

図1 捕獲猫の地理的分布(東京都)

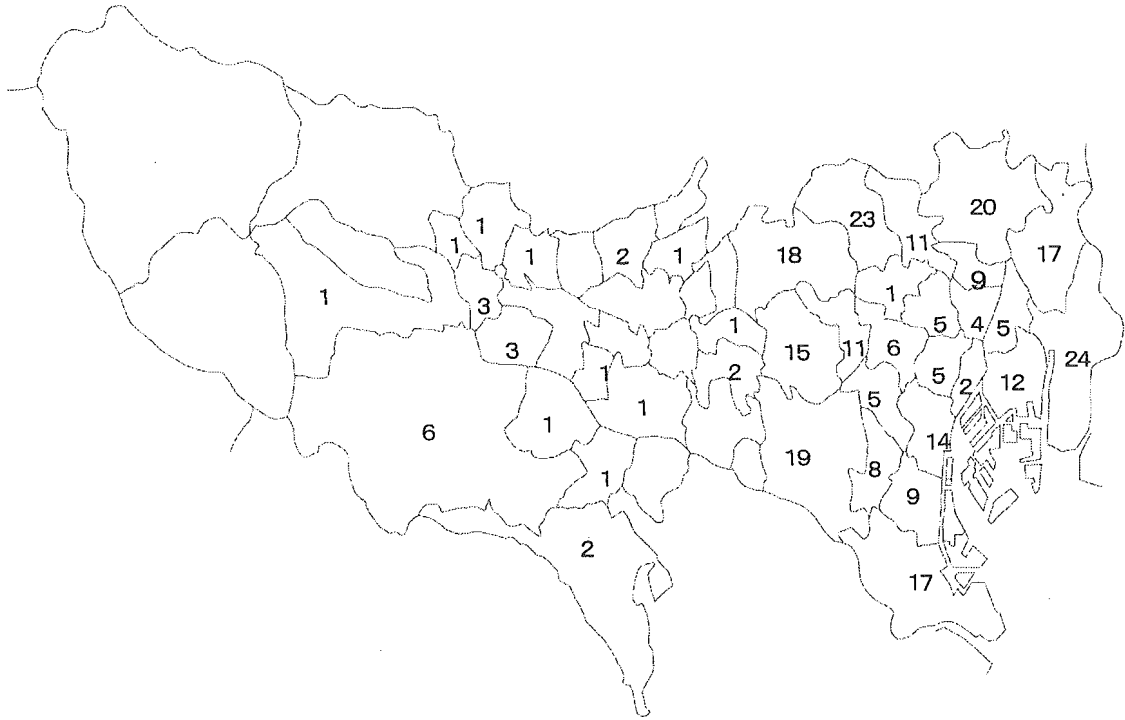


図2 捕獲猫の地理的分布(兵庫県)

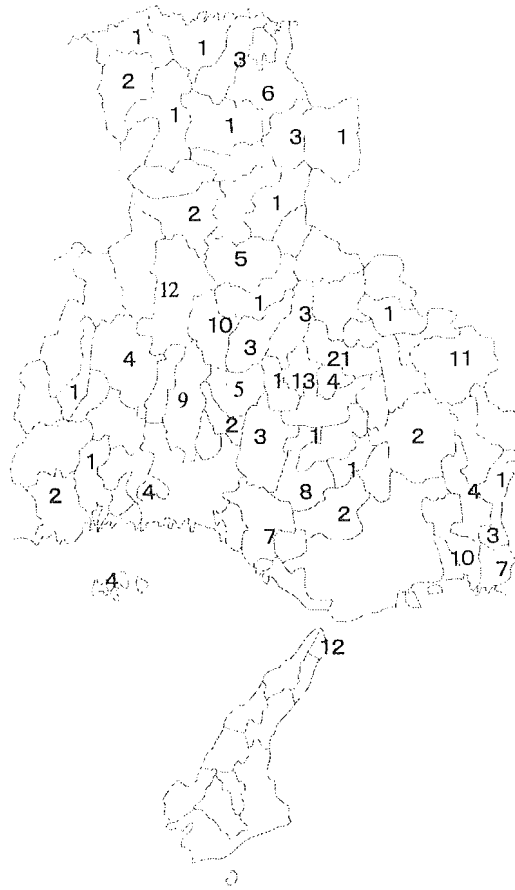


表 4 抗 HFRSV-NP 猫免疫血清の力価 (陽性血清)

時 期	抗体価
免疫前	(-)
免疫 2 週間後	1 : 1 6 0
免疫 4 週間後	1 : 2, 5 6 0 以上
免疫 5 週間後	1 : 2, 5 6 0 以上

表 5 猫 (野良猫及び飼い猫) の HFRSV 抗体測定結果

地 域	検体数	陽性検体数	陽性率 (%)
東京都			
野良猫	2 2 8	0	0. 0
飼い猫	6 0	0	0. 0
兵庫県			
野良猫	1 6 6	0	0. 0
飼い猫	3 4	0	0. 0
計	4 8 8	0	0. 0

平成 15 年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症対策研究事業）

研究班研究課題：輸入動物に由来する新興感染症侵入防止対策に関する研究

分担者研究課題：輸入動物特に爬虫類、鳥類、食肉類、
霊長類由来感染症に関する研究

分担研究報告書

輸入野生齧歯類の病原体保有調査
(主として感染症予防法対象病原体の保有調査)

分担研究者	宇根 有美	麻布大学獣医学部病理学研究室
研究協力者	太田 周司	東京検疫所川崎支所
	吉川 泰弘	東京大学大学院農学生命科学研究科 実験動物学研究室
	増澤 俊幸	静岡県立大学医学部寄生虫学研究室
	莉和 宏明	北海道大学大学院 獣医学研究科 環境獣医科学講座 公衆衛生学教室
	青木英雄、飯塚信二	横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター

愛玩用に輸入された野生齧歯類 9 種 144 匹を対象に、主として感染症予防法に掲載されている病原体の保有調査を行った。その結果、ハンタウイルス肺症候群および腎症候性出血熱の病原体に対する抗体とペストに対する抗体を保有する動物はいなかったが、アフリカヤマネ(African Dormice)10 匹中 5 匹 (50%) の腎臓からレプトスピラが分離培養され、ゲノム解析より *Leptospira kirschneri* 血清型 *grippotyphosa* に近縁である可能性が示された。以上の結果から愛玩用として輸入される野生齧歯類には、危険な病原体を保有している動物が含まれていることが明らかになり、これらの動物の取り扱いについては十分注意する必要がある。なお、同じ材料を用いて愛玩用動物の衛生管理に関連する寄生生物の保有状況調査を他研究班で実施した。

A. 研究の目的

近年、愛玩動物への嗜好の変化から、エキゾチックアニマルの輸入数および飼育数が増加している。これらの動物の中には、我が国ではみられない動物由来感染症が発生している国からの野生捕獲種も含まれている。この種の動物は、検疫対象外で、何らの検査も受けずに輸入され、流通している。そこで、我々は、これらの動物について、主として感染症

予防法に掲載されている病原体の保有調査によるリスク評価を行った。

B. 材料と方法

1) 対象とした動物

対象動物を選定するにあたって、①人獣共通伝染病発生率の高い国から輸入されている(表 1)、ペストはアフリカ諸国、野兔病はカザフスタンと北欧諸国、ハンタン肺症候群は北・南米諸国、腎症候性出血熱、ロシア、

中国、フィンランド、リンパ球性脈絡髄膜炎はカナダ・アルゼンチンでリスクが高かった。②愛玩用として輸入数が多く、ポピュラーな野生捕獲種（表2と表3）。ハムスター、モルモット、プレーリードッグ、リス、チンチラを除く齧歯類の輸出国として、年間1万頭以上とアメリカが最も多くの動物を日本に輸出していた。これは、表3の内容とあわせると北米産のジリスが多いことと、表4のアフリカヤマネの輸入状況からアフリカ産の動物の流通経路としてアメリカ経由のルートがあるためと思われた。また、5001頭以上の齧歯類の輸出国としてパキスタンがあったが、これは、人気テレビ番組で取り上げられブームとなったピグミージェルボアの輸入数が激増したことによる。以上の条件から14種類をノミネートした。そのエリアは北米、南米、中国、ロシア、アフガニスタン/パキスタン、アフリカにわたっており、全種類各20匹以上として合計290匹を検査することにして、2箇所の輸入業者に動物に発注した。図は、その外景写真である。

なお、表3の取り扱い業者数は、インターネットを用いて、販売・宣伝している10数業者（卸および小売り業者）を対象として、各齧歯類別に取り扱っている業者の数を計上した。参考に小売り価格も記入した。

特記すべき動物のプロフィール：

コタケネズミ、学名：*Cannomys badius*、英名：Lesser Bamboo Rat、分類：げっ歯目ネズミ科、分布：ネパール東部からビルマ。コタケネズミという名前は小型のタケネズミ（竹鼠）という意味からきている。実際は竹林ではなく森林や畑などに生息し、夜行性。*Penicillium marneffei* はタイやベトナム、中国の一部など東南アジアに分布する二形性真菌であり、全身播種性の感染症の起炎菌となる。近年タイにおいてAIDS患者の日和見感染マルネツフェイ型ペニシリウム症として注目を浴びている。自然界ではコタケネズミの糞や土壌に存在していることが知られてい

るが、感染様式は不明。25～75%のコタケネズミがこの真菌を保有しているとされ、ほとんど無症状である。本真菌は室温下で、急激に増殖し、胞子を空気中に放出するため、非常に危険で、取り扱いにはP3レベルで実施することになっている。

チビネズミ、学名：*Oryzomys minutus*、チビコメネズミ、分類：げっ歯目アメリカネズミ亜目、分布：南米。非常に小型なネズミ。ハンタウイルス肺症候群の原因であるハンタウイルスは、自然界で南北アメリカに生息するいわゆる新世界ネズミ（アメリカネズミ亜目）が保有しており、北米ではシカシロアシマウス（シカネズミ）、南米ではコメネズミ、ヨルマウスが媒介動物となっている。患者は、米国では2002年4月時点において31州から313例（死亡率37%）が、またカナダでも発生が報告されている。南アメリカではアルゼンチン、チリ、ボリビア、ブラジル、パナマ、パラグアイ、ウルグアイから合計250例以上（死亡率40%以上）が報告されている。

2) 検査対象とした病原体

主として感染症予防法に掲載されている病原体として、ペスト、野兔病、レプトスピラ、ライム病、ハンタウイルス（腎臓、肺）、リンパ球性脈絡髄膜炎の保有調査を行った。

【 実施要領 】

(1) 検査項目：検査対象個体の外景検査、体重測定、剖検検査、各種病原体保有検査、病理組織学的検査（必要に応じて）

(2) 実施場所とメンバー：剖検は、麻布大学獣医学部病理解剖場および生物総合科学研究所内で実施した。参加メンバーは、麻布大学獣医学部病理学研究室宇根有美および所属学生、同公衆衛生学研究室加藤行男、オカタニ・アレシャンドレ・トモミツおよび所属学生、東京農工大学農獣医学部家畜衛生学研究室所属学生、神奈川県衛生検査所黒木俊郎、神奈川県動物保護センター職員、神奈川県食肉衛生検査所職員、実験動物中央研究所職員

など。

(3) 手順

- (a) 麻酔 対象動物をエーテルあるいはクロロフォルムで麻酔
- (b) 外景検査、写真撮影、体重測定
- (c) 心採血
- (d) 内臓諸臓器の観察（目視による内臓の著変の確認）
- (e) 採材（脾臓、肺、腎臓など）
- (f) 各検査機関に配送

(4) 検査内容と担当者

- ペスト：抗体検査 横浜検疫所輸入食品・検疫センター微生物課
- 野兔病：抗体検査 東京大学
- レプトスピラ：分離培養 静岡県立大学医学部寄生虫学研究室増澤 俊幸
- ライム病：抗体検査 東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学研究室
- ハンタウイルス：抗体検査 北海道大学大学院 獣医学研究科環境獣医学講座公衆衛生学教室 莉和 宏明
- リンパ球性脈絡髄膜炎：抗体検査 東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学研究室

C. 結果

当初、14 種、290 匹の齧歯類を検査する予定で業者に発注したが、調査期間中に、アメリカでプレーリードッグを感染源とするサル痘が流行し、その元凶がアフリカ産齧歯類であることが判明したため、防疫管理令によりアフリカ産齧歯類の輸入が禁止された。さらに輸入業者が野生齧歯類の輸入を自粛したため、調査半ばで動物の入手が困難となり、表 4 の 144 頭で調査を終了した。また、死着で、腐敗が激しかった 4 匹については検査から除外した。

1) ハンタウイルス：腎および肺ハンタウイルスに対する抗体を保有する動物はいなかった。

2) ペスト：抗体を保有する動物はいなかつ

た。

3) レプトスピラ：アフリカ産アフリカヤマネ 10 匹中 5 匹の腎臓からレプトスピラが分離された。

分離レプトスピラは *gyrB* のシークエンスに基づく系統解析、パルスフィールドゲル電気泳動による制限酵素長鎖断片長多型性解析 (LRFP)、ならびに顕微鏡凝集試験 (MAT) により血清型を推定した。また、データベース構築のためオランダ国立熱帯研究所よりレプトスピラ 192 血清型を輸入し、*gyrB* 約 1,200bp のシークエンス解析を行った。その結果、5 株はゲノムの *Not I* 消化による LRFP で同一パターンを示し、*gyrB* 解析からこれらの株は *Leptospira kirschneri* 血清型 *grippotyphosa* に近縁である可能性を示した。一方 MAT の結果より、日本に存在が確認されているいずれの血清型にも当てはまらなかった。(この検査結果について、検査担当者である増澤俊幸先生が 2004 年春の日本細菌学会総会に発表を予定している)

3) 他の検査項目については、現在も検索中である。

D. 考察

今回、愛玩用としてポピュラーな野生齧歯類 9 種 144 匹について、主として感染症予防法対象の病原体保有調査を行った。その結果、ハンタウイルスやペストに対する抗体を保有している動物はいなかったが、50%のアフリカヤマネからレプトスピラが分離され、本来日本には存在しない血清型レプトスピラが国内に持ち込まれていることが明らかになった。他の研究班で、同じ材料を用いて、法では規制されていない病原体の保有調査も行ったところ、サルモネラ 3 種類 11 匹、ジアルジア 3 種類 16 匹、黄色ブドウ球菌 5 種類 39 匹 (ピグミージェルボア 21/39 (53.8%))、*Aspergillus flavus* 2 種類 38 匹、うち 3 株はアフラトキシン産生 (ピグミージェルボア 39 匹中 37 匹 94.9%) などが分離されたこと

と併せると、野生齧歯類は、多くの注意すべき寄生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	野兔病	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、フランス、ベルギー		フィンランド	
751～1000						
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、チェコ、ハンガリー、メキシコ、ドミニカ共和国	ブラジル、パラグアイ、パナマ	スイス	
11～25	ベルー、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、エクアドル、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、エクアドル、ラオス、ブラジル、カザフスタン、インドネシア、ボリビア	ノルウェー、デンマーク、ドイツ、ポーランド、スロベニア	イスラエル、チンマーウク、アイルランド、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、ボリビア、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・ブレ・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、チェコ、 中国、アメリカ、 韓国	オランダ、チェコ、 韓国	中国			アメリカ	台湾、中国、香港、 ハキスタン、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	ハキスタン	ハキスタン						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、 キニア、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、 セネガル	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、 チェコ、 ニカラグア、 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	チェコ、 中国、カナダ	チェコ
76～100				マレーシア	アメリカ	チェコ		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
★	ビグミージェルボア (=バルチスタンコミトビネズミ)、 ミュビコミトビネズミ	<i>Salpingotulus michaelis</i>	アフリカ、中近東、 ロシア	5	¥9,800~19,800
	サバンナアフリカオネズミ、アフリカオネズミ	<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、ビグミーマウス、 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	
	オオミュビトビネズミ、グレーター(ミュビ)トビネズミ	<i>Jaculus orientalis</i>	アフリカ、中近東	3	¥8,900~12,800
	カイロトゲマウス、カイロトゲネズミ	<i>Acomys cahirinus=A.nesiotes =A.cineraceus=Mus cahirinus</i>	アフリカ、中近東	1	
	ヒメミュビトビネズミ、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、アフリカンゼウラムウス、 ホシフクサマウス	<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
	ワキシジリス	<i>Callosciurus phayrei</i>	ミャンマー	1	
★	キタリス、エブリス、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、ホクベアカリス	<i>Tamiasciurus hudsonicus =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、タカサゴリス	<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	
	ドワーフパンダマウス			1	
○	ハタリス(=ジリス類)	<i>Spermophilus spp.</i>		1	
	ホワイシマリス			1	
	ホワイリス	<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>Scrdnvs.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

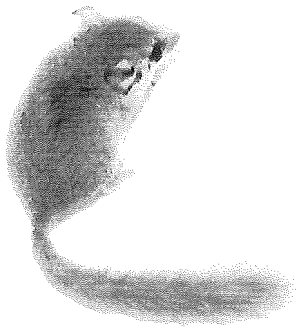
★ 検査した種類

○ 購入予定であったが入手できなかった種類

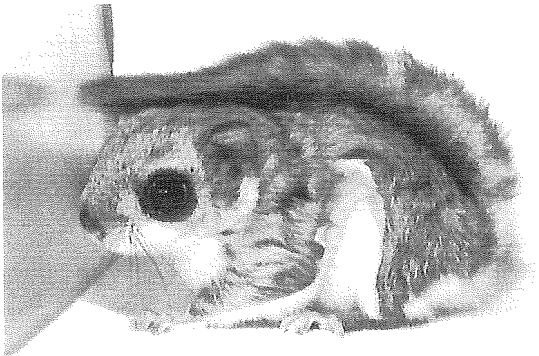
表4 野生齧歯類の和名、英名、原産国、検査数、購入状況

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
ピグミージェールボア	<i>Saipingotulus 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=Claviglis 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、エンリス	<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*) エゾリス (*Sciurus vulgaris orientalis*)



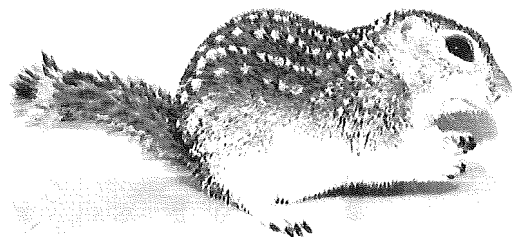
タイリクモモンガ (*Pteromys volans*)



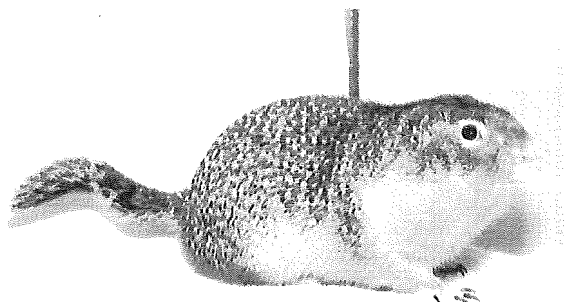
リチャードソンズリス (*Spermophilus richardsonii*)



シマリス (*Tamias sibiricus lineatus*)



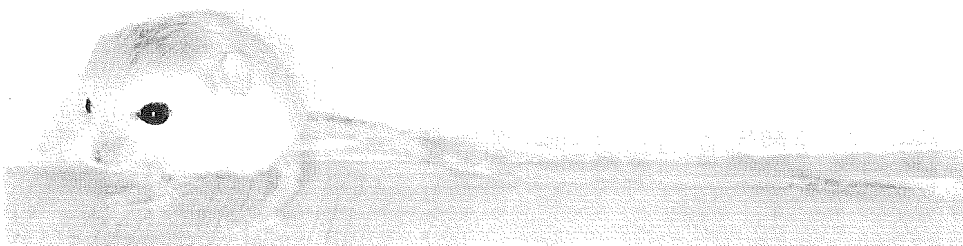
ジューサンセンズリス (*Spermophilus tridecemlineatus*)



コロンビアズリス (*Spermophilus columbianus*)



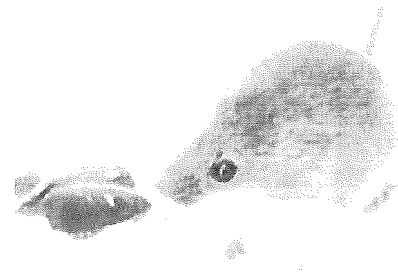
フトオアレチネズミ (*Pachyeuromys duprasi*)



ピクミーゼルホア (*Salpingotulus michaelis*)



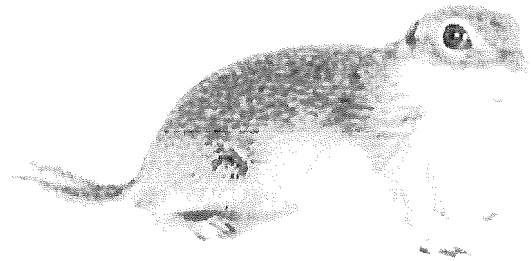
ゼブラマウス (*Lemiscomys barbarus*)



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B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の動態を知ることを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、ビオチン標識・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, Fukikō 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)

図1.

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

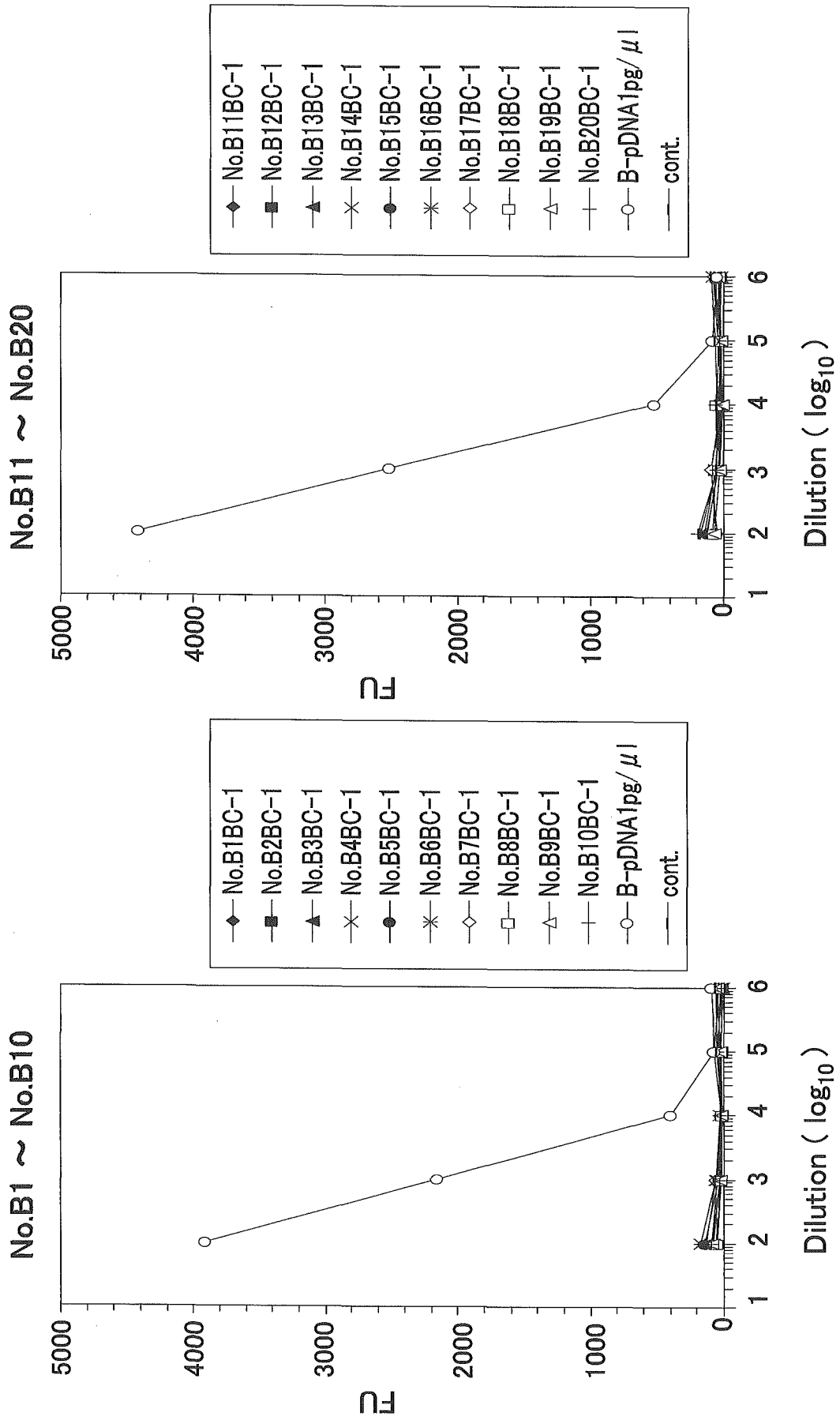
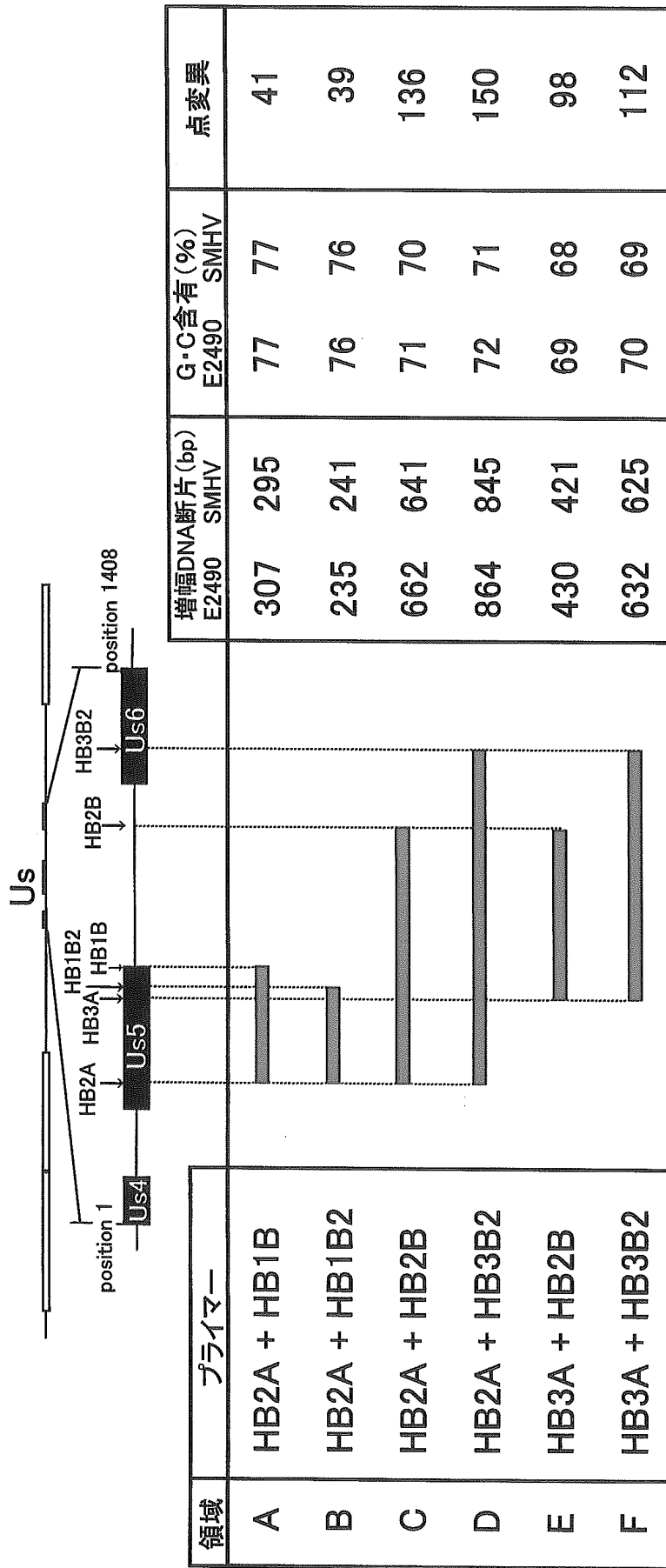


図2.

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

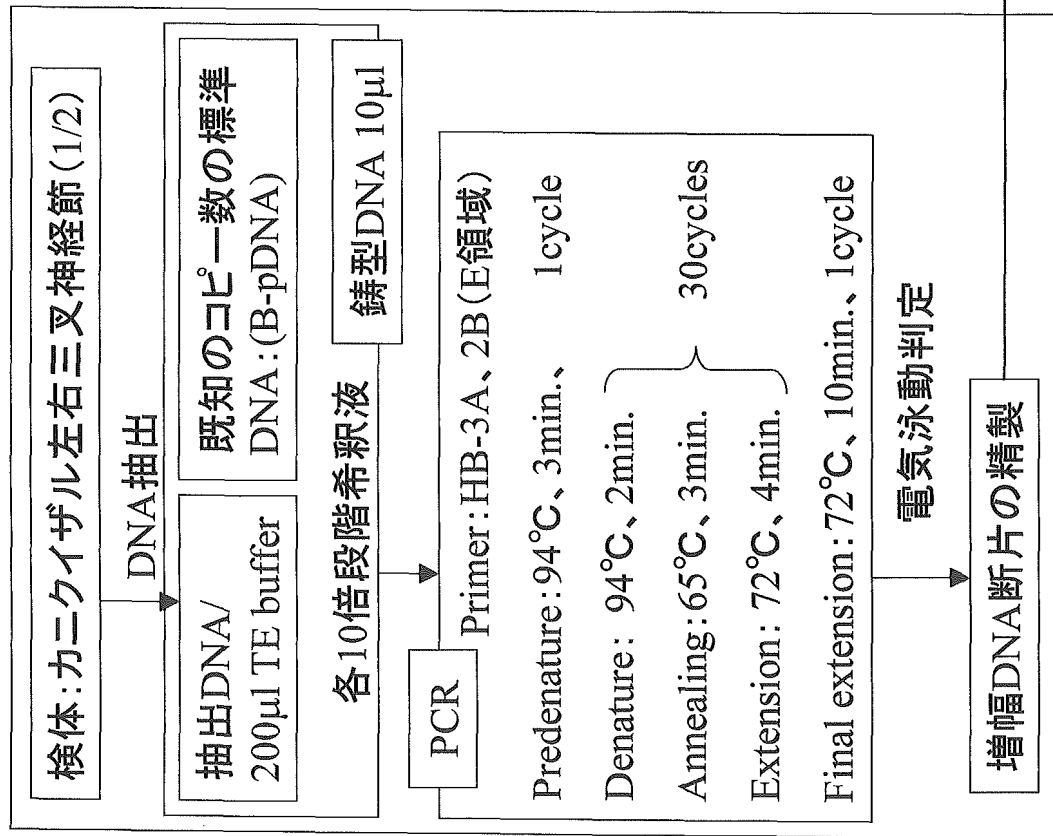


Smith et al., J. Virol. 72, 1998

<プライマー配列>

- HB2A : 5'-CCGGCTGGCCACGGACACCA-3'
- HB3A : 5'-CCTGCACCGGTGCTGTA GACG-3'
- HB1B : 5'-TCGGGGTACGGGTA GACG-3'
- HB1B2 : 5'-CGTCTACAGCACGGTGCAGG-3'
- HB2B : 5'-ATCGCGCGCGGACCGATCGT-3'
- HB3B2 : 5'-TCAGGGACCGCTCCACCGCA-3'

図3. 1. 定量PCR法



2. microplate hybridization法

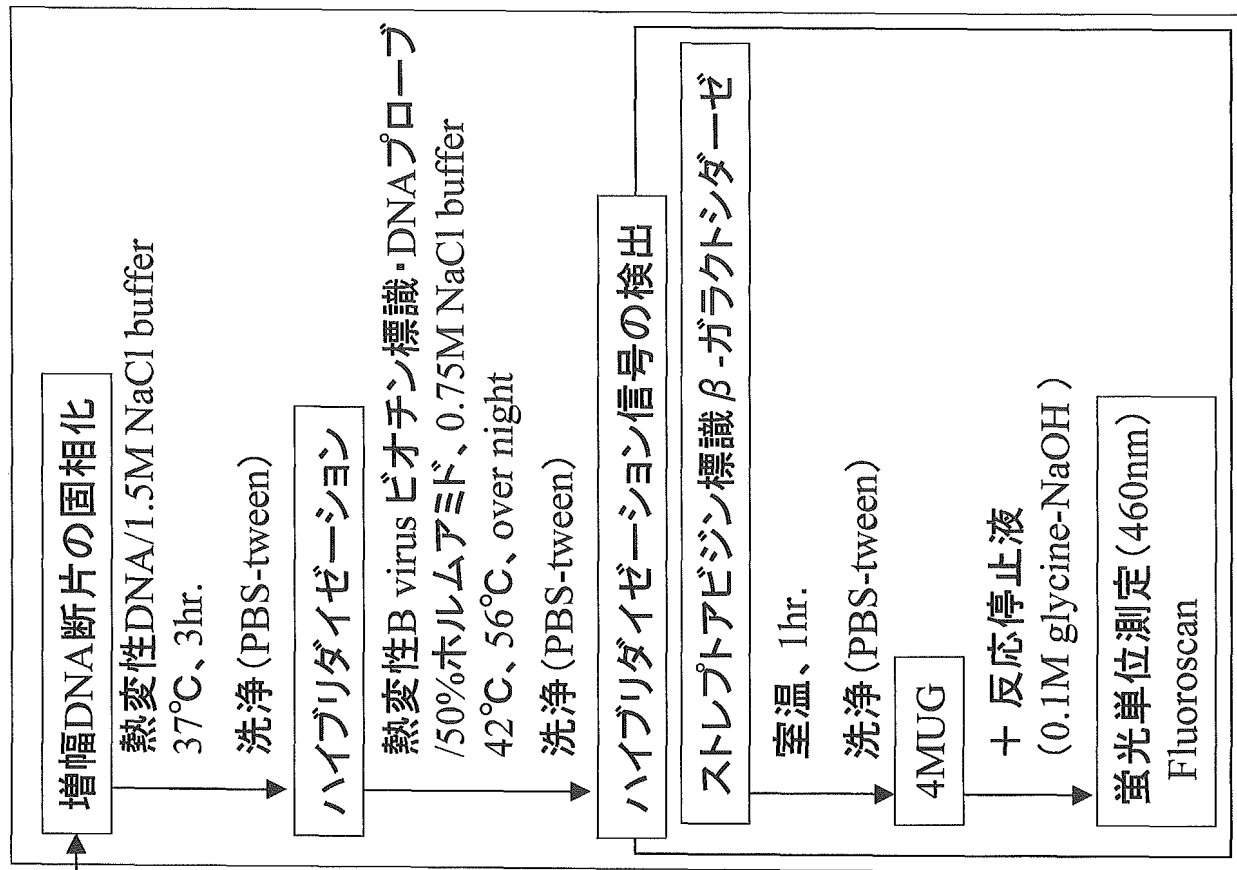
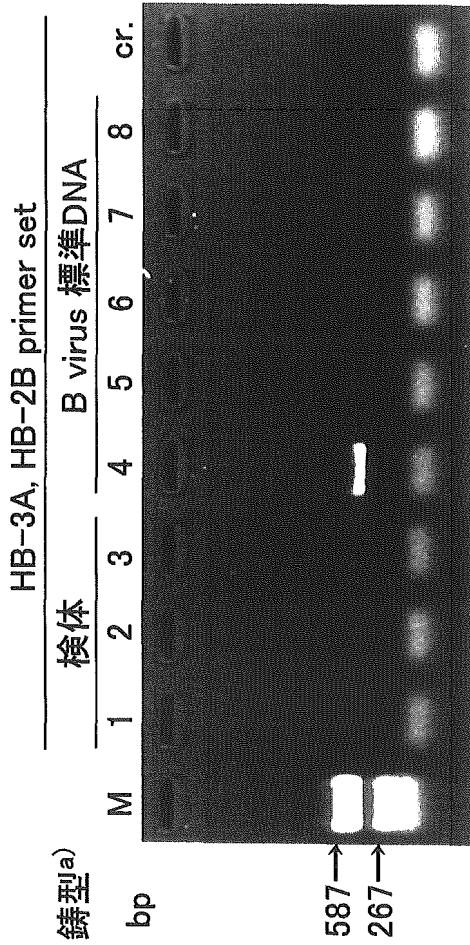


図4.

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



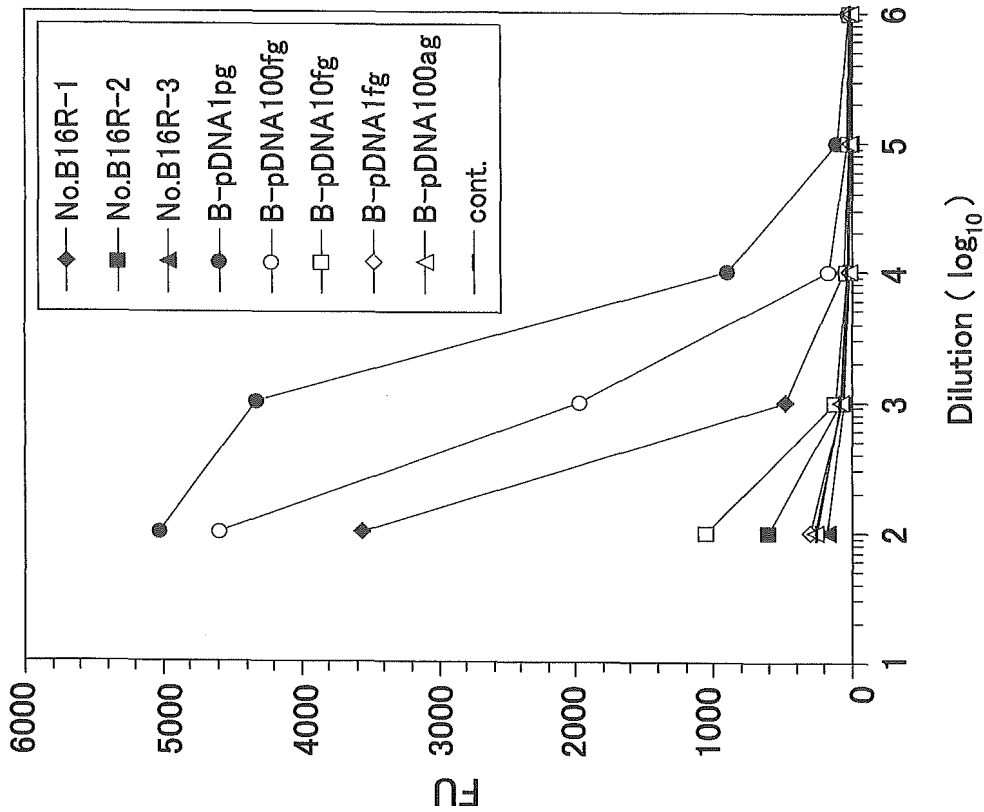
a) 検体; No.B16R-TG抽出DNA・10倍段階希釈液
 (1; 10^{-1} , 2; 10^{-2} , 3; 10^{-3})

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

2) Microplate hybridization



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