

平成10年度 厚生科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

霊長類を介する人獣共通感染症の制御に関する研究

研究報告書

班 長 山 田 章 雄

国立感染症研究所  
筑波医学実験用霊長類センター

# 目 次

## I. 総括研究報告書

1. 霊長類を介する人獣共通感染症の制御に関する研究 ..... 1

国立感染症研究所 筑波医学実験用霊長類センター 山田 章雄

## II. 分担研究報告書

2. Bウイルスの遺伝子診断と分子疫学に関する基礎的研究（II） ..... 4

東京大学大学院 農学生命科学科 吉川 泰弘

3. アジア産マカ属科Bウイルスの特異的検出法に関する基礎的研究 II ..... 7

国立感染症研究所 筑波医学実験用霊長類センター 向井 鏡三郎

4. SA8（Simian Agent 8：アフリカトリザル由来の $\alpha$ ヘルペスウイルス）抗原を利用した  
Bウイルス抗体検査法の開発に関する研究 ..... 13

社団法人 予防衛生協会 藤本 浩二

5. マカウイルスの血清診断法の開発に関する研究 ..... 20

国立感染症研究所 ウイルス第1部 森川 茂

6. 人獣共通原虫感染症に関する研究 ..... 28

国立感染症研究所 獣医科学部 神山 恒夫

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

霊長類を介する人獣共通感染症の制御に関する研究

主任研究者 山田章雄 国立感染症研究所

**研究要旨** 本研究では霊長類を介する人獣共通感染症の制御のため、特に人に対する病原性が極めて高いフィロウイルス及びBウイルスに対する血清学的あるいは病原学的診断法を確立することを主たる目的としている。フィロウイルスに関しては組み換えウイルス抗原を用いた抗体検出法を検討した結果、新たに作成した哺乳動物細胞での発現用の組み替えバキュロウイルス並びにNP蛋白の疎水性のN'-末端領域を除いた領域が有力な抗原であること明らかになったため、今年度はこれらの知見に基づきフィロウイルス患者血清を用いて組み換え抗原を用いた抗体検査法を確立した。また、ホルマリン固定組織から免疫組織染色による抗原検出法ならびにウイルス遺伝子の検出法を確立した。一方、Bウイルスに関してはBウイルス抗原の代替抗原としてアフリカミドリザル由来のSA8の有用性を検討したところ、特異性及び感度の点で優れており、Bウイルスのスクリーニングに使用できることが示された。また、国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターで飼育されていたBウイルスに対する抗体陽性ザルについて、米国との共同で、三叉神経節からのPCRによるウイルスゲノムの検出を行ったところ、予想されたサイズのPCR産物が検出できたが、更に特異性に関して検討する必要がある。

分担研究者

吉川泰弘 東京大学農学部教授  
神山恒夫 国立感染症研究所獣医科学部  
主任研究官  
向井鎌三郎 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター 主任研究官  
森川 茂 国立感染症研究所ウイルス1部室長  
藤本浩二 (社) 予防衛生協会部長

を迅速に検出する方法の確立は緊急の課題である。しかしながら、これらのウイルスはレベル4に分類される病原体であり、我が国では診断用抗原の調整もできないのが実情である。そこで本研究ではcDNAから発現させることにより、これらのウイルス抗原を調整し、血清学的検査法を確立することを主たる目的とした。また、ウイルスゲノムの迅速な検出法の確立も目的とした。

B. 研究方法

Bウイルスに関してはBウイルス抗原の代替抗原として使用に耐えるものがあるか否かを検討した。また、米国Oklahoma州立大学およびSouthwestern Foundationとの共同で、国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターで飼育されていた抗体陽性ザルについて、血清学的検査と三叉神経節からのPCRによるウイルスゲノムの検出を行った。フィロウイルスに関しては、エボラウイルスのNP蛋白をコードする遺伝子を発現させ、抗原として使用できるか否かを検討した。

A. 研究目的

サル類はヒトに近縁なため人獣共通感染症の視点からもヒトに感染しうる感染症を潜在的に有していると考えられる。特にマカク属のアルファヘルペスウイルスであるBウイルスやエボラ、マールブルグのようなフィロウイルスはヒトに対して致死的であるため、ヒトへの感染事故を未然に防ぐためにもこれらのウイルスに感染している可能性のある個体

### C. 研究結果

1. フィロウイルスに関しては、昨年度エボラウイルスの NP 蛋白をコードする遺伝子を発現させ、抗原として使用できるか否かを検討したが、非特異反応が多く本年度はその改善を目指した。エボラウイルス NP 蛋白を哺乳動物細胞で遺伝子発現を可能にするバキュロウイルスベクターに挿入し、得られた組み替えウイルスを HeLa 細胞感染させ蛍光抗体法(IF)様の抗原としたところ、非特異反応の極めて少ない、感度、特性の点でも優れた方法であることが認められた。また、およそ 100 アミノ酸から成る相互に重複するペプチドに分割し、その抗原性を免疫沈降法及びウエスタンブロッティングで調べたところ、C 末端側と、NP5-8 が、特異性及び感度から考えて、エボラウイルスに対する抗体測定のための抗原として使用できる可能性が示された。また、米国 CDC との共同でこれらの抗原を用いた抗体検出方の評価を行ったところ、感度、精度いずれにおいても CDC で採用されている方法に匹敵することが判明した。

2. フィリピン熱帯医学研究所に保存されている Reston 感染サルのホルマリン固定組織 8 検体をパラフィン包埋切片から RNA を抽出し RT-PCR 反応を行なった結果、2 検体が陽性であった。陽性反応を呈したサンプルは遺伝子配列から Reston であることが確認された。また、免疫組織染色では陽性例すべてに、肝および脾にウイルス抗原が検出された。

3. B ウイルスに関しては B ウイルス抗原の代替抗原として使用に耐えるものがあるか否かを検討したところ、アフリカミドリザル由来の SA-8 が特異性及び感度の点で優れている可能性が示された。このウイルス抗原を用いた診断法の確立のため、様々な血清検体で検討中である。また、米国 Oklahoma 州立大学および Southwestern Foundation との共同で、国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターで飼育されていた抗体陽性ザルについて、血清学的検査と三叉神経節からの PCR によるウイルスゲノムの検出を行った。血清学的検査に関しては筑波医学実験用霊長類センターにおける成績とほぼ一致していたが、少数例で曖昧な場合が認められ、検査法のより一層の改良が望まれた。PCR では特異的なバンドが検出できたが、再現性を確認する必要がある。

### D. 考察

ここで確立されたフィロウイルスに対する IF および ELISA システムは、危険なウイルスを扱うことなく、感染症新法で第一類感染症として位置づけられたフィロウイルス感染の有無を、血清学的に評価する有力な手段を提供することになる。また、サルの検疫に際しても有力な診断方法としての活用が期待される。一方、SA8 を抗原とした B ウイルスに対する抗体検出系に関しても、通常の実験室で抗原調整が可能であるばかりでなく、従来の HSV を抗原とした場合よりも遥かに高感度で、B ウイルス抗体を検出できることが明らかとなったため、今後サル類における B ウイルスの浸淫状況などの把握を血清学的に実施するうえで強力な方法となると期待される。

### E. 結論

フィロウイルスの検出系に関してはほぼ満足のできる成績が得られた。SA8 が代替抗原として使用できることは各研究施設で、B ウイルスの浸淫状況を把握できる可能性を示している。しかし、B ウイルスを確定的に診断するためには発現系の速やかな樹立が望まれる。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Fukao, T., Hirano, A., Nakamura, K.,

Yamazaki, Y., Yamada, A., Tshita, H., Inoue,

R., and Kondo, N.: Perinatal mumps associated with bronchiolitis and respiratory distress. *Eur. J. Pediatr.*, 157, 952-953, 1998

Saito, H., Takahashi, Y., Harata, S., Tanaka, K.,

Sato, H., Suto, T., Yamada, A., Yamazaki, S.,

and Morita, M.: Cloning and characterization of the genomic RNA sequence of the mumps

virus strain associated with a high incidence of aseptic meningitis. *Microbiol. Immunol.*, 42,

133-137, 1998

Kawana, R., Kitamura, T., Nakagomi, O.,

Matsumoto, I., Arita, M., Yshihara, N., Yanagi,

K., Yamada, A., Morita, O., Yoshida, Y.,  
Furuya, Y., and Chiba, S.: Inactivation of  
Human Viruses by Povidone-Iodine in  
Comparison with Other Antiseptics. *Dermatol.*,  
195, S2, 29-41, 1997

山田章雄：ムンプスのヒトにおける病理  
と動物モデル、*臨床とウイルス*、26、13-16、  
1998

山田章雄：DNA ワクチン、*治療学*、32、  
1520-1523, 1998

- G. 知的所有権の取得状況  
特になし

## Bウイルスの遺伝子診断と分子疫学に関する基礎的研究（Ⅱ）

分担研究者 吉川 泰弘 東京大学大学院農学生命科学科 教授  
協力研究者 本藤 良 日本獣医畜産大学獣医畜産学部 教授

研究要旨： PCR法を応用した、Bウイルスの遺伝子診断法の確立を目的として研究を進めた。本年度は、Bウイルス・ゲノム上で、他の霊長類ヘルペスウイルス（SCMV, HSV-1, 2, VZV, HCMV）との低相同性および分離株間での多型性を有する遺伝子領域を選択し、PCR法での新たな増幅領域としてUs領域内に3カ所を設定した。これにより、検出ゲノムに種々特徴をもつ8種類の領域で増幅が可能となった。また、HCMVゲノムのVP25を含む610bpのプライマーで、SCMVゲノムが特異的に検出され、その検出DNA断片のサイズが分離株間で異なることを明らかにした。これにより、株間の異同による分類を可能にした。今後、以上の解析法に、マイクロプレート・ハイブリダイゼーション法を加え、Bウイルス感染の遺伝子診断法と分子疫学的解析法の実用性を検討する。

### A. 研究目的

PCR法による、Bウイルス特性ゲノムの検出とその定量化による迅速診断法を確立することが目的である。また、この方法を用いて本邦におけるサル類の感染状況とストレス等の外因による個体内での再活性化の可能性を分子疫学的に解析する。

### B. 研究方法

Bウイルス・ゲノム上で、他の霊長類ヘルペスウイルス（SCMV, HSV-1, 2, VZV, HCMV）との低相同性および分離株間での多型性を示す領域を選択し、PCR法での新たな増幅領域を設定する。その領域を含むピオチン標識DNAプローブを製作し、今まで明らかにしてきた、PCR法とマイクロプレート・ハイブリダイゼーション法を併用した検出同定と定量法の条件を設定する。この手法を用いて、サル類およびヒトの種々検体から、Bウイルス特性ゲノムの検出と定量によるその消長を調べ、感染状況と同一個体内での動態を分子疫学的に解析する。

### C. 研究結果

PCR法による増幅領域を、Bウイルス・ゲノム上のUs領域内に3カ所設定した（図1）。いずれも糖蛋白（ORF, Us4;gG, Us5;gI, Us6;gD）をコードする領域で、プライマーのGC含有量、アニーリングの至適温度条件、ループとダイマー形成を検索して、センスとアンチセンスのプライマー（21マー）を作図した。霊長類ヘルペスウイルス群ではHB1の領域は分離株間で共有する安定した塩基配列部で、HB2とHB3の領域には分離株間で異なる点変異が局在し、多型を示す領域である。これらのプライマーを組み合わせることにより、特徴ある8種類の領域で増幅することが可能となった。

さらに、PCR法による増幅領域の特異性に関する検討を、SCMV3株、HSV-1, 2型の各20株、VZV30株およびHCMV20株の抽出DNAを用いて、HCMVゲノム上のVP25をコードする領域（610bp）のプライマーで試みた。SCMVにおいて、HCMVとはサイズの異なる約400bpの断片が特異的に検出された。その検出DNA断片のサイズが分離株間で異なっており、株間の異同による分類に有意な結果が得られた。

#### D. 考察

Bウイルスの遺伝子診断では、サルの近縁ヘルペス（SCMV）およびヒトヘルペスウイルス（HSV-1, HSV-2, HCMVなど）とのゲノム上の相同性が問題となる。本研究では、PCR法による増幅領域を、Bウイルス・ゲノム上のUs領域内に新たに3カ所設定した。そのプライマーを組み合わせることにより、ゲノム構造で特徴ある8種類の領域で増幅することができ、株間におけるゲノム構造の特性を詳細に解析することが可能となった。また、PCR法による増幅領域の特異性に関する検討では、HCMVゲノム上のVP25を含む領域（610bp）のプライマーで、SCMVのゲノムが特異的に検出され、その検出DNA断片のサイズが分離株間で異なることから、株間の分類が可能であると考えられた。以上の解析法に、今まで明らかにしてきた、マイクロプレート・ハイブリダイゼーション法を加えることにより、今後Bウイルスの遺伝子診断法と本ウイルスの初感染、潜伏感染およびその再活性化に関する分子疫学的解析がさらに進展するものと考えられる。

#### E. 結論

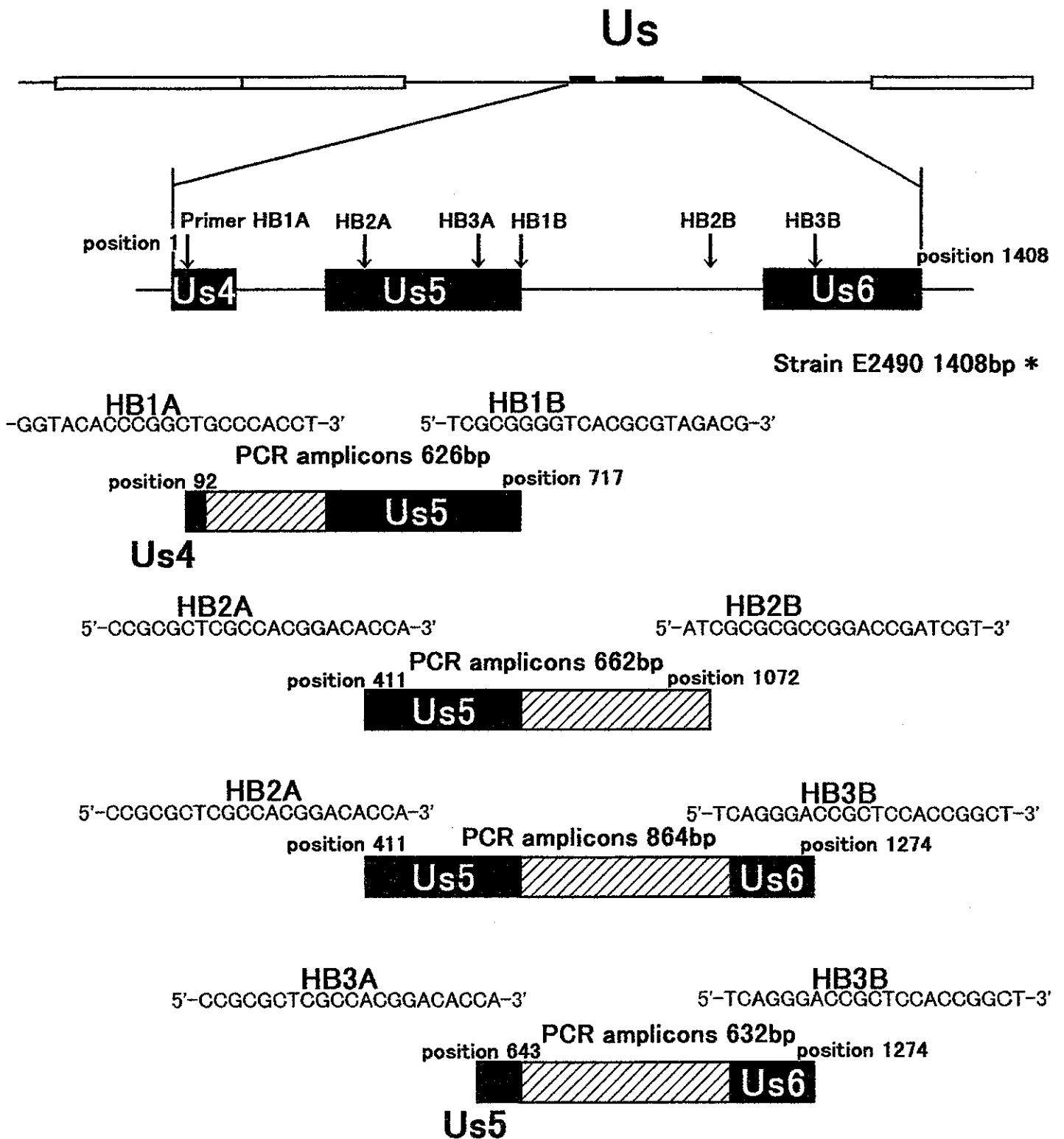
Bウイルス・ゲノム上で、他の霊長類ヘルペスウイルス（SCMV, HSV-1, 2, VZV, HCMV）との低相同性および分離株間での多型性を有する遺伝子領域を選択した。この結果、PCR法での新たな増幅領域として、Us領域内に3カ所の領域を設定した。これらのプライマーを組み合わせることにより、特徴ある8種類の領域での増幅が可能となった。また、PCR法による増幅領域の特異性に関する検討では、HCMVゲノムのVP25を含む領域610bpのプライマーで、SCMVのゲノムが特異的に検出され、その検出DNA断片のサイズが分離株間で異なることを明らかにし、株間の異同による分類を可能にした。今後、以上の解析法に、マイクロプレート・ハイブリダイゼーション法を加え、Bウイルス感染の遺伝子診断法と分子疫学

的解析法の実用性を検討する。

#### F. 研究発表

- 1) Prevalence of herpes B virus antibody in nonhuman primates reared at national university of Japan. Sato, H., Arikawa, J., Furuya, M., Kitoh, J., Mannen, K., Nishimune, Y., Ohsawa, K., Serikawa, T., Shibahara, T., Watanabe, Y., Yagami, K., Yamamoto, H., Yoshikawa, Y., *Exp. Anim.*, 47, 199-202, 1998
- 2) ヒト獣共通感染症としての新興・再興感染症 吉川泰弘 *Vita* 15, 39-44, 1998
- 3) 学校飼育動物とヒト獣共通感染症 吉川泰弘 *MVM.*, 10, 59-53, 1999
- 4) サル由来のウイルス感染症 吉川泰弘 *科学療法の領域* 15, 27-33, 1999
- 5) 霊長類の輸入検疫等に関するOIE（国際獣疫事務局）の改正案について 吉川泰弘、川越真喜男 *オベリスク* 2, 2-18, 1999
- 6) サル類の輸入、検疫に関する最近の動向 吉川泰弘 *INA Res, News*, 55, 2-3, 1998
- 7) 人獣共通感染症—その現状と行政対応— 吉川泰弘 *宮城県獣医師会報* 51, 197-217, 1998
- 8) ペット動物をめぐる主な感染症とつきあい方 吉川泰弘 *地域保健* 3, 4-26, 1999
- 9) Bウイルス感染症 pp265-270, *In エマージェンディジース* 武田美文、五十嵐章、児島荘明編 近代出版 1999

(図1) BウイルスにおけるPCR増幅領域の設定



\* Smith, A., et al. : J. Virol., 72, 9224 (1998)



## アジア産マカク属サルBウイルスの特異的検出法に関する基礎的研究II

分担研究者 向井 隼三郎 (国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター)  
研究協力者 小松原博文 ( )  
R. Eberle (米国オクラホマ州立大学、獣医学部、感染症学科)  
山田 章雄 (国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター)

**研究要旨** アジア産マカク属サルBウイルスはヒトに感染すると致死性である。従って、抗Bウイルス抗体の検出及び、PCR法によるBウイルスDNAの検出を通じて、Bウイルス感染サルを個体レベルでの日常から把握しておくことは、万が一ヒトへの感染の可能性が考えられるような事態に対応するために必要である。本研究では、ELISA抗体価が低いCut off値近くの血清8検体と陽性血清2検体を米国2カ所の研究室でウエスタンブロット法とELISA法にて比較検討し、双方の結果が一致しない血清を見出した。また、43例のELISA抗体価が低いサル血清をウエスタンブロット法で解析した結果も併せて考慮し、現時点での問題点の指摘と、今後の対策を検討したので報告する。

### A. 研究目的

アジア産マカク属サルBウイルスはヒトに感染すると致死性である。従って、抗Bウイルス抗体の検出及び、PCR法によるBウイルスDNAの検出を通じて、Bウイルス感染サルを個体レベルでの日常から把握しておくことは、万が一ヒトへの感染の可能性が考えられるような事態に対応するために必要である。

本研究では、ELISA抗体価が低いCut off値近くの血清8検体と陽性血清2検体を米国2カ所の研究室でウエスタンブロット法とELISA法にて比較検討し、双方の結果が一致しない血清を見出した。また、43例のELISA抗体価が低いサル血清をウエスタンブロット法で解析した結果も併せて考慮し、現時点での問題点の指摘と、今後の対策を検討することを目的とした。

### B. 研究方法

本研究では、Bウイルス感染サル血清のうちELISA抗体価が低いCut off値近くの血清8検体と陽性血清2検体を米国2カ所の研究室でWB法とELISA法にて比較検討した。

オクラホマ州立大学獣医科学単科大学感染症部  
R. W. Eberle教授研究室

### A. DNAの調製とPCR

昨年度と同様、ワクチンの国家検定用の繁殖

育成サルを作出するために過去、繁殖に用いられていた親サルのうち抗Bウイルス抗体陽性の個体4頭を選び、筑波医学実験用霊長類センターのP3施設内のクラスII-A解剖台を用い、国立感染症研究所の実験動物指針及び病原体等安全管理規定に従って、三叉神経節と脊椎後根を摘出し、米国オクラホマ州立大学、R. W. Eberle教授の研究室において、神経組織からゲノムDNAの抽出及びPCRを行った1)2)。

### B. 抗原の調製

ELISA抗原の調製法：Bウイルス感染Vero細胞のCPEが4+/5になったとき、感染細胞を集め、Tris-HCl(50mM), Triton X-100 (0.5%)溶液0.15mlに溶解し、15,000g, 30秒遠心した上清をELISA抗原として用いた。ELISA法は常法に従い、抗原をハンクス緩衝液にて100倍に希釈し、96穴Immulon IIプレートの1穴あたり100 $\mu$ l用いた。R. W. Eberle教授の研究室におけるELISA法の判定法は、感染抗原のOD値が0.1より大きく、非感染抗原のOD値の3倍以上の場合にELISA法陽性と判断する。

WB抗原の調製法：Bウイルス感染Vero細胞を同様に集め、Tris-HCl(50mM), Triton X-100 (0.5%), SDS(0.1%)溶液0.15mlに溶解し、遠心しないでそのまま保存し、用時、LaemmliのSDSサンプルBufferで希釈して用いた(Laemmli Nature, 227, 680, 1970)。WB法は基本的にTowbin

らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350, 1979) に従い、2次抗体としては、抗ヒト、抗ウサギ、抗マウス IgG抗体を用い、発色はベクター社のHRPO-DAB系を用いた。本法では確認されたポリペプチドバンドが2本以上見られた場合に陽性と判定するが、R. W. Eberle教授はELISA法の判定の方を信頼するようである。

サウスウエスト医生物学研究所ウイルス・免疫部 Julia Hilliard教授研究室

本研究室は、米国NIHのBウイルス検査室として認定されている。WB法とELISA法に関して技術的には、Eberle教授の研究室とほぼ同じであったが、ELISA法では、コンピューター処理(計算方法は不明)により、血清の希釈率(力価)で表わされる。また、WB法に関し、抗原の作製法も明らかでなく(おそらく、NIHに書類として提出済み)、その判定法は、感染細胞特異的ポリペプチドバンドが5本以上見られた場合に陽性で、4~2本までは、不確定(陰性ではない)としていた。また、ELISA法よりもWB法の方に信頼性をおいていた。

**C. 研究結果**

抗Bウイルス抗体陽性カニクイザル神経組織からのPCR法によるBウイルスDNAの検出

昨年度は、カニクイザル8頭の三叉神経(t)もしくは脊椎後根(r)を用い、神経組織のゲノムDNAを調製し、PCR法によるBウイルスの検出を試みた。抗Bウイルス抗体陽性の8頭すべての神経組織から期待どおりの産物が検出でき、nested PCRとnested PCR産物のHaeIII消化によるRFLP解析により、Bウイルス糖蛋白質B(Glycoprotein B; gB)特異的遺伝子断片(364bp)を検出することに成功したことは、昨年度報告したとおりである。本年度も、抗Bウイルス抗体陽性のサル4頭を選び、神経組織のゲノムDNAを用いて、同様の検出を試みたところ、やはり、BウイルスgB特異的遺伝子断片(364bp)を検出できたので、現在DNA塩基配列を決定しているところである。

抗体価が低いかCut off値近くの抗B血清の判定

米国2カ所の研究室でウエスタンブロット法とELISA法にて比較検討し、双方の結果が一致しない血清を見出した。これら10個の血清サンプルのEberle教授研究室でのELISA法による抗Bウイルス抗体検出結果(OD値)を表1に示す。血清の希釈は100倍である。また、図1にはWB法による解析結果を示す。レーン1はウサギ抗Bウイルス血清による全Bウイルスタンパクを示し、レーン2、3、4はマウス単クローン抗体でそれぞれ、VP5、gB、gDバンドを示す。レーン5、6、7は、神経組織を採取した抗Bウイルス抗体が十分に高力価の3頭のカニクイザルの血清であり、血清は40倍に希釈して用いた。レーン8、9、10は血清サンプル#6、#7、#9でELISA法で陰性の血清である。レーン5、6、7で明らかのように、いずれのBウイルス陽性カニクイザルにおいてもgB、gDバンドが濃く染まっている。

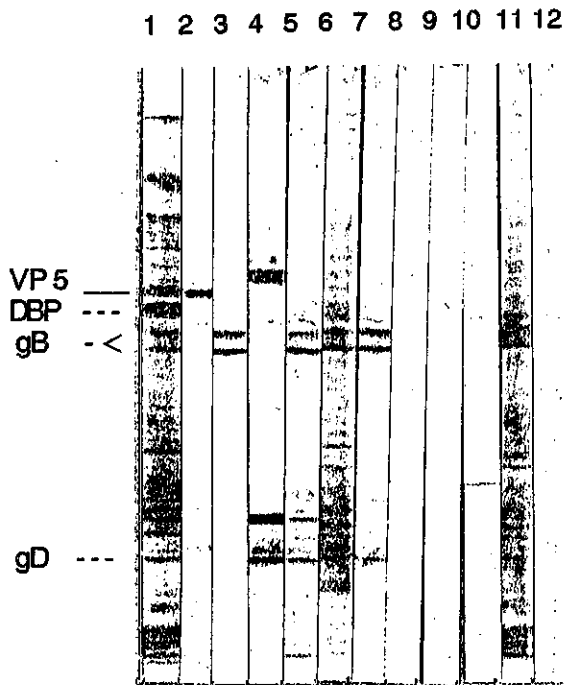
表1 血清サンプル#1~#10のELISA法によるOD値(非感染抗原、感染抗原)

|       | #1    | #2    | #3    | #4    | #5    |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 非感染Ag | 0.116 | 0.057 | 0.299 | 0.101 | 0.108 |
| 感染Ag  | 2.134 | 0.918 | 0.519 | 0.369 | 0.222 |
| 判定    | +     | +     | -     | +     | -     |
|       | #6    | #7    | #8    | #9    | #10   |
| 非感染Ag | 0.074 | 0.228 | 0.069 | 0.088 | 0.092 |
| 感染Ag  | 0.185 | 0.503 | 2.054 | 0.196 | 0.460 |
| 判定    | -     | -     | +     | -     | +     |

また、データには示さないが、43例の抗B ELISA抗体価が低い(OD<sub>50</sub> ≤ 0.6)サル血清をウエスタンブロット法で解析した結果、gDより低分子量のキャプシッドタンパクが12例の血清に検出されたが、その検出とELISA抗体価には相関がなかった。従って、Eberle教授研究室では、WB法よりもELISA法のほうが、検出

感度がよいと考えている。

図1 7%ゲルを用いたB抗原のWB



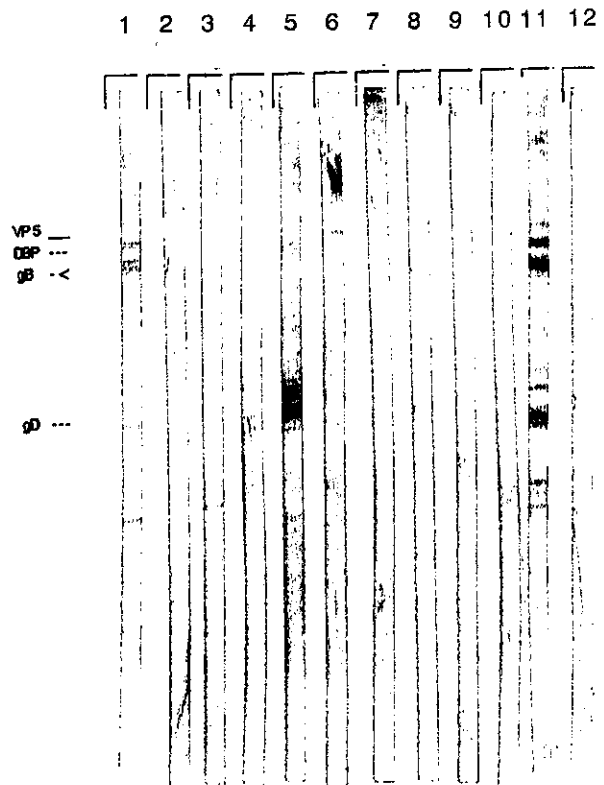
- Lane 1; Rabbit  $\alpha$ /B virus
- Lane 2; Mouse  $\alpha$ /VP5 MoAb
- Lane 3; Mouse  $\alpha$ /gB MoAb
- Lane 4; Mouse  $\alpha$ /gD MoAb
- Lanes 5~7; Monkey sera, positive
- Lane 8; 血清サンプル# 6
- Lane 9; 血清サンプル# 7
- Lane 10; 血清サンプル# 9
- Lane 11; Monkey positive control
- Lane 12; Monkey negative control

Hilliard教授研究室でこれら10血清サンプルをWB法で解析した結果を図2に示す。レーン1(血清サンプル#1)は陽性対照のサル血清で、明らかにDBPとgBおよびgDのバンドがみられる。レーン5(血清サンプル#5)はHilliard教授研究室の基準ではELISA力価は1/500以下で低値を示すが、濃いgDのバンドのほかDBPや35Kバンドが見られ、あきらかに陽性である。レーン8(血清サンプル#8)もDBPバンドやgDのバンドが見られ陽性で

ある。

レーン11、12はそれぞれアカゲザルの陽性対照と陰性対照である。表2には、Hilliard教授研究室での血清サンプル#8以外のこれらの血清サンプルのELISA法による力価とWB法の結果(最終判定)を示す。

図2 8~20%アクリルアミドゲルを用いたBウイルス抗原のWestern Blotting



- Lane 1; 血清サンプル# 1
- Lane 2; 血清サンプル# 2
- Lane 3; 血清サンプル# 3
- Lane 4; 血清サンプル# 4
- Lane 5; 血清サンプル# 5
- Lane 6; 血清サンプル# 6
- Lane 7; 血清サンプル# 7
- Lane 8; 血清サンプル# 8
- Lane 9; 血清サンプル# 9
- Lane 10; 血清サンプル# 10
- Lane 11; Monkey positive control
- Lane 12; Monkey negative control

表 2

NIH B Virus Resource Lab  
 Virology / Immunology Center  
 50 Decatur St.  
 Atlanta, GA 30303  
 Tel.: (404) 651-0808

CASE#  
 7387

SEROLOGY - DIAGNOSTIC  
 REPORT

Ryouzaburo Mukai, PhD.  
 Tsukuba Primate Center  
 for Medical Science  
 Natl Institute of Infectious Diseases  
 Hachimandai 1  
 Tsukuba-City  
 305 JAPAN

INVOICE: 1998-04-1347

DATE: 05/19/98

REPORT REQUESTED BY: Ryouzaburo Mukai, PhD.

| ITEM | SAMPLE ID | SPECIES | SPECIMEN | ANTIBODY | SPEC.DATE | ELISA TITER | WESTERN-BLOT  |
|------|-----------|---------|----------|----------|-----------|-------------|---------------|
| 001  | #1        | MFU     | SERUM    | BV       | 02/18/98  | <=1:5000    | POSITIVE      |
| 002  | #2        | CYN     | SERUM    | BV       | 01/20/98  | <=1:500     | INDETERMINATE |
| 003  | #3        | CYN     | SERUM    | BV       | 12/22/97  | <=1:500     | NEGATIVE      |
| 004  | #4        | CYN     | SERUM    | BV       | 12/22/97  | <=1:500     | NEGATIVE      |
| 005  | #5        | CYN     | SERUM    | BV       | 12/22/97  | <=1:500     | POSITIVE      |
| 006  | #6        | CYN     | SERUM    | BV       | 02/18/98  | NEGATIVE    | NEGATIVE      |
| 007  | #7        | MFU     | SERUM    | BV       | 04/25/96  | HIGH BKGD   | NEGATIVE      |
| 008  | #9        | MFU     | SERUM    | BV       | 04/25/96  | NEGATIVE    | NEGATIVE      |
| 009  | #10       | MFU     | SERUM    | BV       | 04/10/96  | <=1:500     | NEGATIVE      |

**COMPLETED**

TECHNICIAN NOTE:

If you have questions concerning results, please do not hesitate to call Tel.: (210) 673-3269.  
 Please have invoice number available at the time you call.

以上 2 研究室の結果をまとめると、抗 B 抗体の有無に関する判定で、両研究室で差があった血清は、以下に示したとおりである。  
 血清サンプル# 2 (Eberle; +、Hilliard; ±)  
 血清サンプル# 4 (Eberle; +、Hilliard; -)  
 血清サンプル# 5 (Eberle; -、Hilliard; +)  
 血清サンプル# 10 (Eberle; +、Hilliard; -)

D. 考察  
 我々のグループでは、過去 19 年間にわたり、P 4 にランクされるマカク属ヘルペスウイルス (B ウイルス) の抗体検査と新生仔の早期母仔分離を通じて、国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターカニクイザル繁殖コロニーから本ウイルスの除去に成功した。

しかしながら、当センターにも、老化の研究や、遺伝病資源のためのカニクイザルの中には、Bウイルス抗体陽性のサルがおり、また、日本全国の国立研究機関や大学では、Bウイルス抗体陽性のサルが実験に用いられているのが現状である。

本研究では、万が一感染の可能性が考えられるような事態に対応するために、抗Bウイルス抗体の検出及び、PCR法によるBウイルスDNAの検出を通じて、Bウイルス感染サル、Bウイルス排出サルを個体レベルで日常から把握しておくことは、重要である。

昨年度からの研究により、抗Bウイルス抗体陽性のカニクイザル合計12頭の神経組織から、全例Bウイルスの糖蛋白質B (Glycoprotein B) 遺伝子の断片を検出することに成功した。

日本では、マカク属サルBウイルスの感染によるヒトの死亡事故の報告はないけれども、わが国のマカク属サルの神経組織にもBウイルスが潜伏感染していることは、間違いないと思われる。

抗B抗体の有無に関する判定で、Eberle教授研究室Hilliard教授研究室とで差があった血清は、以下に示したとおりである。

血清サンプル# 2 (Eberle; +、Hilliard; ±)

血清サンプル# 4 (Eberle; +、Hilliard; -)

血清サンプル# 5 (Eberle; -、Hilliard; +)

血清サンプル# 10 (Eberle; +、Hilliard; -)

この原因として考えられるのは、Eberle教授は最終判定にELISA法を、Hilliard教授はWB法を採用していることに起因すると思われる。

OD値が0.6以下のELISA抗体価が低い血清をWB法で解析した結果、gDより低分子量のキャプシッドタンパクが12例の血清に検出されたが、その検出とELISA抗体価には相関がなかった。従って、ELISA法で陽性の血清でも、現在のWB法を用いる限りで陽性に判定される場合と陰性に判定される場合があり、WB用抗原を改良するかまたは、抗血清の希釈を5倍に濃くして試みる必要がある。Bウイルス感染の血清学的確定診断における問題点を考えてみると、ELISA法においてはヘルペスウイルス感染により誘導された宿主細胞抗原に対する交差反応やい

わゆる非特異反応を発色系で測定してしまう可能性があり、WB法では、何本のウイルス特異バンドに対する反応で抗体陽性と判断するのか。また、一見ウイルス特異バンドとみられるバンドは本当にウイルス抗原なのか。といった問題点がある。この問題の解決には、O'farellの2次元電気泳動法を用いることが考えられるが、煩雑で非効率的である。

ヘルペスウイルスのWB用の抗原は、両研究室とも感染細胞を界面活性剤で可溶化して調製しているが、ヘルペスウイルス遺伝子のタンパクの数は80個以上あり1次元電気泳動法によるSDSPAGE法ではその分離に限界があるのかもしれない。

これに比して、レトロウイルスの場合は、ウイルス粒子を抗原とする限りELISA法の結果はWB法とほぼ相関し最終確定診断はWB法により行われている。例えば、SRV/Dの場合、ウイルス粒子抗原の数は10個以内であり、env(gp70)とその他のバンドに対する抗体があれば(2個以上のバンドが検出されれば)抗体陽性と確定診断できる(図3)。

典型的なBウイルス抗体陽性カニクイザルにおいてその血清は、WB法でヘルペスウイルスの2種の主要な糖タンパクであるgBとgDを認識した。現在、gDに関してはpBlue SK 2.6 (SalI-EcoRIでBウイルスDNAを消化したものの(2652bp)をpBluescriptに組換えたもの)を入手してあるし、gBに関しては、このORF遺伝子領域を含むプラスミドpMKC (kpnIでBウイルスDNAを消化したもののCフラグメント(3177bp)をpUC19に組換えたもの)を分与される予定であり、その手続きを開始したところである。今後、これら、2個の遺伝子を組換え遺伝子発現系に組換えて(動物細胞もしくは、昆虫細胞系で)2種のポリペプチドを大量に得てWB法やELISA法によるアッセイの抗原として用いる予定である。これら組換え抗原とBウイルス粒子抗原を用いた測定結果の相関を調べながら、順次組換えBウイルス抗原を追加していく方針である。

## E. 結論

①昨年度に引き続き、PCR法により、抗Bウイルス抗体陽性サル全例からBウイルスの糖蛋白質B (Glycoprotein B) 遺伝子の断片を検出することに成功した。現在までに、12例の神経組織からgB遺伝子の断片を検出したことになり、DNA塩基配列を決定しているところである。

②抗Bウイルス抗体陽性血清のうちELISA抗体価が低いかCut off値近くのカニクイザル血清に関しては、米国2カ所の研究室でもその判定にバラツキがあった。

③ELISA法で陰性の血清でも、WB法で陽性と判定される血清が認められた。

④ELISA法で陽性の血清でも、現在のWB法を用いる限りで陽性に判定される場合と陰性に判定される場合があり、WB用抗原を改良するかまたは、抗血清の希釈を5倍に濃くして試みる必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1)Black, D.H. and Eberle, R.: Detection and differentiation of primate  $\alpha$ -herpesviruses by PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 225-231, 1997

2)Mukai, R., Narita, T, Kobayashi, R. Fujimoto, M. Takasaka, M., Honjyo, S.: Survey of viral infections in nonhuman primates at Tsukuba Primate Center for Medical Science.

*Topics in Primatology Vol 3:* 399-408, 1992.

3) Fujii Y, Mukai R, Akari H, Machida M, Mori K, Takasaka M, Kojima E, Murakami K, Yoshikawa Y.: Antiviral effects of 6-chloro-2', 3'-dideoxyguanosine in rhesus monkey acutely infected with simian immunodeficiency virus.

*Antivir. Chem. Chemother.* 9, 85-92, (1998)

4)Akari H, Ono F, Sakakibara I, Murayama Y, Hiyaoka A, Terao K, Otani I, Mukai R, Adachi A, Yoshikawa Y.: Simian T cell leukemia virus type I-induced malignant adult

T cell leukemialike disease in a naturally infected African green monkey: implication of CD8+ T cell leukemia.

*AIDS. Res. Hum. Retroviruses*, 14, 367-371, (1998)

5)Shoji S, Furuishi K, Ogata A, Yamataka K, Tachibana K, Mukai R, Uda A, Harano K, Matsushita S, Misumi S.: An allosteric drug, o,o'-bismyristoyl thiamine disulfide suppresses HIV-1 replication through prevention of nuclear translocation of both HIV-1 Tat and NF-kappa B.

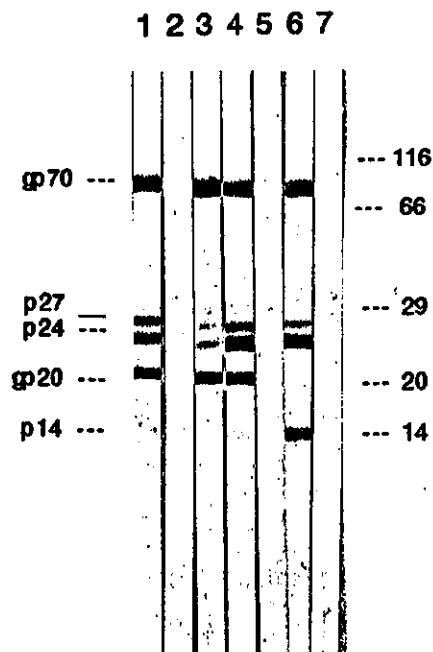
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 745-53 (1998)

### 2. 学会発表

①向井鏡三郎、佐多徹太郎、宇田晶彦、小松原博文、毒島孝治、村山裕一、倉田毅、山田章雄：サルエイズ脳炎発症におけるモノサイト様細胞株 (BM1, BM2) の役割。

第12回日本エイズ学会総会 東京、1998年12月

図3



厚生科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）  
研究報告書

SA 8 (Simian Agent 8 : アフリカミドリザル由来  $\alpha$  ヘルペスウイルス)  
抗原を利用した B ウイルス抗体検査法の開発に関する研究

分担研究者 藤本 浩二 社団法人予防衛生協会  
協力研究者 成田 豊子  
高野淳一郎

研究要旨

B ウイルス (*Herpesvirus simiae*) と共通抗原性を有する SA 8 (アフリカミドリザル由来  $\alpha$  ヘルペスウイルス) を利用して、ELISA 法による B ウイルス抗体検査法を開発し、その有効性について検討した。

A. 研究目的

B ウイルスはマカカ属サル類に広範に感染している  $\alpha$  ヘルペスウイルスの一種であるが、その取扱は BL4 (Biosafety Level 4) 施設内で行う必要がある。よって、BL4 施設が稼動していない日本国内では B ウイルスに係わる培養増殖等の操作は実施できない状況である。このような理由から、現在、B ウイルス抗体検査に必要な B ウイルス抗原については、米国内の BL4 施設内で調整した抗原を日本に輸入して、これを利用して ELISA 法で抗体検査を実施している。

SA 8 (Simian Agent 8) は、B ウイルスと共通抗原性を有するアフリカミドリザル由来の  $\alpha$  ヘルペスウイルスの一種であるが、その取扱は BL2 レベルで可能であるため日本国内で抗原等の調整ができる。

本研究では、SA 8 を培養細胞内で増殖させ、これからウイルス抗原を調整して、

これを利用して ELISA 法による B ウイルス抗体検査法を開発した。また SA 8 抗原と B ウイルス抗原で、100 件の B ウイルス抗体陽性及び陰性血清について B ウイルス抗体を検査し、その結果を比較した。

B. 研究方法

1) ウイルス株、細胞、培養液

SA 8 は米国 Southwest Foundation for Biomedical Research から分与を受け、筑波医学霊長類センターで保存されていた株である。CV-1 細胞 (アフリカミドリザル由来腎細胞株) は ATCC 提供株であり、その後筑波医学霊長類センターで保存されていた株である。ウイルス増殖用培地は、5% 牛胎仔血清加 Eargle's 緩衝塩類液 / MEM 培地 (GIBCO BRL) を使用した。

2) SA 8 抗原の調整

SA 8 は CV-1 細胞で培養した。

CV-1 細胞に SA 8 を感染後 50% CPE(cytopathic effect)が出現した時点で (図 1)、トリプシン処理により感染細胞を回収した。回収した細胞は、3回の凍結・融解処理の後、Tween-40 (Sigma) と sodium desoxycholate (DOC) (Difco) を各 1% の濃度で加え、37°C で 60 分間反応させて可溶化した。可溶化抗原は使用時まで -80°C に保存した。

SA 8 未感染 CV-1 細胞についても同様な処理をして、コントロール抗原とした。

### 3) PCR 検査

SA 8 感染 CV-1 細胞、不活化 B ウイルス抗原 (BioReliance 社製)、HSV-1 感染 CV-1 細胞、HSV-2 感染 CV-1 細胞、CV-1 細胞からそれぞれ DNA を分離し、PCR のテンプレートとした。方法は、F. Scinicariello ら (J Infec Dis 168:747-50,1993) の報告に従い、SA 8 と B ウイルス、HSV-1、HSV-2 に共通なプライマーを合成し PCR を実施した。PCR 増幅産物は Sac II で処理後アガロース電気泳動で検出した。

### 4) ELISA 法

ELISA は、96 穴プレート (グライナー EIA プレート; イムロン 600) を使用して実施した。

ボックスタイトレーションでは、可溶化 SA 8 抗原と標準陽性血清の各希釈系列の組み合わせにおける OD 値を測定し、ELISA プレーートのウェルを飽和できる抗原希釈倍率を決定した。

### 5) フィールド試験

100 件の B ウイルス抗体陽性および陰性カニクイザル血清について SA 8 抗原を用いた抗体検査結果と B ウイルス抗原

を用いた抗体検査結果を比較した。なお SA 8 抗原及び B ウイルス抗原を用いた検査における、陽性域、不定域、陰性域は、それぞれの抗原を用いた検査系でレファレンス血清 (BioReliance 社提供) を測定しその OD 値の (平均  $\pm$  3SD) の範囲で決定した。

## C. 研究結果

### 1) ボックスタイトレーション

図 2 に SA 8 抗原と B ウイルス抗体陽性血清を組み合わせた、ボックスタイトレーションの結果を示す。抗原飽和域は抗原希釈 500 倍、1,000 倍と 2,000 倍であり、抗体飽和域は血清希釈 100 倍と 200 倍であった。抗体飽和状態である血清希釈 100 倍の系列で見ると、抗原希釈 4,000 倍から OD 値の低下 (OD 1.99) が認められたため、抗原は 3,000 倍希釈で使用することとした。

なお検査に際しての血清希釈倍数は、100 倍とした。

### 2) PCR 検査

SA 8 について B ウイルスと HSV-1、HSV-2 と共通のプライマーで PCR を実施し、増幅産物を Sac II 処理した後電気泳動した結果を図 3 に示す。

B ウイルスと SA 8 については、PCR 増幅産物が Sac II で 2 つに切断されたが、HSV-1、HSV-2 の増幅産物は Sac II で切断されなかった。

### 3) B ウイルスと SA 8 抗原に対する OD 値の相関

図 4 に 100 件のカニクイザル血清について SA 8 抗原と B ウイルス抗原を用いた ELISA 検査における OD 値の相関を



示す。近似式は  $y = 1.01x + 0.277$ 、相関係数  $r = 0.95$  であった。

#### 4) ELISA 検査における判定 OD 値域の決定

図 5 に B ウイルス抗原及び SA 8 抗原を用いた ELISA 検査における判定 OD 値域を示す。OD 値域決定に当てっては、陰性レファレンス血清 10 件、判定不定レファレンス血清 9 件、陽性レファレンス血清 10 件について、その OD 値の (平均  $\pm$  3 SD) の範囲を計算した。陰性域の OD 値上限値は (陰性レファレンス血清 OD 値の平均 + 3 SD) とし、不定域の上限値は (判定不定レファレンス血清 OD 値の平均 + 3 SD) とした。

#### 5) B ウイルス抗原と SA 8 抗原を用いた B ウイルス抗体検査結果の比較

図 6 に 100 件のカニクイザル血清についての B ウイルス抗体検査結果を示す。

感度は (対 B ウイルス抗原陽性数 / 対 B ウイルス抗原陽性数 + 対 B ウイルス抗原陽性検体中 SA 8 抗原で陰性と判定された検体数) とし、 $(71 / 71 + 0)$  で 1.00 であった。

特異性は (対 B ウイルス抗原陰性数 / 対 B ウイルス抗原陰性数 + 対 B ウイルス抗原陰性検体中 SA 8 抗原で陽性と判定された検体数) とし、 $(28 / 28 + 2)$  で 0.93 であった。

陽性予測率は (対 B ウイルス抗原陽性数 / 対 B ウイルス抗原陽性数 + 対 B ウイルス抗原陰性検体中 SA 8 抗原で陽性と判定された検体数) とし  $(72 / 72 + 2)$  で 0.97 であった。

陰性予測率は (対 B ウイルス抗原陰性数 / 対 B ウイルス抗原陰性数 + 対 B ウ

イルス抗原陽性検体中 SA 8 抗原で陰性と判定された検体数) とし  $(28 / 28 + 0)$  で 1.00 であった。

判定結果の相関率は (対 B ウイルス抗原陽性数 + 対 B ウイルス抗原陰性数 / 対 B ウイルス抗原陽性数 + 対 B ウイルス抗原陰性数 + 対 B ウイルス抗原陽性検体中 SA 8 抗原で陰性と判定された検体数 + 対 B ウイルス抗原陰性検体中 SA 8 抗原で陽性と判定された検体数) とし、 $(71 + 28 / 71 + 28 + 2)$  で 0.98 であった。

なお、感度、特異性、陽性予測率、陰性予測率、相関率の計算にあたっては「不定」判定の検体数 (1 件) は含まなかった。

#### D. 考察

SA 8 はアフリカミドリザル由来の  $\alpha$  ヘルペスウイルスであることから、ヒト由来の HSV-1、HSV-2 に比べ、よりマカカ属由来  $\alpha$  ヘルペスウイルスである B ウイルスと抗原的に類似していることが期待されたため、SA 8 抗原を利用した B ウイルス抗体検査法の有用性を検討した。

実験に使用した SA 8 株について、PCR で gB 遺伝子近傍領域を増幅しその産物を Sac II で処理すると、SA 8 では B ウイルスと同様に増幅産物が 2 つに切断されるのに対し、ヒト由来  $\alpha$  ヘルペスウイルスである HSV-1 および HSV-2 では切断が起こらないことが明かとなり、SA 8 が HSV-1、HSV-2 に比べ B ウイルスにより近縁であることが推測された。

SA 8 ウイルスは CV-1 細胞で良好に増殖し、感染後 24 時間から 48 時間で 50% CPE が起きた。50% CPE 発現時に回収

した感染細胞の可溶化処理については、凍結融解処理のみでは不十分であったため（データ示さず）、界面活性剤の処理を施した。可溶化抗原中の界面活性剤は抗原を ELISA プレートに固層化する際に妨害因子となる可能性があるが、今回調整した SA 8 抗原は 3,000 倍希釈で使用可能であったため、抗原希釈時において界面活性剤の影響は極少ないものと判断した。

調整した SA 8 抗原が ELISA プレートのウェルを飽和できる最少蛋白量を決定する目的で抗原希釈系列と抗体希釈系列を組み合わせて、ボックスタイトレーションを実施した。その結果、飽和反応が期待される最大希釈倍数である 3,000 倍希釈で抗原を使用することとした。

100 件の血清について SA 8 抗原と B ウイルス抗原を利用した ELISA による B ウイルス抗体検査を実施したところ、SA 8 抗原に対する OD 値と B ウイルス抗原に対する OD 値は強い相関（ $r = 0.95$ ）を示した。さらに、100 件のサル血清について、SA 8 抗原による判定結果と B ウイルス抗原による判定結果を比較すると、その感度、特異性、陽性予測率、陰性予測率、相関率はいずれも 0.93 以上であり、本研究で作出した SA 8 抗原を利用した B ウイルス抗体検査法の精度が高いことが明らかとなった。

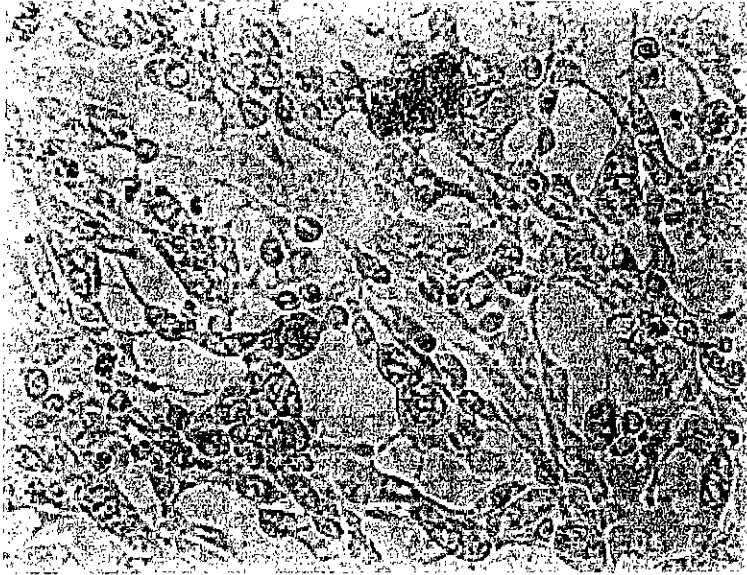
SA 8 の取扱は現在 BL2 施設で実施しているが、その病原性等 B ウイルスとの関連は、まだ十分に研究されていない状況であり、今後免疫遺伝学的手法および感染実験による、SA 8 の特性解析が重要である。

なお、SA 8 抗原を利用した ELISA 検査では、SA 8 抗原調整ごとの抗原希釈倍率の決定及びリファレンス血清を基にした陰性 OD 値域および不定 OD 値域の決定が重要である。また、毎回の検査に際してはコントロール血清を利用した検査精度の管理が重要となる。

## F. 研究発表

なし

図1. SA8感染によるCV-1細胞のCPE



(感染後 36 時間)

図2. SA8抗原とBウイルス陽性血清を組み合わせたボックスタイトレーション

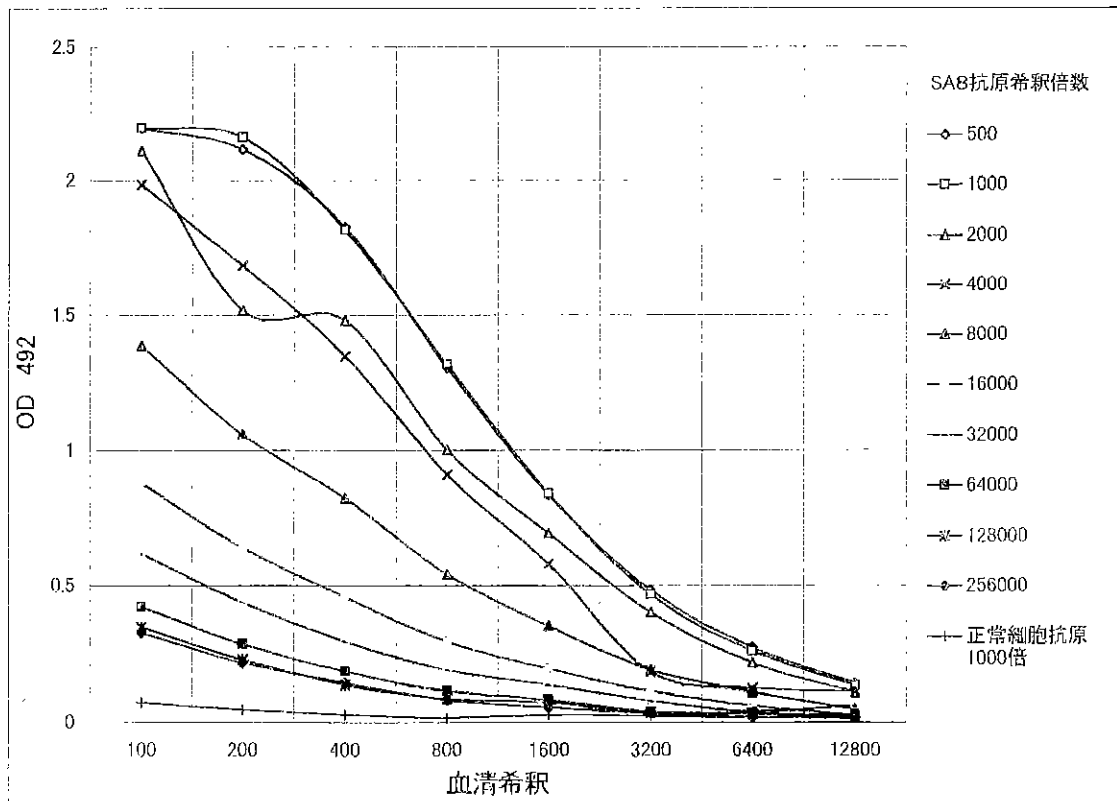
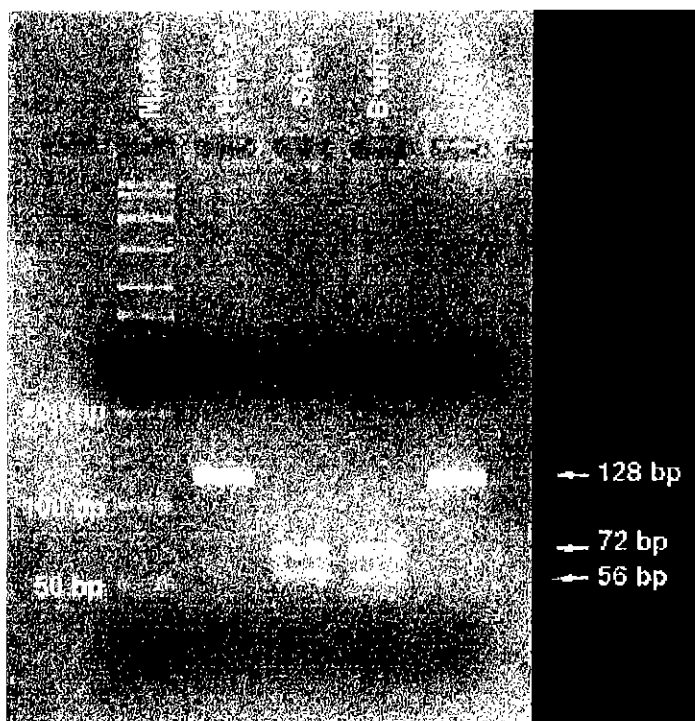


図3. SA8のPCR検査



HSV-1、HSV-2、SA8、Bウイルス由来PCR増幅産物をSac IIで処理した後の電気泳動

図4. Bウイルス抗原とSA8抗原に対するカニクイザル血清100検体のOD値の相関

