

海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究

ダニ媒介性脳炎の疫学

研究分担者 好井 健太郎 北海道大学大学院獣医学研究科 助教

研究要旨:ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)はヒトに重篤な脳炎を引き起こす、人獣共通感染症の原因ウイルスである。我々はこれまで継続的な血清疫学調査を行うことによって、道南地域には現在まで 10 年以上にわたってウイルスの流行巣が存続している事を明らかにしてきた。そこで本研究では、同地域における現在の TBEV の疫学的危険度を評価するため、野鼠を対象とした疫学調査を行い、野鼠からウイルス分離を試み、その性状を解析した。野鼠より採取した脾臓乳剤を哺乳マウスに脳内接種する事によって、アカネズミより TBE ウイルス Oshima 08-AS 株が分離された。遺伝子解析により、分離株は病原性の高い極東亜型に分類され、1990 年代において同地域において分離されたウイルス株と非常に近縁である事が明らかとなった。今後は分離ウイルスの病原性等の生物性状を解析し、同地域における TBE ウイルスの疫学的な危険度を評価していく必要があると考えられる。

A. 研究目的

ダニ媒介性脳炎(Tick-borne encephalitis: TBE)ウイルスは、フラビウイルス科フラビウイルス属に属し、マダニ類によって媒介される危険度の高い人獣共通感染症の原因ウイルスとして知られ、ヒトに致命的な脳炎を引き起こす。

日本では 1993 年北海道上磯町(現北斗市)において初めて TBE 患者が発生し、その後の疫学調査により患者発生地域に TBE ウイルスの流行巣が存在することを明らかにしてきた。

これまでの所、新たな TBE 患者は発生していない。しかし我々は北海道を中心に継続的な血清疫学調査を行うことによって、道南地域には現

在まで 10 年以上にわたってウイルスの流行巣が存続している事を明らかにしてきた。

同地域の疫学的危険度を評価する上で、現在流行している TBE ウイルスの分離を試みその性状を解析する事は重要な課題である。そこで、本研究では北斗市において採取した野鼠からウイルス分離を試み、その性状を解析した。

B. 研究方法

1)被検検体

疫学調査により捕獲された野鼠検体として、北海道北斗市の 34 検体より麻酔下での心採血により安楽殺後、脾臓を採取し使用まで-80℃で保存

した。

## 2) ウイルス分離

採取した脾臓を10%乳剤とした後、1 プール 3-5 匹として 9 プールの脾臓乳剤を、これを 1-2 日齢の BALB/c 哺乳マウスの脳内に接種した。

接種哺乳マウスから脳を採取し、10%脳乳剤を作成し以降の実験に用いた。

## 3) 蛍光抗体法による TBE ウイルス抗原の検出

BHK 細胞に脳乳剤を接種し、5 日間培養後 4% Paraformaldehyde により細胞を固定した。0.2% Triton X-100 加 PBS により透過処理を行い、マウス抗 TBE ウイルス抗体を反応させ、二次抗体として Alexa555 標識抗マウス IgG 抗体により検出した。

## 4) TBE ウイルス RNA の検出と塩基配列の決定

脳乳剤を接種した BHK 細胞から ISOGEN を用いて RNA 抽出を行い、RT-PCR により TBE ウイルスの遺伝子の増幅を試みた。

増幅された PCR 産物を精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行い、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を解析した。

## 5) 分離ウイルスの増殖性

BHK細胞に MOI=0.01 でウイルスを感染させ、経時的に培養上清を回収した。培養上清中のウイルスカ価は BHK 細胞を用いたプラークアッセイにより測定した。

## C. 研究結果

### 1) アカネズミからの TBE ウイルスの分離

脾臓乳剤を脳内接種した哺乳マウスの中で、衰弱個体が 1 匹現れた。このマウスより採取した脳乳剤を BHK 細胞に接種した所、蛍光抗体法により細胞内において TBE ウイルス抗原が産生されて TBE ウイルスが分離された事が確認された。

このウイルスを Oshima 08-AS 株と命名し、以降の実験に使用した。

### 2) Oshima 08-AS 株の遺伝子性状の解析

今回、分離された Oshima 08-AS についてウイルスゲノム RNA の全塩基配列を解読した。1995 年に分離された Oshima 5-10 株と比較した所、35 ヶ所に塩基の相違が認められ、そのうち 13 ヶ所がアミノ酸の相違を伴うものだった。これらアミノ酸配列の相違は全て非構造蛋白領域に位置していた。

E 蛋白領域(1,488 塩基)について既知のウイルス株との系統樹を作成した。系統樹から、Oshima-08-AS は病原性の高い極東亜型に分類され、中でも以前に北斗市で分離された株達と同じクラスターを形成し、ロシアで分離された Sofjin 株や KH98 株とは明らかに異なるクラスターに属することが示された。

### 3) Oshima 08-AS 株の細胞における増殖性

Oshima 08-AS 株の BHK 細胞における増殖性を Oshima 5-10 株と比較した所、同様の増殖性を示した。しかし Oshima 08-AS 株は Oshima 5-10 株と比較して、細胞変性効果が弱く、またプラークアッセイにおいて大きなプラークを示し、生物性状に相違がある事が示唆された。

#### D. 考察

現在北海道において流行している TBE ウイルスの性状を解析するため、北斗市の野鼠からのウイルス分離を試みた。その結果、アカネズミから TBE ウイルスが 1 株分離された。分離株の塩基配列を解析した結果、分離ウイルスは極東亜型に分類され、1990 年代に当教室で北斗市より分離された株達と非常に近縁である事が示された。TBE ウイルスの遺伝子は自然界では安定であることが報告されており、それを支持する結果だと考えられる。

培養細胞を用いた実験では、Oshima 08-AS 株は Oshima 5-10 株と同様の増殖性を示したものの、細胞障害性やプラーク形成等において相違を示し、生物性状が異なる事が示唆された。今後は病原性の比較を行っていくことによって、分離地域における TBE ウイルスの疫学的な危険度を評価していく必要がある。

また我々はこれまでの研究で、北海道の他の地域や本州においても TBE ウイルスの流行帯が存在している可能性を指摘している。今後はこれらの地域における人への感染リスクを評価するため、住民を対象とした血清疫学調査も行うべきであると考えられる。さらに本研究と同様にウイルスの分離を試み病原性等を解析する事は今後の疫学的危険度を評価する上で重要な課題であると考えられる。

#### E. 結論

今回、北海道北斗市で採取されたアカネズミより TBE ウイルスが分離された。分離ウイルスは病原性の高い極東亜型に分類された。また 1990 年

代に分離されたウイルス株と非常に近縁で、自然界で安定してウイルスが維持されている事が示された。今後は病原性を解析していくことにより、分離地域における住民への危険度を評価するとともに、TBE 患者発生の予防に役立てることが重要である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yoshii, K., Mottate, K., Omori-Urabe, Y., Chiba, Y., Seto, T., Sanada, T., Maeda, J., Obara, M., Ando, S., Ito, N., Sugiyama, M., Sato, H., Fukushima, H., Kariwa, H. and Takashima, I.: Epizootiological Study of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Japan. *J. Vet. Med. Sci. Epub ahead of print*, 2010
- 2) Yoshii, K., Igarashi, M., Ito, K., Kariwa, H., Holbrook, M.R. and Takashima, I.: Construction of an infectious cDNA clone for Omsk hemorrhagic fever virus, and characterization of mutations in NS2A and NS5. *Virus Res. Epub ahead of print*, 2010
- 3) Murata, R., Eshita, Y., Maeda, A., Maeda, J., Akita, S., Tanaka, T., Yoshii, K., Kariwa, H., Umemura, T. and Takashima, I.: Glycosylation of the West Nile Virus envelope protein increases in vivo and in vitro viral multiplication in birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82: 696-704, 2010
- 4) 村田亮、好井健太郎、苅和宏明、高島郁夫: ウエストナイルウイルスの鳥類における増殖性と

- 極東ロシアでの抗体調査, 獣医畜産新報, 63: 208-209, 2010
- 5) 好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫: ダニ媒介性脳炎, 北海道獣医師会雑誌, 54: 2-7, 2010
2. 学会発表
- 1) Saasa, N., Kariwa, H., Sánchez-Hernández, C., Romero-Almaraz, M. de L., Yoshida, H., Sanada, T., Seto, T., Yoshikawa, K., Yoshii, K., Ramos, C., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I.: Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay for epidemiological studies of hantavirus infection in Mexico: 第 149 回日本獣医学会、東京(2010, 3)
- 2) 好井健太郎、寸田祐嗣、苺和宏明、Michael R. Holbrook、高島郁夫: ダニ媒介性脳炎/オムスク出血熱のキメラウイルスの作成と性状解析: 第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、東京 (2010, 5)
- 3) Kariwa, H., Yoshikawa, K., Tanikawa, Y., Seto, T., Sanada, T., Saasa, N., Ivanov, L. I., Slonova, R., Zakharycheva, T. A., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K. and Takashima I: Isolation of Amur and Hantaan viruses from wild rodents and the epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in Far East Russia: U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 44<sup>th</sup> Joint Working Conference on Viral Diseases. Sapporo, (2010. 6)
- 4) Sanada, T., Kariwa, H., Tanikawa, Y., Abu Daud, N. H., Seto, T., Nagata, N., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K. and Takashima, I: Persistent infection of Puumala virus in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) resembling hantavirus infection in natural hosts: The 2<sup>nd</sup> International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2010. Sapporo (2010. 9)
- 5) Seto, T., Sanada, T., Saasa, N., Takashima, I., Yoshii, K. and Kariwa, H.: Efficient Isolation Method for Puumala Hantavirus by Using Syrian Hamsters: The 2<sup>nd</sup> International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2010. Sapporo (2010. 9)
- 6) Saasa, N., Kariwa, H., Sánchez-Hernández, C., Romero-Almaraz, M. de L., Yoshida, H., Sanada, T., Seto, T., Yoshikawa, K., Yoshii, K., Ramos, C., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I.: Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay for epidemiological studies of hantavirus infection in Mexico: The 2<sup>nd</sup> International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2010. Sapporo (2010. 9)
- 7) 山崎翔子、好井健太郎、持館景太、村田亮、真田崇弘、苺和宏明、高島郁夫: 2008 年北海道におけるダニ媒介性脳炎ウイルスの分離と性状解析: 第 150 回日本獣医学会、帯広(2010, 9)
- 8) 柳原なつみ、好井健太郎、後藤明子、伊川綾恵、石塚万里子、苺和宏明、高島郁夫: ダニ媒介性脳炎ウイルスの E 蛋白の糖鎖付加がウイルス性状に与える影響: 第 150 回日本獣医学会、帯広(2010, 9)
- 9) 高野絢子、大森優紀、好井健太郎、横澤香菜、苺和宏明、高島郁夫: ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株の感染性 cDNA の構築: 第 150 回日本獣医学会、帯広(2010, 9)
- 10) 好井健太郎、寸田祐嗣、苺和宏明、Michael R.

- Holbrook、高島郁夫:ダニ媒介性脳炎ノオムスク出血熱のキメラウイルスの作成と性状解析: 第 150 回日本獣医学会、帯広(2010, 9)
- 11) 吉田喜香、苺和宏明、真田崇弘、Ngonda Saasa、瀬戸隆弘、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫:メキシコ由来のハンタウイルスに対するモノクローナル抗体の作出と各種ハンタウイルスに対する反応性の検討: 第 150 回日本獣医学会、帯広(2010, 9)
- 12) 戸谷理詩、好井健太郎、村田亮、秋田紗希、田中智久、苺和宏明、梅村孝司、高島郁夫:ウエストナイルウイルスのE蛋白糖鎖付加が鳥類における病態に与える影響の解析: 第 150 回日本獣医学会、帯広(2010, 9)
- 13) 真田崇弘、苺和宏明、谷川洋一、Abu Daud Nur Hardy、瀬戸隆弘、永田典代、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫:Puumala ウイルスを感染させたシリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*)の感染動態の解析: 第 150 回日本獣医学会、帯広(2010, 9)
- 14) 好井健太郎、持館景太、大森優紀、千葉裕美子、真田崇弘、瀬戸隆弘、前田純子、小原真弓、安藤秀二、伊藤直人、杉山誠、佐藤浩、福島博、苺和宏明、高島郁夫:日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査: 第 10 回人と動物の共通感染症研究会学術集会、東京(2010, 10)
- 15) 真田崇弘、苺和宏明、永田典代、谷川洋一、Nur Hardy Abu Daud、瀬戸隆弘、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫:Puumala ウイルスを感染させたシリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*)の感染動態の解析: 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島(2010,11)
- 16) 吉田喜香、苺和宏明、真田崇弘、Saasa Ngonda、瀬戸隆弘、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫:メキシコの野生げっ歯類が保有するハンタウイルスの抗原性解析: 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島(2010,11)
- 17) 高野絢子、大森優紀、好井健太郎、横澤香菜、苺和宏明、高島郁夫:ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株の感染性 cDNA の構築: 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島(2010,11)
- 18) 好井健太郎、寸田祐嗣、苺和宏明、Michael R. Holbrook、高島郁夫:ダニ媒介性脳炎ノオムスク出血熱のキメラウイルスの作成と性状解析: 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島(2010,11)
- 19) 戸谷理詩、好井健太郎、村田亮、秋田紗希、田中智久、苺和宏明、梅村孝司、高島郁夫:ウエストナイルウイルスのE蛋白糖鎖付加が鳥類における病原性に与える影響の解析: 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島(2010,11)
- 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

ハンタウイルス感染症に関する研究

分担研究者 有川二郎 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨:近年げっ歯類やベクターによって媒介される人獣共通感染症の検査体制の確立が緊急の課題となっている。本研究ではハンタウイルス感染症について診断法を開発し、輸入げっ歯類の検査に応用する。さらに、わが国や諸外国の流行地域、病原巣動物、および流行株の性状を明らかにする。

A. 研究目的

ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類される RNA ウイルスで腎症候性出血熱 (HFRS) とハンタウイルス肺症候(HPS)の原因ウイルスである。ヒトは、ハンタウイルスに不顕性に持続感染したげっ歯類の排泄物などを吸引することにより感染する。このためハンタウイルスは代表的な齧歯類媒介性ウイルス性人獣共通感染症の原因ウイルスであり、公衆衛生上重要なウイルスである。様々なげっ歯類が多くの血清型や遺伝子型のハンタウイルスの病原巣動物であるため、一種類の検出法ではそれら全てのハンタウイルス感染症を検出することはできない。本研究では、ハンタウイルス感染症全般を検出する診断システムを開発することを目的とする。

B. 研究方法

「抗原および ELISA」:各ハンタウイルス組換え核蛋白(NP)の全長(アミノ酸:全長抗原)をバキュロウイルスベクター(AcNPV:BAC-TO-BAC GIBCO BRL)を用いて昆虫細胞(High Five)に発現させた。組み換えバキュロウイルス感染細胞は SDS で処理し、Western blotting 抗原とした。また、超音波処理後 ELISA 抗原とした。また、NP の N 末端を削除したトランケート抗原を同様に発現させ、血清型鑑別のための ELISA 抗原とした。また、全長の NP はさらに pET43.1 ベクターを用いて大腸菌に発現させ、精製して ELISA 抗原として用いた。この ELISA において尿素を含む洗浄ステップを加えた結果との比較により、抗体の結合性の強さを見積もる、Avidity 解析を行った。

「新世界げっ歯類に対する2次抗体の作成」:  
Cotton ratの血清からProtein Aカラムを用いてIgG分子を精製し、これをウサギに免疫して抗血清を得た。ここからIgG分子を精製し、さらにビオチンでラベルして2次抗体とした。

「ELISA、Western blotting」: ELISA およびWestern blottingは既報の方法に従った (Araki et al J. Clin Microbiol. 2001)。

「実験用ラット血清」: 実験用ラットWKAH/hkm 6週齢にHantaan virus (HTNV)/Soul virus (SEOV)/Thailand virus (THAIV)/Dobrava virus (DOBV)を接種し、麻酔下で経時的に採血した。血清は5-6°Cで30分間非働化し、血清学的解析に使用した。

(倫理面からの配慮について)

各種げっ歯類血清の採血は、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものである。ウサギの採血は耳介静脈より行った。それぞれの実験については北海道大学の動物実験委員会の承認を受けたものであり、動物福祉の観点からも問題はないと判断された。

(倫理面からの配慮について)

該当なし

## C. 研究結果

### 1. 抗コットンラット2次抗体の作成

昨年度の成果から、抗コットンラットIgG抗体が*Oligoryzomys*属げっ歯類の抗体検査に有用であることが明らかとなった。昨年度はマウスに免疫することによって少量の抗血清を得て、有用性を明らかにすることができたが、検

査の現場において配布するなどの目的には不十分であった。今年度は免疫動物をウサギとして、十分な量の2次抗体を得ることができた。

### 2. 旧世界 HTNV 関連ウイルス保有げっ歯類の血清型鑑別診断

NPのN末端を削除したトランケート抗原を用いた血清型鑑別診断である代替中和法の適用を実験感染げっ歯類から得られた経過血清を用いてさらに解析を加えた。感染げっ歯類の血清を用いた以前の研究から、本法が血清型鑑別診断が可能であることが確認されている。今回、さらに血清型鑑別診断が可能となる感染後の時期について経時的に調べた。その結果、感染初期のIgG抗体は鑑別しがたく、感染後25日前後より、鑑別が可能であることが明らかとなった。この鑑別はIgG抗体のAvidityが十分に高くなる時期に一致して可能となることが示された。一方、IgM抗体ではこのトランケート抗原を用いても血清型鑑別を行うことが出来ず、代替中和法はIgM抗体では使用できないことも明らかとなった。すなわち感染初期においては本代替中和法が適応外であることが示された。

## D. 考察

北米・南米由来ハンタウイルスの血清診断法の開発: 昨年までの研究成果により、北米・南米に棲息するげっ歯類における罹患ウイルスを代替中和法により鑑別することができるようになった。一方、2次抗体として市販されているものは、シロアシマウスIgGに対するもののみであり、この2次抗体は、*Oligoryzomys*属

げっ歯類など他の属のげっ歯類の抗体への結合が不十分であるため、検出が困難であった。今回、ウサギを用いて、1ロットの2次抗体を準備した。今後、北米南米由来げっ歯類の抗体検出の敏感度が改善され、防疫体制に貢献することが期待される。

また、この代替中和法は感染初期の応用が難しいことが示された。しかしながら、その結果は抗体の Avidity との関連が考えられた。このことから、代替中和法陰性の場合、Avidity を測定して考察することが重要であると考えられる。すなわち、定 Avidity の場合には感染初期である可能性が示される。反対に高 Avidity であるにも関わらずどの血清型の代替中和抗原とも反応しない場合には、未知の型のウイルスの罹患が予想される。これらの情報は、ゲノムを検出する際の PCR プライマーの選定に重要な情報となる。

## 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、その病原性も HFRS, HPS および無症候性とその多様性から診断法はそれぞれについて必要である。さらに、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いく可能性がある。それらについて情報を収集し、迅速に診断法を準備していくことが公衆衛生上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) Tegshduuren, E., Yoshimatsu, K., Taruishi, M., Endo, R., Shimizu, K., Koma, T., Yasuda, S. P., Kariwa, H., Arikawa, J., and Ishihara, C. 2010. Different cross-reactivity of human and rodent sera to Tula virus and Puumala virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33:e67-73.
- 2) Schmidt-Chanasit, J., Essbauer, S. S., Petraityte, R., Yoshimatsu, K., Tackman, K., Contraths, F. J., Sasnauskas, K., Arikawa, J., Thomas, A., Pfeiffer, M., Scharninghausen, J. J., Spletstoesser, W., Wenk, M., Heckel, G., and Ulrich, R. G. 2010. Extensive host sharing of Central European Tula virus. *J. Virol.* 84:459-474
- 3) Koma, T., Yoshimatsu, K., Pini, N., Safronetz, D., Taruishi, M., Levis, S., Endo, R., Shimizu, K., Yasuda, S. P., Ebihara, H., Feldmann, H., Enria, D., and Arikawa, J. 2010. Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Sin Nombre, Andes, and Laguna Negra hantavirus infections in humans and rodents. *J Clin Microbiol* 48:1635-1642.
- 4) Huong, V. T., Yoshimatsu, K., Luan, V. D., Tuan le, V., Nhi, L., Arikawa, J., and Nguyen, T. M. 2010. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 16:363-365.
- 5) Gamage, D. C., Yasuda, P. S., Nishio, S., Kularatne, S. A., Weerakoon, K., Rajapakse, J., Nwafor-Okoli, C., Lee, R. B., Obayasi, Y., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Tamashiro, H. 2010. Serological evidence of Thailand virus-related hantavirus infection among leptospirosis suspected patients in Kandy, Sri Lanka. *Japanese Journal of Infectious Diseases* in 64:72-75.

## 2. 学会発表

- 1) Arikawa, J. Hantavirus infection as a rodent-borne zoonoses How we learn from nature. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22.2010



2) Kariwa H, Yoshikawa K, Tanikawa Y, Seto T, Sanada T, Ngonda S, Ivanov LI, Slonova R, Zakharycheva TZ, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I. Isolation of amur and Hantaan viruses from wild rodents and the epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in far east Russia. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22.2010

3) Koma T, Yoshimatsu K, Pini N, Safronetz D, Taruishi M, Levis S, Endo R, Shimizu K, Yasuda SP, Ebihara H, Feldmann H, Enria D and Arikawa J. Development of serotyping ELISAs for new world hantavirus infection. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22.2010

4) Sanada T, Kariwa H, Tanikawa Y, Seto T, Miyashita D, Ngonda S, Yoshikawa K, Sanchez-Hernandez C, Romero-Almaraz MdL, Ramos C, Ivanov LI, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I. Development of diagnostic methods applicable to various hantavirus infections. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22.2010

5) Yasuda SP, Endo R, Shimizu K, Koma T, Tegshduuren E, Luan VD, Yoshimatsu K, Huong VTQ, Arikawa J. Comparison of the pathogenesis of Seoul virus infection in experimentally infected laboratory rats and naturally infected wild rats. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22.2010

6) Koma T, Yoshimatsu K, Pini N., Safronetz D., Taruishi M., Levis S., Endo R., Shimizu K.,

Yasuda S., Ebihara H., Feldmann H., Enria D. and Arikawa J. TRUNCATED HANTAVIRUS NUCLEOCAPSID PROTEINS FOR SEROTYPING ANTIGEN XIV International conference on Negative Strand Viruses, June 20-25, 2010, Brugge-Belgium

7) 吉田喜香, 苅和宏明, 真田崇弘, Ngonda Saasa, 瀬戸隆弘, 吉松組子, 有川二郎, 好井健太郎, 高島郁夫: メキシコ由来のハンタウイルスに対するモノクローナル抗体の作出と各種ハンタウイルスに対する反応性の検討 第150回日本獣医学会学術集会, 帯広畜産大学, 2010.9.16~18

8) 安田俊平, 吉松組子, 遠藤理香, 清水健太, 駒貴明, 有川二郎: ハンタウイルス持続感染メカニズム解明のための実験感染ラットを用いた細胞性免疫測定系の確立 第58回日本ウイルス学会学術集会, あわぎんホール(徳島県郷土文化会館), 2010.11.7~9

9) 吉田喜香, 苅和宏明, 真田崇弘, Saasa Ngonda, 瀬戸隆弘, 吉松組子, 有川二郎, 好井健太郎, 高島郁夫: メキシコの野生げっ歯類が保有するハンタウイルスの抗原性解析 第58回日本ウイルス学会学術集会, あわぎんホール(徳島県郷土文化会館), 2010.11.7~9

10) 駒貴明, 吉松組子, 永田典代, 清水健太, 安田俊平, 有川二郎: 免疫不全マウスを用いたハンタウイルス感染症病態モデルの検討 第58回日本ウイルス学会学術集会, あわぎんホール(徳島県郷土文化会館), 2010.11.7~9

#### 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

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業）

研究分担者報告書

海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究

中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの  
詳細な分子疫学

研究分担者 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部部長  
研究協力者 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：クリミア・コンゴ出血熱（CCHF）は、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス（CCHFウイルス）により引き起される出血熱ウイルスで、ダニ媒介ウイルス感染症のひとつである。我が国へ海外から侵入が危惧される感染症のひとつに CCHF が挙げられる。近年、アジアにおいてもクリミア・コンゴ出血熱の流行が発生している。CCHF ウイルスは、核蛋白をコードする S-遺伝子、膜蛋白をコードする M-遺伝子、RNA ポリメラーゼをコードする L-遺伝子の 3 つの分節 RNA を有する。CCHF の致死率は 5～40% と高く、ヒトへの感染経路は、感染ダニによる刺咬やウイルス血症を伴う家畜動物との接触である。本研究では、これまで私たちが解析した中国新疆ウイグル自治区で患者やダニから増幅された CCHF ウイルスの部分 S-遺伝子および近年同地域で分離または遺伝子増幅された遺伝子情報（S-遺伝子）の部分配列を用いて、より詳細な分子疫学を明らかにした。新疆ウイグル自治区で増幅された CCHF ウイルスの多くは、系統樹解析上独立したクラスターに分類されたが、一部の CCHF ウイルスはアラブ首長国連邦（中近東）の株と同一のクラスターに分類された。中国新疆ウイグル自治区に存在する CCHF ウイルスは、同地域で進化した CCHF ウイルスの他に、中近東に存在する CCHF ウイルスに近縁のものも存在することが明らかにされた。中近東近縁 CCHF ウイルスを保有しているダニに近縁のダニが、新疆ウイグル自治区にも存在することを示唆している。

A. 研究目的

クリミア・コンゴ出血熱（Crimean-Congo hemorrhagic fever, CCHF）は、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される CCHF ウイルスによる感染症で、致死率の高いウイルス

感染症の一つである。ヒトは感染ダニ（*Hyalomma* 属等）に咬まれたり、ウイルス血症を伴う感染動物（ヒツジなど）の血液や体液に接触したりして CCHF ウイルスに感染する。また、ヒトからヒトへの感染もまれではなく、

CCHF 患者の治療にあたった医療関係者が患者から CCHF ウイルスに感染する院内感染例も報告されている。さらに、近年アジア（中近東、南アジア、中央アジア、中国新疆ウイグル自治区）において CCHF が流行している。このような状況では、輸入感染例やダニの侵入などを介して CCHF が海外から我が国に侵入する可能性がある。本研究では、私たちの研究室においてこれまでに解析された新疆ウイグル自治区で分離された CCHF ウイルスの S-遺伝子および近年急速に中国の研究者によって解明された同地域の多くの CCHF ウイルス株の S-遺伝子の塩基配列をもとに、新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスに関して分子疫学的に解析した。

## B. 研究方法

### 1. CCHF ウイルス新疆株の S-遺伝子情報。

2001 年および 2002 年の新疆ウイグル自治区における CCHF 流行時に、10 人の患者から増幅された S-遺伝子、および、6 匹のダニから増幅された S-遺伝子の塩基配列は、当研究室において決定された。また、2005 年以降に中国の研究者により増幅され、解析された S-遺伝子の塩基配列 29 株については、GenBank から情報を得た。系統樹解析に用いられた部分 S-遺伝子は、先の報告（Clin Diagnost Lab Immunol 10:489-491, 2003）の方法で増幅された約 240 塩基（プライマーの部分を除く）である。

### 2. 分子疫学的解析。

世界各国で分離されている CCHF ウイルス、中国新疆ウイグル自治区で分離された

CCHF ウイルス、および、RT-PCR 等で増幅された CCHF ウイルスの遺伝子の塩基配列を用いて、NJ 法により系統樹解析を実施した。

（倫理面からの配慮について）

該当しない。

## C. 研究結果

### 1. 中国新疆ウイグル自治区における CCHF ウイルスの分子疫学

部分 S-遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析により、これまでの報告と異なる成績が得られた。新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスは、患者やダニから得られたウイルス全てが、独立した一つのクラスターを形成していた。しかし、近年報告された新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスを加えた今回の解析により、中近東分離株のクラスターに分類されるものが、新疆ウイグル自治区に存在することが明らかにされた（図 1）。

## D. 考察

2001 年から 2002 年にかけて、私たちは中国新疆ウイグル自治区における CCHF の流行について詳細に研究したが、近年の国際情勢により同地域における CCHF の流行に関する情報は入手していない。しかし、近年中国の研究者により新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスの塩基配列に関する情報（特に部分 S-遺伝子に関する情報）が GenBank を通じて入手可能になった。

今回の解析で明らかになったことは、これまでと同様に新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスの多くは独立した一つのクラスターを形成していることから、同地域で CCHF ウイルスは独自の進化を遂げているということである。S-遺伝子の塩基配列は、宿主となるダニの種に深い関連があると考えられている。つまり、新疆ウイグル自治区には、CCHF ウイルスの宿主となりうる特異的なダニが生息していることを示唆する。これまで私たちは CCHF ウイルス遺伝子が増幅されたダニを、16S-ribosomal DNA の部分配列により分子系統樹解析で同定した(図2)。それによると、*Hyalomma* 属と *Dermacentor* 属が CCHF ウイルスの宿主となっていることが明らかにされている。

しかし、今回の解析により中近東(特に UAE) に存在する CCHF ウイルスと同じクラスターに分類される CCHF ウイルスが新疆ウイグル自治区に存在することが明らかにされた。隣国、パキスタンに存在する CCHF ウイルスは、系統樹解析上中近東の CCHF ウイルスに近縁である。以上の成績は、新疆ウイグル自治区における CCHF ウイルスは、同地域において進化をとげているものと、中近東から動物(特にヒツジなどの家畜)の移動、ダニを有する渡り鳥の移動により中近東の CCHF ウイルスが混在し、かつ、同地域に存在する CCHF ウイルスの宿主となり得るダニの種は、多様であることを示している。

#### J. 健康危険情報

なし

#### K. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I.: Recent progress in the treatment for Crimean-Congo hemorrhagic fever and future perspectives. *Future Virology* 5:801-809, 2010
- 2) Nakayama, E., Yokoyama, A., Miyamoto, H., Igarashi, M., Kishida, N., Matuno, K., Marzi, A., Feldmann, H., Ito, K., Saijo, M., Takada, A.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of filovirus species-specific antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology* 17:1723-1728, 2010
- 3) 西條政幸: アレナウイルス. 日本臨床 68 (増刊号): 431-434, 2010
- 4) 西條政幸: 南米出血熱の診断法の概要. 日本医事新報 4495: 83-84, 2010

##### 2. 学会発表

- 1) 木下一美, 酒井宏治, 永田典代, 王麗欣, 伊藤(高山)睦代, 中道一生, 森川茂, 倉根一郎, 西條政幸. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス核蛋白の単クローン抗体を用いた診断法の開発. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010.11)
- 2) 伊波興一朗, 中内美奈, 谷口怜, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. アルゼンチン出血熱の実験室診断法の患者血清を用いた評価. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島

- (2010.11)
- 3) 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. 3分節 RNA の塩基配列に基づく中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの分子疫学と進化. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010.11)
- 4) Saijo, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Morikawa, S. Evolutional events of Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses in Xinjinag, China, assessed with 3 segmented RNA genes. 44th US-Japan Cooperative Medical Science, Viral Diseases Panel Meeting, Sapporo, Japan (2010.06)
- 5) Saijo, M. Molecular epidemiology on Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections based on the 3 segmented RNA genes. BIT's 1st World Congress of Virus and Infections-2010, Busan, Korea (2010.07)
- 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. CCHF ウイルスの部分 S-遺伝子配列に基づく中国新疆ウイグル自治区および世界各国の CCHF ウイルスの系統樹解析。図中の“Chinese CCHFV”が中国新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスを、その他分離された国名を示している。

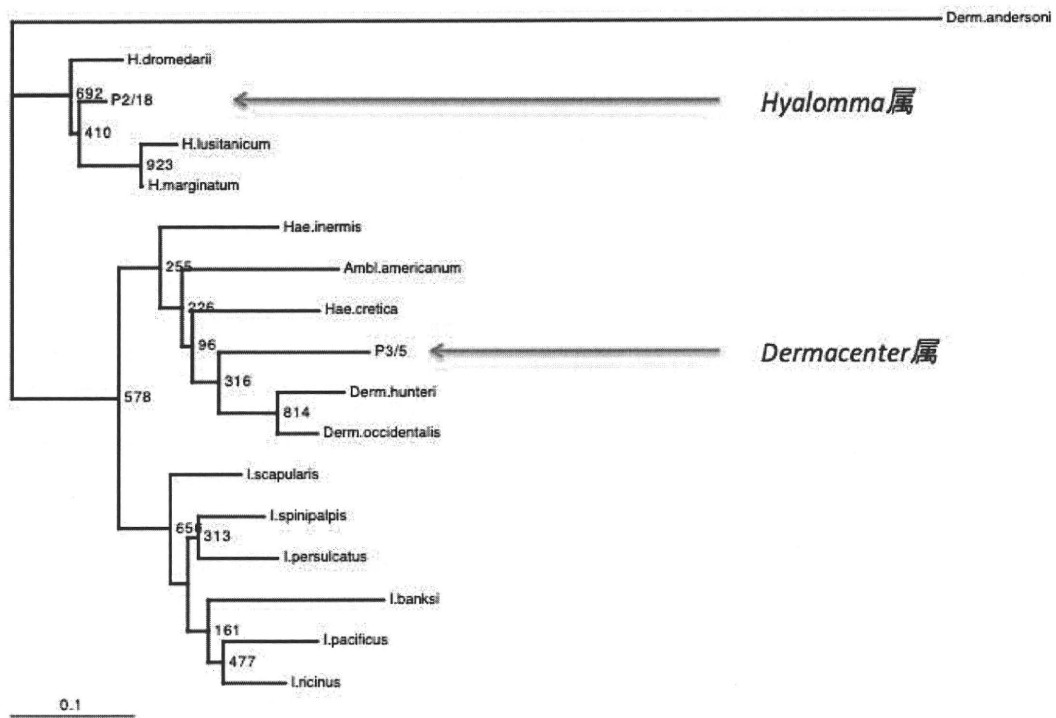


図 2. 2002 年に新疆ウイグル自治区（Bachu 地区）で捕獲したダニの 16S-ribosomal DNA の部分配列による分子系統樹

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究

狂犬病の疫学に関する研究

研究分担者	井上 智	国立感染症研究所
研究協力者	Bazartseren Boldbaatar	日本大学、国立感染症研究所
	野口 章	国立感染症研究所
	加来義浩	国立感染症研究所
	奥谷晶子	国立感染症研究所
	佐藤 豪	国立感染症研究所員

研究要旨:わが国では、1970年と2006年に経験したヒトの輸入狂犬病3症例を除いて 50 年以上に渡って狂犬病は国内で発生していないが、アジア諸国ではヒトの感染源となるイヌ等の動物で流行が継続しており、ヒトの公衆衛生において大きな脅威となっている。近隣諸国での狂犬病流行拡大は日本への狂犬病侵入リスク増大につながるため、その疫学的背景を調査・分析して最新の情報をわが国の公衆衛生行政に還元することが期待される。そこで、本研究では、海外の研究協力者と共同してユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病(リッサウイルス感染症を含む)について流行状況に関する情報の収集、疫学調査、流行様式の解明、新規診断法開発等を行ってわが国への侵入可能性や発生予測・被害予想などを可能にすることを目的とした。今回は、野生動物に狂犬病が流行しているモンゴルで現地専門家の協力を得て流行している狂犬病ウイルス(RABV)の遺伝学的多様性について解析を行った。2005 から 2008 年に西部・中央モンゴルの8種類の家畜および野生動物から集めた 24 の狂犬病陽性検体について N 遺伝子の塩基配列を特定して分子疫学系統樹を行ったところ、モンゴルで流行している RABV は2つの遺伝子グループに分けられ、それぞれがロシアで分離される Steppe 型と Arctic 型の RABV に近縁であることが明らかとなった。近年、モンゴル国境沿いのロシア地域で新しいコウモリ由来のリッサウイルスが発見されており、国境を越えた野生動物での流行拡大リスク等についての懸念がある。したがって、モンゴルで流行している野生動物等の RABV 流行形態を明らかにするためには隣国のロシアや中国等での患者発生状況や感染源動物における流行様式、分離される RABV 株に関する疫学的な調査とその解析が必要と考えられた。

- A. 研究目的
- ワイ、英国、日本などを除く世界のほぼ全域で流行している。アジア、アフリカを中心に年間で少なくとも



とも5万人の死亡例があると推計されており、ヒトを含むほぼすべての哺乳類に致死的な脳炎を起こす狂犬病ウイルス(ラブドウイルス科リッサウイルス属)を原因とするウイルス性疾病である。わが国では、1970年と2006年に経験したヒトの輸入狂犬病3症例を除いて50年以上に渡って狂犬病は国内で発生していないが、アジア諸国ではヒトの感染源となるイヌ等の動物で流行が継続しており、ヒトの公衆衛生において大きな脅威となっている。

本研究では海外の研究協力者と共同してユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病(リッサウイルス感染症を含む)について流行状況に関する情報の収集、疫学調査、流行様式の解明、新規診断法開発等を行ってわが国への侵入可能性や発生予測・被害予想などを可能にすることを目的としており、今年度は野生動物に狂犬病が流行しているモンゴルの専門家との共同研究によって、野生動物および家畜から分離される狂犬病ウイルス(RABV)の遺伝学的多様性について解析を行った。

## B. 研究方法

モンゴルの国立中央獣医学研究所の専門家の協力により、狂犬病を発症した8種類の動物(オオカミ、赤キツネ、イヌ、野生ネコ、ラクダ、ウシ、ヤギ、ヒツジ)から採取した24の脳材料について解析を行った。動物は、2005～2008年にZavkhan、Khuvsgul、Govi-Altai、Bayan-Ulgii、Tuv 地方で捕獲されたものである。脳検体は、FITC 標識抗RABV モノクローナル抗体(Fujirebio)を用いて狂犬病ウイルス抗原の陽性が確認された(図1)。

脳検体からRNAの抽出をQIAmp Viral RNA

extraction kit(Qiagen)を用いて行った。抽出したRNAについて、P1プライマーでRT反応(avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase (Promega))を行った後に、P1および304プライマーを用いてPCR反応(TaKaRa ExTaq PCR kit)を行った。PCRの反応条は、①95°C 5分、②(95°C 30秒→50°C 30秒→72°C 30秒)を30サイクル、③72°C 10分とした。

PCRされた遺伝子は、アガロースゲル電気泳動後にエチジウムブロマイド染色を行いUVトランスイルミネーターで増幅を確認の後に、QIAquick column(Qiagen)で精製して、N蛋白質遺伝子の全領域についてシーケンシングを行った。シーケンシングはABI Prism Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit(Applied Biosystems)と3130 Genetic Analyzerを使用して行った(表1にプライマーを示す)。

ゲノムの比較解析は、新しく特定した24株のモンゴル由来RABVとGenBankより入手した43個のリッサウイルスN遺伝子配列について行った。系統樹の作成は、Clustal X version 2で作成したRABVのN遺伝子配列(1,353nt)アラインメントを用いてneighbor-joining法によって行った(ClustalX version 2が構築した遺伝距離マトリクスに基づいて作成)。オーストラリアバットリッサウイルス(ABL)(GenBank accession no. NC003243)のN遺伝子をoutgroupに使用した。

## C. 研究結果

モンゴル由来ウイルスの間で、塩基配列の一致率は98.3%以上であった。モンゴル由来RABV株についてN遺伝子配列(1,353nt)を利用した系統樹解析を行ったところ、モンゴルのRABVは2つ

のグループに分かれることが示された(図 2)。グループ A は、主にモンゴル西部で分離されたウイルスが含まれ、ロシアやカザフスタンで分離された Steppe(草原)-type ウイルス株と分子遺伝学的に近縁であった。一方、モンゴル中央部由来の 1 株(MGL 22)はグループ B に属していた。MGL 22 は、Arctic-like ウイルスに分類されるロシア、グリーンランド、韓国由来のウイルスに近縁であった。

モンゴル由来ウイルスのアミノ酸配列を GenBank の他の株と比較すると、N 遺伝子の Ser389(リン酸化への関与が報告されている)は、モンゴル由来株だけでなく、他の株でも保存されていた(表 3)。Antigenic site I(アミノ酸 359-366 番目)および site IV(アミノ酸 375-383 番目)も、同様にモンゴル由来株では保存されていた。N 蛋白質の全アミノ酸の配列では、MGL 22 と他のモンゴル由来株の間に 11 アミノ酸の違いが認められた。モンゴル由来株間のアミノ酸配列の一致率は 97.6% 以上であり、全ての株は direct immunofluorescent antibody (DFA) test で検出可能であった。

#### D. 考察

モンゴルでは、1972~2006 年に狂犬病を発症した動物が約 6,000 頭ほど報告されており、毎年 2,000 人が狂犬病ワクチンの曝露後接種を受けている。1972~2004 年には、34 人のヒトが発症(死亡)しており、15 例は狂犬病を発症したイヌによる感染であり、残りの 7 例が狂犬病を発症したオオカビによる感染である。

本研究では、2005 年から 2008 年に西部・中央モンゴルに生息している 7 種類の家畜および野生

動物について 24 の狂犬病陽性検体を集めて感染している狂犬病ウイルスの N 遺伝子の塩基配列を特定した。これらの塩基配列を利用して分子疫学系統樹を作成したところモンゴルで流行している RABV は 2 つの遺伝子グループに分けられ、ロシアで分離される Steppe 型と Arctic 型の RABV に近縁であることが明らかになった。

モンゴルは、ロシア・中国(ともに狂犬病流行国)と国境を接しており、国境を移動する野生動物等を介して狂犬病ウイルスが行き来する可能性が十分あり、伝搬経路等を理解することは国境を越えた狂犬病のコントロールの確立に重要である。

また、近年ではモンゴルとの国境に近いイルクーツクに生息するコウモリ(*Murina leucogaster*)から新種のリッサウイルス(Irkut virus)が分離されており、国境を越えて野生動物等を介した流行の拡大リスク等について関心がもたれている。

現在までモンゴルではコウモリに由来する狂犬病の報告はないが、新種のリッサウイルスが分離されたコウモリはシベリア南部、モンゴル西部、中国北東部でも生息が確認されており、モンゴルのコウモリ類がこれらリッサウイルスの感染宿主となりうる可能性は十分にある。

今後、モンゴルで流行しているリッサウイルスの野生動物等における流行形態を明らかにするとともに、隣国のロシアや中国等の患者発生状況や感染源動物における流行様式、分離 RABV 株の分子疫学等についての解析を進めることによって、ユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病(リッサウイルス感染症を含む)の流行形態を明らかにしていく。

## E. 結論

今年度の研究で、モンゴルと国境を接しているロシア・中国(ともに狂犬病流行国)との間を野生動物等が移動して狂犬病ウイルスが往来している可能性が示唆された。

近年、モンゴルとの国境に近いイルクーツクに生息するコウモリ(*Murina leucogaster*)から新種のリッサウイルス(Irkut virus)が分離されて、野生動物等を介した流行の拡大リスク等についても高い関心もたれている。新種のリッサウイルスは、シベリア南部、モンゴル西部、中国北東部で生息が確認されているコウモリから分離されており、モンゴルのコウモリ類がこれらリッサウイルスの感染宿主となりうる可能性は十分にある。

今後、隣国のロシアや中国等の研究者を加えて、ユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病(リッサウイルス感染症を含む)流行形態を患者発生状況、感染源動物における流行様式、分離RABV株の疫学的調査とその解析によって明らかにしていくことが必要と考えられた。

## L. 健康危険情報

## M. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Bazartseren B., Inoue S., Tuya N., Dulam P., Batchuluun D., Sugiura N., Okutani A., Kaku Y., Noguchi A., Kotaki A., and Yamada A. (2010) Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Mongolia, 2005–2008. *Jpn.J.Infect.Dis.* 63: 358–363.
- 2) 井上 智. 話題の感染症 狂犬病(Rabies). *モダ*

ンメディア別冊、56:25–31、2010

- 3) 井上 智. リッサウイルス感染症. 感染症法改正(2003)で追加された感染症.<新4類>. 25 感染症. 健康生活の基礎知識. 六訂版 家庭医学大全科. 総合監修: 高久史磨、猿田享男、北村惣一郎、福井次矢. 法研、p2542–2543、2010

## 2. 学会発表

- 1) Sato G., Inoue S., Yamada A., Ito F.-H., Silva M. L.-C.-R., Itou T., Sakai T. The rabies viral RNA genomes selectively shifted in quasispecies population after serial passages of street virus in mouse. 44<sup>th</sup> joint working conferece on viral diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 28–30 Sapporo, (June, 2010.).

## 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

- 表 1 -

Table 1. Primers used in this study

Primer	Nucleotide sequence	Position	Sense <sup>6)</sup>	Use
P1 <sup>1)</sup>	ACAGACAGCGTCAATTGCAAAGC	28-50	G	RT-PCR and sequencing
JW12 <sup>2)</sup>	ATGTAACACC(C/T)CTACAATG	55-73	G	sequencing
B1c <sup>3)</sup>	CTTTTGTTAAAATCGTGGAGCACC	530-553	G	sequencing
113 <sup>4)</sup>	GTAGGATGCTATATGGG	1012-1029	G	sequencing
B3 <sup>3)</sup>	TAGCTGGTCCAGTCTTCC	281-264	M	sequencing
304 <sup>5)</sup>	TTGACGAAGATCTTGCTCAT	1533-1514	M	RT-PCR and sequencing

<sup>1)</sup>: Goto et al., 1994 (3).

<sup>2)</sup>: Heaton et al., 1997 (18).

<sup>3)</sup>: designed by nucleotide sequence of EF614254 (Table 2).

<sup>4)</sup>: Smith, 1995 (4).

<sup>5)</sup>: Smith, 1995 (4).

<sup>6)</sup>: G, genomic; M, messenger.

▲表 1 本研究で用いられたプライマー