

有量は 70%で 136 点の点変異が局在することから、株間での多型性が大きい領域である。PCRでの増幅効率も高く、SHBV・DNAで特異的に増幅され、HSV-1型、2型およびHCMVとSCMVでは増幅されない領域で、特に分子疫学的解析に最適な領域である(図2. 参照)。

## 2. プライマーの作製

1) SHBV: Bウイルス・ゲノム上のUs領域内(ORF, Us5:gJ, Us6:gD)に、増幅DNA断片のサイズの長短、各分離株間での点変異と欠損や挿入による多型性を考慮し、プライマーのG・C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6カ所にセンスとアンチセンス・プライマー(各21mer)を作製した。これらのプライマーを組み合わせることにより、A(HB2A: HB1B, 295bp)、C(HB2A:HB2B, 641bp)領域で増幅が可能である(図2. 参照)。

2) HCMV: Meigata, K., ら<sup>4)</sup>による、HCMVのVP25をコードする610bp(CM-3, CM-2)のプライマーを作製した。このプライマーでは、SCMVゲノムが分離株間で異なったサイズで特異的に増幅される。

3) HSV: Kimura, H., ら<sup>5)</sup>による、HSVゲノム上のDNAポリメラーゼをコードする領域の330bpを増幅領域とする1、2型共通のプライマー(KM-1, KM-2)を作製した。

## 3. 検体・DNA

1) SHBV・プラスミドDNA: SMHV/pBV・DNA; pBlueSK+2.6kbp(gG, gJ, gD)<sup>6)</sup>を感染症研究所・医学実験用霊長類センターの山田章雄博士より分与された。

2) SHBV・標準株DNA: 標準株(HL-B)の不活化ウイルス液を感染症研究所・医学実験用霊長類センターの向井博士より分与を受け、ウイルス・DNAを抽出した。

3) HSV・DNA: HSV-1型(K8, K200, 198株)、HSV-2型(79-29, 27, 111株)、各分離株の感染Vero細胞からウイルス・DNAを抽出した。

4) HCMV, SCMV・DNA: HCMV(Towne/ pDNA, AD169, KH, OK-1株)、SCMV

(68-1, 1090K株)、各分離株の感染HEL細胞から、Hondo, R., ら<sup>7)</sup>の方法でウイルス・DNAを抽出した。

5) 感染症例・DNA: カニクイザルの三叉神経節・左右からDNAを抽出した。

## 4. PCRの条件

各ウイルス・ゲノム上に設定したプライマーを用いた。反応系は100  $\mu$ lとし、①dNTPs mix(各0.2mM)、②Primer(各0.5  $\mu$ M)、③DNA Polymerase(Taq, 0.5 unit)、④鋳型・DNA(各分離株・抽出DNAおよびプラスミドDNA)、10  $\mu$ lで、反応液を調整した。PCR反応は、①熱変性(94°C, 2分)、②プライマーのアニーリング(55°Cおよび58°C, 3分)、③DNA Polymeraseによる相補鎖の合成(72°C, 4分)の条件で、PCRを30サイクル実施した。検出には、電気泳動法を用いた。1.5%のアガロース・ゲルを用い、75mA定電流で1時間泳動した後、Ethidium bromideで染色して撮影・印画作製を行った。

5. 定量PCR・Microplate-Hybridization法  
定量PCR・Microplate-Hybridization法のストラテジーを図3. に示した。

1) 検体の採取: 目的に対応して、一定量の検体を経時的に採取する。水疱液、分泌液あるいは唾液等の咽頭拭い液の場合は、一度滅菌PBSに浸した綿棒を用いて経時的に採取し、1mlのPBSかTES液で再浮遊する。また、脊髄液および生検や剖検の検体は、一定量をTES液、400  $\mu$ lに採取する。

2) 検体からのDNAの抽出: 採取検体、1mlをDNA抽出用とする。超遠心25K r.p.m. 2時間後、上清をすてTES液(10mM Tris-HCl(pH7.8), 10mM EDTA, 0.1M NaCl, 0.6% SDS) 400  $\mu$ lとProteinase K(final 200  $\mu$ g/ml、剖検、生検検体の場合は380  $\mu$ g/ml)を加えて37°C水浴で、2から3時間、処理する。常法によるフェノール処理2回後、クロロホルム処理1回、エタノール処理1回行なった後、Na-TE buffer 100  $\mu$ lで再溶解する。

3) 標準DNAとその調製： 目標とするウイルスで、コピー数の既知ウイルスDNAを10倍階段希釈し、標準DNAとして鋳型に用いる。今回の自験例では、SHBV・プラスミドDNA (SMHV/ pBV・DNA; pBlueSK + 2.6kbp) を一定コピー数に10倍階段希釈し、標準DNAの鋳型として用いた。

4) 定量PCRの条件とPCR産物の処理： 標的ウイルス・ゲノム上に設定したプライマーを用いる。反応系は100  $\mu$ lとし、① dNTPs mix (各0.2mM)、② Primer (各0.5  $\mu$ M)、③ DNA Polymerase (Taq, 0.5 unit)、④ 患者検体から抽出した10倍階段希釈DNA、一定コピー数に調製した標準DNAの各々を各鋳型DNAとし、その10  $\mu$ lを用いる。反応は、①熱変性(94 $^{\circ}$ C, 2分)、②プライマーのアニーリング(55 $^{\circ}$ C, 3分)、③DNA Polymeraseによる相補鎖の合成(72 $^{\circ}$ C, 4分)の条件で、④PCRを30サイクル実施する。

PCR産物は、常法によるフェノール処理、クロロホルム処理、エタノール処理の後、アガロースゲルでの電気泳動による特異ゲノムの検出およびハイブリダイゼーションとする。今回の自験例では、Bウイルスのゲノム上に設定したAおよびC領域を増幅領域として使用した。

5) ビオチン標識・DNAプローブの作製と調整： 標準ウイルスのDNAを鋳型として、①目標増幅塩基配列部をPCRで増幅する。②そのPCR増幅産物を常法により、フェノール処理、クロロホルム処理、0.3M酢酸アンモニウム存在下でエタノール処理を行い、適量のNa-TE液(10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM EDTA, 0.1M NaCl)で再溶解する。③この精製DNA断片500 ngを鋳型として、TTP 0.2mMの代わりに、Biotin-11-dUTP 30  $\mu$ Mを用いて、同じ領域のプライマーでPCRを10サイクル行う。④PCR-ビオチン標識DNA片をフィルター濾過で精製し、ビオチン標識効率の検定から使用濃度を調製する。今回の自験例では、Biotin-11-dUTPとBiotin-

11-dCTPの両方を用いて検討した。

6) Microplate-Hybridization法： 定量PCR法で、検体から抽出した10倍階段希釈DNA、一定コピー数に調製した標準DNAの各々を各鋳型としたPCR産物を、①100 $^{\circ}$ C, 5分間、熱変性を行った後、②固相化液(1.5M NaClあるいは、0.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10mM 磷酸ナトリウム(pH7.0), 10mM EDTA)で、10倍階段希釈をプレート上で行い、100  $\mu$ l/wellとする。③プレートをシールして、37 $^{\circ}$ C, 3時間、恒温槽に沈め反応温度を一定にする。④固相化したプレートを、洗浄液(PBS-0.5% Tween20; PBS-T)でよく洗い、ハイブリダイゼーション反応を行う。

Hybridization反応は、固相化したマイクロ・プレートを洗浄した後、①至適使用濃度に調製した、ビオチン標識DNAプローブを熱変性後にハイブリダイゼーション反応液(0.75M NaCl, 5mM 磷酸ナトリウム (pH 7.0), 5mM EDTA, 0.1% Tween20、熱変性サーモン精子DNA(50  $\mu$ g/ml)、50%ホルムアミド)に加えて使用量に調製し、各プレートのウェル内に、100  $\mu$ l滴下する。②プレートをシールし、42 $^{\circ}$ Cあるいは56 $^{\circ}$ C、の恒温槽に沈めて一昼夜反応を行う。

Hybridization信号の検出は、ハイブリダイゼーション反応後のプレートを洗浄液でよく洗い、① $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識を酵素希釈液(1% ウシ血清アルブミン、0.1% Triton X-100, PBS-T)で、1:10000倍に希釈し、100  $\mu$ l/well滴下する。②室温で、1時間振とう反応を行った後、プレートを洗浄し、0.2mM 4-メチルウンベリル- $\beta$ -D-ガラクトシド液(0.1% ウシ血清アルブミン、0.1M NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM 磷酸ナトリウム(pH7.0), 0.1% NaN<sub>3</sub>)を100  $\mu$ l/well滴下する。③プレートをシールして、37 $^{\circ}$ Cの恒温槽で1時間の反応後に、反応停止液(0.1Mグリシン-NaOH (pH10.2))、100  $\mu$ l/well滴下する。④蛍光オートリーダー(励起光; 360nm、蛍光; 450nm)で、蛍光強度(単位)を測定する。

## C. 研究結果

### 1. ビオチン標識DNAプローブの調整

ビオチン標識・DNAプローブの調整に関する基礎的な検討を試み、その結果を図4. に示した。

直接プレート吸着法によるビオチン標識効率の検定結果では、A領域(295bp)、C領域(641bp) DNAプローブ共にビオチン-11-dUTPによって標識したDNAプローブがビオチン-11-dCTPで標識したDNAプローブよりも高いハイブリダイゼーション強度を示した。この結果より、BウイルスはG・Cリッチであるにもかかわらず、ビオチン-11-dCTPよりもビオチン-11-dUTPの方が効率良く標識されることが確認された。

使用ビオチン標識DNAプローブの調整では、A(295bp)、C(641bp)領域DNAプローブを対比して検出・検定に用いる場合には、一定の蛍光単位を示す希釈度で調整して使用することが必要である結果を得た。

### 2. BウイルスのPCR・Microplate-Hybridization

AおよびC領域のPCR産物を用いて、同一蛍光単位に希釈調整した、BウイルスA、C DNAプローブでMicroplate-Hybridizationを42℃と56℃の条件で検討した。その結果を図5. に示した。

A領域PCR産物295bp断片を固相化してハイブリダイゼーションを行った結果、42℃、56℃の条件下では両プローブとも同等の高いハイブリダイゼーション強度が検出され、両者DNAプローブでの差は検出されないことを確認した。

C領域PCR産物641bp断片を固相化し、同様にハイブリダイゼーションを行った結果では、42℃の条件下でホモであるBウイルスC・DNAプローブの方がBウイルスA・DNAプローブよりもわずかに高いハイブリダイゼーション強度を示し、両者間に差が認められ、さらに56℃の峻厳な条件下ではその差が大きくなる傾向が見られた。これは、DNAプローブと固相化DNA

の相同性とサイズの違いによるものと思われる。これにより、A、C領域でのBウイルスゲノムの検出、同定と定量に本法を用いるには、42℃と56℃の条件下でハイブリダイゼーションを行う必要があると考える。

### 3. BウイルスゲノムとHSV-1型、2型との相同性

BウイルスゲノムのA、C領域におけるPCR産物について、HSV-1型、2型との相同性をPCR・Microplate-Hybridization法で検討した。その結果を図6. に示した。

A領域のPCR産物(295bp)、C領域のPCR産物(641bp)をそれぞれマイクロプレートに固相化し、BウイルスのA、CおよびHSV-1型、2型DNAプローブを用いて、42℃と56℃の条件下でハイブリダイゼーションを行った。A、C領域の両者において、42℃、56℃共にBウイルスDNAプローブで高いハイブリダイゼーション強度が得られた。HSV-1型、2型DNAプローブとでは交叉反応が起こらなかった。

HSV-1型、2型DNAのPCR産物(330bp)を固相化して、42℃と56℃の条件下でハイブリダイゼーションを行った結果では、42℃、56℃条件下でHSV-1型、2型DNAプローブでは高いハイブリダイゼーション強度が得られるが、BウイルスDNAプローブとでは交叉反応が認められない結果を得た。また、56℃の条件ではHSV-1型、2型間に差が見られ、両者の相同性から型の識別が可能である結果が得られた。以上の結果から、BウイルスのA、C領域と、HSV-1型、2型との相互間では相同性が少なく、特異性の高い領域であることが確認できた。

### 4. Bウイルス感染症例でのPCR・Microplate-Hybridization

Bウイルス感染症例での実用性をカニクイザルの左右三叉神経節からの抽出DNA6検体、Bウイルス標準株DNA、BウイルスプラスミドDNAを用いて、C領域について検討した。その結果を図7. に示した。

PCR法によるBウイルスゲノムの検出では、PCR後の電気泳動により、各々サイズの異なる増幅

DNA断片が検出された。これは、株間で多型を示していることを示唆するものである。

以上の増幅DNA断片について、ハイブリダイゼーションを試みた。BウイルスのC (641 bp) DNAプローブとの42°Cの条件下では、検体1~8の全てで高いハイブリダイゼーション強度が得られ、検出と同定が可能である結果が得られた。56°Cの条件では、各検体間で相同性の違いによって明瞭な差が見られることから、株間における相補性の識別が可能である。また、HSV-1型、2型DNAプローブとでは、42°C、56°Cの条件下で、共に各検体間で交叉反応は見られないことから、特異的にBウイルスゲノムの検出と同定が可能であり、その実用性を明らかにした。

#### 5. PCR・Microplate-Hybridization法の定量性

Bウイルスゲノムにおける、PCR・Microplate-Hybridization法の定量への応用性を検討した。その結果を図8. に示した。

コピー数既知のBウイルスプラスミドDNAの10倍段階希釈液を鋳型としたC領域(641bp)の定量PCR・電気泳動では、0.1pgの鋳型まで明瞭なバンドとして検出された。この増幅DNA断片についてハイブリダイゼーションを行ったところ、0.01pgの鋳型においても高いハイブリダイゼーション強度が得られ、高感度での検出と同時にハイブリダイゼーション強度と希釈度との標準曲線を作図することが可能であった。また、この希釈度との標準曲線からハイブリダイゼーション強度と鋳型コピー数の標準曲線を作図することが可能である。これによって、この標準曲線と検体から抽出したDNAでの定量PCR産物のハイブリダイゼーション曲線を対比させることにより検体中のウイルスゲノムのコピー数を概算することができ、定量が可能となった。

#### D. 考 察

ヘルペスウイルス科に属するウイルスのG・C含有は一般に高いのが特徴である。その中でもBウイルスは、G・C含有量が75%で、最もG・Cリッチなウイルスである。また、同じ $\alpha$ -ヘルペスウイルス亜科に属するHSV-1, 2型との相同性が高いことから、Bウイルスの遺伝子診断あるいは分子疫学的な解析には特に困難を伴うことが多い。

本研究では、PCR法とMicroplate-Hybridization法を併用した、遺伝子診断と分子疫学的解析に必要な基礎条件として、①Bウイルスの分離株間で特異性があること、②分離株間で多型性を示す領域を含むこと、③近縁ヘルペスウイルスとの交叉・増幅性の少ないこと、④増幅産物がDNA・プローブとして利用できること、⑤定量的PCR法に応用できること、の5点を上げて検討してきた。これにより、Bウイルスに高い特異性を持つPCR増幅領域を指標としたPCR・Microplate-hybridization法を確立し、Bウイルスゲノムの検出と同定およびコピー数の定量への応用を可能にした。

Bウイルス感染のDNA診断法で、検体中から特異ウイルス・ゲノムの検出と同時にウイルス量(コピー数)を測定できるということは、診断だけではなく重要な意義を持つものと考えられる。Bウイルス感染症の予後の判定、感染伝播様式の解析、発病病理の研究、抗ウイルス剤の治療効果判定等の究明に広く応用ができるからである。今後、本法を応用して、Bウイルス感染の遺伝子診断に止まらず、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な解析を進める予定である。

#### E. 結 論

本研究では、PCR法とMicroplate-Hybridization法を併用した、遺伝子診断と分子疫学的解析に必要な基礎条件として、①Bウイルスの分離株間で特異性があること、②分離

株間で多型性を示す領域を含むこと、③近縁ヘルペスウイルスとの交叉・増幅性の少ないこと、④増幅産物がDNA・プローブとして利用できること、⑤定量的PCR法に応用できること、の5点を上げて検討してきた。これにより、Bウイルスに高い特異性を持つPCR増幅領域を指標としたPCR・Microplate-hybridization法を確立し、Bウイルスゲノムの検出と同定およびコピー数の定量への応用を可能にした。今後、本法を応用することにより、Bウイルス感染の遺伝子診断に止まらず、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な解析がさらに進展するものと期待される。

#### 参考論文

1. 上村暁子、他：BウイルスのDNA診断と分子疫学に関する基礎的研究（1）．第129回日本獣医学会学術集会：講演要旨、127、2000.
2. 本藤 良、他：霊長類を介する人獣共通感染症の制御に関する研究．新興・再興感染症研究事業、厚生科学研究報告、103、1999.
3. Smith, A., et al.: Molecular evidence for distinct genotypes of monkey B virus (Herpesvirus Simiae) which are related to the macaque host species. *J. Virol.* 72: 9224-9232, 1998.
4. Meigata K, et al.: Titration of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in urine by combined use of PCR and microplate hybridization in a renal transplant patient with HCMV pneumonitis. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 49: 121-127, 1996.
5. Kimura H, et al.: Detection of viral DNA in neonatal herpes simplex virus infections: Frequent and prolonged presence in serum and cerebrospinal fluid. *J. Infect. Dis.*, 164: 289-293, 1991.

6. Bennett, AM., et al.: Nucleotide sequence analysis of genes encoding glycoproteins D and J in simian herpes B virus. *J. Gen. Virol.* 73, 2963-2967, 1992.
7. Hondo, R., et al.: Genome variation among varicella-zoster virus isolates derived from different individuals and from the same individuals. *Arch. Virol.*, 93: 1-12, 1987.

#### F. 研究発表

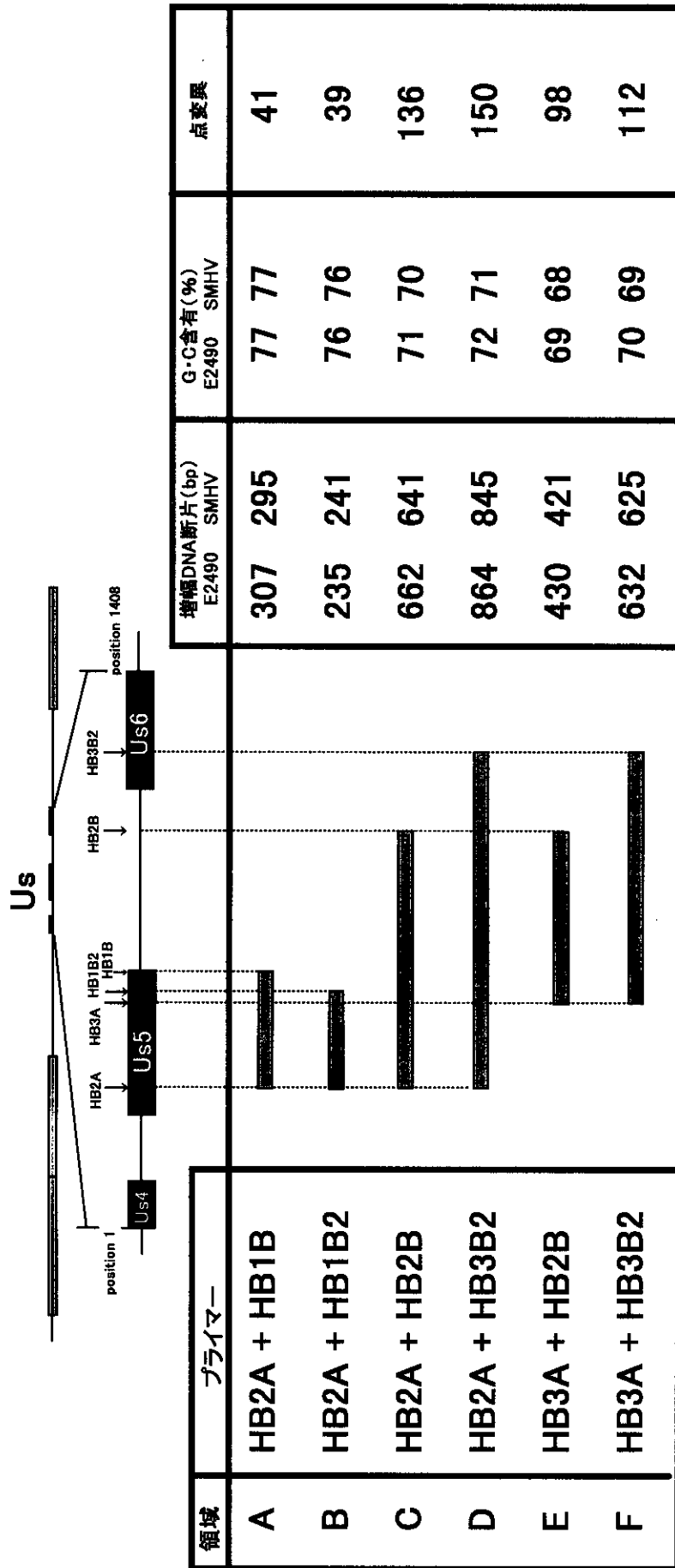
1. 上村暁子、大屋智香、植田富貴子、本藤 良、向井寮三郎、棚林清、山田章雄、吉川泰弘：BウイルスのDNA診断と分子疫学に関する基礎的研究．第129回日本獣医学会学術集会：講演要旨、127、2000.
2. 本藤 良、伊東佑英： $\alpha$ ヘルペスウイルス感染のDNA診断．*日本臨床*、58、858-863、2000.
3. 植田富貴子、本藤 良：市販食肉における *L. monocytogenes* 汚染の分子学．*月刊HACCP*、6、64-69、2000.
4. 広重光一、池田 稔、本藤 良：Ramsay Hunt症候群の涙液および唾液における水痘・帯状疱疹ウイルスDNAの検出．*日本耳鼻咽喉科学会会報*、103、928-936、2000.
5. Akinobu SAITO, Fukiko UEDA, Takuji SAWADA and Ryo HONDO. Characterization of iap gene in *Listeria monocytogenes* strains isolated in Japan. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 23、159-165, 2000.
6. Mariko MOCHIZUKI, Fukiko UEDA, Tadashi SANO and Ryo HONDO. Relation between the vanadate induced relaxation and the vanadium contents in guinea-pig taenia coli. *Can J Physiol Pharmacol*、78(4)、

339-342, 2000

7. Mariko MOCHIZUKI, Fukiko UEDA,  
Kiichi KUMON, Rei Sasaki, Hiroshi  
NAKAZAWA, Hironori MATSUBA and  
Ryo HONDO. Cadmium contamination  
in wild birds as an indicator of  
environmental pollution. Environ  
Monit Assess 2000 (accepted)

図 1.

PCR・Microplate - Hybridization 法のターゲット領域



<プライマー配列>

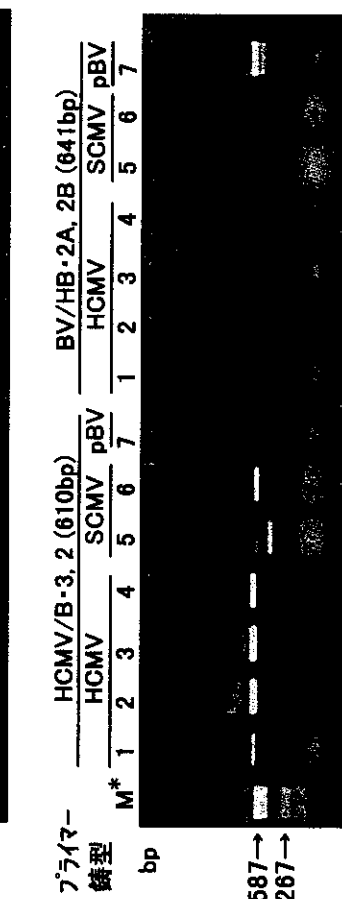
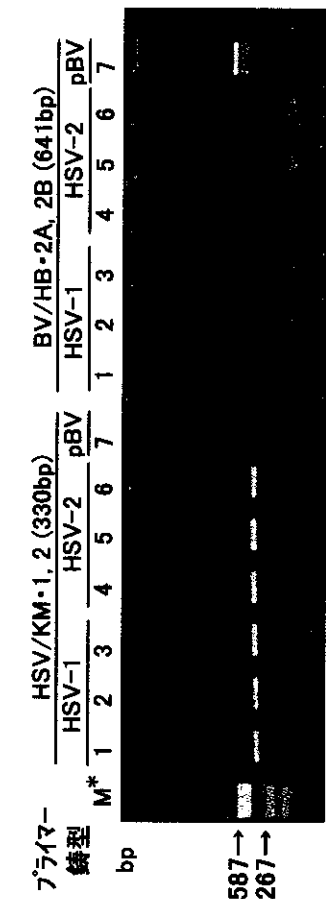
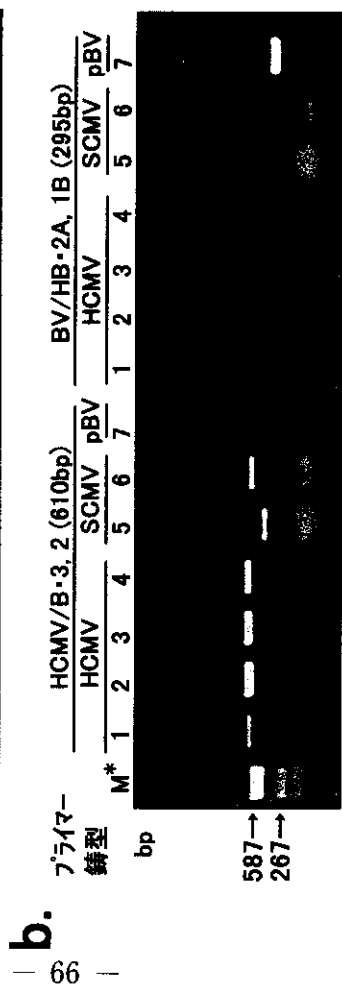
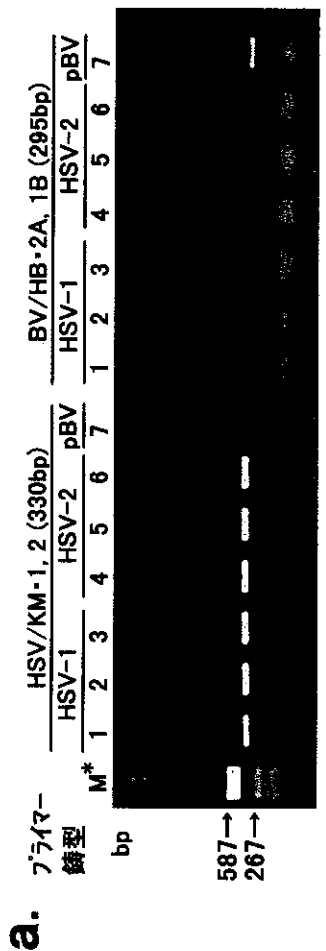
- HB2A : 5'-CCGGGCTCGCCACGGACACCA-3'
- HB3A : 5'-CCTGCACCCGGTGTGTAGACG-3'
- HB1B : 5'-TCGGGGGTACGGGTAGACG-3'
- HB1B2 : 5'-CGTCTACAGCACCGGTGCAGG-3'
- HB2B : 5'-ATCGCGCCGGACCGATCGT-3'
- HB3B2 : 5'-TCAGGACCGCTCCACCGCA-3'

図 2.

Bウイルスゲノム上のA, C領域の特異性  
PCR 法によるBウイルスゲノムの検出

**A領域 : BV/HB・2A, 1Bプライマー (295bp) の特異性**

**C領域 : BV/HB2A, 2Bプライマー (641bp) の特異性**



a. HSV-1, 2型との特異性 : HSV-1-DNA/1(K8), 2(K200), 3(198)  
HSV-2-DNA/4(79-29), 5(27), 6(111)  
pBV(pBlueSK+2.6Kbp)/Bウイルス・プラスミドDNA/7

b. HCMV, SCMVとの特異性 : HCMV-DNA/1(Towme/pDNA), 2(AD<sub>169</sub>), 3(KH), 4(OK-1)  
SCMV-DNA/5(68-1), 6(1090K)  
pBV(pBlueSK+2.6Kbp)/Bウイルス・プラスミドDNA/7

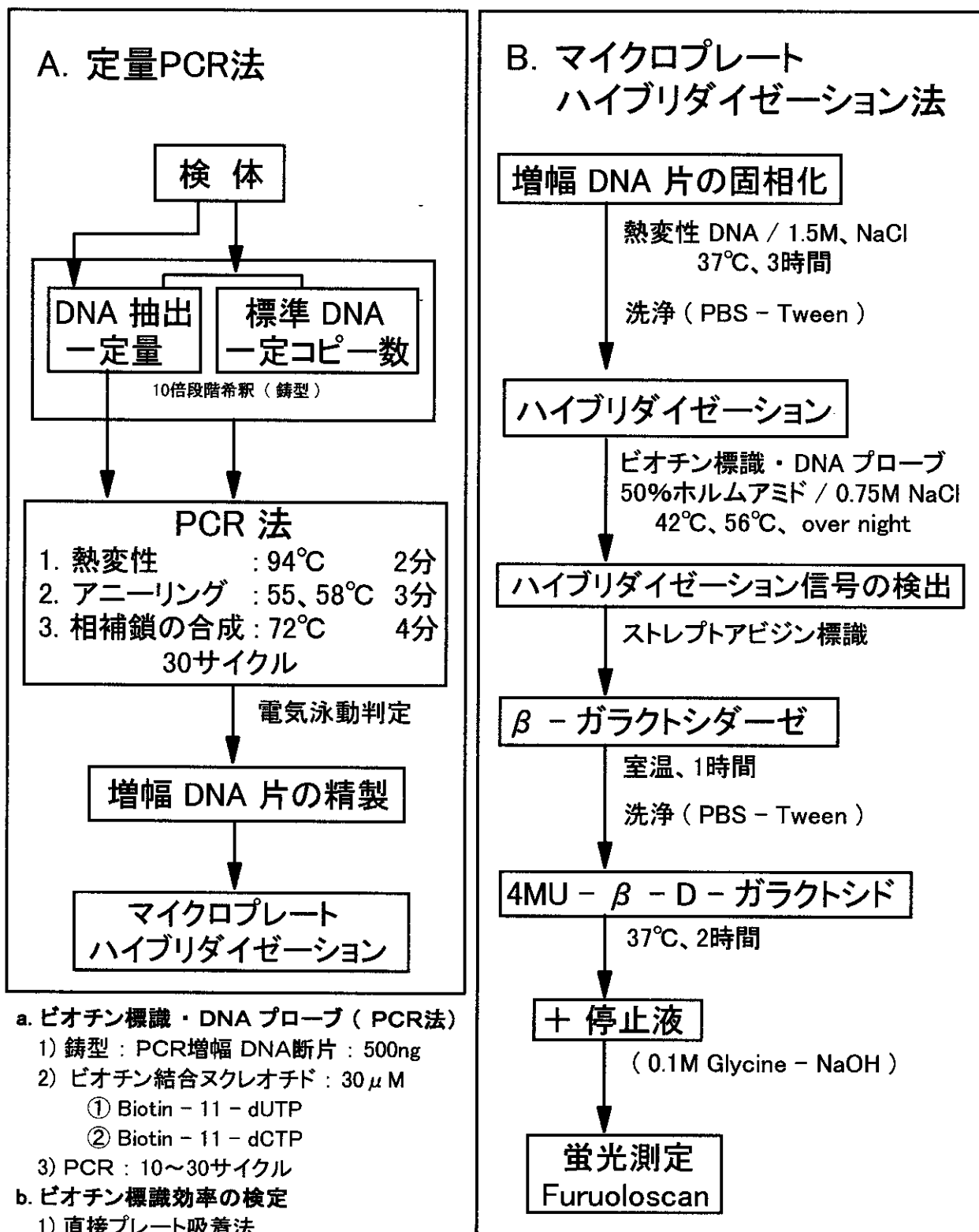
\*M: サイズマーカー

PCRの条件: 1) 熱変性: 94°C 2分, 2) アニールリング: 55°C 3分,  
3) 伸張: 72°C 4分, 4) サイクル: 30回



図 3.

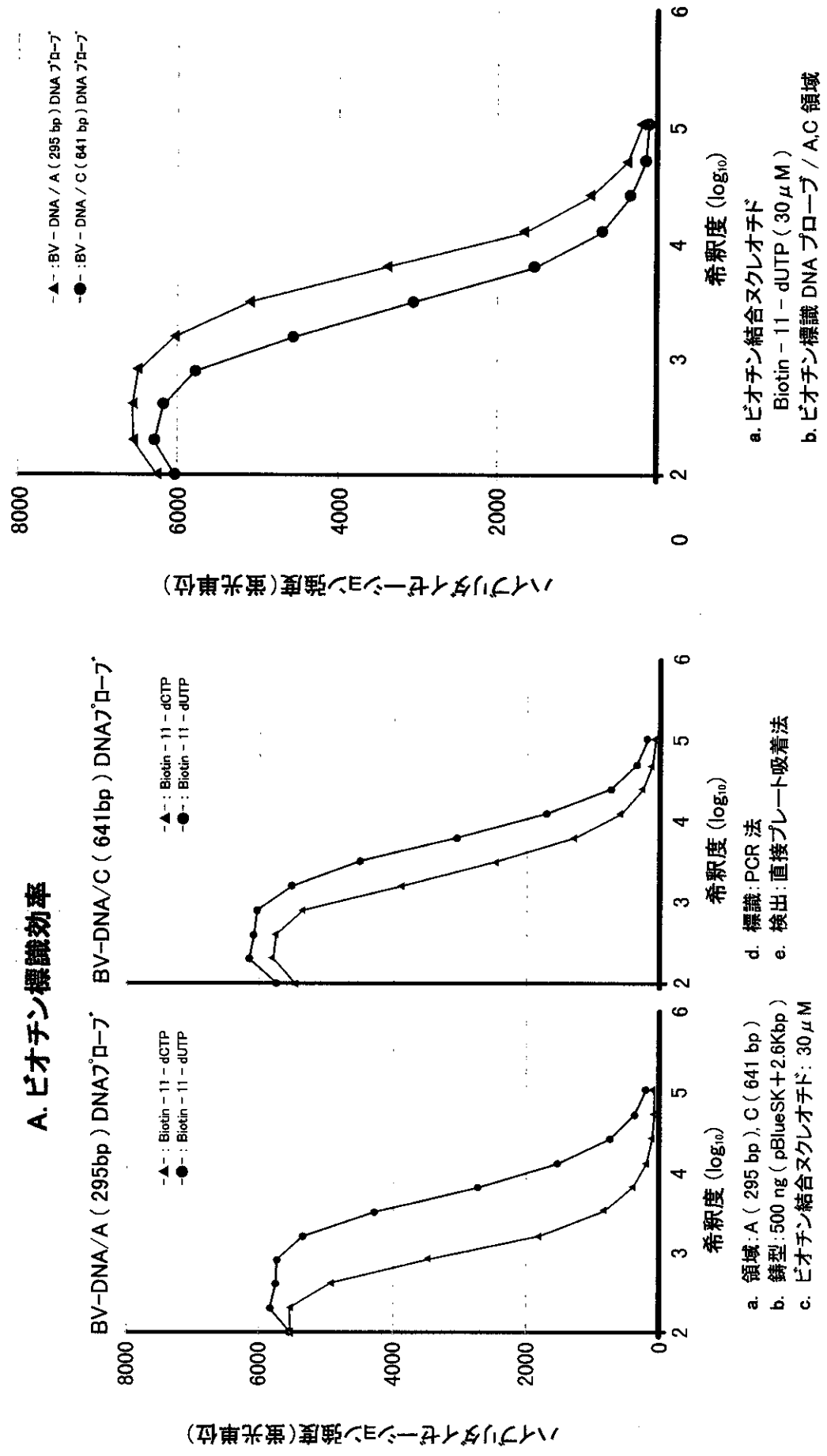
## 定量 PCR ・ Microplate-Hybridization 法



\* Hondo, Jpn. J. Med. Sci. Biol., 48, 1995

# ビオチン標識・DNAプローブの調整

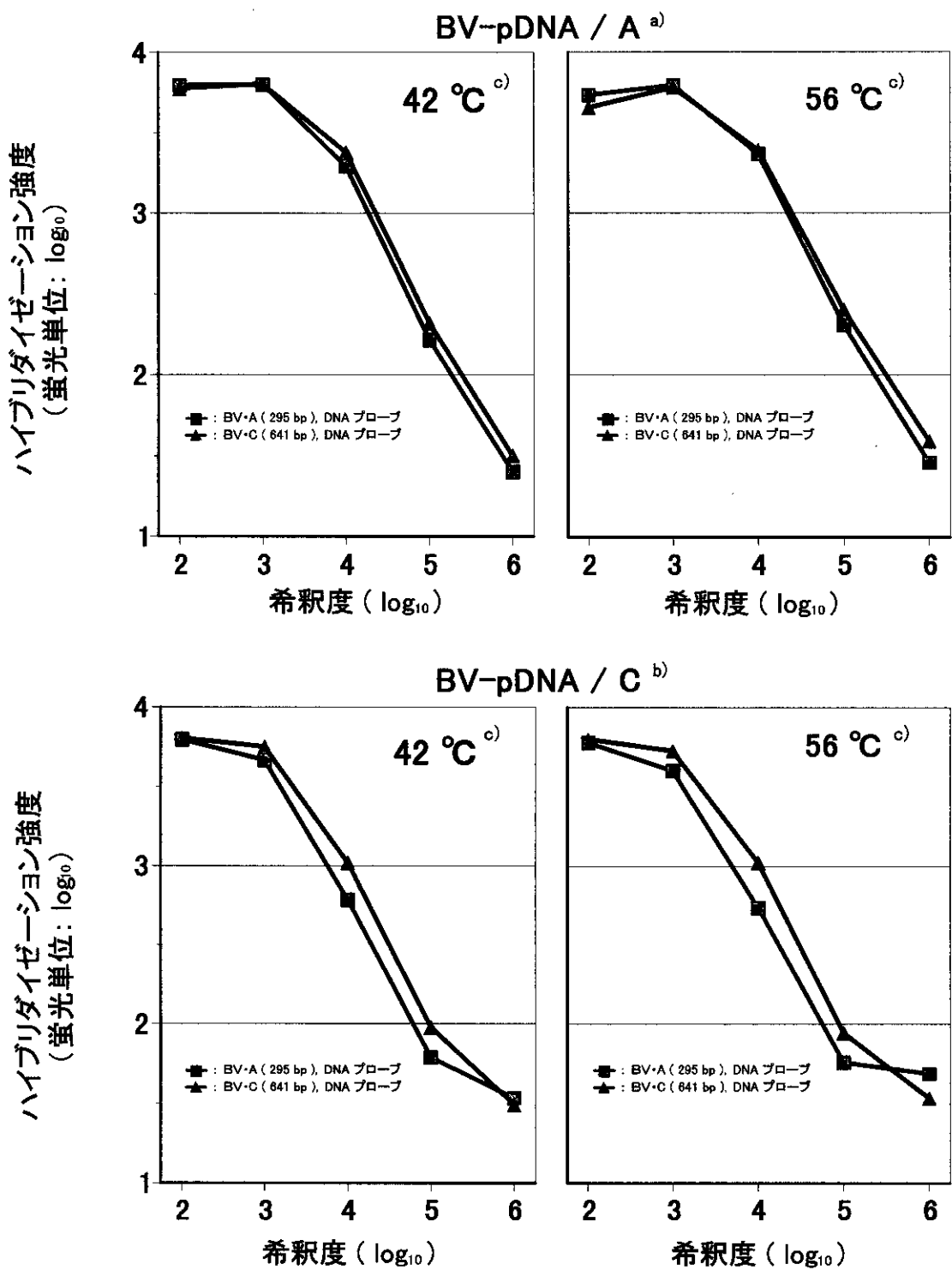
図 4.



- a. 領域: A (295 bp), C (641 bp)
- b. 鋳型: 500 ng (pBlueSK+2.6Kbp)
- c. ビオチン結合ヌクレオチド: 30 μM
- d. 標識: PCR 法
- e. 検出: 直接プレート吸着法

図 5.

**BウイルスのPCR・Microplate - Hybridization  
BV - pDNA / A, C領域**



a) BV-pDNA / A : A 領域 PCR 産物 (295 bp)  
 b) BV-pDNA / C : C 領域 PCR 産物 (641 bp)  
 c) Hybridization 温度 : 42°C, 56°C.

図 6.

Bウイルスの PCR - Microplate - Hybridization  
HSV -1, 2 型との相同性

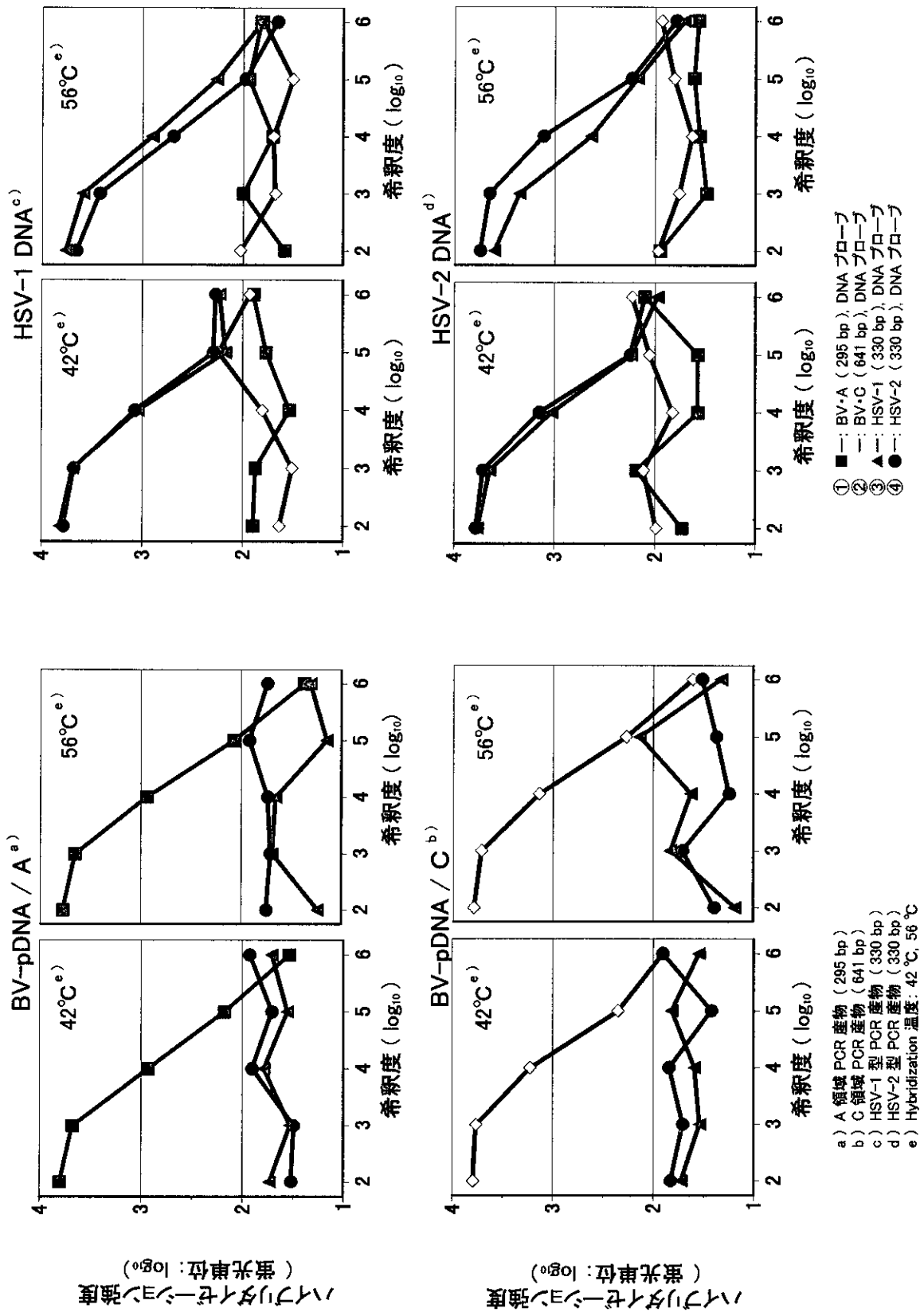
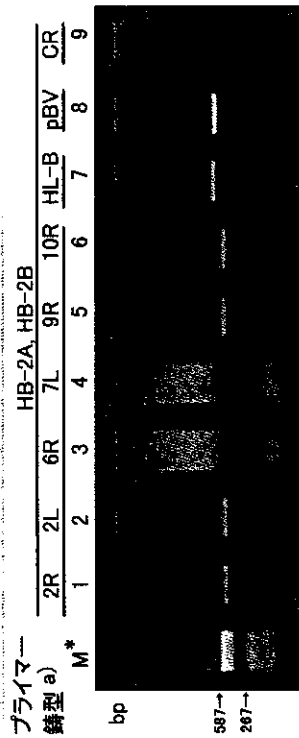


図 7.

**Bウイルス感染症例でのPCR・Microplate-Hybridization  
カニクイザル・三叉神経節からのBウイルスゲノムの検出・検定**

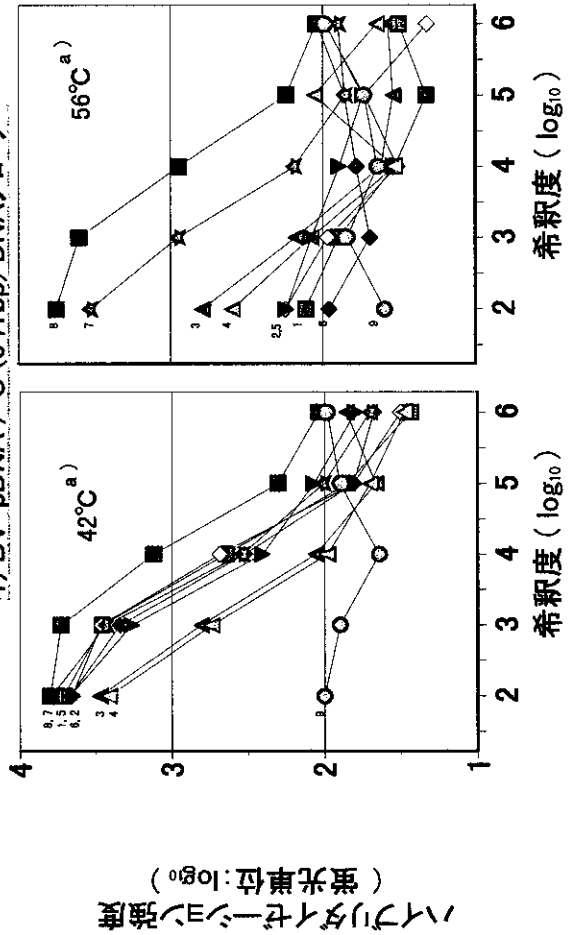
**PCR・アガロースゲル電気泳動 (C領域)**



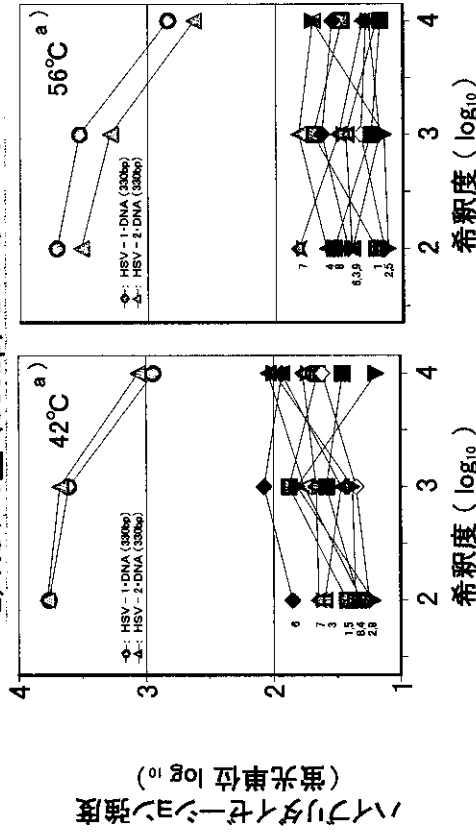
a) 症例・三叉神経節左右抽出DNA: 1 (2R), 2 (2L), 3 (6R), 4 (7L), 5 (9R), 6 (10R), 7 (BV-標準株), 8 (pBV・pBlueSK + 2.6Kbp), 9 (PCRコントロール), \* M: サイズマーカー  
b) PCRの条件: 1) 熱変性: 94°C 2分, 2) アニール: 55°C 3分, 3) 伸長: 72°C 4分, 4) サイクル: 30回

**Microplate-Hybridization**

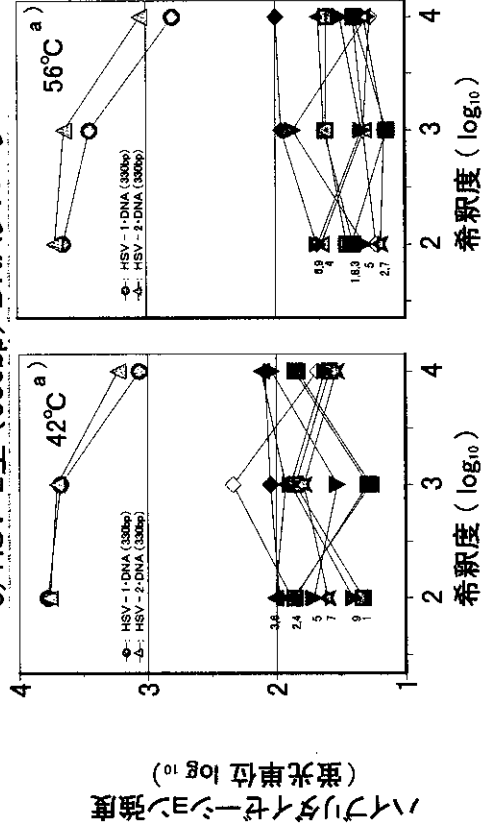
**1) BV-pDNA / C (641bp) DNAプローブ**



**2) HSV-1型 (330bp) DNAプローブ**



**3) HSV-2型 (330bp) DNAプローブ**

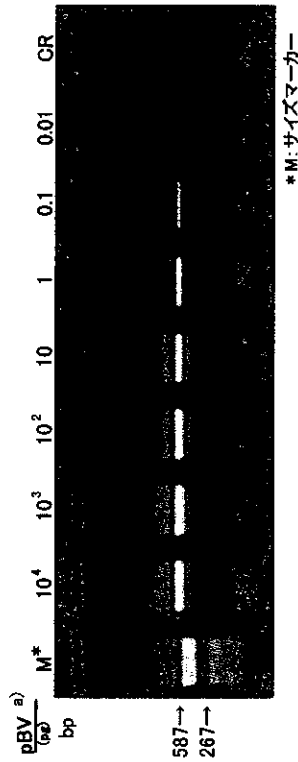


a) Hybridization 温度: 42°C, 56°C

図 8.

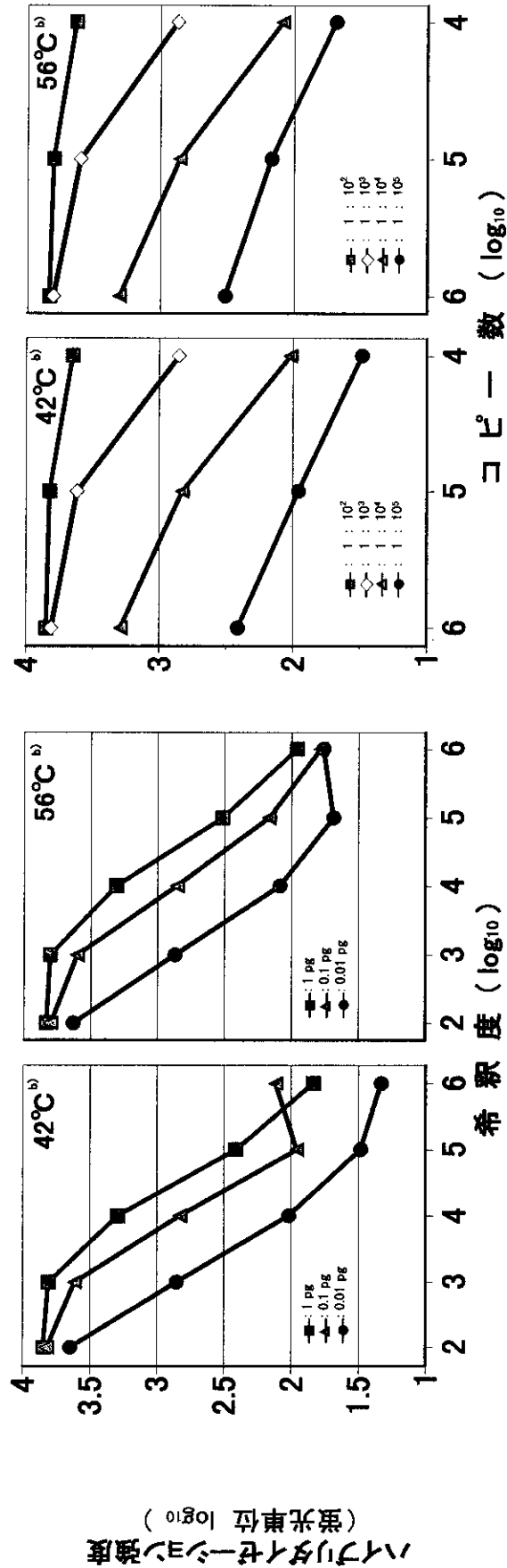
# PCR - Microplate - Hybridization 法の定量への応用

## PCR - アガロースゲル電気泳動 (C領域)



- a) BV-pDNA (pBlueSK + 2.6 Kbp)  
 b) PCRの条件: 1) 脱変性 (94°C, 2分)  
 2) アニリング (55°C, 3分)  
 3) 伸長 (72°C, 4分)  
 4) サイクル (30サイクル)

## Microplate-Hybridization標準曲線



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

サル類由来感染症に関する研究

分担研究者 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

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 マカク属サルにおけるBウイルス感染の血清学的診断法に応用できる有効かつ安全な抗原調製法ならびに抗体検出系を確立するために、ウイルス構造蛋白 gD を分泌型として発現させた抗原を作製した。ELISA 法及びドットプロット法による Bウイルス抗体の検出を試み、従来の不活化Bウイルス感染細胞抽出抗原を用いた ELISA 法との相関性を調べた。ELISA 法では陽性血清は 100% (61/61)が、陰性血清 93.3% (42/45)で一致した。またドットプロット法では 100% (61/61)、97.7% (44/45)が一致した。組換え発現Bウイルス gD 蛋白を抗原として用いたBウイルス感染サル血清抗体の検出法は有効な方法であり、抗原調製にウイルス培養を必要とせず安全な抗原調製が可能となった。

A. 研究目的

Bウイルスはアジア産マカク属サルに感染しているアルファヘルペスウイルスで、サルにおいては著しい病変を示すことなく潜伏感染している。しかし、人に感染した場合には脳炎などの重篤な神経系の疾病を起し致死的になる場合があり、サル由来感染症の中でもBウイルス感染症

は制御すべき重要な感染症の一つである。医学実験用などに飼育されているマカク属サルからの飼育管理者や実験者に対する感染防御対策のために感染したサルを的確に把握することが重要と考えられる。本ウイルスはその病原性の危険度から大量のウイルス培養は高度安全実験室 (BSL4)が要求されており診断用抗原

の調製は困難な状況にある。そこで、本研究では安全かつ有効なウイルス抗原の作成のためにBウイルス構造蛋白を組換えDNA技術を用いて発現させ、Bウイルス感染サル血清学的診断方法を確立することを目的としている。これまでにBウイルス構造蛋白のうちgD糖蛋白を哺乳類細胞で発現することに成功し、これが自然感染サル血清に反応することを確かめている。本年度はこの組換え発現gD蛋白を抗原にしたELISA法及びドットブロット法と従来の不活化Bウイルス感染細胞抽出抗原を用いたELISA法との相関性を確かめることを目的とした。

## B. 研究方法

Bウイルス分泌型gD蛋白の発現：BウイルスgD発現プラスミドのgD翻訳領域のうち膜貫通領域をコードする領域の直前に停止コドンを導入し細胞外領域を発現して分泌する組換えプラスミドpBgDdTMを作製した。このプラスミドをCOS7細胞にトランスフェクトして分泌型gD蛋白を培養上清中に発現させこれを抗原として用いた。陰性対照抗原は発現ベクターpcDNA3.1(-)を同様にトランスフェクトした培養上清を用いた。

組換え発現gD蛋白を抗原とした

ELISA：抗原液100 $\mu$ lを96穴プレートにコーティングしたものを抗原プレートとした。被験血清は100倍希釈し、30 $^{\circ}$ C、90分反応させた。洗浄後、パーオキダーゼ標識抗サルIgG抗体を加えた後、発色基質を加え、その吸光度(490nm)を測定した。

組換え発現gD蛋白を抗原としたドットブロット反応：抗原液5 $\mu$ lをPVDF膜に直接ドットし、乾燥後ブロッカーにて処理した。被験血清は20倍希釈し、室温で90分間反応させた。洗浄後、パーオキダーゼ標識抗サルIgG抗体を反応させ、基質液を加えて発色させた。

被験血清：筑波医学実験用霊長類センターにて保存されていたカニクイザル血清のうち不活化Bウイルス感染細胞抽出抗原を用いたELISA法により陽性とされた61検体と陰性血清45検体について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では筑波医学実験用霊長類センターにおいて定期的な健康診断のために麻酔下で採血された血清を被験検体としており動物愛護上、特段の配慮が必要であるとは思われない。

## C. 研究成果

ELISA法による反応：不活化Bウイルス感染細胞抽出抗原を用いた



ELISA で陰性と判定されたサル血清について組換え発現 gD を用いた ELISA を行なった。陽性抗原と陰性対照抗原との差の OD 値は平均 0.01 (標準偏差値 0.016, n=35) であり、平均値に 3 倍の標準偏差値を加えた値を越える 0.05 以上を示す場合を陽性とした。この基準で被験血清を測定したところ、陽性血清 61 検体は全てが陽性、陰性血清 45 検体は 3 検体で陽性と判定されたのみであり、組換え発現 gD 抗原 ELISA の感度や特異性は良好であった。

ドットプロット法による検出：組換え発現 gD 抗原と陰性対照抗原を同一メンブラン上にドットし、20 倍希釈した被験血清を反応させた。発色後、その濃度を測定し陰性対照の 2 倍以上の発色を示した場合を陽性と判定した。陽性血清 61 検体は全て陽性と判定された。陰性検体では 45 検体中 1 検体が陽性と判定されただけであり、ドットプロット法でも高い判定の一致を認めた。

#### D. 考察

B ウイルス構造蛋白遺伝子のうち gD 蛋白遺伝子の膜貫通領域以降を欠損させ組換え発現ベクターに組み込み、哺乳類細胞に分泌型蛋白として発現させた。この発現蛋白を用いた血清反応を不活化ウイルス感染細胞

抽出液を用いた ELISA 法による抗体検出系と比較し有効性を調べた。保存サル血清 106 検体のうち、従来の ELISA 法での判定と不一致だった検体は、組換え発現 gD ELISA で 3 検体、ドットプロット法では 1 検体だけであり、新たに開発した抗体検出系は有効な方法と考えられる。不一致だった 3 検体はいずれも弱い発色しか示さず、このうち 2 検体は放射免疫沈降法で gD 蛋白を沈降しており、各検出系にわずかながら検出感度や特異性に差があるものと考えられる。

サルにおける B ウイルス感染の血清学的診断は、これまで不活化したウイルス感染細胞抽出液を用いた ELISA 法やウェスタンブロット法により行われてきたが、この方法では抗原調製にウイルスの培養が必要であり、そのための特別な施設が要求され本邦での抗原調製は実施されていない。このため、抗原性の類似したウイルス (ヘルペスウイルスパピオ 2 や Simian agent 8) を用いた血清抗体検出法が開発されている。本研究では抗体検出用抗原として B ウイルス構造蛋白を組換え DNA 技術を応用して発現させており、抗原調製にウイルスの培養を必要とせず調製することができ、有効かつ安全な方法と考えられる。

## E. 結論

Bウイルス gD 蛋白を分泌型として哺乳類細胞で発現させ、これを抗原とした ELISA 法及びドットプロット法によるサル血清抗体の検出法を開発した。不活化感染細胞抽出抗原を用いた ELISA 法による判定と良く一致しており、サル類における B ウイルス感染の血清学的診断に有効な手段となるものであった。

## F. 健康危険情報

今日まで本邦におけるヒトでの B ウイルス感染の報告はないが、実験用に飼育されているマカク属サルにおいては自然感染が確認されている。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

J. Takano, T. Narita, K. Fujimoto, R. Mukai, and A. Yamada: Detection of B virus infection in cynomolgus monkeys by ELISA using simian agent 8 as alternative antigen. *Exp. Anim.*, In press.  
A. Uda, K. Tanabayashi, R. Mukai, M. Yachi, and A. Yamada: CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Primatol.*, in press.

### 2. 学会発表

棚林 清、向井鎌三郎、山田章雄：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、第 129 回日本獣医学会 2000 年 4 月

上村暁子、大屋智香、植田富貴子、本藤 良、向井鎌三郎、棚林 清、山田章雄、吉川泰弘：B ウイルスの DNA 診断と分子疫学に関する基礎的研究(1)PCR 法によるプライマーの設定とその特性、第 129 回日本獣医学会 2000 年 4 月

棚林 清、向井鎌三郎、山田章雄：人獣共通伝染病としての B ウイルス感染症、サル類における B ウイルス抗体検査、第 15 回ヘルペスウイルス研究会 2000 年 6 月

棚林 清、向井鎌三郎、山田章雄：B ウイルス組換え gD タンパクの発現とサル血清抗体検出への応用、第 5 回日本神経感染症研究会第 4 回日本神経ウイルス研究会合同学術集会 2000 年 7 月

棚林 清、向井鎌三郎、山田章雄：組換え発現蛋白を用いた B ウイルスサル血清抗体検出法の開発、第 48 回日本ウイルス学会 2000 年 10 月

## 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

## クリミアコンゴ出血熱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、前田秋彦、倉根一郎（国立感染症研究所）  
唐 青（中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所）

研究要旨：クリミア・コンゴ出血熱（CCHF）ウイルスの組換え核蛋白（CCHFV NP）を抗原としたイムノグロブリン G（IgG）抗体検出システムが、CCHF の診断に有用であるか否かを 15 名の回復期 CCHF 患者から採取された血清と 96 名の日本人血清を用いて CCHF ウイルス感染 Vero E6 細胞を抗原とした間接蛍光抗体法（IFA）と比較して検討した。バキュロウイルス系を用いて発現させ精製した組換え CCHFV NP を抗原とした IgG ELISA および組換え CCHFV NP を発現する HeLa 細胞を抗原とした間接蛍光抗体法（IFA）の精度と感度を評価した。それぞれの方法を用いて、高い感度と精度で患者血清中抗 CCHFV NP 抗体を検出できた。組換え CCHFV NP を抗原とした IgG ELISA と IFA は、CCHF の血清学的診断や血清疫学的研究に有用である。組換え CCHFV NP における強い抗原性を提示する部位を、患者血清を含む抗 CCHF ウイルス抗体を用いたウエスタンブロット法で検討したところ、482 個のアミノ酸からなる CCHFV NP のアミノ酸位置 201-306 番目に相当する中央部に存在することが明らかになった。

### A. 研究目的

クリミア・コンゴ出血熱（CCHF）ウイルスはブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類され、南アフリカから中近東、東ヨーロッパ諸国そして中国西部にいたる広範な地域に常在し、毎年、多くの CCHF 患者が発生している。ヒツジなどの家畜や齧歯類の野生動物などが宿主で、ダニ（Hyalomma 属）が媒介する。ヒトへは CCHF ウイルスを有するダニに咬まれる経路と CCHF ウイルスが含まれる血液などの体液に直接接触する経路で感染する。中国西部の新疆ウイグル自治区はウイルス性出血熱の流行地であることが知られ、その疾患は新疆出血熱（Xinjiang hemorrhagic fever）と呼ばれ、1966 年にはじめてウイルスが分離された。そのウイルスは新疆出血熱ウイルス（Xinjiang hemorrhagic fever virus）と名付けられ、CCHF ウイルスと同じであることが確認された。中国西部の新疆ウイグル自治区をはじめとする CCHF 流行地からの CCHF ウイルスに感染した旅行者や家畜動物の移動に伴って、CCHF ウイルスが我が国に侵入する可能性がある。しかしながら我が国では BSL-4 実験室の稼働が許されていないため、生きた CCHF ウイルスを用いた CCHF ウイルス抗体検出のための検査は不可能であった。そこで我々は CCHF ウイルスの

組換え核蛋白（CCHFV NP）を発現するバキュロウイルスを作成して組換え CCHFV NP を発現、精製し、これを抗原とした IgG ELISA の CCHF の診断および血清疫学的研究への有用性について検討した。また、組換え CCHFV NP を発現する HeLa 細胞を抗原とした間接蛍光抗体法（HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA）についても同様の検討を行った。

### B. 方法

1) cDNA：CCHF ウイルス核蛋白の cDNA は、C. Prehaud 博士（パスツール研究所、フランス）より供与を受けた。その cDNA は、中国新疆ウイグル自治区で分離された CCHF ウイルス 8402 株に由来する。

2) CCHFV 感染 Vero E6 細胞（CCHFV-VeroE6 細胞）を用いた IFA 抗原の作製（中国予防医学科学院唐青担当）：CCHF ウイルス（66019 株）を Vero E6 細胞に感染させ 5 日間培養し、2 回リン酸緩衝液（PBS）で洗浄し、トリプシン処理して細胞を回収した。その細胞を非ウイルス感染 Vero E6 細胞と 1：2 の割合で混和し、マルチスポット蛍光用スライドガラス（AR Brown）に乾燥固定し、さらに 10 分間の冷アセトン固定処理を施した。使用するまで -70℃ に保存し、使用時には乾燥させてから用いた。

3) 組換え CCHFV NP 発現 HeLa 細胞 (HeLa/CCHFV-NP 細胞) の樹立と IFA 抗原の作製: cDNA をテンプレートとして PCR 法で CCHF ウイルス核蛋白 DNA を増幅し, それを真核細胞発現ベクター pKS336 [阪井弘治博士 (国立感染症研究所エイズ研究センター) より分与] のクローニングサイトに順方向に挿入し, pKS336-CCHFV-NP を得た. このベクターは, EF-BOS プロモーターにより外来遺伝子を発現し, SV40 プロモーターにより blastocidin 耐性遺伝子を発現する. この pKS336-CCHFV-NP を HeLa 細胞にトランスフェクションし, blastocidin 耐性細胞を選別して CCHFV NP を発現する HeLa 細胞 (HeLa/CCHFV-NP 細胞) 株を樹立した. HeLa/CCHFV-NP 細胞を 2 日間培養し, PBS で 2 回洗浄し, IFA 用マルチスポットスライドグラスに乾燥固定し, 上記と同様に IFA 抗原を作製した.

4) IFA: 各 IFA 抗原に PBS で段階稀釈したヒト血清を, 37°C で 1 時間反応させた. PBS で洗浄し, 70 倍稀釈された FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Zymed) を 37°C で 1 時間反応させた. PBS で洗浄し, グリセリンを封入して蛍光顕微鏡下で蛍光シグナルを観察した.

5) 組換えバキュロウイルスの作製: N-末端にヒスチジンタグ (6×His タグ) を付加した CCHF-NP (His-CCHF-NP) を発現する組換えバキュロウイルス (Ac-His-CCHF-NP) を以下の方法で作製した. CCHF-NP をコードする cDNA を pQE30 ベクター (QIAGEN) のクローニングサイトに His-tag とフレームに合うように挿入し, His-CCHF-NP をコードする DNA を回収, pAcYM1 ベクターに挿入した (pAc-His-CCHF-NP). pAcYM1-His-CCHF-NP とバキュロウイルス DNA を high five 細胞にトランスフェクションし, His-CCHF-NP を発現する組換えバキュロウイルス (Ac-His-CCHF-NP) を得た.

6) 組換え CCHF-NP の発現と精製: 組換えバキュロウイルス (Ac-His-CCHF-NP) を high five 細胞に感染させ, 感染 3 日後に細胞を回収した. 回収した細胞を超音波破碎し, 12,000rpm 遠心遠心精から,  $\text{Ni}^{2+}$ -カラムを用いて His-CCHF-NP を精製した.

7) 血清: 13 名の CCHF 患者の回復期血清 (中国新疆ウイグル自治区の CCHF 患者血清) および 96 人の日本人血清を用いた.

8) IgG-ELISA: 約 100ng/well になるように精

製 His-CCHF-NP を ELISA 用プレート (Falcon 社) に 4°C で一晩吸着させた. 5% skim milk/0.05% Tween 20 含有リン酸緩衝液 (T-PBS) でブロッキング後, それぞれの被験血清を 100 倍から 6,400 倍まで 4 倍階段稀釈し, 37°C 1 時間反応させた. T-PBS で洗浄後, ペルオキシダーゼ (HRPD) 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Zymed 社, 500 倍稀釈) を 37°C 1 時間反応させた. T-PBS で十分洗浄後, 基質である ABTS 液 (Roche Diagnostics 社) を加え, 37°C 30 分反応させ吸光度 ( $\text{OD}_{405}$ ) を測定した. 対照として, 抗原をコートしていない well を用いて, それぞれの稀釈された被験血清について同様の反応をおこなった. 抗原陽性ウエルの  $\text{OD}_{405}$  から対照の  $\text{OD}_{405}$  を差し引いた値を, CCHF-NP に対する反応としての  $\text{OD}_{405}$  とした.

9) CCHFV NP の部分ペプチドの発現. 図 1 に示す大きさの CCHFV NP 部分蛋白を以下の方法で発現させた. それぞれの部分蛋白に対応する DNA を, 設計したプライマーを用いて PCR 法で増幅し, pGEX-2T ベクター (Amersham Pharmacia Biochemica) の適当なクローニングサイトに組み込み, それぞれのベクターでトランスフォームされた大腸菌 (BL21 株) で部分蛋白を発現させた.

10) ウエスタンブロット (WB) 法. CCHFV NP 部分蛋白を含むサンプルを, SDS-PAGE 法で分離し, 次いでイモビロントランスファーマンブランに吸着させた. 被験血清をそのメンブランと反応させ, 0.05% Tween-20 含有リン酸緩衝液 (T-PBS) で洗浄後 HRPD 標識ヤギ抗種特異的 IgG 抗体 (Zymed) を反応させた. 最後に T-PBS で洗浄後に発色基質と反応させた.

## C. 結果

1) CCHFV-Vero E6 細胞を抗原とした IFA (CCHFV-Vero E6 細胞 IFA) と HeLa/CCHFV-NP 細胞を抗原とした IFA (HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA) の比較: 13 名の CCHF 患者から採取された 13 検体はすべて CCHFV-Vero E6 細胞 IFA で陽性を示し, さらに HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA でも陽性を示した. 一方, 96 名の日本人血清は両 IFA で陰性を示した (表 1). CCHF 患者血清の CCHFV-Vero E6 細胞 IFA による抗体価と HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA による抗体価を