

厚生省
平成11年度

厚生科学研究費補助金・新興再興感染症・研究事業

ボルナ病ウイルス感染の実態に関する疫学的ウイルス学的研究

研 究 報 告 書

平成12年3月

主任研究者 池 田 和 彦

(東京都精神医学総合研究所超微形態研究室長)

目 次

1. 多施設・盲検研究

献血者結晶 200 検体を対象としたボルナ病ウイルス感染血清診断法の評価 1

主任研究者： 池田 和彦（東京都精神医学総合研究所）

2. 第 6 回ボルナ病ウイルス研究会 2 1

特別講演 Genetic diversity and pathogenic potential of Borna disease virus

(Prof. Peter Staeheli) 2 4

抄録 1 ボルナ病ウイルス G 蛋白の培養細胞での発現（大槻貴博ら） 2 5

抄録 2 感染スナネズム脳におけるボルナ病ウイルスの主要抗原の発現様式（渡辺真紀子ら） . . . 2 6

抄録 3 ボルナ病ウイルス 0.8kb(X/P)mRNA の翻訳様式（小林 剛ら） 2 7

抄録 4 ボルナ病ウイルスの選択的遺伝子発現とその調節機構（朝長啓造ら） 2 8

抄録 5 ヒト、動物におけるボルナ病ウイルスの血清疫学と今後の課題（山口一成ら） 2 9

抄録 7 ネコ及びヒトにおける抗 BDV p10 抗体の検出（大内敦夫ら） 3 0

抄録 8 神経症状を呈するネコにおけるボルナ病ウイルス感染の診断と病態（西野佳以ら） . . . 3 1

総括研究報告書

献血者血漿 200 検体を対象としたボルナ病ウイルス感染血清診断法の評価

「ボルナ病ウイルス感染の実態に関する疫学的ウイルス学的研究」班共同研究

- 主任研究者 : 池田 和彦 (東京都精神医学総合研究所超微形態研究部門)
- 分担研究者 : 田代 真人 (国立感染症研究所ウイルス製剤部)
- 生田 和良 (大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野)
- 風祭 元 (東京都立松沢病院)
- 園田 俊郎 (鹿児島大学医学部ウイルス学講座)
- 倉根 一郎 (国立感染症研究所ウイルス第一部)
- 田所 憲治 (日本赤十字社中央血液センター)
- 堀本 泰介 (大阪府立大学農学部獣医微生物学講座)
- 宇野 正威 (国立精神・神経センター武蔵病院)
- 研究協力者 : 西藤 岳彦 (国立感染症研究所ウイルス第一部)
- 西野 佳以 (麻布大学生物科学総合研究所)
- 山口 一成 (熊本大学医学部輸血部)
- 沢田 高志 (エーザイ株式会社・筑波研究所)
- 光永 滋樹 (日本赤十字社中央血液センター)
- 岸 雅彦 (共立商事株式会社・中央研究所)
- ジビレ・ヘアツォーク (ドイツ・ギーセン大学・委託研究*)

* 新興・再興感染症研究推進事業・外国研究機関委託事業
(財) ヒューマン・サイエンス振興財団

研究要旨

献血者血漿 200 検体について、ボルナ病ウイルス抗体の有無を 7 施設・盲検で検索した。各施設のそれぞれの手法による陽性判定はたがいにばらつきをしめした。現段階では、同一検体を複数の施設で複数の手技で検索し、結果を総合的に評価しなければならないと思われる。総合的にみると、ボルナ病ウイルス p24 蛋白と反応する抗体を有する検体が 2 検体見いだされた。これは日本人においてボルナ病ウイルスの不顕性感染が存在する可能性を示唆するものである。今後は、それら陽性抗体がボルナ病ウイルス特異的であるかどうかを確認する一方、ボルナ病ウイルス感染実験動物における抗体産生の推移を詳細に検索するという基盤的研究が不可欠である。そのような手順をへてはじめて、日本におけるボルナ病ウイルス感染の実態が解明され、またこのウイルス感染と精神神経疾患の関連の有無についての正当な評価をくだすことが可能になる。

【目的】

ボルナ病ウイルス (BDV) は、自然宿主であるウマに対する病原性が知られているが、1985年に精神疾患患者の血清中に BDV と反応する抗体が存在することが指摘され、ヒトにたいしても病原性をもつ可能性が示唆されてきた。したがって BDV の感染疫学研究は、精神疾患の理解に多大な貢献をすることになるばかりでなく、ばあいによっては、BDV が関与する精神疾患についての予防・治療の道が拓ける可能性もでてくる。しかし、その一方で、最近、BDV 遺伝子が精神疾患患者群の血球に高い頻度で見られ、また献血者の 5%程度においてもその遺伝子が血球に検出されるという報告がなされている。したがって、ボルナ病ウイルスをめぐる輸血の安全性の評価、ヒトの感染における感染源・感染経路の究明などは、厚生行政の緊急かつ重要な課題となってきた。本研究は、この新興ウイルス感染症への対策に遅れをとらないために、特異性・感度の高いヒト BDV 感染の検索法の標準化をはかり、それを活用してわが国におけるヒト BDV 感染の実態を把握することを目的とする。さらに、これらの結果から得られた感染源・感染経路の情報をもとに感染対策が必要かどうか、また必要ならばその具体的方策はなにかを検討する。

過去2年の成果の概略

ヒト血球におけるBDV遺伝子の検出

1994年に開発された新しい手技（BDV遺伝子検索のための nested RT-PCR法）によりBDV遺伝子の検出が可能となって以来、1995年以降、このウイルス遺伝子がヒトの末梢血単核球において検出されるという報告が国の内外でなされている。この nested RT-PCR 検索においても、精神疾患患者のほうに健常者群にくらべ、BDV RNA の検出率がたかいたいわれる。Sauder らは、ドイツの精神病院入院患者において、50%という驚くほどたかい頻度で、BDV の遺伝子をその血球にみとめている。

わが国では、献血者の5%程度においてBDV遺伝子が血球に検出されるという報告がなされた。また、北海道において、サラブレッド農場の近辺に住む献血者は、都会に住む献血者より、BDV抗体保有者の頻度がたかく、かつ血球のボルナ病ウイルス遺伝子の検出頻度もたかいという報告もなされている。

これらの報告は、1) 血球のBDV遺伝子検索が、ヒトのBDV感染疫学の有用な手技となる可能性を示唆するいっぽうで、2) BDVがヒトに病原性をもつという可能性に鑑みると、輸血の安全性という重大な問題が生じることを示すことになった。

そこで、平成9年度は、70検の輸血血液を対象にした多施設・盲検検索を試みた。まず、多施設・盲検検索という研究体制を確立することができた。ついで、検索の結果、70検体すべてにおいて、ボルナ病ウイルス p24 および p40RNA はともに陰性であると判定された。しかしながら、被検検体が70であり例数が少なく、より多数例で行う必要があることが指摘された。また、北海道の献血者血液の単核球分画（PBMC）を検索した共同研究者からは、高い頻度でBDV遺伝子が検出できることが報告され、今回のバッフィーコート由来の試料の適否の問題が指摘された。

平成10年度は、東京および札幌の献血者200検体の血球について、多施設・盲検検索をおこない、献血者血液におけるボルナ病ウイルス RNA の有無について、評価した。また、札幌地区献血者血液 PBMC 18検体における3施設・盲検検索もあわせて施行した。結果は、献血者200検体のバッフィーコート血球で、ボルナ病ウイルス p24 および p40RNA はともに、検出されなかった。さらに、18例のPBMC分画を対象にした結果も同様に陰性であった。したがって、＜東京・札幌地区の輸血血液検体ではボルナ病ウイルス p24RNA 断片が nested RT-PCR 法により約5%の頻度で検出できる＞、という過去の報告を支持することはできなかった。また、この結果から、ヒト末梢血を対象とした nested RT-PCR 法によるボルナ病ウイルス RNA の検出は、ヒト

のボルナ病ウイルス感染症疫学にとって適当でないことが判明した。

ヒト・ボルナ病ウイルス感染の実態究明にとっては、血清抗体診断法を検討しそれを活用しての血清疫学調査が必須であることが指摘された。しかしながら、ボルナ病ウイルスは他のウイルスとことなり、自然感染のウマや実験感染の動物においても、きわめて低い抗体惹起能しかしめさないことが知られており、通常のウイルス感染のための抗体測定法の活用によって感染の有無が容易に同定できるわけではない。

そこで平成11年度は、ボルナ病ウイルス感染血清診断法の実態把握および日本人検体におけるボルナ病ウイルス抗体の有無の評価をおこなうことにした。

1) 各種血清診断法の特異性、感度、信頼性の検討

ボルナ病ウイルス感染の血清診断には、間接蛍光抗体法、ELISA法、ウエスタン・ブロット法がこれまで活用されてきた。これらの手法は、感染動物や抗原免疫動物の血清抗体測定にはほぼ満足のいく結果をあたえるが、ヒト血清を対象にしたばあいは、不一致をみることがきわめて多いことが近年指摘されている。

そこで、まず、どの手法（あるいは手法の組み合わせ）が、ボルナ病ウイルス感染の血清診断にとって妥当性・信頼性をもつのかを調べる。

わが国において独自に開発された抗原サンドイッチ ELISA法および ECLIA法の2法も加えた全5法について、同一陽性検体（感染ウマ血清、免疫ウサギ血清など動物陽性対照血清）を対象にして、多施設・盲検調査を施行する。その結果を吟味・評価し、適切な手法（あるいは組み合わせ）および適切な手順（たとえば抗原による吸収試験での確認など）を選択する。

2) ヒト検体におけるボルナ病ウイルス感染血清診断の多施設・盲検調査

1) と並行して、平成10年度に検索した献血者200検体（血球）と対応する保存血漿を対象に、多施設・盲検調査を施行して、上記5法がヒト検体にたいしてどのような結果を与えるのかを吟味する。陽性と判定された検体については、今回の主たる対象であるウイルス抗原（p24 および p40）以外のウイルス抗原（p10 や gp56 など）に対する反応性を調べ、ウイルス抗体である確認をさらに行う。

【材料と方法】

(A) 被検検体

(1) 陽性レファレンス検体

ウサギ免疫血清

Rabbit 1 : p24 リコンビナント蛋白免疫血清

Rabbit 2 : p40 リコンビナント蛋白免疫血清

ウマ陽性血清 (ドイツ・ギーセン大学)

Horse 021 : IFA1:160

Horse 022 : IFA1:320

ヒト血清・血漿

	ECLIA	WB	IFA
ヒト 001	p40	p40	
ヒト 005	p24	p24	
ヒト 006	p24	p24	
ヒト 007	p24	p24	
ヒト 008	p24	p24	
ヒト 005-2	p24	p24	
ヒト 006-2	p24	p24	
ヒト 023			1:160 (ドイツ・ギーセン大学)
ヒト 030	p24	p24	
ヒト 031	p40	p40	

(2) 献血者血漿 200 検体

東京地区献血者血液 100 検体 : 日赤中央血液センター提供

札幌地区献血者血液 100 検体 : 北海道日赤血液センター提供

(平成10年度 (BDV 遺伝子検出の多施設・盲検) 検索に使用した血液の血漿部分。)

1) 検索の概要

献血者血漿（200検体）のコード化

血漿検体の配布（日本赤十字社中央血液センター：田所憲治）



7 研究施設



結果をモデレーターに送る

（プロトコールおよび備考も送る）

(2) 参加施設および検索項目

施設：

Lab 1

ドイツ・ギーセン大学ウイルス学研究所

IFA 法

Lab 2

麻布大学生物科学総合研究所

IFA 法

Lab 3

鹿児島大学医学部ウイルス学講座

ECLIA 法、WB 法 (p24, p40)

熊本大学医学部輸血部

エーザイ株式会社・筑波研究所

Lab 4

国立感染症研究所ウイルス製剤部

rs ELISA 法 (p40+GST)

国立感染症研究所ウイルス第一部

大阪府立大学農学部獣医微生物学講座

Lab 5

大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野

WB 法 (p24+GST, p40+GST)

Lab 6

共立商事株式会社・中央研究所

WB 法 (p10+GST)

Lab 7

東京都精神医学総合研究所超微形態研究部門

WB 法 (p24, p40)

(2) 方法

Lab 1

IFA 法 (ギーセン大学ウイルス学研究所・原法)

- ・ MDCK/BDV 細胞の核内蛍光の有無を、間接蛍光抗体法でみる。
- ・ 対照は、非感染 MDCK 細胞。
- ・ 血清 (血漿) 検体をアセトン・パウダーで前処置する。

手順 :

Absorption with swine liver powder

1) Weigh out about 100 mg swine liver powder.

↓

2) Add 2 ml of PBS, resuspend (vortex), stand for 5–10 min at room temperature, spin for 5 min at 5000 rpm, discard the supernatant.

↓

3) Add 500 ul serum, which is diluted 1:5 with swine serum (swine serum: diluted 1:5 with PBS) to the pellet, resuspend for 10–15 min at room temperature, spin for 5 min at 5000 rpm.

↓

4) Serum is ready for use.

MDCK/BDV cells および MDCK cells の培養と固定

confluent にちかい細胞を 1 滴 (その培地でサスペンド)、と新規培地 3 滴を、8 chamber の Tissue Tek の chamber にまく。

↓

3–4 日、培養 (MEM, 10% FBS, 抗生物質)

↓

アセトン固定 (-20) 1日



-20 で風乾 (-20 で数カ月安定)



吸収血清を3滴、室温30分



2次抗体-FITC



鏡検

Lab 2

IFA 法 (ギーセン大学原法)

Lab 1 と同様の手順・手法

Lab 3

ECLIA 法

p24+p40 結合ビーズにてスクリーニングし、1000 カウント以上を示した場合にスクリーニング陽性とした。スクリーニング陽性検体については p24+p40 抗原による inhibition 試験を実施し、50%以上抑制されたものを最終的に BDV 抗体陽性と判定した。その後、p24 結合ビーズおよび p40 結合ビーズにより p24 抗体と p40 抗体を別々に測定した。

(参照文献) Yamaguchi K, Sawada T, Naraki T, Igata-Yi R, Shiraki H, Horii Y, Ishii T, Ikeda K, Asou N, Okabe H, Mochizuki M, Takahashi K, Yamada S, Kubo K, Yashiki S, Waltrip RW II, Carbone KM (1999) Detection of Borna disease virus-reactive antibodies from patients with psychiatric disorders and from horses by electrochemiluminescence immunoassay. Clin Diagn Lab Immunol 6: 696-700

ウェスタンブロット法

- ・電気泳動は 12.5%アクリルアミドゲルでおこなった。
- ・抗原は 1 strip あたり p24 および p40 をそれぞれ 100ng 用いた。

- ・ ニトロセルロース膜に転写後、以下の免疫染色をおこなった。

免疫染色法

1. ウェスタンブロット反应用トレイ (S&S 社製) に抗原転写 strip を入れ、反应用溶液 (10%ウサギ血清、1%スキムミルク、0.15M NaCl、0.1%アジ化 Na を含む 0.05M Tris-HCl、pH7.5) を 1 ml 加える。

↓

2. 被検血清を 0.05ml 加える。

↓

3. 室温で 2 時間、ロッキングしながら反応させる。

↓

4. 内容液を吸引後、洗浄液 (0.05% Tween 20、0.15M NaCl を含む 0.01M Tris-HCl、pH7.5) を 1 ml ずつ加え、軽く攪拌した後吸引する。その後洗浄液を 1 ml 加え、5 分間ロッキングしながら洗浄する。この洗浄操作をもう一度繰り返す。

↓

5. 洗浄液にて 1000 倍希釈した Biotin 標識抗ヒト IgG(Fc)抗体 (Sigma) を 1 ml ずつ加え、室温で 1 時間ロッキングしながら反応させる。

↓

6. 4 項と同様に洗浄する。

↓

7. 洗浄液にて 1000 倍希釈した Avidin 標識 Peroxidase (Sigma) を 1 ml ずつ加え、室温で 1 時間ロッキングしながら反応させる。

↓

8. 4 項と同様に洗浄する。

↓

9. 基質発色液を 1 ml ずつ加え、バンドを出現するまで反応させる (約 5~10 分)。
基質発色液: 4-クロロ-1-ナフトール (3mg/メタノール 1 ml) 1 ml + 基質調製液 (0.15M NaCl を含む 0.01M Tris-HCl, pH6.5) 5 ml + 3%過酸化水素水 20 マイクロリットルの割合で混合し調製する。

Lab 4

RsELISA 法

以下の論文に準じておこなった。

Horimoto, T., Takahashi, H., Sakaguchi, M., Horikoshi, K., Iritani, S., Kazamatsuri, H., Ikeda, K., and Tashiro, M. (1997) A reverse-type sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Borna disease virus. J. Clin. Microbiol. 35: 1661-1666

Lab 5

ウエスタンプロット法

大腸菌発現 GST 融合 BDV p24 および p40 タンパク質を抗原として、ウエスタンプロットを行った。GST で吸収した献血者血漿は、100 倍希釈にてメンブランと反応させ、コニカイムノステインにて発色させた。上記の一次検査で陽性を疑われた検体については、大腸菌発現 p24 あるいは p40 蛋白で吸収をおこなったのちに再度同様にウエスタンプロットをおこない、特異的バンドが消失したものを陽性と判定した。

Lab 6

ウエスタンプロット法

50 倍希釈血清、Horseradish peroxidase 標識ヤギ抗ヒト IgG 血清 (500 倍希釈)、および GST-p10 蛋白 (抗原) を用いたウエスタンプロットをおこなった。

Lab 7

ウエスタンプロット法抗原:

- ・ BDV p24 および BDV p40 リコンビナント蛋白と BSA を混和して使用
 - BDV p24: 100 ng/strip
 - BDV p40: 5 ng/ strip
 - BSA: 100 ng/ strip
- ・ 電気泳動: 12.5% SDS-polyacrylamide gel 使用

・プロット：セミドライ方式（トランスプロット SD セル： Bio-Rad）
膜： PVDF（Millipore）

・免疫染色

1. ブロッキング： 10% FBS 室温 4 h
↓
2. 血漿サンプル： 1：50 に希釈して使用 4 °C、overnight
↓
3. 洗浄 0.05% Tween 20 - TBS (pH 7.5) 10 min、3 回
↓
4. Biotinylated anti-Human IgG (1：1000) 1 h
↓
5. 洗浄 0.05% Tween 20 - TBS (pH 7.5) 10 min、3 回
↓
6. Streptavidine - HRP (1：2000) 1 h
↓
7. 洗浄 0.05% Tween 20 - TBS (pH 7.5) 10 min、3 回
↓
8. 発色： POD Immunostain Set（和光）5 min

【結果】

1) 陽性レファレンス検体 (Table 1)

まずウサギ、ウマ、ヒトの陽性レファレンス血清をもとに、7施設の種々の血清診断法（IFA 法、ウエスタンプロット法、rsELISA 法、ECLIA 法）の結果を比較した。

ウサギ血清（rabbit 1, rabbit 2）は、それぞれボルナ病ウイルス p24 あるいは p40 のリコンビナント蛋白で免疫したウサギの血清であり、事前に、ECLIA 法でそれぞれ p24 あるいは p40 にたいして高値をしめし、ウエスタンプロット法でそれぞれ p24 あるいは p40 蛋白を特異的に認識することを確認している。また IFA 法ではそれぞれ 1:8000 で陽性である。

この2検体にたいして、IFA 法（Lab 2）は、陽性をしめし、抗体価は著しい高値をしめした。ECLIA 法（Lab 3）では、20 万カウント代という高値をしめし、またそれ

ぞれ p24 あるいは p40 にほぼ特異的であった。しかし、rabbit 1 は p40 結合ビーズにたいして 19,000 カウントの陽性反応をみとめ、また rabbit 2 は p24 結合ビーズにたいして 5,400 カウントの陽性反応をみとめた。二施設のウエスタンブロット法 (p24 および p40 : Lab 5, Lab 7) は、それぞれ p24 あるいは p40 蛋白バンドを特異的に認識した。一施設のウエスタンブロット法 (Lab 6) は、両検体ともに p24 および p40 蛋白バンドを認識した。またこの施設での p10 にたいするウエスタンブロット法では、両検体とも陽性であった。rsELISA (p40)法 (Lab 4) は、rabbit 2 検体を著しくたかい抗体価で陽性と判定した。Rabbit 1 にたいしても 1: 1600 で陽性であった。

つぎにウマ血清 (horse 021, horse 022) は、Lab 1 における IFA 陽性 (1: 160, 1: 320) をもとにして、レファレンス血清とした。Lab 2 における IFA では、両検体とも陽性であり、抗体価はそれぞれ 1: 80 と 1: 160 であった。ECLIA 法 (Lab 3) では、horse 021 は陰性と判定されたが、horse 022 は p24 ビーズにたいするカウントが約 3 万であり、吸収試験の結果と合わせかんがえて、p24 特異抗体と判定された。ウエスタンブロット法 (p24 および p40 : Lab 4, Lab 6, Lab 7) は、p24 あるいは p40 あるいは両者を認識し、ばらついた結果となった。一施設のウエスタンブロット法 (p10, Lab 6) は、両検体ともに陽性であった。

ヒト“レファレンス”検体は、ECLIA 法とウエスタンブロット法をもとにして選択した検体であり、#5、#6、#7、#8、#5-2、#6-2、#30 の 7 検体は p24 陽性と判定されたもの (#5、と #5-2、#6#と 6-2 はそれぞれ同一個体で、半年を隔てた血清)、#1#と 31#は同一個体の半年を隔てた血清で p40 陽性と判定されたものである。#23 は、IFA で陽性と判定された血清である (1: 160)。P24 と p40 が双方陽性である検体は選択段階では存在しなかった。

これらの検体についての諸検索の結果は Table 1 にしめすごとく、入り組んでいる (考察を参照)。

(2) 献血者血漿 200 検体の多施設・盲検検索 (Table 2)

すくなくとも 1 つの施設の検索で陽性と判定された検体は、25 あった。このうち 18 検体についての 7 施設の検索結果を Table 2 に掲げた。この結果については、考察をくわえながら、以下に詳述する。

【考察】

1) 免疫ウサギ血清検体における評価

rabbit 1 はボルナ病ウイルス・リコンビナント p24 蛋白で免疫した高力価抗体であり、rabbit 2 は p40 リコンビナント蛋白で免疫した高力価抗体である。

IFA 法 (Lab 2) では、MDCK/BDV 細胞で特徴的な陽性蛍光をみとめ、抗体価は著しく高値であった。

ECLIA 法 (Lab 3) では、両検体ともに 20 万カウント代という高値をしめし、またそれぞれ p24 あるいは p40 にほぼ特異的であった。しかしながら、rabbit 1 は p40 結合ビーズにたいして低値ながら陽性反応をみとめ、また rabbit 2 は p24 結合ビーズにたいして低値ながら陽性反応をみとめた。両抗体が、p40 あるいは p24 蛋白と交差反応をしめすことによるのか、あるいはリコンビナント標品（免疫抗原として使い、かつビーズのラベルにも使用する）に微量に混入していた大腸菌由来の抗原にもとづく非特異反応なのかは、いまのところ不明である。P24 あるいは p40 蛋白にたいする抗体がたがい交差反応をしめすという報告はなされているが、細かくは吟味されていない。いずれにしても、ECLIA 法は、免疫血清についてはボルナ病ウイルス p24 あるいは p40 抗体の力価を定量的に測定できる点で有用である。

二施設のウエスタンブロット法 (p24 および p40 : Lab 5, Lab 7) は、それぞれ p24 あるいは p40 蛋白バンドを特異的に認識した。これらの系では交差反応はみられていない。Lab 4 については、抗原吸収試験でチェックしているので、その所見の信頼性はたかい。

一施設のウエスタンブロット法 (Lab 6) は、両検体ともに p24 および p40 蛋白バンドを認識した。これが上述の交差反応を見ているのか、非特異的反応を見ているのかは判然としない。またこの施設の主要課題である p10 ウエスタンブロット法検索では、両検体ともに陽性であった。P10 は P24 と遺伝子を共有しているが、フレームシフトによって翻訳されるため、アミノ酸配列は異なる。p10 が p24 や p40 とはっきりとした交差反応をしめさないのなら、この所見は非特異的である可能性がたかい。

rsELISA (p40)法 (Lab 4) は抗原サンドイッチ・タイプの ELISA 法で、動物種を問わない、特異性のたかい p40 抗体測定法として開発された。rabbit 2 検体では、 $1 > 64000$ ときわめて高感度に抗体を検出している。Rabbit 1 では、 $1 : 1600$ という力価で陽性反応を認めた。これに関しては、上述の交差反応あるいは非特異反応の議論があてはまる。この手法は、ボルナ病ウイルス p40 抗体については、きわめてたかい感度を有していることがわかる。

以上、高力価のウサギ免疫血清検体にたいしては、一部の手技を除いて、大部分の手技は、感度あるいは特異性あるは双方が充分であることがわかる。

2) ウマ血清検体における評価

今回用いたウマ血清検体 (horse 021, horse 022) は、ギーセン大学ウイルス研究所 (Lab 1) におけるボルナ病ウイルス感染 IFA 診断業務で陽性となったドイツのウマ 2 検体 (1: 160, 1: 320) である。

IFA 法 (Lab 2) では、MDCK/BDV 細胞で特徴的な陽性蛍光をみとめ、抗体価はそれぞれ 1: 80 と 1: 160 であった。これは Lab 1 の IFA の結果に準じており、今回 Lab 2 に導入された IFA 原法検索が信頼性を有していることがわかる。

ECLIA 法 (Lab 3) では、horse 021 は陰性と判定された。horse 022 は p24 ビーズにたいするカウントは約 3 万であり、吸収試験の結果と合わせ考えて、力価のたかい p24 特異抗体と判定された。

ウエスタンブロット法 (p24 および p40 : Lab 4, Lab 6, Lab 7) は、p24 あるいは p40 あるいは両者を認識し、ばらついた結果となった。ウサギ検体検索で妥当と考えられる結果をだした Lab 5 では、horse 021 で p24 抗体陽性、horse 022 で p24 および p40 抗体陽性と判定している。Lab 7 では、両検体とも p40 抗体のみ陽性としている。Lab 6 では、2 検体ともに、p24 および p40 抗体が陽性であった。

一施設のウエスタンブロット法 (p10, Lab 6) は、両検体ともに p10 抗体が陽性であった。

rsELISA (p40)法 (Lab 4) では、horse 021 および horse 022 ともに、陰性であり、p40 抗体は検出されなかった。

以上、ウサギ免疫血清の検索とは様相がことなり、ウマ血清の検索では、手技の違いにより、あるいはおなじ手技でも参加研究施設の違いにより、結果がことになってきている。

今回は IFA 陽性を基準とし、ウマ“レファレンス”血清とした。しかしながら、産生抗体の力価が低く、また抗体産生動態が充分にはわかっていないボルナ病ウイルス感染のその血清疫学検索の立ち上げには、実験感染をおこなったラット、ウマ、サルなどの血清を対象として比較検討することが必要であろう。また、おなじ手技でも施設により試薬や手順がことなるため、同一試薬と同一手順による多施設・盲検検索をおこなうことが必要であろう。

しかしながら、今回の IFA 陽性ウマ血清の七施設による検索の結果を照らし合わせると、いくつかの解釈や疑問点が提示できる。

horse 022 は、ボルナ病ウイルス陽性抗体と考えられる。ECLIA 法からは p24 抗体が主であると推定されるが、ウエスタンブロット法からは p40 抗体も含む可能性がたかい。もし p40 抗体も存在しているとすれば、rsELISA 法で p40 抗体陰性であり、ECLIA 法で p40 抗体が検出されなかったことは問題となる。P10 ウエスタンブロットの陽性所見からは、この検体が p10 抗体を含む可能性も考えられるが、非特異的反応による結果である可能性も否定できない。

horse 021 は、Lab 2 の IFA でも中等度の抗体価で陽性であった。またウエスタンブロット法の検索からは、p24 抗体が陽性である可能性がたかい。ECLIA 法では、4000 というたかいカウントが得られたものの、抗原 (p24+p40) 結合ビーズでの吸収試験で抑制率が 40%ほどであったところから、陰性と判定された。

3) ヒト“レファレンス”検体における評価

ボルナ病ウイルスが日本人において感染しているかどうかはまず検討の対象となっているという状況であるので、歴然としたヒト・レファレンス検体を求めることはできない。ドイツで行なわれているヒト検体・多施設盲検検索をみると、ウマ・ボルナ病ウイルス感染の血清診断標準法とされる IFA 法で陽性の多数ヒト検体について、IFA 以外の手技を含めた多施設の盲検検索をおこない、ヒト感染の有無を検討するというはこびになっている。本年度研究計画立案時は、わが国においてはボルナ病ウイルス感染 IFA 検索手技が不備であったため、ECLIA 法およびウエスタンブロット法の両方で陽性のヒト検体を、暫定的にヒト“レファレンス”血清として、多施設・盲検検索に供した。付記するならば、両法によってボルナ病ウイルス p24 蛋白に免疫反応をしめすヒト血清は相当数存在したが、p40 蛋白に免疫反応をしめすヒト血清はきわめてわずかであった。また、p24 蛋白と p40 蛋白の双方を認識する検体は認められなかった。一部の検体では、およそ半年後の血清も検索することができ、これらは半年前の血清とおなじ陽性所見を呈した。本邦“レファレンス”血清は、配布時点では IFA 検索がなされていない。またギーセン大学 IFA 診断で陽性のヒト 1 検体 (ヒト 023) の供与をうけたので、これも今回の“レファレンス”血清にくわえた。

結果は Table 1 に見るごとくである。

ECLIA およびウエスタンブロット法で陽性とされた“レファレンス”検体は、IFA (Lab 2) では 1 検体 (ヒト 031) をのぞき、すべて陰性か偽陽性 (非感染 MDCK 細

胞においても陽性蛍光をみる)であった。ところで、このヒト 031 検体は、ヒト 001 検体と同一個体のものであり、ヒト 001 検体が IFA で偽陽性であると判定されていることから、ヒト 031 の陽性 IFA (1: 10) は真の陽性かどうか疑問がのこる。これらの“レファレンス”検体検索をみると、総じて、ECLIA・ウエスタンブロット法で陽性の検体は IFA で陽性ではない。これは、ギーセン大学 IFA で陽性のヒト 023 検体が ECLIA・ウエスタンブロット法 (Lab 3) で陰性であったことと呼応している。その他の研究施設のウエスタンブロット法あるいは rsELISA 法をみると、ウエスタンブロット法 (p24 および p40) の所見は一致を見るものが多い。ヒト 001 および 031 は総合的にみてボルナ病ウイルス p40 蛋白と反応する抗体を含むと考えられるが、p40 を感度よく検出する rsELISA 法では陽性とされていない。この点で問題がのこっている。

ECLIA・ウエスタンブロット法 (Lab 3) で p24 陽性のヒト 008 検体は、例外的に IFA 陽性であり、また Lab 4 のウエスタンブロットでは p24 および p40 の双方が陽性であった。

これらの所見の解釈については、以下の「献血者血漿 200 検体の多施設・盲検検索」結果と合わせて考える。

(4) 献血者血漿 200 検体の多施設・盲検検索

すくなくとも 1 研究施設で陽性と判定された検体は 25 あった (Table 2)。

このうち 2 施設あるいは 2 つの検索法で陽性をしめしたのは、8 検体である。これを大別すると、

- ① IFA 法とウエスタンブロット法の両方で陽性のもの：ヒト 119、130、169、290
- ② IFA 法でのみ陽性のもの：ヒト 92、232、247
- ③ ウエスタンブロット法のみ陽性のもの：ヒト 254

となる。

これを詳細に吟味すると、

① IFA 法とウエスタンブロット法の両方で陽性となったもののうち、

ヒト 119 検体は、ウエスタンブロットが p10 陽性のみである点からすると、陽性と判断するには疑問がのこる。

ヒト 130 検体は、両 IFA で陽性であり、また複数の施設で p24 ウエスタンブロット陽性であることから、ボルナ病ウイルス p24 抗原と反応する抗体を含むと考えられる。

ヒト 169 検体は、IFA では Lab 2 のみが陽性であるが、多施設のウエスタンブロット

で p24 陽性であり、また ECLIA で p24 陽性であるので、これもボルナ病ウイルス p24 抗原と反応する抗体を含むと考えられる。

ヒト 290 検体は、ボルナ病ウイルス p24 抗原と反応する抗体を含む可能性が考えられるが、さらに吟味が必要である。

ヒト“レファレンス”検体のばあいと同様に、IFA 法あるいはウエスタンブロット（および ECLIA）法のいずれかで陽性の検体がいくつか見られた。これに関しては、検索法により抗原変性の程度が異なるために違う結果をあたえている可能性も考えられるし、双方が偽陽性を見ている可能性も考えられる。

(追加検索)

実験感染ラット脳切片による免疫染色

“レファレンス”検体 3 検（#5, #6, #8）および検索検体 5 検（ヒト 92, 130, 169, 247, 290）については、1:200 の希釈で脳炎ラット切片を BSA 法により免疫染色した。#6 およびヒト 169 と 247 は、感染神経細胞の核および胞体を陽性に染色した。ヒト 130 は、弱陽性であった。他の検体では、明確な陽性所見はみられなかった。

C6/MDCK 細胞による IFA

フライブルク大学ウイルス学研究所の検索により、ヒト 130 検体は C6/MDCK 細胞による IFA で陽性と判定された。

以上の考察から、ヒト 130 検体とヒト 169 検体はボルナ病ウイルス p24 抗原と反応する抗体を含むと考えられる。これらボルナ病ウイルス p24 蛋白を認識する抗体が、ボルナ病ウイルス抗原により惹起されたのか（不顕性感染をふくむ）、それとも p24 蛋白と交差性をしめす他の病原体あるいは自己抗原により生じたのかは、今後の検討課題になる。ヒト“レファレンス”008 検体では、p24 および p40 蛋白双方を認識することが指摘されたが、これが今後の検索で確認されれば、ボルナ病ウイルス抗体を有している蓋然性はたかまる。

今年度の結果からは、ボルナ病ウイルス抗体検索を行ってきた各施設のそれぞれの手法による陽性判定はたがいにはらつきをしめし、1 施設 1 手技による判定だけでボルナ病ウイルス感染の有無を論じるのは困難であることが判明した。

ボルナ病ウイルスは実験動物感染においても抗体力価がきわめて低く、また抗体が検

出されないばあいもある。免疫動物血清あるいは感染動物血清において抗体検索手技の特異性および感度が保証されたからといって、それがそのままヒトに適用されるかどうかは疑問であるということが本年度の多施設・盲検検索から判明した。ここで得られたボルナ病ウイルス蛋白に反応をしめすヒト検体については、それがボルナ病ウイルス抗原に対する抗体であることを検討する必要がある。また今後のボルナ病ウイルス感染の血清疫学を展開するにあたっては、霊長類をふくめた各種の動物における感染実験をおこない、その抗体産生の程度と質を継時的に検索してゆくという基盤的な研究が不可欠なものとなる。

【結論】

献血者血漿 200 検体について、ボルナ病ウイルス抗体の有無を 7 施設・盲検で検索した。各施設のそれぞれの手法による陽性判定はたがいにばらつきをしめした。現段階では、同一検体を複数の施設で複数の手技で検索し、結果を総合的に評価しなければならないと思われる。総合的にみると、ボルナ病ウイルス p24 蛋白と反応する抗体を有する検体が 2 検体見いだされた。これは日本人においてボルナ病ウイルスの不顕性感染が存在する可能性を示唆するものである。今後は、それら陽性抗体がボルナ病ウイルス特異的であるかどうかを確認する一方、ボルナ病ウイルス感染実験動物における抗体産生の推移を詳細に検索するという基盤的研究が不可欠である。そのような手順をへてはじめて、日本におけるボルナ病ウイルス感染の実態が解明され、またこのウイルス感染と精神神経疾患の関連の有無についての正当な評価をくだすことが可能になる。

追記：

共同研究に参加した各施設の協力者を以下に記し、深謝します。

東京都精神医学総合研究所超微形態研究部門（羽賀誠一、相沢貴子、本井ゆみ子）

国立感染症研究所ウイルス第一部（高崎智彦）

大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野（朝長啓造、小林剛、渡辺真紀子、林宏恵）

鹿児島大学医学部ウイルス学講座（李 洪川、屋敷伸治、藤吉利信）

共立商事株式会社・中央研究所（大内敦夫、望月雅美）

平成10年度に札幌地区献血者血液100検体をご提供くださった北海道日赤血液センター関口定美所長（物故）、池淵研二副所長、加藤俊明検査部長、関本達也検査一係長に深謝いたします。