

表2 年齢分布

年齢構成	男		女		計	猫ひっかき病		トキアラスマ		オウム病		陽性者計	陽性率(%)
	男	女	男	女		男	女	男	女				
	20～25	1	43	44		7	1	1	1	1	1		
26～30	9	35	44	6	1	1	1	1	1	1	8	18.2	
31～35	4	16	20	1	1	1	1	1	1	1	3	15.0	
36～40	3	6	9	2	1	1	1	1	1	1	4	44.4	
41～45	5	3	8	1	1	1	1	1	1	1	2	25.0	
46～50	11	7	18	1	1	1	1	1	1	1	4	22.2	
51～55	7	4	11	1	1	1	1	1	1	1	3	27.3	
56～60	4	1	5										
60歳以上	1		1										
計	45	115	160	5	15	1	5	3	4	33	20.6		

表3 職種別集計

職種	男		女		計	猫ひっかき病		トキアラスマ		オウム病		陽性者計	陽性率(%)
	男	女	男	女		男	女	男	女				
	獣医師	44	17	61		5	3	1	1	3	1		
獣医看護師	1	76	77		12	2	2		3	17	22.1		
トリマー		10	10										
事務、その他		12	12				2				2	16.7	
計	45	115	160	5	15	1	5	3	4	33	20.6		

表4 勤続年数分布

勤続年数	男		女		計	猫ひっかかり病		トキソラスマ		オウム病	
	男	女	男	女		男	女	男	女	男	女
～5年	11	74			85		13			3	1
6～10年	6	25			31		1			1	2
11～15年	3	6			9	1				1	
16～20年	7	4			11	2					1
21～25年	9	4			13				1		1
26～30年	5	2			7	2	1				
31～35年	4				4						
36～40年											
41年以上											
計	45	115			160	5	15	1		5	4

表5 1日のうちで動物や動物ゲージと接する時間

時間	男		女		計	猫ひっかかり病		トキソラスマ		オウム病	
	男	女	男	女		男	女	男	女	男	女
1時間未満	1	3			4		1				
1～2時間未満		3			3						
2～4時間	2	9			11		1			2	1
4～6時間	11	11			22		1	1		1	1
6～8時間	6	40			46		6			1	
8時間以上	25	45			70	5	6			3	2
その他		4			4						
計	45	115			160	5	15	1		5	4

表6 この2～3年で取り扱ったことのある動物種

職種	霊長類	食肉目	翼種目	けっ歯類	ウサギ目	鳥類	は虫類	両生類	その他	無
獣医師	6	41	4	48	53	50	10	11	14	1
獣医看護師	3	43	3	53	54	47	8	8	14	1
トリマー		4		2	5	3				2
事務、その他		2		3	2	2		1	1	1
計	9	90	7	106	114	102	18	20	29	5

表7 輸入されたものとはっきり言える動物

職種	フェレット	ブリードック	かメ	鳥類	ウサギ	無
獣医師	11	3	2	1	1	25
獣医看護師	7	5	1		1	36
トリマー						4
事務、その他						2
計	18	8	3	1	2	67

表8 動物やゲージを取り扱うときに自分や動物を守るために行うこと

職種	前後に手洗い	手袋着用	マスク着用	専用履物	前後にうがい	帽子をかぶる	専用作業着	シャワーを浴びる	常に爪を切る	器具消毒衛生管理	特に何もしない	その他
獣医師	55	10	6	12	1	3	21	3	40	40	2	
獣医看護師	76	24	8	26	1		43	4	55	60		
トリマー	10		4	6			6		3	9		
事務、その他	11	1	2	2			2		6	6		
計	152	35	20	46	2	3	72	7	104	115	2	

表9 これまで自分が取り扱った動物で、人への感染症を引き起こした事例に遭遇したこと

職種	なし	あり
獣医師	36	25
獣医看護師	56	21
トリマー	9	1
事務、その他	11	
計	112	47

表10-1 動物咬傷の経験

職種	動物名										頻度		
	犬	猫	ウサギ	フェレット	アリードック	ハムスター	鳥	リス	時々	たまに	極たまに		
獣医師	49	53	3	4	2	6	2		9	25	22		
獣医看護師	62	68	1	2	1	1	1	1	18	26	26		
トリマー	8	7		1					2	4	1		
事務、その他	1	5				1				1	6		
計	120	133	4	7	3	8	3	1	29	56	55		

表10-2 ノミ、ダニ刺傷の経験

職種	動物名						頻度		
	犬	猫	ハムスター	不明	時々	たまに	極たまに		
獣医師	25	31		2	10	12	11		
獣医看護師	23	22	1	3	4	10	9		
トリマー	3	2					2		
事務、その他		1				1			
計	51	56	1	5	14	23	22		

表10-3 動物からの病気伝染の経験

職種	動物名		頻度					その病気				
	病気をうつされた	犬	猫	時々	たまに	極たまに	肺炎	皮膚炎(カビ)	皮膚化膿症	リンパ節炎	その他	
獣医師	11	3	8			9		7	1	3		
獣医看護師	6	4	3			6		3	2	1		
トリマー												
事務、その他	1							1				
計	18	7	11			15		11	3	4		

表11 動物咬傷、ノミ・ダニ刺傷、病気伝染ありと答えた勤務者の対処法

職種	特に何もしていない	受診し治療	自分の判断で治療	同僚上司に相談	保健所、動物愛護センターに相談	その他
獣医師	11	15	49	1		
獣医看護師	14	28	57	21		2
トリマー	3	5	7	4		
事務、その他	7		5			
計	35	48	118	26		2

表12 健康診断や人間ドックの受診状況

職種	毎年受診	なるべく受診	あまり気にしていない	全く考えていない	その他
獣医師	4	16	32	8	1
獣医看護師	1	8	42	23	3
トリマー			7	1	2
事務、その他		1	6	4	1
計	5	25	87	36	7

表13 これまでに健康診断等で健康異常を指摘されたことや社会人になって治療したり入院した病気

職種	腎機能異常、 腎疾患	黄疸を伴う肝 機能異常	原因不明の 膵臓炎	肺炎	リンパ節腫脹	その他	特になし	計
獣医師	1			2	1	12	45	61
獣医看護師				2	1	13	63	79
トリマー					1	1	8	10
事務、その他				1		1	10	12
計	1			5	3	27	126	162

表14 ペットの飼育状況(現在、過去にかかわらず)

	犬	猫	トリ	ウサギ	ハムスター
猫ひっかき病(20名)	15(75%)	6(30%)	11(55%)	2(10%)	3(15%)
トキソプラズマ(6名)	4(66.7%)	2(33.3%)	0(0%)	0(0%)	1(16.7%)
オウム病(7名)	7(100%)	4(57.1%)	3(42.9%)	1(14.3%)	2(28.6%)
陰性(127名)	98(77.2%)	81(63.8%)	35(27.6%)	20(15.7%)	27(21.3%)
計(160名)	124(77.5%)	93(58.1%)	49(30.6%)	23(14.4%)	33(20.6%)

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

動物由来感染症のコントロール法の確立に関する研究

分担研究課題：危機管理対応のための診断技術開発に関する研究

分担研究者：森川茂（国立感染症研究所ウイルス第1部第1室長）

協力研究者：水谷哲也、酒井宏治、福士秀悦、西條政幸、倉根一郎（同、ウイルス第1部）
池郁夫（理研 BRC）

研究要旨：リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)は、マウスを自然宿主とする動物由来感染症でラッサウイルスに近縁なアレナウイルスである。LCMV は、ウイルス蛋白のアミノ酸配列は良く保存されているが、遺伝子配列は同義置換が多いため、全てのウイルス株を網羅できる RT-PCR 用プライマーの設定が難しい。我々は、血清や培養細胞上清中の RNA ウイルスの遺伝子を、特異的な primer を用いずに効率よく増幅して遺伝子配列を決定する Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV)法を確立した。RDV 法は、ウイルス粒子外の核酸を nuclease 処理により除去し、特異的な primer を用いない whole genome amplification 技術を用いて遺伝子を均等に増幅し、さらにアダプターを付加した後に特殊な primer sets による PCR を行いにダイレクトシーケンスを行なうことに特長がある。本年度は、RDV 法による LCMV 検出への適用を検討した結果、LCMV Armstrong 株、M1 株いずれも効率良く検出できることが明らかとなった。

A. 研究目的

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (Lymphocytic choriomeningitis virus; LCMV) はマウスを自然宿主とする動物由来感染症で、原因ウイルスはラッサウイルスなどと共に旧世界アレナウイルスに分類される。LCMV はマウスを自然宿主とするが感受性の高いハムスターからヒトへの感染が海外では報告されている。近年米国でハムスターから LCMV に感染したドナーからの臓器移植で死亡例が報告されている (N Engl J Med. 2006, 354: 2235-49)。また、国内では理研 BRC がフランスから導入したマウス系統が LCMV に汚染していたことが 2005 年に明らかになっている (Comp Med, *in press*)。これまで、LCMV の RT-PCR に関する文献

(Virology 1999, 257:73-83) で用いられている primer set による RT-PCR では、LCMV の検出は不十分で、米国での患者検体の場合も、国内でのマウスからの検出の場合も、原因となった LCMV 株の遺伝子配列が決定されてから、その株特異的な primers を設定することにより高感度な検出が初めて可能となっている。

特に変異の多いウイルスへの PCR 法の適用として、CODEHOP-PCR (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers-PCR) と Consensus-PCR 法がある。前者は、保存されているウイルス蛋白のアミノ酸配列から mixed primers をデザインして行なう PCR 法であり、後者はこれまで既知の遺伝子配列から複数の primers をデザインして

行なう PCR 法である。LCMV は、例えば S-RNA にコードされる NP と GP のアミノ酸配列は良く保存されているが、遺伝子配列ではトリプレットの 3 番目に非常に変異が多い(同義置換の多い) ウイルスである。このため、遺伝子両末端と中央部分のヘアピン構造をとる部位のみ高度に保存されているが、他の領域ではウイルス株ごとに種々の同義置換が認められる。これまで、CODEHOP-PCR や Consensus-PCR 様の primers のデザインを試みたが全てのウイルス株に共通に適用できるような primers は見出せなかった。

最近、我々はウイルス感染培養細胞の上清や血清のような細胞の RNA が比較的少ない検体を対象として、ウイルス RNA 由来 cDNA の均等増幅と特殊な primers の組み合わせによる二次増幅によりウイルス由来 amplicons を single あるいは数個の産物として増幅する系を確立した (rapid determination of viral RNA sequences : RDV 法; *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, 13: 322-4.)。RDV 法では、遺伝子配列の決定まで遺伝子クローニングを必要としないため、未知のウイルスに対しても文部科学省の遺伝子組換え実験の承認を必要としない。また、RDV 法は逆転写反応でランダムプライマーを用いるため、LCMV のように変異の多いウイルスの検出に適していると考えられる。本年度は、既にゲノム配列の判明している LCMV2 株を対象に RDV 法が適用できるかについて検討し、危機管理対応のための診断技術開発の可能性を検討した。

B. 方法

Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV) 法は、ウイルス以外の核酸を除去した後、全ゲノム増幅法あるいは全トランスクリプトーム増幅法を利用してウイルス核酸を特異的プライマーを用いずに増幅して

一次 cDNA ライブラリーを作製した後、アダプターを付加して特別にデザインしたプライマーの組み合わせ最大 96 種類で PCR を行ない、二次ライブラリーを作製する方法である。この二次ライブラリー作製時のプライマーの特性から、PCR 産物が 1 から 2 個の産物として増幅される。これらをゲル精製してダイレクトシーケンスすることにより、検体中に含まれるウイルス遺伝子配列情報を得ることができる。

今回、LCMV Armstrong 株と 2005 年に理研 BRC に導入されたマウス系統から分離された M1 株を用いて、RDV 法の適用が可能か、以下のように検討した。

1. LCMV 感染 HeLa 細胞の培養上清 100 μ L から Agilent Total RNA isolation mini kit (Agilent Tech. Inc.)を用いて RNA を抽出した。
2. 一次 cDNA ライブラリーの作製: Whole transcriptome amplification kit (Sigma 社)により抽出 RNA の cDNA を増幅した。このキットでは逆転写反応時にクアジランダム配列に tag 配列が付加されたプライマーを用いるため、両端に tag 配列が付いたランダムな長さの 2 本鎖 cDNA が合成される。この cDNA は、Takara の Multiplex PCR system と tag プライマーで 40 サイクル増幅して一次 cDNA ライブラリーを作製した。
3. 二次ライブラリーの作製: 一次 cDNA ライブラリーの一部を *HaeIII* で切断後、アダプターを付加し、特別にデザインした primers の組み合わせ 12 種類で PCR を行ない、二次ライブラリーを作製した。いくつかの primer set の組み合わせで PCR 産物がシングルバンドとして増幅されるため、それらをダイレクトシーケンスすることにより、検体中に含まれるウイルスの遺伝子配列の部分情報を得た。得られた遺伝子配列を blast 検索

により解析した。

C. 結果

RDV 法は、二次ライブラリー作製時にアダプターに相補的な配列に 4 塩基の配列を付加したプライマーの組み合わせ 96 種の PCR を行なうことにより、PCR 産物がシングルバンドから複数のバンドとして増幅されるため直接シーケンスできる方法である。二次ライブラリー作製時に用いる primer sets は理論的に全ての配列に対応できないが（理論的には $256 \times 256 = 65,536$ 通りの primer sets による反応が必要）、リンカー付加時に一次ライブラリーの amplicon 同士がタンデムにライゲーションされることによりウイルス遺伝子断片を含むキメラ遺伝子として増幅されることが多いため、網羅的にウイルス遺伝子が増幅できると考えられる。RDV 法を改良した結果、12 から 24 通りの primer sets の組み合わせでもかなりのウイルス遺伝子の増幅ができることが明らかになったため、本実験では 12 通り（表 1）の primer sets の組み合わせで二次ライブラリーの作製を行った（図 1）。

当初 RDV 法には、全ゲノム増幅法を用いていたが、最近全トランスクリプトーム増幅キットが市販された（Whole transcriptome amplification kit (Sigma 社)）ため、本研究ではこのキットを用いて一次ライブラリーを作製した。その結果、LCMV Armstrong 株では得られた二次ライブラリー PCR 産物 16 個の内 3 個が、M1 株では得られた PCR 産物 23 個の内 18 個が、それぞれ LCMV 由来産物であった（表 2）。このように、いずれの株の培養上清からもウイルス特異的配列情報を得ることができた。

D. 考察

RDV 法は、SARS の様な新興ウイルス感染症発生時に、迅速に遺伝子配列情報を取得することを目的として開発されたが、その後の改良により、現状では 1,000 コピー程度のウイルス RNA を検出し、遺伝子配列を得ることができる。さらに、この方法では遺伝子組み換えを必要としないため、未知のウイルスの遺伝子組換えの場合必要な大臣確認実験に相当しない。このため、迅速にウイルス遺伝配列情報からウイルスの同定が可能である。

理研 BRC で導入マウス系統が LCMV に汚染していた事例（Comp. Med., in press）では、これまで報告されていた LCMV 検出プライマーの内いくつかのプライマーを用いた RT-PCR で遺伝子が検出されたが、最終的には分離されたウイルス（M1, M2 株）の S-RNA の全遺伝子配列を決定して、この株特異的なプライマーで再検討した結果、同一系統のマウスの 100%がウイルスに感染していることが初めて明らかになった。このように、同義置換が非常に多い LCMV の様なウイルスの場合は、既知のウイルス遺伝子配列情報から作製されたプライマーでは検出感度が低い、あるいは検出されないウイルス株がある。本研究から、このようなウイルスの遺伝子検出・同定法としても RDV 法は有用であると考えられる。本研究では、分離された LCMV を用いて RDV 法による遺伝子増幅・解析をしたが、今後感染動物の尿や血清等からの遺伝子検出への適用に関しても検討したい。また、近縁な旧世界アレナウイルスであるラッサウイルスも同様に同義置換が多いため、RDV 法の適用に関して検討したい。

E. 結論

LCM ウイルスの様に同義置換の高頻度なウイルスの遺伝子検出・同定法として、特異的 primers を必要としない Rapid

Determination of Viral RNA Sequence (RDV)
法が有用であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizutani T, Fukushi S, Kenri T, Sasaki Y, Ishii K, Endoh D, Zamoto A, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2007) Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by Mycoplasma fermentans. Arch Virol. in press
2. Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, and Nishimura H. (2007) Rapid genome sequencing of RNA viruses. Emerg. Infect. Dis., 13(2): 322-4.
3. Ike F, Bourgade F, Ohsawa, K, Sato H, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Takimoto K, Yamada YK, Jaubert J, Berard M, Nakata H, Hiraiwa, N, Mekada K, Takakura A, Itoh T, Obata Y, Yoshiki A, Montagutelli, X. (2007) LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. Comp. Med., in press
4. Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Morikawa S, Yokosawa H, and Yasuda J. (2007) Tsg101 interacts with Marburg VP40 depending on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as for Ebola virus, and plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. J. Virol., in press
5. Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, Peiris JS, Chen PJ, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. (2007) Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. Vaccine. in press
6. Yu F, Le MQ, Inoue S, Hasebe F, Parquet MD, Morikawa S, Morita K. (2007) Development of immunoglobulin m capture enzyme-linked immunosorbent assay system for severe acute respiratory syndrome coronavirus by using recombinant truncated nucleocapsid protein as antigen. Clin Vaccine Immunol. 2007 Jan 3; [Epub ahead of print]
7. Saijo M, Georges-Courbot MC, Fukushi S, Mizutani T, Philippe M, Georges AJ, Kurane I, Morikawa S. (2006) Marburgvirus nucleoprotein-capture enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to recombinant nucleoprotein: detection of authentic Marburgvirus. Jpn J Infect Dis., 59(5):323-5.
8. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Yokoyama M, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Morikawa S, Sata T. (2006) Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus. J Virol., 81(4):1848-57
9. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Taguchi F, Tashiro M, Morikawa S. Evaluation of a novel vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detection of neutralizing antibody responses to SARS-CoV. J Med Virol. 2006, 78:1509-12.
10. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T,

- Morikawa S, Tashiro M, Suzuki T, Taguchi F, Takemori T, Miyamura T, Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 581: 593-6.
11. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Peiris JS, DeMello DE, Chen PJ, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS coronavirus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 581: 561-6.
 12. Zamoto A, Taguchi F, Fukushi S, Morikawa S, Yamada YK. Identification of ferret ACE2 and its receptor function for SARS-coronavirus. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 581: 519-22.
 13. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infections in experimental animals. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 581:515-8.
 14. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS coronavirus spike protein. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 581: 293-6.
 15. Matsuyama S, Ujike M, Ishii K, Fukushi S, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F. Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 581: 253-8.
 16. Mizutani T, Fukushi S, Ishii K, Sasaki Y, Kenri T, Saijo M, Kanaji Y, Shiota K, Kurane I, Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 347(1):261-5.
 17. 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. LC16m8, a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein B5R, protects monkeys from monkeypox. *J Virol.* 2006; 80 (11): 5179-88.
 18. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Suzuki T, Taguchi F, Tashiro M, Takemori T, Miyamura T, Tsunetsugu-Yokota Y. Induction of protective immunity against severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection using highly attenuated recombinant vaccinia virus DIs. *Virology.* 2006;351(2):368-80.
 19. 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. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(4):444-51.
 20. 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 Immunol Med Microbiol.* 2006;46(2):236-43.
 21. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEBS Lett.* 2006; 580(5):

1417-24.

2. 学会発表

1. Lee SL, Di Caro A, Favier AL, Grolla AR, Lacote S, Morikawa S, Nitsche A, Olivera H, Zimmermann P, Damon IK. Smallpox Diagnostics: Global Preparedness. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED 2007). 23-25 February 2007, Vienna, Austria
2. Morikawa S, Saijo M, Qing T, and Kurane I. Viral hemorrhagic fevers: Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. The 1st Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases, Bangkok, Thailand, 29-30 January 2007
3. Watanabe R, Maejima M, Fukushi S, Matsuyama S, Morikawa S, and Taguchi F. Cleavage of spike protein defines the entry pathway of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV). Keystone Symposia, Respiratory viruses of animals causing diseases in humans, 2006年12月、Singapore
4. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Harashima A, Sato Y, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S, and Sata T. Animal models of severe acute respiratory syndrome using rodent-passaged SARS-CoV. Keystone Symposia, Respiratory viruses of animals causing diseases in humans, 2006年12月、Singapore
5. Fukushi S, Mizutani T, Sakai K, Saijo M, Kurane I, and Morikawa S. Amino acid substitutions on S2 region responsible in enhancement of SARS-CoV infection to rat ACE2-expressing cells. Keystone Symposia, Respiratory viruses of animals causing diseases in humans, 2006年12月、Singapore
6. 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, September 2006
7. 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, June 2006
8. 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, June 2006
9. 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, February 2006
10. Zamoto, A., Taguchi, F., Fukushi, S., Morikawa, S., Yamada, Y. K. Identification of ferret ACE2 and its receptor function for SARS-CoV. Xth International Nidovirus Symposium, 2005年6月 Colorado, USA
11. Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S. Importance of JNK

- and PI3K/Akt signaling pathways for establishing persistent SARS-CoV-infection in Vero E6 cells. Xth International Nidovirus Symposium, 2005 年 6 月 Colorado, USA
12. Fukushi,S., Mizutani,T., Saijo,M., Matsuyama,S., Taguchi,F., Kurane,I., Morikawa,S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus Symposium, 2005 年 6 月 Colorado, USA
 13. Mizutani,T., Fukushi,S., Kenri,T., Sasaki,Y., Endo,D., Zamoto,A., Saijo,M., Kurane,I., Morikawa,S. Molecular mechanism of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006 年 6 月 Kyoto, Japan
 14. 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 年 11 月
 15. 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 年 11 月
 16. 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. 改良型痘そうワクチン株 m8D 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 年 11 月
 17. 渡邊理恵、前島雅美、福士秀悦、松山州徳、森川茂、田口文広. SARS コロナウイルス解裂性スパイク蛋白を持つ pseudotype ウイルスの細胞内侵入帰国に関する研究. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006 年 11 月
 18. 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 年 11 月
 19. 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-CoV と *Mycoplasma fermentans* の共感染が細胞に及ぼす影響. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006 年 11 月
 20. 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、ラット馴化 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 年 11 月
 21. 氏家誠、福士秀悦、森川茂、田口文広. SARS-CoV スパイク (S) 蛋白質の Cys-rich 領域は細胞間融合及びウイルス細胞侵入活性に重要な働きを持つ. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006 年 11 月
 22. 座元綾、福士秀悦、田口文広、森川茂、山田靖子. フェレット ACE2 と SARS-CoV S 蛋白質の親和性の解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006 年 11 月
 23. 光木裕也、大島正道、山本拓也、高木弘

- 隆、森川茂、山岡昇司、永井美之、大西和夫、横田恭子. SARS-CoV Spike に対する中和抗体のエスケープ変異ウイルスの単離と感染防御に重要な抗体エピトープの同定. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006 年 11 月
24. 浦田秀造、野田岳志、河岡義裕、森川茂、横沢英良、安田二郎. マールブルグウイルス VP40 によるウイルス様粒子形成の出芽解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006 年 11 月
25. 池尻昌宏、西條政幸、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、倉根一郎. 6-クロロプリンを塩基とした核酸誘導体の SARS-CoV 抑制作用. 第 16 回抗ウイルス科学療法研究会, 福島市, 2006 年 5 月

表 1. RDV 法の二次ライブラリー作製時に用いたプライマーの組み合わせ

H1-5	<u>AATTCGGCGGCCGCGGATCCCCGGCG</u>
H9-1	<u>AATTCGGCGGCCGCGGATCCCCAGGG</u>
H9-2	<u>AATTCGGCGGCCGCGGATCCCCAGGC</u>
H9-3	<u>AATTCGGCGGCCGCGGATCCCCAGGA</u>
H9-4	<u>AATTCGGCGGCCGCGGATCCCCAGGT</u>
H9-5	<u>AATTCGGCGGCCGCGGATCCCCAGCG</u>
H9-6	<u>AATTCGGCGGCCGCGGATCCCCAGCC</u>
H9-7	<u>AATTCGGCGGCCGCGGATCCCCAGCA</u>
H9-8	<u>AATTCGGCGGCCGCGGATCCCCAGCT</u>
H9-9	<u>AATTCGGCGGCCGCGGATCCCCAGAG</u>
H9-10	<u>AATTCGGCGGCCGCGGATCCCCAGAC</u>
H9-11	<u>AATTCGGCGGCCGCGGATCCCCAGAA</u>
H9-12	<u>AATTCGGCGGCCGCGGATCCCCAGAT</u>

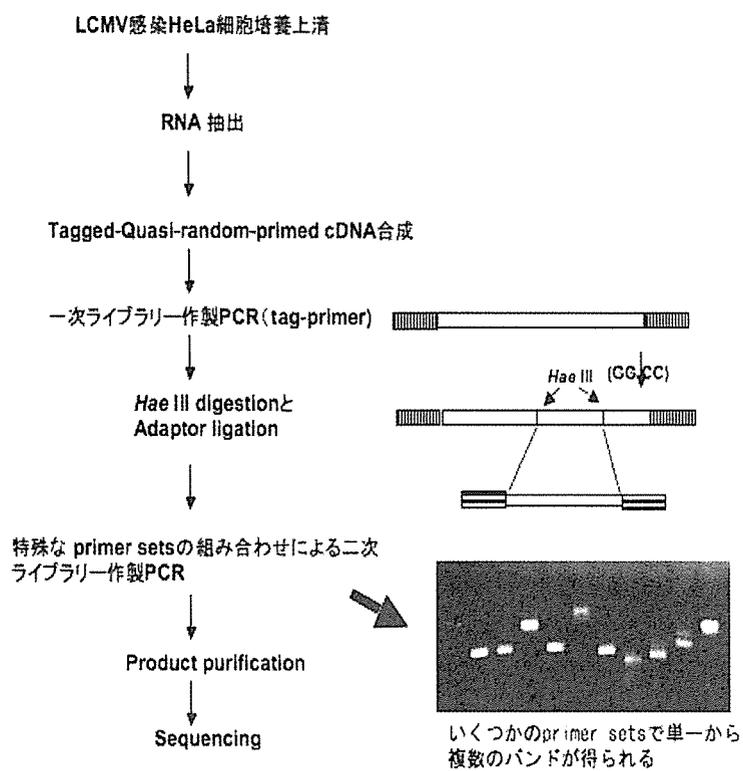
H1-5 と H9-1 から H9-12 の 12 種類のプライマーの組み合わせ 12 通りで二次ライブラリー作製 PCR を行なった。下線は二次ライブラリー作製時に付加したアダプター特異的配列を示す。

表 2. RDV 法による LCMV 遺伝子増幅の結果

ウイルス株	primer *	PCR 産物**
Armstrong	H9-1	2284-2369
	H9-3	2377-2470
	H9-6	2381-2474
M1	H9-2	114-398
	H9-2	2715-2799
	H9-3	2043-2149
	H9-3	2715-2800
	H9-4	110-401
	H9-4	2035-2255
	H9-5	2715-2859
	H9-5	2751-2771
	H9-6	114-350
	H9-6	2038-2259
	H9-7	2715-2875
	H9-8	2385-2544
	H9-8	2268-2373
	H9-10	110-401
	H9-10	110-401
H9-11	2035-2240	
H9-12	2035-2263	
H9-12	110-401	

* H1-5 と記載の primer により二次ライブラリー作製 PCR を行なった
 **それぞれのウイルス株の S-RNA 配列上の位置をしめす

図1. RDV法のステップ



エキノコックス症感染源対策

（地域住民のベイト散布による感染源対策（小清水）、野外のキツネ糞便採取の効率、ペットのエキノコックス虫卵排泄前の糞便DNA検査による診断法の改善、多包虫の完全長cDNAライブラリー作成、トリヒナの分類と動物疫学調査）

分担研究者 奥 祐三郎 北海道大学大学院獣医学研究科 助教授

研究の要旨

1) 小清水では 2005 年から住民による駆虫薬入りベイト散布（エキノコックス感染源対策）のための技術移転を試みている。2006 年には 5-11 月まで隔月に住民がベイト散布し、8 月に野外において 82 個の糞便を採取した。これらの糞便はすべてエキノコックス抗原陰性であった。Multiplex PCR により糞主動物の鑑別を試み（79 例が鑑別可）、78 個がキツネの糞便であることが確認された。これらのことから、住民によるベイト散布により小清水町に生息するキツネに対する顕著なエキノコックス駆虫効果が確認された。2) 野外におけるキツネ糞便採取の効率を調べるために、2006 年 7 月および 8 月に、道南（初調査地域、21 カ所）および小清水町（既調査地域）において自動車（運転者と助手各 1 名）を利用した道路沿いの糞便採取を実施した。道南では自動車 1 台 1 時間当たり約 2.5 個、小清水では約 8.4 個が採取され、糞便採取の回数を重ね、糞便採取ポイントデータを蓄積することにより、より効率的に糞便を野外で採取できることが示唆された。3) 2005 年からペットのプレパテントピリオド（虫卵排泄前）のエキノコックス確定診断のために、糞便内のエキノコックス DNA を検出する方法を試みてきたが、2006 年にはプライマーの改善（EmA/B→EmA' /B'）を行ない、より高感度に寄生虫 DNA が検出された。4) コットンラットの腹腔から得た多包虫シスト塊を用いて（一部宿主成分を含む）、2005 年には多包虫の完全長 cDNA ライブラリーを V-Capping 法により作成し、約 11,000 のクローンを得た。これらクローンについて予備的に 5' 末端から DNA 配列を解読し、2006 年にはこれらのデータについて解析した。100 塩基以下しか解読できなかったクローンは約 3,000 ほどあり、600 塩基以上解読されたクローンは約 6,300 であった。200 塩基以上解読された約 8,000 クローンについて DNA ホモロジー検索を行ったところ、約 2,300 クローンはエキノコックス由来（約 600 のクラスターを含む）、2,800 は宿主由来と判断され、残り（約 3,000）はいずれの由来か不明であった。エキノコックス由来と予想された約 2,300 クローンの中で 1,300 クローン（約 300 クラスターを含む）については遺伝子が予想された。これらの結果は Full-Echinococcus としてインターネットを介して公開している。多数の診断用抗原の候補 cDNA、さらに、ワクチン候補および増殖に関連する遺伝子、石灰小体と関連が予想される Ca 結合性蛋白の cDNA も得られた。5) エキノコックスと並んで重要な人獣共通寄生虫であるトリヒナ（線虫）について、多数のキツネ、タヌキ、アライグマおよびクマの筋肉材料を採取し、筋肉トリヒナの調査を継続した。検出した虫体の DNA 検査により、小樽市以外にも *Trichinella* T9 が分布すること、さらに道東（音更）から *Trichinella nativa*（本邦初）を検出した。なおこれらの *Trichinella* spp. の生物学的性状と生殖隔離についても調べた。

1. 地域住民のベイト散布による感染源対策（小清水）

A. 研究目的

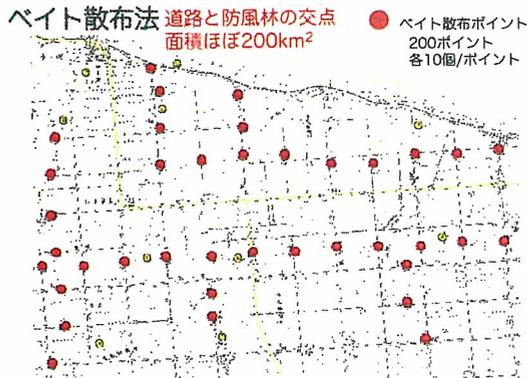
我々は研究レベルにおいて小清水町の農村地帯におけるベイト散布法についてはほぼ確立し、今後の住民による展開に向けて、住民に技術移転を試みた。すなわち、2003 年および 2004 年においてベイト散布を行わず、キツネにおける感染率が上昇した小清水町において、ベイトの散布法およびキツネの

糞便採取法を地域住民（NPO 法人オホーツクの村）に技術移転を試みた。

B. 研究方法

2005 年に NPO 法人オホーツクの村の会員に小清水町全体のベイト散布地点（主に道路と防風林の交点）についてプロットした地図を配布し、ベイト散布法について説明を加えた。その後、小清水町を自動車で同伴して回り、数カ所の地点における散布法を示した。また、キツネ糞便採取ポイントと自動車

からのキツネ糞便発見法および糞便の取り扱いの注意点(虫卵感染の予防)について実地で説明した。2005年には5-11月まで毎月ベイト散布が行われた。キツネの糞便採取は住民によりなされた。2006年度はベイト散布回数を減らして継続し(5-11月隔月-計4回)、8月の糞便採取は奥・巖城が担当することとした。また、2006年に採取された糞便82個についてはMultiplex PCRにより糞主動物の鑑別を行った。

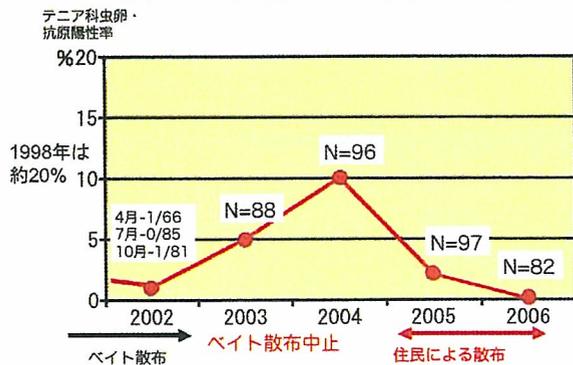


散布回数 5-11月1回/1ヶ月(2005) 5-11月1回/2ヶ月(2006)

C. 研究結果

糞便の抗原・虫卵陽性率は1998年からのベイト散布により2002年では2%程度にまで減少し、2002年以降ベイト散布を2004年まで中止したが、2004年には9%に上昇していた。2005年の5月から11月までの住民による毎月のベイト散布が実施された。その間に8月に採取したキツネの糞便について検査したところ、糞便の抗原および虫卵陽性率が2%に減少し、散布効果が認められた。2006年8月には糞便の抗原陽性率はさらに0%に減少し、より散布効果が認められた。

小清水町 8月に採取した糞便による駆虫効果の判定



これらの採取された糞便82個の糞主動物についてMultiplex PCRにより鑑別を試みたところ、3例は鑑別不可、1例は犬、その他78例がキツネであ

ることが確認された。

D. 考察

小清水では今まで研究者がベイトを散布し、キツネ糞便を採取してきたが、地域住民でもこの作業が可能で、キツネの感染率が抑えられることが示された。今後、小清水では散布回数を減らすことを予定しているが、2005年につづいて2006年にも住民がベイトを散布しても効果があることが確認された。これは(糞便採取地点、ベイト散布地点)を収集していれば、研究者から短時間の住民への講習で、ベイト散布およびキツネの糞便採取は可能であることが示された。すなわち、今後の北海道における感染源対策が専門家のアドバイスがあれば住民で実施可能であることが示唆された。予めその地域についての情報がない地域における試みについては、神谷が別に報告する。

E. 結論

エキノコックス感染源対策(ベイト散布)は予め状況が把握されている小清水では研究者から住民への技術移転が可能であることが示され、また、糞便採取についても可能であることが示された。また、キツネ糞便の肉眼的鑑別の結果がDNAによる鑑別結果とほぼ一致していたことから、小清水町においては、一部犬の混入はあるものの、野外採取糞便の肉眼的な鑑別法の有効性について確認された。

2. 野外のキツネ糞便採取の効率

A. 研究目的

ベイト散布後の駆虫評価のためには、キツネの剖検、ネズミの感染率調査、豚の感染率の調査などもあるが、キツネの糞便採取とその糞便検査が最も実用的と考えられるが、糞便採取がどの程度の労力で可能は示されていない。今後の大規模なベイト散布実施に向けての糞便採取効率についての基礎データが必要と考えられた。地域により、キツネの生息密度は異なることが予想され、糞便採取効率についても当然地域差が予想されるが、例として、全く調査したことのない道南と、既に調査を行ってきた小清水で糞便採取効率を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

野外におけるキツネ糞便採取の効率を調べるために、2006年7月および8月に、道南(21カ所)および小清水町において、自動車(運転者と助手1名)

を利用した道路沿いの糞便採取を行った。道南においては、地図によりキツネの生息しそうな地域を選定し、探索ルートを決定し、その地域を自動車です速走行し、キツネ糞便を探索した。小清水では既に糞便採取地点の記載した地図があるので、それを利用して糞便探索を行った。

C. 研究結果

道南では185km/2台/13時間で65個採取され、自動車1台1時間当たり約2.5個、小清水(既調査地域)では73km/9時間30分/1台で80個採取され、自動車1台1時間当たり約8.4個の効率であった。



自動車道路沿い探索：65個/185km/2台/13時間/21地域
自動車1台1時間当たり 約2.5個

D & E 考察および結論

キツネ糞便の野外採取・糞便検査法による評価法の利点としては、1) その地域内の現存する駆虫キツネの個体群を攪乱しない。したがって周辺の感染キツネの侵入を防ぐ。2) 季節(冬を除く)や場所にはあまり限定されない。3) キツネ捕獲より容易(多数の材料採取可能、より広範囲に採取可能)である。4) ハンター以外の住民でも可能(感染に注意)。5) 剖検のための施設、道職員の関与がなくても調査可能であり、6) 統計学的処理が可能な数の検体が得られることである。

今回の結果から効率よく糞便採取できることが示された。また、糞便採取を回数を重ね、糞便採取ポイントデータを蓄積することにより、より効率的に糞便を採取できることが示唆された。

3. ペットのエキノコックス虫卵排泄前の糞便 DNA 検査による診断法の改善

A. 研究目的

北海道では野生動物において多包条虫症が蔓延し、飼い犬の感染例も報告され、犬を介した人への感染や流行地拡大が危惧されている。現在、犬における多包条虫症の診断は、糞便を用いた虫卵・抗原

検査によるスクリーニング検査と、虫卵が検出された場合には、虫卵 DNA の PCR による鑑別で確定診断が行なわれている。しかし、感染初期においても糞便内抗原は陽性となるが、この間虫卵を排泄しないため確定診断は困難である。我々は2005年には感染後偶発的に糞便とともに排泄される虫体や離脱した片節から、特異プライマー(Emsp1 -A/B)を用いたPCRにより糞便からエキノコックスDNAを検出することを試みたが、検出率がかなり低いが、試験的駆虫後の糞便を用いることにより検出率が改善されることを報告してきた。2006年度は、駆虫しなくても診断できるように、糞便からのエキノコックスDNAの検出感度を高めるために、プライマーとPCR法の検討を行なった。

B & C. 研究方法および結果

(1) 下記のプライマーを用いて比較したところ、COI領域のための改良プライマー(Emsp1-A' /B')と hot start Taq (System 2)、(2) U1snRNA 遺伝子のためのプライマー(UP1/2)と Ampdirect Plus (System1)という2つの組み合わせにより多包条虫DNAの検出感度が高まることがわかった。

プライマー名	Target gene	size (bp)
Em 1/2/3/4 (van der Giessen et al., 1997)	mtDNA 12SrRNA	242
Emsp1-A/B (江越ら, 2002)	mtDNA COI	236
Emsp1-A'/B' (本発表)	mtDNA COI	243
EMH15/17 (Stieger et al., 2002)	mtDNA 12SrRNA	250
UP1/UP2 (Brotagne et al., 1993)	U1 small nuclear RNA	337

次に、これらの検出系を用いて、多包条虫感染初期の犬の糞便から多包条虫DNAの検出を試みた。さらに、多包条虫感染後14日目にプラジクアンテルで駆虫し、感染後21日目に安楽殺した犬と、駆

①非駆虫群

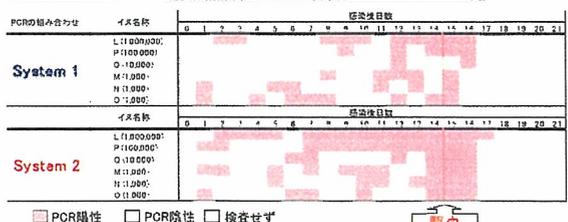
System 2 によるPCR結果



PCR陽性 □ PCR陰性 □ 検査せず イヌ名称の()内は投与原駆虫数を示す。各サンプル2回PCRを行い、1回でも特異的なバンドが検出されたものをPCR陽性とした。
※イヌD、Eに関しては、一部の虫体のみ回収した。

②駆虫群

System 1, System 2 によるPCR結果



イヌP、Qに関しては、感染後14、15、16日目の糞便からは各5つずつDNAを抽出しPCRを行った。5つのうち1つでも特異的なバンドが検出したらPCR陽性とした。

虫せず感染後 21 日目に安楽殺した犬の糞便を毎日継続的に採取し、これらの糞便から QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を検出し、上述の 2 方法を比較した。改良プライマー (Emsp1-A' /B') と hot start Taq (System 2) の系では非駆虫群では感染初期から特異的なバンドがしばしば検出され、プライマー (Emsp1-A/B) を用いたものより検出率は上昇した。駆虫群でも感染初期から特異的なバンドが時折検出されたが、駆虫直後 (1-2 日) の糞便からは全ての犬から多包条虫 DNA を検出することができた。

D & E. 考察と結論

以上のように、今回改良プライマー (Emsp1-A' /B') と hot start Taq を用いることにより、PCR の検出感度が改善され、また感染初期 (虫卵排泄前の期間) の犬の糞便からの多包条虫 DNA の検出率も改善されたが、まだ満足できるものではなく、駆虫と組み合わせることにより、さらに検出率が上昇した。

駆虫薬投与後における DNA 検出率は高いので、抗原検査によるスクリーニングで陽性となったものは、すぐに駆虫し、駆虫後 1-2 日の糞便を用いて DNA による確定診断を行うシステムが可能と考えられる。なお、虫卵の検出されたものについては、虫卵の DNA 鑑別により再確認できる。

4. 多包虫の完全長 cDNA ライブラリー作成

A. 研究目的

寄生虫症対策には、治療薬やワクチン開発および診断法の確立が不可欠である。これらのためには遺伝子解析が有効である。さらに、多包虫 (エキノコックスの幼虫) の活発で特異な発育・増殖様式の解明などさまざまな課題で利用していくために、多包虫の網羅的な完全長 cDNA ライブラリー作成を試みた。なお、現在までいくつかの寄生虫のゲノムプロジェクトが行われてきたが、エキノコックスに関しても今後サンガー研究所で実施されることになっており、我々も完全長 cDNA ライブラリーにより、このゲノム解析をサポートしたいと考えている。

B & C. 研究方法および結果

コトンラットの腹腔から得た多包虫シスト塊を用いて (一部宿主成分を含む)、2005 年には多包虫の完全長 cDNA ライブラリーを V-Capping 法により作成し、約 11,000 のクローンを得た。これらクローンについて予備的に 5' 末端から DNA 配列を解読し、2006 年には解析を開始した。100 塩基以下し

か解読できないクローンが、約 3,000 ほどあり、600 塩基以上解読されたクローンは 6,300 程であった。200 塩基以上解読され約 8,000 クローンについて DNA ホモロジー検索を行ったところ、約 2,300 はエキノコックス由来 (約 600 のクラスターを含む)、2,800 は宿主由来と判断され、残り (約 3,000) は由来が不明であった。エキノコックス由来と予想された約 2,300 の中で 1,300 クローンについては遺伝子が予想された (約 300 クラスターを含む)。多数検出されたクローンについては文末にリストを添付した。診断に使用されている Antigen B8 のサブユニット (EmAgB8/1、2、3、4) のクローンがたくさん (計 223 クローン) 得られ、他の診断抗原候補分子のクローンも多数見られ、ワクチン候補 (Eg95-5) なども得られた。増殖に関連する 14-3-3 (計 24 クローン) などの cDNA も得られた。なお、多包虫では石灰小体を多く含むことが特徴であるが、Ca 結合性の蛋白 (32 クローン) も得られた。他の多く含まれたクローンとしては、リーボソーム蛋白 (計約 200)、Large subunit rRNA (67 クローン)、GAPDH (39 クローン)、Actin (計 33 クローン)、Heat shock protein (計 33 クローン) などであった。なお、エキノコックスでは Spliced leader が報告されているが、これらの頻度は低く、83 クローンの 5' 末端にこれらの配列が見られたのみであった。これらの結果は Full-Echinococcus としてインターネットを介して公開している。

D. 考察

まず、多包虫の活発な増殖活性を解析するためには、好適な中間宿主のシスト塊材料を用いることが重要と考えた。原頭節を分離することも行われているが、原頭節は将来成虫の頭部となるもので、これ自体は増殖せず、今回の目的にはシスト塊が最も適していると考えた。

今回、膨大な数のライブラリーが得られ、現在解析を始めたばかりであるが、コトンラット由来のシスト塊を用いたことにより宿主由来と寄生虫由来の判断が困難になっているクローンが多く含まれた。すでにマウスの全ゲノムが解読されていることから、宿主由来 mRNA は容易に除外可能と予想したが、意外と困難であることが判明した。また、宿主細胞の混入は少ないと考えられるが、作成されたライブラリーからは半分および半分以上が宿主のコトンラット由来であることが予想される。今後はマウス由来の多包虫および成虫を用いたライブラリーの作成を計画している。いずれにしても、現在の多包虫の cDNA 解析により多数の (おそらく 3,000-4,000) 多包虫の完全長 cDNA の全塩基が解読され、その後それらの機能についての解析が進むことが期待される。