

25010722

厚生科学研究費補助金

平成13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14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、疫学及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）	
クリミア・コンゴ出血熱の分子生物学的な診断法の有用性と問題点	17
分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
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	24
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）	
日本における西ナイルウイルスサーベイランス	29
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
日本における日本脳炎ウイルス不顕性感染者の割合（続報）	34
分担研究者：小西英二（神戸大学医学部 医療基礎学講座）	
2001年輸入デングウイルス感染症の検査・診断	41
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
RT-PCR法を用いたアルボウイルス媒介蚊からのウイルスゲノム検出およびPCR法を用いた蚊種の 区別に関する研究	48
分担研究者：江下優樹（大分医科大学 感染予防医学講座）	
デング熱媒介蚊の寄生原虫 <i>Ascogrenarina</i> spp.を用いた新しい防除法について	67
分担研究者：安居院宣昭（国立感染症研究所 昆虫医科学部）	
リポソームによる日本脳炎 DNA ワクチンの免疫誘導促進（続報）	76
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	84
分担研究者：山田章雄（国立感染症研究所 獣医科学部）	
デングウイルス非構造蛋白質組み込みプラスミドの作製とマウス防御実験	88
分担研究者：山岡政興（兵庫県立衛生研究所）	
西ナイルウイルス致死的感染に対する日本脳炎抗体による交叉防御の検討と沖縄県住民の西ナ イルウイルス交叉中和抗体保有状況の調査	95
分担研究者：只野昌之（琉球大学医学部 ウイルス学講座）	
西ナイルウイルスに対する日本脳炎不活化ワクチンの効果	105
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
ジフテリアトキシン A フラグメントを負荷した日本脳炎ウイルスと、アフリカミドリザル由来 Vero 細胞との膜融合の観察	111
分担研究者：名和優（埼玉医科大学 微生物学講座）	
シンドビスウイルスレセプタータンパクの N 末端アミノ酸分析に関する研究	117
主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	

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起こし、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：1）ダニ媒介性感染症としてクリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対する分子生物学的診断法を確立した。2）日本脳炎ウイルスとデングウイルス1型、3型、4型のキメラウイルスを作製し、これを用いたデングウイルス診断用抗原の大量産生方法を確立した。

（2）媒介節足動物とウイルスの侵淫状況を把握するための技術開発と現状の把握：1）デングウイルス媒介蚊の分子生物学的区分法を確立した。また、デングウイルス媒介蚊からのウイルスゲノム検出法を確立した。2）日本産アカエイカが西ナイルウイルスに感受性を有することを明らかにした。3）デング熱媒介蚊の分布と幼虫への寄生原虫の日本における分布状況を詳細に調査した。4）米国からの帰国者血清、蚊、カラス血清中の西ナイルウイルス抗体を調査するシステムを確立し、上記検体を調査したがすべて陰性であった。

（3）節足動物媒介性ウイルスに対する防御免疫の解明と新型ワクチンに必要な基礎技術の開発：1）新しいトランスフェクション試薬を用い新型ワクチンとしてのDNAワクチンの中和抗体産生能を増強させることに成功した。2）デングウイルスPreMとE遺伝子、NS1、NS2、NS3、NS4、NS5のそれぞれを含む実験的DNAワクチンを作成した。3）日本脳炎ウイルスの細胞への感染機構を明らかにする方法を確立した。

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）
江下優樹（大分医科大学感染予防医学講座
助教授）

小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座
助教授）
高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部
室長）
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)

森川 茂 (国立感染症研究所ウイルス第一部
室長)

森田公一 (長崎大学熱帯医学研究所分子構造
解析分野 教授)

山岡正興 (兵庫県立衛生研究所 主任研究員)

山田章雄 (国立感染症研究所獣医科学部 部
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年以降アメリカ合衆国で発生している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、節足動物媒介性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)媒介節足動物とウイルスの侵淫状況を把握するための技術開発を行い現状を把握する、(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・遺伝子診断法の確立

1) クリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) に対する RT-PCR 法の確立: 2001年5月に新疆ウイグル自治区西部の CCHF 流行地で、急性期の CCHF 患者 (疑い例を含む) から採取された血清 11 検体を用いた。これらの血清は、CCHF の診断目的に採取された。ただし、これらの 11 検体のうち、3 検体 (8, 9 および 72) は CCHF の同一患者 (28 歳, 羊飼) から経時的に採取された血清である。RT-PCR および nested PCR. RT 反応および PCR は Ready-to-go RT-PCR キット (Pharmacia Biotech 社) を用いて行われ、その条件は、42°C30 分 (RT 反応), 95 度 5 分 (RT の不活化), 30 サイクルの 95°C 30 秒-52°C30 秒-72°C30 秒, および 72°C5 分である。Nested PCR は、RT-PCR 産物をテンプレートとして、Ready-to-go RT-PCR キット (Pharmacia Biotech 社) を用いて行われ、その条件は 25 サイクルの 95°C30 秒-52°C30 秒-72°C30 秒, および 72°C5 分である。PCR に用いられたプライマーセット A は論文

(Rodriguez LL et al.: Molecular investigation of a multisource outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates. Am J Trop Med Hyg 57:512-8, 1997)に基づいて設計された。プライマーセット B は、中国 8402 株の S-遺伝子塩基配列に基づいて、プライマーセット A に相当させて設計された。

2) 日本脳炎、デングキメラウイルスの作製：回転培養法で大量に培養したヒトスジシマカ培養細胞クローン C6/36 細胞に日本脳炎ウイルスとデングウイルスを感染させ培養液中に産生されたウイルス粒子からウイルス遺伝子 RNA を抽出する。逆転写酵素を用いてウイルス遺伝子 RNA に相補的な一本鎖 cDNA を合成する。この一本鎖 cDNA から LongPCR 技術を用いて完全長 (11kb) キメラウイルス cDNA を作製する。さらに、キメラウイルス RNA を作製し、これを C6/36 細胞にエレクトロポレーション法を用いて導入し、数日間培養する。培養した細胞を免疫学的に抗日本脳炎ウイルス、抗デングウイルス抗体で染色し、遺伝子 RNA 導入細胞内におけるウイルス関連蛋白の生産の有無を確認する。

(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 12 年度厚生科学研究費補助金「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。調査対象の血清は 1980 年代に兵庫県において採取された血清を用いた。

2) 単クローン抗体を用いた IgM-ELISA 法：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。西ナイ

ルウイルス抗原(P)と正常非感染抗原(N)とを別々に加えて、固相に捕捉された西ナイルウイルス特異的 IgM 抗体と反応させた。西ナイルウイルス特異的 IgM 抗体と反応したウイルス抗原を、酵素標識したフラビウイルス交叉性単クローン抗体 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。

3) PCR 法による蚊種の区別：加齢の成虫蚊の形態学的特徴をもって蚊種を鑑別することは困難なる場合が想定されたので、日本、タイ国、オアフ島とルイジアナ州産のアメリカ 2 系統、およびアルバニア産のヒトスジシマカを用いて、それらの rDNA シストロンの ITS 2 (Internal Transcribed Spacer 2) 領域を比較するためのツールとして特異的な制限酵素の探索を行い、類似性が地域毎に認められるか否かを検討した。

4) ヤブカ幼虫の採取と寄生原虫の検出：ヤブカ幼虫は、墓地の花立て、古タイヤ等の人工容器から駒込ピペットを用いて幼虫を採集し、約 100 ml のポリエチレン容器に入れて研究所に持ち帰った。終令幼虫まで飼育し、*Ascogregarina* 栄養体の寄生を確認するために、実体顕微鏡下で幼虫を解剖し、中腸を摘出後、囲食膜に囲まれた未消化物を膜ごとピンセットで取り出した。中腸をスライドグラス上の PBS (Dulbecco's, pH 7.0) 1 滴中に置き、カバーグラスをかけて光学顕微鏡で観察した。栄養体の超微形態を観察するために、必要に応じて 2.5% glutaraldehyde と 2% paraformaldehyde で固定を行った。また、採集されたヤブカ幼虫は種の同定を行うために成虫まで飼育した。

(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

1) 日本脳炎 DNA ワクチンの作製と免疫：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。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 μ g を筋肉内接種することにより、3 回免疫した。リポソームは米国 V 社より分与を受けた。

2) サルにおける日本脳炎 DNA ワクチンの免疫応答：JEV 中山株の prM 及び E 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。国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターで出生、育成された年齢 4 歳（オス）カニクイザル 9 頭を用いた。カニクイザル 5 頭には PBS に溶解したプラスミド DNA、pNJEME 500 μ g を大腿部筋肉内に投与した。4 頭には対照としてベクター DNA 500 μ g を同様に接種した。初回免疫後、4 および 8 週間後に、同量のプラスミド DNA を追加投与した。この間、経時的に血清抗体価を測定した。

3) デング DNA ワクチンの開発：デングウイルス 2 型ニューギニア C 株の PreM および E 遺伝子、非構造蛋白遺伝子 NS1、NS2 (NS2A+NS2B)、NS3、NS4 (NS4A+NS4B)、NS5 それぞれを pcDNA3 ベクターに組み込み実験用デング DNA ワクチンを作製し、マウスの致死的チャレンジモデルを用いて防御免疫誘導能を検討した。

(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・遺伝子診断法の確立

1) クリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) に対する RT-PCR 法の確立：過去報告された RT-PCR および nested PCR [PCR(A)] および CCHF ウイルスの中国分離株 (8402 株) の S-遺伝子の塩基配列に基いて設計されたプライマーを用いた RT-PCR および nested PCR [PCR(B)] により、血清からのウイルスゲノムの検出を試みた。CCHF に罹患していると思われる患者から採取されたヒト血清 11 検体を被験血清とした。4 検体から CCHF ウイルスゲノムが検出された。その 4 検体のうち、PCR(A) と PCR(B) によりウイルスゲノムが検出されたのは 1 検体のみで、PCR(A) でのみウイルスゲノムが検出されたのは 1 検体で、PCR(B) でのみウイルスゲノムが検出されたのは 2 検体であった。また、PCR によりウイルスゲノムが検出された検体は、CCHF ウイルスに対する IgG 抗体または IgM 抗体のみが検出された血清か抗体が出現する前の血清で、IgM、IgG 両抗体が出現している血清からはウイルスゲノムは検出されなかった。

2) 日本脳炎、デングキメラウイルスの作製：昨年度作製したデング 2 型と日本脳炎ウイルスのキメラウイルス (D2/JE) についてその生物活性をさらに詳細に解析するとともに、あらたにデング 4 型と日本脳炎ウイルスのキメラウイルス (D4/JE) の作製にも成功した。この 2 つのキメラウイルスは蚊培養細胞でよく増殖し、これらのキメラウイルスが高効率の

診断用抗原供給に、あるいは不活化ワクチンへの利用に有用であることが判明した。一方、哺乳類細胞に感染させた場合はそれぞれ異なる増殖特性を示した。

(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) 日本における日本脳炎ウイルス不顕性感染状況：1980年代の血清を用い、都市部と農村部における日本脳炎ウイルス NS1 に対する抗体測定を行うことにより当時の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 抗体陽性率は都市部 9.9%、農村部 20.6%であった。1年間隔で採取されたペア血清を用いた研究では1年間に受ける自然感染の頻度は都市部都市部 5%、農村部 7.5%と推定された。

2) 西ナイルウイルス IgM 捕捉 ELISA 法を確立しさらにその感度と精度を検証した。さらに、米国からの帰国者血清、成田空港において採取された蚊、カラス血清中の西ナイルウイルス抗体を調査するシステムを確立し、上記検体を調査したがすべて陰性であった。

3) デング熱輸入症例の検査・診断：成田空港検疫所において熱帯・亜熱帯地域から帰国した不明熱患者 69 症例を検査し 9 症例をデングウイルス感染と診断した。国立感染症研究所においては各地の医療機関、衛生研究所から依頼のあった不明熱患者検体について検査し、76 症例中 35 例をデングウイルス感染と診断した。

4) 感染蚊からのデングウイルスゲノム検出：個々の蚊から総 RNA を抽出しないで粗抽出液を RT-PCR 反応に用いた場合は、特異的なプライマーを用いても PCR 産物が得られない例が

観察されたが、そこで、Isogen-LS 液によって個別別に蚊から総 RNA を抽出すると、RT-PCR 法で特異的な PCR 産物が得られた。個々の蚊から抽出した総 RNA をプールにして、RT-PCR 反応を行ったところ、総 RNA 濃度が高いほど特異的な PCR 産物が得られにくい傾向が観察された。この点を改善するために、プールにした蚊の総 RNA 液をカラムで再度精製したところ、特異的で明瞭な PCR 産物の泳動像が観察された。蚊 1 個体当たり抽出精製した総 RNA の 1/50 あるいは 1/10 を用いても、明瞭な 511 塩基数の特異的な PCR 産物が得られた。

5) 感染蚊からのウエストナイルウイルスゲノムの検出：個々の蚊から総 RNA を抽出しないで粗抽出液を RT-PCR 反応に用いた場合は、特異的なプライマーを用いても PCR 産物が得られない例が観察された。Isogen-LS 液によって個別別に蚊から総 RNA を抽出すると、RT-PCR 法で特異的な PCR 産物が得られた。

6) PCR 法によるネッタイシマカとヒトスジシマカの鑑別：ゲノム DNA 上にあるリボソーム DNA シストロンの ITS 2 領域を比較するために、ハエ目（双翅目）に共通して利用可能なプライマーを用いて PCR を行ったところ、両蚊種で特異的な PCR 産物が認められた。ネッタイシマカ（タイ国、グアテマラ、アフリカ）では約 350 bp の PCR 産物が得られたが、ヒトスジシマカ（日本、タイ国、アメリカ、アルバニア）では約 530 bp の大きさの異なる PCR 産物が得られた。両者の PCR 産物の大きさには約 180 bp の相違が認められたことから、形態的特徴が不明瞭となった両蚊種では、PCR 法の適用によって両種を区別することが可能な結果が得られた。

7) ヒトスジシマカ幼虫に対する寄生虫感染状況の検討：本邦産ヒトスジシマカ幼虫に寄

生する *Ascogregarina* sp. がどの程度広範に認められるかを昨年に引き続き調査した。東北、関東、関西、沖縄地方等広範に *A. taiwanensis* の寄生を認めた。寄生率および幼虫当たりの寄生栄養体数は発生源や発生場所によって大きな差が見られた。また、岩手県で採集されたヤマトヤブカ幼虫から類似した寄生原虫を分離し、タイ国チェンマイ市で採集したネツタイシマカからも同様の原虫を分離した。3種の寄生原虫を走査電顕で比較したところ、栄養体の後端部の構造とオーシストの表面構造にそれぞれ明瞭な違いが確認され、ヤマトヤブカ由来の *Ascogregarina* sp. は新種と考えられた。

(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に関する基礎的研究

- 1) リポソーム試薬による DNA ワクチンの免疫増強：リポソーム試薬は BALB/c、ICR、ddY マウスいずれの系統においても DNA ワクチンの中和抗体誘導能を増強した。しかし、リポソーム試薬の免疫誘導増強は雌マウスにおいてのみ観察され、雄マウスにおいては観察されなかった。従って、リポソーム試薬は DNA ワクチンにアジュバント効果を示すが、今回の調査条件においては性差が認められた。
- 2) サルにおける日本脳炎 DNA ワクチンの免疫誘導能：一回当たりに投与する DNA 量を 500 μ g に増量し、初回、4、8週目に3回筋肉内接種した。その HI 抗体価は表1に示すように、最終免疫後1週目(9週)で5頭中3頭に80倍から160倍の HI 抗体価が認められた。また、ウイルス中和抗体は4頭で20倍から40倍の値を示した。pNJEME を投与した1頭と対照 DNA 接種群4頭では抗体の上昇は認められなかった。
- 3) 実験的デング DNA ワクチンの開発：デングウイルス2型ニューギニア C 株の PreM お

よび E 遺伝子を組み込んだ DNA ワクチンは防御効果を示したが、非構造蛋白遺伝子のそれぞれを組み込んだ DNA ワクチンは防御効果を示さなかった。

4) 西ナイルウイルスに対する日本脳炎ワクチンの効果：現行日本脳炎ワクチンが西ナイルウイルスの致死感染を防御するか否かをマウスを用いて2施設で検討した。国立感染症研究所における検討では、日本脳炎ワクチン免疫後、西ナイルウイルスを脳内接種した場合、有意な防御効果を認めなかった。西ナイルウイルスを腹腔内接種した場合はある程度の効果を認めたが、十分な防御効果は示さなかった。一方、琉球大学における検討では、日本脳炎ワクチン免疫、日本脳炎ウイルス抗体を含むヒト血清の硫酸分画による受動免疫により、西ナイルウイルスの致死な脳内接種からマウスを防御した。従って、今後さらに研究を進める必要がある。

5) 日本脳炎ウイルス感染機序の新解析法の開発：ジフテリアトキシン A フラグメントを負荷した日本脳炎ウイルスを用いることにより、日本脳炎ウイルスの細胞への感染機序を解析する新しい方法を開発した。

6) 節足動物媒介性ウイルスレセプターの解析：シンドビスウイルスのレセプターとして 95kDa と 175kDa の2つの蛋白を検出した。さらに、アミノ酸配列の解析から Heat shock protein 90-alpha がシンドビスウイルスのレセプターであ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。

以上の研究計画に従い、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) ダニ媒介性感染症としてクリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対する分子生物学的診断法を確立した。2) 日本脳炎ウイルスとデングウイルス1型、3型、4型のキメラウイルスを作製し、これを用いたデングウイルス診断用抗原の大量産生方法を確立した。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、1) デングウイルス媒介蚊の分子生物学的区分法を確立した。また、デングウイルス媒介蚊からのウイルスゲノム検出法を確立した。2) 日本産アカエイカが西ナイルウイルスに感受性を有することを明らかにした。3) デング熱媒介蚊の分布と幼虫への寄生原虫の日本における分布状況を詳細に調査した。4) 米国からの帰国者血清、蚊、カラス血清中の西ナイルウイルス抗体を調査するシステムを確立し、上記検体を調査したがすべて陰性であった。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) 新トランスフェク

ション試薬を用い新型ワクチンとしての DNA ワクチンの中和抗体産生能を増強させることに成功した。2) デングウイルス NS1, NS2, NS3 を含む実験的 DNA ワクチンを作成した。3) 日本脳炎ウイルスの細胞への感染機構を単クローン抗体を用いて明らかにした。本年度の研究は、当初の計画に沿って進められ、以上のような成果を得た。

以上の結果は以下の点で厚生労働行政に貢献する。1) デング熱、西ナイル熱、クリミア・コンゴ出血熱等の診断法は旅行者による輸入感染症の実体把握に貢献する。また、検疫所等への技術移転によりウイルスの日本への侵入阻止に貢献し得る。2) ベクターの分布を把握し、感染蚊の検出法を整備することにより、ウイルスの日本侵入時における、早期の感染症対策を可能にする。3) 現在ワクチンが存在しない節足動物媒介性ウイルスに対するワクチン開発を推進する。

E. 結論

節足動物媒介性ウイルスに対する血清・病原体・遺伝子診断法として、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対する分子生物学的診断法を確立した。また、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、これを用いたデングウイルス診断用抗原の大量産生方法を確立した。媒介節足動物とウイルスの侵淫状況を把握するための技術開発と現状の把握として、デングウイルス媒介蚊の分子生物学的区分法を確立した。また、デングウイルス媒介蚊からのウイルスゲノム検出法を確立した。さらに、デング熱媒介蚊の分布と幼虫への寄生原虫の日本における分布状況を明らかにした。上記方法を用いて、米国からの帰国者血清、蚊、カラス血清

中の西ナイルウイルス抗体を調査するシステムを確立し、上記検体を調査したがすべて陰性であった。節足動物媒介性ウイルスに対する防御免疫の解明と新型ワクチンに必要な基礎技術の開発として、新しいトランスフェクション試薬を用い新型ワクチンとしてのDNAワクチンの中和抗体産生能を増強させることに成功した。デングウイルスPreMとE遺伝子、NS1, NS2, NS3, NS4, NS5のそれぞれを含む実験的DNAワクチンを作製した。日本脳炎ウイルスの細胞への感染機構を明らかにする方法を確立した。

F. 健康危機管理情報

熱帯亜熱帯地域において、デング熱・デング出血熱が大流行している。日本にはデングウイルスを媒介しうるヒトスジシマカが存在することを考慮しておくべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表

Gagnon, S.J., Leporati, A., Kalayanarooj, S., Vaughn, D.W., Stephens, H.A.F., Suntayakorn, S., Kurane, I., Ennis, F.A., and Rothman, A.L.: T cell receptor Vbeta gene usage in Thai children with dengue virus infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 64: 41-48, 2001

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

Takasaki, T., Takada, K., and Kurane, I.: Electron microscopic study of persistent dengue virus infection: Analysis using a cell line persistently infected with dengue-2 virus. *Intervirology*. 44:48-54, 2001.

Saijo, M., Niikura, M., Morikawa, S., Ogata, M., Ksiazek, T.G., Mayer, R., Peters, C.J., and Kurane, I.: Development of enzyme linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses, using recombinant nucleoproteins. *Journal of Clinical Microbiology*. 39:1-7, 2001

Saijo, M., Niikura, M., Morikawa, S., and Kurane, I.: Immunofluorescent method for detection of Ebola virus IgG, using HeLa cells which express recombinant nucleoprotein. *Journal of Clinical Microbiology*. 39:776-778, 2001

Niikura, M., Ikegami, T., Saijo, M., Morikawa, S., Miranda, M.E., and Kurane, I.: Ebola antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay using a novel monoclonal antibody to nucleoprotein. *Journal of Clinical Microbiology*. 39:3267-3271, 2001

Kurane I. and Takasaki T.: Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large.

Reviews in Medical Virology. 11:301-311, 2001

Ikegami, T., Calaor, A.B., Miranda, M.E., Niikura, m., Saijo, M., Kurane, I., Yoshikawa, Y., and Morikawa, S. : Genome structure of Ebola virus subtype Reston : differences among Ebola subtypes. Archives of Virology. 146:2021-2027, 2001

Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M., Nakayama, M., Arai, Y., Morimoto, K., Yabe, S. and Kurane, I. : The demographic features of imported dengue fever cases serodiagnosed in Japan during 2000. Dengue Bulletin. In press 2001

Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M., and Kurane, I. : Increase in sensitivity of dengue diagnosis by combination of reverse transcriptase-polymerase chain reaction and passage on cell cultures. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 32:470-471, 2001

Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M. and Kurane, I. : Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. Journal of Clinical Virology. 24:203-209, 2002

Takasaki, T., Nawa, M., Yamada, K., Takeda, A. and Kurane, I. : Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases. Journal of Virological Methods. 102:61-66, 2002

Saijo, M., Qing, T., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Sakai, K., Prehaud, C., Kurane, I., and Morikawa, S. : Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Journal of Clinical Microbiology. 40:372-375, 2002

Saijo, M., Qing, T., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Prehaud, C., Kurane, I., and Morikawa, S. : Recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Journal of Clinical Microbiology. In press 2002

Kurane I. : Immune responses to Japanese encephalitis virus. Current Topics in Immunology and Microbiology. In press 2002.

Morikawa, S., Qing, T., Xinqin, Z., Saijo, M., and Kurane, I. : Genetic Diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus isolates in China. Virology. In press 2002

Saijo, M., Suzutani, T., Niikura, M., Morikawa, S., and Kurane, I. : Genotypic and phenotypic characterization of thymidine kinase of acyclovir (ACV)-resistant herpes simplex virus type 1 experimentally

- derived from ACV-sensitive strain. Journal of Medical Virology. In press 2002
- Yamamoto, A., Nakayama, M., Kurosawa, Y., Sugo, K., Karasawa, H., Ogawa, T., Takasaki, T., Tashiro, M., and Kurane, I.: Development of a particle agglutination assay system for detecting Japanese encephalitis virus-specific IgM, using hydroxyapatite-coated nylon beads. Journal of Virological Methods. In press 2002
- Uda, A., Tanabayashi, K., Mukai, R., Yachi, M., Nam, K. H., and Yamada, A.: CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). J. Med. Primatol. 30, 141-147, 2001
- Takano, J., Narita, T., Fujimoto, K., Mukai, R., and Yamada, A.: Detection of B virus infection by the enzyme-linked immunoassay using simian agent 8 as antigen. Exp. Anim. 50, 345-347, 2001.
- Tanabayashi, K., Mukai, R., and Yamada, A.: Detection of B virus antibody in monkey sera using glycoprotein D expressed in mammalian cells. J. Clin. Microbiol. 39, 3025-3030, 2001
- Konishi E. and Fujii A.: Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. Vaccine 20:1058-1067, 2002.
- Eshita, Y.: Vector competence of Japanese mosquitoes against dengue viruses. SP World, No. 29: 13-17, 2001.
- Uchida, K., Ohmori, D., Ueno, T., Nishizuka, M., Eshita Y., Fukunaga, A. and Kominami, E.: Preoviposition activation of cathepsin-like proteinases in degenerating ovarian follicles of the mosquito *Culex pipiens pallens*. Developmental Biology 237: 68-78. 2001
- Oda, T., Eshita, Y., Uchida, K., Mine, M., Kurokawa, K., Ogawa, Y., Kato, K. and Tahara, H.: Comparison of reproductive activity and survival of *Culex pipiens pallens* and *Culex quinquefasciatus* in Japan at high temperature. J. Med. Entomol. 2001 In press
- Morales, R., Morita, K., Eshita, Y., Tsuda, Y., Fukuma, T., and Takagi, M.: Infection and dissemination of two dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities in orally infected *Aedes aegypti* from different geographic origin. Med. Entomol. Zool. 2002 In press
- Kobayashi, M., Nihei, N. & Kurihara, T.: Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system. J. Med. Entomol. 39: 4-11. 2002

江下優樹：フィリッピンにおけるデングウイルス媒介蚊の調査. しすと、34号：2002

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）. 日本検疫学会誌 3:67-70, 2001

森川茂、西條政幸、新倉昌浩、倉根一郎：ウイルス性出血熱と我国における検査体制. ウイルス 51: 215-224, 2001

滝沢慶彦、オリベラ恵、沢田春美、山田堅一郎、高崎智彦、倉根一郎：重症デング熱の1例. 市立札幌病院医誌 61:223-228, 2001

2. 学会発表

Konishi E., Fujii A. and Kurane I.: Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. The 35th Joint Viral Diseases Panel Meeting. US-Japan Cooperative Medical Science Program. Hawaii 2001.

Morikawa S, Saijo M, Niikura M, Tang Q, Kurane I. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antibody detection system using its recombinant nucleoprotein. 6th International Conference on emerging infectious diseases in the pacific rim (Manila), 2001

江下優樹、福田昌子、デュ・ジョーン・マハンディ・クルス、ロナルド・エンリケ・モラ

レス、山田堅一郎、倉根一郎、内田幸憲、長谷部 太、五十嵐 章：蚊類のアルボウイルス媒介能（1）RT-PCRによる蚊からのデングウイルスゲノムの検出。第53回日本衛生動物学会大会 2001年4月

福永昭廣、江下優樹、西尾恭好、内田桂吉、大森大二郎：アカイエカのピテロジェニンcDNAの解析：卵形成期には複数のピテロジェニン遺伝子が発現する。第53回日本衛生動物学会大会 2001年4月

高田容司、村中俊哉、江下優樹：本邦で採集されたデイルドリン抵抗性チャバネゴキブリのGABAA受容体遺伝子の解析。第53回日本衛生動物学会大会 2001年4月

福田昌子、江下優樹、安西三郎、大塚 靖、青木千春、高岡宏行、高崎智彦、山田堅一郎、内田幸憲、倉根一郎：蚊類のアルボウイルス媒介能（2）PCRを用いたウイルス媒介蚊の識別。第54回日本寄生虫学会南日本支部大会・第51回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会。2001年10月27日

福田昌子、江下優樹、安西三郎、大塚 靖、青木千春、高岡宏行、高崎智彦、山田堅一郎、内田幸憲、倉根一郎（2002）：蚊類のアルボウイルス媒介能（3）PCRを用いたデングウイルス媒介蚊2種の識別。第54回日本衛生動物学会大会大会、東京、一橋記念講堂、2002年4月

前田 秋彦、新倉 昌浩、西條 政幸、池上 徹郎、緒方もも子、倉根 一郎、森川 茂. ハンタウイルスの核蛋白(NP)とユビキチン様結合

酵素 Ubc9 との結合様式. 第 132 回日本獣医学
学会、岩手、2001

池上 徹郎, Calaor Alan B, Miranda Mary E,
新倉 昌浩, 西條 政幸, 緒方もも子, 倉根 一
郎, 吉川 泰弘, 森川 茂. 1996 年のフィリピン
のエボラウイルスレストン株流行施設内の
サルにおける抗体保有状況. 第 132 回日本獣
医学会, 岩手, 2001

新倉 昌浩, 西條 政幸, 池上 徹郎, 倉田 毅,
倉根 一郎, 森川 茂. エボラウイルスサブタ
イプを区別できる単クローン性抗体の認識す
る核蛋白上のリニアエピトープ. 第 49 回日
本ウイルス学会, 大阪, 2001

池上 徹郎, 新倉 昌浩, 西條 政幸, 緒方もも
子, 倉根 一郎, 吉川 泰弘, 森川 茂. エボラ
ウイルスレストン株の組み換え核蛋白発現
HeLa 細胞を用いた IFA の有用性. 第 49 回日
本ウイルス学会, 大阪, 2001

西條 政幸, 新倉 昌浩, 前田 秋彦, 池上 徹
郎, 倉根 一郎, 森川 茂. 組換え核蛋白を用
いたクリミア・コンゴ出血熱(CCHF)の診断と
中国における疫学的研究. 第 49 回日本ウイ
ルス学会, 大阪, 2001

森川 茂, 西條 政幸, 倉根 一郎, 森川 茂.
クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの M セグメ
ント RNA の塩基配列. 第 49 回日本ウイルス
学会, 大阪, 2001

奴久妻美代子、網代直子、小西英二:Vaxfectin
による日本脳炎 DNA ワクチンの中和抗体誘導
能促進. 第 49 回日本ウイルス学会 2001

鈴木智之、奴久妻美代子、小西英二:日本人
における日本脳炎ウイルス不顕性感染率の推
定. 第 49 回日本ウイルス学会 2001

小西英二:日本脳炎 DNA ワクチン:はたして
実用化されうるのか? 第 49 回日本ウイル
ス学会 2001

只野昌之、新川武、馬紹平、加根村和美、森
田公一、倉根一郎、福永俊彦:日本脳炎ワク
チンで免疫したマウスにおける西ナイルウイ
ルス致死感染に対する交叉防御. 第 49 回日
本ウイルス学会 抄録集 p172, 2001

加根村和美、只野昌之、馬紹平、森田公一、
倉根一郎、福永俊彦:沖縄県住民血清の西ナ
イルウイルスに対する交叉中和抗体測定. 第
49 回日本ウイルス学会 抄録集 p174, 2001

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予防効果. 第 49
回日本ウイルス学会 2001 11 月

高崎智彦:ニューヨークにおける西ナイル脳
炎 第 36 回日本脳炎生態学研究会 2001 5
月

山田堅一郎、高崎智彦、倉根一郎:デングウ
イルス感染症の実験室診断—病原体診断法の
検討—第 36 回日本脳炎生態学研究会 2001
5 月

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 2001 4月

小林陸生、二瓶直子、斉藤典子、佐々木年則、
栗原 毅、安居院宣昭(2001)岩手県産ヤマト
ヤブカに認められた寄生原虫 *Ascogregarina*
sp. について。第 53 回日本衛生動物学会、4
月 4 日 山形。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 国内特許

名称「日本脳炎ワクチンによる免疫の西
ナイルウイルス感染に対する交叉防御効果」

発明者：只野昌之（他 8 名）

別紙5. 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
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
Takasaki, T., Takada, K., and Kurane, I.	Electron microscopic study of persistent dengue virus infection: Analysis using a cell line persistently infected with dengue-2 virus.	Intervirolgy	44	48-54	2001
Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M., and Kurane, I.	Increase in sensitivity of dengue diagnosis by combination of reverse transcriptase-polymerase chain reaction and passage on cell cultures.	Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.	32	470-471	2001
Uchida, K., Ohmori, D., Ueno, T., Nishizuka, M., Eshita Y., Fukunaga, A. and Kominami, E.	Preoviposition activation of cathepsin-like proteinases in degenerating ovarian follicles of the mosquito <i>Culex pipiens pallens</i> .	Developmental Biology	237	68-78	2001
Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M. and Kurane, I.	Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection.	Journal of Clinical Virology.	24	203-209	2002

Takasaki, T., Nawa, M., Yamada, K., Takeda, A. and Kurane, I.	Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases.	Journal of Virological Methods.	102	51-66	2002
Saijo, M., Qing, T., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Sakai, K., Prehaud, C., Kurane, I., and Morikawa, S.	Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus.	Journal of Clinical Microbiology.	40	372-375	2002
Konishi E. and Fujii A.	Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine.	Vaccine	20	1058-1067	2002
Uda A., Tanabayashi K., Mukai, R., Yachi, M., Nam, K.H., and Yamada, A.	CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>).	J. Med. Primatol	30	141-147	2001
Parquet M.C., Kumatori A., Hasebe F., Morita K. and Igarashi A.	West Nile Virus induced bax-dependent apoptosis.	FEBS Letters	500	17-24	2001
Morita K., Tadano M., Nakaji S.,	Locus of a virus neutralization epitope on the Japanese	Virology	287	417-426	2001

Kosai K., Mathenge E. G. M., Pandey B. D., Hasebe F., Inoue S., and Igarashi A.	encephalitis virus envelope protein determined by use of Long PCR-based region-specific random mutagenesis.				
森田 公一	最近 20 年間に出現した感染症と地球マップ.	総合臨床	50	427-430	2001

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

クリミア・コンゴ出血熱の分子生物学的な診断法の有用性と問題点

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 (国立感染症研究所ウイルス第1部)

研究要旨

クリミア・コンゴ出血熱の迅速診断における RT-PCR によるウイルスゲノムの検出の有用性と問題点を明らかにした。これまでの報告 (Rodriguez LL, et al.: Molecular investigation of a multisource outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates. Am J Trop Med Hyg 57:512-8, 1997) による RT-PCR および nested PCR [PCR(A)] および CCHF ウイルスの中国分離株 (8402 株) の S-遺伝子の塩基配列に合わせて設計されたプライマーを用いた RT-PCR および nested PCR [PCR(B)] により、血清からのウイルスゲノムの検出を試みた。急性期 CCHF に罹患していると思われた患者から採取されたヒト血清 11 検体 (3 検体は同一患者から採取された) を被験血清とした。4 検体から CCHF ウイルスゲノムが検出された。その 4 検体のうち、PCR(A) と PCR(B) によりウイルスゲノムが検出されたのは 1 検体のみで、PCR(A) でのみウイルスゲノムが検出されたのは 1 検体で、PCR(B) でのみウイルスゲノムが検出されたのは 2 検体であった。また、PCR によりウイルスゲノムが検出された検体は、CCHF ウイルスに対する IgG 抗体または IgM 抗体のみが検出された血清か抗体が出現する前の血清で、IgM、IgG 両抗体が出現している血清からはウイルスゲノムは検出されなかった。このように PCR による CCHF の診断において用いられるプライマーのデザインや血清採取時期が結果に影響を及ぼすことから、PCR による診断の感度を上げるためには改良が必要である。また、CCHF の診断には PCR 以外の診断法を合せて施行する必要がある。

A. 研究目的. クリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) は、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される CCHF ウイルスによる感染症で、エボラウイルス感染症などと共に感染症新法では 1 類感染症に分類される。我が国においては CCHF ウイルスの扱いは高度安全研究施設 (P4 研究室) でのみ許されているが、CCHF ウイルスが我が国に存在しないことと P4 研究室の稼働が許可されていない現状では、感染性ウイルスを用いた CCHF の診断は不可能である。そこで、私たちは CCHF ウイルスの組換え抗原を用いた診断法 (抗体検出法, 抗原検出法) を開発した。

輸入感染症として出血熱患者が我が国において発生した場合には、正確かつ迅速な診断が必要である。私たちの研究室では出血熱ウイルスの組換え抗原を用いた血清学的診断法や分子生物学的診断法

(reverse transcription-PCR, RT-PCR) を用いて、総合的に CCHF を診断しようと考えている。しかし、我が国には CCHF は存在しないことから、これらの診断方法の有用性と問題点を評価できなかった。そこで、CCHF 流行地での疫学的研究を行い、これらの問題点を明らかにし、より信頼性の高い CCHF の診断法を開発しようと考えている。本研究では、CCHF の診断における分子生物学的診断法 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) の有用性と問題点を報告する。

B. 研究方法

1) 血清. 2001 年 5 月に新疆ウイグル自治区西部の CCHF 流行地で、急性期の CCHF 患者 (疑い例を含む) から採取された血清 11 検体 (検体 1-9, 71, 72) を用

いた。これらの血清は、CCHF の診断目的に採取された。ただし、これらの 11 検体のうち、3 検体 (8, 9 および 72) は CCHF の同一患者 (28 歳, 羊飼い) から経時的に採取された血清である。その 3 検体の発症から採取までの日数を表 2 にまとめた。

- 2) CCHF ウイルスに対する IgG 抗体検出。
IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による CCHF ウイルス抗体の検出の方法は、先に報告した (Saijo M, et al. Recombinant nucleoprotein based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. J. Clin. Microbiol., in press). 簡単に説明すると、CCHF ウイルスの組換え核蛋白をバキュロウイルス系を用いて発現させ、それを抗原とした ELISA である。約 100ng/well になるように精製された CCHF ウイルス核蛋白を ELISA 用プレート (Falcon 社) に 4°C 一晩吸着させた。5% skim milk/T-PBS でブロッキング後、それぞれの被験血清を 100 倍から 6400 倍まで 4 倍階段希釈し、37°C 1 時間反応させた。0.05% Tween 20 含有リン酸緩衝液 (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 倍希釈) 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 (Boehringer-Mannheim 社) を加え、37°C 30 分反応させ吸光度 (OD₄₀₅) 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、それぞれの希釈された被験血清について同様の反応をおこなった。そして対応する OD₄₀₅ から対照の OD₄₀₅ を差し引いた値を、組換え抗原に対する IgG 抗体の反応による OD₄₀₅ とした。
- 3) CCHF ウイルスに対する IgM 抗体検出。
抗ヒト IgM 抗体 (μ -chain specific, Zymed 社) を適量 ELISA プレートにコートした。5% skim milk/T-PBS でブロッキング後、階段希釈された被験血清を 1 時間 37°C の条件で反応させ、T-PBS で洗浄後に精製組換え CCHF ウイルス核蛋白を 1 時間 37°C で反応させた。同様に洗浄後、抗組換え CCHF ウイルス核蛋白ウサギ血清を反応

させ、さらに、洗浄後に HRP0-標識ヒツジ抗ウサギ IgG 抗体を反応させた。最後に T-PBS で洗浄した後、基質 (ABTS 液, Roche Diagnostics) を 37°C 30 分反応させ吸光度 (OD₄₀₅) を測定した。対照として、抗原を加えない well を用いて、それぞれの希釈された被験血清について同様の反応をおこない、対応する OD₄₀₅ から対照の OD₄₀₅ を差し引いた値を、組換え抗原に対する IgM による OD₄₀₅ とした。

- 4) RNA の抽出。血清中 RNA は、High Pure Viral RNA kit (Boehringer-Mannheim) を用いて抽出された。
- 5) RT-PCR および nested PCR。RT 反応および PCR は、Ready-to-go RT-PCR キット (Pharmacia Biotech 社) を用いて行われ、その条件は、42°C 30 分 (RT 反応), 95 度 5 分 (RT の不活化), 30 サイクルの 95°C 30 秒-52°C 30 秒-72°C 30 秒、および 72°C 5 分である。Nested PCR は、RT-PCR 産物をテンプレートとして、Ready-to-go RT-PCR キット (Pharmacia Biotech 社) を用いて行われ、その条件は 25 サイクルの 95°C 30 秒-52°C 30 秒-72°C 30 秒、および 72°C 5 分である。PCR に用いられたプライマーセット A は、論文 (Rodriguez LL, et al.: Molecular investigation of a multisource outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates. Am J Trop Med Hyg 57:512-8, 1997) に基づいて設計された。プライマーセット B は、中国 8402 株の S-遺伝子塩基配列に基づいて、プライマーセット A に相当させて設計された。それぞれのプライマーのアニールする S-遺伝子上の部位と増幅される DNA 産物の大きさを図 1 に示した。2% アガロースゲルで電気泳動後、増幅された DNA をエチジウムブロマイドで染色し、紫外線をあてて検出した。尚、プライマーセット A と B を、表 1 にまとめた。プライマーセット A とプライマーセット B を用いた RT-PCR/nested PCR を、便宜上それぞれ PCR (A) および PCR (B) とした。

C. 結果