

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 福土 秀人 岐阜大学応用生物科学部獣医学講座教授

研究要旨:我々が開発した間接蛍光抗体法を野外例に応用し、有用性を検討した。その結果、発症患者抗体と不顕性感染者抗体では反応性が異なることを見いだした。これまでに多数検出されていたQ熱抗体陽性者は大半が不顕性感染者である可能性が見いだされ、本法を応用することにより公衆衛生上の対策を考慮する際に有意義な成果が得られると考えられた。また、急性型Q熱に特異的な抗原, acute disease antigen A (adaA), を解析し、病原学的診断用標的遺伝子ならびに鑑別診断用抗原として有用であることを示した。

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。これまでに我々は、コクシエラ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を確立した。さらに、我が国でこれまでに分離された *C. 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。

今回は、間接蛍光抗体法を野外例に応用し、有用性を検討した。また、以前の我々の研究 (Ho et al., Microbiol. Immunol. 42:81-85, 1998) において見いだされた急性型Q熱に特異的な抗原, acute disease antigen A (adaA), を解析した。

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。

[血清材料]

健康人血清 50 検体および Q 熱が疑われた患者血清 9 検体を被検血清とした。

[adaA 抗原のクローニング]

adaA 抗原遺伝子を lambdaZAP II ライブラリーからクローニングした。pET23a ベクターを用い発現蛋白質を得た。感染動物血清との反応性をウェスタンブロットにより解析した。

(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

間接蛍光抗体法を野外例に応用したところ、3つの染色パターンが観察された。細胞内黄緑色の封入体および細胞外散在性の黄緑色の粒子が観察されるパターン、細胞内黄緑色の封入体のみが観察されるパターンおよび蛍光が観察されないパターンであった。検体の症状の有無と細胞外散在性粒子の反応パターンはほぼ一致していた。このことから、封入体のみが蛍光染色される場合は陰性とし、細胞外散在性粒子も同

時に蛍光染色される場合を陽性とするべきであると考えられた。

2. 急性型特異的抗原 A の解析

28-kDa 蛋白質をゲル電気泳動により精製しアミノ末端配列を得た。この配列に基づいてプローブを作成し、lambdaZAP II ライブラリーより反応クローンをクローニングした。さらに pET23a にクローニングし発現蛋白質を得た。この蛋白質を抗原として作成した抗血清は急性型株とは反応したが、慢性型株とは反応しなかった。また、逆にこの抗原は急性型株感染動物血清と反応したが、慢性型株感染動物血清とは反応しなかった。

D. 考察

従来、血清診断法では顕性発症患者と不顕性感染者抗体が混在して判定されていた可能性がしめされた。今回の方法では実際の発症者と不顕性感染者の抗体応答を区別できるものと考えられた。しかしながら、この反応性の差を規定している抗体が認識する抗原の同定にはいたっていない。今後、顕性発症患者のみが認識する抗原を同定することによりさらに有用な血清診断法を開発できると考えられる。

また、急性期に特有な抗原 adaA を解析し、急性型株と慢性型株を鑑別できる可能性が示された。病型の類症鑑別が可能になれば予後の予測ができ、治療方針の決定に有用であろう。しかしながら、この adaA 抗原と先の間接蛍光抗体法における反応性の差とを結びつけるにはいたっていない。今後さらに、検討が必要である。

E. 結論

我々が開発した間接蛍光抗体法は Q 熱の顕性発症患者と不顕性感染者を鑑別できる可能性が示された。また、急性型特異抗原が見いだされ、病型の違いを鑑別する上で有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Zhang G, To H, Russell KE, Hendrix LR, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K, Samuel JE: Identification and characterization of an immunodominant 28-kilodalton *Coxiella burnetii* outer membrane protein specific to isolates associated with acute disease. *Infection and Immunity* 73 (3): 1561-1567, 2005.

2. 学会発表

1) 蔡 燕, 矢野竹男, 野村彩朱, 竹田有紀子, 中尾義喜, 松尾雄志, 芳賀敏美, 今井俊介, 平井克哉, 福士秀人: Q 熱コクシエラ抗体スクリーニング(法)の改良. 第 45 回臨床化学会, 2005.

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

野生齧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

わが国の野生齧歯類における *Bartonella* 属菌の分布とその分離株の分子生物学的特性

分担研究者 丸山総一 日本大学生物資源科学部 教授

研究要旨：本年度は、*Bartonella* 感染症の疫学に関する基礎研究として、これまで不明であったわが国の野生齧歯類における *Bartonella* 属菌の保菌状況について検討した。1997年10月～2004年9月にかけて青森、群馬、神奈川、静岡、徳島の各県で捕獲した野生齧歯類 414 頭（アカネズミ 48 頭、ヒメネズミ 22 頭、スミスネズミ 1 頭、クマネズミ 259 頭、ドブネズミ 84 頭）から *Bartonella* 属菌の分離を試みた。調査した齧歯類のうち、*Apodemus* 属であるアカネズミの 56.3% (27/48) とヒメネズミの 59.1% (13/22) からのみ *Bartonella* 属菌が分離された。また、青森県で捕獲した 2 頭のアカネズミが異なる *Bartonella* 属菌に混合感染していることが明らかとなった。*Apodemus* 属における捕獲県別の保菌率は、青森県の 63.2% (12/19)、群馬県の 100% (1/1)、神奈川県 100% (4/4)、静岡県の 55.3% (21/38)、徳島県の 33.3% (2/6) であった。PCR-RFLP 法により分類した株の 73.8% が *B. grahamii*, 9.5% が *B. tribocorum*, 4.8% が *B. taylorii* であった。さらに、既存の *Bartonella* 属菌に該当しない 2 菌種が存在した。これらの 2 菌種について、各遺伝子の塩基配列を既存の *Bartonella* 種と比較したところ、新種の *Bartonella* であることが判明した。

A. 研究目的

Bartonella は、哺乳類を自然病原巣とする 1 科 1 属の赤血球内寄生性の細菌で、現在までに 20 種 3 亜種が知られている。このうち 7 種 2 亜種が人獣共通感染症の病原体であることが報告されている。特に、齧歯類に分布する *Bartonella* 属菌のうち、*B. grahamii* は視神経網膜炎、*B. elizabethae* が心内膜炎、*B. vinsonii* subsp. *arupensis* が菌血症と発熱を人に引き起こすことが明らかとなっている。しかしながら、日本国内における齧歯類の *Bartonella* 属菌の感染状況は全く明らかにされていない。そこで本研究では、*Bartonella* 感染症の疫学に関する基礎研究として、これまで不明であったわが国の野生齧歯類にお

ける *Bartonella* 属菌の保菌状況ならびにその分離株の分子生物学的性状について検討した。

B. 研究方法

【材料】

齧歯類：1997年10月～2004年9月にかけて青森、群馬、神奈川、静岡、徳島の各県でシャーマン式トラップを用いて捕獲した野生齧歯類 414 頭（アカネズミ 48 頭、ヒメネズミ 22 頭、スミスネズミ 1 頭、クマネズミ 259 頭、ドブネズミ 84 頭）を実験に供試した。

【検査方法】

捕獲した野生齧歯類は、エーテルまたは二酸化炭素の深麻酔下で心臓から血液を採取した。血液は、血清を分離した後、使用時まで -70°C で保存した。実験時は、凍結した血液（血

餅を含む) を室温で融解し、充分ホモジエナイズした後、5%ウサギ血液加 heart-infusion 寒天培地を用い、35°C、5%CO₂ 下で2週間培養した。

培地上に発育した *Bartonella* 属菌を疑う株は、純培養後インスタジーン(Bio-Rad)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAを用い、*rpoB* 領域のPCRにより *Bartonella* 属菌であることを確認したのち、制限酵素 *AcsI* を用いたPCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)により5つの型に分類した。さらに分離株の16S ribosomal RNA (16S rDNA), citrate synthase (*glcA*), RNA polymerase beta-subunit (*rpoB*), cell division protein (*ftsZ*), heat shock protein (*groEL*), riboflavin synthase alpha chain C (*ribC*)の各遺伝子領域の塩基配列をダイレクトDNAシーケンス法により決定し、種の同定を行った。

C. 研究結果及び考察

調査した齧歯類のうち、*Apodemus* 属であるアカネズミの56.3% (27/48)とヒメネズミの59.1% (13/22)からのみ *Bartonella* 属菌が分離された。また、青森県で捕獲した2頭のアカネズミが異なる *Bartonella* 属菌に混合感染していることが明らかとなった。捕獲した県別にみた *Apodemus* 属のネズミの保菌率は、青森県の63.2% (12/19), 群馬県の100% (1/1), 神奈川県100% (4/4), 静岡県55.2% (21/38), 徳島県33.3% (2/6)であった(表1)。PCR-RFLP法により分類した株の73.8%は *B. grahamii*, 9.5%は *B. tribocorum*, 4.8%は *B. taylorii* であった。さらに、新種と思われる *Bartonella* 属菌が2菌種(9.5%, 2.4%)存在していた(表2)。これらの2菌種について、各遺伝子の塩基配列を既存の *Bartonella* 種と

比較したところ、新種の *Bartonella* 属菌であることが明らかになった。

本研究により、日本国内に生息する野生齧歯類のうちアカネズミとヒメネズミは *Bartonella* 属菌を高率(57.1%)に保菌していることが明らかとなった。さらに、齧歯類における *Bartonella* 属菌の混合感染が *Apodemus* 属で初めて確認された。また、分離株の多くはヒトに対し視神経網膜炎を起こす *B. grahamii* と未だ病原性の不明な *B. tribocorum*, *B. taylorii* であり、*Bartonella* 属菌の新たな2菌種がわが国の野生齧歯類に分布していることが明らかとなった。

D. 結論

本研究では、これまで不明であった日本国内の野生齧歯類における *Bartonella* 属菌の保菌状況について調査を行ない、*Apodemus* 属の57.1%が *Bartonella* 属菌を保有していることを明らかにした。さらに、PCR-RFLP法とDNAシーケンスによる菌種の同定法を開発し、分離株の73.8%が人に対し視神経網膜炎を起こす可能性のある *B. grahamii* であり、*B. tribocorum*, *B. taylorii* の2種に加え、新種と思われる *Bartonella* 属菌が日本国内の野生齧歯類に分布していることを明らかにした。

E. 健康危険情報

これまで調査した日本国内の野生齧歯類、特に、*Apodemus* 属の57.1%が *Bartonella* 属菌を保有しており、分離株の73.8%が人に対し視神経網膜炎を起こす可能性のある *B. grahamii* であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chomel, B B., Boulois, H-J, Maruyama, S. and Breitschwerdt, E. B. 2006. *Bartonella* in pets: impact on human health. *Emerg. Infect. Dis.* (in press).
- 2) Chang, C-C., Lee, C-C, Maruyama, S., Lin, J-W., and Pan, M-J. 2006. Cat scratch disease in veterinary associated populations and in its cat reservoir in Taiwan. *Vet. Res.* (in press)
- 3) Kabeya, H., Sase, M., Yamashita, M. and Maruyama, S. 2006. Predominant T helper 2 immune responses against *Bartonella henselae* in naturally infected cats. *Microbiol. Immunol.* (in press)
- 4) 高橋敏子, 久保雅敏, 鈴木宣夫, 長井章, 松本寿男, 小林洋平, 森田幸雄, 丸山総一 (2005) : 群馬県の猫および犬における *Bartonella* 保有状況と分離株の遺伝子多型性. 日獣会誌58:697-702.
- 5) 日本臨床増刊号 : 広範囲血液・尿科学検査, 免疫学検査 (その数値をどう読むか), 猫ひっかき病の検査 p237-240, 2005年7月, (株) 日本臨床社, 大阪

2. 学会発表

- 1) 井上 快, 丸山総一, 山田直之, 壁谷英則, 佐藤雪太, 見上 彪, 大橋典男, 増沢俊幸, 川森文彦, 角坂照貴, 高田伸弘, 藤田博己, 小泉信夫, 川端寛樹(2005) : 日本の野鼠に分布する *Bartonella* 属菌と同定法の開発. 第139回日本獣医学会 (埼玉, 理研)

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

表 1. 地域別・野鼠別にみた *Bartonella* 属菌保菌状況

県	地域	アカネズミ		ヒメネズミ		スミスネズミ		計	
		捕獲数	陽性数(%)	捕獲数	陽性数(%)	捕獲数	陽性数(%)	捕獲数	陽性数(%)
青森	津軽郡	18	11 (61.1)	1	1 (100)	NT	・	19	12 (63.2)
群馬	水上町	NT	・	1	1 (100)	NT	・	1	1 (100)
神奈川*	藤沢市	1	1 (100)	3	3 (100)	NT	・	4	4 (100)
静岡	下田市	2	0	NT	・	NT	・	2	0
静岡	富士市	21	13 (61.9)	17	8 (47.1)	1	0	39	21 (53.8)
徳島	日和佐町	6	2 (33.3)	NT	・	NT	・	6	2 (33.3)
	計	48	27 (56.3)	22	13 (59.1)	1	0	71	40 (56.3)

*神奈川県横浜市で捕獲したドブネズミ 83 頭, クマネズミ 256 頭からは *Bartonella* 属菌は分離されなかった。

表 2. わが国の野鼠から分離された *Bartonella* 属 42 株の菌種とその割合

分離菌種	株数 (%)
<i>B. grahamii</i>	31 株 (73.8)
<i>B. tribocorum</i>	4 株 (9.5)
<i>B. taylorii</i>	2 株 (4.8)
新種 1	4 株 (9.5)
新種 2	1 株 (2.4)

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

病原性 *Yersinia* の迅速検出法ならびに
Yersinia kristensenii のげっ歯類に対する病原性に関する研究

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 *Yersinia enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* の迅速な検出のために昨年度の研究で開発した LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法を、エルシニア症での死亡が疑われる動物の感染症例に応用し、培養法と検出感度を比較した結果、調査した 33 検体中 *Y. pseudotuberculosis* 感染で死亡した 14 検体はいずれも LAMP 法と培養法で陽性となり、昨年度開発した LAMP 法は実用的で迅速・高感度な遺伝子診断法であることが確認できた。また、動物におけるエルシニア症の調査過程で、野生げっ歯類が高率に保菌し、これまで非病原性と考えられていた *Yersinia kristensenii* によるリスザルの感染致死例を見出した。分離された *Y. kristensenii* は免疫抑制状態のマウスに致死性を示す弱毒な病原性株であることが判明した。また、本菌をマウスに経口投与後、強毒の *Y. pseudotuberculosis* を経口投与すると、マウスは *Y. pseudotuberculosis* の感染は阻止できないものの、致死から免れてすべて生残した。

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、野生げっ歯類を、自然界における主たるレゼルボアとする代表的な人獣共通感染症原因菌として知られている。昨年度、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、LAMP

(Loop-mediated isothermal amplification) 法を開発したが、本年度は本法をエルシニア症が疑われる動物の臨床例に応用し、その実用性や有用性を検証した。また、この調査の過程で見出した非病原性と考えられている *Yersinia kristensenii* によるリスザルの感染致死例からの分離菌について、げっ歯類に対する病原性や感染性について検討した。

B.研究方法

1.LAMP 法の臨床検体への応用

1) 供試検体

供試検体として、2005年1～12月にエルシニア感染症が疑われた動物の死亡検体33検体（リスザル23検体、マントヒヒ3検体、シロガオサキ2検体、アジルテナガザル1検体、ワオキツネザル1検体、エリマキキツネザル1検体、ニホンリス1検体およびオオハシ1検体）の肝臓、脾臓、小腸パイエル板などの臓器を用いた。

2) LAMP法と培養法による病原性エルシニアの検出

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*、ならびに両菌種のプラスミド 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た。供試検体の臓器から抽出した 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 LAMP 反応を行った。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、同じ検体を CIN 寒天培地(OXOID)に接種し、25℃で48時間培養し *Yersinia* 属菌の分離を行った。さらに、供試検体から分離された *Y. pseudotuberculosis* については、病原性遺伝子として *virF*、*inv*、*Y. pseudotuberculosis* が保有するスーパー抗原をコードする *ypmA*、*ypmB* および *ypmC*、ならびに鉄規定タンパ

クをコードしている *irp2* を選び、その保有状況を PCR 法により検索した。

2.死亡したリスザル由来 *Yersinia kristensenii* の病原性と感染性

1) 供試菌株

供試菌株として2005年5月に敗血症で死亡したリスザルから分離した *Yersinia kristensenii* を用いた。

2) リスザル由来 *Y. kristensenii* のマウスに対する病原性

病原性の評価には、ICR マウス（4週齢、オス）に Iron-Dextran (25mg/l) と Deferoxamine mesylate salt (25mg/ml) をそれぞれ 0.2ml ずつ腹腔内投与し免疫抑制状態にした群と未処置群それぞれ5匹に、 10^7 CFU/ml に調整した供試菌を腹腔内投与し、菌投与後1週間死亡状況を観察した。

3) リスザル由来 *Y. kristensenii* のマウスに対する感染性

供試菌のマウスへの感染性を調べる目的で、 10^7 CFU/ml に調整した供試菌を BALB/c マウス（5週齢、オス）に、経口ならびに皮下にそれぞれ6匹と7匹に投与し、経時的に排菌状況と死亡状況を観察した。また、菌投与後29日目に 10^9 CFU/ml に調整した強毒の *Y. pseudotuberculosis* 血清型4bを両群に経口投与し、排菌状況と死亡状況を観察した。また、コントロールとして、*Y. kristensenii* 未投与の同じ週齢のマウス7匹を用いた。

C 研究結果

1. LAMP 法と培養法による病原性エルシニアの検出成績

供試 33 検体中、培養法により *Y. pseudotuberculosis* 14 検体、*Y. kristensenii* 1 株が分離された。一方、LAMP 法では *Y. pseudotuberculosis* が 14 検体から検出された。また、分離された *Y. pseudotuberculosis* は *virF* および *inv* 遺伝子を保有する病原性株で、いずれもスーパー抗原をコードする *ypmA* 遺伝子を保有していた。なお、*irp2* 遺伝子はいずれも保有していなかった。

2. 死亡したリスザル由来 *Yersinia kristensenii* のマウスに対する病原性成績

死亡したリスザル由来 *Yersinia kristensenii* を免疫抑制したマウスと未処理のマウスに腹腔内投与すると、未処理マウスでは全例が生存したが、免疫抑制マウスでは全例が菌投与後 1 週間目までに死亡した。

3. リスザル由来 *Y. kristensenii* のマウスに対する感染性成績

リスザル由来 *Y. kristensenii* を皮下または経口投与したマウスは、いずれも投与菌を排菌しないか、投与 1 週間以内に排菌を停止した。また、*Y. kristensenii* 投与後 29 日目に強毒の *Y. pseudotuberculosis* を経口投与すると、*Y. kristensenii* 未投与のコントロール群では 7 匹すべてが菌投与後 1 週間目までに死亡し、皮下投与群も 7 匹中 6 匹が菌投与後 1 週間目ま

で死亡したのに対し、経口投与群では 6 匹すべてが *Y. pseudotuberculosis* を排菌するものの菌投与後 28 日目まで生残した。

D. 考察

病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* の迅速な検出のために昨年度の研究で開発した LAMP 法を、エルシニア症での死亡が疑われる動物の症例に応用し、培養法との間で検出感度を比較した結果、LAMP 法は培養法と同様の検出感度を示した。LAMP 法は検体処理時間を合わせても 2 時間以内に同定できる迅速性を持つことを考慮すると、昨年度開発した病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* 検出のための LAMP 法は極めて実用的で迅速・高感度な遺伝子診断法であることが確認できた。

動物におけるエルシニア症の調査過程でリスザルの *Y. kristensenii* による感染致死例を見出したが、*Y. kristensenii* は一般的に非病原性の *Yersinia* 属菌と考えられており、これまでに本菌による動物の自然感染例は報告されていない。本症例は世界で初めての本菌による動物感染致死例である。Robins-Browne ら¹⁾ は *Y. kristensenii* の中に免疫抑制状態のマウスに対して病原性を示す菌株があることを報告しているが、本調査で死亡したリスザルから分離した *Y. kristensenii* も、Robins-Browne らの報告と同様、マウスに対し弱い病原性を示す菌株であった。

Y. kristensenii は環境中に広く分布し、野生のげっ歯類から比較的高率に分離されることが報告されている²⁾。今回、分離した *Y. kristensenii* のげっ歯類に対する感染性を調べる目的で、分離菌をマウスに対し経口と皮下に投与したが、いずれの場合も投与菌はマウスから排菌されないか、投与1週間以内に排菌が停止したことから、分離菌はマウスに対し腸管定着性は持たないものと思われる。しかし、本菌をマウスに経口投与後29日目に、強毒の *Y. pseudotuberculosis* を経口投与した場合、*Y. pseudotuberculosis* のマウスの腸管定着は阻止できなかったが、28日間の観察期間を通じ菌投与マウスは死亡することなくすべて生残した。一方、*Y. kristensenii* 未投与のマウスでは *Y. pseudotuberculosis* を経口投与後1週間目までに全例が死亡し、皮下投与したものも1例を除き全例が菌投与後1週間目までに死亡したことから、*Y. kristensenii* の経口投与は、そのメカニズムは不明であるが、マウスに対し *Y. pseudotuberculosis* の病原性を低減させる何らかの免疫能を付与するものと思われる。Fukushima³⁾は、野外で捕獲した成獣のアカネズミに *Y. pseudotuberculosis* を経口投与した場合、2週間程度の排菌の後ほとんどが生残したのに対し、研究室で生まれた幼獣個体は経口投与後1週間目までにすべての個体が死亡したことを報告しているが、成獣と幼獣における感受性の差はアカネズミの年齢によるものだけでなく、自然環境中には *Y.*

kristensenii を含めた非病原性の *Yersinia* 属菌が広く分布しており、アカネズミの成獣はこれらの菌を日常的に経口摂取しているので、強毒の *Y. pseudotuberculosis* に対してなんらかの弱い免疫能を獲得していたことによる可能性が考えられる。

いずれにしろ、今回の研究で見出したマウスに対して *Y. kristensenii* が *Y. pseudotuberculosis* に対し弱い交差免疫能を付与する現象は、野生げっ歯類における *Yersinia* 属菌の生態や疫学を考える上で極めて興味深いものであり、また、今後、病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* に対する経口ワクチンを開発する上で貴重な知見を提供するものと考えられる。来年度は、今回見出した現象のメカニズムの解析やこの現象が他の *Yersinia* 属菌でも観察されるのか否かについても検討していきたい。

参考文献

- 1)Robins-Browne, R. M., et al., Infect. Immun. 59: 162-167, 1991.
- 2)Hayashidani, H., et al., J.Clin.Microbiol. 33: 1253-1257, 1995.
- 3)Fukushima, H., Zentralbl. Bacteriol. 275: 530-540, 1991.

E.結論

昨年度開発した病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* のための LAMP 法は、

迅速かつ高感度な実用的遺伝子診断法であることが確認できた。また、リスザル感染致死例から分離された *Y. kristensenii* は、マウスに対して弱い病原性を示し、かつ経口投与によりマウスに *Y. pseudotuberculosis* に対する弱い免疫能を付与することが判明した。

F.健康危険情報

なし

G.研究論文

1.発表論文

- 1) 林谷秀樹: *Yersinia pseudotuberculosis* 感染症(仮性結核). モダンメディア 51,211-216.,2005.
- 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

- 1) 岩田剛敏、宇根有美、Alexandre Tomomitsu Okatani、加藤行男、中臺文、林谷秀樹、サルから分離された *Yersinia pseudotuberculosis* の病原性状、第5回人と動物の共通感染症研究会学術集会、東京、2005年11月。

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： *Babesia rodhaini* は野生げっ歯類由来の赤血球寄生原虫で、ヒトバベシア症の原因である *B. microti* と近縁ではあるが完全な別種の原因である。本研究では、*B. rodhaini* が *B. microti* と同様にヒト赤血球への感染性を有するか否かをヒト赤血球置き換え SCID マウスモデルを用いて検証した。実験開始当初、*B. rodhaini* は本マウスモデルでほとんど増殖しなかったが、約 3 週間の馴化期間を経て徐々にヒト赤血球内で増殖できるようになった。得られた原虫をヒト赤血球置き換え SCID マウスで希釈継代することにより安定的な変異株を樹立することができた。原虫の宿主特異性変化に関与する可能性のある蛋白質分子の検索を目的として、*B. rodhaini* の cDNA 発現ライブラリーを構築した。感染マウス血清を用いたイムノスクリーニングにより、3 つのメロゾイト表面蛋白質 (MSP) 遺伝子が得られたが、それらの塩基配列はいずれも親株およびヒト赤血球馴化株の両者で一致していた。以上の結果から、*B. rodhaini* はヒト赤血球に感染する潜在能力を有することが判明したが、この能力は MSP のアミノ酸配列の変化によって発揮されるのではないかも知れない。

A. 研究目的

Babesia rodhaini は、げっ歯類の赤血球に寄生する原虫でバベシア症モデルの実験室株として、古くから多くの研究に用いられてきた。van den Berghe らが 1950 年に報告した原著論文によれば、この原虫株は旧ベルギー領コンゴで捕獲された野生げっ歯類 *Thamnomys surdaster* から分離されたとされており、以来、マウスやラッ

トで感染血液を注射継代することにより今日まで維持されてきた。*B. rodhaini* はバベシア症の実験モデルとして多用されてきた経緯から、宿主寄生体関係の基礎的知見に関しては数多くの蓄積があるが、自然界におけるこの原虫種の疫学調査や人獣共通感染症病原体としての潜在能力については全く調べられていない。

一方、*B. microti* もまた野生げっ歯類を自然宿主とする赤血球寄生原虫で、いくつかの代表株については古くから多くの研究が行われている。この原虫種が研究される主な理由は、それが米国北東部で流行の見られるダニ媒介性人獣共通感染症の病原体であるからであり、当然、その生活環や疫学に関する知見は豊富で、特にベクターとなるマダニやレズルボアとなる野鼠類に関しては詳細に調べられている。

B. rodhaini と *B. microti* の分類学的位置づけに関しては、形態的類似性、免疫学的交差反応および広い宿主域を示すことなどから、古くから多くの議論がなされてきた。事実、一時期、両者は同一種として扱われていたこともあるが、今では分子レベルでの解析が進み、完全な別種と認められている。ところが、最近になって PCR による高感度な原虫検出が可能となったため、世界のいろいろな地域でげっ歯類以外の様々な動物種（イヌ、ネコ、ライオン、カルカラ、キツネ、スカンク、アライグマおよびバブーン）から *B. microti* 様あるいは *B. rodhaini* 様の原虫の寄生が続々と報告されるようになってきた。これらの原虫の多くは *B. microti* あるいは *B. rodhaini* に近縁であるが、両者のいずれとも完全に一致しないため、種名の確定しない両者の中間的存在として扱われている。

このような状況から、米国北東部で患者や野鼠から分離される、いわゆる“狭義の *B. microti*” と呼ばれる原虫種のみがヒトに

病原を起こすとされている現在の教科書的記載は、再検討してみる必要があると思われる。そこで、本研究では *B. rodhaini* のヒト赤血球への感染性を調べることにした。

B. 研究方法

ヒト赤血球置き換えマウスは、NOD/shi-*scid* マウスにヒト赤血球を静脈内に輸血し続けることにより作製した。原虫寄生率は、マウスの尾部より得た血液の塗抹標本をギムザ染色し、感染赤血球数を顕微鏡下で観察することにより決定した。ヒト赤血球置き換え率は、マウス末梢循環血液中のヒト赤血球を単クローン抗体 2E11 により赤色に蛍光標識した後、フローサイトメーターで解析することにより測定した。さらに、生体蛍光染色試薬 SYTO16 で原虫 DNA を緑色に蛍光標識することで、ヒト赤血球とマウス赤血球のそれぞれに感染した原虫の寄生率を区別して測定した。動物実験は、酪農学園大学動物実験委員会で承認を得た実験計画書の方法に従って行われた。

B. rodhaini の cDNA ライブラリーは、感染赤血球より抽出した mRNA を逆転写することにより作製した cDNA を入ファージベクターへ導入することにより作出した。イムノスクリーニングは、*B. rodhaini* を感染させた BALB/c マウスを抗原虫薬で治療することにより感染耐過させて得られた抗血清を用いて行った。

C. 研究結果

B. rodhaini 感染赤血球 2×10^8 個を SCID マウスに接種し、その 2 日後、寄生率が約 40%に達した時点で、ヒト赤血球の輸血を開始した。その結果、末梢血液中のヒト赤血球率は上昇したものの、寄生率は減少に転じた。感染後 4 日目時点でヒト赤血球置き換え率は 74%、原虫寄生率は 26%であった。フローサイトメーターによる解析結果から、原虫うちのヒト赤血球に寄生しているものはわずかに 7%程度で残りの 93%はマウス赤血球に寄生していた。その後も、ヒト赤血球による置き換え率の上昇とは逆に、原虫寄生率は減少を続け、感染後 7 日目には 0.1%以下になった。このことから、親株のとして接種した *B. rodhaini* はヒト赤血球にほとんど感染しないことが判明した。ヒト赤血球の輸血頻度を少なくして、マウスの赤血球新生をうながした結果、原虫は末梢血から完全に消失せず、低いレベルながらも原虫血症を維持させることができた。そのような状態を約 3 週間にわたって維持したところ、徐々に寄生率の上昇が認められるようになり、感染後 24 日目頃からは、明らかな原虫増殖が観察されるようになった。ヒト赤血球の連日輸血を行った結果、感染後 28 日目には末梢血の 98%をヒト赤血球に置き換えることができ、原虫寄生率は 39%にまで達した。この原虫を新たなヒト赤血球置き換えマウスで希釈継代することにより安定的にヒト赤

血球内で増殖する変異株を樹立することができた。

原虫の宿主特異性変化に関与する可能性のある蛋白質分子の検索を目的として、*B. rodhaini* の cDNA 発現ライブラリーを構築した。感染マウス血清抗体を用いたイムノスクリーニングにより得られた 42 の cDNA クローンの部分塩基配列を調べたところ、17 クローンがメロゾイト表面蛋白質抗原 (MSP) の遺伝子をコードしていることが判明した。さらに詳細な解析を行ったところ、3 種類の MSP 遺伝子に分類されることが分かった。しかし、それらの塩基配列はいずれも親株およびヒト赤血球馴化株の両方で完全に一致していた。

D. 考察

B. rodhaini と *B. microti* は、いずれもマウスに感染性を示すが、それぞれの病態と感染転帰は全く異なる。すなわち、前者はマウスに対して非常に強い病原性を示し、ごく少量の原虫 (10 個程度) 接種でさえほぼ 100%致死的となる。これに対し、*B. microti* の病原性は弱く、通常、感染マウスは慢性的な経過をたどり最終的には感染に耐過する。従って、これら 2 つの原虫種は、バベシア原虫の毒力や病原性に関与する宿主および病原体側の因子を研究するための格好の実験素材として注目されている。

B. rodhaini はコンゴのキンシャサ付近で野生げっ歯類から分離された原虫であるが、その地域でのヒトのバベシア症の発生報告

はない。しかし、中央アフリカは熱帯熱マラリアの流行地であることから、病気自体が見誤られている可能性も否定できない。文献的に、*B. rodhaini*は*B. microti*と同様にげっ歯類に広く感染性を示すことが知られており、マウス、ラット、ハムスターおよびスナネズミでの実験感染が報告されている。*B. microti*ではこれらの動物種に加え、アカゲザルへの感染も報告されており、人獣共通感染症病原体として特性が伺われる。本研究の結果は、*B. rodhaini*にも、その潜在能力が秘められていることを強く示唆する。最近になって、*B. microti*様あるいは*B. rodhaini*様の原虫がイヌ、キツネ、スカンク、アライグマ、ネコ、ライオン、カルカラおよびバブーンなどから続々と検出されている。これらの原虫の18SrRNA塩基配列は、*B. microti*あるいは*B. rodhaini*のものに近い縁であるが、完全に一致せず別種と思われる。それらは、いずれも血液塗沫で原虫が認められ、PCRで増幅した18SrRNAの塩基配列が報告されているのみで、原虫自体は分離されていないので、ヒト赤血球への感染能については不明である。ただ、本研究で*B. rodhaini*がヒト赤血球への感染能を獲得し得ることが判明したので、*B. microti*および*B. rodhaini*に近い縁な原虫グループ全般がヒトへの潜在的な感染能力をもつ可能性を想定しなければならぬだろう。

*B. rodhaini*がヒト赤血球への感染性を獲得するには、その能力を発現させるための

馴化操作が必要であった。親株の*B. rodhaini*は、実験開始当初、ヒト赤血球でほとんど増殖しなかったが、これは赤血球への吸着あるいは侵入像が観察されなかったことから、感染の初期過程に障害あることによると思われた。そこで、それらの過程で重要な役割を果たすと考えられている原虫の表面抗原であるMSPに注目し、それらの遺伝子クローニングを試みた。cDNAライブラリーから、3つの異なるMSP遺伝子を得ることに成功したが、それらの遺伝子の塩基配列は、親株および馴化株の両方で完全に一致していた。*B. rodhaini*のMSP抗原は少なくとも4つあることが報告されているので、MSPが宿主細胞へ感染指向性の変化に関わっているか否かの結論は全てのMSP遺伝子ファミリーを解析し終えるのを待たねばならぬだろう。

E. 結論

本研究により、これまでヒトには感染しないと考えられてきた*B. rodhaini*がヒト赤血球への感染能を獲得し得ることが判明した。このことは*B. microti*や*B. rodhaini*に近い縁な原虫グループ全般がヒトへの潜在的な感染能を有する可能性を示唆するが、その能力を発現させるには馴化を強制する過程が必要であるため、ヒトへの病原性を直ちに危惧させるものではないであろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawabuchi, T., Tsuji, M., Kuwahara, S., Nishida, A., Shimofurutachi, T., Oka, H. and Ishihara, C. Isolation of a human erythrocyte-adapted substrain of *Babesia rodhaini* and analysis of the merozoite surface protein gene sequences. J. Vet. Med. Sci. 67(9): 901-907, 2005.
- 2) Kawabuchi, T., Tsuji, M., Sado, A., Matoba, Y., Asakawa, M. and Ishihara, C. *Babesia microti*-like parasites detected in feral raccoons (*Procyon lotor*) captured in Hokkaido, Japan. J. Vet. Med. Sci. 67(8): 825-827, 2005.
- 3) He, W., Ohashi, K., Sugimoto, C., Tsuji, M. and Onuma, M. Cloning and characterization of cDNA encoding a prohibitin-like protein from *Theileria orientalis*. Jpn. J. Vet. Res. 53(1-2): 27-35, 2005.
- 4) Hagiwara K., Tokuda M., Baba T., Yamanaka H., Kirisawa R., Tsuji M., Ishihara C. and Iwai H. The role of INF-gamma in cattle with *Theileria segenti*. Vet. Parasitol. 127: 105-110, 2005.
- 5) 辻 正義. わが国における *Baebisia microti* 感染症. Medical Technology. 33(4): 338-340, 2005.
2. 学会発表
- 1) 川淵貴子 佐戸亜矢子 的場洋平 浅川満彦 辻 正義 石原智明. 札幌市近郊で捕獲されたアライグマから検出された *Babesia microti* 様原虫. 第 139 回日本獣医学会学術集会、和光市、2005 年 3 月 31 日.
- 2) 辻正義、三竹博道、石原智明. *Babesia rodhaini* の grp78 遺伝子のクローニング 第 139 回日本獣医学会学術集会、和光市、2005 年 3 月 31 日.
- 3) 尾関陽子、辻 正義、磯貝真代、川淵貴子、石原智明. ATCC で市販されている 2 株の *Babesia microti* について. 第 140 回 日本獣医学会総会、鹿児島市、2005 年 9 月 29～10 月 2 日.
- 4) 中嶋瑠衣、佐戸亜矢子、浅川満彦、辻正義、石原智明九州と山口県の小型野生ほ乳動物血液からのピロプラズマ及びバルコシスティス原虫の検出. 第 140 回日本獣医学会総会、鹿児島市、2005 年 9 月 29～10 月 2 日.
- 5) 川淵貴子、佐戸亜矢子、陣内理生、的場洋平、浅川満彦、辻正義、石原智明. 北海道のアライグマから見つかった新たな *Babesia* 原虫. 第 140 回日本獣医学会総会、鹿児島市、2005 年 9 月 29～10 月 2 日.
- 6) 辻正義、高橋弥生、岡 英樹、石原智明. *Babesia rodhaini* 弱毒株に対する感受性に影響を及ぼす宿主側の要因. 第 140 回日本獣医学会総会、鹿児島市、2005 年 9

月 29～10 月 2 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
（代表研究者：高島郁夫）

分担研究項目 中枢神経組織はなぜ特定の RNA ウイルスに脆弱か？

分担研究者 岩崎琢也（長崎大学・熱帯医学研究所）

協力研究者 小池 智、吉河智城（東京都神経科学総合研究所）

研究要旨 中枢神経系の RNA ウイルス感染症の大部分は直接中枢神経組織 CNS にウイルスが侵入することは非常に稀であり、通常、体内の他の組織での増殖後に二次的に CNS に侵入する。これまで、他の組織で増殖した RNA ウイルスがなぜ効果的に CNS において増殖できるかは解明されていない。今年度はウイルスレセプターが確定しているポリオウイルスを対象として、このメカニズムを解析した。その結果、RNA ウイルスが細胞内増殖するさいに合成されると考えられている double stranded RNA の細胞内センサーである RIG-I ならびに MDA5 を含む I 型インターフェロン応答システムが CNS では他の組織に比較し、極度に準備されておらず、これが CNS におけるウイルス増殖を容易にしていることが明らかにされた。

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。

今年度は東京都神経研・微生物部門の小池智博士と共同で行った、中枢神経系組織 CNS の特定の RNA ウイルスに対する脆弱性の研究成果を報告する。

RNA ウイルスのうち CNS 組織において著明な病原性を発揮することが判明しているのはフラビウイルス属、アルファウイルス属、エンテロウイルス属等がある。フラビウイルス属としては黄熱ウイルス、West Nile ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイ

ルスなどが、アルファウイルスとして西部ウマ脳炎ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラ脳炎ウイルスなどが、エンテロウイルスとしてはポリオウイルスが挙げられる。フラビウイルスあるいはアルファウイルスは節足動物が吸血時に経皮的にウイルスを体内に注入する。注入されたウイルスは皮下組織、所属リンパ節、（場所によって胸管）、血液を経て CNS に到達する。エンテロウイルスは経口ルートによって体内に侵入し、消化管上皮、消化管付属リンパ装置を経て、血行あるいは神経性に CNS に到達するとされている。この CNS 侵入までの時間、つまり発症までの潜伏期は 7 日前後要するとされ、これらの RNA ウイルスが CNS に侵入するまで、CNS 外の組織において一度以上増殖していることが予想される。

CNSにおいて効率的にウイルスが増殖できる要因としては、ウイルス増殖に関わるポジティブ因子とネガティブ因子が考えられる。このうちポジティブ因子としては

- ① ウイルスレセプターが CNS に豊富に発現している。
 - ② ウイルス増殖に必要としている細胞内因子が中枢神経組織に豊富である。
- 一方、ネガティブ因子としては
- ③ 宿主側因子として、CNS においてのみウイルス増殖を抑制できない。

残念ながら、フラビウイルス属とアルファウイルス属のウイルスに関してはウイルスレセプターが同定されていないため、最も重要視される①について不明であり、従って②と③の検討には難がある。一方、ポリオウイルスは 1990 年前後にヒトポリオウイルスレセプター-hPVR が同定され、さらにこの hPVR を発現しているトランスジェニックマウス PVR-tg1, 21, 25 等がポリオウイルス感受性となり、ヒトの CNS 病変を再現できることが明らかとされた。このような背景のもと、本年度の研究はポリオウイルスを使って、神経組織の RNA ウイルスに対する脆弱性を検討した。

B.方法と結果

方法

1. ウイルス：ポリオウイルス 1 型 Mahoney 株の感染性 cDNA クローン(pOM)より試験管内で転写した RNA をアフリカミドリザルの腎由来の継代細胞 JVK-02 に形質導入し、得られたウイルスを使用し、ストックウイルスの作製ならびにプラークウイルス定量にはこの細胞を用いた。
2. マウス：PVR を発現するトランスジェニックマウス ICR-PVRtg21 を C57BL/6 にバッククロスした PVRtg21 (以下 WT) と I 型インターフェロンレセプター(Ifnar)遺伝子欠

損マウス A129 を C57BL/6 にバッククロスし、PVR21 と掛け合わせた PVR+/+Ifnar-/- (以下 KO) を使用した。すべての動物実験は東京都神経研のガイドラインに基づき実施された。

3. ウイルス接種：静脈内 iv、脳内 ic、腹腔内 ip に投与した。接種後 3 週間観察した。LD₅₀ は Karber 法に基づき算定した。
4. 組織学的・免疫組織学的解析：3-6 匹を一群とし、接種後 1-3 日あるいは弛緩性麻痺を呈した時点で、深麻酔下でマウスを屠殺し、10%緩衝ホルマリン液で環流固定し、全身の各臓器を採材し、通常の方法にてパラフィン包埋した。厚さ 3-5 μm の薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色と抗ポリオウイルスウサギ血清を用いたポリオウイルス抗原の免疫組織学的検出を行った。
5. 生化学的解析：血清トランスアミナーゼは Transaminase Nissui Kit を用いて測定した。
6. 定量的 PCR：RNeasy mini RNA 分離キット(キアゲン)を用いて各組織より RNA を抽出し、DNase I 処理により DNA を消化し、逆転写により cDNA を調整した。18S-rRNA、ポリオウイルス、IFN-β、2'-5' oligoadenylate synthetase (OAS)1a、OAS2、OAS3、OASL2、protein kinase R、RIG-I、helicard mRNAs を定量した。

結果

1. KO マウスにおけるポリオウイルス感受性：WT マウス(PVRtg21)における PVR の発現は CNS、胸腺、肺、心、胃、横紋筋で高発現、脾と腎で中度発現、肝で低発現し、iv、ic、ip さらには筋肉内ならびに経鼻ルートで感染し、経口ルートでは感染しない。WT ならびに KO マウスにウイルスを ic、iv、ip ルートで接種し、2 週間以内の死亡について検討し、LD₅₀ を算定した(表 1)。

表1 ポリオウイルスの感受性(LD₅₀ log₁₀)

Route	WT	KO
intracerebral	2.5	0.8
intravenous	5.0	1.7
intraperitoneal	>6.2	1.2

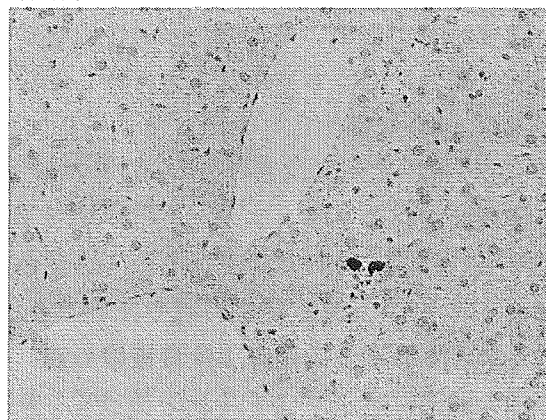
このようにWTのLD₅₀は脳内接種で10² PFU以上の、ivならびにipでは10⁵PFU以上のウイルス量が必要とされるのに対し、KOではWTに比し感受性が増加し、ivでは3,000倍、ipでは20,000倍以上の感受性を示した。

2. 感受性細胞の局在: KO マウスにおけるポリオウイルス感受性の増加は非神経組織においてウイルスの増殖が増加しているためと考えられたので、2 x 10⁷ PFUのポリオウイルスをC57BL/6、WT、KO マウスにiv接種し、3日後に脳、脊髄、心、肺、肝、脾、膵、腎、横紋筋組織内のウイルス量を測定した。その結果、C57BL/6ではいずれの組織でも10⁵ PFU/組織g重量未満と殆どウイルスの増殖は確認されないが、WTでは脳、脊髄、膵が10⁵ PFU/組織g以上とCNSを中心としてウイルス増殖が認められるのに対し、KOマウスでは脳、脊髄、心、肺、肝、脾、膵、腎、横紋筋と検索した全臓器で10⁵ PFU/組織g重量以上のウイルス増殖が観察された。この結果はPVRを保有している場合は、CNS以外の組織ではI型IFN応答が介在しない時ポリオウイルスが有効に増殖でき、またCNSではI型IFN応答はポリオウイルス増殖の抑制に効果的に影響していないことを示唆している。

3. 非CNS組織におけるウイルス増殖: ウイルス定量実験においてウイルス増殖の著しい差が存在する各組織における組織学的変化ならびにウイルス抗原陽性細胞の局在を検討した。ウイルス抗原の局在でWTとKOマウスで最も差異が生じた組織は肝であった。

た。WTマウスではごく少数のウイルス抗原陽性の肝細胞が非常に稀に散在性に分布しているのに対し、KOマウスの肝では抗原陽性の肝細胞が連なった状態で地図上に分布していた。形態学的にはWTではポリオウイルス抗原が陽性と判断した肝細胞は壊死に陥っているのに対し、KOの肝では細胞の形にはあまり変化がなく、細胞質のeosin染色性の変化のみであった。抗原陽性の細胞数は接種後1日目が3日目に比し多く、一方、炎症性細胞の浸潤は後者で目立っていることより、I型IFN以外の機序により感染細胞が処理されることが示唆された。

A. WT



B. KO

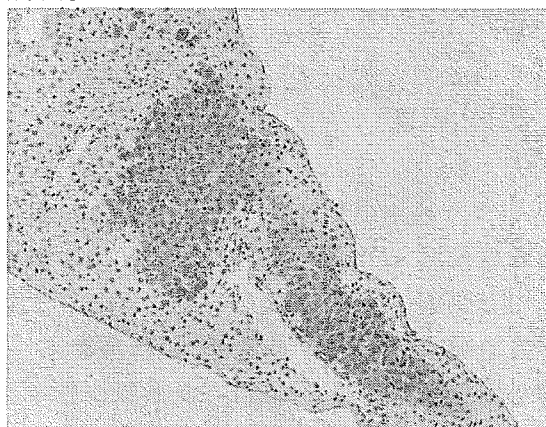


図1 ポリオウイルス経静脈性接種後の肝

脾においても抗原陽性の細胞数はWTとKOマウスでは著しく異なっていた。WTでは白脾髄と赤脾髄の境界の濾胞周辺帯に分