

4. 北米・南米由来ハンタウイルスの血清診断法の開発: データベース解析の結果から、北米・南米由来ハンタウイルス核蛋白抗原中に抗原性が共通する部位(N末端)があることが予想され、この部位が診断抗原として有用であると考えられた。さらに、可変領域には少なくとも4種類のタイプが見つかり、代替中和法で鑑別できる可能性が示された。今年度はこれらについて組換え抗原を発現させ診断法の構築を試みた。現在のところ、北米由来の2種類の抗血清を入手し、診断法の評価を進めている。(上記の異なった可変領域をもつ他のハンタウイルスについても、これらの遺伝子について分与を受けるための交渉を継続している。

#### D. 考察

(1) THAIV 鑑別診断抗原の開発: 鑑別抗原のELISA プレートへの捕捉はマウスモノクローナル抗体でのキャプチャーによって行われている。このため、げっ歯類血清、特に Protein A/G への反応性を欠き、マウス IgG に交差する二次抗体の使用に制限があるため、ラット血清への鑑別診断系の応用は困難であった。しかしながら、二次抗体をマウス抗ラット IgG を選択することによりラット血清への応用が可能となった。実験感染ラット血清、THAIV 自然感染 *B. indica* 血清は明らかに鑑別することが可能であったことから、今後も野生げっ歯類の血清疫学に有用なツールとなると考えられる。また、SEOV 感染と考えられたヒトの中に THAIV 感染を効率よく検出できることから、より正確な疫学的情報を得ることができるようになると考えられる。

(2) ベトナム齧歯類およびスunksの調査: ベトナム南部のゴム農園において2頭の抗 TPMV 抗体陽性スunksが見つかった。この血清は TPMV に対して強い中和を示し、インド由来 TPMV との関連が示された。我々はすでにインドネシアで捕獲されたスunksにおける抗 TPMV 抗体陽性例を報告しているが、これは中和を示さず、TPMV 関連ウイルスの間での多様性を示すものと考えられた。

(3) インドネシアのげっ歯類が保有するウイルスについての調査: 今年開発した鑑別 ELISA を用いて新たなウイルスの存在が示唆された。ヒトへの病原性および遺伝子検索が次の課題であると考えられる。

#### H. 結論

ハンタウイルスはその宿主によって、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、その多様性から診断法はそれぞれについて必要である。また、次々と新規ウイルスが報告されつつあり、近い将来より多くのグループが認められてゆく可能性がある。それらについて情報を収集し、迅速に診断法を準備してゆくことが公衆衛生上必要であると考えられる。

#### I. 健康危険情報

なし

#### J. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 有川二郎: 「ハンタウイルス肺症候群」新臨床内科学 (第9版) (2008.3)

- 2.)有川二郎:「ハンタウイルス」  
 ■ウイルスハンドブックNo. 10  
 2.呼吸器系ウイルス  
 (2008.4)(P25~27)
- 3)Chandy S. Yoshimatsu K. Ulrich R.G.  
 MertesM. Okumura M. JohnT.BalrajV.  
 MuliylilJ. MammenJ.AbrahamP.  
 ArikawaJ. SridharanG.:  
 Seropidemiological study on hantavirus  
 infections in India.  
 ELESEVIER/Transactions of Royal Society of  
 Tropical Medicine and Hygiene  
 (2008)102.70-74
- 4)有川二郎:「ハンタウイルス肺症候群(HPS)」  
 特集 輸入感染の可能性がある希少感染症  
 Vol.24No.11(2008.10)化学療法領域  
 『医科ウイルス学』南江堂
- 5)TaruishiM. YoshimatsuK. HatsuseR.  
 OkumuraM. NakamuraI. ArikawaJ.:  
 Lack of vertical transmission of Hantaan virus  
 from persistently infected dam to progeny in  
 laboratory mice. ( 2008 Arch Virol in press)
- 6)YamamotoH. LiTian-Cheng. KoshimotoC.  
 ItoK. KitaM. MiyashitaN. ArikawaJ.  
 YagamiK. AsanoM. TezukaH. SuzukiN.  
 KurosawaT. ShibaharaT.FuruyaM. MohriS.  
 SatoH. OhsawaK. IbukiK. TakedaN.:  
 Serological Evidence for Hepatitis E  
 Virus infection in Laboratory Monkeys and Pigs  
 in Animal Facilities in Japan.  
 Exp.Anim.57(4)367-3762008
- 7)AraiS. OhdachiDS. AsakawaM.  
 KangHJ. MoczG. ArikawaJ. OkabeN.:  
 Molecular phylogeny of a newfound hantavirus  
 in the Japanese shrew mole  
 (Urotichus talpodeis)
- 8)有川二郎:「10ハンタウイルス」
- バイオセーフティの事典 病原微生物とハザ  
 ード対策の実際[バイオメディカルサイエンス  
 研究会]編集 (P285~P287)2008.12.10
- 9)有川二郎:「腎症候性出血熱」小児疾患診療  
 のための病理生理 小児内科 40 増刊号  
 第4版 (P1222~P1225)
- 2.学会発表
- 1) Yoshimatsu K. TaruishiM. Arikawa J.  
 Analysis of the hantavirus-specific CD8+ T  
 cell response in mice  
 The 7th Japan-China International Conference  
 of Virology  
 University of Tokyo School of Medicine
- 2)土佐紀子、吉松組子、有川二郎 マウスの異  
 常行動における環境エンリッチメントの効果  
 第55回日本実験動物学会総会(2008.5)
- 3)吉松組子、垂石みどり、有川二郎  
 マウスのハンタウイルスに対する細胞性免疫応  
 答の解析:第55回日本実験動物学会総会  
 (2008.5)
- 4)Okumura M.. Yoshimatsu K.Kumperasart. S  
 Nakamura. I. Taruishi M. Sungdee A.  
 Pattamadilok S. Yanagihara R. Arikawa J. :  
 Antigenic profile of thottapalayam virus and  
 development of a serodiagnostic assay  
 XII International Congress of Virology  
 IstanbulTurkey (2008.8)

- 5) kariwa H. Miyashita D. Hernandez C.  
Romero-Almaraz M. Ramos C. Seto T.  
Murata R. Bin Abu Daud N. Ishizuka M.  
Nakauchi M. Yoshii K. Yoshimatsu K.  
Arikawa J. Takashima I. : Epidemiological  
Investigation of Hantavirus Infection in Mexico  
XII International Congress of Virology  
Istanbul Turkey (2008.8)
- 6) Endo R. Ishiguro N. Shirkoohi R.  
Teramoto S. Ariga T. Yoshimatsu K.  
Arikawa J. : Seroepidemiology of human  
bocavirus infection in Japan XII International  
XII International Congress of Virology  
Istanbul Turkey (2008.8)
- 7) 新井智、大館智志、浅川満彦、有川二郎  
Mocz Gabor 岡部信彦、Yanagihara Richard:  
Newfound Hantavirus Sequences in the  
Japanese Shrew Mole (*Urotrichus talpoides*)  
第56回日本ウイルス学会学術集会(2008.10)
- 8) Nur hardy Abu Daud 莉和宏明、石塚万里子、  
瀬戸隆弘、宮下大輔、真田崇弘、中内美名、  
好井健太郎、前田秋彦、吉松組子、有川二郎、  
Evgeniy Tkachenko 高島郁夫、:  
Genetic and antigenic characterization of  
Puumala virus strain DTJ-Ufa-97  
Isolated from a patient of hemorrhagic fever  
With renal syndrome. 第56回日本ウイルス学  
会学術集会(2008.10)
- 9) 駒貴明、吉松組子、垂石みどり、遠藤理香、  
海老原秀喜、有川二郎、:  
新世界ハンタウイルス感染の血清型鑑別  
診断法の確立: 第56回日本ウイルス学会学術  
集会(2008.10)
- 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)

分担者研究報告書

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

研究分担者 福士 秀人 岐阜大学応用生物科学部 教授

研究協力者 大屋 賢司 岐阜大学応用生物科学部 助教

小宮 智義 北里研究所

岸本 寿男 国立感染症研究所

研究要旨: *Coxiella burnetii* 感染症(Q 熱)の血清診断法の開発を目的として、組み換え蛋白質を抗原とした酵素抗体法(ELISA)を開発した。Com1-ELISA について血清診断法としての有用性を検討した。*C. burnetii*感染 A/J マウス血清における抗体応答を Com1-ELISA にて検出することができた。また、IF 法にて陽性(16-256 倍)を示したヒト患者血清を Com1-ELISA に供したところ、一部で反応が認められた。また、昨年度、北海道の野生齧歯類血清中(105 検体)における *C. burnetii* 抗体保有状況を調査し、*C. burnetii* 感染細胞を抗原とした蛍光抗体(IF)法で、70 検体(66.6%)が陽性(16 倍以上)と判定された血清について、*Bartonella henselae* に対する抗体について検討したところ、全てにおいて陰性(128 倍未満)と判定され、*C. burnetii* IF 法にて陽性と判定された検体は、*B. henselae* に対する交叉反応ではないことが示された。Com1-ELISA は感度の点で IF 法に劣る傾向が認められ、さらに Com1 に対する抗体応答は感染経過により異なるとの報告もあり、実験動物であるマウスと野生齧歯類における反応および検出系の検討を行っている。

A. 研究目的

Q 熱は *Coxiella burnetii* を病原体とし、家畜、野  
外のげっ歯類などを感染源とするダニ媒介性の  
人獣共通感染症である。感染症法では第4類に  
指定され、年間約6例程度の届け出がある。しか  
しながら、病原学のおよび血清学的診断法は確  
立されておらず、実態は明らかではない。これま  
での研究から我が国のダニが *C. burnetii* を保有

していることが明らかになっているが、自然界に  
おける保有宿主についてはわかっていない。そこ  
で本研究では血清学的診断法を確立するととも  
に、野外のげっ歯類における *C. burnetii* 感染の実  
態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

*C. burnetii* ゲノム DNA から外膜タンパク質遺伝子

com1 を PCR により増幅し、定法にしたがい、GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させ、抽出精製した。また、新たな抗原として *C. burnetii* 34kDa 外膜タンパク質遺伝子をライブラリースクリーニングにより得た。34kDa 外膜タンパク質抗原も GST 融合タンパク質として大腸菌にて発現させ、抽出精製した。これら GST-com1 および GST-34kDa OMP を抗原として ELISA を行った。

*C. burnetii* Nine Mile 1 細菌ないし Priscilla 株感染 A/J マウス血清およびヒト血清は以前の研究で得られた検体を用いた。

*Bartonella henselae* に対するネズミ血清の抗体検索は日本大学の丸山研究室に依頼した。

(倫理面からの配慮について)

マウス感染血清は動物実験委員会による承認を受けた。ヒト血清についても倫理委員会の承認を得た。

#### C. 研究結果

マウス感染血清を ELISA で測定したところ GST-com1 では接種菌数が多かったマウスにおいて接種菌株に関わらず抗体応答が認められた。しかし、接種菌数が少ない場合には IFA 抗体応答が認められたが、ELISA 抗体は検出されなかった。また、34kDa OMP 抗原に対する抗体は検出されなかった。ヒト血清では 18 検体中 1 検体で com1 に対する抗体応答が検出された。ヒト血清において IFA 抗体価と ELISA 抗体に相関はみられなかった。

昨年度の研究において *C. burnetii* IFA 抗体が検出された北海道の野生ネズミの血清について *B. henselae* との交差を調べた。いずれの検体からも *B. henselae* に対する抗体は 128 倍未満であった。また、また、com1 を抗原とする ELISA においても

抗体は検出されなかった。

#### D. 考察

昨年度樹立した Com1-ELISA について血清診断法としての有用性を検討した。*C. burnetii* 感染 A/J マウス血清における抗体応答を Com1-ELISA にて検出することができた。また、IF 法にて陽性 (16-256 倍) を示したヒト患者血清を Com1-ELISA に供したところ、一部で反応が認められた。しかしながら、野生齧歯類において IF 陽性を示した検体では、Com1-ELISA では反応が認められていない。

昨年度の研究において野生げっ歯類で検出された抗体は *B. henselae* との交差によるものではなく、*C. burnetii* 抗体と見なすことができることがわかった。野生げっ歯類は *C. burnetii* の野外における保菌動物として何らかの役割を果たしている可能性が示された。

今回検索した Com1-ELISA は感度の点で IF 法に劣る傾向が認められた。また、感染個体により応答性は異なる可能性が示された。Com1 に対する抗体応答は感染動物や患者の感染経過により異なるとの報告もある。今後、実験動物であるマウスと野生齧歯類における反応および検出系の検討が必要である。引き続き、一般施設で実施可能なコクシエラ診断法としての ELISA 法の実用化に向け検討を行っている。

#### E. 結論

Com1 を抗原とする ELISA により、重篤な感染をした動物において抗体検出をすることができた。野外のげっ歯類が *C. burnetii* に感染していることを再確認した。ELISA を実用化するためにはさらに検討が必要である。

K. 健康危険情報

L. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

3) 奥田秀子、大屋賢司、安藤匡子、小宮智義、

野村彩朱、矢野竹男、平井克哉、福士秀人:

*Coxiella burnetii* 外膜蛋白質 Com1 の診断用

抗原としての有用性: 第 147 回日本獣医学会,  
宇都宮 (2009.4) (発表予定)

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

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—

研究分担者 丸山 総一 日本大学生物資源科学部・教授

研究要旨: 神奈川県丹沢山系のニホンジカ 8 頭および寄生マダニ 3 種 178 匹ヒメシカシラミバエ 5 匹について *Bartonella* 属菌の分布状況を検討した。シカ血液と各節足動物から DNA を抽出し *Bartonella* の *gltA* 領域を標的に PCR を行い得られた塩基配列をもとに系統解析を行った。ニホンジカ血液の 25.0% (2/8) 寄生マダニの 42.7% (76/178) およびヒメシカシラミバエの 80.0% (4/5) から *Bartonella* 属菌の DNA を抽出した。これら節足動物から高率に *Bartonella* DNA が検出されたこと幼ダニの 33.3% (1/3) 若ダニの 37.2% (16/43) 成ダニの 43.8% (57/130) とダニの成長に伴い陽性率が増加したことさらに未吸血マダニの 42.1% (53/126) から本属 DNA が検出されたことから神奈川県丹沢山系のニホンジカには *Bartonella* 属菌が分布しており寄生マダニおよびシラミバエが *Bartonella* のベクターであることが示唆された。さらにマダニ内では本属菌の経発育伝播が起きている可能性も示唆された。また検出された *Bartonella* 属菌は分子系統解析により人に対し筋肉痛や関節痛などを引き起こすことが知られている *B. melophagi* と近縁であることが明らかとなった。

A. 研究目的

*Bartonella* 属菌は哺乳類を自然病原巣とするグラム陰性細菌で現在 20 種 3 亜種が知られている。このうち *B. bovis*, *B. capreoli*, *B. chomelii*, *B. schoenbuchensis* そして *B. melophagi* の 5 種は反芻獣を自然宿主とすることが知られている。またシカシラミバエウマシラミバエヒツジシラミバエおよびマダニ類からこれら反芻獣由来 *Bartonella* 属菌の DNA が検出されていることからこれら節足動物がベクターである可能性が示唆されている。しかしながらこれまでわが国の鹿を含む反芻獣における *Bartonella* 属菌の感染状況は全く不明の状態である。そこでわれわれは *Bartonella* 症の疫学解明の一環として丹沢で管理捕獲された鹿ならびにその鹿に寄生していたマダニシラミバエについて *Bartonella* 属菌の保有状況を分子生物学

的に検討した。

B. 研究方法

神奈川県丹沢山系において管理捕獲されたニホンジカ 8 頭の血液ならびにその寄生マダニ 178 匹(オオトゲチマダニ 163 匹ヒゲナガチマダニ 6 匹フタトゲチマダニ 3 匹チマダニ属 6 匹)およびヒメシカシラミバエ 5 匹をそれぞれ実験に供した。シカ血液は Instagene (BioRad 社) を各節足動物は DNeasy Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出し *Bartonella* 属菌の *gltA* 領域を標的とした PCR 法により *Bartonella* 属菌 DNA の検出を行った。さらに DNA シーケンスによりその塩基配列 (312bp) を決定し既存の *Bartonella* 属菌の同領域と近接接合法により系統解析を行うとともに菌

種を同定した。

#### C. 研究結果

今回検討したニホンジカ血液の 25.0% (2/8) オオゲチマダニの 42.3% (69/163) ヒゲナガチマダニの 50.0% (3/6) フタトゲチマダニの 66.7% (2/3) チマダニ属の 33.3% (2/6) およびヒメシカシラミバエの 80.0% (4/5) からわが国で初めて *Bartonella* 属菌の DNA が検出された。またマダニの発育ステージ別にみた *Bartonella* 属菌 DNA 陽性率は雄成ダニの 51.9% (40/77) 雌成ダニの 32.1% (17/53) 若ダニの 37.2% (16/43) 幼ダニの 33.3% (1/3) であった。さらに飽血マダニの 44.2% (23/52) および非飽血マダニの 42.1% (53/126) がそれぞれ *Bartonella* 属菌 DNA 陽性であった。

さらにシカ血液オオゲチマダニマダニ 2 匹およびヒメシカシラミバエ 2 匹から得られた *Bartonella* 属菌の塩基配列は分子系統解析により既存の *Bartonella* 属菌とは異なるクレードを形成し *B. melophagi* と高い相同性 (94.9-95.6%) を示した。

#### D. 考察

本研究によりわが国のニホンジカから初めて *Bartonella* 属菌の DNA が検出されたことからわが国のニホンジカにも *Bartonella* 属菌が分布していることが明らかとなった。またニホンジカに寄生していたマダニおよびシラミバエからも *Bartonella* 属菌の DNA が高率 (44.2-80.0%) に検出されたことさらに *Bartonella* 属菌は採取したマダニの発育に伴い高率 (33%→37%→44%) に検出されたことまた未吸血マダニからも検出されたことからこれらの節足動物がベクターとなっている可能性が示

唆されるとともにマダニにおける経発育感染の可能性も示唆された。

ニホンジカ寄生マダニ寄生シラミバエから検出された *Bartonella* 属菌は分子系統解析によりわが国固有の *Bartonella* 属菌である可能性が示唆された。また本菌は、塩基配列の相同性から *B. melophagi* と近縁であることが明らかとなった。*B. melophagi* は人に筋肉痛や関節痛などを引き起こす可能性があることが近年報告された。従って公衆衛生的見地から今後わが国のニホンジカおよびマダニに分布する *Bartonella* 属菌の詳細な調査が必要であると考えられた。

#### E. 結論

神奈川県丹沢山系に生息するニホンジカには人に対し病原性を有する *B. melophagi* が分布していることが明らかとなった。さらにマダニとシラミバエがわが国において本菌の主要なベクターとなっている可能性が示唆された。

#### M. 健康危険情報

なし

#### N. 研究発表

##### 1. 論文発表

- I. Inoue K. Maruyama S. Kabeya H. Yamada N. Ohashi N. Sato Y. Yukawa M. Masuzawa T. Kawamori F. Kadosaka T. Takada N. Fujita H. Kawabata H. : Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* species isolated from wild rodents in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 : 5086-5092 2008.
- II. Jittapalpong S. Sangwaranond A. Inpunkaew T. Phasuk C. Pinyopanuwat N. Chimnoi W.



- Kengradomkij C. Arunwipat P. and Maruyama S. : Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dairy cows in northeastern Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 39: 1-5 2008.
- III. Inoue K. Kabeya H. Kosoy M. Bai Y. Smirnov G. McColl D. Artsob H. Maruyama S. : Evolutional and geographical relationships of *Bartonella grahamii* isolates from wild rodents by multi-locus sequencing analysis. Microb. Ecol. in press 2009
- IV. Inoue K. Maruyama S. Kabeya H. Kawanami K. Yanai K. Jitchum S. Jittaparapong S. : Prevalence of *Bartonella* infection in cats and dogs in the Bangkok metropolitan areas Thailand. Epidemiol. Infect. in press 2009.
- 2.学会発表
- 1) 井上 快壁谷英則篠原ひとみ小林俊元高野愛山内健生丸山総一 : 丹沢の鹿および寄生節足動物における *Bartonella* 属菌 DNA の検出状況 : 第 16 回 ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー熊野古道大会和歌山 (2008.5)
- 2) 井上 快大島夕佳壁谷英則野上貞雄坂田義美丸山総一 : 関東の猫におけるトキソプラズマバルトネラFIVFeLVおよびフィリアの感染状況の年次推移 : 日本獣医師会学会平成20年度地区学会茨城 (2008.9)
- 3) 井上 快壁谷英則篠原ひとみ小林俊元高野愛山内健生丸山総一 : 神奈川県丹沢山系のニホンジカとその寄生節足動物における *Bartonella* DNA の検出状況 : 第 146 回日本獣医学会学術集会宮崎 (2008.9)
- 4) 吉川聡一井上 快小磯祐介壁谷英則丸山総一 : 分子生物学的手法を用いた *Bartonella* の菌種同定法の確立 : 第 146 回日本獣医学会学術集会宮崎 (2008.9)
- 4) 下長根 藍井上 快壁谷英則川端寛樹高田伸弘林谷秀樹丸山総一 : わが国の野鼠における *Yersinia enterocolitica* の保有状況と分離株の *gyrB* 遺伝子系統解析 : 第 146 回日本獣医学会学術集会宮崎 (2008.9)
- 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

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

病原性 *Yersinia* の迅速遺伝子診断法ならびに血清学的診断法の開発

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：** *Yersinia pseudotuberculosis* の迅速な検出ならびに定量を目的に、TaqMan プローブを用いた Real-Time PCR 法の開発を試みた。その結果、*inv* 遺伝子を標的遺伝子として *Y. pseudotuberculosis* の 21 血清群すべてが検出できる TaqMan Real-Time PCR 法を開発することができた。今回開発した Real-Time PCR 法では *Y. pseudotuberculosis* に感染して死亡した動物から標的遺伝子を検出するのに臓器からの DNA の抽出を含め、約 4 時間以内で可能であった。さらに、ラットを用いて病原性 *Yersinia* による感染を菌種別・血清型別に検出できる血清学的診断法の開発を試みた。その結果、病原性 *Yersinia* の産生する菌体外膜タンパク (YOP) と LPS を抗原とした ELISA 法により、*Y. pseudotuberculosis* または病原性 *Y. enterocolitica* による感染を菌種別・血清型別に診断できる血清学的診断法を開発することができた。今回開発したこれらの方法はいずれも病原性 *Yersinia* の迅速かつ簡便な遺伝学的または血清学的診断法であると思われた。

A. 研究目的

*Yersinia* 属菌は腸内細菌科に属するグラム陰性通性嫌気性桿菌で現在 12 菌種に分類されている。そのうち仮性結核菌である *Yersinia pseudotuberculosis* および食物中毒起因菌である *Yersinia enterocolitica* の 2 菌種は人獣共通感染症の原因菌として知られており両者による感染症は総称してエルシニア症と呼ばれている。*Y. pseudotuberculosis* は、現在、0 抗原により 21 の血清群に分けられており、このうち

血清群 1-710 および 15 群が病原性を持つことが知られている。人が *Y. pseudotuberculosis* に感染すると一般的には発熱下痢および腹痛などの胃腸炎症状を示すが我が国における人の *Y. pseudotuberculosis* 感染事例では発疹、結節性紅斑、咽頭炎などの多様な症状を示し、時に敗血症に至るなど、重篤な感染報告例が多い。近年、従来の PCR 法に代わり、蛍光修飾物質を使用して増幅産物をリアルタイムに確認することのできる Real-Time

PCR法が開発され、病原性 *Yersinia* の検出にも応用されるようになってきた。従来のPCR法ではDNAの定量は困難であるが、Real-Time PCR法では可能で本法の大きな利点である。現在、Real-Time PCR法には、蛍光色素を二本鎖DNAの間に非特異的に結合させるインターカレーター法とTaqManプローブのように目的のDNA配列に特異的に結合する蛍光標識プローブを用いる方法の二者があるが、後者のほうがよりDNAの定量に高い精度を示す方法であるとされている。Lambertzら [Appl. Environ. Microbiol. 74: 6465-6469 2008.] はTaqManプローブ法によるReal-Time PCR法を報告しているが、Lambertzらの設計したプライマーでは *Y. pseudotuberculosis* の21血清群のうち、血清型11と12を検出できず、本菌を検出するReal-Time PCR法としては不十分なもので、すべての血清型を検出できるReal-Time PCR法は未だ開発されていない。

また、我が国で *Y. pseudotuberculosis* に感染した場合、特に幼児などでは胃腸炎症状を示さずいきなり敗血症などの重篤な臨床症状を呈することが多い。その場合、臨床医は病原体の分離・同定ができないまま抗生物質を投与して治療を行うため、症状が改善されてからでは病原体が検出できず、結果として抗体値を測定するなどの血清学的手法で診断を行わなければならない場合が多々ある。しかし、エルシニア症の血清学的診断を依頼できる施設は我が国にはほとんどなく、また、その菌種・血清型

まで診断できる方法は十分に確立されていないのが現状である。

そこで、本研究では、まず *Y. pseudotuberculosis* の全血清群が検出可能なTaqMan Real-Time PCR法の開発を試み、その検出感度や特異性などを調べ、その有用性を検討した。さらに、*Y. pseudotuberculosis* または病原性 *Y. enterocolitica* による感染を菌種別・血清型別に検出できる血清学的診断法の開発を試みた。

## B. 材料と方法

### 1. Real-Time PCR法による *Y. pseudotuberculosis* の迅速遺伝子診断法の開発

#### 1) 供試菌株

供試菌株として、病原性 *Y. enterocolitica* 9株、*Y. pseudotuberculosis* 21株、非病原性 *Yersinia* 属菌5株およびその他のグラム陰性菌4株の計39株を用いた。

#### 2) DNAの抽出

供試菌株を trypticase soy broth 50ml に接種し、25°Cで24時間振盪培養した。培養した菌液からはDNAを抽出し、TEバッファー (0.1M Tris-HCl 10mM EDTA [pH 8.0]) に懸濁させた。

#### 3) TaqMan Real-Time PCR法

##### (1) 標的遺伝子

TaqMan Real-Time PCR法の標的遺伝子として、*Y. pseudotuberculosis* 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、これに特異的なプラ

イマーならびに TaqMan プローブを設計した。これらの設計は、GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) から得られた *Y. pseudotuberculosis* YPIII (p+) (血清型 3、病原性プラスミド陽性) の *inv* 遺伝子の塩基配列 (accession no. M17448) を基に、Primer Express ソフトウェア v2.0 (Applied Biosystems) を用いて行った。

#### (2) TaqMan Real-Time PCR 法の条件設定

Real-time PCR 用の 48 穴プレートの各ウエルに、供試菌株から抽出し滅菌精製水を用いて 50ng/ $\mu$ l に調整した鋳型 DNA 溶液を 1.6 $\mu$ l、2 $\times$  Premix Ex Taq<sup>M</sup> (Perfect Real Time) (タカラバイオ(株)) を 10 $\mu$ l、5 $\mu$ M プライマー (Forward と Reverse) をそれぞれ 0.8 $\mu$ l ずつ、5 $\mu$ M プローブを 0.8 $\mu$ l、および滅菌水 7.6 $\mu$ l を加え、計 20 $\mu$ l の反応液とした。陰性コントロールとしては、鋳型 DNA の代わりに滅菌精製水 1.6 $\mu$ l を加えたものを用いた。なお、DNA 量は 260nm の波長における吸光度から測定した。Real-time PCR の反応条件として、予備実験の成績から 95 $^{\circ}$ C で 10 分間維持した後、95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒および 72 $^{\circ}$ C 30 秒のサイクルを 40 回反復した。

#### (3) TaqMan Real-Time PCR 法における検量線の設定

TaqMan Real-Time PCR 法により DNA 量の定量を行うために、検量線の設定を行った。検量線の設定を行うために、*Y. pseudotuberculosis* 血清型 3 から抽出した DNA を、滅菌精製水を用いて 1 Real-time PCR 反応液当たり、およそ  $10^0$ – $10^8$  ゲノム

になるように段階希釈したのち、Real-time PCR 法を行った。

#### (4) 臨床検体からの TaqMan Real-Time PCR 法による *Y. pseudotuberculosis* の検出

*Y. pseudotuberculosis* を検出する目的で開発した TaqMan Real-Time PCR 法が、野外で実際に応用できるかどうかを確認するために、病原性 *Yersinia* に感染して死亡したリスザルの臓器を検体として、開発した TaqMan Real-Time PCR 法を用いて標的遺伝子の増幅を行った。

供試検体として、国内で病原性 *Yersinia* に自然感染して死亡したリスザル 4 頭ならびに臓器からは病原性 *Yersinia* が分離されなかったリスザル 2 頭の肝臓を用いた。病原性 *Yersinia* で死亡したリスザル 4 頭のうち、3 頭の臓器からは *Y. pseudotuberculosis* が分離され、1 頭の臓器からは *Y. enterocolitica* 0:8 が分離された。なお、肝臓からの DNA 抽出は市販キットを用いて行った。

#### 2. ELISA 法による病原性 *Yersinia* の血清学的診断法の開発

##### 1) 供試菌株

供試菌株として、1.1) と同じ菌株を用いた。

##### 2) 供試動物

供試動物として SPF の 4 週齢 F344/N 雄ラットを用いた。各ラットには抗生物質無添加の固形飼料と滅菌水を不断給与し菌投与前に全てのラットの糞便中に *Yersinia* 属菌が存在しないことを確認した。

### 3) ELISA 法による抗体価の測定

#### (1) 抗原

ELISA のための抗原として、病原性 *Yersinia* の産生する菌体外膜タンパク (YOP) ならびに LPS を用いた。YOP は以下のように作成した。供試菌株として *Y. pseudotuberculosis* 血清型 4b を用い、菌株を Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地に接種し 25°C で 24 時間培養後 20 倍量の BHI 液体培地に接種した。BHI 液体培地は 37°C で 90 分振盪培養後 0.45  $\mu$  メンブレンフィルターで濾過滅菌した Ethylene glycol-bis (  $\beta$ -aminoethylether ) -NNN<sup>1</sup>-tetraacetic acid (EGTA) を 10mM になるように添加しさらに 37°C で 90 分振盪培養後 2000 rpm で 30 分遠心分離しその上清を 0.45  $\mu$  フィルターで濾過した。濾過上清は ammonium sulphate を 40mg/ml になるように添加してよく混合した後 2000 rpm で 30 分遠心分離し上清を捨てて沈殿物を得た。沈殿物は蒸留水に溶解し透析膜で透析後凍結乾燥した。また、LPS はすべての供試菌株から市販のキットを用いて抽出した。

#### (2) 被検血清

供試菌株のうち、病原性 *Y. enterocolitica* 4 株 (血清型 03 0527 08 および 09) ならびに *Y. pseudotuberculosis* 6 株 (1b 2a 3 4b 5a および 6) の計 10 株を選び、これらの菌株を 1 血清型当りラット 2-3 匹にそれぞれ 10<sup>9</sup> 個を経口投与した。菌投与後、1 週ごとに 4 週まで採血し、被験血清とした。なお、菌投与後、排菌状況も

あわせて調べた。

#### (3) ELISA 法

抗原として Yop は 250  $\mu$ g/ml に調整したものを、LPS はキットで精製したものを 60 倍に希釈したものを ELISA 用 96 穴マイクロプレートの各ウェルに 50  $\mu$ l ずつ分注し 4°C で 24 時間静置した。次に各ウェルの抗原液を除去し被検血清中の蛋白質が非特異的にプレートに結合するのを阻止するためウシ血清アルブミン加 PBS を 10 倍希釈して各ウェルに 300  $\mu$ l ずつ分注し室温で 15 分間反応させた後反応液をウェルより除去した。そして、このウェルに 80 倍に希釈したラットの血清を 50  $\mu$ l ずつ入れ室温で 1 時間反応させた。その後反応液を捨て Wash solution で 3 回洗浄した。2 次抗体として 1000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ラットヤギ IgG を 50  $\mu$ l ずつ加え室温で 1 時間反応させた後反応液を捨て Wash solution で洗浄した。その後、ABTS (2,2'-azino-di [3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) 溶液を 50  $\mu$ l ずつ分注し 20 分間室温で静置後マイクロプレートリーダーを用いて波長 405nm での吸光度を Optical Density (OD) 値として測定した。

### C. 研究結果

#### 1. Real-Time PCR 法による *Y. pseudotuberculosis* の迅速遺伝子診断の検討結果

供試菌株から抽出した DNA を鋳型とし、TaqMan Real-Time PCR 法を用いて、標的遺伝子である *inv* 遺伝子を増幅した。蛍光色

素 FAM の発色に対する閾値を 0.088 に設定し、これ以上の値を示した場合に DNA の増幅を陽性としたところ、閾値を越えるまでに要したサイクル数を示す  $C_T$  値は最大であった *Y. pseudotuberculosis* 血清型 14 でも 16.83 で、供試した *Y. pseudotuberculosis* 21 菌株のすべてにおいて 20 サイクル以内で標的遺伝子の増幅が確認できた。一方、*Y. enterocolitica* を含め、その他の供試菌株はいずれも 40 サイクル以上を要しても蛍光色素 FAM の発色は閾値を越えることはなかった。また、検量線の回帰式は  $y = -0.300x + 11.98$  (決定係数  $R^2 = 0.995$ ) であり、検量線の傾きから算出した増幅効率  $e = 1.154$  であった。

今回開発した TaqMan Real-Time PCR 法を用いて病原性 *Yersinia* に感染して死亡したリスザルの肝臓を検体として、*Y. pseudotuberculosis* の検出を試みた。その結果、*Y. pseudotuberculosis* 感染によって死亡したリスザルの肝臓からのみ DNA の増幅が確認されたが、*Y. enterocolitica* 0:8 感染によって死亡したリスザルおよび病原性 *Yersinia* 感染以外の理由で死亡したリスザルの肝臓では DNA の増幅は認められなかった。また、本法では *Y. pseudotuberculosis* を検出するのに臓器からの DNA の抽出を含め、約 4 時間以内で可能であった。

## 2. ELISA 法による病原性 *Yersinia* の血清学的診断法の検討結果

わが国で感染患者の多い *Y.*

*pseudotuberculosis* 血清型 4b から抽出した YOP を抗原として、*Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica* を経口感染させたラットの血清を被験血清として ELISA を行ったところ、いずれも菌経口投与前には吸光度値が 0.05 以下であったが、経口感染後 3 週目には吸光度が 0.30-0.50 まで上昇し、供試した *Y. pseudotuberculosis* 血清型 4b から作成した YOP 抗原は病原性 *Yersinia* に経口感染したすべてのラットの血清と反応することが明らかになった。また、さらに *Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica* から抽出した LPS を抗原として、供試したラットの血清の ELISA を行ったところ、いずれも感染させた *Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica* の血清型に対してのみ、吸光度値が高い値を示した。

## D. 考察

### 1. Real-Time PCR 法による *Y. pseudotuberculosis* の迅速遺伝子診断の開発

今回開発した TaqMan Real-Time PCR 法は、*Y. pseudotuberculosis* のすべての血清型だけを増幅できる特異性の高いものであった。Horisaka ら [J. Clin. Microbiol. 42: 5349-5352 2004.] は Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いて *Y. pseudotuberculosis* を迅速かつ高感度に検出できる遺伝子検出法を開発しており、 $10^0$  個の菌数のものまで検出可能であっ

たことを報告しているが、今回開発した TaqMan Real-Time PCR 法も実験的には *Y. pseudotuberculosis* を  $10^0$  個まで検出可能であり、LAMP 法とほぼ同様の高い検出感度を示した。また、PCR 法では理論的に 1 サイクルごとに鋳型 DNA が 2 倍に増幅するが、今回開発した TaqMan Real-Time PCR 法は 1 サイクルごとの鋳型 DNA の増幅量が 2.154 倍で理論値に近く、PCR 反応の増幅効率は高いものであった。さらに、今回開発した TaqMan Real-Time PCR 法が、実際に野外サンプルに応用できるか否かを確認するために、病原性 *Yersinia* に感染して死亡したリスザルの肝臓を検体として用いてその有用性を検討したところ、*Y. pseudotuberculosis* 感染によって死亡したリスザルの肝臓からのみ DNA の増幅が確認され、本法が野外でも有用であることが確認された。これらの結果から、今回開発した TaqMan Real-Time PCR 法は *Y. pseudotuberculosis* を特異的かつ高感度に検出可能で、臨床材料、環境、食品などからの本菌の検出に有用な遺伝子検出法であると思われる。なお、今回開発した *Y. pseudotuberculosis* を検出するための TaqMan Real-Time PCR 法と病原性 *Y. enterocolitica* を検出できる TaqMan Real-Time PCR 法を組み合わせ、両菌種が検出できる Multiplex Real-Time PCR 法についても検討中である。

## 2. ELISA 法による病原性 *Yersinia* の血清学的診断法の開発

今回、抗原とした YOP は病原性 *Yersinia* が産生するさまざまな菌体外膜タンパクを含む粗精製のものであるが、*Y. pseudotuberculosis* 血清型 4b から精製した YOP が *Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica* の代表的な血清型に経口感染したラットのすべての血中抗体と反応が認められたことから、血清型 4b から精製したこの YOP を抗原とすることで病原性 *Yersinia* の血清学的診断が可能であることが明らかになった。また、*Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica* から抽出した LPS を抗原として供試したラットの血清の ELISA を行ったところ、いずれも感染させた病原性 *Yersinia* の血清型に対してのみ反応が認められた。このことから、LPS を抗原とした ELISA では、ラットが *Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica* のどの血清型に感染したかを診断することが可能であった。したがって、今回得られた結果から、エルシニア症の血清学的診断には、まず、YOP を用いた ELISA を行って、病原性 *Yersinia* の感染の有無を診断し、もし感染が陽性であった時にはさらに LPS を抗原とした ELISA を行って、菌種および血清型の判定を行うのが最も適切と思われる。なお、最初から LPS を抗原とした ELISA を行えば 1 回の ELISA で病原性 *Yersinia* の菌種および血清型の判定が可能ではあるが、この場合、準備しなければならない LPS 抗原が多数あること、ならびに *Y. enterocolitica* 血清型 09 は

*Brucella abortus* と共通抗原を持つことなどの点を考慮すると、最初に病原性 *Yersinia* の感染の有無を YOP を抗原とした ELISA で確認するほうが血清学的診断を行う上で効率的であると考えられる。今回はラットを用いて検討しただけであるが、今後は人や野生げっ歯類を対象として開発した ELISA 法の有用性について検討する必要があると思われる。なお、現在さらに YOP と同様に病原性 *Yersinia* が産生する菌体外膜タンパクである YadA を抗原とした ELISA 法の有用性についても検討中である。

## E. 結論

今回、*Y. pseudotuberculosis* の 21 血清型すべてが検出可能な TaqMan Real-Time PCR 法が開発できた。さらに、ラットにおいて *Y. pseudotuberculosis* と病原性 *Y. enterocolitica* の ELISA 法による血清学的診断法を確立できた。これらの方法はいずれも病原性 *Yersinia* の迅速かつ簡便な遺伝学的または血清学的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) Lee K, Iwata T, Shimizu M, Taniguchi T, Nakadai A, Hirota Y, and Hayashidani H. A novel multiplex PCR assay for *Salmonella* subspecies identification. J.

Appl. Microbiol. (in press)

2) Ogasawara N, Tran T.P, Ly T. L. K, Nguyen T. T, Iwata T, Watanabe M, Taniguchi T, Hirota Y, and Hayashidani H. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* from domestic animals food and human in the Mekong Delta Vietnam. J. Vet. Med. Sci. 70 : 1159-1164 2008.

3) 林谷秀樹、岩田剛敏、中臺文：爬虫類とサルモネラ. 54 : 165-170 2008.

## 2. 学会発表

1) 林谷秀樹、中臺文、岩田剛敏、黒木俊郎、佐伯和美、馬場浩、吉田信一郎、加藤行男、廣田好和：ヘビ類における *Salmonella* 属菌保有のメカニズムに関する研究、第 146 回日本獣医学学会、宮崎 (2008. 9)

2) 藤原あずさ、馬場智成、林谷秀樹、宇根有美；リスザル (*saimiri sciureus*) の *Yersinia enterocolitica* O3 感染症の 1 例とリスザル由来 *Y. enterocolitica* O3 の病原性の検討第 145 回日本獣医学学会相模原 (2008. 3)

3) 林谷秀樹、久野格、岩田剛敏、李謙一、廣田好和：グレープフルーツ種子抽出物の抗菌活性とその応用 145 回日本獣医学学会相模原 (2008. 3) .

## 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)

分担者研究報告書

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  
サル痘ウイルス感染症の皮膚病変と内臓病変

研究分担者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部第三室・室長
協力研究者	網康至	国立感染症研究所動物管理室・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二室・室長
	森川茂	国立感染症研究所ウイルス第一部第一室室長

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 ウイ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。本研究では輸入感染症対策として重要な感染症のひとつであるサル痘ウイルス感染症の病態を明らかにするためカニクイザルにおけるサル痘ウイルス感染症(いわゆるサル痘)の内臓病変について検討した。サル痘ウイルスを感染させたカニクイザルの解剖時に内臓組織を採取し肉眼的に病変の有無を確認しさらにそれらの各臓器についてサル痘ウイルス抗原の有無について病理学的に検討した。4頭のカニクイザルに皮下接種経路で Zr-599 株[コンゴ盆地型( $10^6$  PFU)]を2頭に鼻腔噴霧経路で Zr-599 株( $10^6$  PFU)を3頭に皮下接種経路で Liberia 株[西アフリカ型( $10^6$  PFU)]を2頭に鼻腔噴霧経路で Liberia 株( $10^6$  PFU)を感染させた。Zr-599 感染個体では皮膚病変の他にリンパ系組織(リンパ節や胸腺)呼吸器臓器(気管支と肺臓)消化管臓器(胃小腸大腸)泌尿生殖器系臓器(膀胱前立腺精巣子宮卵巣)の臓器にウイルス抗原陽性の肉眼的病変が認められた。一方 Liberia 株感染個体では鼻腔内噴霧感染個体で肺臓に病変が認められた以外皮膚とリンパ系組織のみにウイルス抗原陽性の肉眼的病変が認められた。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と報告されている。病原性の違いは Zr-599 株は皮膚やリンパ系組織以外に消化管臓器や泌尿生殖器系臓器に強い病変を引き起こし Liberia 株は皮膚やリンパ系組織にのみ病変を引き起こすことに起因することを示唆している。

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。この流行はサル痘ウイルスの宿主であるげっ歯類がペット用にアフリカからアメリカ合衆国に輸出されそれがサル痘ウイルスに感染してそのげっ歯類から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対策の必要な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。

本研究では霊長類におけるサル痘ウイルス感染症の皮膚および体内臓器の症状を詳細に検討した。また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の病原性の違いの原因を考察した。

## B. 研究方法

1. ウイルス。サル痘ウイルス Zr-599 株と Liberia 株を用いた。Zr-599 株と Liberia 株はそれぞれコンゴ民主共和国とリベリア国のヒトサル痘患

者から分離されたウイルスで前者はコンゴ盆地型の後者は西アフリカ型のサル痘ウイルスである。

2. 霊長類および感染実験。11 頭のカニクイザルを使用した。4 頭のカニクイザルには  $10^6$ PFU の Zr-599 株を皮下接種経路(Zr-599/SC 群)で 2 頭には  $10^6$ PFU の Zr-599 株を鼻腔内噴霧経路(Zr-599/IN 群)で 3 頭には Liberia 株を皮下接種経路(Liberia/SC 群)で 2 頭には Liberia 株を鼻腔内噴霧経路(Liberia/IN 群)でそれぞれ感染させた。感染後重症のサル痘を発症した場合には予定した 3 週間の観察期間を待たずに安楽殺しその他の場合には感染 3 週間後に安楽殺した。本感染実験は国立感染症研究所村山庁舎の高度安全研究施設内で実施された。
3. 病理学的解析。安楽殺されたカニクイザルの各臓器(リンパ節胸腺消化管呼吸器臓器心臓肝臓脾臓泌尿生殖器臓器中枢神経皮膚内分泌臓器等)を採取し目視にて病変の有無を確認しさらに免疫組織学的検査によりウイルス抗原の有無を確認した。

(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承認を得た上で実施された。

## C. 研究結果

1. 予後。Zr-599/SC 群では 4 頭中 3 頭が Liberia/SC 群の 3 頭中 1 頭が致死感染を呈した。Zr-599/IN 群の 1 頭は重症のサル痘を残る 1 頭と Liberia/IN の 2 頭は比較的軽症のサル痘を呈した。

2. 皮膚病変. Zr-599 株感染カニクイザルと Liberia 株感染カニクイザルに認められた皮膚病変には形態や性状において差は認められなかった(図 1).

3. 内臓病変. 各臓器におけるサル痘ウイルス抗原の有無を組織化学免疫法で検索したところ Zr-599 株と Liberia 株感染カニクイザルの胸腺を含むリンパ系組織にはサル痘ウイルス抗原が認められたが肝臓や膵臓を含む消化官臓器泌尿生殖器臓器にはサル痘ウイルス抗原はより多くの Zr-599 株感染カニクイザルに抗原が認められた.

#### D. 考察

本研究ではカニクイザルにおけるサル痘ウイルス感染症の皮膚および臓器の病変について詳細に調べた. サル痘ウイルス感染症では皮膚において典型的な水疱性病変が認められる. さらに特に Zr-599 株感染カニクイザルでは皮膚だけではなく呼吸器消化管泌尿生殖器臓器にウイルス抗原を伴う肉芽腫性病変が認められ全身感染症であることが明らかである. アフリカではヒトのサル痘ウイルス感染症(ヒトサル痘)が流行し死亡率は 5%未満とされている. 死亡するような症例では本研究で認められたように呼吸器や消化管泌尿生殖器などの臓器にも病変が生じ多臓器不全が原因となっている可能性がある.

これまでコンゴ盆地型サル痘ウイルスは西アフリカ型サル痘ウイルスよりも病原性が高いことが報告されている. 統計学的には有意な差が認められなかったものの Zr-599 感染カニクイザルの方が Liberia 感染カニクイザルよりも致死率が高かった. この差は Zr-599 株(コンゴ盆地型)では

皮膚やリンパ系組織だけではなく呼吸器や消化管泌尿生殖器などの臓器にも病変が生じ一方 Liberia 株(西アフリカ型)感染カニクイザルでは主として皮膚やリンパ系組織にのみ病変が生じるというウイルスの臓器指向性の違いに基づくものと予想される.

天然痘が根絶された今日においても天然痘様疾患のヒトサル痘がアフリカで流行している. この疾患は天然痘ワクチンで予防可能であることが知られていることからより有効で安全な天然痘ワクチンを感染リスクの高い人々に接種することは感染対策上重要なことである. また抗ウイルス薬による治療法の開発も重要である. 本研究で詳細に明らかにされた霊長類におけるサル痘ウイルス感染症の病態はワクチンや抗ウイルス薬による治療の評価の基礎データとなるものと考えられる.

#### E. 結論

コンゴ盆地型サル痘ウイルスの病原性は西アフリカ型サル痘ウイルスのそれよりも高いと考えられその差は臓器指向性の違いによるものと推測された. 本研究で詳細に明らかにされた霊長類におけるサル痘ウイルス感染症の病態はワクチンや抗ウイルス薬による治療の評価の基礎データとなるものと考えられた.

#### O. 健康危険情報

該当なし.

#### P. 研究発表

1. 論文発表