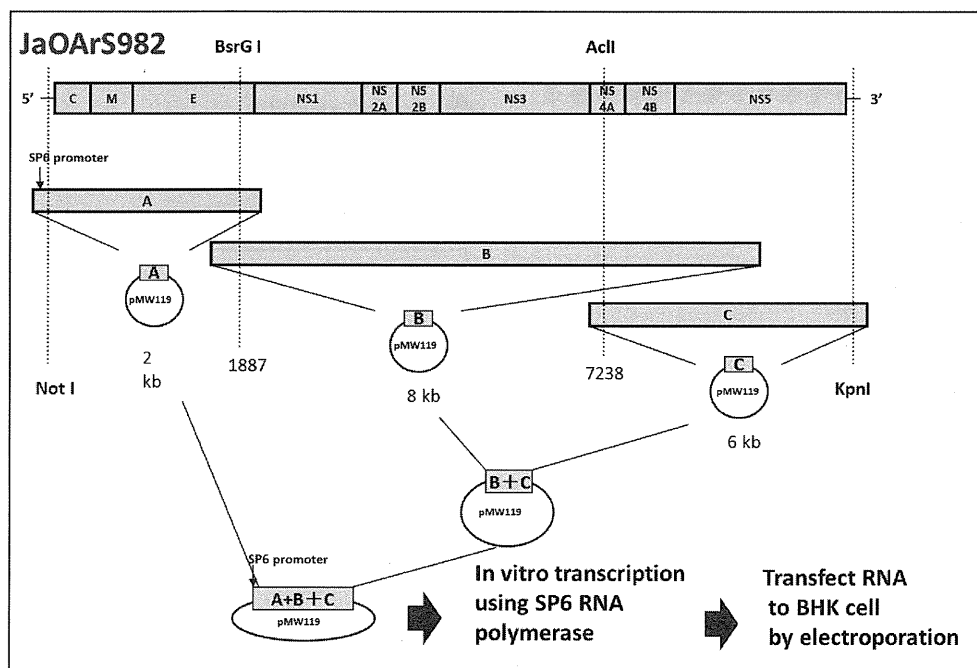
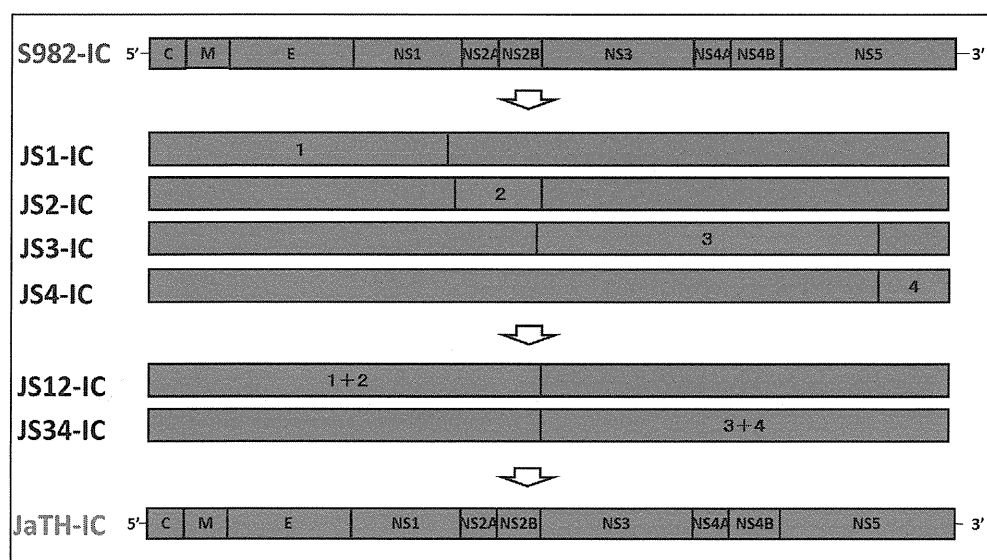


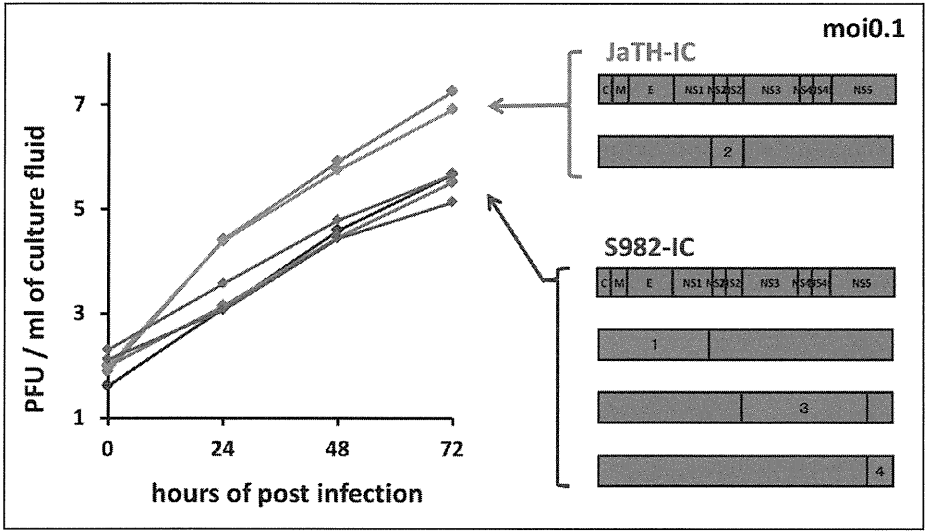
(Fig. 3) キメラウイルスの構築手順



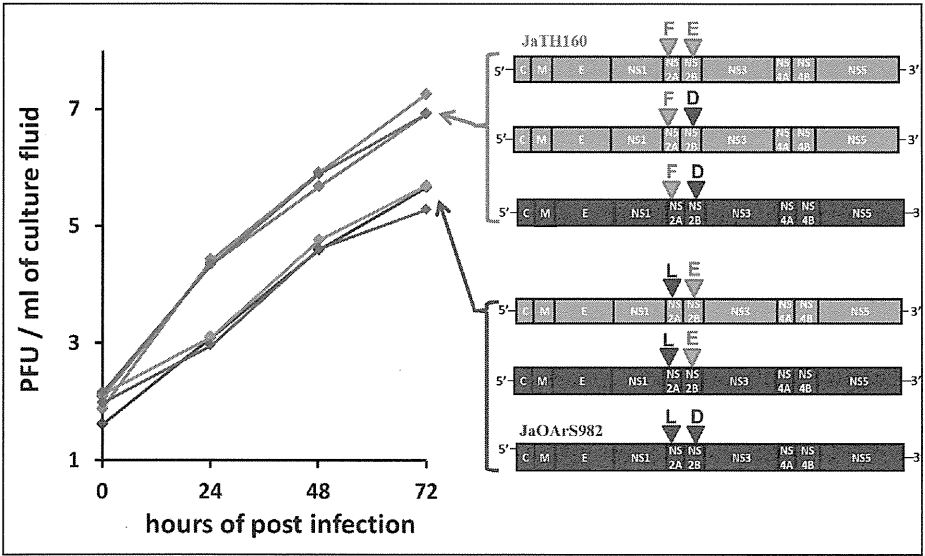
(Fig. 4) キメラウイルスの構成内容



(Fig. 5) キメラウイルスの N2a 細胞における増殖性



(Fig. 6) 点突然変異を導入したウイルスの N2a 細胞における増殖性



分担研究報告書

ハンタウイルス感染症の診断法に関する研究

研究分担者 有川二郎 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨： ハンタウイルス感染症は、ブニヤウイルス科ハンタウイルスを原因とする急性熱性疾患で、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の総称である。いずれの疾患も、持続感染したげっ歯類を自然宿主とする人獣共通感染症である。ウイルスの血清型や遺伝子型毎に特定の種類のげっ歯類が自然宿主となりその生息地域に一致して流行が発生し、HFRS は中国、極東ロシアや欧州を中心に広くユーラシア大陸全域で、また HPS は南北アメリカ大陸で流行が報告され、公衆衛生上の大きな問題となっている。本研究では、ハンタウイルス感染を広く検出するスクリーニング用血清診断抗原と血清型鑑別診断抗原を開発し、ELISA 法とイムノクロマト法に応用し迅速かつ安全な診断法を開発した。

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、急性熱性疾患で腎臓の機能障害を特徴とする腎症候性出血熱(HFRS)と呼吸器障害を特徴とするハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因ウイルスである。いずれの疾患も持続感染したげっ歯類を自然宿主とする人獣共通感染症である。ハンタウイルスでは、その血清型や遺伝子型毎に特定の種類のげっ歯類が自然宿主となるため、生息地域に一致して流行が発生し、HFRS の流行は中国、極東ロシアや欧州を中心に広くユーラシア大陸全域で、また HPS は南北アメリカ大陸で報告され、公衆衛生上の大きな問題となっている。また、血清型によってヒトへの病原性の強弱が異なる傾向がある。このた

め、感染ウイルスの血清型の鑑別は、自然宿主げっ歯類の種類、また、輸入症例では流行国の特定、さらに病原性の強弱の予想をもとに封じ込め対策や初期の治療方針の選択等に有用な情報を提供する。

ハンタウイルスでは、Hantaan virus (HTNV)、Seoul virus (SEOV)、Dobrava virus (DOBV)、Thailand virus (THAIV)、Puumala virus (PUUV)の少なくとも5つの血清型がユーラシア大陸に分布し、HFRS の原因となる。また Sin Nombre virus (SNV)、Carrizal virus (CAZV)、Black Creek Canal virus (BCCV)、Andes virus (ANDV)および Lagna Negra virus (LANV)は5つの遺伝子グループに分かれ、北米と南米で HPS の原因となるウイルスが含まれる。HFRS ウイルスと同様に遺伝子型に

一致して異なった血清型に分類されることが予想されている。しかし、血清型鑑別には live virus を用いる中和試験が必要であるが、これまでに分離されている HPS ウイルスが限られた数であり、また、ウイルスの病原性が高いため、中和試験による解析がほとんど行われていない。このため、代替法として、組換え蛋白を抗原として用いる安全な血清診断法の開発が進められている。我々はこれまで多くの血清型のハンタウイルスの核蛋白（ヌクレオキャプシッド蛋白）を遺伝子工学的に調整し、スクリーニングと血清型鑑別抗原に応用し、病原性ハンタウイルスのすべてを検出するスクリーニング法と血清型を鑑別する診断法の確立を目指している。

本研究では、1) 抗原性が強く交差する4種類の血清型ハンタウイルス（いずれもネズミ亜科げっ歯類を自然宿主とする）- HTNV、SEOV、DOBV、THAIV - 鑑別診断抗原の特異性を実験感染ラット血清を用いて解析し、2) HPS 原因ウイルスのうちの3グループ（4種）を鑑別する組換え抗原のELISAへの応用性を解析し、3) さらに、より迅速かつ簡便な診断法の開発を目指して、これまでELISAに用いた抗原をイムノクロマトグラフィー法へ応用することを試みた。

B. 研究方法

抗原：

血清型鑑別診断ELISA用抗原として、各ハンタウイルス組換え核蛋白(NP)の全長（全長抗原）あるいはN末端の50から100アミノ酸を欠損したものをバキュロウイルス発現ベク

ター系を用いて昆虫細胞（High Five cell）中に発現させた。発現細胞を凍結融解、超音波処理したのち、抗原として用いた。イムノクロマト用抗原として、SEOV、PUUV およびANDVのNPのN末端、103アミノ酸を大腸菌にpET43.1ベクターを用いてNUSタグとともに発現させ、溶解・精製の後、イムノクロマト用抗原とした。

ELISA：

ELISAは基本的には既報の方法に従った(Araki et al J. Clin Microbiol. 2001)

イムノクロマト法：

グラスファイバーコンジュゲートパッド（GFCP103000、MILIPORE社）と展開担体として、Hi-Flow Plus 240 Membrane Card（MILIPORE社）を用いた。ヒト抗体検出にはProtein A 標識 Colloidal Gold（EY LABORATORIES）を、ラット抗体検出にはウサギ抗ラットIgG 標識 Colloidal Gold WRGH2（Wine red chemical社）を用いた。

ラットへの実験感染：

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56度30分の非働化し、血清学的解析に使用した。

血清：

HPS患者とげっ歯類血清をアルゼンチン国立ウイルス研究所のDeria Enria博士から分与された。HFRS患者血清、HFRSとHPSウイルス抗体陽性げっ歯類血清は研究分担者がこれまでの保存しているものを使用した。

(倫理面からの配慮について)

ヒト血清については保有研究施設等で予インフォームドコンセントを得た後、分与されたものである。用いた血清(動物血清は)の採血では、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものであり、動物福祉の観点からも問題はないと判断された。

C. 研究結果

1. ネズミ亜科げっ歯類由来ハンタウイルス-HTNV、SEOV、DOBV、THAIV- 型鑑別診断 ELISA の特異性解析：

実験感染ラットから得られた経過血清を用いて、血清型鑑別診断を実施したところ、感染初期の IgG 抗体では鑑別しがたいものの、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。また、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 抗体ではこの血清型鑑別抗原を用いても血清型鑑別を行うことが出来ず、本法は IgM 抗体では使用できないことも明らかとなった。

2. HPS 原因ウイルス、3 グループ (4 種) 鑑別 ELISA 組換え抗原の解析：

HPS ウイルスのうち、遺伝子グループ 1 の SNV、グループ 2 の CAZV およびグループ 3 の ANDV と LANV について N 末端の約 100 アミノ酸を削除した鑑別診断抗原を用いて、それぞれのウイルスに対するヒト血清とげっ歯類血清を用いて ELISA を実施した。その結果、いずれのウイルスに対する血清も、ホモの抗原に対してヘテロ抗原に対するよりも高

い吸光度を示し、鑑別診断が可能であった。

ヘテロの抗原に対する吸光度は、ホモの抗原に対する吸光度の 60% 以下であったことから、この割合をカットオフ値として鑑別診断が可能と考えられた。

3. イムノクロマトグラフィー法の開発：

SEOV、PUUV および ANDV 感染患者血清および SEOV 抗体陽性ラット血清を用いた解析では、いずれの血清に対しても明瞭な陽性バンドを検出することが出来、イムノクロマト法の基本的条件設定が完了した。また、SEOV、PUUV および ANDV 感染患者血清はそれぞれホモの抗原に対してのみ反応し、鑑別診断も可能であることが示唆された。

D. 考察

実験感染ラット血清を用いた経時的解析から、感染後 25 日以上経過した後の IgG 抗体で血清型特異抗体が増加すると考えられた。感染初期においては中和試験の結果の信頼度が低いことが既に報告されていることから、感染初期の型鑑別には、遺伝子配列情報の解析が必要であることが確認された。一般に、げっ歯類はハンタウイルスに持続感染することから、感染初期の検体を鑑別診断する割合は低いと考えられ、実際の使用には大きな支障はないと考えられる。むしろ、鑑別不能な場合、新規血清型ウイルスへの感染も示唆されるため、PCR 法等による遺伝子解析と併用することが必要であることが確認された。

HPS ウイルスに関しては、5 つの遺伝子グループのうち 3 グループについて鑑別が可能

であった。残りの2グループのうちの一つに分類される BCCV については、抗原が作成されていないが、抗 BCCV 血清は鑑別することが可能であったため、本 ELISA は、全ての血清型の HPS ウイルスに対する感染を鑑別出来ることが示唆される。また、ANDV と LANV は同一グループに属するが ANDV の病原性が LANV に比べて明らかに強い。両ウイルスは、地域的に共通したエリアで流行しているため、両者の鑑別診断は治療法の選択等のために必要である。本鑑別 ELISA では、ANDV と LANV 感染を鑑別することが可能であったことから、両ウイルスが流行している、アルゼンチンでの疫学的研究への応用が期待出来る。

ハンタウイルス抗体検出のための、イムノクロマト法が大腸菌発現組み換え NP (N 末端 103 アミノ酸抗原) を用いて確立された。未だ、基礎的条件の検討段階であるが、SEOV、PUUV および ANDV 感染患者血清はそれぞれホモの抗原に対してのみ反応したことから、3種類のイムノクロマト試験によって、全てのハンタウイルス感染をスクリーニング、かつ、HFRS もしくは HPS 症例の区別も可能であることが示唆された。特に、HFRS と HPS 双方の侵入が危惧海外からの輸入症例等の検査に有用と考えられた。

E. 結論

近年、我が国でのハンタウイルス感染例の報告はないが、近隣諸国や世界的にもハンタウイルスは流行しており、輸入症例の出現する可能性に常に配慮する必要がある。とくに、南北アメリカ大陸で流行している HPS は

経過が早くかつ重症になりやすいため、早期診断が求められている。このような状況のなかで、本研究で示した各種診断抗原やスクリーニングおよび鑑別診断用抗原の開発は、本疾患に対する公衆衛生対策上必要であると考えられる。

健康危険情報

なし

F. 研究発表

1.論文発表

(1) Li TC, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Arikawa J, Koma T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Mai le TQ, Hoa NT, Yamashiro T, Hasebe F, Takeda N, Wakita T : Characterization of self-assembled virus-like particles of rat hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *J Gen Virol* 92(Pt 12), 2830-7, 2011

(2) Yasuda SP, Yoshimatsu K, Koma T, Shimizu K, Endo R, Isozumi R, Arikawa J : Application of Truncated Nucleocapsid Protein (N) for Serotyping ELISA of Murinae-Associated Hantavirus Infection in Rats. *J Vet Med Sci* 74(2), 215-9, 2012

2.学会発表

(1) Shimizu K, Yoshimatsu K, Koma T, Yasuda SP, Arikawa J : Role of hantavirus nucleocapsid protein in intracellular traffic of glycoprotein's. XV International Congress of Virology, Sapporo (2011, 9)

(2) Yasuda SP, Yoshimatsu K, Endo R, Shimizu K, Koma T, Isozumi R, Arikawa J : Development of the method for monitoring cytotoxic Tlymphocyte (CTL) responses to hantaivurs in laboratory rats. XV International Congress of Virology, Sapporo (2011, 9)

(3) Koma T, Yoshimatsu K, Shimizu K, Yasuda SP, Isozumi R, Arikawa J : Analysis of pulmonary edema in hantavirus-infected SCID mouse. XV International Congress of Virology, Sapporo (2011, 9)

(4) Nakamura I, Hang'Ombe BM, Sawa H, Takada A, Yoshimatsu K, Arikawa J, Sugimoto C : Sero-surveillance of hantavirus in rodents captured in Zambia, in 2010. XV International Congress of Virology, Sapporo (2011, 9)

(5) Li TC, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Arikawa J, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Wakita T : Characterization of virus-like particles of rat hepatitis E virus generated by recombinant baculovirus. XV International Congress of Virology, Sapporo (2011, 9)

(6) Isozumi R, Yoshimatsu K, Pattamadilok S, Kumperasart S, Arikawa J : Seroprevalence of anti-leptospira antibodies among patients with acute febrile illness with renal dysfunction in spite of negative result with several laboratorial leptospira tests in Thailand. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Sapporo (2011, 9)

(7) 清水健太、吉松組子、駒貴明、安田俊平、有川二郎 : ハンタウイルス糖蛋白質の細胞内輸送に関与するウイルス蛋白質とその機能領域. 第152回日本獣医学会学術集会, 堺 (2011, 9)

(8) Arikawa J, Yoshimatsu K and Kariwa H : Truncated hantavirus nucleocapsid proteins as useful diagnostic antigen for serotyping old and new world hantavirus infections in humans and rodents. 6th European Meeting on Viral Zoonoses, St Raphael, France (2011, 10)

(9) Arikawa J : Prevalence of Hantavirus Infection among Humans and Animals in Vietnam. The Scientific Conference "Pasteur Institute in Ho Chi Minh City- 120 Years for Control and Prevention of Communicable Diseases", Ho Chi Minh City, Vietnam (2011, 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

ハンタウイルス感染症の疫学に関する研究

研究分担者 苅和宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 准教授

研究要旨

ハンタウイルスはげっ歯類を病原巣動物として自然界に分布し、人が感染すると腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)などの重篤な疾病を引き起こす。ハンタウイルスには様々なウイルスが知られているが、遺伝子性状や抗原性状はウイルスごとに大きく異なっている。中国、韓国、ロシア、ヨーロッパ諸国などのユーラシア大陸では HFRS が流行しているのに対し、米国やアルゼンチンなど、南北アメリカ大陸の諸国では HPS が多発している。我が国でも、1960年代から 1984 年までドブネズミや実験用ラットを介した Seoul ウイルス(SEOV)による HFRS の発生があったが、1985 年以降は患者の発生報告は無い。しかし、その後も日本各地で SEOV 感染ドブネズミの流行巣が見つかった。また、北海道ではタイリクヤチネズミ(亜種名:エゾヤチネズミ)が保有する Hokkaido ウイルス(HOKV)が広く分布している。

そこで、近年の日本におけるげっ歯類のハンタウイルス感染状況を調べるために、1994 年から 2011 年にかけて野生げっ歯類を対象とした全国規模の血清疫学調査を実施した。今回検査した 1658 例のげっ歯類はいずれも、SEOV や Hantaan ウイルス(HTNV)のようなヒトに病原性を示すハンタウイルスに対する抗体を保有しておらず、近年日本で HFRS の発生が見られないという事実とよく一致していた。一方、北海道で捕獲されたエゾヤチネズミ(タイリクヤチネズミの亜種)の 7.67%(27/ 352)とアカネズミ 1.19%(2/ 168)が HOKV に対する抗体を保有していた。

さらに、北海道、サハリンおよびハバロフスクのタイリクヤチネズミ由来ウイルスの遺伝子解析を行ったところ、3 地域のウイルスは検出地点に依存して 3 系統のウイルス群に分類されたが、ハバロフスクのウイルス群は他の 2 地域のものとは明らかに系統が異なることが判明した。したがって、タイリクヤチネズミ由来のウイルスには、起源の異なる複数のウイルスが含まれる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ハンタウイルスはげっ歯類およびトガリネズミ類を自然宿主とする、マイナスイオン鎖の RNA ウイルスで、HTNV、SEOV、Amur ウイルス(AMRV)、Puumala ウイルス(PUUV)、Sin Nombre ウイルス(SNV)など 50 種類以上のウイルスの存在が知ら

れている。げっ歯類を自然宿主とするハンタウイルスが人に感染すると腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)などの重篤な疾患を引き起こす。

我が国におけるハンタウイルス感染症の流行

は、1960年代の大阪梅田熱として知られるドブネズミを病原巣とする HFRS の発生と、1970年代から1984年にかけて全国の実験動物施設における実験用ラットを病原巣とする HFRS の流行が知られている。その後、日本において HFRS の発生は見られていないものの、東京、神戸、名古屋、小樽など、全国の主たる港湾地区を中心として、ドブネズミが SEOV を保有していることが1990年代までの調査では報告されている。さらに、北海道においては、エゾヤチネズミ (*Myodes rufocanus bedfordiae*) が Puumala ウイルスに近縁な Hokkaido ウイルス (HOKV) を保有していることが明らかになっている。

そこで、本研究では、1994年から2011年にかけて日本中から広くげっ歯類の検体を収集し、近年の日本におけるげっ歯類のハンタウイルス感染状況を調査した。また、北海道、サハリン、およびロシアのハバロフスク地方でげっ歯類の疫学調査を行い、抗体陽性のタイリクヤチネズミおよびエゾヤチネズミの臓器からハンタウイルス遺伝子を検出して、地理的由来地の異なる HOKV の遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

1. げっ歯類の捕獲と血清の採取

1994年から2011年に日本各地の山林、港湾、下水道、養鶏場、食品工場などで捕獲されたげっ歯類とトガリネズミ類、合計1658例から血清を採取し、抗ハンタウイルス抗体の検索を行った。捕獲した動物からの採血は、採材時まで生存していた個体についてはエーテル麻酔後心臓採血を行い、既に死亡していたものについては開胸後、採血用濾紙 (TOYO) を心

臓や肺に押し付けて血液を吸収することにより採血を行った。なお、本研究では、当教室で捕獲したげっ歯類の検体の他に、本学大学院獣医学研究科の毒性学教室および野生動物学教室、小樽検疫所、富山県衛生検査所、西宮市保健所より提供を受けたげっ歯類の血清をも検体として用いた。

2. ELISA による抗体検出

抗原性の異なる3種類のハンタウイルス (AMRV、HOKV、SNV) の核蛋白を Nus A との融合蛋白として大腸菌中で発現させ (rNP)、それぞれが $0.5 \mu\text{g/ml}$ となるように混合して PBS により希釈して抗原液とした (混合抗原)。これを96穴平底プレートに各穴 $50 \mu\text{l}$ ずつ分注して、 4°C で一晩吸着させた。また、陰性抗原として Nus A を PBS で $1.5 \mu\text{g/ml}$ に希釈して同様に用いた。その後、牛血清アルブミンを3%加えた PBS を各穴 $200 \mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C で1時間静置してブロッキングした。これを各穴 $200 \mu\text{l}$ の 0.05% Tween20 加 PBS (PBST) で3回洗浄した後、PBST で200倍に希釈した被検血清を各穴 $50 \mu\text{l}$ ずつ加えて、 37°C で1時間静置した。再度 PBST で3回洗浄した後、検出用標識試薬として、*Rattus* 属のげっ歯類血清の検査の際はペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG (Cappel) を、その他のげっ歯類血清の検査の際にはペルオキシダーゼ標識 Protein G (Prozyme) を、それぞれ PBST で4,000倍に希釈して各穴 $50 \mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C で1時間静置した。その後、PBST で4回洗浄し、オルトフェニレンジアミン二塩酸塩 (OPD) 試薬 (Sigma) を 10mg 当たり超純水 6ml に溶解し、過酸化水素 (H_2O_2) を $4 \mu\text{l}$ 加えたものを各

穴 95 μ l ずつ加えた。37°C で 30 分間発色させた後、405nm の吸光度から 630nm の吸光度を引いた値を測定し、混合抗原の値から陰性抗原の値を引いたものを本試験の OD 値とした。

3. IFA による野生げっ歯類の血清における抗 ハンタウイルス抗体の検出

AMRV、HTNV、SEOV および Puumala virus (PUUV) を感染させた Vero E6 細胞を 24 穴スライドに巻き、冷アセトンで固定したものを抗原スライドとした。PBS で 2 倍階段希釈したげっ歯類血清を各ウェル 15 μ l ずつ載せ、37°C で 1 時間反応させ、PBS で洗浄した。次に、エゾヤチネズミの血清サンプルについては 1,000 倍に希釈した Alexa Fluor® 488 蛍光色素標識 Protein G (Molecular Probes Inc.) を、アカネズミの血清サンプルについては 1,000 倍に希釈した Alexa Fluor® 488 蛍光色素標識抗マウス IgG (Molecular Probes Inc.) を、ドブネズミおよびクマネズミの血清サンプルについては 80 倍に希釈した FITC 蛍光色素標識抗ラット IgG (Bioscience) を各穴 20 μ l ずつ載せて 37°C で 1 時間反応させた。洗浄後、緩衝グリセリン液 [PBS:グリセリン=1:9] を載せてカバーガラスで封入し、蛍光顕微鏡下で観察した。細胞質内に顆粒状の蛍光が散在するものについて抗体陽性とした。

4. RT-PCR による野生げっ歯類の肺からのハ ンタウイルス遺伝子の検出

げっ歯類の肺と培養細胞から、Isogen (ニッポンジーン) を用いて RNA を抽出し、ランダムプライマー (Invitrogen) と Superscript II (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として Platinum Taq DNA

Polymerase High Fidelity (Invitrogen) を用いて PCR 反応を行い、ハンタウイルス遺伝子の増幅を行った。

5. ハンタウイルス遺伝子の塩基配列の決定

ハンタウイルス S および M 遺伝子の塩基配列を決定するために、PCR によるウイルス遺伝子の増幅後、PCR 産物を電気泳動した。Gel Indicator™ (BioDynamics Laboratory Inc.) でゲルを染色した後目的のバンドを切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) を用いて PCR 産物を精製した。この精製 PCR 産物を鋳型にサーマルシーケンスを行い、ハンタウイルス遺伝子の塩基配列を決定した。

6. 遺伝子解析と系統樹解析

S、M および L 遺伝子の塩基配列を決定後、GENETYX-MAC version 10.1 (Software Development Co. Ltd.) により既知のハンタウイルス遺伝子との一致率を求めた。近隣接合法 (NJ 法) を用いてハンタウイルス各遺伝子の多重解析を行い、MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 4.0 プログラムパッケージを使用して系統樹を作成した。

7. フォーカス減少中和試験 (FRNT)

培地で 2 倍階段希釈した被検血清と同量のウイルス液を混合し、37°C で 1 時間、5% CO₂ 条件下で反応させた。その混合液 50 μ l を 96 ウェル平底マイクロプレート (Nalge Nunc International K.K.) 上に単層培養した Vero E6 細胞 (4.0×10^4 個/ウェル) に重層し、再び 37°C で 1 時間、5% CO₂ 条件下で反応させた後、重層液を除去し、Dulbecco's Modified Eagle Medium L-Glutamine[+] (Gibco) にカルボキ

シメチルセルロースおよび FBS をそれぞれ 1.5%および 5%になるように添加した培地を各ウェル 300 μ l 重層し、37°C、5%CO₂ 条件下で 5 日間培養した。培地を除去後、PBS で 1 回洗浄後、メタノールを各ウェル 100 μ l 加えて 15 分間静置し、細胞を固定した。このプレートを IFA で染色し、フォーカス数を数えた。中和抗体価は、被検血清のフォーカス数が血清対照ウェルのフォーカス数より 80%以上減少した最高の血清希釈倍率の逆数で表した。中和抗体価は、被検血清(もしくは MAb、マウス感染血清)のフォーカス数が血清対照ウェルのフォーカス数より 80%以上減少した最高の血清希釈倍率の逆数で表した。

(倫理面からの配慮について)

該当なし。

C. 研究結果

Rattus 属げっ歯類における血清疫学調査

2005 年から 2011 年までの間に北海道、神奈川県、新潟県、兵庫県など 20 の都道府県において合計 840 例の *Rattus* 属げっ歯類(ドブネズミとクマネズミ)が捕獲され、それらについて抗ハンタウイルス抗体の保有状況を調査した。まず、AMRV、HOKV および SNV の混合抗原を用いた ELISA を実施したところ、OD 値 0.1 未満を示す血清が全体の約 9 割(751 例)を占め、0.1 以上 0.2 未満が 60 例、0.2 以上が 29 例であった。OD 値 0.1 以上を示す 89 検体について、さらに IFA により抗体保有の確認を行ったところ、いずれも陰性を示した。したがって、今回、検査を行った *Rattus* 属げっ歯類 840 例は全てハンタウイルス感染陰性と判定し

た。

本州の野鼠における血清疫学調査

2005 年から 2009 年までの間に富山県、島根県、兵庫県の 3 地域で合計 113 例の野鼠が捕獲され、それらについて抗ハンタウイルス抗体の保有状況を調査した。混合抗原を用いた ELISA における OD 値の分布は、0.1 未満が 88 例、0.1 以上 0.2 未満が 16 例、0.2 以上が 9 例であり(図 3)、OD 値 0.1 以上を示した 25 例は全てアカネズミであった。OD 値 0.2 以上を示した 25 検体について、3 種類の抗原を単独で使用する ELISA もしくは IFA で抗体の保有の有無を確認したところ、いずれも陰性であった。したがって、本州の 3 地域で捕獲された野鼠については 113 例全てをハンタウイルス感染陰性と判定した。

北海道の野鼠およびトガリネズミ類における血清疫学調査

1994 年から 2010 年までの間に北海道内の 13 地域で合計 705 例の野鼠およびトガリネズミ類が捕獲され、それらについて抗ハンタウイルス抗体の保有状況を調査した。

1) エゾヤチネズミ(タイリクヤチネズミの亜種名) 今回の調査で捕獲されたエゾヤチネズミ 352 例について、混合抗原を用いた ELISA を行った。まず、抗体保有の有無がすでに判明しているエゾヤチネズミの血清を用いて本 ELISA の cut-off 値を 0.14 と定め、この cut-off 値を上回る 27 例(7.67%)を抗体陽性と判定した。これらの抗体陽性エゾヤチネズミの雌雄比を見ると、およそ 4 対 1 の割合で雄が多かった。また、今回の疫学調査では、北海道内の殆どの調査地点で抗体陽性例が検出されており、抗体保有状況に地理的な偏りは見られなかった(図 1)。

次に、抗体陽性エゾヤチネズミのうち臓器が入手できた25例についてRT-PCRを行った。エゾヤチネズミの肺から抽出した全RNAを鋳型として逆転写反応を行い、PCRによりウイルスのS遺伝子の増幅を試みた。その結果、25例中21例(84.0%)からS遺伝子が検出された。さらに、S遺伝子陽性のサンプルについてはM遺伝子についても増幅を試みたところ、S遺伝子陽性の21例中16例(76.2%)からM遺伝子が検出された。

2) アカネズミ

北海道における疫学調査で捕獲されたアカネズミ168例について混合抗原を用いたELISAを行ったところ、OD値0.1以上を示したサンプルは4例のみで、残りの164例はいずれもOD値0.1未満であった。OD値0.1以上を示した検体のうち、斜里町の2例は80%フォーカス減少中和試験でPUUVのSamara94株に対して320倍と1280倍の中和抗体価を示した。一方、ハントウアカネズミを自然宿主とするAMRVのAP209株に対する中和抗体価は、いずれも80倍以下であった。次に、これらのアカネズミの肺からRNA抽出を行い、HOKVに特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ1例からHOKVのS遺伝子が検出された。以上の成績から、北海道のアカネズミは168例中2例(1.19%)にHOKVの感染があったものと考えられた。

3) ヒメネズミ、ミカドネズミおよびトガリネズミ類

ヒメネズミ、ミカドネズミおよびトガリネズミ類185例はいずれも混合抗原を用いたELISAでOD値が0.1未満であったため、全例を抗ハンタウイルス抗体陰性と判定した。

ハンタウイルスのSおよびM遺伝子に基づく系統樹解析

北海道のエゾヤチネズミとアカネズミ、および極東ロシアのタイリクヤチネズミからウイルス遺伝子が検出された。これらウイルス遺伝子に関して、S遺伝子については269番目から707番目までの約440塩基、M遺伝子については1659番目から2223番目までの約560塩基の塩基配列を決定した。決定された塩基配列はNJ法により系統樹を作成した(図2)。S遺伝子、M遺伝子のいずれにおいても、HOKVは検出地点に依存してハバロフスク(HOKV-Kha)、サハリン(HOKV-Sak)、北海道(HOKV-Hok)の3系統に分かれた。これらのHOKVの3系統は、HOKV-HokとHOKV-Sakが遺伝学的に最も近く、HOKV-Khaは両系統に対して類縁関係が明らかに離れていた。また、北海道内で検出されたウイルス同士の遺伝学的距離と検出地点の地理的距離との間には明瞭な相関関係は見られなかった。

D. 考察

ハンタウイルス感染症は野生げっ歯類が病原巣動物となること、ウイルスごとに固有のげっ歯類を宿主とすることなどから、げっ歯類と人における疫学調査を行うことにより、HFRSおよびHPSの予防対策に有用な情報を得ることができる。

そこで、本研究ではまず、かつて我が国で流行したHFRSの感染源となったドブネズミやクマネズミなどの*Rattus*属げっ歯類について、全国規模の血清疫学調査を実施した。2005年から2011年までの6年間で20の都道府県から合計840例の野生の*Rattus*属げっ歯類を収集し、ELISAにより血清中の抗ハンタウイルス抗体の検出を試みたが、840例全てが抗体陰性と診断された。したがって、近年の我が国における*Rattus*属げっ歯類

のハンタウイルス感染率は極めて低いことが明らかになった。わずか 20 年前までは日本でも、小樽、横浜、神戸など 10 以上の港湾地域や、函館に近い旧上磯町のゴミ埋め立て地、さらに、名古屋の市街地でも抗 SEOV 抗体陽性のドブネズミが捕獲されており、実際にウイルスが分離されている地域もある。今回の疫学調査では、我が国の *Rattus* 属げっ歯類において SEOV の感染が全く検出されなかった。なぜ、日本から SEOV 感染ネズミ集団がいなくなったのか正確な理由は不明であるが、土地利用の変化やごみ処理法の変化、ネズミの駆除などによってハンタウイルス陽性集団が縮小した、あるいは排除されたのかもしれない。いずれにしても、今回の疫学調査の成績は、近年我が国において HFRS の発生が見られないことをよく裏付けていると言えるだろう。

次に、*Rattus* 属以外の野生げっ歯類およびトガリネズミ類についても同様の調査を実施したところ、本州で捕獲された 113 例は全て抗体陰性であった。一方、北海道ではエゾヤチネズミの 7.67% (27/ 352) とアカネズミの 1.19% (2/ 168) がハンタウイルスに対する抗体を保有しており、その全例が HOKV の感染であることが判明した。エゾヤチネズミは HOKV の宿主として自然界で安定して本ウイルスを保持していることが再確認された。一方、アカネズミはエゾヤチネズミから偶発的に HOKV の感染をうけたものと考えられた。今回の調査では北海道内の殆どの調査地点で抗体陽性野鼠が捕獲されており(図 1)、本ウイルスが道内でかなり広域に亘って分布していることが示唆された。

また、S および M 遺伝子の部分的配列に基づく系統樹解析により、サハリンと北海道由来の

HOKV は共通の系統から分化していたのに対し、ハバロフスクの HOKV は PUUV と他の HOKV の共通祖先から分化した可能性が示された(図 2)。

これまで北海道、サハリンおよびハバロフスクのタイリクヤチネズミ由来のハンタウイルスは宿主が同じであることから、全て HOKV に属していると考えられてきた。しかし、系統樹解析の結果から HOKV-Kha は他の 2 地域のウイルスとは系統の異なるウイルスであり、今後別のハンタウイルスとして分類される可能性もある。

現在のところ、人での HOKV 感染は報告されていないが、PUUV の構造タンパク質中のアミノ酸の一致率は 90%を超えることから、今後も本ウイルスのげっ歯類における継続的な疫学調査を行うとともに、一般住民における抗体調査も実施する必要があると考えられる。

E. 結論

日本国内で捕獲された *Rattus* 属げっ歯類(ドブネズミおよびクマネズミ)の 840 例中、全例が抗ハンタウイルス抗体陰性であった。また、*Rattus* 属以外の野鼠については、本州で捕獲された 113 例がいずれも抗体陰性であったのに対し、北海道で捕獲された 705 例のうちエゾヤチネズミの 7.67% (27/ 352) とアカネズミの 1.19% (2/ 168) が HOKV に対する抗体を保有していた。したがって、本州以南の日本では、げっ歯類におけるハンタウイルス感染率は極めて低いことが示唆された。一方で、北海道ではエゾヤチネズミが高率に HOKV を保有しており、北海道内で広範囲に亘って感染個体が検出された。

北海道、サハリンおよびハバロフスクのタイリクヤチネズミ由来ウイルスの遺伝子解析と系統樹

解析を行ったところ、これらのウイルスは検出地点に依存して 3 系統に分かれ、さらにハバロフスクのウイルスは他の 2 地点のウイルスよりも系統がかなり異なることが判明した。また、北海道内で検出されたウイルス間では、遺伝学的な近縁性が非常に高かった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kariwa, H., Yoshida, H., Sanchez-Hernandez, C., Romero-Almaraz, M.D., Almazan-Catalan, J.A., Ramos, C., Miyashita, D., Seto, T., Takano, A., Totani, M., Murata, R., Saasa, N., Ishizuka, M., Sanada, T., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I.: Genetic diversity of hantaviruses in Mexico: Identification of three novel hantaviruses from Neotominae rodents. *Virus Res.* epub ahead of print, 2011
- 2) Seto, T., Nagata, N., Yoshikawa, K., Ichii, O., Sanada, T., Saasa, N., Ozaki, Y., Kon, Y., Yoshii, K., Takashima, I. and Kariwa, H.: Infection of Hantaan virus strain AA57 leading to pulmonary disease in laboratory mice. epub ahead of print, 2011
- 3) Omori-Urabe, Y., Yoshii, K., Ikawa-Yoshida, A., Kariwa, H. and Takashima, I.: Needle-free jet injection of DNA and protein vaccine of the Far-Eastern subtype of Tick-borne encephalitis virus induced protective immunity in mice. *Microbiol. Immunol.* epub ahead of print, 2011
- 4) Totani, M., Yoshii, K., Kariwa, H. and Takashima, I.: Glycosylation of the Envelope Protein of West Nile Virus Affects Its Replication in Chicks. *Avian Diseases.* 55: 561-568, 2011
- 5) Takano, A., Yoshii, K., Omori-Urabe, Y., Yokozawa, K., Kariwa, H. and Takashima, I.: Construction of a replicon and an infectious cDNA clone of the Sofjin strain of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. *Arch. Virol.* 156: 1931-1941, 2011
- 6) Sanada, T., Kariwa, H., Nagata, N., Tanikawa, Y., Seto, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K. and Takashima, I.: Puumala virus infection in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) resembling hantavirus infection in natural rodent hosts. *Virus Res.* 160: 108-119, 2011
- 7) Murata, R., Hashiguchi, K., Yoshii, K., Kariwa, H., Nakajima, K., Ivanov, L.I., Leonova, G.N. and Takashima, I.: Seroprevalence of West Nile Virus in Wild Birds in Far Eastern Russia Using a Focus Reduction Neutralization Test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84: 461-465, 2011
- 8) Ikawa-Yoshida, A., Yoshii, K., Kuwahara, K., Obara, M., Kariwa, H. and Takashima, I.: Development of ELISA system for tick-borne encephalitis virus infection in rodents. *Microbiol. Immunol.* 55: 100-107, 2011
- 9) Seto, T., Tkachenko, E.A., Morozov, V.G.,

- Tanikawa, Y., Kolominov, S.I., Belov, S.N., Nakamura, I., Hashimoto, N., Kon, Y., Balakiev, A.E., Dzagurnova, T.K., Medvedkina, O.A., Nakauchi, M., Ishizuka, M., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Ivanov, L.V., Arikawa, J., Takashima, I. and Kariwa, H.: An Efficient in vivo Method for THE Isolation OF PUUMALA VIRUS IN SYRIAN Hamsters and the Characterization of the isolates from russia. J. Virol. Methods. 173: 17-23, 2011
- 10) 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. 73: 409-412, 2011
- 11) 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.155: 61-68, 2011
- 12) 好井健太郎、持舘景太、苅和弘明、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、獣医畜産新報、64: 801-803, 2011
- 13) 苅和宏明、好井健太郎、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎、公衆衛生、75: 36-38, 2011
- 2.学会発表
- 1) 瀬戸隆弘、吉川佳佑、真田崇弘、Ngonda Saasa、尾崎由佳、市居修、好井健太郎、昆泰寛、苅和宏明：腎症候性出血熱の致死感染モデルの開発とその病態解析：第 151 回の本獣医学会、東京(2011, 3)
- 2) 好井健太郎、寸田祐嗣、横澤香菜、苅和宏明、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を用いた病態発現機序の解析：第 15 回日本神経ウイルス研究会、金沢(2011, 5)
- 3) 好井健太郎、森藤可南子、永田典代、浅野淳、佐々木宣哉、苅和宏明、安居院高志、高島郁夫：野生マウス由来 *Oas* 遺伝子座導入コンジェニックマウスの作製とフラビウイルス抵抗性の解析：第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、金沢(2011, 5)
- 4) Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Kariwa, H., Holbrook, M.R. and Takashima, I.: CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF CHIMERIC VIRUS BETWEEN TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS AND OMSK HEMORRHAGIC FEVER VIRUS: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 5) Yamazaki, S., Yoshii, K., Mottate, K., Murata, R., Sanada, T., Kariwa, H. and Takashima, I.: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN HOKKAIDO, JAPAN IN 2008: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 6) Yanagihara, N., Yoshii, K., Goto, A., Ikawa, A., Ishizuka, M., Kariwa, H. and Takashima I.: ROLE OF THE N-LINKED GLYCAN OF

- ENVELOPE PROTEIN OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN THE VIRUS REPLICATION AND PATHOGENICITY: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 7) Seto, T., Nagata, N., Yoshikawa, K., Ichii, O., Sanada, T., Saasa, N., Kon, Y., Yoshii, K., and Kariwa, H.: DEVELOPMENT OF THE LETHAL ANIMAL MODEL OF HUMAN HANTAVIRUS INFECTION: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
 - 8) Sanada, T., Seto, T., Ozaki, Y., Saasa, N., Yoshii, K., and Kariwa, H.: HIGH SUSCEPTIBILITY OF CULTURED CELLS DERIVED FROM THE KIDNEY OF GRAY RED-BACKED VOLE (*MYODES RUFOCANUS*) TO PUUMALA VIRUS AND OTHER HANTAVIRUSES: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
 - 9) Ozaki, Y., Sanada, T., Seto, T., Taylor, K., Saasa, N., Ivanov, L.I., Yoshii, K., Tubota, T., Ikenaka, Y., Ishizuka, M., Arikawa, J. and Kariwa, H.: EPIZOOTIOLOGICAL INVESTIGATION OF HANTAVIRUS INFECTION IN JAPAN AND GENETIC VARIATION OF HOKKAIDO VIRUS IN MYODES RUFOCANUS: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
 - 10) Saasa, N., Sánchez-Hernández, C., Romero-Almaraz, M. de L., Yoshida, H., Sanada, T., Seto, T., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. Takashima, I. and Kariwa, H.: THE IDENTIFICATION OF THE RODENT RESERVOIR OF MONTANO VIRUS, A NOVEL HANTAVIRUS IN MEXICO: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
 - 11) Kariwa, H., Seto, T., Yoshikawa, K., Tkachenko, T.E.A., Morozov, V.G., Ivanov, L. I., Slonova, R., Zakharycheva, T. A., Yoshii, K. and Takashima I: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HANTAVIRUSES FROM WILD RODENTS AND EPIDEMIOLOGY OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME IN RUSSIA: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
 - 12) Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Kariwa, H., Holbrook, M.R. and Takashima, I.: CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF CHIMERIC VIRUS BETWEEN TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS AND OMSK HEMORRHAGIC FEVER VIRUS: The 3rd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2011. Sapporo (2011. 9)
 - 13) Seto, T., Nagata, N., Yoshikawa, K., Ichii, O., Sanada, T., Saasa, N., Kon, Y., Yoshii, K., and Kariwa, H.: DEVELOPMENT OF THE LETHAL ANIMAL MODEL OF HUMAN HANTAVIRUS INFECTION: The 3rd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2011. Sapporo (2011. 9)
 - 14) Sanada, T., Seto, T., Ozaki, Y., Saasa, N., Yoshii, K., and Kariwa, H.: HIGH

- SUSCEPTIBILITY OF CULTURED CELLS DERIVED FROM THE KIDNEY OF GRAY RED-BACKED VOLE (MYODES RUFOCANUS) TO PUUMALA VIRUS AND OTHER HANTAVIRUSES: The 3rd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2011. Sapporo (2011. 9)
- 15) Saasa, N., Sánchez-Hernández, C., Romero-Almaraz, M. de L., Yoshida, H., Sanada, T., Seto, T., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. Takashima, I. and Kariwa, H.: THE IDENTIFICATION OF THE RODENT RESERVOIR OF MONTANO VIRUS, A NOVEL HANTAVIRUS IN MEXICO: The 3rd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2011. Sapporo (2011. 9)
 - 16) 山崎翔子、好井健太郎、真田崇弘、苅和宏明、高島郁夫: 2008 年北海道で分離されたダニ媒介性脳炎ウイルス Oshima 08-AS 株の病原性解析: 第 152 回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
 - 17) 好井健太郎、森藤可南子、永田典代、佐々木宣哉、苅和宏明、安居院高志、高島郁夫: 野生マウス由来 *Oas* 遺伝子座導入コンジェニックマウスにおけるダニ媒介性脳炎ウイルスの神経病原性の解析: 第 152 回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
 - 18) 柳原なつみ、好井健太郎、石塚万里子、苅和宏明、高島郁夫: ダニ媒介性脳炎ウイルスの E 蛋白糖鎖は哺乳動物細胞におけるウイルス粒子分泌に影響する: 第 152 回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
 - 19) 尾崎由佳、萩谷友洋、真田崇弘、瀬戸隆弘、Taylor Kyle、吉川佳佑、Ivanov Leonid、好井健太郎、坪田敏男、池中良徳、石塚真由美、吉松組子、有川二郎、苅和宏明: 日本のげっ歯類のハンタウイルス感染状況に関する血清疫学調査とエゾヤチネズミが保有する Hokkaido ウイルスの遺伝的多様性: 第 152 回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
 - 20) 真田崇弘、瀬戸隆弘、尾崎由佳、Saasa Ngonda、好井健太郎、苅和宏明: エゾヤチネズミ (*Myodes rufocanus*) の腎臓由来細胞系の確立と Hokkaido ウイルス分離への応用: 第 152 回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
 - 21) 川岸崇裕、日向亮輔、加藤文博、好井健太郎、高島郁夫、三浦智行、五十嵐樹彦、小林剛: 新規相同組換え技術による組換えダニ媒介性脳炎ウイルスの構築: 第 152 回日本獣医学会、大阪(2011, 9)
 - 22) 好井健太郎、山崎翔子、持舘景太、苅和宏明、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 11 回人と動物の共通感染症研究会学術集会、東京(2011, 11)
 - 23) 境瑞紀、好井健太郎、高野絢子、大森優紀、横澤香菜、苅和宏明、高島郁夫: リバースジェネティクスを用いた極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの病原性決定因子の解析: 第 18 回トガ・フラビ・ペステウイルス研究会 (2011, 11)
 - 24) 日向亮輔、川岸崇裕、加藤文博、好井健太郎、高島郁夫、三浦智行、五十嵐樹彦、小林剛: フラビウイルスにおける宿主 DNA 修復機構を用いた新規リバースジェネティクス系の開発: 第 18 回トガ・フラビ・ペステウイルス研究会(2011, 11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

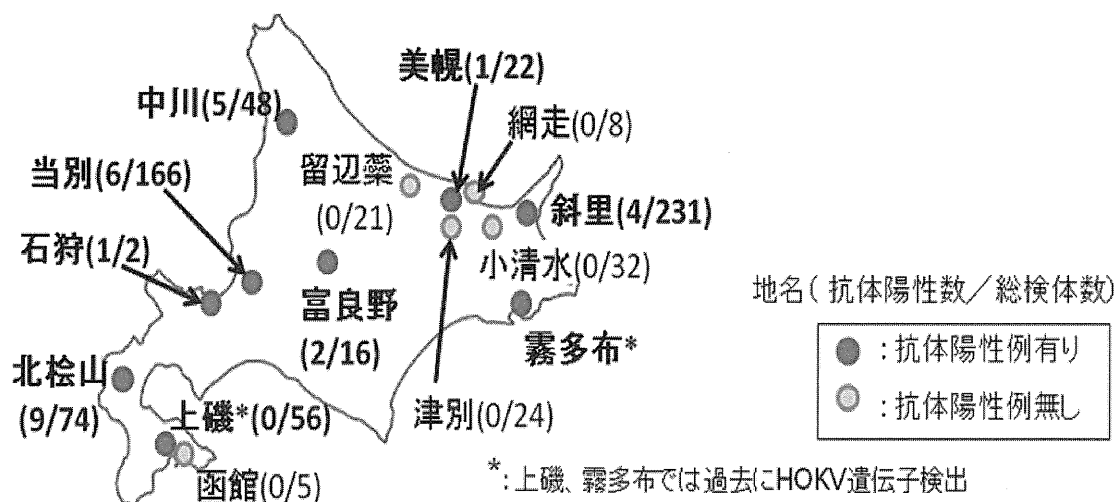


図1. 北海道の野生げっ歯類における抗ハンタウイルス抗体の検出状況

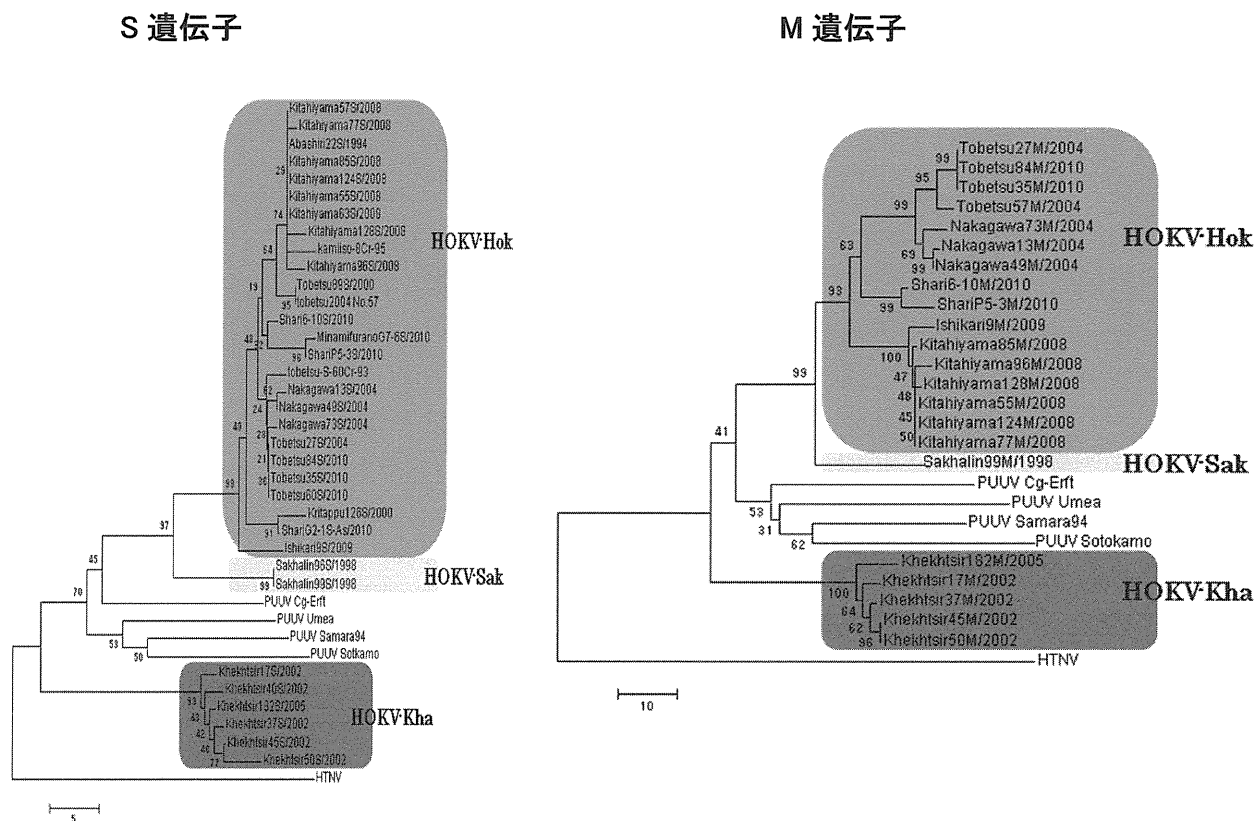


図2. タイリクヤチネズミ由来ハンタウイルスの系統樹解析

厚生労働科学研究費補助金(地球規模保健課題推進研究事業(国際医学協力研究事業))
分担研究報告書

ウイルス性出血熱の診断法の開発に関する研究
ナイジェリアの霊長類におけるエボラウイルスに対する抗体保有状況に関する調査

研究分担者 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部長
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
研究協力者 David N Bukbuk マイドゥーグリ大学科学科微生物学教室・准教授

研究要旨: ナイジェリア国西部の国立公園内に生息する霊長類(サル)の血清中のエボラウイルスに対する抗体保有状況を、エボラウイルス組換え核蛋白を抗原とした ELISA を用いて調査した。34 個体の血清について調査したところ、3 検体(約 9%)が陽性と判定された。調査検体数が少なく、ナイジェリア国の霊長類におけるエボラウイルス感染状況について結論は得られないが、同国におけるエボラウイルス感染症の疫学について明らかにするためには、更なる調査が必要であることが示された。

A. 研究目的

エボラウイルスによるエボラ出血熱は、アフリカ中央部の熱帯雨林地域および西部地域(コンゴ民主共和国、ガボン、ウガンダ、スーダン、アイボリーコースト)で発生している。コンゴ民主共和国やガボンでは、エボラウイルスによる出血熱のために、特定の地域のゴリラが絶滅の危機に瀕している。エボラウイルスの宿主は、これらの地域に生息するオオコウモリであると推測されているが、霊長類もヒトと同様にエボラウイルス感染により出血熱を引き起こす。本研究では、ナイジェリア国西部の国立公園に生息する霊長類(サル、種は不明)におけるエボラウイルスに対する抗体保有状況について検討した。

B. 研究方法

1. 血清

ナイジェリア国西部の国立公園に生息

するサル血清 34 検体を用いた。これらの血清はマイドゥーグリ大学科学科微生物学教室・准教授およびその共同研究者から提供された。尚、本研究はマイドゥーグリ大学(マイドゥーグリ市、ナイジェリア国)において実施された。

2. 抗体検出法

抗体検出は、ザイールエボラウイルスの組換え核蛋白を抗原とした ELISA 法によった(Saijo, M., et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. J Clin Microbiol 39:1-7, 2001)。陽性コントロール血清が基準の抗体価を呈した場合に、400 倍希釈の血清が呈する OD 値が 0.200 を超えた場合、または、100 倍、400 倍、1600 倍、6400