

が必要である。本研究では最終的に4グループのハンタウイルスについてそれぞれ血清診断法および遺伝子診断法を開発し、病原巣動物の解明につなげることを目的としている。ネズミ亜科由来のグループについては、これまでの研究で血清診断法により鑑別システムがほぼ完成しており、今回の遺伝子診断法のプライマー設定で血清診断のみならず、ゲノム検出による遺伝子型鑑別も可能になった。また、組織からの検出効率および非特異増幅の有無など検討すべきことは残っているものの、現在このプライマーをげっ歯類の疫学的検討にも試用しており、現在のところ良い結果を得ている。一方ハタネズミ亜科のウイルスについては遺伝子情報は多く得られるものの、限られた株のウイルスしか日本国内に存在しない上、確実なハタネズミ陽性血清も無かった。今回陽性血清を、ハタネズミに対する実験接種で得られたことは、血清診断法開発を推し進める上で有用であると考えられる。このグループについてもプライマー設定をすることができるが、ウイルスおよび遺伝子が無いため、PCR 検出の評価が困難である。同様の材料の不足は南米・北米由来ウイルスでも顕著である。これらを打開するため、海外の研究施設との連携を深める必要がある。

食虫類由来ウイルスは、ここ数ヶ月急速に遺伝子情報が公開され、アフリカ・北米・アジア・欧州に新たなグループの食虫類由来ウイルスが存在することが明らかになってきた。このため、新たなプライマー設定の可能性が開かれてきた。今後も情報収集を続け、診断法開発のための材料の入手に努力する必要があると考えられる。

E. 結論

ハンタウイルスはその病原巣動物によって、ネズミ亜科由来、ハタネズミ亜科由来、新世界ネズミ由来、および食虫類由来ウイルスの4つのグループに分けられ、その抗原型、遺伝型の多様性から診断法はそれぞれのグループについて確立する必要である。しかしながら近年の疫学的調査・解析から近い将来より多くのグループが報告されると予想される。それらについて情報を収集し、迅速に診断法を準備して行くことが、新興感染症としての人獣共通感染症対策に必要であると考えられる。

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

1.論文発表

- 1) Kariwa, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L.I., Iwasaki, T. and Takashima, I.: A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia. *Jpn. J. Vet. Res.* 54(4): 145-161, 2007
- 2) Matsuura, Y., Suzuki, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., Yokoyama, M., Igota, H., Yamauchi, K., Ishida, S., Fukui, D., Bando, G., Kosuge, M., Tsunemitsu, H., Koshimoto, C., Sakae, K., Chikahira, M., Ogawa, S., Miyamura, T., Takeda, N. and Li, T. C.: Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus Nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152:1375-1381, 2007

- 3) Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Araki, K., Okumura, M., Nakamura, I., Kajino, K., Arikawa, J.: Analysis of the immune response of Hantaan virus nucleocapsid protein-specific CD8+ T cells in mice. *Virology sep1*: 365(2) 292-301, 2007
- 4) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Truong, U.T., Truong, U.N.: Hantavirus Infection-typical rodent-borne viral zoonosis. *Tropical Medicine and health* 35(2) 55-59, 2007
- 5) Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Arikawa J.: hantavirus infection in East Asia. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 30, 341-356, 2007
- 6) Bin Abu Daud, N.H., Kariwa, H., Tanikawa, Y., Nakamura, I., Seto, T., Miyashita, D., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I.: Mode of Infection of Hokkaido Virus (Genus Hantavirus) among Grey Red-Backed Voles, *Myodes rufocanus*, in Hokkaido, Japan. *Microbiol. Immunol.* 1081-1090, 2007
- 7) Chandy, S., Yoshimatsu, K., Ulrich, R.G., Mertens, M., Okumura, M., George, R.P., John, T., Balraj, V., Muliyl, J., Mammen, J., Abraham, P., Arikawa, J., Sridharan, G.: Seroepidemiological study on hantavirus infections in India: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102(1) 70-74, 2008
- 8) 有川二郎：ハンタウイルス肺症候群，日本臨床，65巻，増刊号3：126-130，2007
- 9) 有川二郎：腎症候性出血熱，日本臨床，65巻，増刊号3：112-116，2007
- 2.学会発表
- 2) 有川二郎：腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)-げっ歯類媒介性の人獣共通感染症：第54回日本実験動物学会総会(2007.5)
- 3) 山本博、李天成、伊藤薫、越本知大、宮下信和泉、有川二郎、八神健一、他：国動協および公私動協傘下の動物実験施設において動物実験に用いられたサルおよびブタのHEV感染調査：第54回日本実験動物学会総会(2007.5)
- 4) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Kariwa H.: Epidemiology and Epizootiology of Hantavirus Infection in East Asian Countries. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
- 5) Yoshimatsu, K., Taruishi, M., Kariwa, H., Arikawa, J.: Studies on Structure and Function of N and GP of □Hantaan Virus. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
- 6) Kariwa, H., Tanikawa, Y., Abu Daud, N.H., Lokugamage, N., Lokugamage, K., Seto, T., Miyashita, D., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., Nakauchi, M., Takashima, I.: Animals Models for Puumaka Virus Infection Using Several Rodent Species of Laboratory Animal. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
- 7) Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Araki, K., Okumura, M., Nakamura, I., Kajino, K.,

- Arikawa, J.: Pathological and immunological analysis of the experimental model mice of the Hantaan virus infection. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
- 8) Okumura, M., Yoshimatsu, K., Kumperasart, S., Nakamura, I., Ogino, M., Taruishi, M., Sungdee, A., Pattamadilok, S., Ibrahim, I.N., Erlina, S., Agui, T., Yanagihara, R., Arikawa, J.: Studies of Thottapalayam Virus: a Hantavirus Isolated from Shrew. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
- 9) Kariwa, H., Seto, T., Tanikawa, Y., Nakamura, I., Hashimoto, N., Abu Daud, N.H., Nakauchi, M., Miyashita, D., Evgeniy A. Tkachenko, Leonid I. Ivanov, Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.: Epidemiological Study of Hantavirus Infections in Volga-Side Federal Region, Russia. 41st Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program: Virology Panel Meeting. Baltimore, MD (2007. July 24-25)
- 10) 吉松組子、垂石みどり、有川二郎：ハンタウイルスエンベロープ糖タンパク G2 の細胞外ドメインに関する研究、第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10)
- 11) 垂石みどり、吉松組子、エルデネサイハン テグシドーレン、有川二郎：ハンタウイルス持続感染モデルマウスにおけるウイルス特異的 T 細胞の解析、第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10)
- 12) エルデネサイハン テグシドーレン、吉松組子、垂石みどり、有川二郎、石原智明：ホンドネズミ (*Microtus montebelli*) の Puumala 型ハンタウイルスおよび Tula 型ハンタウイルスに対する感受性に関する研究、第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10)
- 13) 瀬戸隆弘、苅和宏明、谷川洋一、吉松組子、中村一郎、宮下大輔、中内美名、好井健太郎、有川二郎、高島郁夫：ロシアのボルガ川流域におけるハンタウイルス感染症の疫学的研究、第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10)
- 14) 宮下大輔、苅和宏明、瀬戸隆弘、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：メキシコの野生げっ歯類におけるハンタウイルス感染症の疫学調査、第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10)
- 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

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

国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断法等の研究

Q 熱の診断と疫学

分担研究者 福士 秀人 岐阜大学応用生物科学部 教授

研究要旨:野生げっ歯類における *Coxiella burnetii* 抗体保有状況を調査した。北海道で 2004 年から 2005 年に捕獲されたエゾヤチネズミ *Myodes rufocanus* 87 検体およびアカネズミ *Apodemus speciosus* 18 検体について間接蛍光抗体法により検索した。その結果, *M. rufocanus* 69/87 (79%), *A. speciosus* 10/18 (56%)が抗体陽性であった。一方, 新たな抗体検出系を確立するため *C. burnetii* 日本分離株外膜蛋白質 *com1* 遺伝子をクローニングした。クローニングした *com1* 遺伝子はヒスチジンタグおよび glutathione S-transferase 融合蛋白質発現ベクター-pColdI および pGEX-6P にそれぞれサブクローニングした。今後, 診断用抗原としての有用性を検討する予定である。

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。野外ではダニが媒介動物となり野生のげっ歯類との間で感染環が成立していると推測されているが, 我が国における実態は不明である。ヒトは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。感染症法では4類に指定され, 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 例が届け出られてきたが, ここ数年は届け出数が一桁台となっている。届け出数が減少している理由は不明であるが, 血清診断や病原体検索が確立されていない事も一因となっている可能性がある。本年度は我が国の

野生げっ歯類における *C. burnetii* 抗体保有状況を明らかにするとともに, 新たな抗体検出系を確立するため, *C. burnetii* 外膜蛋白質 *com1* 遺伝子のクローニングを行った。

B. 研究方法

[被検血清]北海道で 2004 年から 2005 年に捕獲されたエゾヤチネズミ *Myodes rufocanus* 87 検体およびアカネズミ *Apodemus speciosus* 18 検体を苅和博士より分与を受け, 検索に用いた。

[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。16 倍以上を陽性とした。

[*com1* 遺伝子クローニング]日本分離株(406 株)のゲノム DNA を鋳型として *com1* 遺伝子を PCR 増幅した。増幅産物を pGEM T-easy ベクターにクローニングした後, pColdI および pGEX-6P にサブクローニングした。

(倫理面からの配慮について)

今回の研究における野生げっ歯類の血清の使用について倫理面での問題はない。

C. 研究結果

1. 野生げっ歯類における *C. burnetii* 抗体

M. rufocanus 69/87 (79%), *A. speciosus* 10/18 (56%)が抗体陽性であった。抗体価の分布をみると *M. rufocanus* は 16 倍 16 検体, 64 倍 29 検体, 128 倍 4 検体, 256 倍 13 検体, 512 倍 6 検体および 2048 倍 1 検体であったが, *A. speciosus* は 16 倍 6 検体および 64 倍 4 検体であった。地域や年による陽性率の偏りは見いだされなかった。

2. コクシエラ外膜蛋白質のクローニング

新たな抗体検出系を確立するため *Coxiella burnetii* 日本分離株外膜蛋白質 *com1* 遺伝子をクローニングした。クローニングした *com1* 遺伝子はヒスチジンタグおよび glutathione S-transferase 融合蛋白質発現ベクター pColdI および pGEX-6P にそれぞれサブクローニングした。それぞれの発現クローンについて抗原性の検討を行っている。

E. 結論

我が国の野生げっ歯類が高率に *C. burnetii* 抗体を保有している事が明らかになった。我が国における Q 熱の疫学は不明な点が多い。今回の結果からげっ歯類が Q 熱の伝播に関与している可能性が示唆された。また, 外膜蛋白質を発現ベクターにクローニングすることができた。この組換え抗原を用い, Q 熱の抗体検査系の確立を行った。

J. 健康危険情報

なし

K. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 蔡燕, 野村彩朱, 矢野竹男, 中尾義喜, 福士秀人 Q 熱コクシエラ抗体スクリーニング検査法の改良. 獣医畜産新報, 60:374-375, 2007

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

国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断法等の研究

バルトネラ感染症の疫学

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：2005年8月に北海道札幌市周辺で捕獲した野鼠とそれらに寄生していたネズミノミから *Bartonella* の分離およびその DNA 検出を行い、この地域の野鼠における *Bartonella* の保有状況と野鼠間の伝播にネズミノミが関与する可能性について検討した。北海道の野鼠は *Bartonella* 属菌を 67.9% (36/53) と高率に保有していることが明らかとなった。ネズミノミが寄生していた野鼠と同一の *Bartonella* 属菌 DNA を保有していたことから、ネズミノミが本菌のベクターである可能性が示唆された。また、アカネズミからは *B. grahamii* および *Bartonella*. sp が分離されたのに対し、寄生していたネズミノミから *B. grahamii*, *B. taylorii* が検出されたことから、アカネズミと *B. grahamii* との間には宿主特異性があると考えられた。さらに、ネズミノミの血リンパ液および卵巣から *Bartonella* 属菌の DNA が検出されたことから、*Bartonella* 属菌はノミの中腸から体腔に分布したことが示唆された。今後、本菌のノミ体内における経卵伝播の可能性についても検討する必要があると思われる。

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 亜種が報告されている。特に、齧歯類を自然病原巣とする *Bartonella* のうち *B. grahamii* が視神経網膜炎、*B. elizabethae* と *B. washoensis* が心内膜炎、*B. vinsonii* subsp. *arupensis* が心内膜炎と発熱をそれぞれ人に引き起こすことが知られている。また、多くの *Bartonella* 属菌の伝播にノミやダニなどの吸血性節足動物が関与していると考えられているが、齧歯類間の伝播におけるベクターについて詳細に検討した

報告はない。そこで本研究では、北海道の野鼠とそれらに寄生していたネズミノミの諸器官における *Bartonella* の分布について細菌学的・分子生物学的に検討するとともにネズミノミが各野鼠間における *Bartonella* のベクターとして関与する可能性について検討した。

B. 研究方法

2005年8月に北海道札幌市で捕獲した野鼠 53 頭（アカネズミ 31 頭、ヒメネズミ 5 頭、エゾヤチネズミ 17 頭）から採取し -80°C で保存していた血液、野鼠の体表から採取し -80°C で保

存していたネズミノミ 40 匹 (*Ctenophthalmus congener truncus* 32 匹, *Hystriehopsylla microti* 3 匹, *Neopsylla sasai* 5 匹) を本研究に用いた。

野鼠の血液は解凍後 5%ウサギ血液加 Heart Infusion Agar (HIA) 培地に塗沫し, 35°C, 5% CO₂ 下で 2 週間 *Bartonella* の分離培養を行った。

野鼠から採取したノミはエタノール洗浄後, 中腸, 血リンパ液, 卵巣の各器官に分離した。分離株とネズミノミの各器官から DNA を抽出し, *rpoB*, *gltA* の各遺伝子領域を標的とした PCR により *Bartonella* DNA を検出した後, ダイレクト DNA シーケンス法により塩基配列を決定し, 既存種と比較して種の同定を行った。

C. 研究結果

今回検討した野鼠の *Bartonella* 保菌率は 67.9% (36/53) であった。野鼠別の保菌率はアカネズミで 93.5% (29/31), ヒメネズミで 60.0% (3/5), エゾヤチネズミで 23.5% (4/17) であった。*Apodemus* 属のネズミから分離された *Bartonella* 属菌の 75.0% (24/32) は *B. grahamii*, 25.0% (8/32) は *Bartonella* sp. であった。また, *Apodemus* 属からは *Ctenophthalmus congener truncus* と *Neopsylla sasai* が採取され, それぞれの *Bartonella* 遺伝子陽性率は 44.0% (11/25), 40.0% (2/5) であった。*Ctenophthalmus congener truncus* からは *B. taylorii* が 72.7% (8/11), *B. grahamii* が 27.3% (3/11), *Neopsylla sasai* からは *B. grahamii* のみ (2/2) が検出された。一方, エゾヤチネズミからは *B. taylorii* のみが分離された。また, エゾヤチネズミからは *Ctenophthalmus congener truncus*, *Hystriehopsylla microti* が採取され, このうち, *Ctenophthalmus*

congener truncus から *B. taylorii* のみ 42.9% (3/7) が検出された。*Bartonella* DNA が検出されたネズミノミ 16 匹における各器官別の *Bartonella* DNA は, 中腸のみが 43.8% (7/16), 中腸・血リンパが 18.8% (3/16), 中腸・血リンパ・卵巣が 6.3% (1/16), 中腸・卵巣が 31.3% (5/16) であった。

E. 結論

北海道に生息する野鼠は *Bartonella* を高率に保有していることが判明した。特に, アカネズミ分離株の 75% は人に病原性を有する *B. grahamii* であったことから, 本野鼠はバルトネラ症の病原巢の一つとして注目していく必要があると思われた。

Bartonella が分離された野鼠 36 頭のうち 5 頭において, 野鼠分離株と寄生ノミの *Bartonella* DNA が一致したことから, ネズミノミが野鼠間のベクターである可能性が示唆された。特に, アカネズミからは *B. grahamii* および *Bartonella* sp. が分離されたのに対し, アカネズミに寄生していたネズミノミから *B. grahamii*, *B. taylorii* が検出された。これより, アカネズミと *B. grahamii* との間には, 宿主特異性があり, *B. taylorii* はネズミに感染してもその体内から速やかに排除されたものと考えられた。また, ネズミノミの血リンパ液および卵巣から *Bartonella* DNA が検出されたことから, *Bartonella* は中腸から体腔に分布したことが示唆された。また, 卵巣から *Bartonella* DNA が検出されたことから, 今後本菌がノミ体内で経卵伝播する可能性について, 検討する必要があると思われた。

L. 健康危険情報

なし

M. 研究発表

1.論文発表

- 3) Kosoy, M., Morway, C., Sheff, K. W., Ying Bai, Colborn, J., Chalcraft, L., Dowell, S. F., Peruski, L. F., Maloney, S. A., Baggett, H., Sutthirattana, S., Sidhirat, A., Maruyama, S., Kabeya, H., Chomel, B. B., Kasten, R., Popov, V. Robinson, J., Kruglov, A., and Petersen, L. R. : *Bartonella tamiae* sp. nov., a Newly Recognized Pathogen Isolated from Three Human Patients from Thailand. J. Clin. Microbiol. 46:772-775, 2008.
- 4) 丸山総一：吸血昆虫と新興感染症，ダニと新興再興感染症，267-276，2007（株）全国農村教育協会，東京

2.学会発表

- 15) 井上 快, 丸山総一, 壁谷英則, 山田直之, 川端寛樹：わが国の小型哺乳類に分布する *Bartonella* 属菌：第 36 回 日仏獣医学会, 恵比寿(2007, 2)
- 16) 井上 快, 壁谷英則, Kosoy, M. Y., Ying, B., Smirnov, G, McColl, D., Artsob, H., 丸山総一：野鼠由来 *Bartonella grahamii* の遺伝的多様性と地理的分布の関係, 第 144 回 日本獣医学会, 山口 (2007. 8)

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

国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断法等の研究

Salmonella ならびに病原性 *Yersinia* の迅速遺伝子診断法の開発

分担研究者 林谷秀樹 東京農工大学大学院・准教授

研究要旨： *Salmonella* の迅速な同定と生物型別を同時に行うことを目的として、*Salmonella* に特異的な病原遺伝子ならびに糖の脱水素酵素など生化学的性状に関与する形質の遺伝子などを標的とした multiplex PCR 法を開発し、その有効性を検討した。その結果、今回開発した multiplex PCR 法により、供試した *Salmonella* はいずれも本属菌特異的な *invA* 遺伝子が増幅され、*Salmonella* と同定することが可能であった。さらに、5 つの標的遺伝子が生物群ごとに 1~4 個増幅され、そのバンドパターンにより生物群ごとの型別が可能であった。また、*Yersinia pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica*、ならびに病原性 *Y. enterocolitica* のうち、最も病原性の強い“American Strains”が同時に迅速かつ簡便に検出できる multiplex PCR 法の開発を試みた。その結果、開発した multiplex PCR 法により、*Y. pseudotuberculosis* および病原性 *Y. enterocolitica*、ならびに“American Strains”が同時に検出することが可能であった。以上のように、本研究で開発した *Salmonella* または病原 *Yersinia* を検出できる multiplex PCR 法は、これら病原菌の迅速かつ簡便な検出に有用な遺伝子診断法であると思われた。

A. 研究目的

Salmonella は代表的な人獣共通感染症または食中毒の起原因菌として知られており、生化学的性状により 2 種 6 亜種（生物群）に分類されている。哺乳類や人から分離される *Salmonella* の生物群は I 群が多いが、環境や爬虫類などからは I 群以外の生物群が高頻度に分離され、これらの生物群は市販の抗血清では血清型別ができない菌株が多い。したがって、これらの菌株の菌種以下の型別に

は生物群の同定が最も有用であるが、生物型別には多数の培地を必要とし、煩雑で時間も要する。本研究では *Salmonella* の同定と生物型別を同時に行うことを目的とし、*Salmonella* に特異的な病原遺伝子ならびに糖の脱水素酵素など生化学的性状に関与する形質の遺伝子などを標的とした multiplex PCR 法を開発し、その有効性を検討した。

Yersinia も *Salmonella* 同様、代表的な人獣共通感染症のひとつとして知られている。病

原性 *Yersinia* には、*Y. pseudotuberculosis* と *Y. enterocolitica* があり、*Y. enterocolitica* では、03、04、32、05、27、08、09、013a、13b、018 および 020 の 9 血清群が病原性を有することが明らかになっている。このうち、04、32、08、013a、13b、018 および 020 の 5 血清群は“American Strains”と呼ばれ、北米を中心に分布することが知られている強毒な血清群である。これら“American Strains”は、ペスト菌のようにノミやダニを媒介して感染する可能性が指摘されている。そこで、本研究では、*Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica*、さらに“American Strains”が迅速かつ簡便に検出できる multiplex PCR 法を開発し、その有効性を検討した。

B. 研究方法

1. *Salmonella* の迅速同定・生物型別法の開発

1) 供試菌株

供試菌株として *S. enterica* 生物群 I-VI および *S. bongori* を含む *Salmonella* 53 株ならびに *Escherichia coli* などの非 *Salmonella* 属菌 5 株、計 58 株を用いた。

2) Multiplex PCR 法

供試菌株は LB broth に接種し、37°C で 18 時間培養後、市販キットを用いて鋳型となる DNA を抽出した。標的遺伝子として、*Salmonella* 属に特異的な *invA* 遺伝子ならびに生化学的性状などに関与する 5 種の遺伝子 (*fljB*: 第 2 相鞭毛、*gatD*: ガラクチト-

ル 1 リン酸脱水素酵素、*mdcA*: マロン酸脱炭酸酵素、*stn*: サルモネラエンテロトキシン、STM4057: 細胞膜タンパク) を選択した。そして、それぞれの遺伝子を増幅するためプライマーを作製した。作製したプライマーにより、*invA* では 244bp、*fljB*: では 848bp、*gatD* では 501bp、*mdcA* では 728bp、*stn* では 179bp ならびに STM4057 では 137bp のバンドが増幅される。抽出した DNA を用いて、まず、作製したプライマーの特異性を monoplex PCR 法で確認した後、次に 6 つの遺伝子に対するプライマーを用い、multiplex PCR 法を行った時の最適な条件を検討した。なお、増幅産物は 2.5% アガロースゲル中で電気泳動を行い、その後ゲルをエチジウムブロマイド溶液で染色し、UV で可視化後バンドパターンを確認した。また、multiplex PCR 法で得られた成績は生化学性状試験による生物型別の成績と比較した。

2. 病原性 *Yersinia* の迅速診断法の開発

1) 供試菌株

供試菌株として、病原性 *Yersinia enterocolitica* 血清型 03、04、32、05、27、08、09、013a、13b、018、020 および 021 ならびに *Yersinia pseudotuberculosis* 21 血清群 (6 亜群を含む) の計 30 菌株と *Escherichia coli* などの非 *Yersinia* 属菌 5 株の計 35 菌株を用いた。

2) Multiplex PCR 法

供試菌株は LB broth に接種し、25°C で 48 時間培養後、市販キットを用いて鋳型となる DNA を抽出した。標的遺伝子として、病原性 *Y. enterocolitica* の染色体 DNA 上に特異的

に存在し、組織への付着、および補体の殺菌作用に対する抵抗性に関与する遺伝子である *ail*、ならびに“American Strains”に特異的な遺伝子である *irp2* 遺伝子、および *Y. pseudotuberculosis* の染色体 DNA に特異的に存在し、腸管の粘膜上皮への侵入に関与する *inv* 遺伝子を用いた。そして、これらに特異的に増幅するプライマーを作製し、抽出した DNA を用いて、Multiplex PCR を行い、最適な条件を検討した。

C. 研究結果

1. *Salmonella* の迅速同定・生物型別法

6 つの標的遺伝子がすべて増幅される Multiplex PCR の最適な条件は、95°C で 10 分間維持した後、95°C で 1 分、60°C で 1 分間および 72°C で 1 分間のサイクルを 40 サイクル反復し、最後に 72°C で 15 分間の伸長反応を行うものであった。この条件での Multiplex PCR により、供試した *Salmonella* 53 株はいずれも *invA* 遺伝子が増幅され、*Salmonella* と同定することが可能であった。また、供試した非 *Salmonella* では増幅は認められなかった。また、供試した *Salmonella* の各生物群は *fljB*、*gatD*、*mdcA*、*stn* および STM4057 の 5 つの遺伝子のうち、1~4 個の遺伝子が増幅され、そのバンドパターンにより生物群ごとに 7 タイプに型別された。この multiplex PCR 法により、供試した 53 株中 50 株 (94.3%) は PCR 法による生物型別と生化学性状試験による生物型別の成績が一致した。PCR 法による生物型別と生化学性状試験による生物型別の成績が一致しなかつた

のは生物群 II の 3 菌株で、うち 1 菌株はマロン酸脱炭酸酵素遺伝子が増幅されなかったため生物群 VI に型別され、1 菌株も同様にマロン酸脱炭酸酵素遺伝子が増幅されず、さらにサルモネラエンテロトキシンの遺伝子も検出されなかったため生物群 V に型別された。これらの 2 菌株はマロン酸の利用が他の菌株と比べて遅い菌株であった。また、残りの 1 株は生物群 I に特異的な STM4057 遺伝子が増幅されたため、いずれの生物群にも型別されなかった。なお、生物群 V 及び VI は極めて分離頻度の低い生物群であるので、multiplex PCR 法によりこれらの生物群のパターンを示した際にはマロン酸利用能試験を行えば、誤同定を防ぐことが可能と考えられた。また、*Salmonella* の生物型別には、生化学的性状試験では最低 2 日間は必要であるが、今回開発した multiplex PCR 法では 7~8 時間で可能であった。これらのことから、今回開発した multiplex PCR 法は、*Salmonella* を迅速に同定でき、同時に生物群の同定も可能な有益な遺伝子診断法であると思われた。

2. *Yersinia* の迅速遺伝子診断法の開発

3 つの標的遺伝子がすべて増幅される Multiplex PCR の最適な条件は、95°C で 10 分間維持した後、95°C で 15 秒、60°C で 30 秒および 72°C で 30 秒のサイクルを 25 サイクル反復し、最後に 72°C で 10 分間の伸長反応を行うものであった。供試した *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* 30 菌株は、今回開発した Multiplex PCR 法により、*Y. pseudotuberculosis* では、183bp

のバンドが、病原性 *Y. enterocolitica* では 351bp のバンドが増幅され、バンドの大きさから 2 菌種の同定は可能であった。さらに病原性 *Y. enterocolitica* のうち、American Strains の 5 血清群では、351bp に加え、280bp のバンドが増幅され、03、05、27 および 09 の弱毒な血清群 (European Strains) と識別が可能であった。

現在、American Strains の血清群のうち、08 は近年、我が国で人、ノネズミ、サルなどから分離され、我が国に分布することが明らかにされているが、それ以外の 04、32、013a、13b、018 および 020 の 4 血清群はこれまで我が国での分離例はみられない。しかし、今後、これらの血清群菌は北米から我が国に持ち込まれる可能性があり、警戒が必要である。本研究で開発した multiplex PCR 法は、*Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica* を同時に検出でき、さらに病原性 *Y. enterocolitica* のうち、今後我が国への侵入が危惧される強毒な American Strains を検出できる有益な遺伝子診断法と思われる。現在、さらに、同じ遺伝子を標的にした Real-time PCR 法による病原性 *Yersinia* の迅速遺伝子診断法の系を開発中である。

D. 結論

今回研究により、*Salmonella* では本菌属の同定と生物型別が同時に可能な multiplex PCR 法が、また *Yersinia* では *Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica*、ならびに病原性

Y. enterocolitica のうち、最も病原性の強い “American Strains” が同時に検出することが可能な multiplex PCR 法が開発できた。本研究で開発した multiplex PCR 法は、これら病原菌の迅速かつ簡便な検出に有用な遺伝子診断法であると思われた。

F 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Iwata, T., Une, U., Okatani, A. T., Kato, Y., Nakadai, A., Lee, K., Watanabe, M., Taniguchi, T., Elhelaly, A. E., Hirota, Y., Hayashidani, H. : Virulence characteristics of *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from breeding monkeys in Japan. *Vet. Microbiol.* 2008 (印刷中)

2) 中臺文, 塩谷亮, 加藤行男, 黒木俊郎, 岩田剛敏, 廣田好和, 林谷秀樹: 家庭で飼育されている爬虫類におけるサルモネラの保有状況, *獣畜新報* 60, 386-387, 2007.

3) 岡谷友三アレシヤンドレ, 加藤行男, 林谷秀樹: 豚丹毒 —古くて新しい人獣共通感染症—, *モダンメディア* 53:231-237, 2007

2. 学会発表

1) 李謙一, 中臺文, 岩田剛敏, 廣田好和, 林谷秀樹: Multiplex PCR 法による *Salmonella* の生物型別, 第144回日本獣医学学会、江別 (2007.9)

- 2) 林谷秀樹, 松本周, 又吉正直, 岩田剛敏, 中臺文, 佐伯和美, 馬場浩, 吉田信一郎, 廣田好和: 沖縄県由来 *Salmonella Weltevreden* の分子遺伝子型別, 第144回日本獣医学学会, 江別 (2007. 9)
- 3) 岩田剛敏, 松本周, 李謙一, 宇根有美, 廣田好和, 林谷秀樹: マウスにおける *Yersinia pseudotuberculosis* の感染防御抗原の検討, 第144回日本獣医学学会, 江別 (2007. 9) .
- 4) 李謙一, 中臺文, 岩田剛敏, 廣田好和, 林谷秀樹: アライグマおよびハクビシンにおける人獣共通感染症原因菌の保有状況, 第7回人と動物の共通感染症研究会学術集会, 東京 (2007. 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

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

国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断法等の研究

Loop-Mediated Isothermal Amplification 法を用いたサル痘ウイルス遺伝子増幅によるサル痘
迅速診断法: 西アフリカ型およびコンゴ盆地型サル痘ウイルスの鑑別を含めて

分担研究者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第1部第3室・室長
	飯塚愛恵	国立感染症研究所ウイルス第1部・実習生
	網 康至	国立感染症研究所実験動物管理室・主任研究官
	永田典代	国立感染症研究所感染病理部・主任研究官
	長谷川秀樹	国立感染症研究所感染病理部第2室・室長
	森川茂	国立感染症研究所ウイルス第1部第1室・室長

研究要旨: サル痘ウイルスは、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二本鎖 DNA ウィルスで、霊長類において天然痘様の急性発疹性疾患(サル痘、ヒトサル痘)を引き起こす。サル痘ウイルスはコンゴ盆地型と西アフリカ型に分類され、コンゴ盆地型の病原性が西アフリカ型のそれよりも高い。本研究では、迅速・簡便に、しかも定量的に遺伝子を検出する方法として開発された Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を、サル痘ウイルス感染症の診断に応用した。コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルス遺伝子とともに検出する LAMP 法 (COM-LAMP) に用いるプライマー、西アフリカ型を特異的に検出する LAMP 法 (W-LAMP) 用プライマー、および、コンゴ盆地型を特異的に検出する LAMP 法 (C-LAMP) 用プライマーは、それぞれ、両型に存在する A-type inclusion body (ATI) 遺伝子、コンゴ盆地型にのみ存在する D14L 遺伝子、そして、を ATI 遺伝子内で西アフリカ型にのみ存在する塩基配列を標的領域として設計された。今回開発された LAMP 法の診断における感度と精度を、種々の程度のサル痘症状を示すカニクイザル (5 頭; 4 頭はコンゴ盆地型サル痘ウイルス感染、1 頭は西アフリカ型サル痘ウイルス感染) から経時的に採取された末梢血液および咽頭ぬぐい液を検体として、高感度遺伝子検出法である nested PCR と比較して検討した。COM-LAMP の感度 (LAMP 陽性検体数 / nested PCR 陽性検体数) と精度 (LAMP 陰性検体数 / nested PCR 陰性検体数) は、それぞれ 30/36 (83%) および 26/26 (100%) であった。また、C-LAMP では高い感度と精度でコンゴ盆地型サル痘ウイルスのみが、W-LAMP では西アフリカ型サル痘ウイルスのみが検出された。さらに、サル痘症状が重い個体ほど、ウイルス血症

レベルが高く、その持続期間も長かった。COM-LAMP、C-LAMP、W-LAMP を診断法として用いることにより、型特異的サル痘ウイルス感染症の診断が可能となり、かつ、定量的にウイルス血症レベルを測定できることから、これらの診断法は、ヒトサル痘の病勢、予後、疫学的診断にも有用と考えられる。

A. 研究目的

サル痘は、サルにおける天然痘様疾患として 1958 年に初めて報告され、その病原体はサル痘ウイルスであることが明らかにされた。サル痘ウイルスは、天然痘の病原体（痘瘡ウイルス）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 2 本鎖 DNA ウイルスである。1970 年には、ヒトのサル痘ウイルス感染症（ヒトサル痘）がコンゴ民主共和国（旧ザイール）において天然痘様疾患としてはじめて報告された。ヒトサル痘は、中央および西アフリカにおいて流行しており、現在でもコンゴ民主共和国やスーダンなどで流行している。サル痘ウイルスはコンゴ盆地型と西アフリカ型に分類され、前者の病原性は後者のそれよりも高く、コンゴ盆地型サル痘ウイルスによるヒトサル痘では致死的な場合もある。

2003 年に、アメリカ合衆国において、ヒトサル痘がアフリカ大陸以外で初めて流行した。この流行は、ペット用に輸入されたげっ歯類がサル痘ウイルスに感染していて、そのげっ歯類から、同時に、かつ、同一個所で飼育されていたプレーリードッグに感染が広がり、感染プレーリードッグからさらにヒトへ感染したことによる。このことは、ヒトサル痘は輸入感染症のひとつであることを示している。また、ヒトサル痘の臨床症状は天然痘と類似し

ているため、天然痘によるバイオテロの脅威に直面している現在、天然痘との鑑別診断の重要性が指摘されている。

従来、サル痘の実験室診断には、電子顕微鏡によるウイルス粒子検出、免疫病理組織学的検査によるウイルス抗原検出、ウイルス分離、PCR などが用いられてきた。サル痘を特異的に診断するには、ウイルスを分離・同定するか、サル痘ウイルス遺伝子を特異的に検出する必要がある。これまでサル痘ウイルス遺伝子を特異的に検出する方法として、PCR や定量的リアルタイム PCR などの遺伝子増幅法が開発されている。

近年開発された Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法は、標的遺伝子に対して 4 ないし 6 種類のプライマーを設定し、鎖置換型 DNA 合成酵素による鎖置換反応を利用して一定温度で遺伝子を増幅する方法である。LAMP 法では、検体、プライマー、鎖置換型 DNA 合成酵素、基質等を混合し、一定温度（65°C 付近）で反応させることによって DNA 合成が進み、検出までの工程を 1 ステップで行うことができる。増幅効率が高いことから標的遺伝子を 15 分～1 時間で約 10^{10} 倍に増幅することが可能である。そこで、本研究では、LAMP 法によるサル痘ウイルス遺伝子の検出システムを用いたサル痘診断法を開発した。さらに、コンゴ盆地型と西アフリカ

型のサル痘ウイルスを、それぞれ特異的に検出するシステムも開発した。

B. 研究方法

- 1) ウイルスと細胞. 国立感染症研究所に保管されている、コンゴ盆地型サル痘ウイルスの Zr-599 株、Congo-8 株、および V97-I-008 株と西アフリカ型サル痘ウイルスの Sierra Leone 株、Copenhagen 株、Anteatan 株、Liberia 株および SEN-79 株を用いた。また、サル痘ウイルスを増殖させるために、HeLa 細胞を用いた。
- 2) ウイルス遺伝子の抽出・精製. サル痘ウイルス感染 HeLa 細胞からの DNA 抽出は、Hirt's extraction 法によった。サル痘ウイルス感染カニクイザルから経時的に採取された全末梢血液、咽頭ぬぐい液からの DNA 精製には、Viral Nucleic Acid purification kit (Roche Diagnostics 社) を用いた。これらを、各遺伝子検出法のテンプレートとした。
- 3) カニクイザルとサル痘ウイルスの接種. 国立感染症研究所筑波霊長類センター(現独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医学研究センター)にて養育された、5頭の カニクイザル (*Macaca fascicularis*) を用いた。カニクイザルへのサル痘ウイルスの接種実験は、国立感染症研究所(村山庁舎)高度封じ込め施設の ABSL3 実験室にて行われた。種々の程度のサル痘症状をそれぞれのカニクイザルに発症させるために、1頭のサル (naïve Zr-599) には Zr-599 株 [10^6 plaque forming unite (PFU)] を、1頭の

サル (D0-Zr-599) には同ウイルスを皮下接種直後に天然痘ワクチン LC16m8 を投与した。また、1 頭 (D3-Zr-599) には、LC16m8 を投与 3 日目に、1 頭 (D7-Zr-599) には、投与 7 日目に Zr-599 株を感染させた。残る 1 頭 (naïve Liberia) には 10^6 PFU のサル痘ウイルス Liberia 株を皮下接種した。これらのカニクイザルにおける症状(皮膚に生じた水疱性病変数や症状の程度、および、転機)とサル痘ウイルス感染日から検体採取までの日数を表1にまとめた(表1)。

- 4) Nested PCR. PCR によるウイルス遺伝子の増幅には Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics 社) を用いた。第一段階 PCR のプライマーには、サル痘ウイルスの ATI 遺伝子の塩基配列に基づいて設計された Gabon-1 (5'-GAGAGAATCTCTTGATAT-3')、Gabon-2 (5'-ATTCTAGATTGTAATC-3') を用いた。反応条件は、[94°Cで 5 分、25 サイクルの (94°C1 分、36°C1 分、72°C1 分)、72°C5 分] である。第二段階 PCR には、第一段階 PCR 産物 2 μ L をテンプレートとして、第一段階 PCR 増幅産物領域の内側にアニールするように設計された nest-F1 (5'-GCACACGCAATCAAGAAGAC-3')、nest-R1 (5'-ATTGTAATCTCTGTAGCATTTC-3') を用いた。Nest-R1 は、オルソポックスウイルスの中でサル痘ウイルスにのみ認められる 8 塩基欠損領域にアニールするよう

に設計された。反応条件は、[94°Cで5分、25 サイクルの(94°C1分、50°C1分、72°C1分)、72°C5分]である。得られた増幅産物は、電気泳動法により検出した。

- 5) **LAMP 法**. コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルスの遺伝子をともに検出する LAMP 法 (COM-LAMP) 用プライマー、コンゴ盆地型を特異的に検出する LAMP 法 (C-LAMP) 用プライマー、および、西アフリカ型を特異的に検出する LAMP 法 (W-LAMP) 用プライマーは、それぞれ ATI 遺伝子 (サル痘ウイルス Gabon 株の ATI 遺伝子の塩基配列: アクセション番号 U84504)、コンゴ盆地型にのみ存在する D14L 遺伝子、そして、ATI 遺伝子内で西アフリカ型にのみ存在する 453bp からなる塩基配列を標的領域として設計された。各 LAMP 法に用いられたプライマーの塩基配列は表 2 にまとめた (表 2)。増幅反応は、Loop-amp DNA 増幅キット (栄研化学) を用いて、説明書に従い 2.0 μ L のテンプレートを加え、63°C で 1 時間反応させた。増幅された遺伝子を、リアルタイム濁度測定装置 LA-200 (テラメックス社) を用いて定量的に検出した。なお、LAMP 法により増幅された遺伝子量を測定するための標準遺伝子には、それぞれの標的遺伝子が組み込まれた pGEM-T-easy プラスミドを用いた。
- 6) **統計学的解析**. COM-LAMP、C-LAMP および W-LAMP の感度は、nested PCR 陽性検体数に対する各 LAMP 陽性検体数の割合とした。精度は、nested PCR 陰性検体数に対する各 LAMP 陰性検体数の割合と

した。

(倫理面からの配慮について)

本研究は、国立感染症研究所動物実験委員会の審査受け、許可の下に実施された。研究の実施に際しては、国立感染症研究所動物実験実施規則に従い行われた。

C. 研究結果

- 1) **COM-LAMP、C-LAMP、および、W-LAMP の検出感度**. LAMP 法用標準遺伝子を用いて、COM-LAMP、C-LAMP、および、W-LAMP の検出感度を測定したところ、それぞれ 10² コピー/反応、10³ コピー/反応、10² コピー/反応であった。
- 2) **Nested PCR 法の検出感度**. 国立感染症研究所で開発された定量的リアルタイム PCR (未公表) により定量されたサル痘ウイルス遺伝子を用いて検討したところ、nested PCR では 10 コピー/反応まで検出された。つまり、nested PCR では、COM-LAMP よりも高い感度で、サル痘ウイルス遺伝子が検出された。
- 3) **COM-LAMP、C-LAMP、W-LAMP のサル痘診断における有用性**. COM-LAMP では、用いられた全てのサル痘ウイルス株が検出された。一方、C-LAMP では、コンゴ盆地型サル痘ウイルス株が検出され、西アフリカ型サル痘ウイルス株が検出されず、W-LAMP ではその逆であった。Zr-599 感染カニクイザルから採取された末梢血液および咽頭ぬぐい液 (それぞれ 24 検体) において、nested PCR 陽性を示したのは 24 検体で、残る 24 検体が陰性を示した。Nested PCR 陽性検体のうち、COM-LAMP 陽性検体は 21 検体 (感度:

21/24、88%)、nested PCR 陰性の 24 検体はすべて COM-LAMP 陰性を示した(精度: 24/24、100%)。Liberia 感染カニクイザルから採取された 14 検体(nested PCR では 12 検体が陽性)について同様に検討すると、COM-LAMP の感度と精度は、それぞれ 75% (9/12)と 100%(2/2)であった。全検体では、感度と精度は、それぞれ 83% (30/36)と 100%(22/22)であった(表 3)。Zr-599 感染カニクイザルの検体で nested PCR 陽性検体(24 検体)のうち、C-LAMP 陽性検体は 19 検体(感度: 19/24、79%)、nested PCR 陰性検体(24 検体)はすべて COM-LAMP 陰性を示した(精度: 24/24、100%)。Liberia 感染カニクイザルからの 14 検体はすべて C-LAMP では陰性を示した。一方、Liberia 感染カニクイザルからの検体で、nested PCR 陽性検体のうち、W-LAMP 陽性を呈したものは 11 検体(感度: 92%、11/12)、nested PCR 陰性 2 検体はともに W-LAMP 陰性を呈した(精度: 100%、2/2)。W-LAMP については、naïve-Zr-599 から採取された 10 検体についてのみ、その反応性を検討した。Nested PCR 陽性の 7 検体を含むすべての検体が W-LAMP 陰性を示した。

4) サル痘症状の重症度とウイルス血症レベル. Naïve-Zr-599 と D0-Zr-599 では、比較的多くの水泡性病変が出現し、体重の低下も顕著に認められた。D7-Zr-599 では、サル痘症状は全く認められなかった(表 1)。このように、天然痘ワクチン接種後、サル痘ウイルス感染までの日数が長いサルほど症状が軽くなった。Naïve-Zr-599 では、COM-LAMP で

感染 7 日目にウイルス血症が検出され、その後上昇し続け、感染 13 日目に死亡した。D0-Zr-599 では、感染 3 日目にウイルス血症が検出され、感染 10 日目に最も高いレベルを呈し、その後徐々に低下した。D3-Zr-599 では、感染 7 日目にウイルス血症が検出され、14 日目まで持続し、17 日目には陰性化した。D7-Zr-599 では、ウイルス血症は検出されなかった。Naïve-Liberia では、D0-Zr-599 と同様のウイルス血症レベルの推移を示し、感染 21 日目には陰性化した(図 1)。

D. 考察

本研究では、LAMP 法によるサル痘ウイルスの遺伝子検出、および、コンゴ盆地型と西アフリカ型のサル痘ウイルス遺伝子を特異的に検出する方法を開発した。

サル痘ウイルス遺伝子を特異的に検出する PCR は既に報告されているが、この方法では検出感度が低く、臨床検体から遺伝子を高感度に検出できず、サル痘の診断法としては不十分である。そこで、本研究では高感度 nested PCR を、開発された LAMP 法を評価するための基準にした。

COM-LAMP の検出感度は nested PCR に劣るものの、より迅速に結果が得られ、また、増幅された遺伝子量がリアルタイムに確認できるという利点がある。データは示していないが、他のオルソポックス属ウイルスを標的として COM-LAMP を行ったところ、 10^6 コピー/反応の camelpox ウイルスと vaccinia ウイルスの遺伝子も検出され、cowpox ウイルスと ectromelia ウイルスの遺伝子は検出されな

かった。つまり、同量のサル痘ウイルスに比べほぼ 10^4 倍低い感度で、camelpoxウイルスと vaccinia ウイルスの遺伝子が検出されると考えられる。このことは、COM-LAMP が厳密にはサル痘ウイルスに特異的でないことを示している。Vaccinia ウイルスは、ヒトにおいて水疱性病変を呈する感染症を発症させるが、それは天然痘ワクチン接種時のみで、ヒトサル痘と vaccinia ウイルス感染症との鑑別診断は容易と考えられる。

COM-LAMP により、サル痘症状が重い個体ほどウイルス血症レベルが高く、また、長く持続することが明らかにされた。つまり、COM-LAMP によるウイルス血症レベル、および、その推移は臨床症状の重症度を反映した。また、COM-LAMP によるウイルス遺伝子量と定量的リアルタイム PCR によるウイルス遺伝子量との間に正の相関が認められた（データ未公表）。これらの成績は、COM-LAMP がヒトサル痘の診断においても、病原診断のみならず病勢や予後の診断にも有用であることを示唆する。

C-LAMP と W-LAMP では、それぞれコンゴ盆地型と西アフリカ型が特異的に検出された。また、高感度および高精度でそれぞれのウイルス遺伝子が検出された。病原性の異なるコンゴ盆地型と西アフリカ型を鑑別するための迅速で簡便な C-LAMP と W-LAMP が開発され、これらの診断法を用いることにより、患者予後を推定し、疫学的情報が得ることが可能となる。

LAMP 法では高額な装置を要しない。また、目視によっても陽性と陰性を区別できる。つ

まり、LAMP 法は比較的安価かつ簡便であり、ヒトサル痘の流行地域に導入し易い診断法と考えられる。

本研究では、COM-LAMP により痘瘡ウイルス遺伝子が検出されるか否かは検討されていない。近年、痘瘡ウイルスやサル痘ウイルスがバイオテロ病原体として使用される危険性が指摘されている。今後、COM-LAMP の痘瘡ウイルスへの反応性を検討されなければならない。また、ヒトサル痘患者から得られた検体を用いて、LAMP 法の有用性は評価されていない。ヒトサル痘の診断に応用するには、さらなる研究を要する。

E. 結論

LAMP 法によるサル痘ウイルス感染症の診断法を開発した。病原性の比較的高いコンゴ盆地型サル痘ウイルスおよび比較的低い西アフリカ型サル痘ウイルスの両株をともに検出する COM-LAMP、コンゴ盆地型サル痘ウイルスのみを検出する C-LAMP を、そして、西アフリカ型サル痘ウイルスのみを検出する W-LAMP を開発した。

N. 健康危険情報

なし

O. 研究発表

1.論文発表

- 5) 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). *J. Virol. Methods* 139:78–84, 2007
- 6) Ike, F., Bourqade, B., Sato, H., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S., Yamada, Y., Jaubert, J., Berard, M., Nakata, H., Hiraiwa, N., Mekada, K., Takakura, A., Itoh, T., Obata, Y., Yoshiki, A., Montagutelli, X.: LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. *Comp. Med.* 53:272–281, 2007
- 7) Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Yokoyama, M., Harashima, A., Sato, Y., Saijo, M., Morikawa, S., Sata, T.: Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus. *J. Virol.* 81:1848–1857, 2007
- 8) Sakai, K., Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Endoh, D., Kurane, I., Takehara, K., Morikawa, S.: An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences of avian RNA viruses. *Arch. Virol.* 152:1763–1765, 2007
- 9) Morikawa S, Saijo M, Kurane I.: Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus (in French: Connaissances actuelles sur la moindre virulence du virus Ebola Resoton). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis* 30:391–398, 2007
- 10) Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., Romanowski, V., Fukushi, S., Mizutani, T., Georges, A.J., Kurata, K., Kurane, I., Morikawa, S.: Recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever: development of diagnostic assays, which do not require infectious virus for antibody and antigen detection. *Clin. Vac. Immunol.* 14:1182–1189, 2007
- 11) Fukushi, S., Mizutani, T., Sakai, K., Saijo, M., Taguchi, F., Yokoyama, M., Kurane, I., Morikawa, S.: Amino acid substitutions in S2 region enhance SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells. *J. Virol.* 81: 10831–10834, 2007
- 12) Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I.: Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30:375–389, 2007
- 13) Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Sato, Y., Morikawa, S., Saijo, M., Itamura, S., Saito, T., Ami, Y., Odagiri, T., Tashiro, M., Sata, T.: Pathology and virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. *International J. Exp. Pathol.* 88:403–414, 2007
- 2.学会発表
- 17) Saijo, M: Cytokine responses in monkeys infected with monkeypox virus: