

地域となっている。しかしながら、この地域における HFRS の媒介動物は明らかにされておらず、ハンタウイルスの疫学的調査の実施が望まれていた。そこで、ボルガ川中流域の中核都市であるサマラ市において、げっ歯類の疫学調査を行い、ハンタウイルスの感染状況の解明を試みた。

B. 研究方法

1. げっ歯類の疫学調査

サマラ市郊外の森林において 145 匹の野生げっ歯類を捕獲し、血液、肺、腎臓、脾臓、肝臓を採取した。採取した臓器は使用時まで-80C で保存し、血清はハンタウイルスの抗体検査時まで-40 C で保存した。

2. ELISA による抗体検出

北海道のエゾヤチネズミから検出されたハンタウイルスのヌクレオキャプシド (NP) を大腸菌で発現させたものを抗原として ELISA を実施した。抗原をコートした 96 穴プレートをカゼインでブロッキングし、さらにげっ歯類の血清をアプライした。抗体の検出はペルオキシダーゼ標識プロテイン G を用いた。

3. PCR

ハンタウイルスの S 遺伝子を標的として PCR を行った。RNA の抽出は型のごとく行い、逆転写反応を行った後、Platinum Taq Polymerase を用いてウイルス遺伝子の増幅を行った。増幅された PCR 産物はそのまま塩基配列決定のための鋳型に用いた。

4. ウイルス遺伝子の解析

検出されたウイルスの S 遺伝子について、ほぼ全長 (62-1801nt) の塩基配列を決定し、Clustal X により多重解析を行って

系統樹を作成した。

(倫理面からの配慮について)

今回の調査ではロシア国内でげっ歯類の捕獲を行った。本調査はロシア国内の野生動物保護および福祉の理念に基づいて、申請され、許可されたものである。

C. 研究結果および考察

サマラ市郊外の森林において 145 匹の野生げっ歯類を捕獲し、血液、肺、腎臓、脾臓、肝臓を採取した。捕獲されたげっ歯類の内訳はヨーロッパヤチネズミが 68 匹、セスジネズミが 21 匹、キクビアカネズミが 19 匹、およびウラルアカネズミが 37 匹であった。まず、すべてのげっ歯類の血清について ELISA を実施し、抗ハンタウイルス抗体の検出を試みた。その結果、ヨーロッパヤチネズミで陽性例が 6 例 (8.8%) 認められたが、それ以外のげっ歯類では抗体陽性例は見られなかった。次にヨーロッパヤチネズミの全例について RT-PCR によるウイルス遺伝子の検出を行ったところ、7 例 (うち抗体陽性 4 例) が陽性となった。これら 7 例の S 遺伝子について他のハンタウイルスと比較したところ、サマラのウイルスはロシアの PUUV 分離株である Kazan 株および CG1820 株との塩基配列が 93~95% と最も高い一致率を示したが、フィンランド由来の PUUV である Sotkamo 株とは約 85% とやや低い一致率を示した。Hantaan 型 (HTNV) や Sin Nombre 型 (SNV) のウイルスとはそれぞれ 74% と 71% の一致率であった。したがって、サマラのヨーロッパヤチネズミから検出されたウイルスは PUUV であることが明らかになった。ウイルス遺伝子の系統樹か

らもサマラのウイルスがロシアの PUUV にもっとも近縁であり、北欧の PUUV とは遺伝学的にかなり離れていることが判明した。さらに今回、サマラのヨーロッパヤチネズミから検出されたウイルス遺伝子はサマラ市の HFRS 患者から検出されたウイルス遺伝子と 96%以上の一致率を示したことから、サマラではヨーロッパヤチネズミから PUUV がヒトに感染して HFRS が発生していることが明らかになった。

D. 結論

ロシアのボルガ川中流域のサマラ市近郊の森林でげっ歯類の疫学調査を行い、ヨーロッパヤチネズミがハンタウイルスの病原巣動物になっていることが判明した。また、遺伝子解析の結果からヨーロッパヤチネズミが PUUV を保有していることが明らかになった。さらに、サマラの HFRS 患者由来のウイルス遺伝子の配列とヨーロッパヤチネズミの配列が 96%以上の一致率を示した。

以上のことから、ロシアのボルガ川流域の HFRS 多発地帯ではヨーロッパヤチネズミが病原巣動物となり、PUUV の感染によって HFRS の流行が起きていることが強く示唆された。

この地域では年間 6,000 から 8,000 名の HFRS 患者が発生しているが、これらの患者の多くは PUUV の感染を受けたものと推察される。今後 PUUV に対するワクチン開発の進展が強く望まれる。

E. 健康危険情報

ロシアのボルガ川流域の HFRS 多発地帯ではヨーロッパヤチネズミが病原巣動物となり、

PUUV の感染によって HFRS の流行が起きているものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Pattamadilok, S., Lee, B.H., Kumperasart, S., Yoshimatsu, K., Okumura, M., Nakamura, I., Araki, K., Khoprasert, Y., Dangsupa, P., Panlar, P., Jandrig, B., Kruger, D.H., Klempa, B., Jakel, T., Schmidt, J., Ulrich, R., Kariwa, H., and Arikawa, J.: Geographical distribution of hantaviruses in Thailand and potential human health significance of Thailand virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:994-1002, 2006
- 2) Shirato, K., Miyoshi, H., Kariwa, H., and Takashima, I.: The kinetics of proinflammatory cytokines in murine peritoneal macrophages infected with envelope protein-glycosylated or non-glycosylated West Nile virus. *Virus Res.* 121:11-16, 2006
- 3) Obara, M., Yoshii, K., Kawata, T., Hayasaka, D., Goto, A., Mizutani, T., Kariwa, H., and Takashima, I.: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of tick-borne encephalitis using subviral particles. *J. Virol. Methods.* 134:55-60, 2006
- 4) Kariwa, H., Fujii, N., and Takashima, I.: Inactivation of SARS coronavirus by means of povidone-iodine, physical

- conditions and chemical reagents. *Dermatology*. 212(S1):119-123, 2006
- 5) Okabayashi, T., Kariwa, H., Yokota, S., Iki, S., Indoh, T., Yokosawa, N., Takashima, I., Tsutsumi, H., and Fujii, N.: Cytokine regulation in SARS coronavirus infection compared to other respiratory virus infections. *J. Med. Virol.* 78:417-424, 2006
- 6) Baek, L. J., Kariwa, H., Lokugamage, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., Kang, J. I., Moon, S. S., Chung, S. Y., Kim, E. J., Kang, H. J., Song, K. J., Klein, T. A., Yanagihara, R., and Song J. W.: Soochong virus: an antigenically and genetically distinct hantavirus isolated from *Apodemus peninsulae* in Korea. *J. Med. Virol.* 78:290-297, 2006
- 7) Kariwa, H., Nakauchi, M., Takashima, I.: Epidemiology of SARS. In SARS edited by Mizutani, T., Transworld Research Network, Kerala, India, p29-40, 2006
- 8) 荻和宏明: げっ歯類とハンタウイルス感染症, ANIMATE, 特別号 1: 124-131, 2006
- 9) 荻和宏明、谷川洋一、萩谷友洋、Lokugamage, K., Lokugamage, N., Nur Hardy Bin Abu Daud, 好井健太郎、高島郁夫: 齧歯類とハンタウイルス感染症. 獣医畜産新報, 59:633-638, 2006
2. 学会発表
- 1) 好井健太郎、後藤明子、小原真弓、川上和江、伊川綾江、荻和宏明、高島郁夫: ウイルス様粒子を用いたフラビウイルスの粒子形成機構の改正、および診断法・予防法への応用: 第 141 回日本獣医学会、つくば (2006, 3)
- 2) 荻和宏明、Lokugamage, N., 谷川洋一、萩谷友洋、Lokugamage, K., 吉松組子、有川二郎、高島郁夫: タイリクヤチネズミに保有されるハンタウイルスの分離の試み: 第 141 回日本獣医学会、つくば (2006, 3)
- 3) 原田祐里、好井健太郎、伊川綾江、荻和宏明、高島郁夫: レプリコンを利用したウエストナイルウイルスとダニ媒介性脳炎ウイルスのキメラウイルス様粒子の作製: 第 142 回日本獣医学会、山口 (2006, 9)
- 4) 白戸憲也、三次洋嗣、荻和宏明、高島郁夫: エンベロープ蛋白の糖鎖付加配列の有無がウエストナイルウイルス感染マウス腹腔マクロファージからの炎症性サイトカインの分泌に及ぼす影響: 第 142 回日本獣医学会、山口 (2006, 9)
- 5) 好井健太郎、小原真弓、後藤明子、荻和宏明、高島郁夫: ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス様粒子を用いた ELISA 法による血清疫学的診断法の開発: 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋 (2006, 11)
- 6) 中内美名、好井健太郎、荻和宏明、高島郁夫: SARS コロナウイルスのウイルス様粒子の作製: 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋 (2006, 11)
- 7) Yoshii, K., Goto, A., Obara, M., Kawakami, K., Kariwa, H., and Takashima, I.: Involvement of conserved region of flavivirus prM protein in virus particle budding. 40th Joint Working Conference on Viral Diseases, Sendai, (2006, 7)
- 8) Kariwa, H., Tanikawa, Y., Nur Hardy

A.D., Yoshii, K., Yoshimatsu, K.,
Arikawa, J., Takashima, I.:
Establishment of animal model for
Puumala virus infection in Syrian
hamsters. 40th Joint Working Conference
on Viral Diseases, Sendai, (2006, 7)

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

コンゴ盆地型サル痘ウイルスと西アフリカ型サル痘ウイルスを区別し、かつ、サル痘ウイルス遺伝子を高感度かつ迅速に検出するための定量的リアルタイム PCR 法

分担研究者 西條政幸

国立感染症研究所

ウイルス第 1 部主任研究官

研究要旨: ヒトにおけるサル痘ウイルス感染症(ヒトサル痘)は、アフリカ中央部から西部にかけて流行する風土病としての性格を有する感染症であるが、同ウイルス感染動物(げっ歯類)の輸入を介して 2003 年米国でも流行した。再興ウイルス感染症のひとつとして重要な疾患である。コンゴ民主共和国およびその近隣地域に分布するサル痘ウイルス(コンゴ盆地型)と西アフリカに分布するサル痘ウイルス(西アフリカ型)のウイルスゲノムを区別し、高感度かつ定量的に同ウイルスゲノムを迅速に検出するためのリアルタイム PCR 法を開発した。その PCR 法に利用されるプライマーおよびプローブの塩基配列は、サル痘ウイルスの A-type inclusion body (ATI)-遺伝子におけるサル痘ウイルスに特異的塩基配列を利用して、オルソポックスウイルス属のウイルスの中から、サル痘ウイルスゲノムだけを特異的に検出するように設計された。また、コンゴ盆地型と西アフリカ型サル痘ウイルスの ATI 遺伝子の差異を利用して、それぞれのウイルスゲノムを特異的に検出できるように設計された。本法は、ヒトサル痘を迅速、かつ、正確に診断するための方法として有用である。

A. 研究目的

サル痘ウイルスは、痘そうウイルスと同様にポックスウイルス科オルソポックスウイルス属に分類される。サル痘ウイルスの宿主は西〜中央アフリカに生息するリスなどのげっ歯類である。痘そうウイルスに極めて近縁のサル痘ウイルスは、霊長類において痘そう(天然痘)様疾患(サル痘)を引き起こす。ヒトにおいても痘そう様疾患を引き起こし、ヒトにおけるサル痘ウイルス感染症は「ヒトサル痘」と呼ばれる。それはアフリカ中央部および西部の風土病である。2003 年に西アフリカのガーナから米国にペット用として輸出されたげっ歯類(Gambian giant rat など)が感染源となるヒトサル痘が米国で発生した。さらにガーナから米国に輸出されたげっ歯類の一部が我が国にも輸出されていたことが明らかにされている。

本研究では、オルソポックスウイルス属の中でも、サル痘ウイルスの A-type inclusion body (ATI)-遺伝子に特異的な塩基配列と、かつ、コンゴ盆地型と西アフリカ型サル痘ウイルスの ATI 遺伝子の差異を利用して、サル痘ウイルスコンゴ盆地型と西アフリカ型のウイルスゲノムを区別し、迅速、高感度、かつ、定量的にサル痘ウイルスゲ

ノムを検出するためのリアルタイム PCR 法を開発した。

B. 研究方法

- 1) ウイルス。コンゴ盆地型サル痘ウイルスとして、Zr-599 株, Congo-8 株, および、1999 年コンゴ民主共和国にて流行したヒトサル痘患者から分離されたサル痘ウイルスを、西アフリカ型サル痘ウイルスとして、Sierra Leone 株, Orangutan 株, Copenhagen 株, Liberia 株, SEN-79 株を使用した。オルソポックスウイルス属に分類される ectromeria ウイルス, camelpox ウイルス, cowpox ウイルス, vaccinia ウイルスも用いられた。カニクイザルに接種する天然痘ワクチンとして、LC16m8 株を用いた。サル痘や天然痘との鑑別診断として重要な水痘・帯状疱疹ウイルスゲノムも用いられた。
- 2) カニクイザル。5 頭のカニクイザルを用いた。
- 3) リアルタイム PCR 法におけるプライマーおよびプローブの塩基配列。設計されたプライマーおよびプローブは以下になる。LC-forward プライマーとして、5'-GAGATTAGCAGACTCC AA-3' を、fluorescein (FC)-プローブとして、5'

-GCAGTCGTTCAACTGTATTTCAAGATCTGA
GAT-3'-Fluorescein を, LCRed640 プローブと
して, 5'-LCRed640-CTAGATTGTAATCTCTG
TAGCATTTCACGGC-3'-phosphorylation を,
そして, reverse プライマーとして Reverse prim
er 1[5'-GATTCAATTTCCAGTTTGTAC-3' (コ
ンゴ盆地型ウイルス用)], および, Reverse pr
imer 2[5'-TCTCTTTTCCATATCAGC-3' (西
アフリカ型ウイルス用)]を用いた(図 1).

- 4) サル痘ウイルスゲノムレベルの決定. 末梢血
液 200 μ l から Viral nucleic acid purification
system(Roche diagnostics 社)を用いてウイル
ス DNA を精製した. 精製されたサンプル 5 μ l を
テンプレートとして, リアルタイム PCR 法でウイル
スゲノムを検出した. LightCycler PCR システ
ム(Roche 社)において, LightCycler FastStart
DNA Master Hybrob(Roche diagnostics 社)を用
い, 遺伝子増幅条件[95 $^{\circ}$ C10 分; 40 サイクルの
(95 $^{\circ}$ C10 秒, 57 $^{\circ}$ C10 秒, 72 $^{\circ}$ C6 秒);メルティング
反応]で, 遺伝子を増幅させた.
- 5) サル痘ウイルス感染によるサル痘の発症. 5
頭のカニクイザルのうち, 1 頭には Zr-599 株を,
1 頭には Liberia 株を感染させた. 残りの 3 頭
には, LC16m8 ワクチン接種後, 0 日後, 3 日後,
および, 7 日後に Zr-599 株を感染させた. 尚,
感染に用いられたチャレンジウイルスの感染価
は, 10⁶ plaque forming unite で, 皮下接種経路
で感染させた.
- 6) 部分 ATI 遺伝子の PCR 法による増幅と塩基配
列の決定. サル痘ウイルスの部分 ATI 遺伝子
を ATI-up-1 (5'-AATACAAGGAGGATCT-3')
と ATI-low-1 (5'-CTTAACCTTTTCTTTCTC-
3')のプライマーセットを用いて, PCR 法により
増幅し, ダイレクトシーケンス法により部分遺
伝子塩基配列を決定した.

(倫理面からの配慮について)

カニクイザルを用いたサル痘ウイルスの感染実
験は, 国立感染症研究所実験動物委員会の承
認のもとに, 国立感染症研究所の高度安全研究
施設内で行われた.

C. 研究結果

- 1) サル痘ウイルス ATI 遺伝子の増幅と塩基配
列. ATI-up-1 と ATI-low-1 のプライマーセッ
トを用いた PCR 法により, ATI 部分遺伝子を
増幅させると, コンゴ盆地型サル痘ウイルスで

は 1070bp の塩基からなる PCR 産物が, 西ア
フリカ型サル痘ウイルスでは 1520bp の塩基
配列からなる PCR 産物が増幅された(図 1).
このサイズの差は, コンゴ盆地型サル痘ウ
イルス ATI 遺伝子(GenBank accession No.
MVU84504)における 2147-2148 番目の位置
に 453 個の塩基が挿入されることによること
が明らかにされた(図 2).

- 2) リアルタイム PCR におけるプライマーおよび
プローブ設計. 設計されたプライマーおよび
プローブが, サル痘ウイルスの ATI-遺伝子
においてアニールする部位を示した(図 2).
- 3) 末梢血液からのサル痘ウイルスゲノム検出.
今回開発されたリアルタイム PCR では, 数コ
ピーのウイルスゲノムが検出されることが明
らかにされた(データ未公表).
- 4) ウイルス分離とリアルタイム PCR. 5 頭のカ
ニクイザルから経時的に 24 検体の末梢血液が
採取され, ウイルス分離陽性の検体が 15 検
体で, 16 検体がウイルス分離陰性であった.
ウイルス分離陽性の 15 検体中 14 検体がリア
ルタイム PCR 陽性を, ウイルス分離陰性の 16
検体中 9 検体がリアルタイム PCR 陰性を示
した. 天然痘ワクチン非接種の 2 頭では, 感
染後期のサル痘ウイルスに対する抗体が陽
性になる時期には, 末梢血液からのウイルス
分離検査は陰性になるものの, リアルタイム
PCR は陽性を呈する傾向が認められた.
- 5) 臨床症状とウイルス血症. ワクチン非接種
のカニクイザルおよびワクチン接種と同時
にチャレンジウイルスを感染させたカニク
イザルでは, 重症のサル痘を発症し, リアル
タイム PCR によるウイルス血症レベルも
より高い値を示した. 一方, ワクチン接種
後 3 日目および 7 日目にチャレンジウ
イルスを感染させたカニクイザルでは,
サル痘の臨床症状はほとんど認められ
ず, それと相関するように, それぞれ比
較的低いウイルス血症レベルまたは感
度以下のウイルス血症レベルにあるこ
とが明らかにされた.
- 6) リアルタイム PCR によるオルソポックスウ
イルスの検出. 本リアルタイム PCR 法
では, サル痘ウイルス以外の調べられ
たオルソポックスウイルスゲノムは
検出されなかった. サル痘ウイルス
の ATI 遺伝子に相当する他のオル
ソポックスウイルス ATI 遺伝子の
塩基配列を

表 2 に示した. 本リアルタイム-PCR のサル痘ウイルスゲノム検出の特異性は, 主に LC-Red プローブの設計によると考えられた. 本リアルタイム PCR では, 水痘・帯状疱疹ウイルスゲノムは検出されなかった.

C. 考察

本研究では, 再興ウイルス感染症として重要と考えられるサル痘ウイルス感染症の, 迅速でしかも高感度に診断を下すためのリアルタイム PCR 法が開発された. サル痘ウイルスには, コンゴ盆地型と西アフリカ型に分類されることが最近明らかにされ, 前者が後者より病原性が高いと推測されている. これまでの私たちの研究においてもその事実が明らかにされている. そのため, サル痘ウイルス感染症を診断する場合には, 型内鑑別が重要となる. 今回開発されたリアルタイム PCR 法は, その意味においても有用な診断法と考えられる. データは示さなかったが, 咽頭スワブを検体とした場合には, ウイルス分離成績と比較すると, 本リアルタイム PCR の精度と感度はともに 90% を超える. 末梢血液を検体とした今回の検討では, 本 LC-PCR が陽性を呈する検体でも, ウイルス分離陰性を呈するものが含まれた. これはサル痘ウイルスに対する抗体が出現したことによりウイルスが中和され, ウイルス分離検査が陰性化したためと考えられる.

サル痘ウイルス感染症は, 天然痘との鑑別疾患として重要である. 本 LC-PCR は天然痘を鑑別するための診断法としても有用と考えられる.

E. 結論

サル痘ウイルス感染症の診断およびその病勢の評価のために有用な, サル痘ウイルスゲノムを特異的かつ高感度に, また, 迅速に検出するためのリアルタイム PCR 法を開発した.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Saijo M, George-Courbot MC, Fukushi S, Mizutani T, Philippe M, Georges AJ, Kurane I, Morikawa S. Marburgvirus nucleoprotein-capture enzyme-linked

immunosorbent assay using monoclonal antibodies to recombinant nucleoprotein detection of authentic Marburgvirus. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 59:323-325, 2006

- 2) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, lacking B5R membrane protein expression protects monkeys from monkeypox. *Journal of Virology* 80:5179-5188, 2006
- 3) Saijo M, Niikura M, Ikegami T, Kurane I, Kurata T, Morikawa S. Laboratory diagnostic systems for Ebola and Marburg hemorrhagic fevers developed with recombinant proteins. *Clinical and Vaccine Immunology* 13:437-443, 2006
- 4) Shirato K, Nishimura H, Saijo M, Okamoto M, Noda M, Tashiro M, Taguchi F. Diagnosis of human respiratory syncytial virus infections using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods* 139:78-84, 2007
- 5) Mizutani T, Fukushi S, Ishii K, Sasaki Y, Kenri T, Saijo M, Kanaji Y, Shirato K, Kurane I, Morikawa S. Mechanism of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 347:261-265, 2006
- 6) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Evaluation of a vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detection of valuable for SARS-CoV neutralizing antibody responses to SARS-CoV. *Journal of Medical Virology* 78:1509-1512, 2006
- 7) Mizutani T, Fukushi S, Iizuka D, Inanami O, Kuwabara M, Takashima H, Yanagawa H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Inhibition of cell proliferation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEMS Immunology and Medical*

- Microbiology 46:236-243, 2006
- 8) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. FEBS Letter 580:1417-1424, 2006
 - 9) 西條政幸. ウイルス講座「天然痘」. 感染制御 2: 342-346, 2006
 - 10) 西條政幸. 根絶されたはずの天然痘の今. 小児科臨床 60:149-154, 2007
- 2.学会発表
- 1) Saijo M, Georges-Courbot MC, Fukushi S, Mizutani T, Marianneau P, Georges AJ, Kurane I, Romanowski V, Morikawa S. Recombinant nucleoprotein-base diagnosis of Lassa fever-antibody and antigen detection systems. Filoviruses: Recent advances and future challenges, An ICID global conference, Winnipeg, Canada (2006. 9)
 - 2) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC18m8, lacking B5R membrane protein expression protects monkeys from monkeypox. 12th International Conference of Infectious Diseases, Lisbon, Portugal (2006. 6)
 - 3) Yokote H, Shinmura Y, Satou A, Kanehara T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Kurata T, Hashizume S. Safety and efficacy of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in animals. 12th International Conference of Infectious Diseases, Lisbon, Portugal (2006. 6)
 - 4) Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Kurata T, Hashizume S. Safety and efficacy study of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in animals. ASM Biodefence Research Meeting, Washington DC, USA (2006. 2)
 - 5) 西條政幸、網康至、須崎百合子、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、倉根一郎、佐多徹太郎、倉田毅、森川茂. サル痘ウイルス Zr-599 株(コンゴ盆地型)と Liberia 株(西アフリカ型)の霊長類における病原性. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋 (2006.11)
 - 6) 西條政幸、錫谷達夫、水田克巳、倉根一郎、森川茂. チミジンリン酸化酵素遺伝子の 1 番目と 45 番目のコドンに存在するメチオニンの間に終始コドンが存在する HSV-1 の薬剤感受性. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋 (2006.11)
 - 7) 水谷哲也, 福士秀悦, 石井孝司, 西條政幸, 緒方もも子, 酒井宏治, 遠藤大二, 座本綾, 倉根一郎, 森川茂. SARS-coronavirus と Mycoplasma fermentans の共感染が細胞におよぼす影響. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋 (2006.11)
 - 8) 木所稔, 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 志田壽利, 田代真人, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 倉田毅, 森川茂. 改良痘そうワクチン株 m8Δのカニクイザルにおけるサル痘発症予防効果. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋 (2006.11)
 - 9) 福士秀悦, 水谷哲也, 酒井宏治, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. ラット ACE2 発現細胞で継代した SARS-CoV の S 遺伝子変異. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋 (2006.11)
 - 10) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. マウス, ラット順化 SARS-CoV を用いた SARS 発症動物モデルの作製. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋 (2006.11)
- 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

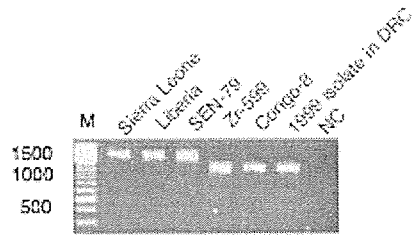
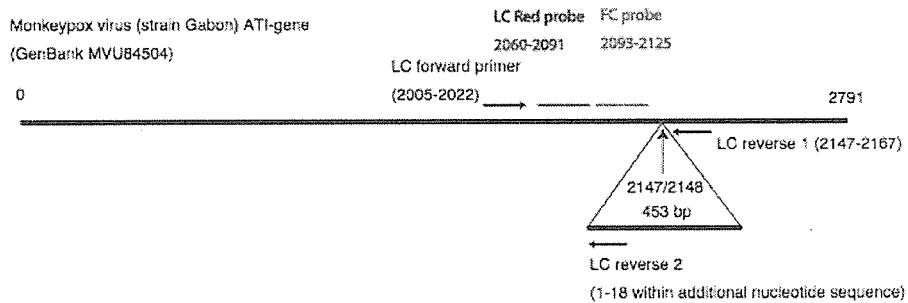


図 1. ATI-up-1 および ATI-low-1 のプライマーセットを用いた PCR 法で増幅されたサル痘ウイルスの部分 ATI 遺伝子.

(A)



(B)

		10	20	30	40	50	60
DO011156	Monkeypox	CGCATACC	CACICCGT	CTGCATCT	GCCTTCG	TGCCTTCG	CTCCTCC
DO439815	Vaccinia	CGCATACC	CACICCGT	CTGCATCT	GCCTTCG	TGCCTTCG	CTCCTCC
AF438165	Camelpox	CGCATACC	CACICCGT	CTGCATCT	GCCTTCG	TGCCTTCG	CTCCTCC
DO437589	Cowpox	CGCATACC	CACICCGT	CTGCATCT	GCCTTCG	TGCCTTCG	CTCCTCC
DO785204	Horsepox	CGCATACC	CACICCGT	CTGCATCT	GCCTTCG	TGCCTTCG	CTCCTCC
DO190239	Buffalopox	CGCATACC	CACICCGT	CTGCATCT	GCCTTCG	TGCCTTCG	CTCCTCC
AY484639	Rabbitpox	CGCATACC	CACICCGT	CTGCATCT	GCCTTCG	TGCCTTCG	CTCCTCC
DO437594	Taterapox	CGCATACC	CACICCGT	CTGCATCT	GCCTTCG	TGCCTTCG	CTCCTCC
X88225	Ectromeria	CGACTACG	CCACTACCT	CACCATCA	CCACCACG	AACACTTC	CATTCCT

		70	80	90	100	110	120
DO011156	Monkeypox	TTCCG	TTACGCGAT	TA	CAATCAGA	TCTCCCTC	
DO439815	Vaccinia	TTCCG	TTACGCGAT	TACCGCTC	CAATCAGA	TCTCCCTC	
AF438165	Camelpox	TTCCG	TTACGCGAT	TACCGCTC	CAATCAGA	TCTCCCTC	
DO437589	Cowpox	TTCCG	TTACGCGAT	TACCGCTC	CAATCAGA	TCTCCCTC	
DO785204	Horsepox	TTCCG	TTACGCGAT	TACCGCTC	CAATCAGA	TCTCCCTC	
DO190239	Buffalopox	TTCCG	TTACGCGAT	TACCGCTC	CAATCAGA	TCTCCCTC	
AY484639	Rabbitpox	TTCCG	TTACGCGAT	TACCGCTC	CAATCAGA	TCTCCCTC	
DO437594	Taterapox	TTCCG	TTACGCGAT	TACCGCTC	CAATCAGA	TCTCCCTC	
X88225	Ectromeria	CGATATCG	CCAAACATA	TTACGCGAT	TACCGCTC	AAATCAGA	TTACCTC

		130	140	150	160	170	180
DO011156	Monkeypox	TGAAATCC	TTCCGCT	CCGCCTAA	TAATCCAT	AAATC	
DO439815	Vaccinia	TGAAATCC	TTCCGCT	CCGCCTAA	TAATCCAT	AAATC	
AF438165	Camelpox	TGAAATCC	TTCCGCT	CCGCCTAA	TAATCCAT	AAATC	
DO437589	Cowpox	TGAAATCC	TTCCGCT	CCGCCTAA	TAATCCAT	AAATC	
DO785204	Horsepox	TGAAATCC	TTCCGCT	CCGCCTAA	TAATCCAT	AAATC	
DO190239	Buffalopox	TGAAATCC	TTCCGCT	CCGCCTAA	TAATCCAT	AAATC	
AY484639	Rabbitpox	TGAAATCC	TTCCGCT	CCGCCTAA	TAATCCAT	AAATC	
DO437594	Taterapox	TGAAATCC	TTCCGCT	CCGCCTAA	TAATCCAT	AAATC	
X88225	Ectromeria	CGAAATCC	CTAPCTTT	CCGCCTAA	TAATCCAT	AAATC	

図 2. リアルタイム LC-PCR のプライマーおよびプローブのサル痘ウイルス ATI 遺伝子にアニールする部位 (A) および他のオルソポックスウイルス ATI 遺伝子のサル痘ウイルス部分 ATI 遺伝子に相当する部位の塩基配列.

サポウイルス全長遺伝子の発現と組換え粒子の形成

分担研究者 武田 直和 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室長

協力研究者 Grant S. Hansman 国立感染症研究所ウイルス第二部

協力研究者 岡 智一郎 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨:1 型遺伝子群に属するサポウイルスの全長遺伝子およびサブジェニミック RNA に相当する遺伝子領域を組換えバキュロウイルスで発現した。全長遺伝子を発現した細胞内には全ての非構造蛋白と構造蛋白が発現し、比重 1.27 g/ml と 1.32 g/ml の 2 種類のウイルス様粒子が産生されていた。一方、サブジェニミック領域では比重 1.27 g/ml の中空粒子だけが産生されていた。比重 1.32 g/ml の粒子の産生には前駆体蛋白の切断によって VP1 が生じる必要があるらしい。

A. 研究目的

サポウイルスは散発性の小児感染性胃腸炎の主たる病因ウイルスである。本ウイルスは現在 1~5 まで 5 つの遺伝子群 (genogroup 1~5, G1~G5) に分類され、このうちヒトに感染するのは G3 を除く G1、G2、G4、および G5 である。サポウイルス粒子は直径 38nm の小型球形ウイルスで約 7.5kb のプラス一本鎖 RNA を遺伝子に持つ。未だ本ウイルスが増殖可能な培養細胞系は見つかっていないが、ORF2 がコードする構造蛋白を昆虫細胞あるいは哺乳動物細胞で発現することによって、ネオティブ粒子と同じ形態と抗原性を有する組換え粒子を作出することが可能になっている。

本研究では、G2 に属する Mc10 株を用い、その全長遺伝子を発現する組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ、ウイルス蛋白の翻訳と切断、さらにウイルス様粒子 (virus-like particles,

VLPs) の形成を解析した。

B. 研究方法

1. ウイルス

2001 年、タイ王国で 7 ヶ月の小児の糞便から検出された Mc10 株を用いた。RNA 抽出後、遺伝子を 3 分割し定法に従って RT-PCR で増幅した。pCR-BluntII-Topo vector (Invitrogen) へのクローニング後、数ステップの増幅とクローニングを経て、3' 末端にリボザイムと T7 ターミネータを有する全長クローンを作製した。これを用いて 3C 様プロテアーゼ活性を欠失した変異体全長クローン、サブジェニミック RNA 領域に相当するクローンを作製した。これらのクローンは定法どおり bacmid を経由して組換えバキュロウイルスを作出した。

2. ウイルス蛋白特異抗体

ウイルス蛋白は定法に従って大腸菌で発現し、アフニティカラムで精製後、ウサギに接種して抗血

清を作製した。

(倫理面からの配慮について)

本研究にあたっては、試料提供者の人権、尊厳、利益が保護されるよう提供試料を厳格に管理、保存した。データについて個人が特定されないよう、特段の配慮をした。動物実験に関しては外注先の「動物の保護及び管理に関する規定」を尊重した。

C. 研究結果

Mc10 の全長遺伝子を組換えバキュロウイルスで発現した。全ての非構造蛋白および構造蛋白 (VP1) の発現と前駆体蛋白から機能蛋白へ切断がウイルス特異蛋白に対する抗血清を用いたウエスタンブロットで確認された。一方、3C 様プロテアーゼの機能ドメインに変異を導入した場合は前駆体産物と思われる 250kDa の蛋白のみ産生されていた。サブジェニミック RNA に相当する遺伝子領域を発現した場合は、VP1 のみが産生されていた。全長遺伝子を発現した細胞内には比重 1.27 g/ml と 1.32 g/ml の 2 種類の VLPs が産生されていた。一方、サブジェニミック領域では比重 1.27 g/ml の中空 VLPs だけが産生されていた。

C. 考察

サポウイルス Mc10 株の遺伝子上には約 6850 塩基の ORF1 と約 500 塩基の ORF2 がそれぞれ 5' と 3' に配置されている。ORF1 は全ての非構造蛋白と構造蛋白 VP1 をコードし、この領域から 250kDa の前駆体蛋白が翻訳される。一方、ORF2 は VP1 とともにサブジェニミック RNA から翻訳されると考えられている。ORF2 から翻訳される蛋白の機能は未だ明らかではない。したがって、

VP1 は ORF1 蛋白の切断によって生じるほかに、サブジェニミック RNA からの翻訳から生じる場合の 2 系統のルートで産生されると考えられる。本研究によって、250k 前駆体蛋白の切断によって生じた VP1 は比重 1.27 g/ml と 1.32 g/ml の 2 種類の VLPs として産生されること、サブジェニミック RNA から生じた VP1 は比重 1.27 g/ml のみを産生することが明らかになった。比重 1.27 g/ml の VLPs は内部が空の中空粒子であったが、1.32 g/ml の粒子内には核酸が取り込まれていることが示唆された。このことは 1.32 g/ml の粒子産生には前駆体蛋白からの切断によって VP1 が産生される必要があることを示唆している。

E. 結論

サポウイルスプロテアーゼは昆虫細胞内で活性を有し、前駆体蛋白の切断によって生じた VP1 は VLPs を形成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Wu FT, Oka T, Katayama K, Wu HS, Donald Jiang DS, Miyamura T, Takeda N, Hansman GS: Genetic diversity of noroviruses in Taiwan between November 2004 and March 2005. Arch Virol 151:1319-1327, 2006
2. Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS: Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. Arch Virol in press

3. Oka T, Yamamoto M, Katayama K, Hansman GS, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N: Identification of the cleavage sites of sapovirus open reading frame 1 polyprotein. *J Gen Virol* 87:3329–3338, 2006
 4. Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, White PA, Takeda N: Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 78:1347–1353, 2006
 5. Oka T, Hansman GS, Katayama K, Ogawa S, Nagata N, Miyamura T, Takeda N: Expression of sapovirus virus-like particles in mammalian cells. *Arch Virol* 151:399–404, 2006
 6. Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N: Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch Virol* 151:1291–1308, 2006
 7. Hansman GS, Takeda N, Katayama K, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA: Genetic diversity of Sapovirus in children, Australia. *Emerg Infect Dis* 12:141–143, 2006
 8. Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N: Enhancement of sapovirus recombinant capsid protein expression in insect cells. *FEBS Lett* 580:4047–4050, 2006
 9. Hansman GS, Guntapong R, Pongsuwanna Y, Natori K, Katayama K, Takeda N: Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens. *Arch Virol* 151:551–561, 2006
- 2.学会発表
- 1) Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N : Expression and Self-Assembly of Virus-Like Particles from the Full-Length Sapovirus Genome in Insect Cells. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 40th Joint Working Conference on Viral Diseases. Sendai (2006. 7)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし
 1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

ロタウイルスのリバースジェネティクス系の開発: 新世代のワクチン開発に向けて

分担研究者 谷口孝喜 藤田保健衛生大学医学部教授

研究要旨: ロタウイルスについては、これまでの世界中での精力的な研究にかかわらず、リバースジェネティクス系が開発されていなかった。われわれは、T7RNA ポリメラーゼ発現 rDIs、ヘルパーウイルスとしてのヒトロタウイルス KU 株、および P8 特異的抗 VP4 中和単クロン抗体の利用により、ロタウイルスのリバースジェネティクス系の開発に初めて成功した。

A. 研究目的

ロタウイルスは 1973 年の発見以来、各ウイルス蛋白質の構造、機能が解明され、ウイルス増殖過程の解析も進んだ。しかし、さらに詳細な検討には、リバースジェネティクス系の利用が望まれる。リバースジェネティクス系が開発されれば、こうした基礎的研究のみならず、新世代のワクチン開発につながる可能性がある。われわれは、これまで報告のないロタウイルスのリバースジェネティクス系の開発に向けた研究を進めた。

B. 研究方法

サルロタウイルス SA11 株の VP4 遺伝子に対応する cDNA を増幅し、pX8dT ベクターに挿入後 (pT7/VP4(SA11))、pT7/VP4(SA11) に人工的に変異を導入した。COS7 細胞に rDIs-T7pol を感染後、pT7/VP4(SA11) あるいは変異体をトランスフェクションし、ヘルパーウイルスとしてのヒトロタウイルス KU 株を感染後、抗 P8-VP4 中和モノクロン抗体 YO-2G2, ST-1F2 存在下で培養し、新たなウイルスを得た。

C. 研究結果

pT7/VP4(SA11) 内の制限酵素認識部位に変異を加え、制限酵素認識不能とした pT7/VP4(SA11)- Δ Pst-I, pT7/VP4(SA11) Δ HaeII, および pT7/VP4(SA11) Δ PstI, Δ HaeII をトランスフェクションに用いた場合、得られた新たなウイルスクロンは、制限酵素での切断の有無が設計どおりの結果となった。得られたウイルスクロンをブランク純化し、濃縮、塩化セシウム密度勾配遠心でビリオンを精製後、ELISA により VP4 蛋白質が SA11 由来であること、アクリルアミド電気泳動、塩基配列決定によりゲノムが VP4 コード遺伝子のみ SA11 由来であることを確認した。

C. 考察

ここで開発したロタウイルスのリバースジェネティクス系は、これが世界初とういことでは画期的である。しかしながら、今後の改良を必要としている。まず、効率を上げる工夫が求められる。また、外

層蛋白質であるVP4, VP7以外のウイルス構造蛋白質および非構造蛋白質を標的とした人為的改変を加えた後の選択の方法の開発が求められる。最終的には、プラスミド DNA のみのトランスフェクションによる感染性ウイルスの形成という、真のリバースジェネティクス系の開発に向けた研究が必要である。

E. 結論

ロタウイルスの外層蛋白質 VP4 をコードする遺伝子に人工的な変異を加え、その遺伝子を保有する感染性のロタウイルスの分離に成功した。こうしたロタウイルスのリバースジェネティクス系の開発は、世界で初めての報告となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Komoto, S., Sasaki, J., Taniguchi, K.: Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 4646-4651, 2006
- 2) Komoto, S., Taniguchi, K: Reverse genetics systems of segmented double-stranded RNA viruses including rotavirus. *Future Virology*,

1:833-846, 2006

- 3) Rahman, M., Matthijnsens, J., Yang, X., Delberke, T., Arijs, I., Taniguchi, K., Iturriza-Gomara, M., Iftekharuddin, N., Azim, T., Ranst, M.V.: Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J. Virol.*, 81: 2382-2390, 2007

2.学会発表

- 1) Komoto, S., Sasaki, J., Taniguchi, K.: Reverse genetics for rotavirus: U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, The 40th Joint Working Conference on Viral Diseases. Sendai (2006. 7)
- 2) Taniguchi, K., Sakon, N., Wakuda, M., Yui, A., Maeno, Y., Yoshikawa, T., Asano, Y.: Two topics on rotavirus researches: Antigenemia in human rotavirus infection and development of reverse genetics system for rotavirus. The 6th China-Japan International Conference of Virology. Shanghai, China (2006, 6)

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

ウイルス性胃腸炎の診断、疫学および予防に関する研究

分担研究者 中込 治 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨:A 群ロタウイルスの中で、G1がもっとも優勢を占めていることが多くの疫学的調査から明らかにされているが、その原因は十分解明されていない。そこで秋田県のある地域で10年間に優勢を占めたG1ロタウイルス株の相対的検出率の増加とVP7遺伝子の変化との間にどのような関係があるかを調べた。この結果、G1株の相対的検出頻度が増加するときには、多様なG1-VP7遺伝子プールのなかから、抗原性決定部位にアミノ酸置換をもったVP7遺伝子をもつG1ロタウイルス株が優勢株として流行していることがわかった。このような現象の背景として、そのときにもっとも選択的有利性をもつG1ロタウイルス株が集団内で選択され流行するものと解釈される。

A. 研究目的

A 群ロタウイルスは乳幼児の胃腸炎のもっとも重要な病原体であり、ロタウイルスにみられる多数の血清型のうち、G1がもっとも優勢を占めていることが多くの疫学的調査から明らかにされている。しかし、G1が優勢となる原因を極めようとした研究は少ない。最近イタリアの研究グループであるAristaらが一地域で長期にわたるG1株の検出率とそのVP7遺伝子との関係を調べ、G1の検出率が増加する背景には、あらたなVP7遺伝子が地域の中に導入されていることを示した。本研究は、秋田県のある地域で10年間の間に優勢を占めたG1ロタウイルス株の検出率の変動とVP7遺伝子との関係を調べ、Aristaらの観察が普遍的な現象であるかどうかを追試・確認することを目的とした。

B. 研究方法

すでに公表されている Koshimua et al (2000, Microbiol Immunol 44(6):499-510)の論文で明らかにされている10年間11シーズン中で優勢を占めたロタウイルス株の保存検体を利用した。この11シーズン中、G1が優勢を占めたのは9シーズンであり、一部重複する検体を含め、12検体を再利用した。これら12検体からゲノムRNAを抽出し、Reverse Transcription (RT)-PCR法でVP7遺伝子を増幅した後、塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとにClustal Wで多重整列させた後、Neighbor-Joining法で分子系統樹を作成した。

(倫理面からの配慮について)

本研究で使用した検体はすでに公表済みの論文に基づくデータによるものである。使用した検体についての個人情報はいずれも症例の属性も

切り離されており、まったく遡及できないので倫理上の問題はない。

C. 研究結果

本研究で解析した12株のVP7遺伝子の分子系統樹は、すでに知られているG1-VP7遺伝子の7つの系統のうち、I, II, IVの3系統に属するものであった。これらの異なる系統に属するVP7遺伝子間の主要なアミノ酸置換は94, 97, 147, 217, 218および235におこっており、これらの置換部位はいわゆる抗原性決定部位であるA, B, C, およびFに集中していた。11シーズン中4シーズンでG1ロタウイルス株の検出率が増加したが、これらのいずれに時期にも、優勢をしめるウイルス株のVP7抗原性決定部位におけるアミノ酸置換が起っていた。

C. 考察

本研究は限局された一地域で収集された優勢を占める12株のG1VP7遺伝子に限って解析されたものであること、また、分子系統樹の上から世界中に存在する7つのG1-VP7遺伝子の系統のうち、系統IIIはすでに消滅してしまったと考えられる系統であること、このほか3系統中2系統が極めてまれな1株しかない系統であること、残る1系統が動物に由来する例外的系統であることなどの諸点を考慮すると、G1ロタウイルス株は小さな地域の中に予想外に大きな遺伝子プールをもっているといえる。このような大きな遺伝子プールが選択的有利性を形成する基盤になっている可能性が考えられる。

E. 結論

G1株の相対的検出頻度が増加する原因には、その集団に新しいG1-VP7遺伝子をもったロタウイルス株が侵入してくるばかりではなく、多様なG1-VP7遺伝子プールを背景に、入れ替わりたかわりプールの中からそのときにもっとも選択的有利性をもつVP7遺伝子をもつG1ロタウイルス株が集団内で選択され流行するものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakagomi T, Takahashi Y, Arisawa K, Nakagomi O. A high incidence of intussusception in Japan as studied in a sentinel hospital over a 25-year period (1978-2002). *Epidem Infect* 134: 57-61, 2006
- 2) Hoshino Y, Honma S, Jones RW, Santos N, Nakagomi O, Nakagomi T, Kapikian AZ, Touless ME. A rotavirus strain isolated from pig-tailed macaque (*Macaca nemestrina*) with diarrhea bears a P[6]:G8 specificity. *Virology* 345: 1-12, 2006
- 3) Ahmed HM, Coulter JB, Nakagomi O, Hart CA, Zaki JM, Al-Rabaty AA, Dove W, Cunliffe NA. Molecular characterization of rotavirus gastroenteritis strains, Iraqi Kurdistan. *Emerg Infect Dis* 12: 824-826, 2006
- 4) Nakagomi O, Nakagomi T, Arisawa K. A lack of significant association between the

electropherotype or G-serotype of the infecting strain and disease severity of rotavirus gastroenteritis. Arch Virol 151:1947-1950, 2006

- 5) Sato A, Iizuka M, Nakagomi O, Suzuki M, Horie Y, Konno S, Hirasawa F, Sasaki K, Shindo K, Watanabe S. Rotavirus double-stranded RNA induces apoptosis and diminishes wound repair in rat intestinal epithelial cells. J Gastroenterol Hepatol. 21: 521-530, 2006
- 6) Uchida R, Pandey BD, Sherchand JB, Ahmed K, Yokoo M, Nakagomi T, Cuevas LE, Hart CA, Nakagomi O. Molecular epidemiology of rotavirus diarrhea among children and adults in Nepal: detection of G12 strains with P[6] or P[8] and a G11P[25] strain. J Clin Microbiol 44: 3499-3505, 2006

2. 学会発表

- 1) Nakagomi T, Nakagomi O, Ueda S.: A whole-virion inactivated rotavirus vaccine: an alternative approach to immunization against rotavirus diarrhea. The Fortieth

Joint Working Conference on Viral Diseases: US-Japan Cooperative Medical Science Program, Sendai (2006. 7)

- 2) Nakagomi O, Glass RI.: Prospect for and challenges to rotavirus vaccines. The Fortieth Joint Working Conference on Viral Diseases: US-Japan Cooperative Medical Science Program, Sendai (2006. 7)
- 3) Nakagomi O, Uchida R, Pandey BD, Sherchand JB, Ahmed K, Yokoo M, Nakagomi T, Cuevas LE, Hart CA.: Molecular epidemiology of rotavirus in Nepal: An emergent threat of G12 strains. The Ninth Double-stranded RNA Virus Symposium. Cape Town, South Africa (2006. 10)

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

アジアにおける狂犬病等の動物由来感染症に関する
疫学およびサーベイランスに関わる調査研究の推進

分担研究者 氏名 井上 智、所属 国立感染症研究所、職名 室長

研究要旨：フィリピンの熱帯医学研究所（RITM）との共同研究により、フィリピンで流行している狂犬病ウイルスの遺伝子型の解析を行ってフィリピン由来のウイルス株を検出できる遺伝子診断系の開発と分離ウイルス株の遺伝子解析を行い狂犬病流行株の地域特性について解析を行った。

A. 研究目的

フィリピンで流行しているイヌの狂犬病について、簡便で迅速な遺伝子診断法を確立してRITMの狂犬病診断に導入すること、および、フィリピンで流行している狂犬病ウイルス株の地域特性を分子疫学的解析によって明らかにする（狂犬病の流行原因となっているイヌの集団を分子疫学的に特定する）。この迅速な遺伝子診断系と流行ウイルス株の地域的特性の解析データを利用して、狂犬病の感染源動物（イヌ）対策の標的地域をより限局させた効果的な対策方法を開発することが目的である。

るために、RITMに持ち込まれた検体（イヌ）からウイルスを分離すると共に分離ウイルスのゲノム遺伝子を抽出して核（N）蛋白の構造遺伝子について全塩基配列の決定を行った。遺伝子診断系は、国立感染症研究所獣医科学部で行っている狂犬病の遺伝子診断システムをフィリピンの流行ウイルス株検出に应用することを検討した。得られたN遺伝子の塩基配列は、Gene bankのデータベースに登録されている狂犬病ウイルスの塩基配列利用も行い分子疫学系統樹を作成した。

（倫理面からの配慮について）

必要なし

B. 研究方法

フィリピンで流行しているイヌの狂犬病の流行を分子疫学的に明らかにす

C. 研究結果

フィリピンで流行している狂犬病ウ

ウイルス株はアジアで流行しているウイルス株と近似のクラスターを形成しているが、アジア大陸で流行しているウイルス株とは明らかに異なることが示された。

C. 考察

フィリピンは、7,107の島によって構成される国である。アジアの地域によって異なる狂犬病ウイルスの遺伝子型が流行しているのと同様にフィリピンの島ごとまた島内で地域ごとに流行しているイヌの狂犬病にも異なる遺伝子型が維持されていると予想される。したがって、フィリピンで流行している狂犬病ウイルスの流行株の特定が遺伝子レベルで可能となれば、流行の原因地域とイヌの集団が明らかとなりより効果的な狂犬病の流行対策が行えるようになると考えられた。

E. 結論

地域で流行している狂犬病の遺伝子型を特定することが可能になれば、流行を媒介しているイヌの分布域が明らかとなりワクチンキャンペーンで対象とするべき対策地域を効果的に限定して費用対効果のすぐれた対策が可能になるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takayama-Ito, M., Inoue, K. I., Shoji, Y., Inoue, S., Iijima, T., Sakai, T., Kurane, I. and Morimoto, K.: A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by single amino acid substitution to arginine at position 333 in glycoprotein. *Virus Res.* 119:208-215, 2006.
- 2) Park, C.-H., Kondo, M., Inoue, S., Nguchi, A., Oyamada, T., Yoshikawa, H. and Yamada, A.: The Histopathogenesis of Paralytic Rabies in Six-Week-Old C57BL/6J Mice Following Inoculation of the CVS-11 Strain into the Right Triceps Surae Muscle. *J. Vet. Med. Sci.* 68:589-595, 2006.
- 3) Hotta, K., Motoi Y., Okutani, A., Kaku, Y., Noguchi, A., Inoue, S. and Yamada, A.: Role of GPI-anchored NCAM-120 in rabies virus infection. *Microbes Infect.* XX:1-8, 2006.
- 4) 大日康史、井上 智：我が国の飼育犬に狂犬病が侵入した場合の伝播と流行拡大の数理モデルによる解析／特集 人と動物の共通感染症最前線 3、*獣医畜産新法*、9:279-281、2006
- 5) 井上 智：狂犬病の発生リスクと診断・検査システムの重要性、*家畜衛生学雑誌*、32:7-8、2006

2. 学会発表

- 1) 衛藤真理子、大野貴文、野口 章、井上 智、須永 裕：国際標準法による輸入犬の狂犬

- 病ワクチン抗体保有状況調査：第141回日本獣医学会学術集会、つくば（2006、3）
- 2) 長谷川 徹、小泉 順子、野口 章、井上 智：狂犬病防御抗体保有状況と飼い主意識調査：平成18年東京都福祉保健医療学会、東京（2006、11）
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況