

厚生省科学研究費補助金

平成12年度

新興・再興感染症研究事業

節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及び

ワクチン開発に関する研究（H12-新興-32）

研究報告書

平成13年3月

主任研究者 倉根一郎

（国立感染症研究所）

## 目 次

- 節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学およびワクチン開発に関する研究・・・1  
主任研究者：倉根 一郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
- ダニ媒介性脳炎の診断法と予防法の開発・・・14  
分担研究者：高島郁夫（北海道大学大学院獣医学研究科 公衆衛生学教室）
- 単クローン抗体を用いたデング IgM ELISA 法の開発に関する研究・・・18  
分担研究者：名和 優（埼玉医科大学 微生物学講座）
- 節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学およびワクチン開発に関する研究・・・22  
分担研究者：森田公一（長崎大学熱帯医学研究所 分子構造解析分野）
- 日本における日本脳炎不顕性感染者の割合・・・25  
分担研究者：小西英二（神戸大学医学部 医療基礎学講座）
- デング熱媒介蚊にみられる寄生原虫 *Ascogrenaria* spp. について・・・35  
分担研究者：安居院宣昭（国立感染症研究所 昆虫医科学部）
- 新しい日本脳炎ワクチンの開発：日本脳炎ウイルス抗原の鼻腔粘膜接種に関する研究・・・48  
分担研究者：只野昌之（琉球大学医学部 ウイルス学講座）
- リポソームによる日本脳炎DNAワクチンの免疫誘導促進・・・54  
分担研究者：小西英二（神戸大学医学部 医療基礎学講座）
- 日本脳炎CTLワクチン開発の試み：BALB/cマウスにおける防御CTLエピトープの検索・・・58  
分担研究者：小西英二（神戸大学医学部 医療基礎学講座）
- カニクイザルにおける日本脳炎 DNA ワクチンの有効性に関する研究・・・66  
分担研究者：山田章雄（国立感染症研究所 霊長類センター）
- デング DNA ワクチンの開発：マウスにおける脳内攻撃実験・・・70  
分担研究者：山岡政興（兵庫県立衛生研究所）
- 抗イディオタイプ抗体によるシンドビスウイルスの細胞への感染阻害・・・79  
主任研究者：倉根 一郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

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

節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学およびワクチン開発に関する研究

主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所 ウイルス第1部 部長）

研究要旨：節足動物媒介性ウイルスは数十種がヒトに病気をおこし、新興・再興感染症として、また日本にとっては輸入感染症として非常に重要な位置を占める感染症である。本研究は、節足動物媒介性ウイルス感染症に対する包括的な研究を行うものである。本年度の研究では以下の成果が得られた。（1）節足動物媒介性ウイルスに対する血清病原体診断法の確立については、1）ダニ媒介性脳炎ウイルス北海道株に対して単クローン抗体を作製し、蛍光抗体法を用いた同定法に応用した、2）デング熱血清診断用に単クローン抗体を用いたIgM捕捉酵素抗体測定法（IgM-ELISA）を確立し、従来の方法と比較して高い測定感度を有することを確認した、3）日本脳炎ウイルスとデングウイルスのキメラウイルスを作製し、このウイルスが診断用抗原作製に有用であることを示した。（2）節足動物媒介性ウイルスの疫学については、1）デングウイルス媒介蚊であるヒトスジシマカ幼虫に高率に *Ascogrenaria* sp. が寄生していることを確認した、2）日本においてはヒトが高率に日本脳炎ウイルスに暴露され、防御免疫が維持されている可能性を示した。（3）節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチンの開発については、1）現行日本脳炎ワクチンとアジュバントをマウスに鼻腔内投与することにより血清中和抗体を誘導した、2）日本脳炎 DNA ワクチンをリポソームと筋肉内投与することによりより高い中和抗体を誘導した、3）日本脳炎 DNA ワクチンによりマウスにおいて各蛋白に対するキラーT細胞を誘導した、4）日本脳炎 DNA ワクチンはサルにおいて中和抗体を誘導した、5）デング DNA ワクチンをマウスに免疫することにより特異的抗体を誘導した、6）シンドビスウイルスの細胞への感染を阻害する抗体を作製した。

分担研究者：  
安居院宣昭（国立感染症研究所昆虫医科学部  
部長）  
小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座  
助教授）

高島郁夫（北海道大学大学院獣医学研究科環  
境獣医科学講座公衆衛生学教室 教授）  
只野昌之（琉球大学医学部ウイルス学講座  
助教授）  
名和 優（埼玉医科大学微生物学講座 講師）

森田公一（長崎大学熱帯医学研究所分子構造解析分野 助教授）

山岡正興（兵庫県立衛生研究所 主任研究員）

山田章雄（国立感染症研究所霊長類センターセンター長）

#### A. 研究目的

現在、日本国内で感染しうる節足動物媒介性ウイルスは、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスのみと考えられている。しかし、世界的にみれば節足動物媒介性ウイルスは数十種のウイルスがヒトに感染し病気をおこすことが知られており、デングウイルスや黄熱ウイルスのように海外において毎年多数の感染者が発生し、さらに致死性であるものも多い。近年、海外旅行者の増加に伴い、デング熱等に見られるように海外旅行中に感染し帰国後発症するいわゆる輸入感染症として診断されている症例があるが、診断されずに見逃されている例もあると考えられる。一方、1999年にアメリカ合衆国でみられた西ナイル脳炎のように、過去国内に存在しない節足動物媒介性ウイルス感染症が出現する可能性も存在する。したがって、これら輸入感染症あるいは輸入感染症として国内に侵入する可能性のある多種の節足動物媒介性ウイルスにたいして診断法を確立しておくこと、さらに、これらのウイルス感染症の日本国内における状況を血清、病原体、ベクターの面から把握することが重要である。一方、ワクチンに関しては日本脳炎、黄熱、ダニ媒介性脳炎に対してのワクチンは実用化されているが、現行ワクチンにはない特徴をもつ新形ワクチン開発の意義は大きい。さらに、これ以外の節足動物媒介性ウイルスに対して実用化されているワクチンはなくその開発も重要である。従

って、本研究は以下の3つの目的を有する。

(1) 日本に侵入する可能性のある節足動物媒介性ウイルスに対して、血清診断法と病原体診断法を確立する、(2) 節足動物媒介性ウイルスの国内における感染状況を病原体およびベクターの両面から把握する、(3) 節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチンの開発に向けて、動物実験を含めた基礎的研究を行う。

#### B. 研究方法

(1) 節足動物媒介性ウイルスに対する血清病原体診断法の確立

1) 単クローン抗体の作製：北海道分離ウイルス Oshima 株をホルマリンで不活化し、BALB/c マウスを免疫した。ミエローマ細胞 (SP2/O-Ag1) と免疫マウス脾細胞を常法に従い融合させた。ハイブリドーマからの抗体産生を間接蛍光抗体 (IFA) 法にてスクリーニングし、確立した抗体産生クローンについて各種フラビウイルス株に対する抗体価を、IFA 法、赤血球凝集阻止 (HI) 試験、中和試験において決定した。

2) 単クローン抗体を用いた IgM-ELISA 法の確立：あらかじめ固相に抗ヒト IgM 抗体を被覆しておき、ここへ患者血清を反応させた。ウイルス抗原 (P) と正常非感染抗原 (N) とを別々に加えて、固相に捕捉されたデングウイルス特異的 IgM 抗体と反応させた。デングウイルス特異的 IgM 抗体と反応したウイルス抗原を、酵素標識した単クローン抗体 D1-4G2 により検出する。酵素に対する発色基質を加えて発色させ、吸光度を測定し、デングウイルス抗原および正常非感染抗原との間の吸光度の比 (P/N 比) を算出する。

(2) 節足動物媒介性ウイルスの感染状況：

1) NS1 抗体測定法：平成 11 年度上記研究班の分担研究報告書「日本脳炎ウイルス非構造蛋白 NS1 抗体測定系の確立」に記載した方法にそって行った。

2) ヤブカ幼虫の採取：日本各地の墓地の花立、手水鉢、線香等からピペットを用いて幼虫を焼く 100ml のポリエチレン容器に採取し研究所に持ち帰り解析を行った。

(3) 節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチンの開発

1) プラスミド：pcJEME は、pcDNA3 ベクターに、JEV の prM 及び E 遺伝子を組込んだものである。詳細は平成 9 年度「デングウイルス及び日本脳炎ウイルスに対する新型ワクチンの開発に関する研究」研究班の分担研究報告書「日本脳炎 DNA ワクチンの作製」に記載した。また同遺伝子を pNGVL4a ベクターに挿入して得られた pNJEME の DNA を精製し、ワクチンとして使用した。

2) プラスミド DNA によるマウス免疫：4-8 週齢の雄 BALB/c マウスに、PBS に希釈した精製 DNA を 1 匹あたり 100 $\mu$ g を筋肉内接種することにより、3 回免疫した。

3) サルにおける免疫応答：国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターで育成された年齢 11-20 歳のカニクイザルを用いた。免疫は大腿部筋肉内への筋肉注、あるいはジーンガンを用いての腹部皮内への投与によって行った。中和試験は 90%プラーク減少法によった。

(倫理面への配慮)

動物実験は各研究施設の動物実験委員会による審査を受け承認されてから行った。ヒト血清検体を用いた実験においては個人識別情報はなく検体は完全匿名化して行われた。

## C. 研究結果

(1) 節足動物媒介性ウイルスに対する血清病原体診断法の確立

1) ダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルス北海道株に対する単クローン性抗体の作製：合計 7 種類のクローンを得た。これらはすべてエンベロープ蛋白を認識していた。これらの単クローン性抗体はフラビウイルス属特異的、TBE ウイルス群特異的および TBE ウイルス特異的抗体に分類された。さらに、これらの単クローン性抗体を蛍光抗体法を用いた同定法に応用することができた。また、ロシアイルクーツクにはシベリア型のウイルスが、ハバロフスクとウラジオストックには極東型ウイルスが分布することが判明した。

2) 単クローン抗体を用いたデング IgM-ELISA 法の確立：フラビウイルス特異的モノクローナル抗体 (4G2) を用いたデング IgM-ELISA 法を従来のデング患者血清由来 IgG と比較した。従来の測定方法で IgM 抗体陽性と診断された検体はすべて陽性であった。従来の測定方法で IgM 抗体陰性と診断された血清 34 例のうち 2 例が、新 IgM-ELISA 法で IgM 抗体陽性と診断された。これら 2 例の血清は 2 名のデング様患者より採取されたものであり、1 例は発熱後 4 日、他の 1 例は発熱後 30 日のものであった。4G2 を用いる改良型 IgM-ELISA で IgM 抗体陰性と診断された 32 例の血清検体は、従来のヒト IgG を用いた IgM-ELISA ではすべて陰性であった。以上より新デング IgM-ELISA の有用性が示された。

3) 日本脳炎、デングキメラウイルスの作製：日本脳炎ウイルスにデングウイルス PreM および E 遺伝子を挿入したキメラウイルスを作製した。このウイルスは蚊培養細胞で高い増

殖性を示し、診断用抗原作製に有用であることが示唆された。マウスへの感染性は低かったが、数回の継代で増殖性を獲得した。

(2) 節足動物媒介性ウイルスの感染状況を病原体およびベクターの両面から把握

1) ヒトスジシマカ幼虫に対する寄生虫感染状況：デング熱媒介蚊であるヒトスジシマカの幼虫に寄生する *Ascogrenaria sp.* は、東北地方、関東地方、関西地方、沖縄地方から採取した幼虫において寄生を認めた。さらに、タイ国チェンマイ市で採取した蚊からも *Ascogrenaria sp.* を分離することができた。

2) 日本における日本脳炎不顕性感染状況：NS1に対する抗体測定を行い不顕性感染者の割合を推定した。NS1抗体測定の意義は、不活化ワクチン接種者に存在する抗体（構造蛋白に対する抗体のみ）と感染により誘導される抗体を区別することにある。NS1抗体陽性率が全体で15.7%であった。日本において、ヒト集団はJEVの暴露を自然界から高率に受けていることが類推された。

(3) 節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチンの開発

1) ワクチンの鼻腔内投与による免疫：現行日本脳炎ワクチンとアジュバントをマウスに鼻腔内投与することにより血清中和抗体を誘導した。日本脳炎ワクチン 400ng を鼻腔内投与することにより中和抗体を誘導することができ、新しい免疫法の可能性が示唆された。

2) リポソームによる DNA ワクチンの免疫増強：筋肉内に 2 週間隔で 3 回投与した系において、10ug の DNA ワクチンの誘導する中和抗体は DNA 単独では検出されなかった (<1:10) が、リポソームと調合して投与した群では 1:80 以上に上昇した。また、経鼻接種の系において、20ug の DNA を単独で 8 回投

与した群には攻撃に対する防御は認められなかったが、リポソームと共に投与した群では部分防御が認められた。以上の結果は、リポソームが DNA ワクチンの免疫誘導能を増強する効果をもつことを示す。

3) DNA ワクチンによって誘導されるキラー T 細胞の解析：マウスユビキチン遺伝子が共発現するように設計したベクタープラスミドに、各領域の遺伝子を組み込み作製したプラスミド DNA を免疫原として、100ug のドーズで 3 回筋肉内投与して免疫したマウスを実験に用いた。脾臓細胞を JEV で刺激し CTL 試験した結果、CTL の誘導は NS1、NS2b 及び NS5 免疫マウスに認められたが、NS4a 及び NS4b 免疫マウスには認められなかった。

4) デング DNA ワクチンの開発：PreM および E 遺伝子、NS3 遺伝子、NS5 遺伝子のそれぞれを含むデング DNA ワクチンをマウスに免疫することにより特異的抗体を誘導した。しかし、この抗体は致死感染に対する防御には結びつかなかった。

5) サルにおける DNA ワクチンの免疫誘導能：参照ワクチンを接種したカニクイザルにおいては良好な抗体産生が認められた。同様のスケジュールで DNA ワクチンをカニクイザルに免疫し、抗体の上昇を測定したところ中和抗体の産生が認められた。これらのカニクイザルに北京株を経鼻接種したところ表に示したように 2 頭のサルが斃死したが、他は生残した。しかし、DNA ワクチン接種と感染防御との関連は明確ではなかった。

6) 節足動物媒介性ウイルスに対する新治療法の開発：シンドビスウイルス(SIN)の感染を防御するため、SIN 中和能を有するマウス単クローン抗体(MAb49)を抗原として抗イディオタイプ抗体 ( $\alpha$ -Ids) を作製し、ニワトリ胎

児線維芽細胞 (CEF)、BHK 細胞および COS 細胞 へのウイルス吸着およびプラーク形成阻害を検討した。 $\alpha$ -Ids として 4 クローンが得られ、これらのクローンのあるものはプラーク形成阻害がみられた。 $\alpha$ -Ids はシンドビスウイルスの細胞への感染を阻害する有用な治療薬となりうる可能性が示唆された。

#### D. 考察

本研究全体の計画は以下の通りであった。日本国内に存在する、あるいは海外から侵入する可能性のある節足動物媒介性ウイルスに対して、血清診断および病原体診断法を確立する。一方、これらのウイルスを媒介するベクターとなりうる節足動物 (蚊、ダニ) の国内における生息状況を調査する。次に、上記診断方法を用いて、節足動物媒介性ウイルスの国内における侵淫状況を人およびベクターの両面から把握する。ワクチン開発については、まず節足動物媒介性ウイルスに対する防御免疫を解析する。その結果に基づき、各ウイルスに対する防御エピトープを含む新型ワクチンを開発する。さらに、これらの新型ワクチンが対象とするウイルスに対して防御免疫を誘導することを、動物実験により確認する。

この研究計画に従い、本年度は以下のように研究を実施した。節足動物媒介性ウイルスに対する血清および病原体診断法の確立においては、1) ダニ媒介性脳炎ウイルス北海道株に対して 7 種類の単クローン抗体を作製しダニ媒介性脳炎ウイルス群及び株特異性を解析した。さらに、これらの単クローン抗体を蛍光抗体法を用いたウイルス同定法に使用した。2) デング熱血清診断用に単クローン抗体を用いた IgM 捕捉酵素抗体測定法 (IgM-

ELISA) を確立した。3) 日本脳炎ウイルスとデングウイルスのキメラウイルスを作製し、新しい診断抗原の開発に資した。節足動物媒介性ウイルスおよびベクターの国内における疫学に関しては、デングウイルス媒介蚊であるヒトスジシマカ幼虫への寄生原虫の感染を調査し、寄生原虫の疾病対策への応用への基礎データを得た。また、日本脳炎非構造蛋白に対する抗体の分布から、日本人の日本脳炎ウイルスに対する暴露に関する基礎データを得た。節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチンの開発に関しては、1) 日本脳炎 DNA ワクチンの筋肉内投与における免疫原性の増強法、および日本脳炎 DNA ワクチンにより誘導される防御免疫応答の基礎的データを得た。さらに、2) 日本脳炎 DNA ワクチンがマウスのみでなく、サルにおいても中和抗体を誘導することを確認した。3) 現行日本脳炎ワクチンとアジュバントをマウスに鼻腔内投与することにより血清中和抗体を誘導することから、新たな投与方法が可能であることを示した。一方、4) デング DNA ワクチンについてもマウスにおける特異的抗体を誘導能を示した。次年度は他の節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、ダニを含めベクターサーベイ、新型ワクチンの感染防御能の確認等の研究を行う予定である。

ヒトスジシマカと *Ascogrenaria* sp. の関係においては、ヒトスジシマカ由来のオーシストに宿主特異性が高い傾向が認められた。今後、生物学的防除法への *Ascogrenaria* sp. の利用と遺伝子ベクターとして疾病対策に利用する可能性も考慮される。本年度の研究結果により、節足動物媒介性ウイルスの国内における血清診断法の向上が期待される。また、ベクターを含めた疫学結果は日本脳炎の防御、

ベクター側からのデング熱の防止対策に活用される。ワクチン開発においては、日本脳炎、デング熱に対する新型ワクチン開発とワクチンの新しい投与法の開発が進んでいる。ワクチン開発に関する本研究成果は他の節足動物媒介性ウイルスに対するワクチン開発にも応用しうる。

#### E. 結論

節足動物媒介性ウイルスに対する血清病原体診断法として、ダニ媒介性脳炎ウイルス同定法の確立、デングウイルス感染症の血清診断用に単クローン抗体を用いた新型IgM捕捉酵素抗体測定法を確立した。また、日本脳炎、デングキメラウイルスを作製し、診断用抗原作製における有用性を示した。節足動物媒介性ウイルスの疫学については、ヒトスジシマカ幼虫に高率に *Ascogrenaria* sp. が寄生していることと、ヒトが高率に日本脳炎ウイルスに暴露されている可能性が示唆された。節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチンの開発については、ワクチン鼻腔内投与、新型リポソームによる免疫増強を確認した。また、日本脳炎 DNA ワクチンはサルにおける免疫誘導能も確認した。さらに、新たにデング DNA ワクチンも作製した。

#### F. 健康危機管理情報

アジアにおいてはデング熱・デング出血熱は数年の周期で大流行を繰り返す傾向がある。1997-1998年の前回の流行から3年目にあたり警戒が必要である。また、日本にはヒトスジシマカが存在することも考慮しておくべきである。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kurane, I., and Takasaki, T. : Immunogenicity and protective efficacy of the current inactivated Japanese encephalitis vaccine against different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine*. 18 (Supplement 2):33-35, 2000

Kurane, I., Takasaki, T., and Yamada K.: Recent topics of flavivirus infections in Japan : Increase of imported dengue cases and isolation of tick-borne encephalitis virus. *Emerging Infectious Diseases*. 6:569-571, 2000

Nawa, M., Yamada, K., Takasaki, T., Akatsuka, T., and Kurane, I. : Serotype-cross-reactive IgM responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assays. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 7:774-777, 2000

Konishi, E., Kurane, I., and Mason, P.W.: Immune response to traditional and genetically engineered Japanese encephalitis vaccines. *Recent Research Developments in Virology*. 2 : 1-21. 2000

Nawa, M., Takasaki, T., Yamada, K., Akatsuka, T., and Kurane, I. : Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection



- antibody. *Journal of Virological Methods*. 92:65-70, 2001
- Nihei, N., and Kobayashi, M.: The probable expansion of malaria infested areas in East and Southeast Asia as a result of global warming. *国際保健医療* 15:3-13,2000.
- Sasaki, T., Kobayashi, M., Agui, N.: Epidemiological potential of excretion and regurgitation by *Musca domestica* (Diptera:Muscidae) in the dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 to food. *J. Med. Entomol.* 37:945-949, 2000.
- Konishi E., Fujii A. and Peter W. Mason: Generation and characterization of a mammalian cell line continuously expressing Japanese encephalitis virus subviral particles. *Journal of Virology* 75, 2204-2212 (2001).
- Komoro, K., Hayasaka, D., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I. : Characterization of Monoclonal antibodies against Hokkaido strain tick-borne encephalitis virus. *Microbiol. Immunol.*, 44:535-536, 2000
- Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Araki, K., Chayama, K., Kumada, H., Ogino, M., Ebihara, H., Murphy, M., Mizutani, T., Takashima, I., Arikawa, Detection of hantaviral antibodies among patients with hepatitis of unknown etiology in Japan J. : *Microbiol. Immunol.*, 44: 357-362, 2000
- Mizutani, T., Inagaki, H., Tada, M., Hayasaka, D., Murphy, M., Fujiwara, T., Hamada, J., Kariwa, H., Takashima, I. : The Mechanism of actinomycin D-mediated increase of Borna disease virus (BDV) RNA in cells persistently infected by BDV. *Microbiol. Immunol.*, 44: 597-603, 2000
- Murphy, M. E., Kariwa, H., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I. : In vitro antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. *Arch. Virol.*, 145: 1571-1582, 2000
- 倉根一郎：日本脳炎ウイルスに対する特異的免疫応答。 *臨床と微生物* 127：63-66, 2000
- 倉根一郎：遺伝子組み換えワクチン。 *日本医師会雑誌* 124(9)：115, 2000.
- 二瓶直子、小林睦生：地理情報システムを利用した感染症分布の解析。 *感染症* 30,1-12,2000.
- 小林睦生：感染症媒介動物—とくに昆虫の研究の現状。 *総合臨床* 50:431-432,2000.
- 高島郁夫：ダニ媒介性脳炎。 *化学療法の領域* , 16：572-577 , 2000
2. 学会発表
- Konishi E., Yamaoka M., Kurane I. and Mason P. W.: Japanese encephalitis DNA

vaccine candidates expressing pre-membrane and envelope genes induce virus-specific memory B cells and long-lasting antibodies in swine. The 34th Joint Working Conference of the Japan-US Cooperative Medical Science Program Viral Diseases Panel, Inuyama (2000).

Konishi E., Fujii A. and Peter W. Mason: Generation and characterization of a mammalian cell line continuously expressing Japanese encephalitis virus subviral particles. The 34th meeting of the Japan-US Cooperative Medical Science Program Viral Diseases Panel, Inuyama (2000).

Konishi E., Fujii A. and Peter W. Mason: Development of subunit vaccines for Japanese encephalitis and dengue. International Seminar on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Nagasaki (2000).

Konishi E.: Development of DNA and subunit vaccines for Japanese encephalitis. The 6th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Philippines (2001).

Takasaki, T. and Kurane, I.: Epidemiological features of Japanese encephalitis in Japan and development of a new particle agglutination assay system for sero-diagnosis. 6th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the

Pacific Rim. Manila, Philippines. January 13-15, 2001.

Yamada, K., Takasaki, T., Hamada, A., Okuzawa, E., Nawa, M. and Kurane, I. "Rate of seroconversion for dengue viruses among Japanese who stayed in tropical areas for extended periods. 第15回日本国際保健医療学会、平成12年8月、長崎県

早坂大輔、苺和宏明、水谷哲也、高島郁夫：極東およびシベリア地域から分離されたダニ媒介性脳炎ウイルス型の比較：第129回日本獣医学会、つくば（2000.4）

後藤明子、早坂大輔、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス Oshima 5-10 株の遺伝子塩基配列決定と他のダニ媒介性ウイルスとの比較検討：第129回日本獣医学会、つくば（2000.4）

前田顕司、苺和宏明、Murphy Michael E., 吉松組子、有川二郎、高島郁夫：極東ロシアハバロフスクの野生げっ歯類におけるハンタウイルスの抗体調査と遺伝子塩基配列の解読：第129回日本獣医学会、つくば（2000.4）

早坂大輔、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：極東およびシベリア地域に分布するダニ媒介性脳炎ウイルスの比較：第48回日本ウイルス学会総会、津（2000.10）

有川二郎、吉松組子、苺和宏明、荒木幸一、荻野倫子、海老原秀喜、Lee Byoung-Hee、高島郁夫、奥村敦、深澤昌史、六反田亮：我が国の人におけるハンタウイルス抗体保有調査

(北歐型ハンタウイルスに対する抗体陽性例の発見)：第 48 回ウイルス学会総会、津 (2000 . 10)

荻和宏明、前田顕司、Michal E. Murphy, Kumari Lokugamage, 崔百忠、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：極東ロシアハバロフスクの野生げっ歯類におけるハンタウイルスの抗体調査と遺伝子学的解析：第 48 回日本ウイルス学会総会、津 (2000 . 10)

網代直子、奴久妻智代子、倉根一郎、小西英二：日本脳炎ウイルスに対する防御CTLエピトープの検索。第48回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2000)。

小西英二、藤井敦子：日本脳炎ウイルス非構造蛋白NS1の役割—哺乳類細胞と蚊細胞から放出されるウイルス粒子からのアプローチ。第48回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2000)。

藤井敦子、小西英二：デングウイルス細胞外ウイルス様粒子を産生する細胞クローンの樹立。第48回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2000)。

高崎智彦、倉根一郎：西ナイル脳炎の実験室診断：日本脳炎との鑑別。P.50 第5回日本神経感染症研究会。名古屋市 July14-15, 2000.

島袋勲、只野昌之、馬紹平、岸本亜耶乃、富真弘、佐藤良也、Roy Curtiss III、清野宏、倉根一郎、新川武：組換えサルモネラ菌によるミュータントコレラトキシンの発現及び分

泌：感染症に対する「飲むワクチン」の開発を目指して。p.129 第41回日本熱帯医学会大会。東京都 November 11-12, 2000.

山田堅一郎、高崎智彦、名和優、倉根一郎：デングウイルス感染診断キットの評価：その有用性と問題点。p.130 第41回日本熱帯医学会大会。東京都 November 11-12, 2000.

只野昌之、新川武、馬紹平、加根村和美、富真弘、岸本亜耶乃、松本安喜、佐藤茂俊、倉根一郎、佐藤良也、福永利彦：日本脳炎ウイルスE蛋白／CTBサブユニット融合蛋白の発現と経粘膜免疫の試み：食べる日本脳炎ワクチンの開発をめざして。p.137 第41回日本熱帯医学会大会。東京都 November 11-12, 2000..

中山幹男、松永泰子、山田堅一郎、矢部貞夫、新井陽子、森本金次郎、高崎智彦、倉根一郎：Vero 細胞を用いた日本脳炎中和抗体測定法：CE 細胞法との比較。第1回抗体測定研究会。東京都 January17, 2001

高崎智彦、原田誠、山田堅一郎、新井陽子、中山幹男、倉根一郎：西ナイル脳炎の実験室診断：日本脳炎との鑑別。第3回日本検疫医学会学術大会。東京都 平成13年2月14日

山田堅一郎、高崎智彦、名和優、倉根一郎「デングウイルス感染診断キットの評価：その有用性と問題点」熱帯医学会大会、平成12年11月、東京都

山田堅一郎、高崎智彦、名和優、武田昭、

倉根一郎「自己免疫疾患患者における抗 Dengue IgM 抗体偽陽性例について」第 35 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、平成 12 年 6 月、沖縄県

田部井由紀子、吉田靖子、長谷川道弥、長島真美。平田一郎、小久保弥太郎、名和 優、山田堅一郎、高崎智彦、倉根一郎「Dengue ウイルス感染症の実験室内診断-種々の測定法による抗体価の検討-」第 35 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、平成 12 年 6 月、沖縄県

名和 優、赤塚俊隆、山田堅一郎、高崎智彦、倉根一郎「モノクローナル抗体を用いた Dengue IgM-ELISA の構築と、血清型別診断への応用」第 35 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、平成 12 年 6 月、沖縄県

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

小西英二、倉根一郎

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kurane, I., and Takasaki, T.	Immunogenicity and protective efficacy of the current inactivated Japanese encephalitis vaccine against different Japanese encephalitis virus strains.	Vaccine	18	33-35	2000
Kurane, I., Takasaki, T., and Yamada K.	Recent topics of flavivirus infections in Japan : Increase of imported dengue cases and isolation of tick-borne encephalitis virus.	Emerging Infectious Diseases	6	569-571	2000
Nawa, M., Yamada, K., Takasaki, T., Akatsuka, T., and Kurane, I.	Serotype-cross-reactive IgM responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assays	Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.	7	774-777	2000
Konishi, E., Kurane, I., and Mason, P.W.	Immune response to traditional and genetically engineered Japanese encephalitis vaccines.	Recent Research Developments in Virology	2	1-21	2000
Nawa, M., Takasaki, T., Yamada, K., Akatsuka, T., and Kurane, I.	Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody.	Journal of Virological Methods	92	65-70	2001
Nihei, N., and Kobayashi, M.	The probable expansion of malaria infested areas in East and Southeast Asia as a result of global warming.	国際保健医療	15	3-13	2000
Sasaki, T., Kobayashi, M., and Agui, N.	Epidemiological potential of excretion and regurgitation by <i>Musca domestica</i> (Diptera: Muscidae) in the dissemination of <i>Escherichia</i>	J. Med. Entomol.	37	945-949	2000

	coli O157:H7 to food				
Konishi E., Fujii A. and Peter W. Mason	Generation and characterization of a mammalian cell line continuously expressing Japanese encephalitis virus subviral particles.	Journal of Virology	75	2204-2212	2001
Komoro, K., Hayasaka, D., Mizutani, T., Kariwa, H., and Takashima, I.	Characterization of Monoclonal antibodies against Hokkaido strain tick-borne encephalitis virus.	Microbiol. Immunol.	44	535-536	2000
Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Araki, K., Chayama, K., Kumada, H., Ogino, M., Ebihara, H., Murphy, M., Mizutani, T., Takashima, I., and Arikawa, J.	Detection of hantaviral antibodies among patients with hepatitis of unknown etiology in Japan.	Microbiol. Immunol.	44	357-362	2000
Mizutani, T., Inagaki, H., Tada, M., Hayasaka, D., Murphy, M., Fujiwara, T., Hamada, J., Kariwa, H., and Takashima, I.	The Mechanism of actinomycin D-mediated increase of Borna disease virus (BDV) RNA in cells persistently infected by BDV.	Microbiol. Immunol.	44	597-603	2000
Murphy, M. E., Kariwa, H., Mizutani, T., Yoshimatsu, K.,	In vitro antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. Arch, Virol.	Arch Virol	145	1571-1582	2000

<b>Arikawa, J., and Takashima, I.</b>					
倉根一郎	日本脳炎ウイルスに対する特異的免疫応答.	臨床と微生物	127	63-66	2000
倉根一郎	遺伝子組み換えワクチン.	日本医師会雑誌	124	115	2000
二瓶直子、小林睦生	地理情報システムを利用した感染症分布の解析.	感染症	30	1-12	2000
小林睦生	感染症媒介動物—とくに昆虫の研究の現状.	総合臨床	50	431-432	2000
高島郁夫	ダニ媒介性脳炎.	化学療法の領域	16	572-577	2000

# 厚生省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

## 分担研究報告書

### ダニ媒介性脳炎の診断法と予防法の開発

分担研究者 高島郁夫 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

#### 研究要旨

ダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルス北海道株に対して単クローン性抗体を作製し、合計7種類の抗体産生クローンを得た。これらはすべてウイルスエンベロープ蛋白を認識していることが判った。これらの単クローン性抗体はフラビウイルス属特異的、TBEウイルス群特異的およびTBEウイルス特異的抗体に分類された。これらの単クローン性抗体を蛍光抗体法を用いた同定法に応用した。ロシアのハバロフスク地区、ウラジオストック地区およびイルクーツク地区でTBEウイルスを分離して性状解析を行った。イルクーツクにはシベリア型のウイルスが、ハバロフスクとウラジオストックには極東型ウイルスが分布することが判明した。イルクーツクのウイルス株は他のTBEウイルス株と比べ、抗原性が少し異なり、さらに毒力が強いことが判明した。

#### A. 研究目的

我々の1999年までの研究により、ダニ媒介性脳炎(TBE)の流行巣が北海道の特定地域に分布していることが判明した。さらに道内の渡島地区において1995年と1996年にTBEウイルスがおとりのイヌ、マダニおよび野ネズミから分離された。これらの北海道のTBEウイルスとハバロフスクのウイルスについて系統樹解析を行ったところ、北海道株は260～430年前に分岐したと推定された。

そこで本研究では、TBEウイルス北海道株に対する単クローン性抗体を作出し、分離ウイルスの同定への応用を試みた。さらにTBE流行地のロシアで複数の地区からウイルス株を分離し、遺伝子解析によるウイルス型の分類、単クローン性抗体による抗原性の解析ならびにマウスモデルにおける毒力の解析を実施した。これらの成績を日本およびロシアにおけるTBEの診断と予防に役立てる。

#### B. 研究方法

北海道分離ウイルスOshima株をホルマリンで不活化し、BALB/cマウスを免疫した。ミエローマ細胞(SP2/O-Ag1)と免疫マウス脾細胞を常法に従い融合させた。ハイブリドーマからの抗体産生を間接蛍光抗体(IFA)法にてスクリーニングした。確立した抗体産生クローンについて各種フラビウイルス株に対する抗体価を、IFA法、赤血球凝集阻止(HI)試験、中和試験において決定し

た。

1999年にロシアのハバロフスク地区、ウラジオストック地区およびイルクーツク地区においてマダニ類(シュルツェマダニ)を採集し哺乳マウス脳内接種法によりウイルス分離を実施した。分離ウイルスの抗原性を単クローン性抗体で解析するとともに、マウスモデルにおいて毒力を比較した。さらにエンベロープ(E)蛋白遺伝子の塩基配列を決定し、系統樹解析によりウイルス型を同定した。

ウイルスを用いた実験は封じ込めレベルP-3の施設において実施した。また動物実験は封じ込めレベルP-3の施設において北海道大学医学研究科動物実験委員会の承認を得て実施した。

#### C. 研究結果

ホルマリン不活化TBEウイルスOshima株に対して合計7種類の抗体産生クローンを得た。これらの単クローン性抗体はウェスタンブロット法により、E蛋白を認識していることが判明した。さらに3種の抗体はOshima株のE蛋白質のリニアールエピトープを認識し、残りの4種はE蛋白質の高次構造を認識していることが判った。さらに各種フラビウイルスへの反応性から、これらの単クローン性抗体はフラビウイルス属特異的、TBEウイルス群特異的、およびTBEウイルス特異的抗体に分類された。これらの単クローン性抗体をIFA法に応用してTBEウイルス分離株を同定する手法を開発した。



1999年にハバロフスク地区、ウラジオストック地区およびイルクーツク地区でシュルツェマダニから分離したTBEウイルスの系統樹解析を行った。ハバロフスク地区とウラジオストック地区のTBEウイルスは極東型に、またイルクーツク地区のウイルスはシベリア型に分類された。単クローン性抗体による解析から、イルクーツク分離株は他のTBEウイルス株に比べ抗原性が少し異なっていた。E蛋白遺伝子のアミノ酸配列比較により、イルクーツク株はアミノ酸234番に一個の置換(Q又はH)が見られ、これがシベリア型TBEウイルスの

“signature”と考えられた。イルクーツク株はTBE極東型ウイルス株に比べ同等かまたは少し高い毒力を保有していた。調べられたすべてのウイルス株は3'-NCR領域の塩基配列の長さがほぼ同じであった。これはTBEウイルスの3'-NCRの長さがウイルス株により異なるとする以前の報告と対立する。この結果はこの地域のTBEウイルス株では3'-NCRの塩基配列の長さは均一であり、媒介マダニ類とげっ歯類宿主の細胞での増殖に必要であることを示している。

#### D. 考察

フラビウイルスE蛋白質上には種々の反応特異性を有する抗原部位が知られている。これらの抗原部位は単クローン性抗体に対する反応性により解析されている。ダニ媒介性フラビウイルスではフラビウイルスに共通、TBEウイルス群に特異的、TBEウイルス型特異的、そしてウイルス株特異的な抗原部位が報告されている。

フラビウイルスの抗体検査法としてIFA法、HI試験および中和試験が知られている。これらの検査法における各種フラビウイルスとの反応パターンから、得られた7種の抗体の特異性を決定した。これらの単クローン性抗体は、フラビウイルス特異的、TBEウイルス群特異的およびTBEウイルス特異的なものに分けることができた。ウイルス株を同定するには操作が比較的簡便なIFA法が適当と考えられる。上記の異なる反応特異性を有する単クローン性抗体とIFA法を組み合わせたウイルス同定法が確立された。今後、今回確立された単クローン性抗体を固相化抗体とし、さらに遺伝子工学的的手法により作製したウイルス抗原を用いた抗体検出用のELISAを開発する必

要がある。

これまでTBEウイルスの型は極東型とヨーロッパ型の2型であったが、近年第3の型としてシベリア型の存在が報告された。そこでTBE流行地のロシアにおけるウイルス型別と分布について調査した。その結果イルクーツクのTBEウイルス株はシベリア型に、またハバロフスクとウラジオストックのウイルス株は極東型に分類された。イルクーツクのシベリア型TBEウイルスは他の株に比べ毒力が強く抗原性が少し異なることが判明した。このため今後シベリア型のTBEウイルスに対して市販されているヨーロッパ型TBEウイルスワクチンの効果を評価し予防対策を構築しなければならない。

#### E. 結論

北海道と極東ロシアのダニ媒介ウイルスを同定できる単クローン性抗体が作出された。これらの単クローン性抗体は今後分離したウイルスの同定に実用可能であった。さらにロシアのイルクーツク地区にはTBEウイルスの第3型のシベリア型ウイルスが分布していることが判明した。今後市販のヨーロッパ型TBEウイルスワクチンのシベリア型TBEウイルスに対する効果を調べる必要がある。

#### F. 健康危険情報

本研究は「大学等における研究用微生物安全管理について」の安全管理および健康管理の項目に従って実施した。

#### G. 研究発表

- 1) Hayasaka, D., Ivanov, L., Leonova, G. N., Goto, A., yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I. : Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses in Siberia and far-east Asian region. J. Gen. Virol., 2001 (in press)
- 2) Komoro, K., Hayasaka, D., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I. : Characterization of Monoclonal antibodies against Hokkaido strain tick-borne encephalitis virus. Microbiol. Immunol., 44:535-536, 2000
- 3) 高島郁夫：ダニ媒介性脳炎．化学療法の領域，16：572-577，2000
- 4) Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Araki, K., Chayama, K., Kumada, H., Ogino, M., Ebihara, H.,

Murphy, M., Mizutani, T., Takashima, I., Arikawa, Detection of hantavirul antibodies among patients with hepatitis of unknown etiology in Japan J. : Microbiol. Immunol., 44: 357-362, 2000

5) Mizutani, T., Inagaki, H., Tada, M., Hayasaka, D., Murphy, M., Fujiwara, T., Hamada, J., Kariwa, H., Takashima, I. : The Mechanism of actinomycin D-mediated increase of Borna disease virus (BDV) RNA in cells persistently infected by BDV. Microbiol. Immunol., 44: 597-603, 2000

6) Murphy, M. E., Kariwa, H., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I. : In vitro antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. Arch, Virol., 145: 1571-1582, 2000

#### H. 学会発表

1) 早坂大輔、荻和宏明、水谷哲也、高島郁夫：極東およびシベリア地域から分離さ

れたダニ媒介性脳炎ウイルス型の比較：第129回日本獣医学会、つくば(2000.4)

2) 後藤明子、早坂大輔、水谷哲也、荻和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス Oshima 5-10 株の遺伝子全塩基配列決定と他のダニ媒介性ウイルスとの比較検討：第129回日本獣医学会、つくば(2000.4)

3) 前田顕司、荻和宏明、Murphy Michael E., 吉松組子、有川二郎、高島郁夫：極東ロシアハバロフスクの野生げっ歯類におけるハンタウイルスの抗体調査と遺伝子塩基配列の解読：第129回日本獣医学会、つくば(2000.4)

4) 早坂大輔、水谷哲也、荻和宏明、高島郁夫：極東およびシベリア地域に分布するダニ媒介性脳炎ウイルスの比較：第48回日本ウイルス学会総会、津(2000.10)

5) 有川二郎、吉松組子、荻和宏明、荒木幸一、荻野倫子、海老原秀喜、Lee Byoung-Hee, 高島郁夫、奥村敦、深澤昌史、六反田亮：我が国の人におけるハンタウイルス抗体保有調査(北欧型ハンタウイルスに対する抗体陽性例の発見)：第48回ウイルス学会総会、津(2000.10)

6) 荻和宏明、前田顕司、Michal E. Murphy, Kumari Lokugamage, 崔百忠、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：極東ロシアハバロフスクの野生げっ歯類におけるハンタウイルスの抗体調査と遺伝子学的解析：第48回日本ウイルス学会総会、津(2000.10)

I. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻 号	ページ	出版年
Hayasaka, D. et al.	1) Distribution characterization 2) of tick-borne encephalitis viruses 3) in Siberia and far-east Asiatic region.	J.Gen. Virol.	(in press)		2001
Komoro, K. et al.	Characterization of monoclonal antibodies against Hokkaido strain tick-borne encephalitis virus.	Microbiol. Immunol.	44	535-536,	2000
高島郁夫	タニ媒介性脳炎	化学療法 の領域	16	572-577	2000
Kariwa, H. et al.	Detection of hantaviral antibodies among patients with hepatitis of unknown etiology in Japan.	Microbiol. Immunol	44	357-362	2000
Mizutani, T. et al.	The Mechanism of actinomycin D-mediated increase of Borna disease virus(BDV)RNA in cells persistently infected by BDV.	Microbiol. Immunol.	44	597-603	2000
Murphy, M. E. et al.	In vitro antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus.	Arch. Virol.	145	1572- 1582	2000

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

単クローン抗体を用いたデング IgM-ELISA 法の開発に関する研究

分担研究者 名和 優（埼玉医科大学微生物学教室）

研究要旨 熱帯および亜熱帯地域に流行し、蚊の吸血によって媒介されるデング熱の日本国内での発症を診断する目的で、先に血清学的診断法としてデング流行地で得られた患者血清由来 IgG を酵素標識して作成された検出抗体を用いて、IgM 抗体捕捉酵素抗体測定法 (IgM-ELISA) を確立した。今回、ヒト由来 IgG を検査試液として用いることの問題点に鑑み、マウスモノクローナル抗体を酵素標識して作成した改良型 IgM-ELISA を確立した。改良型 IgM-ELISA は従来の方法と比較して、測定感度が向上した。

A. 研究目的

日本人の海外への渡航機会の増加にともない、熱帯・亜熱帯地域での滞在中に蚊の吸血によって媒介されるデング熱に感染する機会が生じる。帰国後日本国内でデング熱を発症した際に、確定診断可能な血清診断方法の確立を目的とした。

B. 研究方法

診断用デングウイルス抗原の作成は、日本国内におけるバイオハザードの基準にのっとり、クラス II 実験設備内にておこなった。ウイルスはベータプロピオラクトンにて不活化して実験に供した。

使用した血清は、デング熱流行地域へ旅行後、日本国内でデング様疾患と診断された 47 名の日本人より採取された 69

件の血清であった。これらは、国立感染症研究所ウイルス 1 部へデング熱の検査依頼目的で送付された検査後の検体であった。

検体は、先に確立された酵素標識ヒト IgG を検出抗体として用いる IgM-ELISA で、デングウイルス特異的 IgM 抗体を測定されたものであった。

今回新たに IgM-ELISA で使用する検出抗体は、米国 ATCC (American Type Culture Collection) よりフラビウイルス共通エピトープに対するモノクローナル抗体(D1-4G2)産生ハイブリドーマを輸入し、IgG を精製して用いた。

IgM-ELISA に使用する器具・試薬類は、日本国内で市販されているものを購入した。