

図5. Bウイルス抗体検査における判定OD値域

ウイルス抗原	陰性	不定	陽性
Bウイルス抗原	0~0.30	0.31~0.34	0.35以上
SA8抗原	0~0.25	0.26~0.42	0.43以上

図6. Bウイルス抗原とSA8抗原を用いたBウイルス抗体検査結果の比較

Bウイルス抗原による判定	SA8抗原による判定	件数
-	-	25
-	±	1
-	+	2
+	-	0
+	±	0
+	+	72
合計件数		100

フィロウイルスの血清診断法の開発に関する研究

分担研究者 森川 茂 (国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室長)

協力研究者 西條政幸、新倉昌浩、緒方もも子、倉根一郎 (ウイルス第1部)

T. Ksiazek, C.J. Peters (米国 CDC)

研究要旨: フィロウイルス感染の迅速診断法を開発するため、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、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が示唆された。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を確立した。

A. 研究目的

霊長類を介する人畜共通感染症のうち最も危険なウイルス性出血熱の原因ウイルスであるフィロウイルス (エボラ、マールブルグウイルス) 感染の高感度で特異的な診断法の確立を行うことを目的とする。ウイルスはいずれもレベル 4 に属し日本での培養が認められないため、組み換えウイルス蛋白を作成し、これを用いた抗体検出法を開発する。また、固定化組織からのエボラウイルスの検出を検討した。

B. 研究方法

1) Ebola-Zaire virus (EBO)、Marburg virus (MBG) の NP 遺伝子の発現と抗体検出系の検討:

EBO-NP、MBG-NP 蛋白を CMV IE プロモーターで drive する組み換え baculovirus を作製した。組み換え baculovirus は、HeLa 細胞などのほ乳類細胞に abortive に感染し組み換え蛋白のみを発現する。この組み換え蛋白を発現した HeLa 細胞を塗抹アセトン固定した抗原を用いて蛍光抗体法 (IF 法) を行なった。また、6His-tag を N'-末端に付加した EBO-

NP (His-EBO-NP) と MBG-NP (His-MBG-NP) を polyhedrin プロモーターで drive する組み換え baculovirus を作製し、感染昆虫細胞から組み換え蛋白を Ni-カラムにより精製し、ELISA および Western blotting 法 (WB) の抗原とした。

2) EBO-NP、MBG-NP 蛋白のエピトープ解析:

EBO-NP、MBG-NP の重複する 8 フラグメント (約 100 アミノ酸) をそれぞれ GST との融合蛋白として大腸菌 BL21 株で発現した (それぞれ N'-末端側より EBO-NP1~EBO-NP8 および MBG-NP1~MBG-NP8 と命名)。また、EBO および MBG-NP の 5~8 までのフラグメント (それぞれ 379、355 アミノ酸) を GST 融合蛋白 (それぞれ EBO5-8、MBG5-8) として発現した (図 1)。Glutathione カラムで精製したこれら融合蛋白を抗原に用いた ELISA、WB 法を行なった。

3) Ebola-Reston 感染サル組織からの抗原、遺伝子の検出:

Ebola-Reston の NP 遺伝子を検出する RT-

PCRを用いてフィリピン熱帯医学研究所に保存されている Reston 感染サルホルマリン固定組織から RT-PCRを行なった。また、ウサギ抗 EBO 血清を用いて、免疫組織染色を行なった。

C. 研究結果

1) 組換え EBO-NP 発現 HeLa 細胞を用いた IF 法の評価:

今回作製した HeLa 細胞を用いた IF 法では、陽性血清での染色像が大きな顆粒状に認められ、非特異反応との識別が非常に容易であった(図2)。CDC が保有する血清(EBO 患者血清 13 検体、EBO 感染サル血清 1 検体と 4 検体の抗 MBG 抗体を含む 52 検体の非 EBO 感染ヒト血清)を用いて IF 法を行なった結果、EBO 抗体陽性の 14 検体すべてが陽性を示した。抗体価は最高で 25,600 倍、最低で 25 倍であった。一方、非 EBO 感染者 48 検体の血清は、1 検体を除いてすべて陰性であった。1 検体は 100 倍の抗体価で抗 EBO-NP 抗体が確認された。これらの結果、この IF 法の感度は 100%、精度は 98.4%であることが明らかとなった。

2) EBO-NP、MBG-NP 蛋白のエピトープ解析:

抗 EBO-NP ウサギ血清と抗 MBG-NP ウサギ血清を用いて EBO-NP1~8 と MBG-NP1~8 との反応性を解析した結果、抗 EBO-NP ウサギ血清は、EBO-NP5、6、7、8 を、抗 MBG-NP ウサギ血清は MBG-NP5、6、8 を認識した。EBO 患者血清 13 検体、EBO 免疫動物血清 14 検体と MBG 患者血清 3 検体と MBG 免疫動物血清 8 検体を用いて、さらに各フラグメントとの反応性を検討した結果、フィロウイルスの核蛋白の C'-末端側に抗原性領域が確認さ

れた。特に EBO-NP8 と MBG-NP8 に最も強い抗原性が確認された。ついで EBO-NP5 (MBG-NP5)、EBO-NP6 (MBG-NP6)、EBO-NP7 (MBG-NP7) の順に抗原性が確認された(表1, 2)。

3) EBO および MBG 抗体検出 ELISA の検討と評価:

EBO 抗体検出には、His-EBO-NP、EBO-NP5-8、EBO-NP8 をそれぞれ抗原とした ELISA 法の精度と感度を検討した。また、MBG 抗体の検出には、MBG-NP5-8 を抗原としてその精度と感度を検討した。ELISA 法の評価には、EBO 抗体陽性 14 検体(EBO ヒト患者血清 13 検体と EBO 免疫サル血清 1 検体)と MBG 抗体陽性 4 検体(MBG ヒト患者血清 3 検体と MBG 免疫サル血清 1 検体)および西アフリカのヒト血清 48 検体を用いた。ELISA に用いる抗原量は box titration により至的条件を設定して決定した。その結果、His-EBO-NP と EBO-NP5-8 が抗原として適していて、その精度と感度はそれぞれ、His-EBO-NP が 98.1%、93%、EBO-NP5-8 が 98.1%、100%であった。しかし、EBO-NP8 を抗原とした場合は疑陽性の頻度が高くなり精度が低下した。また、MBG-NP5-8 を抗原とした ELISA では、MBG 抗体陽性 4 検体のうち 1 検体は陰性であったが、残りの 3 検体は陽性を示した(精度 100%、感度 75%)。陰性を示した血清は、極めて低い抗体価を有していると考えられた。EBO 患者血清を含むヒト血清はすべて陰性を示した。つまり MBG-NP5-8 を抗原とした ELISA の精度はほぼ 100%であった。

4) Ebola-Reston 感染サル組織からの抗原、遺伝子の検出:

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 (図 3)。

D. 考察

昨年度に検討した組み換え EBO-NP 発現昆虫細胞を用いた IF 法と比べて、今年度作成した組み換え EBO-NP 発現 HeLa 細胞を用いた IF 法は、特異的な染色像、感度、精度のいずれにおいてもはるかに優れた系であった。MBG-NP に関しては、同様に組み換え baculovirus を HeLa 細胞に感染させたとき蛋白発現量が低かった。より強力な CAG プロモーターを用いても十分な発現が得られなかった。そこで、EF-BOS プロモーターで MBG-NP を発現する stable HeLa 細胞株を樹立したところ、発現量が極めて高く IF 法で顆粒状の特異染色像が得られた。MBG 抗体検出 IF 法に関しては、この細胞株を用いた IF 法を今後検討したい。ELISA 抗原としては、EBO 抗体検出には、His-EBO-NP または EBO-NP5-8 が適していた。MBG 抗原は、His-MBG-NP の発現が低く充分量の抗原が精製できなかつたため検討できなかつたが、MBG-NP5-8 が使用可能であった。今回検討した IF 法と ELISA 法を組み合わせることにより抗体検出に関しては感度、精度ともに充分信頼できる結果が得られることが明らかとなった。また、組み換え NP に対するウサギ抗血清を用いてホルマリン固定組織から免疫組織染色によりウイルス抗原を高感度に検出でき

ることができた。固定組織から、RT-PCR により部分遺伝子を増幅することも場合によっては可能であった。感染サルやヒトでは発症初期には十分な抗体が検出できないことがあるため、今後モノクローナル抗体を作成し、血中のウイルス抗原を検出する Ag-capture ELISA 法を開発する必要がある。

E. 結論

ウイルス性出血熱の原因ウイルスのなかでサルを介して輸入される危険のあるフィロウイルス (エボラ、マールブルグウイルス) 抗体の高感度で特異的な診断法が確立できた。これらのウイルスはレベル 4 に属し日本での培養が認められないため、組み換え NP 蛋白を作成し、これを用いた IF 法、ELISA 法による抗体検出法を開発した。これらは感度、精度ともに現在 CDC が用いている培養ウイルス抗原を用いた方法と同レベルにあることが判明した。また、固定化組織からのエボラウイルス抗原の検出も可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe, T., Morikawa, S., Suzuki, K., Miyamura, T., Tamaki, K., and Ueda, Y. (1998) Two major antigenic polypeptides of *Molluscum Contagiosum* virus. *J. Infect. Dis.*, 177, 284-292.
- 2) Okada, H., Morikawa, S., and Tashiro, M. (1998) HIV-1 Nef binding protein expressed on the surface of murine blood cells. *Med. Microbiol. Immunol.*, 186, 201-207
- 3) Watanabe, T., Morikawa, S., Suzuki, K., Miyamura, T., Tamaki, K., and Ueda, Y. (1998) Immunoreactive proteins of *Molluscum Contagiosum* virus type 1, 1v, and 2. *J. Infect. Dis.*, 178, 1231

4) 森川 茂(1998) :ウイルス性出血熱、 臨床病理 (検査微生物学(II)ーウイルスと原虫・寄生虫感染症の検査診断ー) 特 108, 105-110

5) 森川 茂(1998) : マールブルグ病、小児科臨床 51-12, 199-202

6) Saijo, M., Suzutani, T., Itoh, K., Hirano, Y., Muron, K., Niikura, M., and Morikawa, S. (1999) Nucleotide sequence of thymidine kinase gene of sequential acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 recovered from a child with Wiskott-Aldrich syndrome: evidence for reactivation of acyclovir-resistant herpes simplex virus. J. Med. Virol., in press

7) Amano, H., Morikawa, S., Shimizu, H., Shoji, I., Kurosawa, D., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Ueda, Y. (1999) Identification of the canarypox virus thymidine kinase gene and insertion of foreign genes. Virology, in press

2.学会発表

1) Identification of the antigenic regions on the Ebola and Marburg virus nucleoprotein: Masayuki Saijo, Masahiro Niikura, Momoko Ogata, Shigeru Morikawa, and Ichiro Kurane 32nd Joint Working Conference on Viral Diseases (Kyoto)

2) Ebola-Reston 感染サルのホルマリン固定組織からの RT-PCR 法: 森川茂、網康至、西條政幸、新倉昌浩、緒方もも子、倉根 一郎 第46回日本ウイルス学会

3) エボラウイルスとマールブルグウイルスの核蛋白のエピトープ領域の同定; 抗体検出への応用: 西條政幸、新倉昌浩、緒方もも子、森川 茂、倉根 一郎 第46回日本ウイルス学会

図1 GST融合 filovirus NP-fragments

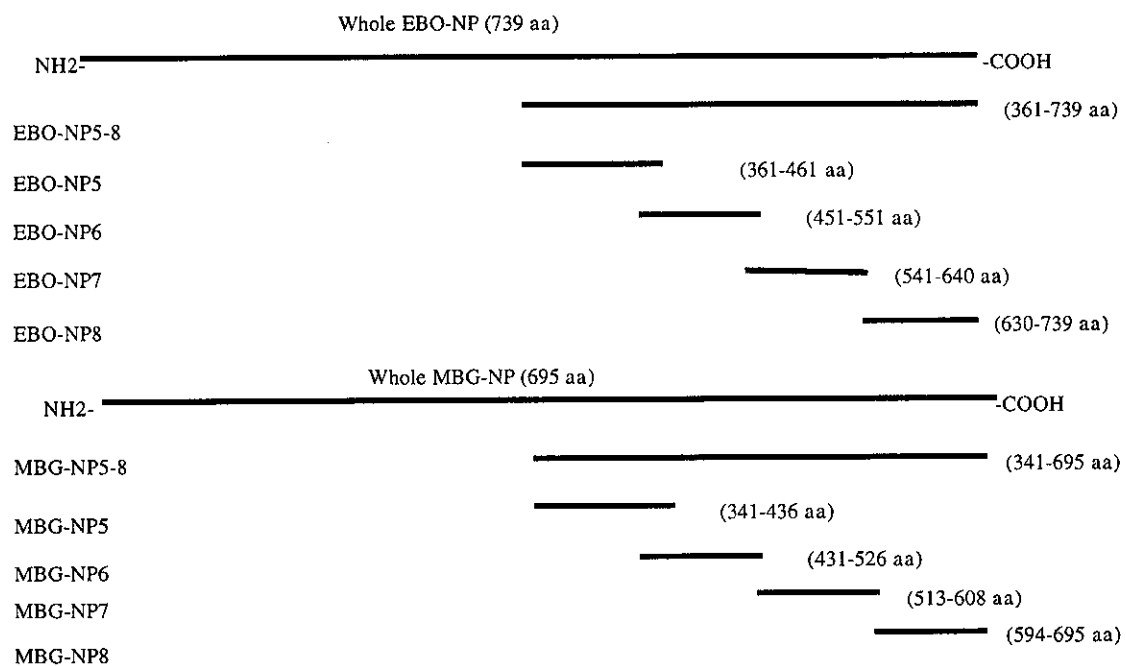
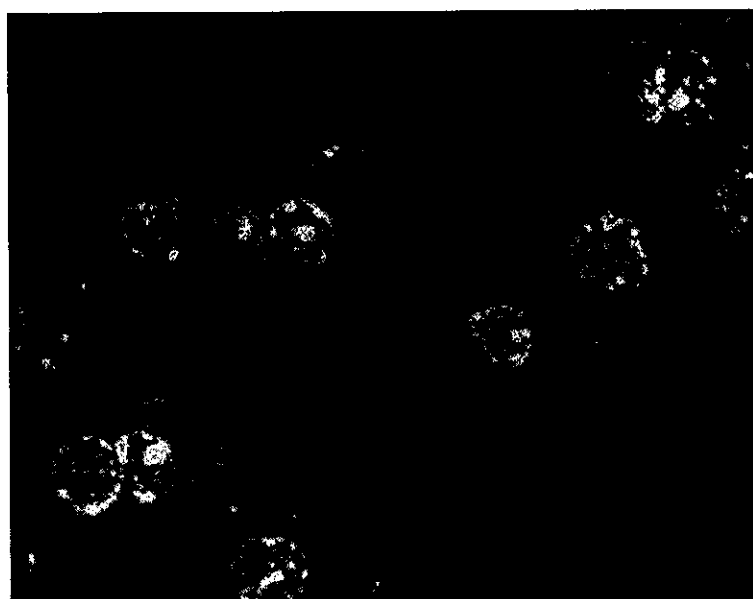


図2 EBO-NP 発現 HeLa 細胞を用いた IF 法の陽性染色像



細胞質に顆粒状に EBO-NP 抗原が染色される。

表1 各 GST-EBO-NP フラグメントと EBO 患者血清等との反応性

	EBO-NP5- 8	EBO-NP5	EBO-NP6	EBO-NP7	EBO-NP8	GST	description	SPB No.
E1	+ / >128	+ / 8	+ / 16	- / 8	+ / >128	- / 1	EBO-Zaire95	703236
E2	+ / 8	+ / 1	+ / 2	- / 1	- / 16	+ - / 1	EBO-Z76	96029
E3	+ / 32	- / 4	+ / 4	+ / 4	+ / 64	- / 1	EBO-Zaire95	703235
E4	+ / >128	+ / 2	- / 2	- / 1	+ / 64	- / 1	EBO-Zaire95	703231
E5	+ / 32	+ / 2	+ / 16	+ / 1	+ / 2	+ / 1	EBO-Zaire	703205
E6	+ / 16	+ / 2	+ / 2	- / 2	+ / 16	- / 1	EBO-Zaire95	703233
E13	+ / 32	+ / 4	+ / 1	- / 1	+ / 8	- / 1	EBO-Zaire	703200
E14	+ / >128	+ / 4	+ / 16	+ / 8	+ / >128	- / 1	EBO-Zaire95	703234
E16	+ / >128	+ / 8	+ / 16	- / 8	+ / >128	- / 1	EBO-Zaire95	703240
E17	+ / >64	+ / 2	+ / 2	+ - / 2	+ / 64	- / 1	EBO-Zaire95	703238
E18	+ / >128	+ / 16	+ / 16	- / 16	+ / 128	- / 1	EBO-Zaire	703232
E20	+ / >128	+ / 2	+ / 8	- / 16	+ / >128	- / 1	EBO-Zaire95	703239
E26	+ / 8	+ / 2	+ / 1	- / 1	+ / 2	- / 1	EBO-Zaire	703201
E27	+ / 8	+ / 8	- / 1	- / 2	+ / 8	- / 1	EBO-Zaire	703202
E7	+ / 32	- / 4	- / 2	- / 2	+ / 16	- / 1	EBO	703076
E8	+ / >128	+ / 32	+ / 32	+ / 32	+ / 128	- / 1	EBO Sudan (Boniface)	703084
E9	+ / 64	+ / 8	- / 1	- / 8	+ / 64	- / 1	EBO Reston	R1633
E10	+ / >128	+ / >128	+ / >128	+ / 64	+ / >128	- / 1	EBO-Zaire	703355
E11	+ / 16	+ / 8	- / 4	- / 2	+ / 8	- / 1	EBO-IC	703258
E15	+ / >128	+ / 32	+ / 64	+ - / 16	+ / 128	- / 1	EBO-Zaire	703354
E19	+ / 64	+ / 64	+ / 32	- / 4	+ / 32	- / 1	EBO Reston	703085
E21	+ / 8	+ - / 1	+ - / 1	+ / 4	+ / 8	- / 1	EBO-Rst	CE21
E22	+ / 4	- / 1	+ / 4	- / 1	+ / 8	- / 1	EBO-Rst	CE26
E23	+ / 8	- / 1	+ - / 8	- / 2	+ / 16	- / 1	EBO-Rst	CE28
E24	+ / NT	+ - / NY	+ / NT	+ - / NT	+ / NT	+ - / NT	EBO-Sudan	CE31
E25	+ / >32	+ / >32	+ / 16	+ / >32	+ / >32	- / 1	EBO-NP(Z)- baculovirus	NIID

+ - は WB での陽性陰性を示す。数字は抗原性の強さを index 表示したもの。

表2 各 GST-MBG-NP フラグメントと MBG 患者血清等との反応性

	NP5-8	NP5	NP6	NP7	NP8	GST	SPB No.	Description
M1	+ / >64	+ / 2	- / 8	- / 8	+ / >64	- / 1	703204	HUMAN MUSOKE 21JUL80 lyoph.
M2	+ / >128	+ / 64	+ / 128	+ / 64	+ / 128	- / 1	703358	RABBIT ANTI-MARBURG, LYOPHILIZED
M3	+ / 16	+ / 2	- / 2	- / 1	+ / 8	- / 1	SPR491	RABBIT ANTI MARBURG POOLS
M4	+ / >128	- / 1	- / 1	- / 1	+ / >128	- / 1	SPR526	MARBURG MONOCLONAL ANTIBODY POOL, LYOPHILIZED
M5	+ / 4	+ - / 1	- / 1	+ / 1	+ / 8	- / 1	SPR421	MBG MAb 3-mix, lyophilized
M6	+ / 16	+ / 4	+ / 8	- / 2	+ / 8	- / 1	703093	MARBURG 4-SHOT HMAF
M7	+ / 4	- / 1	+ / 1	- / 1	- / 2	- / 1	SPR471	POS HUMAN SERUM FROM LAB INF (RUSS)
M8	+ / >64	- / 2	+ / 8	- / 2	+ / >64	- / 1	703203	HUMAN MUSOKE 27AUG80 lyoph.
M9	+ / >16	- / 2	- / 2	- / 2	+ / >16	- / 1	R1305	Monkey #8A40
M10	+ / >128	+ / 4	+ / 32	- / 1	+ / >128	- / 1	NIID	Serum collected from MBG-NP immunized rabbit
M11*	+ / NT	+ / NT	+ / NT	- / NT	+ / NT	- / 1	700808	MBG-human serum

*:M11 is the human serum against MBG supplied from SPB, CDC. Its SPB No. is #700808

+ - は WB での陽性陰性を示す。数字は抗原性の強さを index 表示したもの。

図3 免疫組織染色による Reston 感染サル肝組織中のウイルス抗原の検出



クッパ細胞、マクロファージが染色される（図の黒く染色されたところ）

分担研究者 神山恒夫 国立感染症研究所 獣医科学部 人獣共通感染症室 室長

研究要旨

バベシア症はマラリア様の赤血球寄生原虫である *Babesia microti* の感染によっておこるが、これまで国内では発生例が報告されていない。本研究では、本原虫の自然宿主とされるネズミ類を対照としてレトロスペクティブな血清調査を行い、わが国における本感染症の存在の可能性を明らかにすることとした。288 検体の野外採取ネズミ血清を ELISA 法によってスクリーニングを行い、陽性検体についてウエスタンブロット法で確認を行ったところ、3 検体において *B. microti* 感染が示唆された。今後原虫の分離によってさらに確認する必要がある。

A. 研究目的

サル類を宿主とする人獣共通感染症にはマラリアをはじめとして 20 数種類にもおよぶ原虫疾患が含まれる。バベシア症はマラリア様の赤血球寄生原虫である *Babesia microti* の感染によっておこるが、これまで国内では発生例が報告されていない。しかし、北米およびヨーロッパでは本原虫感染患者数も多く、死亡例も報告されている。

本研究では、本原虫の自然宿主とされるネズミ類を対照としてレトロスペクティブな血清調査を行い、わが国における本感染症の存在の可能性を明らかにすることとした。

B. 研究方法

(1) 1986 年 4 月から 1988 年 6 月の間に、名古屋市内で 216 匹の野鼠（おもにドブネズミ類）を捕獲して血清を採取した。1991 年 4 月から 1992 年 7 月の間に、岐阜県下の林野部で 72 匹の野鼠（おもにハツカネズミ類およびハタネズミ類）を捕獲して血清を採取した。対照血清として実験室内飼育の未処置マウスおよび *B. microti* 感染耐過マウス血清を用いた。

(2) *B. microti* Gray/mo 株を SCID マウスに感染させて 50% 寄生率の感染赤血球を得た。赤血球抗原は、低張溶解処理と Triton-X114 処理によって調整した。対象として *B. rodhaini* および *Plasmodium chabaudi* 感染赤血球を用いた。

(3) 野鼠血清の感染赤血球抗原に対する反応は ELISA およびウエスタンブロットによって、野鼠の免疫グロブリンの検出にビオチン標識プロテイン A/G を用いて常法に従って行った。

C. 研究結果

① 合計 288 検体の野鼠血清の *B. microti* に対する抗体価を ELISA 法によってスクリーニングした。このスクリーニングでは 10 検体の実験室内飼育未処置マウス血清が示した平均吸光度から 5SD 以上の吸光度を示したものを陽性とした。その結果、都市部（名古屋市内）で捕獲されたドブネズミ類 22 匹（10.2%）と林野部（岐阜県）で捕獲されたハツカネズミおよびハタネズミ類 7 匹（9.7%）の血清、合計 29 検体（10.1%）が陽性と判断された。陽性血清（20 倍希釈）の吸光度は 0.26–1.5 の間に分布していた。

② 野鼠血清が様々な血清反応において非特異的に反応することが知られているので、スクリーニングで陽性とされた血清についてウエスタンブロットを行って確認を行った。その結果、林野部で捕獲された 3 匹のネズミ血清が *B. microti* 抗原と反応して約 43kDa と 49kDa の 2 ほんの抗原バンドを認識することが明らかとなった。これらの抗原バンドは実験感染マウス血清とも反応することが認められた。これら 3 匹の血清は *B. rodhaini* および *P. chabaudi* 抗原とは反応しなかった。

D. 考察

B. microti 原虫は感染早期の一時期をのぞいては、血液中にはほとんど認めることができないことが実験的に確かめられている。従って動物界における本原虫による汚染調査には血清学的手法が有用となる。本研究の結果、わが国の野鼠の間に *B. microti* が存在している可能性のあることが示唆された。しかしながら、未確認の抗原との交差反応の可能性も否定することはできないため、*B. microti*

原虫の分離が行われるまではその存在を確認することはできない。

E. 結論

血清学的手法によってわが国の野鼠における *B. microti* 感染が示唆された。今後原虫の分離によってさらに確認する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hanafusa, Y., Onuma, M., and Kamiyama, T. Partial protection of severe combined immunodeficient mice against infection with *Babesia microti* by in vitro-generated CD4+ T cell clones. *J. Vet. Med. Sci.* 60:401-404, 1998.
2. Tsutsui, N., and Kamiyama, T. Suppression of in vitro IFN- γ production by splenic cells of *Plasmodium chabaudi*-infected C57BL/10 mice exposed to dexamethasone at a low dose. *Int. J. Immunopharmacol.* 20:141-152, 1998.
3. 神山恒夫, 筒井尚久 原虫感染と TGF- β 1. *臨床免疫*, 30 : 1337-1343, 1998.
4. Yamamoto, K., Ito, R., Koura, M., and Kamiyama, T. The effect of UV-B irradiation on infectious diseases - the case of mouse malaria -. *Photomed. Photobiol.* 20:71-73, 1998.
5. Miyahira, Y., Kobayashi, S., Takeuchi, T., and Kamiyama, T. Induction of CD8+ T cell-mediated protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Int. Immunol.* 11:133-141, 1999.
6. Tsutsui, N., and Kamiyama, T. Transforming growth factor β -induced failure of resistance to infection with blood-stage *Plasmodium chabaudi* in mice. *Infect. Immun.* in press.