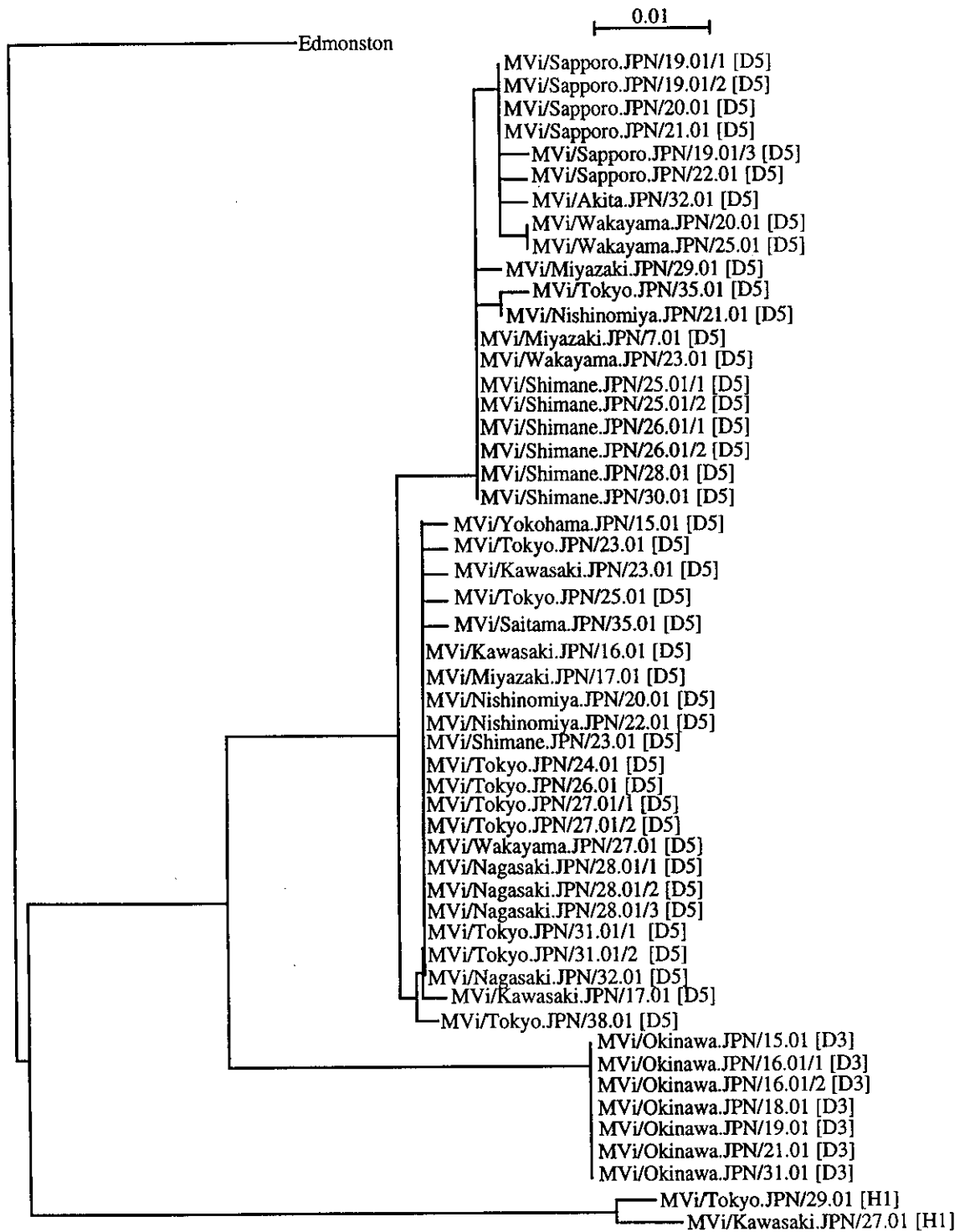
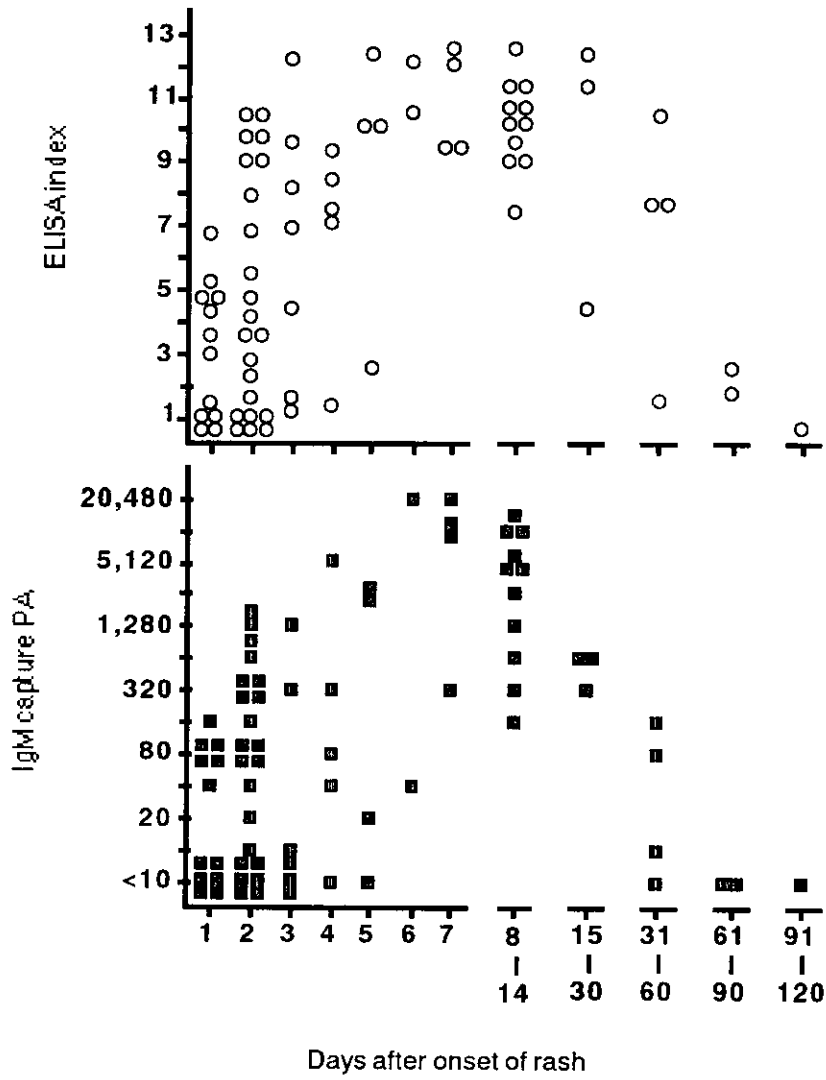


分離ウイルスの遺伝子型2001年 (15週 4/9/01~38週 9/23/01)



Comparison of IgM capture PA and ELISA against measles antibody titers



11. E型肝炎診断法の開発に関する研究

分担研究者 宮村 達男 国立感染症研究所ウイルス第二部長
協力研究者 武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
李 天成 国立感染症研究所ウイルス第二部 協力研究員

研究要旨 E型肝炎ウイルスの組換え中空粒子を発現し、これを抗原に用いた抗体検出EIAを構築しE型肝炎の血清診断法を確立した。また、中空粒子を免疫して高力価血清を作製し、抗原捕獲EIAを構築し、抗原検出法を確立した。血清疫学調査からE型肝炎が少なからずわが国にも存在することが示唆された。依頼検査で試験した非A非B非C型急性肝炎の25%がE型肝炎であった。そのうちの一例は外国渡航歴が全く無く、わが国にもE型肝炎が土着していることが示唆された。

A. 研究目的

A型、B型およびC型肝炎は、病原体の発見以来、疾患の重篤度とわが国における広範な侵淫度を背景に、基礎および応用研究の急速な進歩に基づいた確固たる診断法が確立されてきた。患者発生や流行状況が正確に把握され、A型、B型肝炎では予防のためのワクチンも既に開発されている。これに対し、E型肝炎は開発途上国の肝炎であり、わが国には無縁の肝炎であるとの認識が一般的であり重要視されてはこなかった。原因のひとつには信頼にたる確定診断法がなかったため、たとえE型肝炎であっても診断ができず、非A非B非C型肝炎として片付けられてきたことがあげられる。しかしながら、わが国においても疫学状況からE型肝炎が強く疑われる非A非B非C型肝炎による患者発生が近年増大してきた。E型肝炎の病因であるE型肝炎ウイルス（HEV）は他の肝炎ウイルス同様、いまだ培養が可能な細胞培養系は確立されていない。しかしながら、我々は組換えバキュロウイルスを用いた発現系でウイルス様中空粒子の作出に成功し、これを抗原に用いた血清診断法によってE型肝炎の実態を徐々に明らかにしてきた。その結果、これまで国内には存在せず、ほとんどが輸入感染例と考えられてきたE型肝炎が少なからずわが国にも存在することが示唆された。本研究では、E型肝炎の血

清疫学的調査・研究を広範に展開してHEV感染の実態を把握し、特に、わが国における非A非B非C型肝炎においてE型肝炎が占める割合を明らかにすること、わが国におけるE型肝炎の発生状況を正確に把握すること、そのための確固たる診断法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1) 組換えHEV中空粒子

HEVはエンベロープを持たない直径約30nmの小型の球形ウイルスである。ゲノムは約7.2kbのプラス一本鎖RNAで、3'末端にポリアデニル酸をもつ。HEV感染カニクイザルの胆汁からRNAを抽出し、RT-PCR法で構造蛋白領域をコードするORF2全領域を増幅した。ORF2のN末端から111アミノ酸を欠失させたフラグメントをトランスファーベクターpVL1393にクローニングし、組換えバキュロウイルスを作出した。ブランククローニングで純化後、昆虫細胞Tn5細胞を感染させた。およそ7日間培養し、上清に遊離してきた浮上密度1.285g/cm³、直径約23-24nmのウイルス様中空粒子（Virus-like particles, VLPs）を塩化セシウム平衡密

度勾配遠心で精製し、純度の高い粒子を得た。クリオ電顕とコンピュータによる画像解析で三次構造を推定した。

2) E型肝炎抗体EIA

精製したHEV VLPsを抗原として96マイクロプレートにコーティングした。患者あるいは健康人血清をこのマイクロプレート上で2倍段階希釈し、パーオキシダーゼをラベルした抗ヒトIgM、および抗ヒトIgGを反応させた。基質OPDの吸光度を測定し、カットオフ値を示す最高希釈倍数の逆数を血清抗体価とした。

3) E型肝炎ウイルス抗原捕獲EIA

精製したHEV VLPsを抗原に用いウサギおよびモルモットを免疫して高価血清を作製した。ウサギ血清を抗原捕獲抗体としてマイクロプレートにコーティングした。急性期の患者血清あるいは糞便10%乳剤を加えて反応後、モルモット血清を検出抗体として反応させた。パーオキシダーゼをラベルした抗モルモットIgG抗体を反応させ、定法どおり吸光度を測定してカットオフ値を超えるものを陽性と判定した。陽性検体からは定法どおりRNAを抽出し、HEV構造蛋白領域をRT-PCRで増幅した。塩基配列を解読後GCG Pileupによって系統解析した。

4) HEV VLPsに対する単クローン抗体

HEV VLPsをBALB/cに免疫し、定法にしたがって脾臓細胞をミエローマ細胞と融合した。HEV VLPsを抗原に用いたEIAで反応性を示すクローンを選別した。

C. 研究結果

1) 組換え中空粒子の構造

HEV VLPsは構造蛋白のN末端側111個のアミノ酸を欠失させることによって初めて粒子構造を形成できるようになったものである。これまでの血清学的な性状解析からはこの組換え粒子はネイティブなHEV粒子と区別できない抗原性と免疫原性を持った粒子であることが明らかになっているが、この粒子が担う抗原構造をさらに詳細に明らかにするため、クリオ電子顕微鏡による撮影と画像解析による構造解析を行った。解像度は22オングス

トロームである。その結果、HEV VLPsは正二十面体の2回対称軸上に突出したダイマーをもつT=1粒子の三次構造であることが推定された。中空粒子の中心から50オングストロームの蛋白殻底から135オングストロームの最大突出部を占める蛋白殻はダイマーが30ユニット集合して形成されていた。いまだネイティブなHEV粒子の微細構造や構成蛋白の性状が明らかになっていないので、組換え粒子がネイティブなHEV粒子と同じ構造であるかどうかは現時点では結論できないが、以下に述べる単クローン抗体と結合させた後三次構造を解析し、単クローン抗体の認識部位から構造を解析する実験が進行中である。

2) 単クローン抗体のエピトープマッピング

HEV VLPsをマウスに免疫して13種類の単クローン抗体を得た。抗体のサブタイプはすべてIgG1であった。これらの抗体が反応するエピトープを同定するため、ORF2のNあるいはC末端を順次に欠損させた蛋白を組換えバキュロウイルスで発現し、これらの蛋白と各モノクローナル抗体との反応性によりエピトープを探った。その結果、13株のモノクローナル抗体は反応の特異性から4種類に分類された。中和活性を含め性状解析が進行中である。また、腹水からFabフラグメントを調製し、前記HEV VLPsとの結合部位をクリオ電顕で解析することにより、血清学的な反応に関わる粒子構造の同定を進めている。現在HEV VLPsのX線解析が進行中であり、抗原としての特異性を三次構造の側面からも関連づけていきたい。

3) E型肝炎抗体EIAの感度と特異性

以前に世界の12の機関で一斉に試験されたパネル血清164種を用いて感度を比較した。その結果、本EIAは最も優れていると思われた方法と同等あるいはそれ以上の結果が得られた。また、他の方法でE型肝炎であることが確認された患者血清、およびHEV感染チンパンジー血清を用いて試験した結果、発症時の血清が示すOD値は例外なく高く（通常IgMで2-3、IgGで3ないしはそれ以上を示す）、抗体価はそれぞれIgMは1:5,120以上、IgGでは1:12,800以上であること、ALTの値も高く3,000ないし4,000近くに達することが明らかになった。感染後、約5年間追跡で

きた患者血清を試験した結果、IgG抗体は極めて長期間高いレベルを維持されることが示された。一方、正常チンパンジー血清、健康人血清、A型肝炎患者血清、B型肝炎患者血清、およびC型肝炎患者血清とは全く反応がみられなかった。

4) 健常日本人の抗体保有状況

わが国の北部、中央部および南部に位置する3県から1993年に収集された健常日本人の約900の血清について、IgMおよびIgG抗体を測定した。年齢の増加と共に抗体保有率も増加し、50歳以上で40%近くに達する地域も見られた。地域によって抗体保有率に差がみられ、それぞれ1.9%、3.3%、14.1%であり4-7倍の違いがみられた。わずかの例外を除き、IgG抗体価はいずれも低く、わずか1例のみがIgM陽性であった。

5) 非A非B非C型肝炎の血清診断

過去5年間に依頼を受けた60件の非A非B非C型肝炎の血清診断をおこなった。IgMおよびIgG抗体を測定し、このうちの15件、25%がE型肝炎であることを確認した。一例を除き輸入感染例であった。いずれの場合もIgM、IgGのOD値、抗体価は前述したように高く、血清診断は容易であった。急性期の血清のみならず、IgMが消失する発症後2ヶ月までの血清であれば血清診断によるE型肝炎の同定が可能であると思われた。

D. 考察

健常日本人の抗体保有率と非A非B非C型肝炎の血清診断から、これまでわが国には存在しないと考えられてきたE型肝炎ウイルスが既に土着していることが示された。我々が確認できた非A非B非C型肝炎の一例は海外渡航歴が全くない人であったが、この人の血清にはRT-PCRでHEVの遺伝子が検出されている。感染のルートは不明であるが、塩基配列は豚から分離されたE型肝炎ウイルスのそれと極めて類似している。HEVリザーバーとしての豚の存在が現実味を帯びてきた。E型肝炎はZoonosisとしての研究も必要になってきた。

E. 結論

これまで信頼にたる確定診断法がなかったためE型肝炎の患者発生正確に捉えられてこなかった。また血清疫学的研究もなされてこなかった。そこで、我々が産生に成功したE型肝炎ウイルスの組換え中空粒子を抗原に用いたEIAによって、国内で収集された非A非B非C型肝炎患者の血清についてIgMおよびIgG抗体を測定した。その結果、これまで国内には存在せずほとんどが輸入感染例と考えられてきたE型肝炎が少なからずわが国にも存在することが明らかになってきた。HEV感染の血清疫学的調査・研究を広範に展開してHEV感染の実態を把握し、特にわが国における非A非B非C型肝炎例の原因を明らかにする手段が確立された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Li T-C, Takeda N, Miyamura T: Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* 2001; 19: 3476-3484.
2. Lin K-H, Chern C-L, Chu P-Y, Cheng C-H, Wang H-L, Sheu M-M, Huang W-L, Pongsuwanna Y, Yamamoto S, Yoshino S, Ishiko H, Takeda N: Genetic Analysis of of Recent Taiwanese Isolates of a Variant of Coxsackievirus A24. *J. Med. Virol.* 2001; 64: 269-274.
3. Magden J, Takeda N, Li T, Auvinen P, Ahola T, Miyamura T, Merits A, Kaariainen L: Virus-Specific mRNA Capping Enzyme Encoded by Hepatitis E Virus. *J Virol* 2001; 75: 6249-55.
4. Niikura M, Takamura S, Kim G, Kawai S, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Li T-C, Takeda N, Yasutomi Y: Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an

oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* 2001; in press.

5. Sasaki J, Kusuhara Y, Maeno Y, Kobayashi N, Yamashita T, Sakae K, Takeda N, Taniguchi K: Construction of an infectious cDNA clone of Aichi virus (a new member of the Family Picornaviridae) and mutational analysis of a stem-loop structure at the 5' end of the genome. *J. Virol.* 2001; 75: 8021-8030.
6. Sheikh S, Sugitani M, Kinukawa N, Moriyama M, Arikawa Y, Komiyama K, Li T-C, Takeda N, Ishaque SM, Hasan M, Suzuki K: Hepatitis E virus infection in fulminant hepatitis patients and apparently healthy population in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 2001; In press.
7. Tanaka E, Takeda N, Li T-C, Orii K, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Iijima T, Takayama T, Miyamura K, Yoshizawa K: Seroepidemiological study of hepatitis E virus infection in Japan using a newly developed antibody assay. *J. Gastroenterol.* 2001; 36: 317-321.

2. 学会発表

国際学会

1. Someya Y, Takeda N, Miyamura K: Molecular cloning of the Chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protein in *E.coli*. 6th International Symposium on Positive Strand RNA Viruses, Paris, France, 2001 May 28 - June 2.
2. Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T, Miyamura K: Recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine. 6th International Symposium on Positive Strand RNA Viruses, Paris, France, 2001 May 28 - June 2.
3. Tanaka TN, Natori K, Kamada K, Kitamoto N, Utagawa E, Saito H, Shinozaki K, Okada M, Sakae K,

Kobayashi S, Sawatari M, Nishi K, Yamasaki K, Seto Y, Hamano M, Oseto M, Matsuoka Y, Jiang X, Estes MK, Takeda N: Evaluation of a Norwalk-like virus antigen ELISA based on genogroup-specific monoclonal antibodies: A multi-institutional analysis. Thirty-Fifth Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Honolulu, USA, 2001, August 7-9.

4. Someya Y, Takeda N, Miyamura K: Molecular cloning of the Chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protein in *E.coli*. Thirty-Fifth Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Honolulu, USA, 2001, August 7-9.

国内学会

1. ウイルス様中空粒子を用いたHIV経口ワクチンの開発。高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男、保富康宏。第49回日本ウイルス学会総会、大阪、2001 11月。
2. 磁気ビーズを利用したRT-PCRによる食品からのノーウォークウイルスの検出。小林慎一、榮賢司、鎌田公仁夫、佐藤俊則、名取克郎、武田直和。第49回日本ウイルス学会総会、大阪、2001 11月。
3. 河川水から検出されたNVの遺伝子解析。植木洋、有田富和、後藤郁男、佐藤千鶴子、沖村容子、白石廣行、秋山和夫、橋本修、石古博昭、武田直和。第49回日本ウイルス学会総会、大阪、2001 11月。
4. Norwalk virusゲノムリコンビネーションの解析。影山努、小嶋慈之、福士秀悦、星の文則、片山和彦、武田直和。第49回日本ウイルス学会総会、大阪、2001 11月。
5. 病院内で発生した集団胃腸炎事例でのNLVs核酸検出及び抗体価測定。関根雅夫、志田美奈子、勝見正道、熊谷正憲、早川安彦、吉田菊喜、小山由紀子、佐藤牧人、末武光子、遠藤廣子、名取克郎、武田直和。第49回日本ウイルス学会総会、大阪、2001 11月。

6. 単クローン抗体によるリコンビナントカリシウイルス粒子の共通エピトープの解析。北元憲利、武田直和、名取克郎、田中智之。第49回日本ウイルス学会総会，大阪，2001 11月。
7. 新しいノーウォーク様ウイルス抗原検出ELISA法の確立とその実用例。岩上泰雄、田中智之、鎌田公仁夫、内野清子、吉田永祥、北元憲利、名取克郎、武田直和。第49回日本ウイルス学会総会，大阪，2001 11月。
8. 動物細胞におけるノーウォーク様ウイルス中空粒子形成。田村 克、名取克郎、武田直和、宮浦達男。第49回日本ウイルス学会総会，大阪，2001 11月。
9. チバウイルス3C様プロテアーゼの活性中心アミノ酸残基の同定。染谷雄一、武田直和、宮村達男。第49回日本ウイルス学会総会，大阪，2001 11月。
10. Norwalk-like virusesのキャプシド蛋白質、抗Norwalk-like viruses抗体遺伝子をそれぞれ発現する組換え植物の作出。松村 健、一町田紀子、杉本千尋、大橋和彦、李成一、上田一郎、伊藤敬三、恒光 裕、武田直和、田中智之。第49回日本ウイルス学会総会，大阪，2001 11月。
11. E型肝炎ウイルス組換え中空粒子の経口投与による感染防御抗体の誘導。李天成、網 康至、須崎百合子、武田直和、宮村達男。第49回日本ウイルス学会総会，大阪，2001 11月。
12. ヒトライノウイルスの系統解析による迅速同定。三浦里香、武田直和、山崎修道、石古博昭。第49回日本ウイルス学会総会，大阪，2001 11月。
13. [Overview：ピコルナウイルス]遺伝子の多様性と病原性。武田直和。第49回日本ウイルス学会総会，大阪，2001 11月。

H. 知的所有権の取得状況

なし。

12. レンサ球菌の *emm* タイピングの導入と比較

分担研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所細菌部長
協力研究者 池辺 義之 国立感染症研究所細菌部

研究要旨 レンサ球菌の型別にはM型別とT型別が使用されてきている。T型別用の抗体は市販されており、研究及び調査用に利用されている。一方、M型別は、レンサ球菌の菌体表面のタンパク質抗原の構造の多様性を利用しており、菌の型別と疾病との関係があるとされ臨床的にも有用であるが、Mタンパク質が不安定であるためその精製が難しく、81種類あるすべてのM抗原に対する抗体が作成しにくい状況にある。そのため検査用抗体は市販されておらず、in houseで作成して用いているのが現状であり、どこでもできるというものではない。近年Mタンパク質抗原に対する遺伝子(*emm*)の配列の多様性を利用して、型別に供することが可能になった。本研究においてはその方法を導入し、我が国で分離されるレンサ球菌において*emm*遺伝子型別が可能であるのかおよび既存のM型別との相関性があるのかを調査した。その結果、相関性があり、実際に使用できることを明らかにした。

A. 研究目的

ランスフィールドM型別は、レンサ球菌の菌体表面タンパク質であるM抗原に対する型特異的抗体を用いて抗体抗原反応により判定する方法である。M抗原タンパク質に対する抗体は、全菌体レンサ球菌を免役して得られた免疫血清を、異なるM型の菌で吸収して、交差反応する抗体を全部取り除く操作をすることにより作成する。その血清に型特異的抗体があることは、目的とするM型の菌体とは反応するが、他の知られているM型菌体とは反応しないことにより確かめられている。

現在までにA群レンサ球菌は、81種類のM型に分けられているが、その標準株が世界中にばらまかれており、菌の維持が不完全な場合には正確なM型を示す株であるのかが不確かな場合も存在している。

81種の菌株を安定に維持すること及びそれぞれに対する特異性の高い抗体を含む血清を作成し維持するのに手間と困難さを要することからもっと簡単な方法が求められていた。そこで、Mタンパク質をコードする遺伝子(*emm*)の5'末端の塩基配列に高い多様性が存在することを利用した遺伝子識別法が開発さ

れた(1)。我が国においては、地方衛生研究所と感染研の間のネットワークで、患者から分離されたレンサ球菌の型別(主にT型別、特殊な株に対してM型別を行っている)を過去20年近く行ってきている。M型血清もお互いに作成し、分配してきているが、費用および労力の関係ですべてのM型血清を維持するわけにはいかない。塩基配列をベースにした型別法を導入できれば、どこの地方衛生研究所でも行うことが可能になる。本研究においては、我が国で分離されるレンサ球菌のM型別について、既存の血清反応を用いる方法と塩基配列で行う方法との間に相関があるのかを調査し、今後遺伝子型別法を導入して問題ないかを検討することを目的とした。

B. 研究方法

M蛋白質遺伝子(*emm*)のシークエンスによるM型別:

a. Genomic DNAの抽出は、依存の方法を用いた。

- b. PCRによる *emm* 遺伝子の増幅；プライマーとしては以下のものを用いて *emm* 遺伝子を増幅させた。
emm-1: TAA T(C/G)G CTT AGA AAA TTA A
emm-2: GCA AGT TCT TCA GCT TGT TT
- c. PCR反応
 AmpliTaq Gold with PCR Gold Buffer (Applied Biosystems)を用いた。
- d. 反応条件
 Pre: 95°C 10 min. 95°C 30 sec. 52°C 30 sec. 72°C 1 min. 30 cycles
 Post : 72°C 7 min. 4°C storage
- e. PCR産物の回収
 High Pure PCR products purification kit (Rosh)を用いてPCR産物を回収した。
- f. シークエンス反応
 シークエンス用プライマー； *emmseq2* : TAA TCG CTT AGA AAA TTA AAA ACA GG
 シークエンス反応試薬； BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0を用いてシークエンス反応液を調製した。PCRに用いた *emm*-1 プライマーでもシークエンスは可能である。
- g. 反応条件；
 Pre : 96°C 30 sec. 96°C 30 sec. 55°C 10 sec. 60°C 4 min. 25 cycles, 4°C storage
- h. シークエンスデータの解析および型別
 Center for Disease Control and Prevention (CDC) の Strep HOME, *Streptococcus pyogenes* Database: (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepindex.html>) より BLAST-*emm*の項を開き、必要事項 (Requestor, Phone, Sample Identifier) 、 E-mail addressおよびシークエンスデータを送付すると、サーチ結果をメールで得られる。

C & D. 研究結果と考察

M蛋白質はN末より hypervariable region, variable region, conserved regionに分けられる。PCRに用いるプライマーをデザインする場合、C末の conserved regionはその塩基配列も各型に共通な配列が存在して問題がないが、N末は hypervariable regionで、それ

ぞれの型に特異的な領域であり、各型に共通な配列は存在しないことから、各菌株に共通なプライマーは設定できない。しかし、M蛋白質は菌体外に突出した蛋白質であることから、菌体内で作られたときはそのM蛋白質を菌体外に分泌するためのシグナルペプチドが存在する。このシグナルペプチドはN末から basic region, hydrophobic region, cleavage regionに分けられ、その中でも basic regionは各型に共通な配列が存在する。したがって、シグナルペプチドの basic region および conserved region をコードする領域にプライマーを設定することにより、*emm* 遺伝子の増幅が可能となる。約50bpのシグナルペプチドの basic region および conserved region を含む全体で160塩基の配列を決めた場合、各M型の菌間での *emm* 遺伝子配列の相同性が95%以上あれば、同じM型菌であると考えて差し支えないことが判明した。また我が国で分離される臨床分離株について調べた結果、血清を用いて決めたM型別と、*emm* 遺伝子配列から決めたM遺伝子型の間には矛盾が見られなかった。

E. 結論

レンサ球菌のM型別は、菌の流行調査及び疾患との関連性における研究に有用である。M型別は各型別抗体を用いて判定するため、81種に対する抗体を用意しなければならない等の困難さを伴ったが、*emm* 遺伝子型別がそれにとって代わるものであることが今回の研究で判明した。この方法は、より簡便であり、塩基配列の解析ができる施設であれば何処でも可能であり、かつ精度管理も容易である。今後、地研等への普及を図る予定である。

参考文献

- (1) Facklam.R., et al. *Emm* typing and validation of provisional M types for group A streptococci. *Emerg. Infect. Diseases*. 5: 247-253. 1999.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ikebe,T.,Wada,A.,Inagaki,Y.,Sugama,
K.,Suzuki,R., Tanaka,D., Tamura,A.,
Fujinaga,Y., Abe,Y., Shimizu,Y.,
Watanabe,H.,and The working
group for group A streptococci in
Japan. Dissemination of the phage-
associated novel superantigengene
speL in recent T3/M3
Streptococcus pyogenes isolates in
Japan. Infect. Immun. (in press),
2002

H. 知的所有権の取得状況

なし。

13. アルボウイルス感染症に対する実験室診断法の確立と 標準化に関する研究

分担研究者 倉根 一郎 国立感染症研究所ウイルス第一部長
協力研究者 高崎 智彦 国立感染症研究所ウイルス第一部
山田 堅一郎 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨 アルボウイルス感染症に対する実験室診断法の確立のため、デング熱の病原体診断法と西ナイル熱の血清・病原体診断法の確立と標準化を行った。デング熱の診断においてはウイルス分離法、PCR法は発熱時殆どの患者で陽性であるが、解熱後は陰性となることを示した。IgM捕捉ELISA法と併用することにより発症からの時期によらず実験室診断が可能となる。西ナイルウイルスは、日本脳炎ウイルスと抗体の交叉反応がある。西ナイルウイルスに対するIgM捕捉ELISAを作製し、日本脳炎患者血清を用いて検討した結果、IgM抗体においても交叉反応が認められた。しかし、日本脳炎に対するIgM捕捉ELISAを同時に実施したところ、すべての血清が日本脳炎に対してより強く反応し、IgM捕捉ELISA法が鑑別診断に用いることが示唆された。西ナイルウイルスに対するPCR法による遺伝子検出法の確立も行った。西ナイル熱に関しても、病原体診断法と血清診断法を併用することにより発症からの時期によらず実験室診断が可能となると考えられる。

A. 研究目的

日本人海外渡航者の増加に伴い、熱帯・亜熱帯地域において節足動物媒介性ウイルス（アルボウイルス）に感染し、帰国後発症する例が多く見られる。このうち、患者数の最も多いものとしてデング熱が上げられる。本研究では、これまでに確立したデング熱の実験室診断法のうち、特にウイルス分離の陽性率を発症後との日時との関係を検討した。西ナイルウイルスは、日本脳炎ウイルスとその抗原性が極めて類似している。日本に西ナイルウイルスが侵入した場合、あるいは海外渡航者による輸入症例が発生した場合は、主に日本脳炎やデング熱との鑑別を可能とする実験室内診断法の開発が必要となる。西ナイルウイルスに関しては、特に日本脳炎と鑑別するための血清学的診断法および病原体診断のためのPCR用プライマーを西ナイルウイルス、ニューヨーク株の遺伝子配列から作製した。また、既存のプライマーについても感度・特異

性を検討した。

B. 研究方法

1. デングウイルス分離とPCR法

血清からのデングウイルス分離は蚊細胞株であるC6/36細胞を用いて行った。ウイルス価の測定はVero細胞を用いたブランク法により行った。PCR法は過去報告した方法により行った。

2. 西ナイルウイルス（WNV）IgM捕捉ELISA法

Vero細胞に接種し、細胞変性効果が十分出現した5日目の培養液を3000rpmで遠沈し、その上清をウイルス抗原とした。

(1) 抗ヒトIgM抗体（ μ 鎖特異的）をコーティングしたプレートで西ナイル熱/脳炎患者血清中のIgMを捕捉する。(2)

西ナイルウイルス抗原を反応させる。

(3) ヒト血清中の黄熱ウイルスに対するIgMと反応したウイルス抗原を、酵素標識した抗フラビウイルス抗体 (IgG抗体: D1-4G2-4-15) で検出する。(4) 酵素に対する発色基質を加え、抗体のウイルス抗原との反応を発色により検出する(抗体の結合量は発色の程度として表現される)。作製したIgM捕捉ELISAを日本脳炎患者血清10検体、デング熱患者血清10検体および日本脳炎ワクチン接種者血清を用いて、その感度・特異性を検討した。

3. PCR法の確立

(1) プライマーの設計

フラミンゴから分離したWNV (NY strain) の配列から、Oligo™ Primer Analysis Software (Molecular Biology Insight, Inc.) を用いて以下のプライマーを設計した。

- ① WNNY514/904
CggCgCCTTCATACACA/
gCCTTTgAACAgACgCCATA
- ② WNNY361/733
gCTCTACCAAggCAATAggA/
gTgTgCggTgCTTCg

(2) 感度および特異性の検討

すでに報告されているプライマー2セットを用いた。

- ① NS3領域
Fla - U5004/Fla - L5457 (T. Briese et. al. Lancet 354, 1261-1262, 1999)
5' -ggAACDTCMggHTCNCCHAT-3'
5' -gTgAARTgDgCYTCRTCCAT-3'
- ② 3' UTR領域
WNS3/WNC3 (Tanaka M. Rapid identification of Flavivirus using the polymerase chain reaction. J. of Virol. Methods)

に関しても感度・特異性を検討した。

増幅条件は、逆転写酵素 (AMV) とTTH DNA 合成酵素を用い、53°C 20分逆転写反応させ、92°C 60秒、53°C 60秒、72°C 60秒のPCRサイクルを30回繰り返した。

C. 研究結果

1. デングウイルス分離陽性率の検討

血清からのデングウイルス分離陽性率を発症後 (一般的には発熱で発症する) の日時との関連で検討した。発症後5日以内に採取された検体では28検体中24検体からウイルスが分離された。6日目以降の検体では47検体中3検体のみからウイルスが分離された。検体採取日を解熱日との関連で検討した。解熱日をday0、1日後をday1、1日前をday-1として解析した。ウイルス分離陽性率はDay-7からday-4で9/9、day-3からday-1で18/22、day0は1/5、day1とday2は2/12、day3とday4は1/13、day5以降は0/21であった。PCR法の結果もウイルス分離とほぼ同様の結果であった。

2. 西ナイルウイルスIgM捕捉ELISA法

デング熱患者血清は、西ナイルウイルスに対してそれ程強い交叉反応を示さなかったが、日本脳炎患者血清がIgM抗体においても西ナイルウイルスと交叉反応することを示した。しかし、それぞれのウイルスに対するIgM捕捉ELISA抗原量を揃えて同時に実施することで、鑑別可能であることが確認された (図1)。

3. 西ナイルウイルスRT-PCR法の確立

PCR法では、すでに報告されているWNS3/WNC3よりもNS3領域のプライマーFla-U5004/Fla-L5457は、非常に高感度である (図2) が、特異性の点では西ナイルウイルスおよび日本脳炎ウイルス両方において増幅可能であることが分かった (図3)。また、エンベロップ領域のプライマーはWNNY514/904が特異性において優れていた (図3)。

D. 考察

デングウイルスの病原体診断においては従って、発熱時にはウイルス分離、PCR法が陽性であるが、解熱日以降はウイルス分離、PCR法とも陰性である傾向があった。この結果は、デングウイルス感染においては発熱時ウイルス血症があるという報告と一致する。この結果を抗体診断法の陽性率と組み合わせると図4のようになる。

西ナイルウイルスが日本に侵入した場合、日本には近縁の日本脳炎ウイルスが存在するため診断上混乱が生じることが想定される。血清診断法としては、中和抗体測定以外に、IgM捕捉ELISA法が、日本脳炎との鑑別診断として使いうることが確認された。また、病原体診断法として、ウイルス分離以外に遺伝子診断の目的で、エンベロープ領域のプライマーを作製し、WNNY514/904が使用可能であることを確認した。また、産物の遺伝子解析が必要ではあるが、非常に感度が良く西ナイルウイルスおよび日本脳炎ウイルス両方において増幅可能であるNS3領域のプライマーFla-U5004/Fla-L5457と併用することは偽陰性を防ぐ意味で有効であると思われる。

E. 結論

デングウイルス感染症の診断においてはウイルス分離法、PCR法は発熱時殆どの患者で陽性であるが、解熱後は陰性となる。西ナイルウイルスの血清診断においては、日本脳炎、西ナイル両ウイルスに対するIgM捕捉ELISA抗原量を揃えて同時に実施することで、鑑別可能であった。PCR法では、NS3領域のプライマーFla-U5004/Fla-L5457は、非常に高感度であるが、西ナイルおよび日本脳炎ウイルス両方において増幅可能であった。エンベロープ領域のプライマーはWNNY514/904は特異性において優れていた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ken-Ichiro Yamada, Akira Takeda, Ichiro Kurane Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases. Journal of Virological Methods 102, 61-66. 2002
2. 西ナイル脳炎ウイルスとは。高崎智彦. 感染症と化学療法 5(8) 39-42 (2001)
3. Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko

Takasaki, Masaru Nawa, Mikio Nakayama, Yoko T. Arai, Kinjiro Morimoto, Sadao Yabe, Ichiro Kurane. Demographic features of imported dengue fever cases serodiagnosed in Japan during 2000. Journal: Dengue Bulletin WHO. 24 42-45, 2001

4. Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ichiro Kurane Increase in the sensitivity of dengue diagnosis by combination of reverse transcriptase-polymerase chain reaction and passage on cell culture. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 3 470-471. 2001
5. Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ichiro Kurane. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. Journal of Clinical Virology 24(3):203-209

2. 学会発表

1. 高崎智彦、根路銘令子、新井陽子、山田堅一郎、森本金次郎、中山幹男、倉根一郎「日本脳炎ワクチンの西ナイル脳炎発症予防効果」第49回日本ウイルス学会 2001年11月
2. 倉根一郎、高崎智彦：日本における節足動物媒介性ウイルス感染症の現状と問題点。第70回日本衛生動物学会（山形） 2001年

H. 知的所有権の取得状況

なし。

図1

日脳患者血清の西ナイルウイルスおよび日本
脳炎ウイルスに対する IgM 捕捉 ELISA
(OD値の比較)

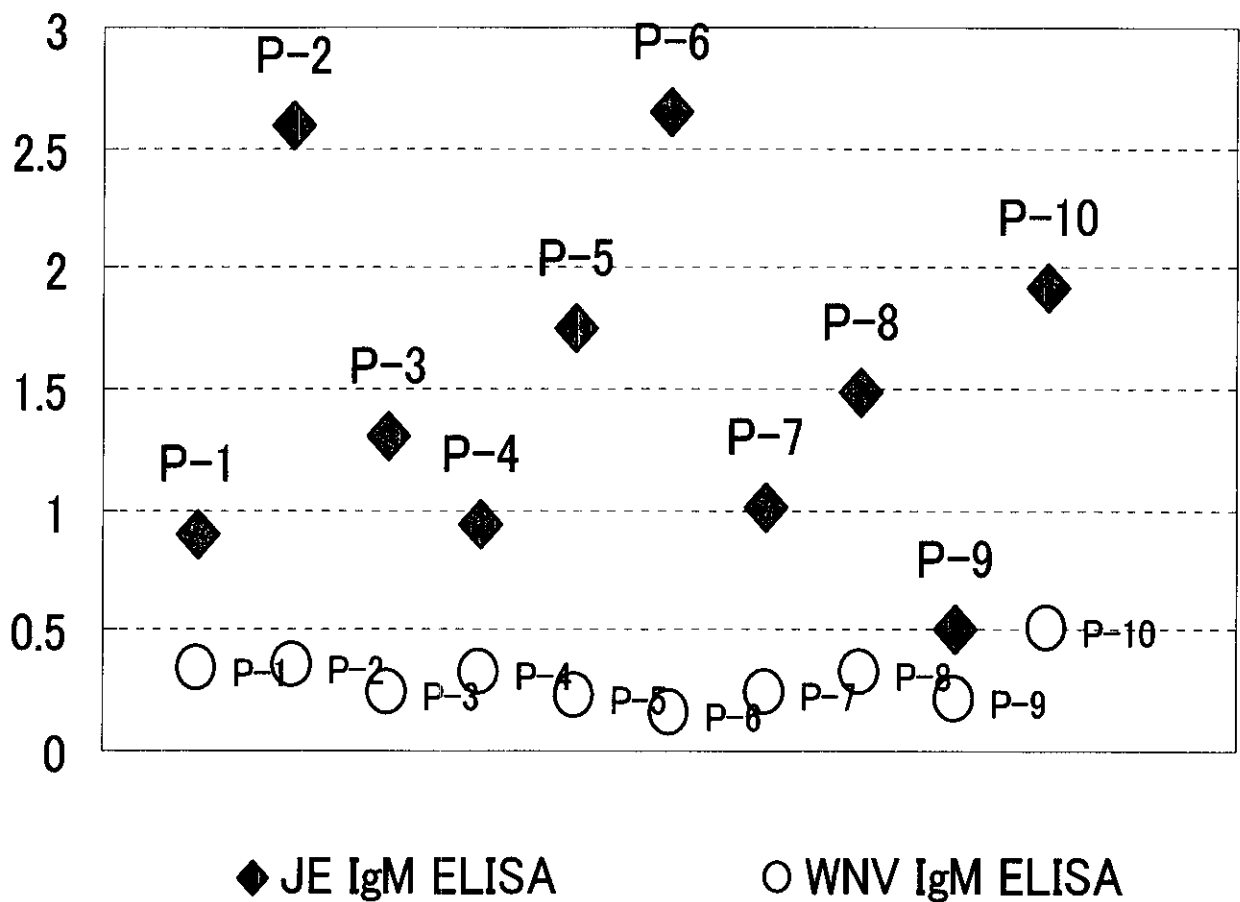
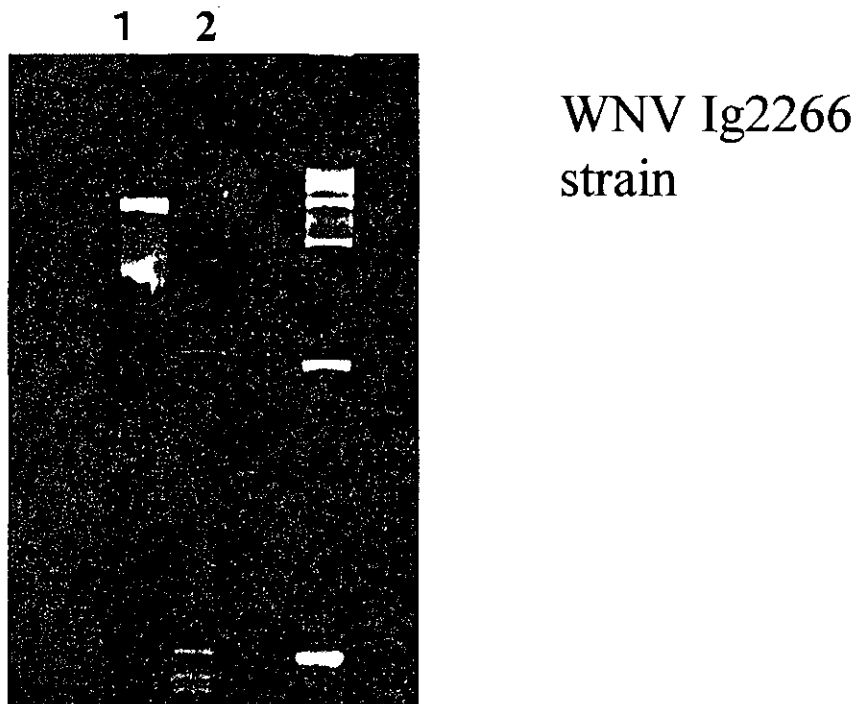


図2. ウエストナイルウイルスRT-PCR 既存のプライマーの感度



1. NS3領域プライマー 470bp
5'-ggAACDTCMggHTCNCCHAT-3'
5'-gTgAARTgDgCYTCRTCCAT-3'
2. Primer set by Tanaka (1993) 229 bp
WN-S3 / WN-C3

図3

WNV(NY flamingo strain)からの primer によるPCRの結果

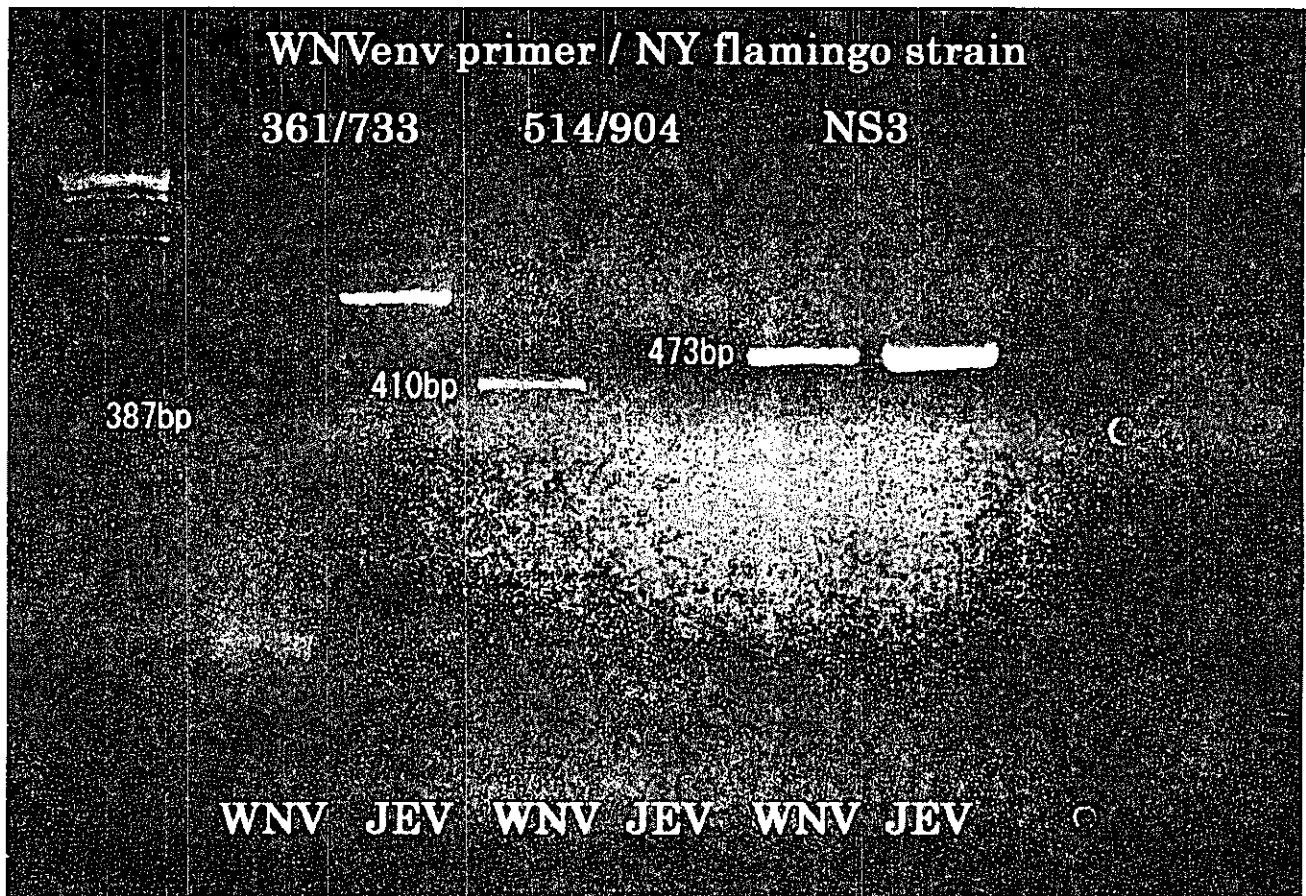
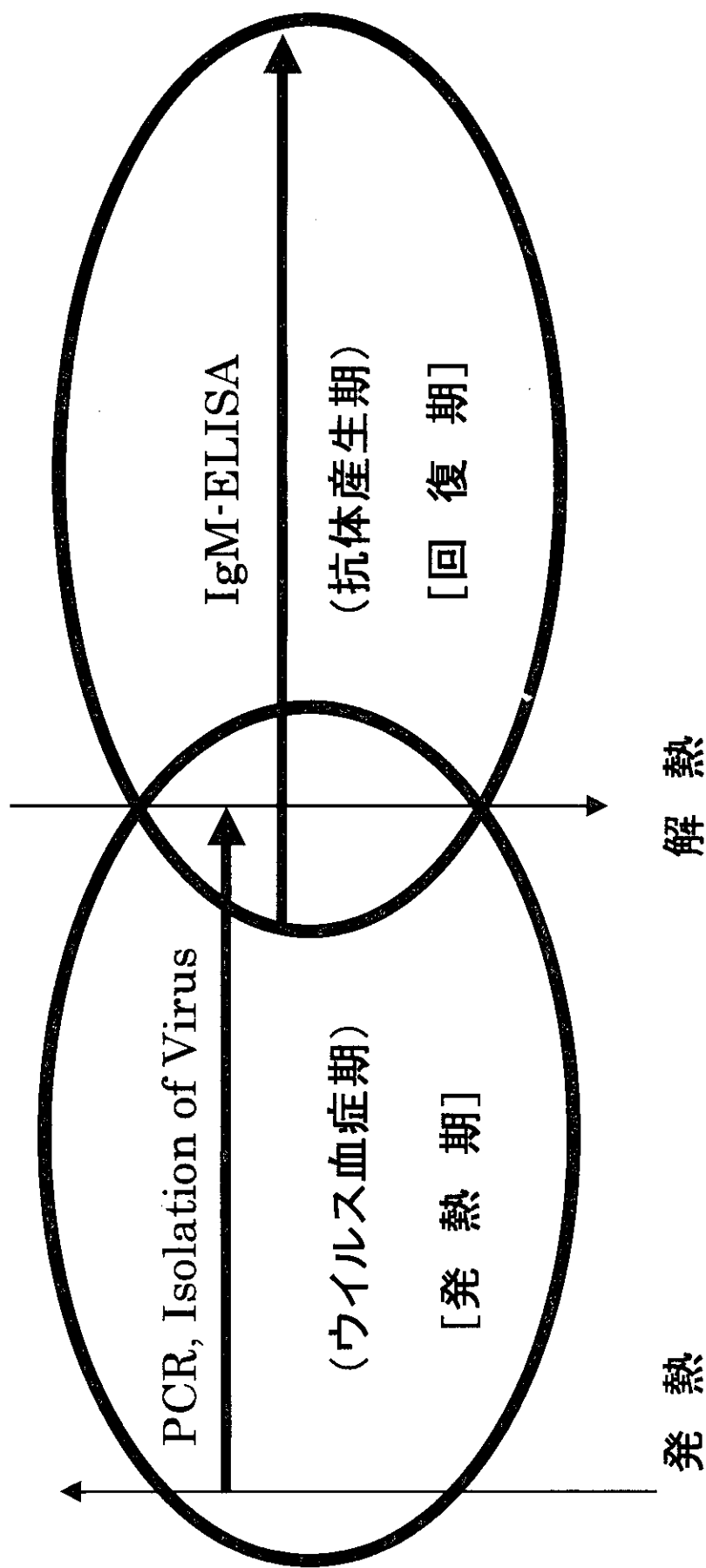


図4. デングウイルス感染(初感染)におけるウイルス血症と抗体反応



14. 病理組織材料を用いた病原体の検出と感染症診断への応用に関する研究

—新規に発見されたウイルス「ヒトヘルペスウイルス8」の診断—

分担研究者 佐多 徹太郎 国立感染症研究所感染病理部長

研究協力者 片野晴隆、佐藤由子 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨 新規に発見されたウイルスにつき、生検剖検組織を用いたウイルス感染症の病理学的診断および血清抗体を検出する血清診断法を確立し、実際の症例で検討した。新種のヘルペスウイルスであるヒトヘルペスウイルス8につき、その感染細胞からcDNAライブラリーを作成し、感染者血清を用いて免疫スクリーニングをすることにより、ウイルスの抗原蛋白を同定した。これら抗原蛋白のリコンビナント蛋白を作成し、血清抗体検出法を確立した。この系を用い、日本人健常人の血清を検討、日本人における感染率を明らかにした。また、このリコンビナント蛋白をもちいてウサギポリクローナル抗体を作成し、組織における感染細胞の同定に成功した。この抗体を用いて、カポジ肉腫症例25例につき免疫組織を行ったところ25例すべてに感染細胞が同定された。ここで確立された手法は新たに発見された病原体に対する診断法確立のモデルとなるものと考えられる。

A. 研究目的

近年の分子生物学的手法のめざましい進歩により、新たな病原体の発見や同定がなされるという報告がある。このような新規病原体が同定された場合には、その病原体が引き起こす疾患はなにか、感染経路や感染率の解明がその感染症の実態を把握する上で必要である。しかし、こうした新規病原体は発見時にその全貌が分かっていることは少なく、発見時には遺伝子の断片や病原体の一部の性質が明らかになっているのみのことが多い。これまで新興感染症として新たに発見された病原体の中にはHIVやエボラウイルスのように致死率の高い疾患を引き起こすものも含まれており、発見されたと同時に診断法の確立が急務となる場合が多い。しかし、新規に発見された病原体ではどの検査方法がどれだけ信頼できるものかの情報を欠くために、複数の感染症診断法を平行して行い、最終的には臨床症状と併せて総合的に判断することになる。したがって、新規病原体に対する診断法の確

立には複数の有効な診断法が同時に確立できるような体制を確立しておくことが望ましい。感染症における病原体の診断には血清診断、分離培養法、核酸診断、病理組織診断などの方法があるが、いずれも一長一短があり、決定的な確定診断法はない。血清診断は病原体に対する血清中の抗体価を測定することで行われる。ひとたび病原体が感染した場合の血清中の抗体価の上昇は鋭敏で、これを利用した血清診断は感染症診断の中では広く用いられている有力で古典的な診断法の一つである。しかし、有病期には抗体価の変化が少ないこと、必ずしも抗体ができない場合や、日和見的に病原体が体内で増殖した場合などにも血清抗体が陽性になることから、血清診断の結果は必ずしも臨床症状と相関しない。病原体そのものの確定診断には分離培養が有用であるが、一部のウイルスなどでは分離培養が不可能である。また分離培養法で病原体が分離されたところで、病変との関与は明らかでない場合もある。病原体そのものの核酸を検出するPCR法も高感度である反面、同様の問題

がある。一方、病理組織学的診断は感染症診断の中でも病原体の局在を明らかにする点、病変部との感染部位の相互関係がわかる点で重要な位置を占める。病原体に対する特異抗体を用いた免疫組織学的染色法や特異的核酸配列を用いたin situ hybridization法は、場合によっては、確定的な診断が可能である。今回、われわれは、1994年に初めて報告されたヒトヘルペスウイルス8 (HHV-8) につき、血清診断法、病理組織学的診断法の確立を行った。このウイルスは当初、エイズに合併したカポジ肉腫からDNA断片が発見され、2年後の1996年には全核酸配列が報告された。核酸配列からは同じヘルペスウイルス属で発癌ウイルスとして知られるエプスタイン・バーウイルスと塩基配列やアミノ酸配列に相同性があったことから、このウイルスも発癌ウイルスであることが予想された。現在ではHHV-8はカポジ肉腫や原発性体腔液性リンパ腫、多巣性キャスルマン病の発病と関連するウイルスであることが分かっている。我々はこのウイルスの感染細胞のcDNAから有効な抗原タンパクを同定、クローニングし、高感度な抗HHV-8血清抗体検出法を確立し、また、HHV-8に特異的なウサギポリクローナル抗体を用いて免疫病理組織学的検査法を開発した。これらの病原体診断の開発法は今後、新規の病原体が発見された際に参考になるものと考えられ、ここに報告する。

B. 研究方法

1. 血清抗体検出法の開発

(1) 抗原タンパクの同定

HHV-8感染細胞株はエイズ合併原発性体腔液性リンパ腫の患者検体から樹立した。本細胞株はHHV-8が持続感染しており、フォルボルエステルなどの添加によりウイルスを産生する増殖性感染を誘導する性質を持つ。cDNA library は λ ZAP Express System (Stratagene社)を用いて作成した。免疫スクリーニング法はこのファージライブラリーを大腸菌に感染させ、プレート上でタンパクを発現させた後にこれらのプラークをメンブラン上に転写、このメンブランをエイズ合併カポジ肉腫患者の血清を1次抗体に用い免疫染色することにより、患者血清が認識するクローンを得た。クローンはシークエンス後

ウイルスタンパクをコードしていることを確かめた。グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST) 融合タンパク法を使いこれらのウイルスタンパクを大腸菌内で人工的に合成、精製後、これを抗原タンパクとしてウエスタンブロットで患者血清と反応させた。

(2) ELISAの開発

HHV-8がコードする4つのタンパクK8.1, ORF59, ORF65, ORF73をグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)融合タンパク法を使い大腸菌内で人工的に合成、精製後、これを抗原タンパクとしてELISAプレートを作成した。すべての血清は55℃30分で非働化したのち、希釈溶液にて規定濃度に希釈した。希釈血清をプレートと反応させた後、酵素抗体法にて発色後、発色強度を吸光度計にて測定した。陽性、陰性の判定は蛍光抗体法などの他の方法で確認された明らかな陰性症例50例の吸光度の平均に標準偏差値の5倍を加えた数値をカットオフ値とし、この値を超えるものを陽性とした。また、陽性例、および、陽性を疑う症例(平均+標準偏差の3倍を越えるもの)についてはHHV-8感染細胞を用いた蛍光免疫染色法にて確認した。

2. 免疫組織学的検出法の確立

(1) HHV-8特異抗体の開発

HHV-8のウイルス蛋白をグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)融合タンパク法でリコンビナントタンパクとして作成した。これらのタンパクをアジュバントとともにウサギに免疫し、2-3ヶ月後に血清を採取した。血清は硫酸沈殿後、アフィニティークラムを用い抗体成分を精製した。抗体の特異性はHHV-8感染細胞株TY-1の蛍光免疫染色、およびウエスタンブロット法により確認した。

(2) 免疫組織学的検出法

生検および剖検病理組織は10%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。4 μ m厚の切片を作製し、シランコートガラススライドに貼付した。脱パラフィン後、クエン酸処理にて抗原賦活化処理を行い、リン酸バッファーで洗浄後、上記ウサギポ

リクローナル抗体を一次抗体として反応させた。洗浄後、ビオチン標識抗ウサギイムノグロブリン抗体を二次抗体として、三次抗体にはペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを順次反応させた。抗体の種類により、Catalyzed Signal Amplification kit (DAKO) によりシグナルを増強させた。ジアミノベンチジンで発色後、アルコール脱水、キシレン透徹、封入後、検鏡した。また、免疫染色とは別に各標本はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で全体の形態変化を観察した。

(倫理面への配慮)

実験に用いたすべての血清はインフォームドコンセントを得て採取されている。また、遺伝子組換え実験は当該施設（国立感染症研究所）の承認の後、遺伝子組換え実験ガイドラインに沿って行われた。剖検組織の検討は事前の剖検承諾書を得、種々の検討は診断の過程で行われた。生検組織については詳細な診断目的と治療への関与について十分に説明し、患者の同意を得て、生検組織診断を行った。

C. 研究結果

1. 血清診断法の確立

他のヘルペスウイルスと同様にHHV-8感染者の血清中にはHHV-8に対する抗体が検出され、これにより個体のHHV-8感染の既往の有無を知ることができる。血清抗体を測定する方法としてはこれまで血清を一次抗体として感染細胞を染色する免疫蛍光染色法やウエスタンプロット法などの報告があるが、どれも特異性や感度に問題があり、なおかつ、大量検体を扱うことは困難であるという欠点がある。そこで我々は比較的特異性に優れ、感度もよく、大量検体の検索が容易な血清抗体検査法である Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) の開発を試みた。これまで報告のあるHHV-8に対するELISA法ではウイルス粒子そのものを抗原に採用していたがこれでは感度が低いことがわかっていった。なおかつHHV-8は100個以上の蛋白をコードしており、どの蛋白が抗原性の高い蛋白かは知られていない。一方、我々は99年にエ

イズ合併原発性体腔液性リンパ腫の症例からHHV-8感染細胞株を樹立することに成功していた。そこで、われわれはHHV-8の抗原蛋白を同定するためにそのHHV-8感染細胞株TY-1のcDNAライブラリーを作成し、免疫スクリーニング法を用いてカポジ肉腫患者血清と反応する14個の蛋白の遺伝子をクローニングした。これらの蛋白のリコンビナント蛋白を作製しウエスタンプロットで患者血清と反応させた結果、K8.1, ORF59, ORF65, ORF73の4つが抗原蛋白であることが明らかになった。我々はこの蛋白をELISAの抗原に用い、高感度な血清抗体検査の系を完成した。このELISAを用い日本人正常人1,004名の血清を検索した結果、1.4%が陽性であることが明らかになった。また、カポジ肉腫患者では100%、原発性体腔液性リンパ腫、多巣性キャッスルマン病では高い感染率を示し、他の悪性リンパ腫、白血病、癌などの悪性腫瘍、悪性貧血などの血液疾患、ヘルペス等の他のウイルス疾患、脳神経疾患、代謝疾患など他の疾患の患者では1.9%であり、あらためてこの3疾患がHHV-8感染と関連していることが示唆された。さらに同性愛HIV感染者で約6割の感染が見られた一方で、血液製剤によるHIV感染者には陽性は認められなかった。また、健常人における血清抗体陽性者でも特別な症状を認めないことから、これらの陽性者は不顕性感染の状態にあるものと思われる。

2. 免疫組織学的検出法の確立

PCR法を用いるとHHV-8はカポジ肉腫のほぼ全例から検出される。正常な皮膚や他の組織からは検出されないことからカポジ肉腫内にHHV-8感染があることは確実であった。しかし、感染細胞の局在に関してはin situ hybridization法やin situ PCR法などの報告は散見されるものの、どれも明瞭なものとはいえず、また方法が複雑で簡便に行えるものではなかった。われわれはカポジ肉腫などのHHV-8関連疾患においてHHV-8の感染細胞を同定する目的で、HHV-8の各ウイルス蛋白に対するウサギポリクローナル抗体を作製し、免疫組織化学染色にて感染細胞の同定とウイルス蛋白の発現を検索した。抗原としてはHHV-8がコードするK2, および ORF26, K8, K8.1, K10, K11, ORF59, ORF65, ORF73蛋白を選択し、これらの蛋白に対するウサギポリクロー