

197900485A・B

厚生科学研究費補助金

(平成9年度～平成11年度)

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クター

目 次

I. 総合研究報告書（平成9年度～平成11年度）

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. 平成9年度 研究報告書

総括研究報告書

2. 霊長類を介する人獣共通感染症の制御に関する研究.....5
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

分担研究報告書

3. フライウイルスの血清診断法の開発に関する研究7
国立感染症研究所 ウイルス第1部 森川 茂

4. Bウイルス特異抗体検出とPCR法によるBウイルス遺伝子検出法.....9
社団法人 予防衛生協会 藤本 浩二

5. アジア産マカ属からBウイルスの特異的検出法に関する基礎的研究.....16
国立感染症研究所 筑波医学実験用霊長類センター 向井 鏖三郎

6. Bウイルスの遺伝子診断と分子免疫学に関する研究21
東京大学大学院 農学生命科学科 吉川 泰弘

7. 人獣共通原虫感染症に関する研究.....22
国立感染症研究所 獣医科学部 神山 恒夫

8. 空港における刃等の輸入手続き等に関する調査研究.....24
成田空港検疫所 鶴田 憲一

III. 平成10年度 研究報告書

総括研究報告書

9. 霊長類を介する人獣共通感染症の制御に関する研究.....50
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

分担研究報告書

10. フライウイルスの血清診断法の開発に関する研究53
国立感染症研究所 ウイルス第1部 森川 茂

11. SA8 (Simian Agent 8 : アフリカトリサル由来 α 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.....	61
	社団法人 予防衛生協会 藤本 浩二
12. 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	68
	国立感染症研究所 筑波医学実験用霊長類センター 向井 鎌三郎
13. Bウイルスの遺伝子診断と分子免疫学に関する基礎的研究 II	74
	東京大学大学院 農学生命科学科 吉川 泰弘
14. 人獣共通原虫感染症に関する研究.....	77
	国立感染症研究所 獣医科学部 神山 恒夫
 IV. 平成 11 年度 研究報告書	
総括研究報告書	
15. 霊長類を介する人獣共通感染症の制御に関する研究.....	79
	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
分担研究報告書	
16. フィロウイルスの血清診断法の開発に関する研究	82
	国立感染症研究所 ウイルス第 1 部 森川 茂
17. Bウイルス糖のタンパク質の発現と血清診断用抗原としての可能性.....	86
	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
18. SA8 (Simian Agent 8 : アフリカトリサル由来 α ヘルペスウイルス) 抗原を利用した Bウイルス抗体代替検査法の開発に関する研究.....	91
	社団法人 予防衛生協会 藤本 浩二
19. 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 III	97
	国立感染症研究所 筑波医学実験用霊長類センター 向井 鎌三郎
20. Bウイルスの遺伝子診断と分子免疫学に関する研究 III.....	103
	東京大学大学院 農学生命科学科 吉川 泰弘
21. 人獣共通原虫感染症に関する研究.....	122
	国立感染症研究所 獣医科学部 神山 恒夫

IV. 平成11年度 研究報告書

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 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター センター長

研究要旨

今年度はエボラ、マールブルグウイルスの NP 遺伝子を *in vitro* で発現させ、この抗原に対して作成したモノクローナル抗体を用い、抗原捕獲 ELISA システムの開発に成功した。B ウイルス感染の検出に関しては B ウイルスに近縁な SA8 ウイルスを抗原とした ELISA について検討したところ、カニクイザルのコロニーにおける本ウイルスの浸淫状況を把握するには感度・特異性ともに十分であることが確認できた。また、B ウイルス蛋白の発現に成功し、細胞貫通部分を除去した gD 蛋白を抗原とした場合に、これまでの不活化ウイルス抗原を用いた方法と極めて相関する検査法が可能であることを示す成績が得られた。一方、B ウイルスゲノムを PCR で検出するための基礎的検討を終了し、B ウイルスゲノムに特異的なプライマーを同定した。また、実際に PCR を臨床例に応用を試みた。

分担研究者

神山恒夫 国立感染症研究所獣医科学部室長
藤本浩二 (社) 予防衛生協会部長
向井鏖三郎 国立感染症研究所筑波医学実験用
霊長類センター室長
森川 茂 国立感染症研究所ウイルス 1 部室長
吉川泰弘 東京大学農学部教授

協力研究者

本藤 良 日本獣医畜産大学教授
棚林 清 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

A. 研究目的

実験用霊長類はヒトに近縁であるが故に様々な医学生理学実験に供されている。しかし、ヒトに近縁であることは一方で、ヒトに感染する病原体を保有している危険性を潜在的に有していることを意味している。中でもエボラ、マールブルグ病に代表されるフィロウイルスやアルファヘルペスウイルスである B ウイルスはヒトに極めて重篤な疾患を引き起こすことから、厳重な対策を講じる必要がある。しかしながら、これらのウイルスの取り扱いはその危険性から、特に大量に扱う場合には P4 施設でのみ行うことが国際的コンセンサスである。従って、日本国内で、抗原を調整し、診断体制を整えることは現状では不可能である。そこで本研究では、これらのウイルスによるサル類の感染の実態を把握するために、血清学的検出法並びにゲノムあるいは抗原検出法を、感染性ウイルスを扱うことなしに実現することを目的とした。

B. 研究方法

方法の詳細は各報告書に記した。

C. 研究結果

(1) フィロウイルスに関してはエボラ、マールブルグウイルスの NP 遺伝子を発現させ、これらの抗原に対するモノクローナル抗体を作出し、抗原

捕獲 ELISA システムを構築した。抗原検出感度は約 20ng であり、フィリピン熱帯医学研究所との共同で、エボラレストンの検出にも応用可能であることを明らかにした。感染初期の確定診断のために、IgM 捕捉 ELISA の開発を試み、実用に耐えうる系を確立できた(森川)。

(2) B ウイルスでは、ウイルスゲノムの特異的検出のため、現在知られている HSV 並びに他のアルファヘルペスウイルスの塩基配列を解析し、できるだけ B ウイルス特異的なプライマーの設定を試みた。その結果、3 種類のプライマーセットが、B ウイルス特異的にゲノム DNA を増幅することが明らかとなった(本藤、吉川)。また、霊長類センターで飼育されているカニクイザル三叉神経節からゲノム検出を試みたところ、1 頭からゲノム断片が検出できた。塩基配列を決定したところ、これまでに報告されている、カニクイザル由来の B ウイルスと非常に近縁であることが明らかとなった(向井)。また、臨床的に B ウイルス感染が疑われた例の、水泡内容物についても PCR でのゲノム検出を試みたところ、ゲノム断片が検出されたが、塩基配列を決定したところ、HSV-1 と非常に近い配列であったことから、この例は HSV-1 感染であろうと考えられた(向井)。一方、血清学的方法に関してはアフリカミドリザル由来のアルファヘルペスウイルス SA-8 感染細胞から調整した抗原を用い、ELISA システムを構築したところ、少なくともカニクイザルにおける B ウイルス感染の摘発には実用的であることが示された(藤本)。更に B ウイルス gD ならびに gB 蛋白を cDNA から発現させることに成功し、これを抗原として放射免疫沈降反応を行うと、特異的に B ウイルスに対する抗体を検出できた。しかし、発現細胞をアセトン処理した後の蛍光抗体法や、ウェスタンブロットリングでは非特異反応を認めたため、細胞膜貫通部分を除去して、蛋白が培養上清中に分泌されるように遺伝子を改変したところ、分泌蛋白を用いた、非特異反応の少ないドットプロット並びに ELISA システムの構築ができた(棚林、山田)。

(3) 原虫感染症に関してはバベシア原虫感染の血

清学的検出法を確立し、ヒト血清について調べたところ、日本人にも低率ではあるが、本原虫感染が認められることが明らかになった(神山)。

D. 考察

フィロウイルスに関してはヒト、サルの感染において血清学的手法並びに抗原検出法ともに実用に耐える方法の確立ができた。今後臨床あるいは検疫現場での応用が期待される。一方、B ウイルスについてもかなり満足のできる抗体検出法を開発できたと考えられる。サルコロニーなどにおける本ウイルスの浸淫状況の把握には、本研究で開発した方法が適用できるものと期待される。しかし、これらの方法をヒトにおける感染の診断に用い得るかについては、更に検討する余地があると考えられる。即ち単純ヘルペスウイルスとの交差反応性の克服が必要である。現在、gD 遺伝子に変異を導入することにより、B ウイルス特異的エピトープの同定が進行中であると同時に、B ウイルス特異的プライマーを用いた、PCR の確立に向けた研究が始まったところである。

E. 結論

実験用霊長類におけるフィロウイルス並びに B ウイルス感染の摘発を効率よく行うために、新たな抗体検出法及び抗原あるいはウイルスゲノムの検出法の開発を行い、充分実用に耐え得る方法の確立に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

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., Yoshihara, 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, 1998.

Fukao T, Hirano A, Nakamura K, Yamazaki Y, Yamada A, Tashita H, Inoue R, Kondo N. : Perinatal mumps associated with bronchiolitis and respiratory distress. *Eur J Pediatr*. 1998 Nov;157(11):952-3.

Ohsawa K, Yamada A, Takeuchi K, Watanabe Y, Miyata H, Sato H. :Genetic characterization of parainfluenza virus 3 derived from guinea pigs. *J Vet Med Sci*. 1998 Aug;60(8):919-22.

Saito M, Shibata Y, Kubo M, Sakakibara I, Yamada A, Itagaki H. :First isolation of *Sarcocystis hominis* from cattle in Japan. *J Vet Med Sci*. 1999 Mar;61(3):307-9.

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.*, 387-393

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*, 256, 280-290

Utama A, Shimizu H, Morikawa S, Hasebe F, Morita K, Igarashi A, Hatsu M, Takamizawa K, Miyamura T (2000): Identification and characterization of the RNA helicase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein. *FEBS Lett* . 7:465(1):74-78

Saijo, M., Niikura, M., Morikawa, S., Ogata, M., Ksiazek, T.G., Mayer, R., Peters, C.J., and Kurane, I. (2000) : Development of enzyme linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. submitted for publication.

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.: Prevalence of herpes B virus antibody in nonhuman primates reared at national university of Japan., *Exp. Anim.*, 47, 199-202, 1998

Miyahira, Y., Kobayashi, S., Takeuchi, T., and Kamiyama, T. Induction of CD8+ T cell-mediated protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *International Immunology* 11:133-141, 1999.

Tsutsui, N., and Kamiyama, T. Transforming growth factor b-induced failure of resistance to infection with blood-stage *Plasmodium chabaudi* in mice. *Infection and Immunity*, 67: 2306-2311, 1999.

Jung, C.-G., Kamiyama, T., and Agui, T. Elevated apoptosis of peripheral T lymphocytes in diabetic BB rats. *Immunology* 98:590-594, 1999.

- Yamamoto, K., Ito, K., Koura, M., and Kamiyama, T. An increased susceptibility of UB-B irradiated mice to infection with Plasmodium chabaudi. Infection and Immunity, in press.
- 棚林 清、向井鎌三郎、山田章雄：Bウイルス病とは何か。検査と技術、27、1551-1552 (1999)、医学書院
- 森川 茂、倉根 一郎 (1999)：ウイルス性出血熱、職場の感染症を防ぐ；食中毒・結核から海外赴任者の健康管理まで (中央労働災害防止協会) 103-104
- 吉川泰弘、輸入動物によるエマージングウイルスへの対策—感染症予防法とエマージングウイルス SUT BULLETEN 2, 7-15, 2000
- 吉川泰弘、河村晴次、斉藤晋、吉崎理華、羽田裕子、エキゾチックアニマルに関するアンケート調査結果報告、JSAVA, 39, 51-55, 1999
- 吉川泰弘、Bウイルス病、サル類のエボラ出血熱、マールブルグ病、in 感染症の診断、治療ガイドライン、JAMA 122, pp164-165, pp274-277, 1999
- 吉川泰弘、Bウイルス感染症： pp265-270、In エマージングディゼイズ 竹田美文、五十嵐章、小島荘明編 近代出版 1999
- 吉川泰弘、学校飼育動物と人獣共通感染症：MVM., 10、59-63、1999
- 吉川泰弘、サル由来のウイルス感染症：化学療法の領域 15、27-33、1999
- 吉川泰弘、川越真喜男、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、オベリスク 2、2-18、1999
- 吉川泰弘、ペット動物をめぐる主な感染症とつきあい方、地域保健 3、4-26、1999
- 吉川泰弘、Bウイルス病、感染症とその治療 54、170～180、1999
- 吉川泰弘、動物由来感染症と検疫、臨床と微生物 26、279-286、1999
- 吉川泰弘、エボラ出血熱、pp108-109、In 獣医感染症カラーアトラス、見上たけし、丸山務編、文永堂出版 1999
- 吉川泰弘、サル類の輸入、検疫に関する最近の動向、INA Res. News 55、2-3、1998
- 吉川泰弘、人獣共通感染症—その現状と行政対応—、宮城県獣医師会報 51、197-217、1998
- 吉川泰弘、狂犬病対策、感染症と化学療法 4、34-38、1998
- 吉川泰弘、医薬品開発における実験用霊長類の有用性について、オベリスク 3、2-3、1998
2. 学会発表
- Detection of Ebola virus (EBO) and Marburg virus (MBG) antibodies using respective nucleoproteins (NPs): M Saijo, M Niikura, M Ogata, S Morikawa, I Kurane, R Meyer, TG Ksiazek, CJ Peters US-Japan Cooperative Medical Science Program, 32nd Joint Working Conference on Viral Diseases (Washington), 1999 (Jun 29-July1)
- Establishment of Lassa virus antibody detection system using its recombinant nucleoprotein: S. Morikawa, M. Niikura, M. Saijo, M. Ogata, and I. Kurane US-Japan Cooperative Medical Science Program, 32nd Joint Working Conference on Viral Diseases (Washington), 1999 (Jun 29-July1)
- E型肝炎ウイルス様粒子への外来エピトープの挿入と経口ワクチンビークルとしての可能性：新倉昌浩、金義宣、西條政幸、森川茂、保富康宏 第47回日本ウイルス学会1999. 11
- エボラウイルス (EBO) とマールブルウイルス (MBG) の組換え核蛋白を用いた抗体測定システム：西條政幸、新倉昌浩、緒方もも子、森川茂、倉根一郎 第47回日本ウイルス学会1999. 11
- ラッサウイルスの組換えN蛋白を用いた血清診断法の開発：森川茂、西條政幸、新倉昌浩、緒方もも子、倉根一郎 第47回日本ウイルス学会 1999. 11

フィロウィ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）

研究要旨： Ebola Zaire 株の NP 蛋白に対するモノクローナル抗体を作成した。36 クロンのうち抗原捕捉 ELISA に使用できるもの 2 クロンの用いて検討した結果、1 クロンの Reston 株の NP を捕捉出来ることが明らかとなった。また、IgM 捕捉 ELISA を開発し、組換え Ebola Zaire NP を免疫したサルに抗体応答を調べた結果、感染後 2~4 週で特異的 IgM が検出された。前年度までの IgG - ELISA、蛍光抗体法と併せて、Ebola 出血熱の血清診断が確立された。

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エボラ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。エボラウイルスはレベル 4 に属し、日本での培養が認められないため、組み換え蛋白を用いた抗体検出法を開発する。今年度は、抗原捕捉 ELISA、IgM 捕捉 ELISA 法を確立する。

B. 研究方法

1) Ebola-Zaire virus (EBO) の NP に対するモノクローナル抗体の作成とエピトープマップ：

6His-tag を N-末端に付加した EBO-NP (His-EBO-NP) を発現する組み換えバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ、組み換え蛋白を Ni-カラムにより精製しマウスを免疫した。モノクローナル抗体の作製は常法により行った。モノクローナル抗体の認識するエピトープを同定するため、種々の Ebola Zaire NP の部分遺伝子を pGEX - 2T にサブクローニングし、GST との融合蛋白として発現し、モノクローナル抗体との反応性を検討した。

2) 抗原捕捉 ELISA 法の確立：

モノクローナル抗体をコートした ELISA プレートに、被験検体を加えて反応後、抗 EBO-NP ウサギ血清 / 抗ウサギ IgG-HRPD を順次反応させ、ABTS 基質を加えて OD(405) を測定することにより行った。コントロール抗原には、精製 His-EBO-NP を用いた。

3) EBO-NP に対する IgM 抗体検出系の開発：

1) と同様に精製した His-EBO-NP をカニクイサルに免疫し、経時的に採血した。IgM 捕捉 ELISA は、抗ヒト IgM 抗体を 100ng/well を ELISA プレートにコートし、被験血清希釈液を反応、洗浄後、100ng/well の精製 His-EBO-NP を反応させ、抗 EBO-NP ウサギ血清 / 抗ウサギ IgG-HRPD を順次反応させ、ABTS 基質を加えて OD(405) を測定することにより行った。

C. 研究結果

1) Ebola-Zaire virus (EBO) の NP に対するモノクローナル抗体の作成と抗原捕捉 ELISA 法の確立：

得られた 36 クロンのモノクローナル抗体のサブタイピングを行い、IgG 型のもの 12 ク

ローンに関して検討した結果、2 クローンが組み換え EBO - NP が、抗原捕捉 ELISA に用いることが出来ることが判明した。抗原検出感度は、いずれも約 20ng であった。

モノクローナル抗体の認識する領域を部分 NP との反応性で解析した結果、EBO-NP5 あるいは EBO-NP8 を認識するものが多かった。これは、前年度の解析で明らかになったように EBO 患者血清が認識する領域と一致した。抗原捕捉 ELISA に使用可能な 2 クローンはいずれも最も C-末側の EBO - NP8 を認識した。

抗原捕捉 ELISA の有効性を検討するため、フィリピン熱帯医学研究所の Dr. E. Miranda の協力を得て、Reston 感染カニクイサル材料を用いて検討した結果、2 クローンのモノクローナル抗体のうち 1 クローンが Reston に対しても反応することが明らかとなった。また、肝臓、脾臓の 10%乳剤を 100 倍以上希釈しても検出が可能であった。

2) EBO-NP に対する IgM 抗体検出系の開発と精製 EBO-NP 免疫サルにおける抗体応答：

精製した His-EBO-NP をカニクイサルに免疫し、経時的に採血し、IgG - ELISA と今年度開発した IgM 捕捉 ELISA によりそれぞれ IgG、IgM 抗体の応答を解析した結果、IgG 抗体は、免疫後 2 週から検出され 4 週でプラトーに達した。一方、IgM 抗体は、2 週をピークに減少し 5 週で検出限界以下になった。この実験系では、IgM 捕捉 ELISA では 50 倍希釈した血清を用いるのが至適であった。

D. 考察

昨年度までの研究で、EF-BOS プロモーターで Ebola および Marburg virus の NP を発現

する stable HeLa 細胞株を用いた蛍光抗体法と、精製組み換え NP を用いた IgG - ELISA 法を開発し、感度および精度ともに優れた系であることを明らかにした。今年度は、より早期に反応の見られる IgM 抗体検出系を開発し、免疫サルでの抗体応答から使用に耐えるものと考えられた。また、しばしばウイルス性出血熱で問題となる抗体応答の見られない症例に対して必要になる抗原捕捉 ELISA を開発するために Ebola virus NP に対するモノクローナル抗体を作製した。認識するエピトープは、EBO 患者血清で認識される領域と同様の部位を認識するものが多かった。モノクローナル抗体を用いて開発した抗原捕捉 ELISA のうち、1 つの系では Reston 感染サルからの抗原捕捉が非常に高感度にできた。Reston 型の NP 遺伝子の配列を RT - PCR direct sequence により決定し、Ebola virus の Zaire 型、Sudan 型のアミノ酸配列と比較したところ、全体ではそれぞれが約 67 - 68%の相同性を示したが、抗原性の強い C 末端側半分では、それぞれが約 43 - 44%の相同性しか示さなかった。しかし、抗原捕捉 ELISA に使用したモノクローナル抗体は、Zaire 型、Reston 型に交差反応することから相同性は低いながらも共通のエピトープが存在することが明らかである。このことは昨年度の患者血清、感染サル血清を用いた解析からも支持される。今年度の研究で、Ebola virus に関しては、抗体検査法、抗原検査法、RT - PCR 法が完成したと考えられる。Marburg virus に関しては、現在モノクローナル抗体を作成中で、近い将来に抗原捕捉 ELISA が確立出来ると考えられる。現在のところ国立感染症研究所村山分室にある、BL4 実験室の使用許可が下りない状態ではあるが、Ebola に関してはウイルス分離以外の検査は、組み換え蛋白を用いることによ

りほぼ可能であると考えられるが、将来的にはBL4実験室を使用したウイルス分離同定が必要である。

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エボラウイルス抗体、抗原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蛋白を用いることにより診断法を確立した。

F. 研究発表

1.論文発表

- 1) 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.*, 387-393
- 2) 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*, 256, 280-290
- 3) 森川 茂、倉根 一郎 (1999) : ウイルス性出血熱、職場の感染症を防ぐ ; 食中毒・結核から海外赴任者の健康管理まで (中央労働災害防止協会) 103-104
- 4) Utama A, Shimizu H, Morikawa S,

Hasebe F, Morita K, Igarashi A, Hatsu M, Takamizawa K, Miyamura T (2000): Identification and characterization of the RNA helicase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein. *FEBS Lett* . 7;465(1):74-78

5) Saijo, M., Niikura, M., Morikawa, S., Ogata, M., Ksiazek, T.G., Mayer, R., Peters, C.J., and Kurane, I. (2000) : Development of enzyme linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. submitted for publication.

2.学会発表

- 1) Detection of Ebola virus (EBO) and Marburg virus (MBG) antibodies using respective nucleoproteins (NPs): M Saijo, M Niikura, M Ogata, S Morikawa, I Kurane, R Meyer, TG Ksiazek, CJ Peters US-Japan Cooperative Medical Science Program, 32nd Joint Working Conference on Viral Diseases (Washington) , 1999 (Jun 29-July1)
- 2) Establishment of Lassa virus antibody detection system using its recombinant nucleoprotein: S. Morikawa, M. Niikura, M. Saijo, M. Ogata, and I. Kurane US-Japan Cooperative Medical Science Program, 32nd Joint Working Conference on Viral Diseases (Washington) , 1999 (Jun 29-July1)
- 3) E型肝炎ウイルス様粒子への外来エピトープの挿入と経口ワクチンビークルとしての可能性 : 新倉昌浩、金義宣、西條政幸、森川茂、保富康宏 第47回日本ウイルス学会

1999.11

4) エボラウイルス(EBO)とマールブルウイルス(MBG)の組換え核蛋白を用いた抗体測定システム：西條政幸、新倉昌浩、緒方もも子、森川茂、倉根一郎 第 47 回日本ウイルス学会 1999.11

5) ラッサウイルスの組換え N 蛋白を用いた血清診断法の開発：森川茂、西條政幸、新倉昌浩、緒方もも子、倉根一郎 第 47 回日本ウイルス学会 1999.11

Bウイルス糖タンパクの発現と血清診断用抗原としての可能性

主任研究者 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
協力研究者 棚林 清 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター
協力研究者 向井鏖三郎 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター

研究要旨

Bウイルス構造タンパクの一つである glycoprotein D (gD)をコードする遺伝子を真核細胞発現ベクターである pcDNA3.1(-)にサブクローニングした組換えプラスミド pBgD と gD の膜貫通領域(TM)上流に停止コドン挿入した組換えプラスミド pBgDdTM を構築した。これらの DNA を COS7 細胞にトランスフェクトしたところ本タンパクを発現することができた。さらに、pBgDdTM をトランスフェクトした細胞の培養上清には TM 欠損 gD タンパクが発現されていた。この発現タンパクを抗体検出のための抗原として利用できるかを検討したところ放射免疫沈降法並びに gD の膜貫通領域を欠損させ培養液中に放出したタンパクを用いたドットブロット法で従来の B ウイルス感染細胞可溶化抗原を用いた ELISA 法と同等にサル血清抗体を検出できることが明らかとなった。

A.研究目的

B ウイルス(Cercopithecine herpesvirus 1)はマカク属サルに自然感染している α ヘルペスウイルスであるが、ヒトに感染した場合には重篤な脳炎を起こし致死させることがある。このため医学実験等の目的に飼育されているサル類において、血清抗体を測定することで本ウイルスの感染の有無を把握しておくことは、作業従事者の本ウイルスへの感染防御対策上重要となる。現在、血清抗体の測定には、B ウイルス感染培養細胞を可溶化したものを抗原とした ELISA 法により行われているが、抗原調製のために感染性ウイルスを取り扱う必要があることや、これを米国より輸入しなければならないなどの問題がある。そこで本研究にお

いては、本ウイルス構造タンパクを組換え DNA 技術を応用して発現させ、これを抗体検出のための抗原に利用する方法の開発を試みた。

B.研究方法

1) Bウイルス gD 発現プラスミドの作製
B ウイルス gD 糖タンパクをコードする遺伝子を含む組換えプラスミド pBlueSK+2.6 は英国 Bennett 博士より分与された。このプラスミドから制限酵素を用いて gD 領域を哺乳類細胞での発現ベクター pcDNA3.1(-)にサブクローニングし、pBgD を作製した。また、gD を培養上清に放出させるため、PCR を応用して停止コドン膜貫通領域(TM)の上流に挿入し

て pBgDdTM プラスミドを作製した。

2) gD タンパクの発現

組換えプラスミド DNA をリポフェクトアミン試薬を用いて、アフリカミドリザル腎細胞由来 COS7 にトランスフェクトした。目的タンパク発現の確認は、抗 gD 抗体または抗 B ウイルス抗体を用いた間接蛍光抗体法と放射免疫沈降法により行った。

3) 発現 gD を用いたサル血清抗体の検出

培養細胞に発現させた gD または gDdTM について、B ウイルス感染細胞抗原を用いた ELISA 法で B ウイルス抗体陽性とされたサル血清 8 検体との反応性を放射免疫沈降法、ウエスタンブロット法、及びドットブロット法により検討した。

C. 研究結果

1) gD および膜貫通領域欠損 gD タンパクの発現

pBgD を COS7 細胞にトランスフェクトしアセトン固定後、抗 gD(SA8)抗体を用いて間接蛍光抗体法による染色を行ったところ、明らかな蛍光シグナルが観察された。ベクター DNA をトランスフェクトした細胞には全く蛍光は認められなかった。また、トランスフェクトした細胞を³⁵S]メチオニン/システインで放射標識し、可溶化後、抗 gD 抗体および抗 B ウイルス抗体を用いて免疫沈降しポリアクリルアミド電気泳動による解析を行ったところ約 57K ダルトンの特異バンドが検出された。以上から pBgD プラスミドをトランスフェクトすることにより B ウイルス gD の発現が確認された。次に、TM 領域上流に停止コドン挿入したプラスミド pBgDdTM を COS7 細胞にトランスフェクトし、その培養上清へ

の TM 欠損タンパクの発現を試みた。培養上清をポリアクリルアミドゲル電気泳動後タンパク染色したところ特異バンドが検出された。また、放射免疫沈降法により抗 gD 抗体と反応するバンドが検出され、培養上清に TM 欠損 gD タンパクが発現していることが確認できた。

2) 組換え発現 gD および TM 欠損 gD タンパクを用いたサル血清抗体の検出

放射標識した pBgD トランスフェクト細胞の可溶化したものを抗原として、放射免疫沈降法により 8 検体の ELISA 陽性とされたサル血清について調べたところ、全ての血清が発現 gD を沈降した。ELISA 陰性血清では目的のバンドは検出されず、組換え発現 gD を用いた放射免疫沈降法が従来の ELISA 法と同等に、B ウイルス抗体を検出できることがわかった。次に、pBgD トランスフェクト細胞を可溶化した抗原を用いて、ウエスタンブロット法による B ウイルス抗体の検出を試みた。しかし、反応性が著しく低下した検体や目的タンパク以外の非特異反応が認められ有効な検出方法ではなかった。

細胞由来成分が少ない細胞培養上清に発現された TM 欠損 gD のサル血清抗体との反応性を調べた。ウエスタンブロット法では正常細胞培養上清と反応するものは無くなったが、反応性の低下する検体が存在した。そこで、TM 欠損 gD を直接 PVDF メンブランに吸着させた後に、検体サル血清を反応させるドットブロット法による血清抗体の検出を試みた。ELISA 陽性検体はいずれも陽性として検出されるとともに、陰性血清では特異シグナルは検出されなかった。このことは、TM 欠損 gD がドットブロッ

ト法を用いることで B ウイルス抗体検査に有効な抗原になりうる事が明らかになった。

D. 考察

B ウイルス糖タンパクの内、感染に必須とされている gD 遺伝子を発現ベクター pcDNA3.1(-) にサブクローニングした、組換えプラスミド pBgD を構築し COS7 細胞に導入して gD タンパクを発現させることができた。これを抗原としてサル血清抗体の検出を行ったところ放射免疫沈降法では調べた 8 検体を従来の ELISA 法と同等に検出することができ、組換え gD タンパクが血清抗体検出のための抗原として有効であることが明らかとなった。本法は特殊施設が必要となるため、通常実験室で可能な検出法として発現 gD を用いたウエスタンブロットを試みた。しかしながら、目的タンパク以外の細胞成分と反応するものが存在することや、目的バンドの検出感度が低下してしまう検体が存在した。これは細胞の可溶化、ポリアクリルアミド電気泳動、およびメンブランへのブロッティング操作中に抗原性が一部損傷を受けたものと推定される。

gD タンパクは C 末端側に一ヶ所の疎水性部分がありこれが細胞膜を貫通して、本タンパクは細胞膜に固定発現されている。そこで、膜貫通領域(TM)を欠損させ目的タンパクを培養液に放出させて発現させることを試みた。組換えプラスミド pBgDdTM を COS7 細胞にトランスフェクトしたところ、培養上清中に gDdTM タンパクが発現されていた。これを用いて、サル血清抗体検出を試みたところ、ウエスタンブロット法で

は反応性が低下した検体が認められたが、ドットブロット法では従来の ELISA 法と同等に検出できた。この培養液を用いたドットブロット法ではウエスタンブロット法に比較して反応操作中での抗原性の損傷が少なくかつ操作も簡便になるなど、今後の血清抗体測定に有効と思われた。

本研究では陽性 8 検体と陰性 5 検体についてのみ調べたが、さらに多数の検体について調べ抗体検出感度や非特異反応の差異などについて従来の ELISA 法と比較して有効性を確かめていく必要がある。

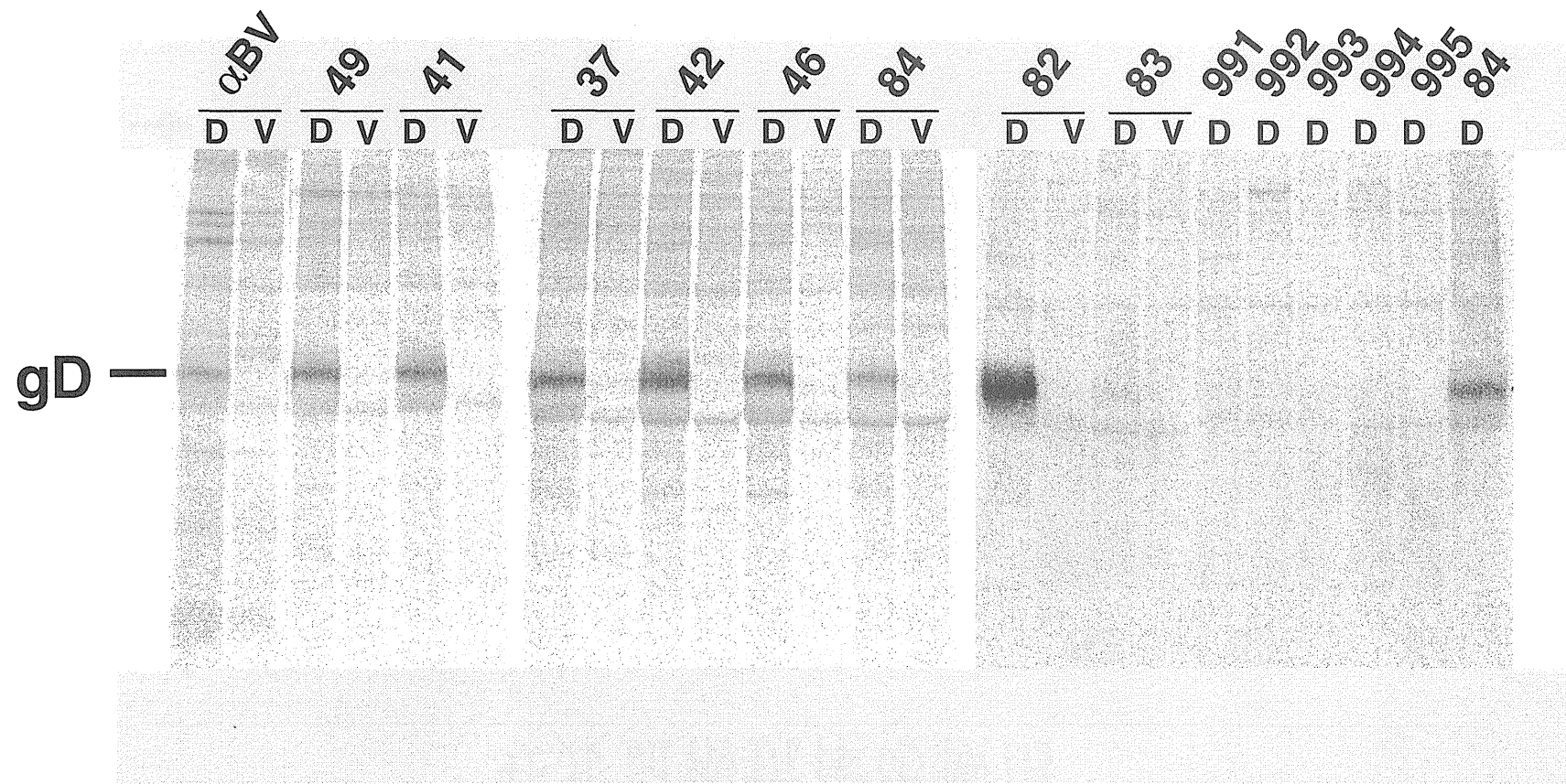
E. 結論

B ウイルス gD タンパク並びに膜貫通領域を欠損させた gD を組換え DNA 技術を応用して真核細胞で発現させることができた。これらの組換えタンパクを抗原とした放射免疫沈降法またはドットブロット法により従来のウイルス感染細胞可溶化抗原を用いた ELISA 法と同等にサル血清抗体を検出することができ、これらの組換えタンパクが抗体検出用抗原として利用できる可能性が明らかとなった。

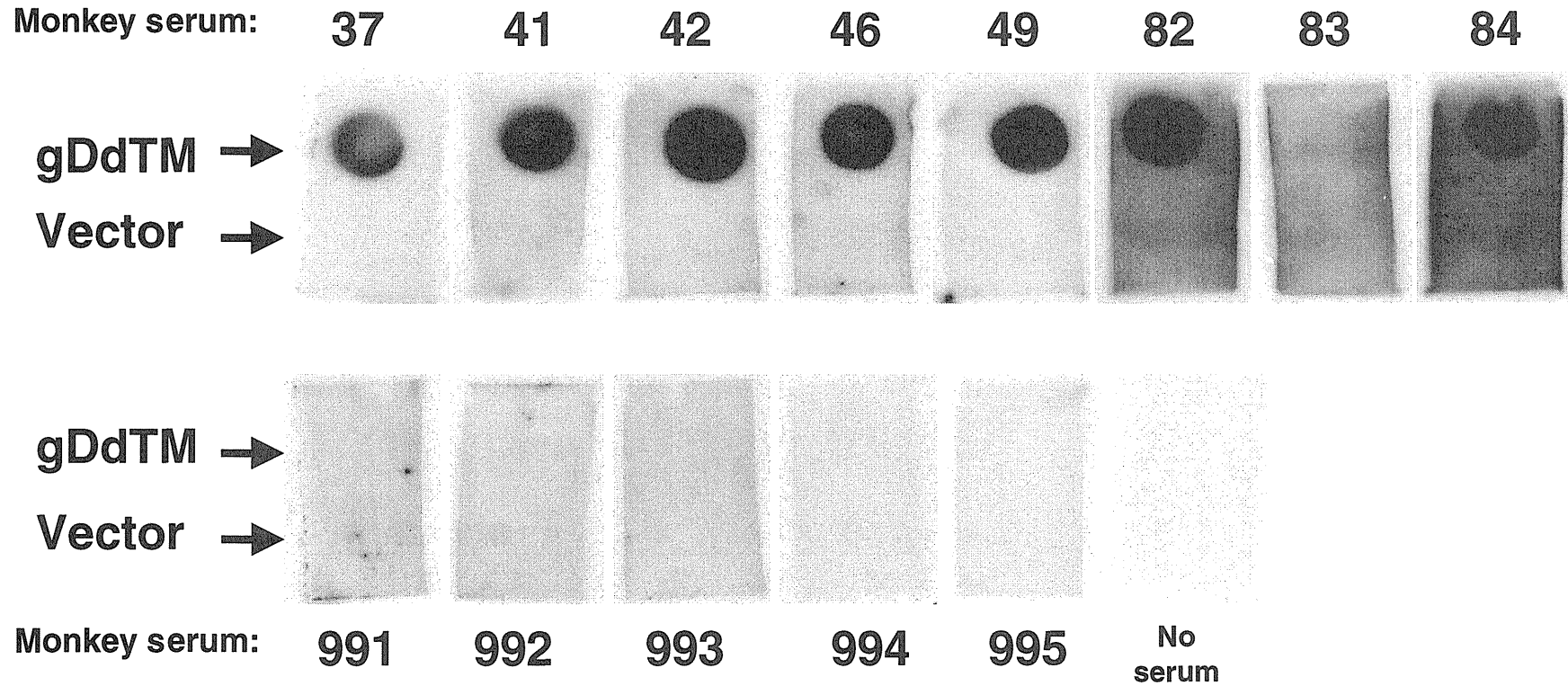
F. 研究発表

棚林 清、向井 隼三郎、山田 章雄：B ウイルス病とは何か。検査と技術、27,1551-1552 (1999)、医学書院

放射免疫沈降法によるサル血清抗体の検出



TM欠損gDを抗原としたドットブロット法による
サル血清抗体の検出



10μl of culture sup./spot
 Serum(1:200)
 Anti-Monkey IgG-HRP (1:200,000)
 ECL-Plus (3min exposed)

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
霊長類を介する人獣共通感染症の制御に関する研究報告書

SA-8 (Simian Agent 8 : アフリカミドリザル由来 α ヘルペスウイルス)
抗原を利用した B ウイルス抗体代替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 α ヘルペスウイルス) を利用した、B ウイルス抗体代替検査法について、その利用評価をカニクイザル、アカゲザル、ニホンザルについて行った。同時に、ミドリザル血清中の SA-8 抗体の B ウイルス抗原に対する反応度も調べた。

A. 研究目的

B ウイルス (*Herpesvirus simiae*) の大量培養及び濃縮等の作業は BSL4 (Biosafety Level 4) で行う必要があるが、B ウイルスと共通抗原性を有する SA-8 (Simian Agent 8) については同様の作業は BSL2 レベルで実施可能である。

昨年度の当該研究事業で SA-8 を培養細胞内で増殖させ、これから ELISA 抗原を調整して B ウイルス抗体代替検査法を作成した。本年度は、作成した代替検査法について、カニクイザル、アカゲザル、ニホンザルについてその利用評価を行った。

なお、SA-8 の自然宿主であるアフリカミドリザルについては、ミドリザル血清中の SA-8 抗体と B ウイルス抗原との反応も調べた。

B. 研究方法

1) サル血清

カニクイザル 100 件、アカゲザル 57 件、ニホンザル 128 件、ミドリザル 27 件の血清を用いた。カニクイザルは中国産である。アカゲザルは中国産と日本国内産である。ニホンザルはすべて野生由来サルである。ミドリザルは筑波霊長類センターで飼育しているサルである。

2) ELISA 法

平成 10 年度当該研究報告書に示した方法に従い実施した。

3) 代替検査法の利用評価計算式

感度 : (対 B ウイルス抗原陽性検体数 / 対 B ウイルス抗原陽性検体数 + 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)

特異性 : (対 B ウイルス抗原陰性検体数

／対 B ウイルス抗原陰性検体数＋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)

陽性予測率：(対 B ウイルス抗原陽性検体数／対 B ウイルス抗原陽性検体数＋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)

陰性予測率：(対 B ウイルス抗原陰性検体数／対 B ウイルス抗原陰性検体数＋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)

C. 研究結果

1) B ウイルス抗原及び SA-8 抗原に対する OD 値の相関

図 1 に 100 件のカニクイザル血清について、B ウイルス抗原と SA-8 抗原を用いた ELISA 検査における OD 値の相関を示す。回帰式は $y=1.23x+0.11$ 、相関係数 $r=0.93$ であった。

図 2 に 57 件のアカゲザル血清について、同様に OD 値の相関を示す。回帰式は $y=0.96x-0.02$ 、相関係数 $r=0.88$ であった。

図 3 に 128 件のニホンザル血清について、同様に OD 値の相関を示す。回帰式は $y=0.83x+0.24$ 、相関係数 $r=0.72$ であった。

図 4 に 20 件のミドリザル血清について、B ウイルス抗原と SA-8 抗原に対する ELISA 検査における OD 値の相関を示す。回帰式は $y=1.95x+0.09$ 、相関係数 $r=0.94$ であった。

2) 感度、特異性、陽性予測率、陰性

予測率、

表 1 にカニクイザル、アカゲザル、ニホンザル血清について SA-8 抗原を利用した B ウイルス抗体代替検査法に係わる利用評価値を示す。ELISA 検査における陰性、不定、陽性の判定 OD 値域は平成 10 年度当該報告書に示した。

カニクイザルについては、感度 0.96、特異性 0.94、陽性予測率 0.99、陰性予測率 0.84 であった。アカゲザルについては、感度 0.92、特異性 1.00、陽性予測率 1.00、陰性予測率 0.94 であった。ニホンザルについては、感度 0.93、特異性 0.97、陽性予測率 0.99、陰性予測率 0.82 であった。

なお、感度、特異性、陽性予測率、陰性予測率の計算に当たっては「不定」判定の検体数（カニクイザル 7 件、アカゲザル 2 件、ニホンザル 6 件）については含めなかった。

D. 考察

カニクイザルについて、SA-8 抗原による B ウイルス抗体判定結果を B ウイルス抗原による判定結果と比較すると、その感度、特異性、陽性予測率はいずれも 0.94 以上と良好であり、また陰性予測率も 0.84 であり、SA-8 抗原の利用は有効と判断した。陰性予測率は 0.84 と感度等の値に比べ幾分低いが、その理由は B ウイルス抗原に対する OD 値が 0.35～0.51 で抗体陽性と判定された血清 6 件のうち 3 件が SA-8 抗原による検査で陰性と判定されたためである。カニクイザルでは SA-8 抗原を利用した本代替検査法において、B ウイルス抗原に対し OD 値の低い陽性検体を陰性と判定してしまう危険性

が考えられる。

アカゲザルにおける利用評価値については、その感度、特異性、陽性予測率、陰性予測率ともに 0.92 以上であり、SA-8 抗原の利用が有効であると判断した。B ウイルス抗原に対する OD 値が 0.71、1.32、1.73 の陽性 3 検体が SA-8 抗原に対し OD 値が 0.04、0.29、0.17 であり、その検査結果はそれぞれ陰性、不定、陰性と判定された。これらの検体のように B ウイルス抗原のみに反応する血清については、WB 検査等で反応する B ウイルス由来蛋白の確認が重要である。

ニホンザルについても感度、特異性、陽性予測率は 0.93 以上で、陰性予測率は 0.82 であり、SA-8 抗原の利用は有効であると判断した。陰性予測率は 0.82 で感度等の値より幾分低いが、これは B ウイルス抗原による検査で陽性と判定された 96 検体中 7 件を SA-8 による検査で陰性と判定したためである。この 7 件の血清では、B ウイルス抗原に対する OD 値が 0.49、0.88、0.90、1.78、2.34、2.60、3.01 で強い反応を示すのに対し SA-8 にはほとんど反応しなかった。これらの血清については WB 検査等で反応に関与している B ウイルス由来蛋白の確認が重要である。OD 値相関に係わる回帰式の傾きは 0.83 ($y=0.83x+0.25$) でありカニクイザル (傾き 1.23)、アカゲザル (傾き 0.96) のそれより小さく、ニホンザルの B ウイルス抗体は SA-8 抗原に対する反応がカニクイザル、アカゲザルに比べて弱い傾向がある。この理由の一つとしては、ニホンザルに感染している B ウイルスが、カニクイザル、アカゲザルに感染しい

る B ウイルスに比べて抗原的に SA-8 と離れていることが考えられる。

ミドリザル血清について、B ウイルス抗原と SA-8 抗原に対する ELISA 検査における OD 値の相関をみると、近似式の傾きは 1.95 ($y=1.95x+0.09$) となり SA-8 の自然宿主であるミドリザル血清が SA-8 抗原により強く反応することが確認された。

以上 SA-8 を利用した B ウイルス抗体代替検査については、カニクイザル、アカゲザル、ニホンザルいずれでも利用可能であると判断した。今後は、B ウイルス抗原のみに反応するアカゲザル、ニホンザル血清の解析を通して、B ウイルス特異抗原を同定し、このタンパクを遺伝子工学的的手法等により作成し、より特異性の高い抗体検査システムの開発が望まれる。

SA-8 の取扱いは現在 BSL2 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なお不明な点があるため、今後免疫遺伝学的手法ならびに感染実験等で SA-8 の特性解析が必要である。

F. 研究発表

SA-8 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：藤本 浩二、成田 豊子、高野淳一郎、向井鎌三郎、山田 章雄
第 34 回 日本実験動物技術者協会総会

図1. カニクイザル血清における B ウイルス抗原と SA-8 抗原に対する OD 値の相関

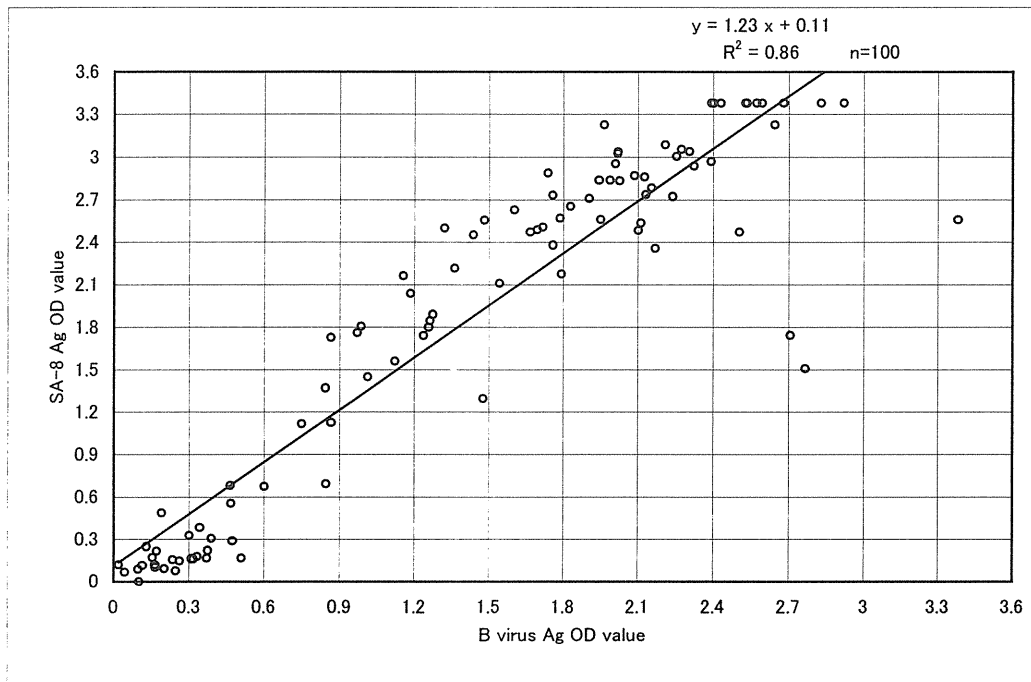


図2. アカゲザル血清における B ウイルス抗原と SA-8 抗原に対する OD 値の相関

