

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

検体 (A群: 10頭, B群: 20頭)

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

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

表2.

カニクイザル三叉神経節における潜伏Bウイルスゲノムコピー数

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

a) copies / TG

## 輸入動物が媒介する動物由来感染症の実態把握及び防御対策に関する研究

### 「アルゼンチン出血熱の血清診断法の開発」

分担研究者 森川 茂 (国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室長)

協力研究者 西條政幸、倉根一郎 (国立感染症研究所)  
Victor Romanowski (アルゼンチンラプラタ国立大学)

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

#### A. 目的と意義：

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

#### B. 材料と方法：

##### 1) フニンウイルス NP の精製：

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

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

##### 2) 血清：

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

##### 3) ELISA：

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

#### C. 結果：

##### 1) フニンウイルス NP の精製：

組換えバキュロウイルス感染細胞からの組

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

#### 2) ELISA :

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

#### D. 考察 :

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

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

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

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

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. (2003): Analysis of linear B-cell epitopes of the nucleoprotein of ebola virus that distinguish ebola virus subtypes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10(1):83-7.
- 2) Tang, Q., Saijo, M., Han, L., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Xinjung, W., Kurane, I., and Morikawa, S. (2003) Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays. *Journal of Virological Methods,* 108: 111-116.
- 3) Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, M.E.G., Calaor, A.B., Hernandez, M., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2003): Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. *Epidemiology and Infection,* 130(3):533-9.
- 4) Tang Q, Saijo M, Zhang Y, Asiguma M, Dong T, Han L, Shimayi B, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2003) A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever diagnosed with recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems. *Clinical and Diagnostic Laboratory immunology* 10(3):489-91.
- 5) Maeda, A., Lee, B-H., Yoshimatsu, K., Saijo, M., Kurane, I., Arikawa, J. and Morikawa, S. (2003): The Intracellular Association of the Nucleocapsid Protein (NP) of HantaanVirus (HTNV) with Small Ubiquitin-Like Modifier-1 (SUMO-1) Conjugating Enzyme 9 (Ubc9). *Virology,* 305: 288-297.
- 6) 森川 茂 (2003) : ラッサウイルス 日本臨床 61 巻増刊号 3 (通巻 821 号) 539? 543
- 7) 森川 茂 (2003) : フィロウイルス 日本臨床 61 巻増刊号 3 (通巻 821 号) 544? 5
- 8) 森川 茂 (2003) : マールブルグ病、総合臨床 (増刊 : 感染症診断・投薬ガイド) Vol 52, 601-604
- 9) 森川 茂 (2003) : ウイルス性出血熱のその検査、モダンメディア、第 49 巻第 4 号、103-109
- 10) Ikegami, T., Niikura, M., Saijo, M., Miranda, M.E., Calaor, A.B., Hernandez, M., Acosata, L.P., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2003) Antigen-capture Enzyme-linked Immunosorbent Assay that specifically detects Reston Ebola Virus nucleoprotein. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.,* 10: 552-557
- 11) Lee BH, Yoshimatsu K, Maeda A, Ochiai K, Morimatsu M, Araki K, Ogino M, Morikawa S, Arikawa J. (2003) : Association of the nucleocapsid protein of the Seoul and Hantaan hantaviruses with small ubiquitin-like modifier-1-related molecules. *Virus*

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

## 2. 知的財産権の出願・登録状況

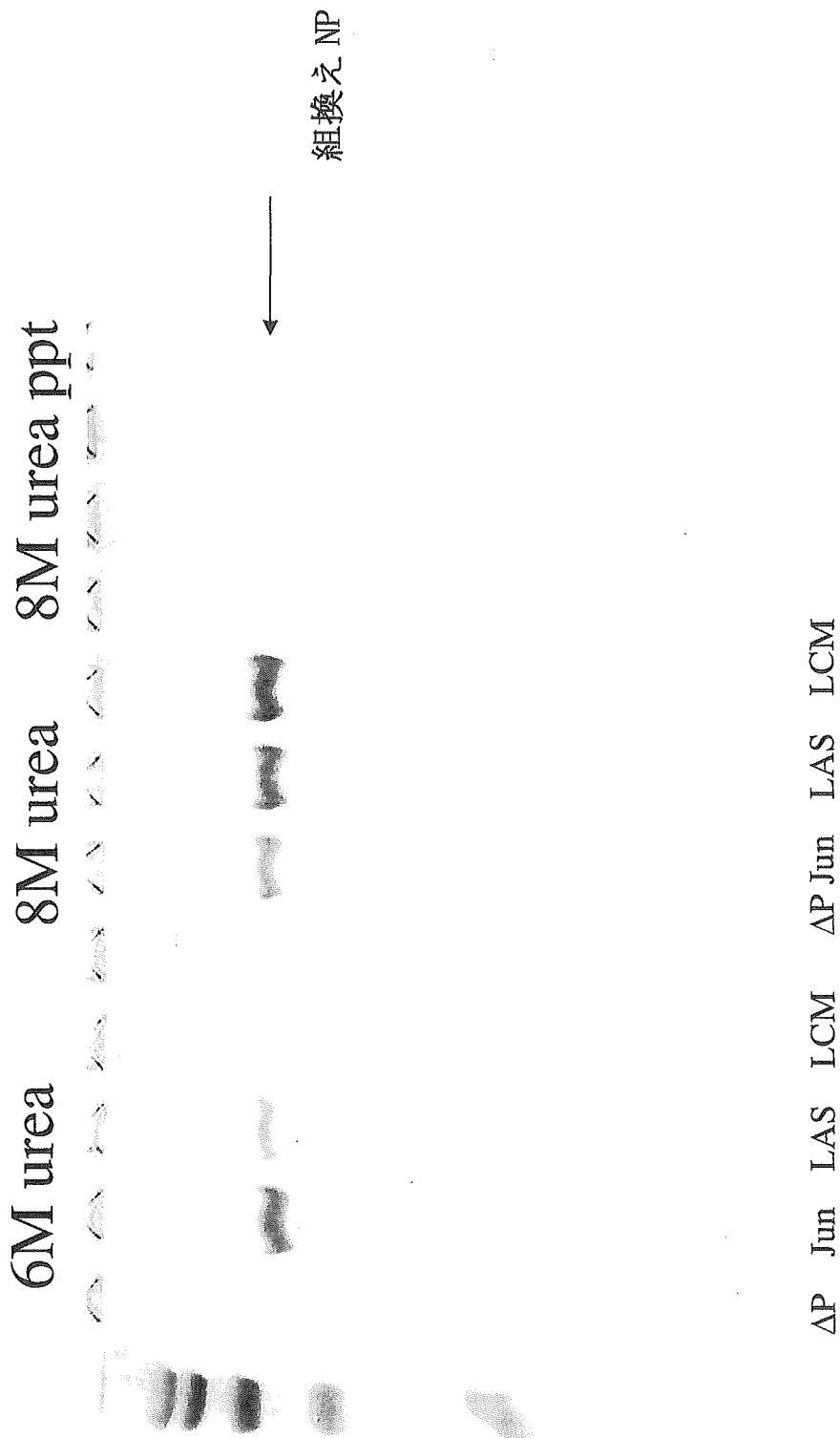
(予定を含む。)

特許取得:該当なし

## 3. 学会発表

- 1) 西條政幸, 唐青, 森川茂, 前田秋彦, 倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱に対するリバビリンによる治療経験. 第13回抗ウイルス化学療法研究会, 2003年1月, 津田沼
- 2) 板村繁之、森川茂、田代真人. 重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスの感染性とゲノムの不活化. 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003年10月, 京都.
- 3) 森川茂、板村繁之、西藤岳彦、西條政幸、小田切孝人、倉根一郎、田代真人. 重症急性呼吸器症候群(SARS)の血清診断法.

図1. 組換えバキョロウイルス感染昆虫細胞からの組換えNPの精製



ΔP : polyhedorin (-), Jun : フニンウイルス NP, LAS : ラッサウイルス NP LCM : LCM ウイルス N 発現  
バキョロウイルス感染細胞から精製した NP

表 1. ウサギ免疫血清のアレナウイルスNPに対するIgG-ELISAでの反応性

dilution	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	204800
Lassa NP												
anti-LasNP #1	>3.5	>3.5	>3.5	>3.5	>3.5	3.1	2.2	1.4	0.8	0.5	0.2	0.1
anti-LasNP #2	>3.5	>3.5	>3.5	3.3	3.0	2.2	1.5	0.9	0.5	0.3	0.1	0.1
anti-LCM-NP #1	>3.5	2.9	2.6	2.1	1.7	1.1	0.7	0.4	0.2	0.1	0.1	0.0
anti-Junin NP	>3.5	2.5	1.6	0.9	0.5	0.3	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
LCM NP												
anti-LasNP #1	>3.5	3.2	2.8	2.5	1.8	1.3	0.8	0.5	0.2	0.1	0.1	0.0
anti-LasNP #2	1.7	0.9	0.5	0.2	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
anti-LCM-NP #1	>3.5	3.2	3.3	3.4	3.3	3.0	2.7	2.4	1.4	0.9	0.5	0.3
anti-Junin NP	3.4	2.2	1.2	0.6	0.3	0.2	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
Junin NP												
anti-LasNP #1	0.3	0.2	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
anti-LasNP #2	-0.1	-0.1	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
anti-LCM-NP #1	0.2	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
anti-Junin NP	>3.5	>3.5	>3.5	>3.5	3.4	2.6	1.7	1.1	0.6	0.4	0.2	0.1

\* OD value >0.2 considered to be reactive in the ELISA

Comparative reactivity of the hyperimmune sera to the

	Las/LCM	Las/Jun	LCM/Jun
anti-LasNP #1	4	1024	256
anti-LasNP #2	64	512	> 8
anti-LCM-NP #1	0.0625	128	2048
anti-Junin NP	1	0.0313	0.0313



表2. 出血熱患者血清のアレナウイルス NP に対する IgG-ELISA での反応性

Patient serum	antigen	serum dilution									
		100	200	400	800	1,600	3,200	6,400	12,800		
Las(CDC)	Lassa	2.80	2.30	1.97	1.78	1.19	0.81	0.52	0.32		
	LCM	0.36	0.20	0.14	0.09	0.08	0.07	0.07	0.07		
	Jun d-P	0.11 0.08	0.09 0.07	0.07 0.07	0.07 0.06	0.06 0.07	0.06 0.06	0.06 0.06	0.06 0.06		
Las(JPN-1)	Lassa	2.28	1.92	1.47	0.96	0.67	0.39	0.24	0.15		
	LCM	0.21	0.14	0.11	0.08	0.07	0.07	0.07	0.06		
	Jun	0.14	0.12	0.08	0.07	0.07	0.06	0.06	0.07		
	d-P	0.09	0.08	0.08	0.07	0.06	0.07	0.06	0.06		
Arg(-)control	Lassa	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06		
	LCM	0.08	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06		
	Jun	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06		
	d-P	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06		
Morikawa (healthy control)	Lassa	0.10	0.08	0.07	0.06	0.07	0.06	0.06	0.06		
	LCM	0.11	0.08	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06		
	Jun	0.09	0.08	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06		
	d-P	0.08	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06		
Jun(Arg1)	Lassa	0.13	0.09	0.08	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06		
	LCM	0.12	0.08	0.08	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06		
	Jun	0.55	0.30	0.18	0.12	0.10	0.08	0.08	0.07		
	d-P	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07		
Jun(Arg2)	Lassa	0.15	0.11	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06		
	LCM	0.10	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07		
	Jun	0.44	0.26	0.17	0.11	0.09	0.08	0.07	0.07		
	d-P	0.09	0.08	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.07		
Las(JPN-2)	Lassa	2.58	2.07	1.57	1.20	0.77	0.50	0.30	0.19		
	LCM	0.22	0.13	0.10	0.09	0.08	0.07	0.07	0.07		
	Jun	0.13	0.09	0.09	0.08	0.08	0.07	0.06	0.06		
	d-P	0.09	0.10	0.07	0.07	0.08	0.06	0.06	0.06		
Las(JPN-3)	Lassa	3.02	2.54	2.01	1.31	0.97	0.63	0.35	0.23		
	LCM	0.30	0.17	0.12	0.09	0.08	0.07	0.07	0.07		
	Jun	0.11	0.09	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06		
	d-P	0.08	0.08	0.06	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06		

None of crossreaction between Lassa/LCM and Junin NP was observed

厚生科学研究費助成金（新興・再興感染症研究）事業  
分担研究報告書

翼手目由来ウイルス感染症の疫学的解明

分担研究者：吉川泰弘（東大大学院農学生命科学研究科）  
協力研究者：大松勉（東大大学院農学生命科学研究科）

研究要旨：近年、ニパウイルス、ヘンドラウイルス感染症といった翼手目に由来する人獣共通感染症が大きな問題となっている。しかし、翼手目の病原微生物を中心とした総合的な研究や翼手目に関する基盤研究もあまり行われていない。本研究では、翼手目に関する基盤研究と翼手目に由来する感染症の疫学的解明のための基礎技術の開発を目的とした。ミトコンドリア塩基配列を用いた系統解析において、翼手目は同一の起源から分岐し偶蹄目・奇蹄目・食肉目からなる群と近縁であることが示唆された。また抗血清を用いた他動物種 IgG との交差性について検討した結果、他動物種では 5～20%までの低値であったのに対し翼手目内では 95%以上の高値を示した。翼手目 CD4 のアミノ酸配列から V2 領域においてイヌ、ネコ、同様ジスルフィド結合を作らないことが予想された。翼手目腎臓初代培養細胞を用いて PrV、CPIV に対する感受性について評価した。その結果、PrV・CPIV それぞれ接種後 1 日目、3 日目から CPE が観察された。また、CPIV については TCID<sub>50</sub> の経時的増加が見られた。脾臓、小腸パイエル板の免疫病理組織学的な検索の結果、B リンパ球の細胞質の膨化が認められた。

A.目的

熱帯雨林の開発が進み、また大量の航空機輸送などに伴い世界の距離が短くなった昨今、今まで接触機会の考えられなかった動物種およびそれらに寄生する病原微生物等に暴露する危険性や局地的流行が短期間のうちに世界的流行に拡大するリスクが著しく増大し、様々な新興感染症および再興感染症の拡大の可能性が高まって来ている。その中で、翼手目を含めた野生動物に由来する人獣共通感染症が大きな問題となっている。特に、翼手目は狂犬病やコウモリリッサウイルス、ニパウイルス、ヘンドラウイルス感染症といった人類に重篤な疾病を引き起こす病原体の媒介動物である。また、それら以外の感染症に関しても翼手目の関与が疑われている感染症として日本脳炎、エボラ出血熱などのウイルス感染症やヒストプラズマなどの細菌感染症、クリプトスポリジウムなどの原虫感染症がある。しかしながら、現段階において翼手目の病原微生物を中心とした総合的な研究は世界的に見ても稀であり、また翼手目に関する基盤研究もあまり行われていない。そこで本研究では、翼手目に関する基盤研究と翼手目に由来する感染症の疫学的解明のための基礎技術の開発を目的とした。

B.方法

1) ミトコンドリア DNA を用いたルーセットオオコウモリの系統解析：ルーセットオオコウモリの肝凍結材料より得た mtDNA についてその塩基配列を決定し、他動物種および他

翼手目全長 mtDNA シークエンスデータと共に進化論的評価を行なった。

2) 疫学調査のための抗オオコウモリ IgG を作成し、その抗原エピトープの交差性から見た他動物種 IgG との類似性について競合 ELISA 法を用いて検索した。

3) 翼手目免疫機構の解明のため、免疫機能の中枢を担う、T リンパ球表面抗原である CD4,CD8 の塩基配列の決定を行なった。

4) 翼手目のウイルス感受性を検索するためのツールとしてルーセットオオコウモリを購入、および飼育し腎臓、肺由来線維芽細胞、グリア細胞の初代培養細胞の条件および株化細胞化について検討を行った。

5) 翼手目免疫機能の特徴を明らかにするために、脾臓、小腸パイエル板の免疫病理組織学的な検索を行なった。

### C. 結果および考察

1) mtDNA の解析結果 (図 1) から、a)大翼手亜目と小翼手亜目は別々の起源ではなく同一の起源から分岐し、b)それは霊長目や食虫目ではなく偶蹄目や奇蹄目、食肉目と尾の字起源を持つという説を支持し、さらに翼手目内における解析 (図 2) では、c)ヒナコウモリ上科群から小翼手亜目の各分類群が分岐し、d)大翼手亜目はキクガシラコウモリ上科群、サシオオコウモリ上科群と共通の祖先から分岐したと考えられた。また、e)ルーセットオオコウモリはオオコウモリの中で最も早く分岐したと考えられ、アフリカから東アジア・オーストラリアへと分布していった可能性が考えられた。

2) 各動物種血清 100 倍希釈においてオオコウモリ IgG 抗原エピトープの類似性について検討した結果 (図 3)、他動物種において交差性は 5~20%までの低い値を示したのに対し、翼手目では大翼手亜目・小翼手亜目共に 95%以上の高い値を示した。IgG の分子進化と言う観点から大翼手亜目と小翼手亜目は近縁種で単系統であると考えられる。また、近縁種と考えられている霊長目や食虫目とは、翼手目としての分岐に比べかなり以前に分岐したと考えられた。

3) ルーセットオオコウモリリンパ節由来リンパ球由来 CD4 の遺伝子について全長 cDNA の塩基配列の決定を行なった。CD4 蛋白コード領域についてヒト、マウスの CD4 と比較を行った結果、塩基配列でそれぞれ 57, 60%、アミノ酸で 55, 46%の相同性があった。また構造解析 (図 4) ではヒトやマウスと異なり細胞外 Ig-like V2 領域においてイヌ、ネコ、同様ジスルフィド結合を作らないことが予想された。この特徴は翼手目 CD4 がヒト、マウスとは異なった構造を作ること示唆し、感染病原体に対する結合や MHC class II との結合、T 細胞の活性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

4) オオコウモリより腎臓を無菌的に取り出し、トリプシン処理で細胞を分離・培養した。

条件検討として 0,1,2,5,10%FCS—DMEM を用いて条件検討を行い、一部を用いて PrV,CPIV に対する感受性について評価した。培養条件としては 10%が適当であった。また、接種試験の結果 (図 5)、PrV,CPIV それぞれ接種後 1 日目、3 日目から CPE が観察された。また、CPIV については TCID50 の経時的増加が見られた。また、成獣大脳由来グリア細胞、肺由来線維芽細胞についても初代培養細胞、株化細胞の条件を行い同様の条件を得た。

5) 検索した 5 個体すべてに脾臓白脾髄における胚中心の明瞭な拡大が脾臓全体に観察され、特殊染色および抗オオコウモリ IgG 抗体を用いた免疫染色の結果 (図 6)、B リンパ球の細胞質の膨化が認められた。また、パイエル板においても同様なものが観察された。この結果から翼手目は何らかの原因で液性免疫が活性化している可能性が示唆された。

#### D.成果の活用

##### 1)日本獣医学会 (岩手大学 2001 年秋)

大松勉・吉川欣亮・石井寿幸・久和茂・宇根有美・吉川泰弘

ミトコンドリア DNA 塩基配列を用いたルーセットオオコウモリの系統分類

##### 2)日本進化学界 (中央大学 2002 年 8 月)

大松勉・吉川欣亮・石井寿幸・久和茂・宇根有美・吉川泰弘

ミトコンドリア DNA 全塩基配列を用いた翼手目の系統分類

##### 3)Tsutomu Omatsu, Yoshiyuki Ishii, Shigeru Kyuwa, Elizabeth G Milanda, Keiji Terao, and Yasuhiro Yoshikawa

Molecular Evolution Inferred from Immunological Cross-reactivity of Immunoglobulin G among Chiroptera and Closely Related Species

Experimental Animals 52(5), 425-8, 2003

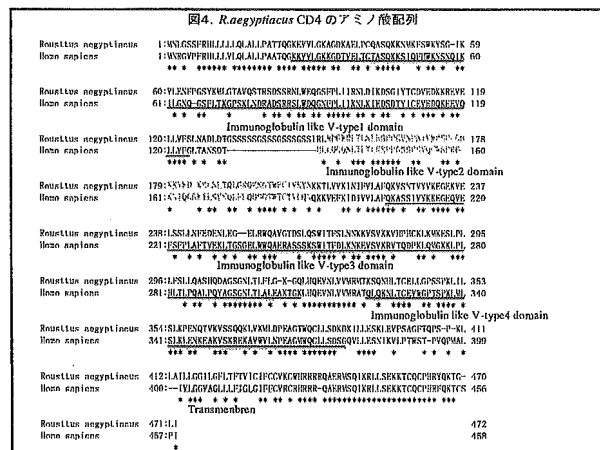
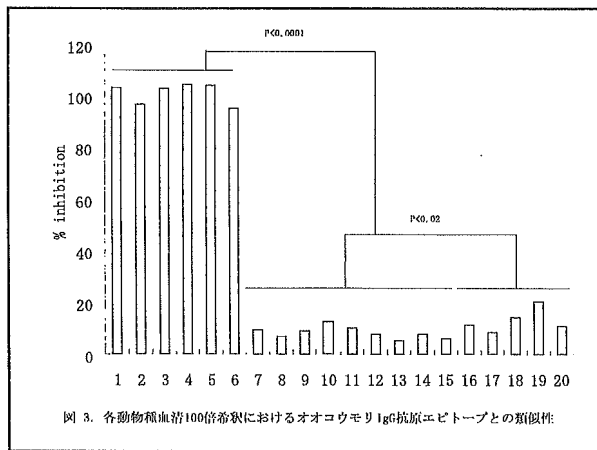
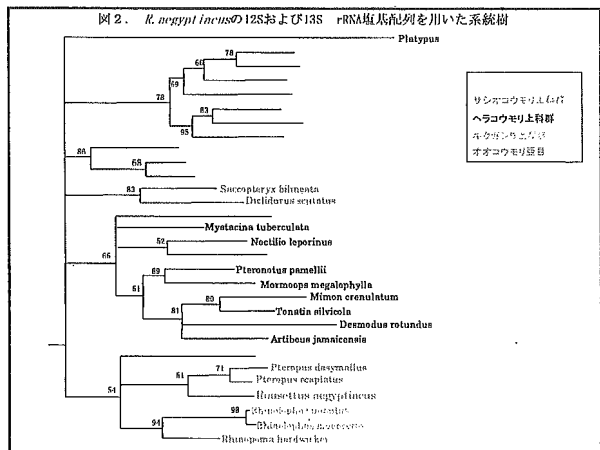
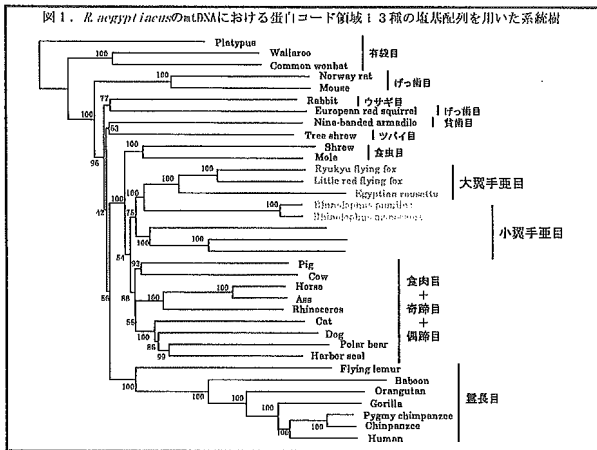


図5. オオコウモリ腎臓初代培養法の確立とそれを用いたウイルス評価

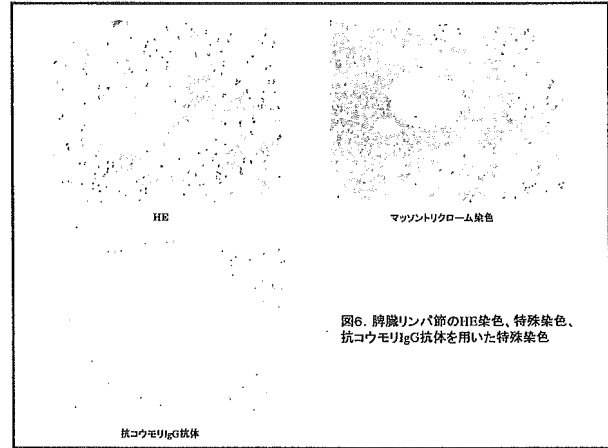
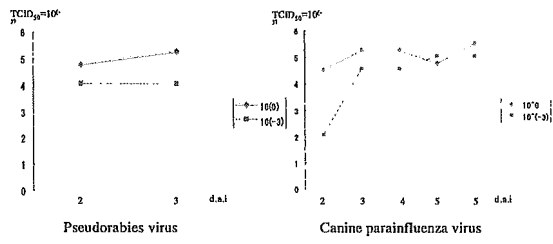


図6. 脾臓リンパ節のHE染色、特殊染色、抗コウモリIgG抗体を用いた特殊染色

# 調查資料

## 動物輸入業者へのアンケート調査結果について

(株)東レリサーチセンター

### 1. 調査の実施概要

#### (1)目的

国内の人獣共通感染症の問題をより実態に即した形で検討することを目的として、頻繁に輸入動物に接している動物輸入業者の責任者及び従業員(輸入動物に接触する業務を担当する者)に対し、輸入動物の取扱いや日頃の業務の中で経験した事柄、健康に関する意識等についてのアンケート調査を実施した。

なお、本アンケートは、全日本動物輸入業協議会の協力の下に実施された。

#### (2)実施期間

平成 15 年 11 月 18 日～平成 16 年 12 月 31 日

#### (3)調査方法等

調査対象 : 動物輸入業者の責任者及び輸入動物に接触する業務を担当する従業員  
調査方法 : 郵送によるアンケート調査

#### (4)回収数

動物輸入業者責任者 15  
輸入動物に接触する業務を担当する従業員 58

#### (5)アンケート調査票

動物輸入業者責任者用(添付1)  
従業員用(添付2)



## 2. 責任者に対するアンケートの結果

この1, 2年間の状況につきまして、下記の質問にお答え頂けますようお願いいたします。

1. 最初に、御社の概要についてお伺いいたします。

1.1 御社の社員数は何人ですか？

(●有効回答数 15)

1人～27人までの回答があり、平均の社員数は7.2名/社であった。

1.2 御社の社員の中で、業務として日常的に動物に接触される方は何人いますか？

(●有効回答数 15)

1人～25人までの回答があり、平均は約4.0名/社であった。

1.3 御社で取り扱っておられる輸入動物種(この1, 2年間)について、該当するものに○をつけて下さい。

表 2-1 動物種の取扱い有無

(●有効回答数 15)

取扱い有無	有り	無し
霊長類	5	10
食肉類	8	7
翼手目	2	13
げっ歯類	13	2
ウサギ目	4	11
その他のほ乳類	8	7
鳥類	13	2
爬虫類	8	7
その他の動物	5	10

<その他のほ乳類(記述回答)>

キリン、オカピ、アジアゾウ、アリクイ、ナマケモノ、アルマジロ、フェレット、有袋類

<その他の動物(記述回答)>

アザラシ、ペンギン、ペリカン、ハリネズミ、フェネック、淡水魚、金魚、クマ、両生類、サソリ、クモ類

1.4 御社で取り扱う動物に対する飼育中の健康管理はどのように行っていますか？(該当する番号をすべて選んで下さい。)

(●有効回答数 13、( )内は回答数)。

- ①専任の獣医師により管理を行っている(5)
- ②獣医師以外の専任者をおいて、管理を行っている(6)
- ③外部の獣医師等に依頼して行っている(5)
- ④あらかじめ決まった投薬等を行っている(5)
- ⑤健康管理は行っていない(1)

上記質問に回答しない理由として、“輸入後直ちに納入するため、飼育管理はしていない”というものがあつた。また、①の回答コメントとして、動物園の担当獣医の指示の下に健康管理を行っているという回答もあつた。

1.5 動物の受け入れや飼育に関わる従業員の方々は健康診断を受けていますか？(該当する番号を1つ選んで下さい)

(●有効回答数 15、( )内は回答数)。

- ①健康診断は、毎年必ず受けている(8)
- ②健康診断を受けるよう、会社から指導している(3)
- ③健康診断の受診については、個人の判断にまかせている(4)
- ④特に何もしていない(0)

1.6 動物を取り扱う従業員の方々への指導としてどのようなことを行っていますか？(該当する番号をすべて選んで下さい)

(●有効回答数 15、( )内は回答数)。

- ①動物を取り扱う前後には、手洗いを実施すること(14)
- ②動物を取り扱うときは、マスクを着用すること(3)
- ③動物を取り扱うときは、専用の履物を使用すること(5)
- ④動物を取り扱うときは、専用作業服を着用すること(7)
- ⑤動物を取り扱った後には、うがいを実施すること(10)
- ⑥その他(3)

その他に関する記述回答としては、手袋の着用、作業後にシャワーを浴びる、特に行っていない、というものがあつた。

2. 次に、外国から輸入した動物やその動物の状況等に関してお伺いいたします

2.1 外国からの到着時、健康に異常があったり、死亡したりする動物はどのくらいいますか。御社でお取扱いの動物種についてのみ①～⑤の中から選んで下さい。

表 2-2 外国からの到着時、動物の健康に異常があったり、死亡したりすること

動物種	① 全くない	② 少しある	③ たまにある	④ たびたびある	⑤ ほぼ毎回ある
霊長類	1	3	0	0	0
食肉類	8	0	1	0	0
翼手目	2	0	0	0	1
げっ歯類	4	5	2	2	0
ウサギ目	2	0	1	0	0
その他のほ乳類	5	4	0	0	0
鳥類	1	8	2	1	0
爬虫類	1	4	0	2	0
その他の動物	4	2	1	0	0

\*会社の輸入業務として取り扱っていない動物種であっても、輸入時の支援業務等のみを担当する場合がありますため、本問の回答総数は 1.3 と異なる場合があります。

2.2 外国からの到着時、検疫等の証明書(健康証明書等を含む)が添付されている動物はどのくらいいますか? 御社でお取扱いの動物種についてのみ①～④の中から選んで下さい。

表 2-3 外国からの到着時、検疫などの証明書(健康証明書等を含む)が添付されている

動物種	① 全くない	② 少し	③ 多い	④ ほぼ全部
霊長類	0	0	0	3
食肉類	0	1	0	7
翼手目	0	0	0	2
げっ歯類	1	2	0	9
ウサギ目	0	0	0	1
その他のほ乳類	0	0	1	8
鳥類	1	1	0	10
爬虫類	2	0	3	1
その他の動物	0	0	2	2

\*会社の輸入業務として取り扱っていない動物種であっても、輸入時の支援業務等のみを担当する場合がありますため、本問の回答総数は 1.3 と異なる場合があります。

2.3 外国からの到着時、動物にノミやシラミ、ダニなどがついている場合がありますか？あるとすればどのくらいですか？御社でお取り扱いの動物種についてのみ①～⑤の中から選んで下さい。

表 2-4 外国からの到着時、動物にノミやシラミ、ダニなどがついていること

動物種	① 全くない	② 少しある	③ たまにある	④ たびたびある	⑤ ほぼ毎回ある
霊長類	2	1	0	0	0
食肉類	6	2	0	0	0
翼手目	1	1	1	0	0
げっ歯類	7	3	1	0	0
ウサギ目	1	0	0	0	0
その他のほ乳類	5	2	1	0	0
鳥類	9	2	1	0	0
爬虫類	2	2	1	1	0
その他の動物	2	2	1	0	0

\*会社の輸入業務として取り扱っていない動物種であっても、輸入時の支援業務等のみを担当する場合がありますため、本問の回答総数は 1.3 と異なる場合があります。

2.4 外国からの到着時や輸送中、飼育中に動物が逃亡することはありますか？御社でお取り扱いの動物種についてのみ①～⑤の中から選んで下さい。

表 2-5 到着時や輸送中、飼育中に動物が逃亡すること

動物種	① 全くない	② 少しある	③ たまにある	④ たびたびある	⑤ ほぼ毎回ある
霊長類	3	0	0	0	0
食肉類	7	1	0	0	0
翼手目	2	0	0	0	0
げっ歯類	11	1	0	0	0
ウサギ目	2	0	0	0	0
その他のほ乳類	9	0	0	0	0
鳥類	10	2	0	0	0
爬虫類	5	1	0	0	0
その他の動物	5	0	0	0	0

\*会社の輸入業務として取り扱っていない動物種であっても、輸入時の支援業務等のみを担当する場合がありますため、本問の回答総数は 1.3 と異なる場合があります。