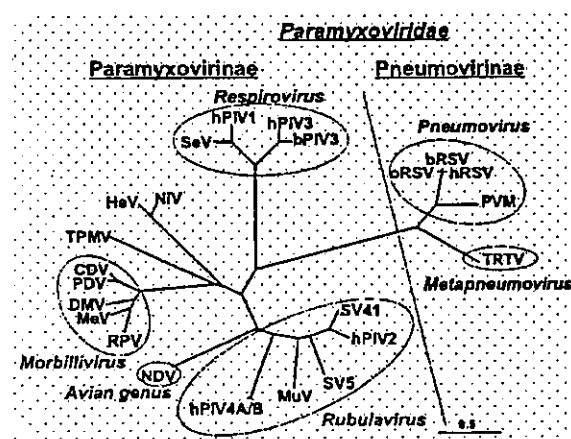


図1 パラミキソウイルス科ウイルスの系統樹
hPIV, human parainfluenza virus; SeV, sendai
virus; NIV, Nipah virus; HeV, Hendra virus;
MeV, Measles virus; MuV, mumps virus

パラインフルエンザウイルス human
parainfluenza virus (HPIV) 1型と3型のレスピ
ロウイルス respiroviruses の中間に位置する。
HPIV2型と4a・4b型はルブラウイルス
rubulaviruseae とされ、さらにRSウイルス・
メタニューモウイルス等はニューモウイル
ス属 pneumovirinae として異なる属に区別さ
れる。

レスピロウイルスの一つである HPIV1 と
マウスから分離されたセンダイウイルスは
非常に近似している。また、共同研究者の渡
辺と佐藤によりモルモットより分離された
PIV3-gp は HPIV3 と塩基配列が非常に類似し、
系統発生とともに分化したとは考えがたく、
近年、モルモットとヒト間で伝播された歴史
が有ったウイルスと考えられる。このように
系統樹をみた場合、図の左半分のウイルスに
は人獣共通感染の可能性を少なくとも否定
する必要があると考える。そこで、本年は
HPIV1, HPIV2, HPIV3, Nipah ウイルスのヌク
レオ蛋白(NP)を試験管内で大量に調整し、こ
の調整した抗原をウサギに免疫することに
より、抗血清を作製し、作製した抗体を用い
て実際のウイルス分離への応用、人体組織な
らびに実験的にウイルスを接種した動物組
織における免疫組織学的解析に応用した。

B.方法

1. ウイルス: マレーシアで1998年のアウト

ブレイク時に分離されたニパウイルス、国
立病院機構仙台医療センターのウイルスセ
ンターで分離された HPIV1 と HPIV2、長崎
大学動物実験施設で分離された PIV3-gp を
対象とした。これらのウイルスは所定の条
件で分離されている。

2. ウイルスゲノムの抽出: 予め加熱により
感染性を不活化させたウイルス粒子より、
フェノール・グアニジウムチオサイアネー
ト法を用いて、ウイルスゲノムを抽出した。
具体的には3倍量の Trizol (Invitrogen)を加
え、よく混合させた。半量のクロロフォル
ムを加え混合後遠心し、上清中の RNA をイ
ソプロパノールを加えて析出し、遠心し、
沈渣を80%エタノールで洗浄後、RNase-free
DW に溶解させた。

3. cDNA ならびに目的の nucleoprotein 遺伝
子(np)のPCRによる増幅:cDNA は原則的に
は random hexamer を用いてプライムし、first
strand cDNA synthesis kit (Roche)により作製
した。np の塩基配列のPCRによる増幅には
以下のプライマーを合成して行った。

Table 1. Oligonucleotide primers used in this
study

Nipah virus np (NC_002728) np
F TGG ATC CTC ATG AGT GAT ATC TTT G
R GGG GAT CCA CGT CAC ACA TCA GCT CT

HPIV1 np (NC_003461) np
F GTA TGG ATC CTT ATA GCC GGG CTA C
R CTG AAT TCT ATT GTC CAA GTA TCC

HPIV2 np (NC_003443) np
F GGA TCC AAA TGT CAA GTG TTT TAA AG
R GAA TTC GAG AGT TAG GAA TCA AAA TC

PIV3-gp (AB012132) np
F AGG ATC CCA AAA ATG TTG AGC CTA TTT
R TGG ATC CGA TTA GTT GCT TCC AAA TGC

4. pGEM-T への TA クローニングと

pGEX-3X へのサブクローニング: PCR により np の予想サイズの増幅産物が得られた場合、TA クローニング法を用いて pGEM-T ベクター(Promega)に分子クローニングを行った。定法通りに大腸菌 DH5 α に形質導入し、得られたコロニーが目的の塩基配列を有しているかどうかについて、コロニーの少量培養後、プラスミド DNA を調整し、制限酵素を用いて解析した。目的の np 遺伝子の塩基配列の存在が確認された組換えプラスミド DNA を PCR プライマーに人工的に導入した制限酵素認識サイトを認識する酵素で切断し、pGEX-3X (Amersham) にサブクローニングを行った。同様に少量培養により目的の塩基配列を有した有した組換えプラスミドは最終的に dideoxy-sequencing 法を用いて、塩基配列を解析し、frame-shift、あるいは問題となる mutation が無いことを確認した。

5. 蛋白発現: 目的の np 遺伝子を有した pGEX-3X 組換えプラスミドを用いて定法により蛋白発現を行った。具体的には一晚 overgrowth させた培養を 20 倍に培地で希釈後再び培養し、OD₆₀₀ が 0.1-0.2 となった時点で IPTG を最終 0.1 mM となるように加え、さらに 2-4 時間培養し、集菌した。集菌した大腸菌を PBS(-) で洗浄後、0.1% Triton X100、2M Urea、4M Urea における発現蛋白の可溶性を検討した。最終的に効率よく溶解する条件で、上精を集め、glutathione-sepharose により、発現している GST 融合蛋白を affinity 法にて回収した。回収蛋白は Bradford 法により蛋白定量を行った。

6. 抗体作製: 精製したレコンビナント蛋白を Freund complete adjuvant とともに New Zealand シロウサギの皮下に接種し、その後

ブースターを 4 回追加した。1 回の免疫の際に 100 μ g の蛋白を免疫した。4 度免疫した時点で耳静脈より採血し、接種抗原の western プロットを用いて定量し、1000 倍以上の抗体価が確認できた時に全採血を行った。全採血後、血清は 1-1.5 ml 量に分割し、-80 度に保存した。

7. 抗体の認識する抗原の解析

培養系の細胞を用いてウイルス増殖を行うことが可能なウイルス PIV1-3 に関しては LLC-MK2 あるいは MDBK 細胞にウイルスを接種し、一定時間後、培地を取り除き、PBS(-) で洗浄後、免疫抗体法あるいは western blot 法を用いて、作製した抗体が感染細胞に出現する NP を認識できるかどうかについて検討した。

8. 組織標本を対象とした免疫組織化学的解析: PIV3 に関してはモルモット (Hartley strain)、ラット (SD, F344 nude)、マウス (ICR, ICR nude, BALB/c SCID) を用い、経鼻接種に依る感染実験を行い、一定時間後に気管と肺を採材し、気管よりカニューレで緩衝ホルマリンを注入し固定した。固定後通常の方法でパラフィン包埋し、厚さ 2-2.5 μ m の薄切切片を作製した。この薄切切片は通常の光学顕微鏡による観察のための hematoxylin-eosin 染色と、作製した抗体の解析のための免疫組織学的解析に使用した。免疫組織学的解析は脱パラフィン後、0.3% 過酸化水素・メタノール液中で内因性の peroxidase 活性を失活させ、必要に応じて抗原を賦活させ、正常ヤギ血清でブロッッキング後、希釈段階を作製した一次抗体 (作製したウサギ血清) と反応させ、linked streptavidin-peroxidase (LSAB) 法により、結合した一次抗体を検出した。発色基質

には diaminobenzidine を用い、核染色には methylgreen あるいは hematoxylin を使用した。

C. 結果

1. 各 np 遺伝子の増幅とクローニング

設計したプライマーを用いた各ウイルスの np 遺伝子の増幅産物の大きさは予想サイズ(Nipah virus np, 1 599 bp; HPIV1 np 1 682 bp; HPIV2 np 1 629 bp; PIV3-gp np, 1570 bp)であった。これらの増幅産物を pGEM-T ベクターにクローニングした際に、とくに予想と異なる事象は観察されず、問題なく組換え体が作製された。これらの組換え体を、プライマーの制限酵素認識サイトを認識する酵素で切断した際の断片の大きさも予想サイズであり、予めクローニングサイトを切断し、phosphatase 処理を行った発現ベクター-pGEX-3X にサブクローニングし、目的の方向でかつサイズが合致する組換え体について、dideoxy-sequencing により塩基配列を解析し、frame shift が無いことと問題となる mutation が無いことを確認した。

2. GST 融合 NP 遺伝子産物の発現

IPTG 添加により大腸菌において誘導が発現された GST 融合蛋白はニパウイルス np を除き、12% SDS-PAGE の SYPRO-Orange 染色で容易に観察することができた。PIV3-gp の npGST 融合蛋白のサイズは 85 kDa 前後で GST が 29 kDa で、np のアミノ酸配列から予想されるサイズは 58 kDa で融合蛋白としては 87 kDa であるからほぼ一致する。一方、同じレスピロウイルスの HPIV1 の融合蛋白の大きさは PIV3-gp とほぼ同一であり、これもアミノ酸配列からの予測値と同じである。一方、ルブラウイルスの HPIV2 は HPIV1, PIV3-gp よりやや大きく、90 kDa 前後である。確かにアミノ酸配列上

からの予測値もやや大きく 60 kDa である。ニパウイルスの np の融合蛋白は SDS-PAGE 上はやや小さく 68kDa であったが、塩基配列の結果を優先して、このクローンを用いて蛋白発現を行った。

3. 作製した抗体の解析

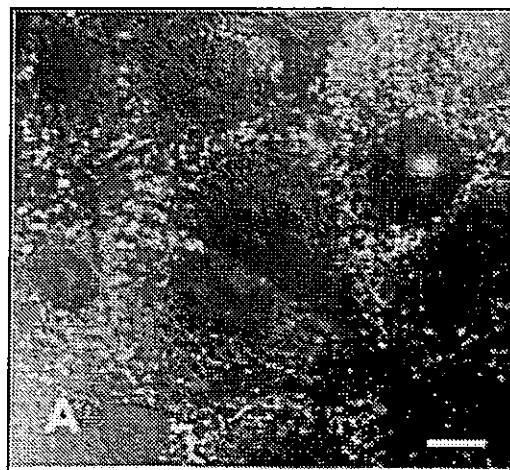
a. 抗ニパウイルス np 抗体

現在ニパウイルスの培養細胞を用いた感染実験は行っていないため、この抗体の特異性は大腸菌で GST 融合蛋白で発現させた pGEX-3X NVnp クローンの塩基配列が目的通りの配列であり、この抗体が抗原とした大腸菌発現蛋白と western プロットで高い希釈濃度で反応するという状況証拠のみを得ている。

b. 抗 PIV3-gp np 抗体

作製した抗体の特異性については PIV3-gp の感染細胞の蛍光抗体法による形態学的解析と感染細胞を抗原とした western プロット解析により確認した。

最初に MOI 3 にて感染させた MDBK 細胞を接種後 16 時間後に PBS(-)で洗浄後、ホルマリンで固定した。0.1% Triton X100/PBS(-)で処理をした後に種々に希釈した抗血清と、3 度 PBS(-)で洗浄後、蛍光色素で標識した抗ウサギ IgG 抗体と反応させ、confocal laser microscopy を用いて解析した。同時に非感染細胞を対照とし、これらの希釈濃度では交差反応が存在しないことも確認した(図 2)。



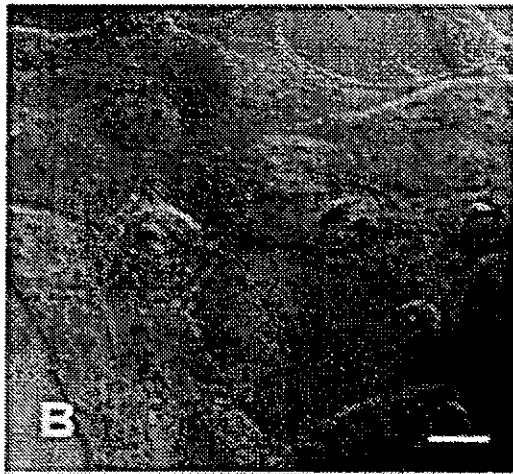


図2 PIV3-gp 感染(A)ならびに非感染(B) MDBK 培養細胞における作製した抗 PIV3-gp np 抗体を用いたウイルス NP 抗原の局在の検討。FA+DIC。

この図で明らかなように NP 抗原は正常の MDBK 細胞との交差性は無く、感染細胞の細胞質に微細線維状あるいは細顆粒状に局在していることが明らかとなった。この分布様式は NP が細胞質内のアクチンと結合して存在しているという過去の文献とも一致している。また、核内には NP 抗原は検出されず、この所見はインフルエンザウイルスとは明らかに異なる。

次に western ブロット解析を用いて抗血清が認識する抗原のサイズを検討した。対照として非感染の MDBK 細胞を用いた。対照との反応性は殆ど存在せず、感染細胞のサンプルにのみ存在する 86 kDA の大きさのバンドと主として反応した。この大きさはアミノ酸配列の予測値とは非常に異なるが、過去にウイルス粒子を SDS-PAGE で解析した結果とは一致し、NP 蛋白と判断した。

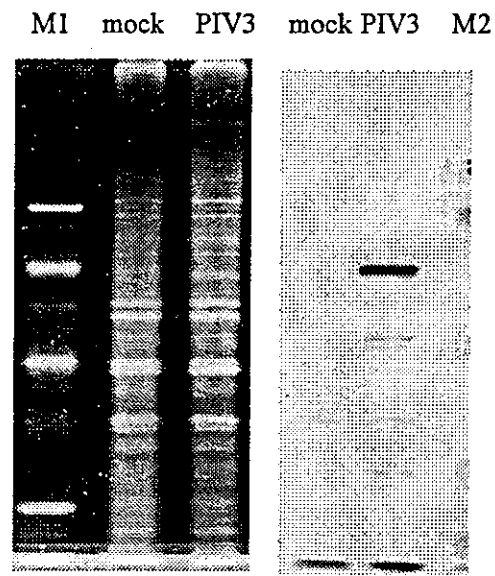


図3 作製した抗体と MDBK 感染細胞 (PIV3)と非感染細胞(mock)との反応性。左側は 12%SDS-PAGE を SYPRO-orange で染色し、紫外線下で観察した。右側はプロットした膜との免疫染色。

さらに、この抗体については血球凝集反応を用いて型別した臨床分離株を対象とし、この抗体が 3 型特異であることを一部の株で確認した。

c. 抗 HPIV1 np 抗体・抗 HPIV2 np 抗体：これらの抗体は現在、検討が進行中で、免疫抗原との反応性、臨床分離株との反応性は確認している。今後、PIV3-gp 同様に蛍光抗体法と western ブロット法を用いて解析する予定である。

4. 免疫組織学的解析

これまでにニパウイルス感染人体組織ならびに実験的に PIV3-gp を経鼻接種したモルモット、ラット、マウスの動物組織を対照として、解析を行っている。

a. 抗ニパウイルス np 抗体：マレーシアの1998年の流行時の剖検例を対象に作製した抗体を用いて、ホルマリン固定パラフィン切片上でウイルス抗原の有無とその局在を検討した。予め正常非感染組織において交差性が無いことを確認後、ニパウイルス脳炎の脳組織で検討したところ、ごくわずかではあるが感染細胞を検出することに成功した。しかし、この陽性細胞数は予測よりも少なく、今後さらに検討する余地がある。

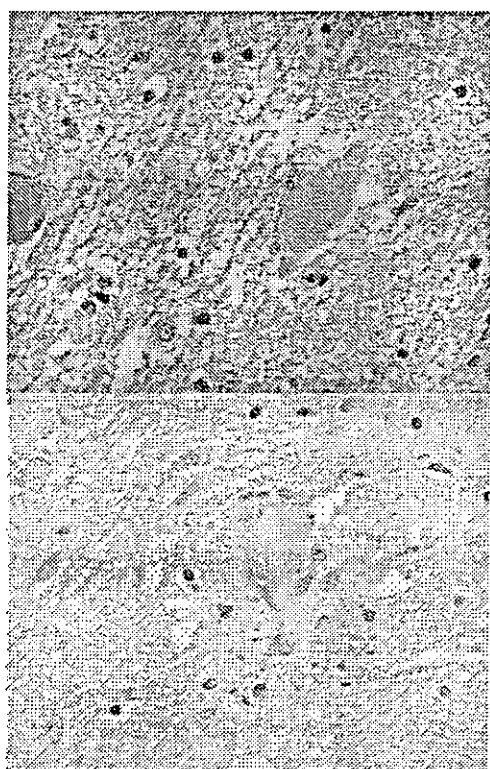


図4 ニパウイルス感染剖検脳の組織像(HE)ならびに免疫組織学的 np 抗原の検出。マレーシア例

b. 抗 PIV3-gp np 抗体

このウイルスが元々分離されたモルモットに実験的に経鼻的に PIV3-gp を接種し、下気道に感染細胞が検出できるのかを検討した。その結果、気管、気管支、細気管支、肺胞上皮に細胞質が陽性となる上皮細胞を検出した。これらの細胞は HE 切片では空胞

状に見えることが多く、周囲には炎症性細胞の浸潤がみられ、PIV3-gp 感染によってこのような細胞形態の変化が生じたとみなしうる。

これらの感染細胞は接種後1日目には下気道内に検出され、5日目までは容易に検出されたが、7日目には殆ど検出されず12日以降は認められなかった。

感染細胞は上皮のみに検出され、上皮下には検出されなかった。下気道以外に肝と脾、心、腎組織も検討したがいずれも陰性であった。



図5 モルモット、細気管支における PIV3-gp np 抗原(茶色)の検出 (Hartley Block No. 7800、核染色は hematoxylin)

次に他の齧歯類に経鼻的にこのウイルスを接種し、同様に免疫組織学的検索を行った。その結果、モルモット同様、下気道上皮に np 抗原陽性となる細胞が認められた。しかし、モルモットほどの多量の抗原陽性細胞が認められることはなく、殆ど限局性であり、多数の感染細胞が観察されることは稀であった。

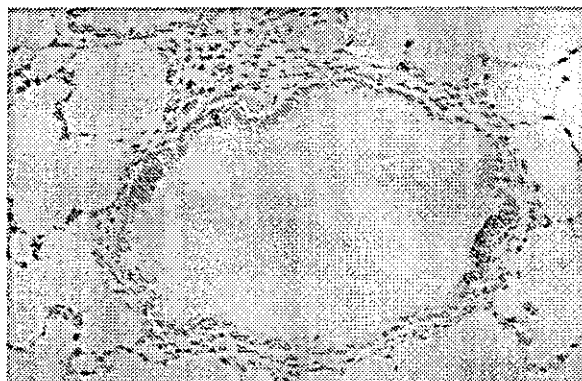


図5 ラット、細気管支における PIV3-gp np 抗原 (茶色) (SD Block No. 7973、核染色は hematoxylin)

ヌードラット、ヌードマウス、SCID マウスにおいても感染細胞が経時的に増加することはなく、接種後7日目には陽性細胞は検出されず、これらの動物においては T 細胞あるいは B 細胞による免疫応答が無くとも感染が終結することが明らかにされた。

c. 抗 HPIV1 np 抗体・抗 HPIV2 np 抗体：現時点ではこれらの抗体で陽性となった人体例は経験していない。これまで3型で陽性となった人体例ならびに動物実験例について検討したが、これらでは陰性であった。

D. 考察

本研究では人獣共通感染症としてのパラミキソウイルス群ウイルスの可能性について、病理組織材料における解析より検討しようとして行った。ニパウイルスならびにヘンドラウイルスは疫学的・病理学的・ウイルス学的に明らかに人獣共通感染を引き起こしており、またこれらのウイルスは経気道感染をしている。おそらくは飛沫感染であり、空気(飛沫核)感染ではないが、最も感染しやすく、かつ予防が困難なウイルスと考えられる。本年度はニパウイルス

の作製した np 抗原を用いて免疫したウサギ血清を用いて実際の人体例におけるウイルス感染の診断、その感染細胞の局在の解析が可能であることを示した。しかし、作製した抗体は CDC が所有している抗体に比較し、感度が悪く(データ非呈示)、さらに今後改善していく必要がある。

ニパウイルスに系統樹的に近い位置にある PIV3 の人獣共通感染性についても検討した。今回使用したウイルスはモルモットから分離されたウイルスであり、人体感染性は現時点では不明である。しかし、ウイルスゲノムの塩基配列の解析では非常にヒト分離株に近似しており、ヒトとモルモット間でウイルスが伝播したと考えられる。今回の解析ではこの PIV3-gp の NP 抗原で作製した抗体が人体からの臨床分離株も検出できることを明らかにしている。現在、PIV の検査室診断は血球凝集阻止試験が一般的であるが、この方法では PIV4a と PIV4b の診断が困難であり、この2つのウイルスの検出は殆ど検出されていない(国立感染症研究所感染症サーベイランスのデータより)。これまで作製した HPIV1, HPIV2, PIV3-gp の NP 抗原の間には抗原交差性が殆ど認められず、作製した抗体は少なくとも型特異的である。今後さらに PIV4a と PIV4b の抗体も作製し、これらの型別が抗 NP 抗体を用いて可能かどうか検討する予定である。

モルモット由来の PIV3-gp は他の齧歯類にも経鼻的に感染し、下気道に感染細胞が検出された。しかし、この感染はモルモットほど病変が拡大することもなく、また、T 細胞あるいは B 細胞の機能不全があるヌードあるいは SCID においても、感染細胞の数的増

加が見られることもなく、一過性の感染となっている。これらの免疫機能不全齧歯類では抗体価の上昇も確認できていない(現在、検討中)ので、このような感染は自然免疫等の機序により感染が排除されたと考えている。また、このことは必ずしも血清抗体が検出できない動物において、これらのウイルスの保有歴あるいは感染歴を否定できないことも意味している。一方、パラミキソウイルス科ウイルスではRSウイルスのように過去に生ワクチン接種により、被接種者が未接種者に比較して症状が重篤となる場合が報告されている。今後、これらの免疫能正常マウスと欠損マウスを比較することにより、獲得免疫がこれらのウイルスにどのように影響するかが解析できると期待する。

E. 結論

ニバウイルスに関しては人体組織材料において感染細胞を検出できる免疫組織学的解析法を確立した。ルブラウイルスのPIV3は人獣共通感染を引き起こしている可能性が高く、この診断に必要な抗体も作製し、また、齧歯類の感染実験により、モルモット、ラット、マウスが感受性を有していること、また、T細胞・B細胞の免疫能が欠如している齧歯類でも感染は一過性であり、獲得免疫以外の機序でウイルスが排除されている可能性を明らかにした。

参考文献

- Ohsawa K et al. 1998. Genetic characterization of parainfluenza virus 3 derived from guinea pigs. *J Vet Med Sci* 60: 919-22
- Watanabe Y et al. 2002. Isolation of a parainfluenza virus type 3-like agent from guinea pigs. *Acta Med Nagasakiensia* 46: 15-8

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 Iyssavirus 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

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

野兔病菌の亜種および株鑑別に有用な遺伝子マーカーの検討

分担研究者	棚林 清	国立感染症研究所	獣医科学部	室長
協力研究者	藤田 修	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員
	堀田明豊	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員
	宇田晶彦	国立感染症研究所	獣医科学部	研究員

研究要旨：野兔病の起原菌である *Francisella tularensis* の亜種や菌株の鑑別に有用な遺伝子マーカーの検討を行った。*F. tularensis* subsp. *tularensis* (Type A) と *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Type B) との鑑別には、IS*Ftu2* や PPI-RNA helicase 遺伝子領域の PCR 増幅 DNA 断片のサイズの差を利用できることがわかった。また、Type B 野兔病菌ゲノム DNA に存在する繰返し配列構造を含む 6 領域について国内外由来の菌株を解析した結果、SSTR16 と SSTR9 領域で繰返し回数や塩基配列に特徴があり有用な疫学調査のための遺伝子マーカーになりうることを示唆された。

A. 研究目的

野兔病の起原菌としては、野兔病菌 (*F. tularensis*) のうち、強病原性の *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Type A) や、病原性がやや弱い subsp. *holarctica* (Type B) が主に分離されている。本邦においても過去には多数の野兔病患者が見られ *F. tularensis* subsp. *holarctica* が分布していることが知られている。近年、国内の発生は極めて稀だが、国内で野兔病菌が検出された場合、海外由来も考慮しその感染源や感染経路を明らかにするため分離菌の亜種の鑑別や株の鑑別は、感染症対策のための疫学情報として重要である。

本菌の抗原性はほぼ同一であり、生化学

性状などでは詳細な分類は出来ず、検査に時間を要するなど分離菌の疫学的マーカーとしては不十分である。本研究では *F. tularensis* の亜種間の鑑別、さらに *F. tularensis* subsp. *holarctica* の国内外由来菌株間の鑑別等に有用な遺伝子マーカーの検討を行った。

B. 研究方法

(1) Type A と Type B 菌株の鑑別

Type B 菌株に存在する IS*Ftu2* を含む領域を増幅するプライマーセット (Peterson ら, 2004) および Peptidyl-prolyl *trans*-isomerase and putative RNA helicase (PPI-RNA helicase) 遺伝子領域を増幅するプライマーセット (Goethert ら,

2004)を用いて、Type B 22 株 (国内分離 16 株、海外株 6 株)、Type A 2 株、*F. novicida* 1 株、さらに *F. philomiragia* 1 株について PCR で増幅される DNA 断片の長さをアガロース電気泳動により比較した。また、これらのプライマーセットを用いた PCR 法の *Francisella* 属菌に対する特異性を調べるために、*Francisella* 属菌と生活史が類似する菌種 (*Coxiella burnetii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella* spp.)、バイオテロに使用されるおそれのある菌種 (*Bacillus* spp., *Yersinia* spp.)、その他数種の細菌種との交叉反応性も調べた。*Francisella* 属菌株は、(財)大原総合病院附属大原研究所 藤田博己博士より分与された。

(2) *F. tularensis* subsp. *holarctica* 国内外株の特徴的繰返し配列の解析

Farlow ら (2001) および Johansson ら (2001) が報告した繰返し配列を含む 6 領域に着目して、まず subsp. *holarctica* 国内分離 16 株の PCR 増幅とその塩基配列の解析を行い、各領域での国内株の配列の特徴を調べ、さらにこれらを外国株での結果と比較し、両者の区別に有用な領域を選択した。

C. 結果

(1) Type A と Type B 菌株の鑑別

ISFtu2 遺伝子領域の PCR により増幅された DNA 断片は Type A では 390 塩基対であるのに対して Type B では 1249 塩基対であり容易に区別することが出来た (図 1-1)。

また、PPI-helicase 領域の PCR での増幅断片は、Type A で 30 塩基対だけ Type B より大きく両者間の鑑別が可能であった (図 2)。しかし、いずれの領域においても *F. novicida* では Type A と同じサイズのバンドが増幅されることから (図 1-2, lane 3、図 2, lane 25)、Type A と B との鑑別は可能だが、Type A と *F. novicida* との鑑別は出来なかった。

(2) *F. tularensis* subsp. *holarctica* 国内外株の特徴的繰返し配列の解析

6 箇所の繰返し配列領域のうち 4 領域では、国内株と海外株のいずれにおいてもほぼ同じ繰返し配列数を有しており明瞭な差は認められなかった。一方、SSTR16 と SSTR9 の 2 領域では国内株と海外株間にそれぞれ特徴的な繰返し配列構造が認められた。

SSTR16 領域において海外株では 16-bp の繰返し配列が 2 回に限定されていたが、国内株間は 2~19 回の繰返し配列と変化に富んだ配列構造が見られた (図 3)。

一方、SSTR9 領域では、国内株は 1 株 (Kokuchi 株) を除く全てが 3 回の繰返し配列とほぼ均一構造だったのに対し、海外株で 13~18 回の繰返し配列と変化に富み、国内株とは明瞭な差が認められた (図 4)。SSTR9 の繰返し配列は 3 アミノ酸残基 (Asn-Lys-Asp) をコードしており、その塩基配列には異なるモチーフがある。塩基配列の解析の結果、ほとんどの国内分離株はモチーフ A (AACAAAGAC) が 1、モチーフ C (AATAAGGAT) が 2 の計 3 回の繰返し配列だったのに対し、繰返し配列回数が異なった

Kokuchi 株ではモチーフ A が 4、モチーフ C が 13 の計 17 個であった。一方、同じ繰返し配列数を有する海外株からこれらのモチーフの組合せ配列構造は認められなかった。

D. 考察

野兔病菌の種・亜種・株の分類は、地理的、生物学的あるいは生化学的特性により行われてきた。また、16SリボゾームRNA遺伝子、外膜蛋白質(*fopA*)または主要膜蛋白質(*tu14*)遺伝子を対象としたPCR法による遺伝子検出法が開発され、属や種の同定は可能となっている。しかし、これらの方法は、分離菌の亜種や菌株の鑑別には不十分である。また、*F. novicida*を除いて抗原性はほぼ同一であり、抗血清を用いた鑑別は出来ない。本研究では、野兔病菌の亜種さらには菌株鑑別のための遺伝子マーカーの検討を行った。

IS*Ftu2*あるいはPPI-helicaseの遺伝子領域のPCR産物のサイズを比較することで*F. tularensis* subsp. *tularensis* (Type A) と subsp. *holarctica* (Type B)との亜種鑑別が簡易迅速にできることがわかった。多くの野兔病患者や動物から分離される菌はType AやBであることから有用な方法であると考えられた。しかし、この両遺伝子領域のPCRでは*F. novicida*と subsp. *tularensis*を区別することはできないことから、他の遺伝子領域の検索も必要と思われた。

F. tularensis subsp. *holarctica*の国内外分離菌株が有する繰返し配列構造の特徴

を調べた結果、SSTR9とSSTR16の両領域における繰返し配列の回数と塩基配列を併せて解析することで国内分離株と海外株との区別や菌株の鑑別が可能であることがわかった。今後、多くの国内外分離株についての解析も必要であるが、今回得られた結果から、これらの繰返し配列を含む領域は、疫学調査のための有用な遺伝子マーカーとなりうることを示唆された。

E. 結論

野兔病菌の亜種鑑別や株鑑別に有用な遺伝子マーカーの検討を行った結果、IS*Ftu2*、PPI-helicase 遺伝子領域のPCRでの増幅断片のサイズ比較でType AとType B菌株の鑑別が出来ることがわかった。しかし*F. novicida*とType Aとの区別は出来なかった。さらにType B菌株における6領域の繰返し配列構造について国内外由来の株を解析した結果、SSTR9とSSTR16の2領域で繰返し回数や塩基配列に特徴があり、有用な疫学調査のための遺伝子マーカーになりうることを示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 棚林 清 野兔病「感染症の事典」国立感染症研究所学友会編、朝倉書店(2004年)

学会発表

1) 棚林 清、堀田明豊、藤田 修、宇田晶彦、山田章雄 簡易型別PCRの日本分離野兔

病菌 (*Francisella tularensis*) への応用
第 138 回日本獣医学会 2004 年 9 月 (札幌)
2) 藤田 修、奥谷晶子、堀田明豊、井上 智、
棚林 清、山田章雄 日本国内から分離さ
れた野兔病菌 (*Francisella tularensis*)
の short-sequence tandem repeat (SSTR) の
特徴、138 回日本獣医学会 2004 年 9 月 (札幌)
3) 堀田明豊、宇田晶彦、藤田 修、棚林清、
山田章雄 *Francisella tularensis* に対す
るモノクローナル抗体の作出 第 138 回日
本獣医学会 2004 年 9 月 (札幌)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

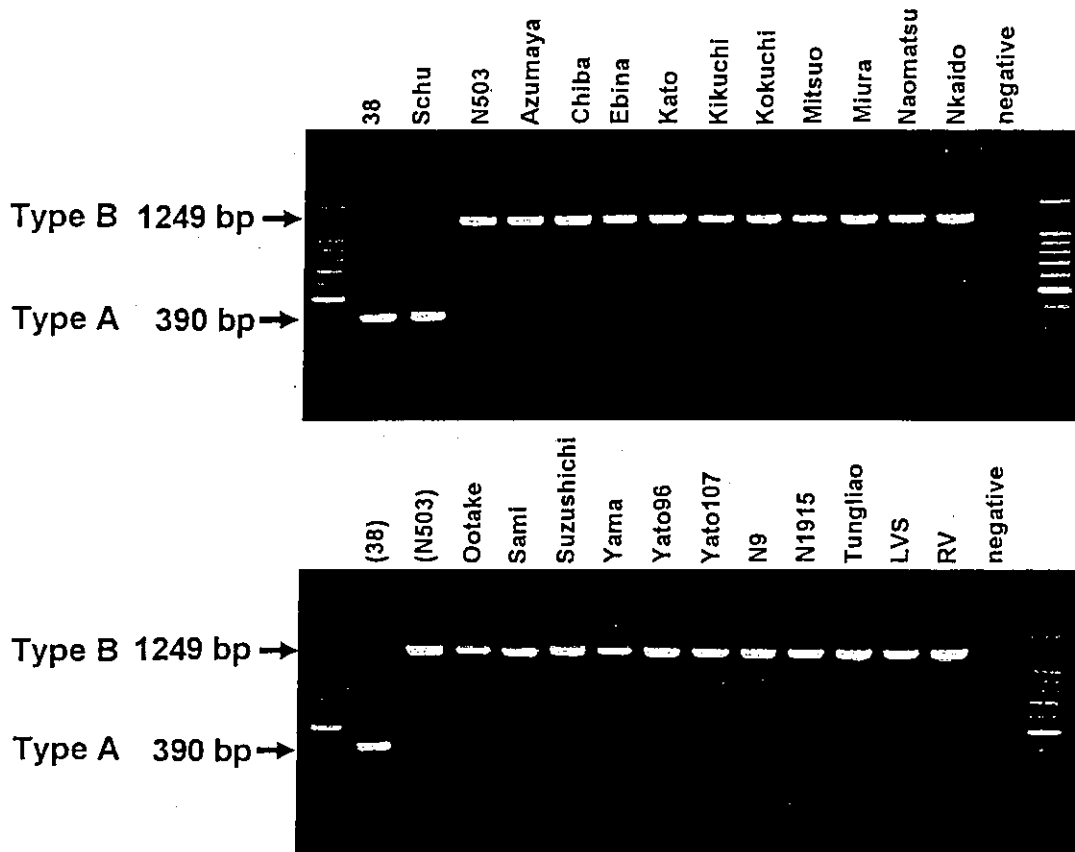


図1-1. ISFtu2領域のPCRによる亜種の鑑別

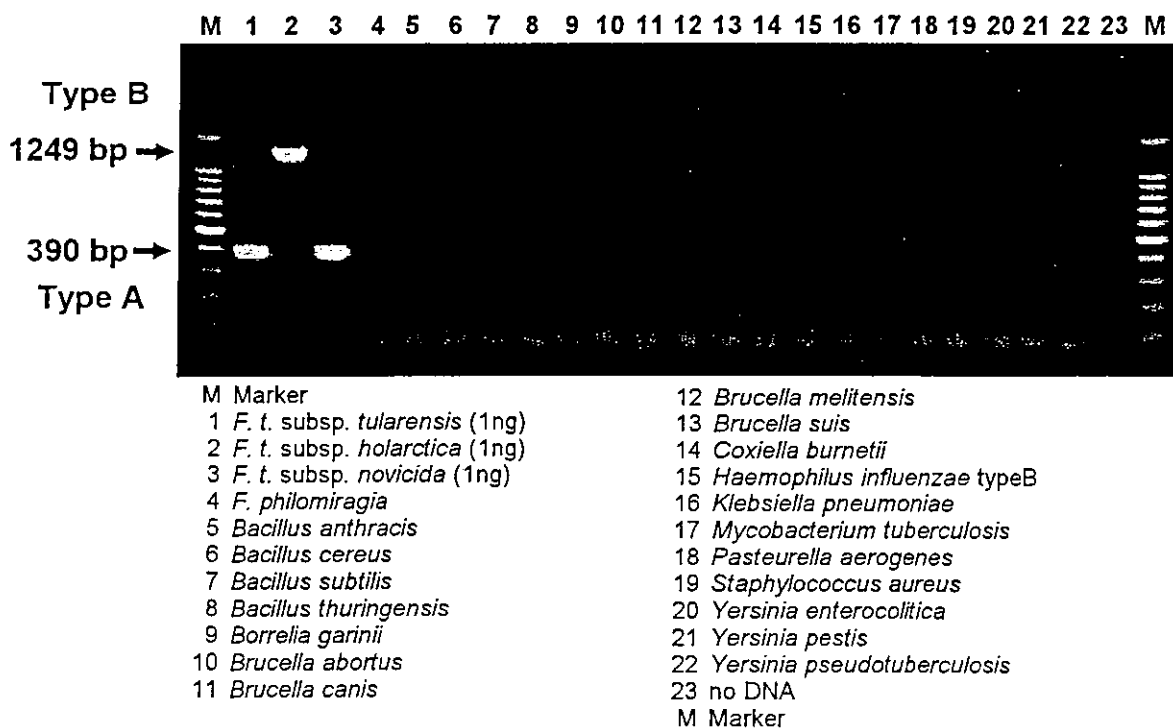
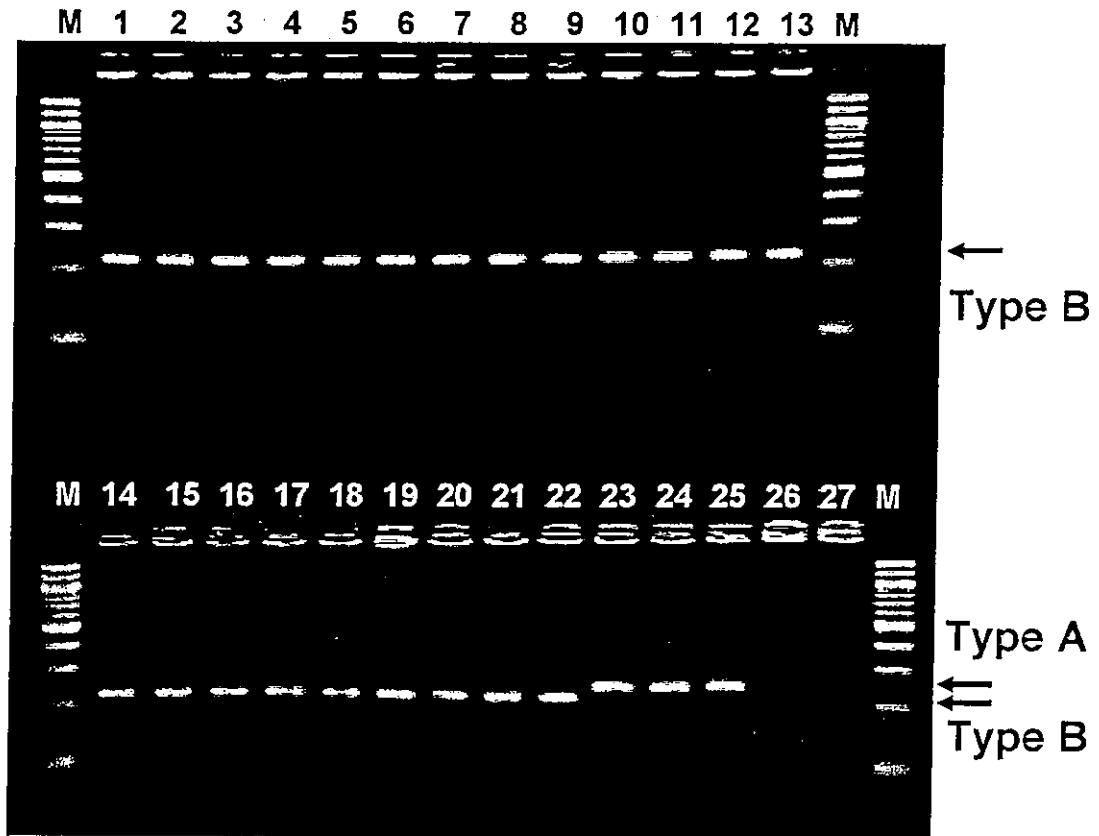


図1-2. ISFtu2領域の亜種鑑別PCRの他の菌種での反応



- | | |
|---------------|---------------------------|
| M Marker | 14 Yama |
| 1 Azumaya | 15 Yati 96 |
| 2 Chiba | 16 Yato 107 |
| 3 Ebina | 17 N9 |
| 4 Kato | 18 N1915 |
| 5 Kikuchi | 19 N503 |
| 6 Kokuchi | 20 Tungliao |
| 7 Mitsuo | 21 LVS |
| 8 Miura | 22 RV |
| 9 Naomatsu | 23 38 |
| 10 Nikaido | 24 Schu |
| 11 Ootake | 25 <i>F. novicida</i> |
| 12 Sami | 26 <i>F. philomiragia</i> |
| 13 Suzushichi | 27 DW |
| | M Marker |

図2. PPI-RNA helicase領域のPCRによる亜種の鑑別

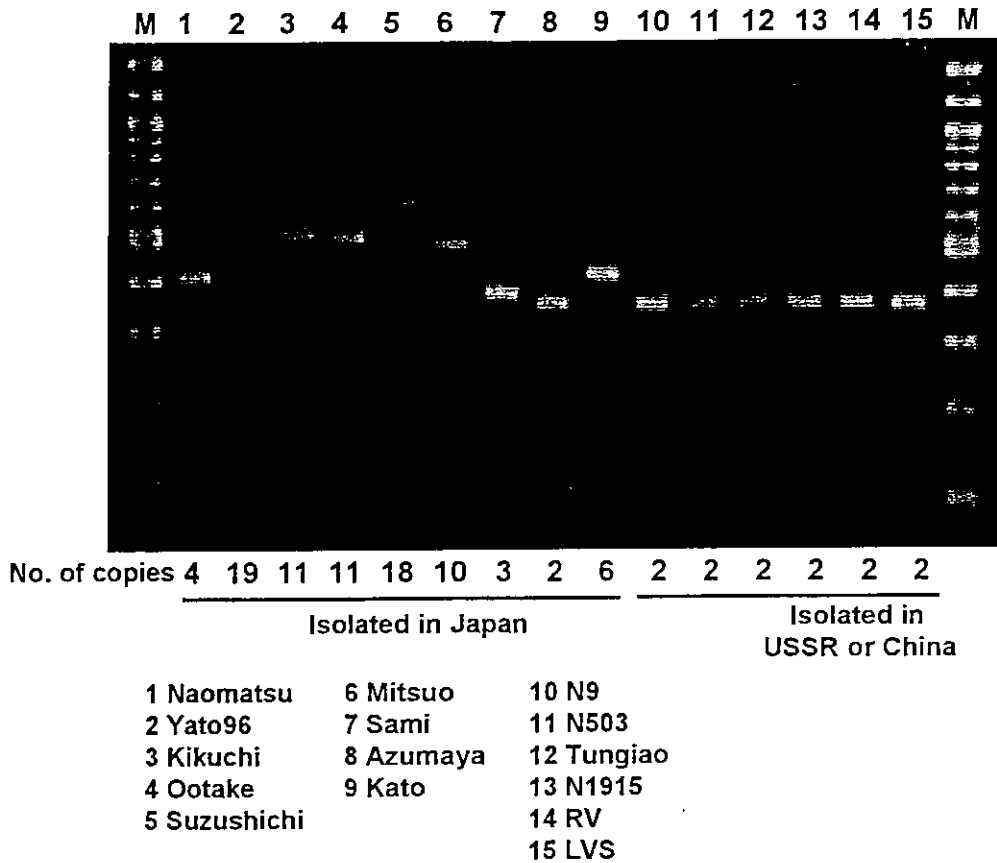


図3. SSTR16領域における繰返し配列の解析

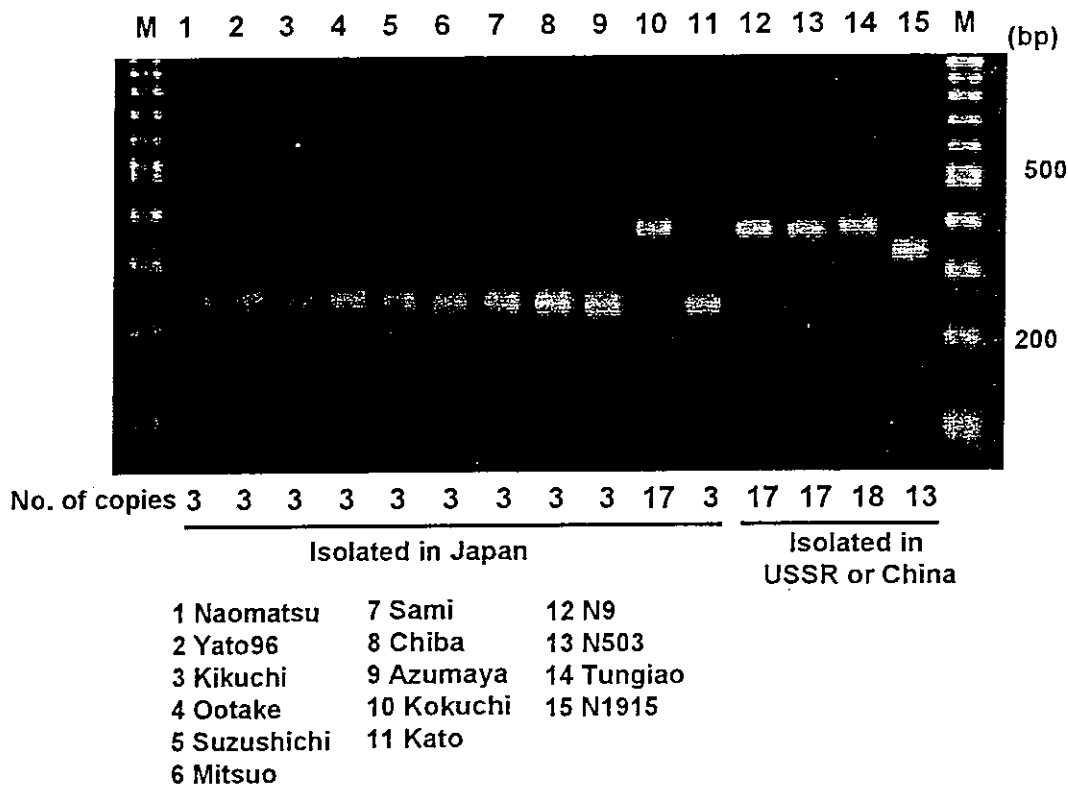


図4. SSTR9領域における繰返し配列の解析

屋外および屋内ラットにおける鼠咬症原因菌の保有状況調査

分担研究者	今岡 浩一	国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官
協力研究者	鈴木 道雄	国立感染症研究所 獣医科学部 第1室研究員
協力研究者	木村 昌伸	国立感染症研究所 獣医科学部 第1室研究員
協力研究者	谷川 力	イカリ消毒株式会社 技術研究所 所長
協力研究者	小泉 信夫	国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究要旨：今回、日本における屋外および屋内の野生ラット（ドブネズミおよびクマネズミ）における *S. moniliformis* の保菌状況の調査を行った。その結果、高率に保菌していることが明らかとなり、患者の報告は定かではないが、今後、感染・発症例が出て不思議ではないことが示された。MMWR に報告されたように発症後、死亡までの経過が非常に短い例もあるので、その診断・同定法の開発が必要である。今回、培養液から 16S rRNA を標的として PCR で検出する方法の開発を行ったが、近縁の細菌に対しても増幅が起こるという不十分な点もあるが、これら非特異的なバンドは明らかにサイズが異なっているので、ある程度、有効な検出法であると考えられた。

A. 研究目的

鼠咬症は、ラットに咬まれることによりヒトに感染し、その原因菌としては、*Streptobacillus moniliformis*（グラム陰性、多形性桿菌、好気性・通性嫌気性）（参考-図）と *Spirillum minus*（グラム陰性、螺旋状）がある。*S. minus* 感染は、主にアジアで見られ、日本では「Sodoku」と呼ばれ古くから知られているが、人工培地での培養が不可能でその検出・同定が困難なため、今回の検討からは除外した。一方、*S. moniliformis* 感染は、アメリカ大陸ほか、世界中で認められている。*S. moniliformis* はラットの口腔内正常細菌叢の1つであり、他の齧歯類にも認められる。ただし、マウスでは致死感染を起こすことが多い。

ヒトへの感染経路は、感染ラットによる咬傷、接触、その排泄物に汚染したものによる糞口感染である。潜伏期間は2～10日で、その症状は、発熱、寒気、筋肉痛、関節痛、四肢の斑状丘疹状発疹、敗血症性関節炎などがある。治療をしないときなどの致死率は10%とされている。その診断は、血液・関節液の培養によりおこなうが、栄養要求が厳しい細菌であり、培養は困難である。感染時の処置として、ペニシリン、アンピシリン、テトラサイクリンなどの投与が効果をもたらす。

患者の報告としては、1831年に最初の発生記録が認められ、1916～41年の間に125例の記録がある。アウトブレイクとしては、1926年に米国・マサチューセッツのHaverhillで、未殺菌ミルクやアイスクリームによる86名の患者発

生があり、また 1983 年には、英国・エセックスの寄宿舎で、飲み水の汚染と、ラットによる咬傷から 304 名の患者発生があった。その他、1986 年には米国・ニューメキシコで、飲み水から 2 名の発生報告がある。これらの大規模な患者発生は、感染ラット排泄物に汚染したものの糞口感染が主である。一方、直接ラットに咬まれる事による感染では、先のエセックスで 7 名の報告があるが、死亡にまでつながった例として 2002 年にワシントン州でラットを飼育していたもの 1 例、2003 年にフロリダ州でペットショップに勤務していてラットに咬まれて発症・死亡したもの 1 例の報告がある(参考資料)。どちらも発症から死に至るまでが 24 時間以内と非常に早い経過をたどっている。死亡には至っていないが、ラットに咬まれることにより四肢に発疹の認められたものや、特に関節炎を発症し、その原因として *S. moniliformis* が同定される例が報告されている。いずれにしても、感染・発症しても *S. moniliformis* の検出・同定が難しいことから、実際の患者数は不明で報告数よりもかなり多いのではないかと考えられている。

今回、国内における鼠咬症の危険性を確認する目的から、*S. moniliformis* 検出法の確立および屋外および屋内のラットにおける保有状況の調査を行った。

B. 研究方法

サンプル(口腔内スワブ): ラットより口腔・咽喉頭スワブを、BD BBL カルチャースワブ・プラス(#212553)を用いて採取した。屋外捕獲ラットは、豊島区千早町(4匹)、静岡県沼津市(1匹)、横浜市中区石川町(10匹)、横浜市中区黄金町(11匹)の計26匹で、いずれもドブネズミ(*Rattus norvegicus*)であった。屋内捕獲ラットは、新宿区M商業ビル(15匹)、新宿区S商店街(1匹)、小笠原(1匹)の計17匹で、いずれもクマネズミ(*Rattus rattus*)で

あった。

サンプル処理: スワブを 1 ml の *S. moniliformis* 用ウマ血清添加液体培地(ATCC medium 488 broth)に希釈し、このうち10ulをウマ血清添加寒天培地(ATCC medium 488 agar)で、37°C、5% CO₂存在下および微好気下で培養し、残りは488 broth 8mlを用いて37°C、5% CO₂存在下で培養した。

陽性対照菌株: 陽性対照菌株として、ATCCより *S. moniliformis* ATCC14647、ATCC49567、ATCC49940株を入手し用いた。

DNA の検出: 一晚培養後の 488 broth 1 ml の遠心沈査、ならびに適宜培養後の 488 agar 上のコロニーを少量(50-100ul)の TE に溶解し熱変成後、16S rRNA 特異的プライマーを用いて、PCR を行った。プライマーのうち S および AS (Table 1) は、Boot ら(Lab. Anim., 36:200-8, 2002) の報告により作製したが、このシーケンスは、*Leptotrichia amnioni* との相同性が高いため、*Leptotrichia* のシーケンスと塩基の異なる部分を中心にして、S3 および S4 (Table 1) を新たに作製した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動し、目的サイズのバンドをゲルより切り出し、DNA を抽出した後、ABI3100 を用いてプロトコールに従い遺伝子解析を実施しシーケンスの確認を行った。

C. 研究結果

1) PCR 用プライマーの特異性: S、S3、S4 と AS を組み合わせて、その反応の特異性を検討した。その結果、いずれのプライマーの組み合わせでも、*S. moniliformis* 以外の細菌では非特異的増幅反応は認められなかった (Fig. 1)。次に、*Streptobacillus* と近縁な *Fusobacterium* および *Leptotrichia* を区別できるかどうか検討した。サンプルは、*S. moniliformis*

ATCC14647、横浜市中区石川町で捕獲されたドブネズミ由来の#22、23、24で、それぞれのS-ASのPCR産物のシーケンスにより#22は不明、#23は*S. moniliformis*、#24は*Fusobacterium*と判断されたものである。DG-5、8、17は、マウス由来のサンプルであるが、S-ASのPCR産物のシーケンスにより*Leptotrichia*と確認されたものである。Fig. 2に示したように、S-ASは*S. moniliformis*以外の細菌でも特異的産物とほぼ等しい位置にバンドが確認され、区別ができなかった。S4-ASでは*S. moniliformis*と*Leptotrichia*が区別できなかった。S3-ASでは、明らかにサイズの異なる非特異的バンドが認められるが、*S. moniliformis*とそれ以外が区別可能であった。

以上のことより、*S. moniliformis*の判定にはSプライマーだけでは不十分で、SプライマーとS3プライマーを併用して用いることが有効であることが示された。

2) ラットサンプルにおける16S rRNAの検出：ラット咽喉頭スワブを488 brothで一晩培養したサンプルのPCRの結果をFig. 3に示した。屋外ラットでは、S-ASプライマーでは、検討したラットすべてで、陽性と思われる位置にバンドが検出された。屋内ラットでは、検討した17匹中9匹で陽性バンドが検出された。データは示さないが、S3-ASを用いた検討では、屋外ラットでは24匹で、屋内ラットでは9匹で陽性バンドが認められた。

3) 陽性サンプルの部分シーケンス：先に述べたように、*Fusobacterium*や*Leptotrichia*のように*Streptobacillus*と近縁な細菌の非特異的検出の可能性があるので、16S rRNAの部分シーケンスを行った。その結果、屋外ラットでは24/26、屋内ラットでは9/17が*S. moniliformis*であると確認された(Fig. 3)。また、屋外で捕獲されたドブネズミ(*Rattus norvegicus*)のシーケンスは、ATCC14647株

(Genbank accession: Z35305)と一致したのに対して、屋内で捕獲されたクマネズミ(*Rattus rattus*)のシーケンスは、AHL370-1株(同: Z35304)と近縁であり、ラットの系統による保有菌株の差が認められた(Fig. 4)。

D. 考察

現在、日本における*S. moniliformis*感染は明らかでないが、やはり日本においても野生ラットは高率に*S. moniliformis*を保菌していた。現在の日本では、ペットの多様化、地震・洪水等の災害後に齧歯類との接触機会の増加が考えられるなど、一般の人が感染する機会が全くないとはいえない。また、実験動物であるラットについても過去に保菌していることが報告されているので、実験動物用ラット取扱者はハイリスクであると考えられる。ただ、*S. moniliformis*は齧歯類の口腔内正常細菌叢の1つで高頻度に常在し、不顕性感染しているため、ラットの処置を行うことは実際的ではない。したがって、感染予防は、ラットに暴露する機会が多いヒトにおける、感染リスクの減少に重点を置くべきである。しかしながらMMWRに報告された例では、発症から死亡までが非常に短く、また、*S. moniliformis*の分離・同定が困難なことから、その迅速診断法の開発は必要であると考えられる。今年度、*S. moniliformis*のPCRによる検出を実施したが、過去に報告されているSプライマーだけでは非特異的反応があり不十分で、Sプライマーと今回新たに作製したS3プライマーを併用して用いることが有効であることが示された。今後さらにその精度を検討しておく必要があると考えられる。また、ドブネズミとクマネズミでは保菌している*S. moniliformis*株が異なっていたが、それぞれの株の病原性の違い、保菌株が異なっている理由など、詳細の検討については今後の課題である。

E. 結論