

表4-2 ウイルス検査：検査対象ウイルスと検査法 —— 追加の方法 ——

1. ロタウイルス 2. SRSV(NLV) 3. SRSV(SLV) 4. アストロウイルス
5. 腸管アデノウイルス40/41型 6. 40/41型以外のアデノウイルス 7. その他

A. 電顕観察		都道府県(A群) N=46 n ₂ =42	政令市(B群) N=10 n ₂ =9
実施数 (n ₃) ¹⁾		4(10)	2(22)
ウイルス	1-5	2	
	1-4	1	
	一部	1	2

1): 6衛研のうち3衛研は当該方法が追加,
3衛研はロタ,NLVがルーチンで,アストロ,アデノが追加の検査

D. 遺伝子学的検査		(A群) N=46 n ₂ =42	(B群) N=10 n ₂ =9
実施数 (n ₃)		17(40)	5(56)
ウイルス	1.ロタ	10(59)	1
	2.NLV	0	3
	3.SLV	9(53)	1
	4.アストロ	7(41)	3
	5.アデノ40/41	3(18)	3
	6.アデノ	3(18)	3
	7.その他	2(12)	0

7: エンテロ2

B. ELISA等		都道府県(A群) N=46 n ₂ =42	政令市(B群) N=10 n ₂ =9	その他都市(C群) N=14 n ₂ =6
EIA				
実施数 (n ₃)		11(26)	2(22)	2(33)
ウイルス	2.NLV	4(36)	0	1
	4.アストロ	8(73)	0	0
	5.アデノ40/41	4(36)	2	0
1か3か6		7(64)	1	1

6衛研では当該方法が追加(うちNLVのみが2,
他は主にロタ,アストロ,アデノ40/41)

E. 分離

- A群: ロタウイルスの同定にPCR, シーケンス
実施各1衛研
腸管アデノウイルス40/41型に中和試験
実施2衛研
エンテロウイルスに中和試験実施1衛研
C群: エンテロウイルスに中和試験1衛研

C. ラテックス凝集等

RPHA

A群8,B群1の9衛研中,8衛研がロタウイルス検査に使用

表5 検査対象 原虫

1. 赤痢アメーバ 2. クリプトスポリジウム 3. ジアルジア 4. その他

検査対象	都道府県(A群)		その他都市(C群)	
	N=46	n ₄ =8 ¹⁾	N=14	n ₄ =3
1-3	6(75)		2	
2, 3	1(13)		0	
1	0		1	

1): 1衛研は質問5無記入

表7 特別プロジェクト調査研究の実施状況

		都道府県(A群)	その他都市(C群)
		N=46	N=14
実施数		8	1
質問 8 回答		7	1
期間	3年	5	
	3年以上	2	1
テーマ	下痢症ウイルス	5	1
	細菌・食中毒	2	
	食品媒介	2	
検体	臨床検体	7	1
	食品	2	

表6 分離病原体等の保存

	都道府県(A群)		政令市(B群)		その他都市(C群)	
	N=46	n=42	N=10	n=9	N=14	n=7
1.凍結保存	37(88)		8(89)		6(86)	
2.凍結乾燥保存	3(7)		0		0	
3.保存しない	0		0		0	
4.その他 ¹⁾	9(21)		1(11)		2(29)	

1): その他のコメント内容

分離病原体のみ保存(2)

菌種により凍結か保存培地で室温保存かを定める(3)

細菌の一部ではゼラチンディスクドルセット培地等(5)

原虫病原体はSAF固定液保存あるいはホルマリン固定保存(2)

検査材料保存(1)

表8 食中毒検査の実施機関

1. 全て保健所 2. 全ての細菌は保健所, ウイルスは衛研
3. 多くの細菌は保健所, 一部の細菌とウイルスは衛研 4. その他

	都道府県(A群)	政令市(B群)	その他都市(C群)
	N=46	N=10	N=14
実施	46(100)	10(100)	11 ¹⁾ (100)
1	0	0	0
2	1(2)	0	0
3	29(63)	0	0
4 ²⁾	16(35)	10(100)	11(100)

1): 区立は除く

2): 全て衛研

表9 サーベイランス検査を実施していない理由

都道府県	0 ¹⁾	全て無記入
政令市	2	・他の調査研究が忙しく余裕なし ・サーベイランス実施機関でない
その他都市	2	・他の機関で実施 ・検体が提出されない

1): 質問10の回答

表10 サーベイランス検査についてのコメント

		都道府県(A群) N=46	政令市(B群) N=10	その他都市(C群) N=14
コメント記入の施設数		19(41)	2(20)	3(21)
検体収集状況	・検体が集まらない	7	1	1
	細菌検査検体	3		
	原虫検査検体	1		
	・ウイルス検査のみ実施	3		1
	・実施要綱による検査指針では対象はウイルスのみ	1	1	
	・検査定点で検体数のバラツキによるバイアス	2		1
	・検体採取の予算なし	1		
・保健所職員による適切な搬入	1			
提言・問題点	・対象疾患として細菌性、ウイルス性を分けた方が良い	1		
	・宅配便が使えると便利	1		
	・検査対象に成人も加える必要性	1		
	・SRSVのプライマーの問題	1		
	・病院内での問題	1		1
	サーベイランスの主旨の不徹底	1		1
	ロタウイルスの臨床診断の普及により疫学データ集まりにくい	1		
・行政窓口がひとつでない弊害			1	
要望等	・SLV,アストロウイルス研修	1		
	・検体取り扱い特に保存温度			1

8. 手足口病及びヘルパンギーナの検査法に関する 開発・改良についての研究

分担研究者 宮崎 豊 (愛知県衛生研究所長)

共同研究者 山下照夫、花島由佳、伊藤 雅、藤浦 明、栄 賢司
(愛知県衛生研究所)

研究要旨 手足口病及びヘルパンギーナの原因ウイルスであるヒトエンテロウイルス A 群は、中和反応が難しいものや、乳のみマウスが必要なものが多く、遺伝子型によるウイルス同定の必要性が高い。そこで、本ウイルス分離株 (53 株、8 血清型) について、VP4、VP0 および VP1 領域の遺伝子解析によるウイルス同定の可能性の有無と、その信頼性の比較をおこなった。系統樹解析では、いずれの領域を用いても血清型と一致したグループに分類することができた。しかし、コクサッキーウイルス A8 型および A10 型では VP4 領域を用いた場合、異なる血清型標準株の中に同一血清型の標準株よりも相同性の高い株が存在した。系統樹解析の信頼度の指標となる boot-strap 値は VP1 領域が最も高く、VP4 領域が最も低かった。このことから遺伝子型によるウイルス同定には VP1 領域の解析が最適と考えられたが、そのプライマーに反応しない株の存在の可能性も考慮して、VP0 領域による同定手段も準備しておくべきであると思われる。

A. 研究目的

エンテロウイルスは小児感染症の原因ウイルスの一つで、感染症発生動向調査の対象疾患としては無菌性髄膜炎、脳炎、手足口病、ヘルパンギーナ等の起因ウイルスとして知られている。本ウイルスは中和反応による血清型別により 63 種類に分類されているが、その血清型により病気との関わりや流行に相違がある。したがって型別分類を実施することは公衆衛生上重要なことと考えられるが、その為の中和反応を行なうには組織培養の技術が必要なだけでなく、63 種全ての抗血清を常備する必要がある。また、同定までには多くの労力と時間も必要となる。一方、遺伝子解析技術の進歩に伴い、最新のウイルス分類学においては遺伝子型を主体とした分類が進められている。我々は昨年度の研究報告で、エンテロウイルス遺伝子の翻訳開始部位から 400 塩基の配列を比較することで、血清型別によるものと同じ解析結果が得

られることを報告した。同ウイルスの遺伝子解析による型別分類法については、Oberst らの報告による VP1 領域の約 337 塩基を比較するものと、石古らの報告による VP4 領域 (翻訳開始部位から 207 塩基) を用いるものが報告されている。そこで、昨年度の研究に用いたのと同じのヒトエンテロウイルス A 群分離株 (53 株、8 血清型) についてこれらの領域を調べ、我々が用いた VP0 領域 400 塩基による結果と比較した。

B. 研究方法

供試したウイルスは、2000 年～01 年の感染症発生動向調査の病原体検査により手足口病およびヘルパンギーナ患者から分離されたヒトエンテロウイルス A 群に属するウイルス 53 株 (CV-A2 型 5 株、4 型 4 株、5 型 4 株、6 型 3 株、8 型 13 株、10 型 3 株、16 型 5 株、エンテロウイルス (EV) 71 型 16 株) である。乳の

みマウスによる分離株は、遠心上清に等量のクロロホルムを加えて処理した後、ポリエチレングリコール（8%）と食塩（0.5M）を加え、4℃にて一晩放置した。10,000 rpm、10 分間遠心した沈渣を遠沈前と同量の滅菌蒸留水に再浮遊した。ウイルス培養細胞は凍結融解を繰り返したのち、10,000 rpm、10 分遠心分離した上清を用いた。

各ウイルス液から TRIzol LS Reagent (Gibco BRL) を用いて RNA を抽出し、Oligo dT とランダムプライマーを用いて cDNA を作成した。PCR 法では、VP1 領域は Oberst らが設定したプライマーセット (189 (+) : 5'-CAR GCI GCI GAR ACI GGN GC, 222 (-) : 5'-CIC CIG GIG GIA YRW ACA T) を、VP4 領域は Olive らの設計したプライマーセット (EVP4 (+) : 5'-CTA CTT TGG GTG TCC GTG TT, OL68 (-) : 5'-GGT AAY TTC CAC CAC CAN CC) を用い、その配列 (VP4 の場合は翻訳開始部位から 207 塩基) を決定した。標準株の塩基配列は公的データベース (GenBank, EMBL, DDBJ) から得た。各塩基配列は市販の遺伝子解析ソフト (GENETYX) にて解析した。

C. 研究結果

供試した 53 株全てから PCR 産物が得られ、それらの解析により塩基配列を決定した。各血清型に分類された株の塩基配列をヒトエンテロウイルス A 群に属する標準ウイルス 12 株との相同性を調べた。CV-A2 分離株は、VP4 領域では標準株の配列との相同性が 78.6%であったのに対し、血清型の異なるウイルス標準株とは最も相同性が高いもので 71.5%と、その差は 7.1%であった。これに対し VP1 領域の比較では、同一血清型で 80.8%、異なる血清型で 69.3%と、その差は 11.5%であった。CV-A4、CV-A5、CV-A16、および EV71 型分離株についても同様に、VP4 領域よりも VP1 領域の方が同一血清型とそうでないものとの相同性の差が大きかった。VP0 領域はその中間であった。一方、CV-A6 分離株では、VP4 領域を用いた場合、同一血清型と異なる血清型の標準株と同一の相同性を示す株が存在した。さらに CV-A8 および CV-A10 分離株では、異なる血清型の中に同一血清型よりも相同性が高い株が存在した (表 1)。

各領域の塩基配列を用いた系統樹解析の結果を図 1~3 に示した。VP4、VP0、VP1 いずれの領域の比較においても分離株は全て同一血清型の標準株と同じ位置に収束した。図中の数字は boot-strap 値 (結果の正確度を現す値) であるが、その値を表 2 に比較した。VP1 領域の比較では boot-strap 値は全て 100 となり、この結果の精度が高いことを示していた。これに対し、VP4 領域の解析では、CV-A6、A8、A10 が低い値 (15 から 45) であった。VP0 領域の解析では CV-A6、A8、A10 の値は 62~92 と VP4 領域の解析と比較すると VP1 領域の boot-strap 値に近い値であった。

D. 考察

近年、EV71 型による手足口病が重症化し、脳炎や死に至る例が報告されている。一方、CV-A16 や CV-A10 も手足口病を発症するが、重症化するか否かは不明である。したがって、手足口病患者の重症化の可能性及びその割合を知るためには、分離ウイルスの正確な型別分類が必要と考えられる。しかしながら、これらのウイルスでは中和反応による血清型別分類が困難な場合がしばしば存在する。そのような場合、遺伝子解析による血清型別分類法は有効な手段と期待される。また、CV-A2-8、および CV-A10 はヘルパンギーナを引き起こすことで知られるが RD-18S 細胞を用いても分離培養が困難なものが多く、乳のみマウスを使った検査が必要とされる。しかしながら、その中和反応には多数の乳のみマウスが必要となることから、遺伝子解析による血清型別分類は実験動物の使用数を減らす意味においても重要であると考えられる。

今回の検討の結果、A 群ヒトエンテロウイルスについては、Oberst らの推奨する VP1 領域 330 塩基の配列の比較による分類が最も信頼のおけることが判明した。VP4 領域の比較では、異なる血清型の標準株の中に同一血清型の標準株より相同性が高い株が存在することが判明した。系統樹解析では同一血清型の株と同じ位置に収束したが、高い信頼性は得られなかった。従ってこの領域を用いたウイルスの型別分類は不適切であることが判明した。

一方、VP4 や VP0 領域を標的とした Olive らの

プライマーはエンテロウイルスのみでなくライノウイルスの遺伝子も検出可能であることから、エンテロウイルスを検出するためのRT-PCR法としては信頼性の高い方法である。VP1領域は、構造タンパクの中で最も変異が多く、かつ、中和抗原決定部位も多く存在することから、この領域を用いた遺伝子型別による分類が他の領域（VP2、3、及び4）と比べ中和反応を用いた分類と最も強く相関することは、標準株の比較からも知られている。しかしながら、変異も多いことから、この領域を標的とするプライマーに反応しない株が存在する可能性も少なくないと考えられる。したがって、VP1領域を標的として解析する場合、RT-PCR法で陰性であっても、VP4領域を標的とするプライマーを用いて反応の有無を確認する必要があると考えられる。

一方、VP4とVP0領域の解析には同じプライマーを用いているが、比較する領域が翻訳開始部位から208塩基（VP4）と400塩基（VP0）の違いがある。今回の結果から、相同性による比較や系統樹解析の信頼度はVP0領域を用いた場合の方が高いことが明らかとなった。したがって、VP1領域を標的とするOberstらのプライマーによるRT-PCR反応が陰性で、VP0領域を標的とするOliveらのプライマーにのみ反応した場合は、翻訳開始部位からできるだけ長い領域の塩基を比較したほうが、精度の高い解析結果が得られると考えられた。

今後は直接患者検体からウイルス遺伝子を回収し、その血清型別分類を遺伝子解析によって行なうことも必要と考えられる。その場合には、再度これらのプライマーの検出感度を比較検討する必要があると考えられる。

E. 結論

ヒトエンテロウイルスA群のVP4とVP0およびVP1領域の遺伝子配列を標準株と分離株について解析し、ウイルスの遺伝子配列を用いた型別分類の可能性について比較検討した。供試した血清型既知の分離53株（8血清型）はいずれの領域の系統樹解析においても同一血清型の株は同じグループに分類することができた。しかし、VP4領域の比較では、異なる血清型標準株の中に同一血清型の標準株よりも相同性の高い株が存在し、系統樹解析の信頼度は

低かった。遺伝子型によるウイルス型別分類にはVP1領域が最も適しているが、そのプライマーに反応しない株の存在の可能性も考慮してVP0領域による型別分類の手段も準備しておくべきであると思われる

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 山下照夫、椛島由佳、伊藤 雅、栄 賢司：コクサッキーA群ウイルスの遺伝子解析による同定。第43回日本臨床ウイルス学会 秋田 2002.6.6-7.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表 1 各遺伝子領域における分離株と標準株の相同性 (%) による比較

血清型	同一および異なる血清型標準株との相同性と差 (%)								
	VP4			VP0			VP1		
	同	異	差	同	異	差	同	異	差
CV-A2	78.6	71.5	7.1	78.0	75.8	2.2	80.8	69.3	11.5
CV-A4	79.7	74.5	5.2	79.9	76.0	3.9	86.2	66.0	20.2
CV-A5	83.1	74.9	8.2	84.0	75.2	8.8	85.9	73.4	12.5
CV-A6	76.8	76.7	0.1	79.8	77.5	2.3	85.3	70.0	15.3
CV-A8	76.7	77.8	-2.1	80.8	75.2	5.6	81.9	74.6	7.3
CV-A10	74.8	78.6	-3.8	76.5	76.0	0.5	78.7	71.4	7.3
CV-A16	81.6	71.5	10.1	79.8	74.8	5.0	77.2	65.0	12.2
EV-71	82.1	70.4	11.7	77.8	68.6	9.2	77.5	65.6	11.9

表 2 遺伝子領域毎の遺伝子型別分類による分離株と標準株の boot-strap 値

血清型	比較した領域 (塩基数)		
	VP4 (207)	VP0 (400)	VP1 (330)
CV-A2	94	88	100
CV-A4	89	85	100
CV-A5	99	100	100
CV-A6	37	86	100
CV-A8	15	92	100
CV-A10	45	62	100
CV-A16	100	99	100
EV-71	100	100	100

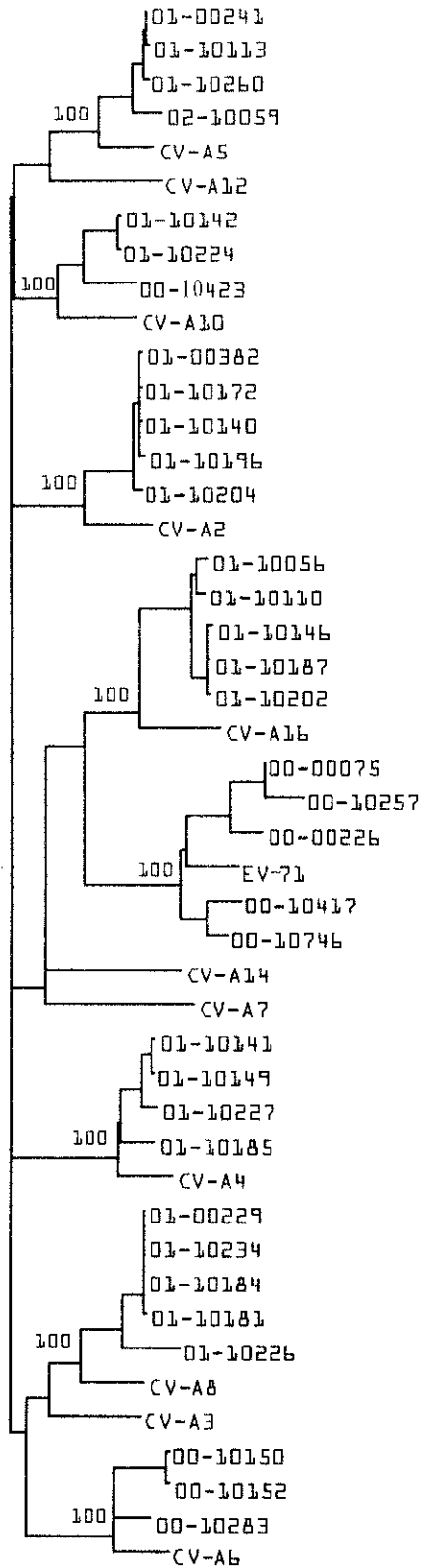


図1、A群エンテロウイルス分離株と標準株のVP1領域337塩基の系統樹解析 (NJ法)。標準株を血清型で示し、分離株は数字で示す。

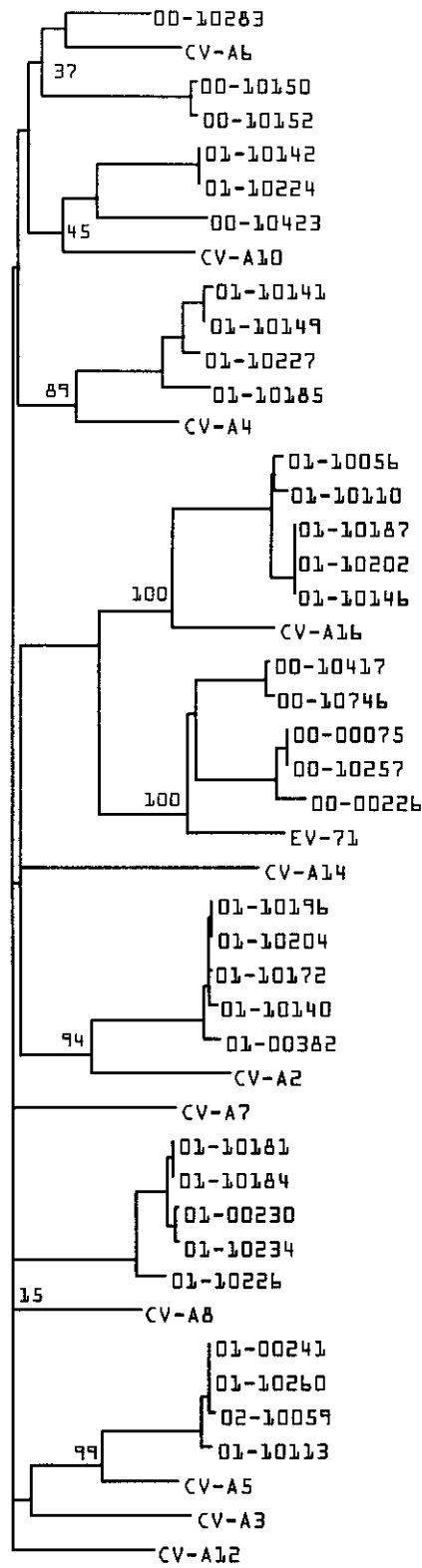


図2、A群エンテロウイルス分離株と標準株のVP4領域207塩基の系統樹解析 (NJ法)。標準株を血清型で示し、分離株は数字で示す。

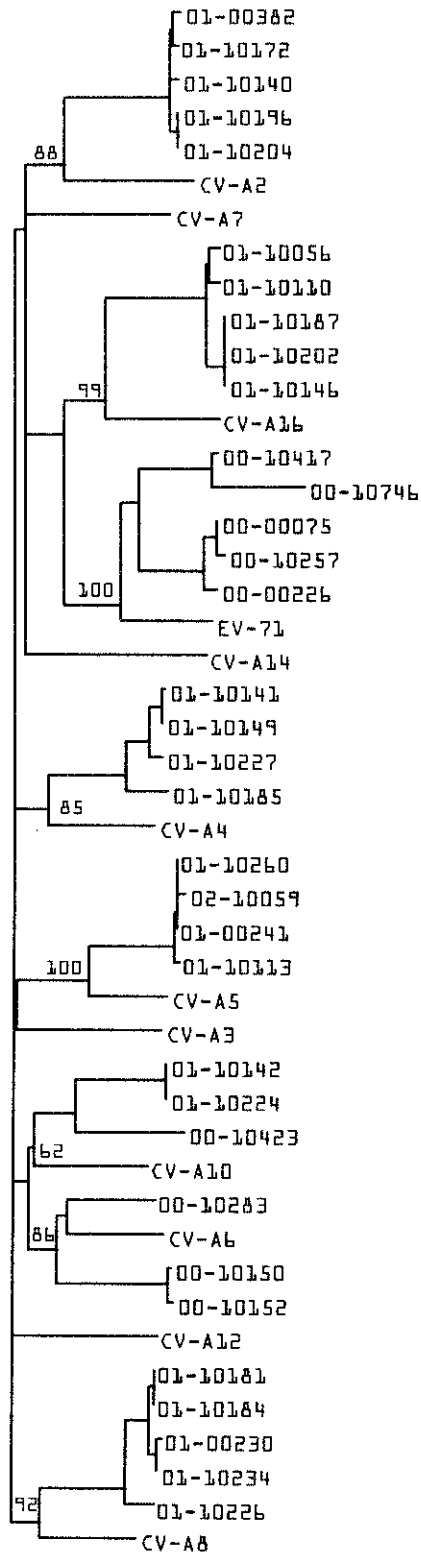


図3、A群エンテロウイルス分離株と標準株のVP0領域400塩基の系統樹解析 (NJ法)。標準株を血清型で示し、分離株は数字で示す。

9. 診断・検査法の普及に関する研究

分担研究者 岡部 信彦（国立感染症研究所感染症情報センター長）

研究協力者 木村 幹男（国立感染症研究所感染症情報センター室長）
多屋 馨子（同室長）、稲田 敏樹（同室長）
西尾 治（同室長）、伊藤 健一郎（同室長）
山下 和予（同主任研究官）、斎藤 剛仁（同研究員）
加藤 信子（同技術補助員）

研究要旨 分担研究者および共同研究者の所属する感染研感染症情報センターでは、疾患サーベイランスとともに病原体サーベイランスを行っている。平成12年度には、個別患者および集団発生ごとの個票がオンラインで情報センターに集まり、全国で分離された病原体に関し疾患別、病原体別、発生状況別などについて検体採取日順に並べた一覧表を作り、これを厚生省WISHネットに掲載するようになった。また通信システムもFTP転送システムなどが導入された。これらによって保健所、地研などで集計された還元情報がより速やかに得られるようになった。一般への情報提供としては、これらのうち重要と思われるものについて随時図表化するなどして、ホームページ上に掲載するようにしている。平成13、14年度には、これらに関するシステムの一部変更などが行われた。感染研および地研が協力して診断・検査マニュアルの作製が行われているが、感染症情報センターでもその一部を担当し作成した。検査法を含めた感染症対策に関する講習会の実施などについては、現在感染症情報センターにおいて、全国あるいは各地を対象とした感染症危機管理研修会、地方衛生研究所などを対象としたウイルス検査コース、細菌検査コース、新興再興感染症コースの開催、稀少感染症研修会への協力などを行っている。

A. 研究目的

近年、感染症は国民の健康にとり益々大きな脅威となっている。感染症の発生情報を正確に把握し、その結果を国民や医療関係者に的確に提供することは、感染症の制圧に向け最も重要な方策の一つである。新たに、施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」においては、73疾患について全数ないし定点からの報告が義務づけられている。診断にあたっての臨床所見の重要性は言うまでもないが、血清および病原体診断の確定診断における持つ意義は大きい。血清や髄液中の特異抗体を調べる方法としてELISA、HI法、中和法等が用いられ、一方、病原体診断においても病原体分

離やPolymerase chain reaction (PCR) 等種々の方法が用いられる。しかし、診断方法の選択は施設ごとに異なっている場合が多い。さらに、同様の方法を用いていたとしても、多くの場合全国的に標準化されたものではなく、精度、特異性やレファレンスは施設ごとに異なっていることが多い。このことは、種々の感染症の発生に関する情報の信頼性を損なうことにもなりうる。本研究においては、このような問題を解決するために、上記73疾患を中心として、以下の4点を目的として行うものである。(1) 各感染症に対する血清および病原体診断法を確立、あるいは再検討する、(2) 広く行われている診断・検査法については標準化、精度管理のシステムを構築する、(3) 診断・検査法を全国的に普及さ

せるための基礎資料を作製する、(4)検査法マニュアル作製の基礎資料を作製する。以上のように、本研究は、感染症の診断・検査をとおして、その制圧に直接的に関わるものである。従って、国民の保健・医療の向上に大きく貢献するものである。

分担研究者は、ことにこれらの情報の収集と提供という点が主な担当となっている。

B. 研究方法

平成11年4月に施行された感染症の予防及び感染症の患者の医療に関する法律（感染症法）では、サーベイランスシステムの強化が示されている。また感染症を正しく把握し的確に対応するためには病原体に関する情報も重要であり、患者発生状況サーベイランスと同様に病原体に関する情報の収集、分析及び提供と公開も必要であることが同法では明確にされている。さらに、提供・公開していく内容は一般国民や第一線の医療現場にいる者にとって有益な情報になること、とされている。

感染症法では対象疾患を1-4類に類型し、そのすべてが感染症サーベイランスの対象疾患となっている。得られた情報は各地域でも解析・還元されるが、保健所⇒都道府県等⇒厚生省⇒感染研、地研⇒感染研がそれぞれオンラインで結ばれ、厚生省および感染研で国全体のデータとして解析し、還元が行われている。国全体の情報は中央感染症情報センターである感染研感染症情報センターがとりまとめて情報還元を行うことになっているが、都道府県等の単位については地域におけるより詳細な感染症情報の分析と提供のために、地方感染症情報センターが整備されつつある。

病原体情報については、地方衛生研究所（地研）で分析された結果が同じく国を経由して感染症情報センターに通知されることになっている。感染症情報センターでは病原体情報についても、同様にそのデータを集計、解析して情報の還元を行っている。

これらの情報はWISHネットを使ったクロードな情報提供と、ホームページを利用した広い情報提供の二つの方法がある。

本研究は、これらを利用してより有効な情報の提供を図ろうとするものである。

(倫理面への配慮)

本研究では、取り扱う情報の中に個人が特定されるような情報が含まれたとしても、それを研究の結果として含むようなことはしない。従って研究成果の公表にあたって個人的情報が含まれることはない。万一個人的情報が本研究の中に含まれる場合には、それに関する機密保護に万全を期するものである。

C. 研究結果

2000年1月からは、個別患者および集団発症ごとの個票がオンラインで感染症情報センターに集まり、全国で分離された病原体に関し疾患別、病原体別、発生状況別などについて検体採取日順に並べた一覧表を作り、これを厚生省WISHネットに掲載するようになった。その結果、保健所、地研などではこれらの集計された還元情報が速やかに得られるようになった。一般への情報提供としては、これらのうち重要と思われるものについて随時図表化するなどして、ホームページ上に掲載している。

平成13年度は、病原体情報システムの改善のために、衛生微生物技術協議会検査情報委員会などを介して地研各ブロックにおける意見要望などをまとめ、インフルエンザ分離情報入力改善のためのVersion 4.2配布（平成13年10月）、WISH-Net無手順接続廃止に伴う通信部分のシステム変更に伴う連絡およびVersion 4.3への修正（FDおよびアニュアルの配布、平成14年1月）、Version 4.3に発生した不具合修正のための機能改善システムVersion 4.4の配布を行い、現在Version 4.52を使用している。

改善点として、通信システムが改良された結果、送受信の時間が大幅に短縮されたことを特筆に値する。一方、定期的な還元ファイルのダウンロードとPCへの取り込みが必要であること、これに時間を要すること、還元は月に1回であるため最新データの加工が地研側で出来ないこと、システムの定期的なメンテナンスが必要であり、そのための維持運営費が常に必要であることなどがあげられる。

なおこれらの研究および実施は、本研究班単独によって行っているものではないため、その内容の一部には他研究班の報告書と重複の可能性のあることを申し添えておく。

現在本研究班の活動として、感染研および地研が協力して診断・検査マニュアルの作製が行われているところである。分担研究者は、流行性角結膜炎、咽頭結膜熱、マラリア、突発性発疹症、伝染性紅斑などを感染症情報センターとして担当した。

検査法に関する講習会、実施などについては、現在感染症情報センターにおいては、毎年1回全国の感染症危機管理研修会の開催を行っている。対象は全国都道府県・指定都市の衛生主幹部局および管内保健所の医師である。平成13年度も2日間にわたり、受講者約130名を対象に感染症に関する研修を行った。平成14年4月から感染症情報センターには第5、6室が新設され（旧公衆衛生院微生物部より移行）、地方衛生研究所技術職員を主な対象として、ウイルス検査、細菌検査などの講習を行い、微生物学的診断・検査法の普及、標準化を行っている。また感染症研究所で行っている希少感染症診断技術向上連絡会議開催へ協力を行っている。

D. & E. 考察と結論

病原体情報については、地方衛生研究所（地研）で分析された結果が同じく国を經由して感染症情報センターに通知されていたが、従来その結果は最初の情報収集者である保健所あるいは地研、地方感染症情報センターなどに還元されるためには、長時日を要していた。2000年1月からは、個別患者および集団発症ごとの個票がオンラインで情報センターに集まるようにシステムが改善されたため、全国で分離された病原体に関し疾患別、病原体別、発生状況別などについて検体採取日順に並べた一覧表を作り、これを厚生省WISHネットに掲載するシステムが構築されるようになった。その結果保健所、地研などではこれらの集計された還元情報が速やかに得られるようになった。通信システムが改良された結果、送受信の時間が大幅に短縮されたことは特筆に値する。一方、定期的な還元ファイルのダウンロードとPCへの取り込みが必要であること、これに時間を要すること、還元は月に1回であるため最新データの加工が地研側で出来ないこと、システムの定期的なメンテナンスが必要であり、そのための維持運営費が常に必要であることなどが今後の問題点としてあげられる。

WISHを用いた還元情報の利用度はまだそれ

ほど高いものではなく、情報提供である我々側の情報の作成方法の問題などとともに、受けて側の電子化および端末の機械の問題など、今後改善すべき課題も多くある。そのために病原体情報システムの改善を目的として、衛生微生物技術協議会検査情報委員会などを介して地研各ブロックにおける意見要望などをまとめ、逐次システムの改善修正のための研究実施を行い、より効率の良い質の高いサーベイランスの実施を行っている。但しこのためにはサーベイランス全体の広範な領域にその対象が及ぶため、これらの研究および実施は、本研究班のみではなくその他の研究班活動に支援も受けながら総合的に行っており、報告内容の一部には他研究班への報告書と重複の可能性がある。

感染症情報センターホームページのアクセス件数は月およそ1万以上と高くなっており、医療機関、保健行政機関、研究検査機関、教育機関、メディア、一般国民など、広く利用されつつある。その中で、公的な研究班などで作成された感染症の診断などに関するマニュアル等の掲載は、感染症診断のための知識の啓発、技術の普及のために有用である。しかし、今後これらをすべて掲載していくことは不可能であり、新たなサーバーあるいはウェブの設置などの必要性が逼迫した問題となってきた。

感染症情報センターで行っている感染症危機管理研修会は、都道府県・指定都市の衛生主幹部局および管内保健所の医師が対象であり、受講者の数は限られている（1回120-140名）。しかし受講者は、地域に戻り地域での研修会を開催するなど、活発な動きとなっており、情報センターはこれを積極的にバックアップするようにしている。実際に受講者がその後研修会などで発表されたものと類似の感染症発生時例に遭遇し、直ちに地域および感染研と連携して積極的実地疫学調査および病原体検索を行い、アウトブレイクの対応に寄与したという事例が増加しつつある。今後感染症への適切な対応が可能になる人材がさらに育っていくことが期待される場所である。平成14年においては9月19-20日、平成14年度感染症危機管理権集会を開催し、約140名の出席であった。次年度も継続して開催して欲しいとの要望を受けている。

平成14年4月から感染症情報センターには第5、6室が新設され（旧公衆衛生院微生物部より移行）、地方衛生研究所技術職員を主な対象

として、ウイルス検査、細菌検査などの講習を行い、微生物学的診断・検査法の普及、標準化を行っている。

感染研、地研、病院検査室、大学、民間検査施設への診断・検査法の普及のための、講習会や実習のシステムを構築するためには、これらのノウハウを利用することも含め、さらなる議論を重ねることが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 感染症情報センターホームページ
<http://idsc.nih.go.jp/index-j.html>
2. 病原微生物検出情報（毎月出版）
3. 感染症情報の入手方法 田中 毅、岡部信彦 JIM 12(4): 325-327, 2002.
4. 熊本県におけるツツガ虫病の診断・報告の現況 -感染症サーベイランスの重要性- 松井珠乃、大山卓昭、岡部信彦、小野友道 日本皮膚科学会雑誌 112(9): 1253-1255, 2002.
5. Infectious Disease Surveillance Designated by the Infectious Disease Control Law, and the Situation of Emerging/Re-emerging Infectious Diseases in Japan. Okabe N. Jap J Med 41(1): 61-62, 2002.
6. 海外における感染症の情報 岡部信彦 臨床と研究 79(4): 611-614, 2002.
7. 日本の感染症サーベイランス 岡部信彦 小児科学 第2版 P.689-693 監修・白木和夫、前川喜平 医学書院 2002.6.
8. わが国における感染症サーベイランスシステム -感染症情報の収集と還元- 岡部信彦 編・柳 雄介、植田浩司、高月 清、西村泰治 感染症研究の新戦略-阿蘇シンポジウム 2001- 南山堂 2002.7.
9. 特集: 感染対策の理論と実際 新興・再興感染症とその対策 岡部信彦

現代医療 34(11): 2624-2629, 2002.

10. 特集「輸入感染症」輸入感染症と感染症法におけるサーベイランス 岡部信彦 小児科診療 65(12): 2025-2031, 2002.
11. 日本の感染症サーベイランス 岡部信彦 日本皮膚科学会雑誌 112(13): 1683-1685, 2002.
12. 新世紀の感染症学 グローバル時代の感染症-本邦の現状- 岡部信彦 日本臨床 61巻増刊号2 9-15, 2003.
13. 感染症週報 (IDWR) からみる日本の感染症の動向 岡部信彦 現代医療 35(1): 42-52, 2003.

H. 知的所有権の取得状況

なし

10. インフルエンザ HI 抗体測定法の改良、麻疹 IgG 抗体の親和性測定法の確立、麻疹中和抗体測定法の改良および簡易麻疹 IgM 抗体測定法の開発

分担研究者 田代 真人（国立感染症研究所ウイルス第三部長）

研究要旨 1) 最近のインフルエンザウイルスは従来動物赤血球を凝集しない傾向が強くなり、HI試験を施行するのに困難が生じている。そこで、すべてのウイルス株に使用可能なインフルエンザHI抗体測定用の標準人工赤血球の開発を試みた。2) 最近増加している成人麻疹では、初感染かワクチン接種後の二次性ワクチン効果不全(SVF)かの鑑別は容易ではない。そこで、初感染と再感染を鑑別するために、既存のELISAキットと6M尿素処理を用いたIgGアビディティー測定法を開発し、その有用性を確認した。3) Vero細胞を用いて分離・継代された従来麻疹ウイルス株は、リンパ球で分離された最近の流行ウイルスとはレセプター特異性が異なり、これらに対する中和抗体を同時に比較定量することは技術的に困難である。この問題解決のために、両ウイルスのレセプターを発現するSLAM/Vero細胞を用いた中和抗体測定法を開発し、その有用性を示した。4) 麻疹サーベイランスでは、他の発疹性疾患との鑑別が必要である。その手段として急性期麻疹患者における簡便なIgM抗体測定法を開発し、その有用性を確認した。

A. 研究目的

1) 最近流行しているA型インフルエンザウイルスは、従来から広く用いられてきたニワトリ赤血球やモルモット赤血球を凝集しない傾向にあり、更にWHOの標準法において使用されているシチメンチョウ赤血球をも凝集しない株も頻りに検出されるようになってきている。そのため、インフルエンザウイルス株の抗原解析方法として、簡便で感度も良く、世界的に普及している赤血球凝集抑制（HI）抗体の測定が困難な場合が多い。そこで、すべてのウイルス株のHI試験に使用可能な標準赤血球が求められているが、現時点では自然界の赤血球には適当なものが見つからない。

一方、インフルエンザウイルスのレセプターであるシアル酸を末端に持つ糖鎖の構造については、詳細な研究が行われて、その全貌が解明されつつある。その結果、すべてのウイルス株に対して被凝集性を持つ糖鎖レセプターの組み合わせが可能が出て

きた。

そこで、適当な担体にこれらの糖鎖を結合させて、すべてのインフルエンザウイルス株に対して被凝集性を持ち、さらに長期保存の可能な標準人工赤血球の開発を目的として、これらの設計・開発を進めた。

2) 最近我が国では、成人麻疹例が増加している。成人麻疹は小児期の患者に比較して一般に重症傾向を示し、死亡例も多いことから、その対策が問題となっている。さらに、小児期におけるワクチン接種歴が確認されているにもかかわらず、青年・成人期になって、麻疹に罹患する二次性ワクチン効果不全（SVF）の報告も増加している。一般にSVFは修飾麻疹と呼ばれる軽症の経過をとることが多いが、中には重症例も存在する。また、これらの患者はウイルスを排泄しており感染源となることから、公衆衛生面でもその対策が緊急課題となっている。成人麻疹においては、免疫記憶の無いヒトにおける初感染なのか、ワクチン接種後の

SVFなのかの鑑別が重要となるが、IgM抗体は両者で出現するので、その鑑別は容易ではない。

一方、麻疹ウイルス（生ワクチンを含む）の初感染時においては、感染初期のIgG抗体はウイルスとの結合親和性（avidity）が低く、尿素などの存在下では抗原抗体複合体は解離しやすいが、その後B細胞における体細胞突然変異によって、麻疹抗原とよりavidityの強い抗体が選択されて産生されるようになることが知られている。これに対して、既に過去の感染によってavidityの高い抗体産生の免疫記憶を持っている場合には、感染初期から高いavidityの抗体が産生される。これを応用して、IgG抗体のavidityの違いを定量することによって、感染時期を推定することが可能である。そこで、成人麻疹における初感染と再感染（SVFを含む）を鑑別するために、麻疹抗体測定ELISAキットと尿素処理を用いて、IgGアビディティー測定法を開発した。

- 3) 従来から麻疹ウイルスの分離・中和抗体測定、研究等にはVero細胞が広く用いられてきた。Vero細胞を用いて分離・継代された従来の麻疹ウイルス株（実験室継代株）は、B95a細胞等のリンパ球で分離・継代された最近の流行ウイルスとは細胞宿主域やサル病原性などの性状が異なっているため、これらのウイルスに対する中和抗体を同時に比較定量することは技術的に困難である。

一方、Vero細胞馴化ウイルスはCD46をレセプターとして、B95a細胞分離野生株はSLAMをレセプターとして利用することが示されており、SLAM遺伝子を導入・発現させた組換えVero細胞SLAM/Vero細胞は、両方のウイルスに感受性を示す。

そこで、過去の流行株と現在の流行株に対する中和抗体価を同時に比較定量するために、SLAM/Vero細胞を用いた麻疹中和抗体測定法を開発し、その感度と特異性を検討した。

- 4) 麻疹の疾患サーベイランスにおいては、麻疹やエンテロウイルス感染症等の他の発疹性疾患との鑑別が必要である。その手段として急性期麻疹患者における血清IgM抗体の検出が簡便で信頼性が高い。しかし、現在のIgM測定方法の多くはELISAを用いる

ものであるため、高額の機械や電力を必要とし、消耗品を含めて検査の価格が高くなる。WHOでは、麻疹に対する拡大予防接種計画（EPI）を推進するに当たり、電力や特殊機器が不要で、特別な熟練を要せず短時間で結果を得ることが出来、安価な簡易IgM抗体測定法の開発を強く求めており、その普及が麻疹EPIには必要不可欠であるとしている。そこで、我々はこれに応じて、我々が先に開発して実用化されている麻疹抗体測定キット（ゼラチン粒子凝集法、PA法）を応用して、IgM捕捉PA法を開発した。このキットに関して、特異性と感度を検討した結果、十分に実用化が可能であるとの結論に達した。そこで、昨年までに我々が開発したIgM捕捉ビーズ凝集法を各国に供与して性能試験を施行した。その結果、WHOの性能試験でも高く評価され実用化を要請されたので、簡易キットを進めた。

B. 研究方法

- 1) インフルエンザウイルスの赤血球凝集活性を検出するための担体としては、赤血球とほぼ同じ大きさと比重を持ち、肉眼的に凝集塊が認識されやすい粒子が望ましい。そこで、先に開発したセラミックで被覆したナイロンビーズ（赤色に着色）を用いた。インフルエンザウイルスに対するレセプターであるN-アセチルシアル酸をガラクトースに $\alpha(2-6)$ または $\alpha(2-3)$ 結合させた様々なオリゴ糖鎖を合成し、これをセラミック粒子の表面に様々な条件で結合させた。これらの粒子について、ウイルス分離株を用いて凝集反応を行い、ニワトリ、モルモット、シチメンチョウの赤血球を用いた赤血球凝集反応の結果と比較検討した。次に、各種抗ウイルス抗血清を用いて、HI試験を行い、その結果を赤血球を用いた従来の方法と比較検討した。
- 2) 成人麻疹患者血清およびワクチン接種者の血清について、通常のELISA法により抗体価を求めた。次に、同じ検体について、ELISAにおける血清吸着後に、様々な濃度の尿素で各ウェルを様々な回数で洗浄し、その後定法通りの測定を行った。両者の吸光度の比率を求めて、avidityの指標とした。
- 3) 麻疹ウイルス実験室継代株に対するレセプ

ター分子CD46を発現しているVero細胞に対して、野生株麻疹ウイルスに対するレセプターSLAMの遺伝子DNAを発現するプラスミドをトランスフェクションした細胞株SLAM/Vero細胞は、九州大学医学部柳雄介教授から分与された。攻撃ウイルスにはVero細胞で継代したEdmonston株またはB95a細胞で継代したIchinose株を、抗体はヒト血清を用い、抗体希釈および攻撃ウイルスとの反応は定法に従った。SLAM/Vero細胞、Vero細胞またはB95a細胞の単層培養または浮遊細胞に抗体処理ウイルスを加え、炭酸ガス培養器で静置培養を行い、CPE出現の最終希釈の逆数を持って中和抗体価を算出した。

- 4) 抗ヒトIgMヒツジ抗体でコートした96穴U底プレートを用いて、予め100倍希釈した麻疹患者血清を2倍階段希釈した。室温で2時間放置後に洗浄し、麻疹ウイルス抗原をコートしたゼラチン粒子（セロディア麻疹）を加え、攪拌後に室温で16時間放置し、凝集像を観察し、完全凝集を起こした濃度の逆数をもって抗体価とした。

(倫理面への配慮)

インフルエンザ及び麻疹患者の血液については、インフォームドコンセプトを得て採取し、目的以外には使用していない。また、データの処理及び公表の際には氏名、居住地等は特定されない。

C. 研究結果

- 1) インフルエンザHI抗体測定における赤血球の標準化を検討した。各種動物赤血球の凝集性はウイルス株ごとに異なるために、HI試験の成績に関して必ずしも横並びの比較が出来ないことが分かった。また、シメンチョウをはじめとする特殊な動物血球は入手が困難である場合が多い。そこで、哺乳類インフルエンザウイルスまたはトリインフルエンザウイルスのレセプターであるN-アセチルシアル酸をガラクトースに $\alpha(2-6)$ または $\alpha(2-3)$ 結合させたオリゴ糖鎖を、セラミックビーズ担体表面に結合させた様々な人工赤血球を設計して検討した。その結果、これらの糖鎖を混合して結合させると、すべてのウイルス株に対して被凝集性をもつ粒子が作製できる可能性が示された。

- 2) 予め100倍希釈した麻疹患者血清を、通常の麻疹IgM-ELISAにおいて吸着後6Mol尿素で3回洗浄する処理によって、低avidityの抗麻疹IgG抗体の除去が可能であり、この処理に抵抗性の高avidity抗体との鑑別が可能となった。これを用いて、様々な時期の成人麻疹患者およびワクチン接種者の血清について検索した結果、初感染患者（ワクチン接種者を含む）では、病初期には低avidityであるが、第30病日頃から高いavidityを示すように変化することが分かった。一方、ワクチン接種歴や過去の感染歴が確認されている再感染患者やSVF症例では、初期から高いavidityを持っており、両者の鑑別が可能であることが示された。

- 3) 現行の麻疹中和抗体測定は、攻撃ウイルスとして40年前の分離株でVero細胞に馴化した実験室株を用いて、Vero細胞の系を用いて行われているが、最近の流行株とくにB95a細胞などで分離された病原性を保持した野生株に対する中和抗体価を必ずしも反映していないことが分かった。

そこで、野外株ウイルスに対するレセプター（SLAM）を発現させたVero細胞を用いた中和試験の手技を検討した結果、SLAM/Vero細胞を用いることによって、新旧両ウイルス株に対する中和抗体価を測定が可能であることが示された。

- 4) 96穴U底プレートにコートする抗ヒトIgMヒツジ血清の品質と価格を検討した結果、安価で効率の良い製品が見いだされた。そこで、IgMをコートしたプレート、セロディア麻疹（市販品と同一）、希釈用緩衝液、陽性及び陰性コントロール血清をセットにしたキットを開発した。

この際に、WHOからの依頼では、必ずしもIgM抗体価の定量は必要ではないので、価格を抑えるために1検体あたりのウェル数を2ウェルにした半定量キットを試作した。

このキットを用いて、これまでの検体を測定したところ、十分な感度と特異性を以てIgMを検出することが分かった。しかし、発疹出現後の2～3日間は、IgM抗体が検出されない場合もあり、鑑別診断の目的には、第4病日以降に採血する必要があることが明らかになった。

D. & E. 考察と結論

- 1) 長期的保存可能な人工赤血球を用いると、すべてのインフルエンザウイルス株について、いつでもHI抗体を比較検討することが可能となる。これによって、ヒトおよび動物インフルエンザのサーベイランス効率が格段に向上すると期待される。
- 2) IgG抗体のavidityの違いによって、初感染か免疫記憶を持ったヒトにおける再感染かを、簡便に効率よく鑑別することが可能となった。これを駆使して、SVFの同定、不顕性感染の存在、再感染例の実証などが進み、従来の麻疹の疫学・感染免疫学の常識を覆す事実が明らかにされつつある。

WHOをはじめ多くの麻疹専門家は、ワクチン接種後の獲得免疫は、終生持続して感染防御、発症阻止に有効であると信じている。しかし、これらの事実は、従来のWHO麻疹根絶計画やワクチン接種政策に対して再検討を迫るものである。

- 3) SLAM/Vero細胞を用いると、すべての麻疹ウイルス株を抗原とした中和抗体を測定することが可能となり、抗原解析を横並びに行いことが出来るようになった。これによって、過去の流行株に由来する現行ワクチン接種によって誘導される抗体が、現在及び将来の流行ウイルスに対してどの程度有効であるかを検証することが可能になる。これに基づいて、今後のワクチン政策を検討することが重要である。
- 4) WHOの要望に応じて、電力や特殊機器が不要で、特殊技術や熟練を必要とせず、短時間で結果が出せる、安価な簡易IgM抗体測定法の開発を目指して、ほぼ要求通りの試作キットが出来た。性能的には、昨年までのWHOの性能試験でも高く評価されたので、今後麻疹EPIに対して大きな貢献が出来るものと考えられる。

現在の条件では、16時間の静置後に凝集パターンを判定するものであり、WHOの要求を満たしていない。粒子の条件を変えることによって、反応時間を短縮することは可能である。しかし、第1日目の午後から作業に取りかかり、オーバーナイトで静置し、翌朝判定するという条件は、実施上好都合であると判断し、またWHOもこの条件を受け入れている。

一方、価格に関しては、WHOの希望価格（1検体あたり1米ドル以下）を満たすことは難しいのが現状である。今後は、WHOの要望に沿って、価格を1検体当たり1米ドル以下に抑えることを目的として、WHOによる買い上げ個数等に関して、メーカーとの折衝が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. A. Yamamoto, M. Nakayama, Y. Kurosawa, K. Sugo, H. Karasawa, T. Ogawa, T. Takasaki, M. Tashiro, I. Kurane. Development of a particle agglutination assay system for detecting Japanese encephalitis virus-specific human IgM, using hydroxyapatite-coated nylon beads. *Journal of Virological Methods* 104. 195-201, 2002

2. 学会発表

1. 小田切孝人、西藤岳彦、板村繁之、渡邊真治、今井正樹、三宮愛、田代真人：2001/2002シーズンのインフルエンザ流行株の解析と次シーズンのワクチン株 第50回日本ウイルス学会学術集会 2002年10月札幌
2. 川上千春、宗村徹也、七種美和子、野口有三、西藤岳彦、小田切孝人、田代真人：横浜市で分離されたAH1N1型ウイルスの性状 第50回日本ウイルス学会学術集会 2002年10月札幌
3. 西藤岳彦、田代真人：ヒト由来H9N2型インフルエンザウイルスとトリ由来ウイルスの遺伝子再集合によるワクチン株開発 第50回日本ウイルス学会学術集会2002年10月札幌

H. 知的所有権の取得状況

なし

11. BK ウイルス中空粒子の作製と診断への応用

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長）
李 天成（同主任研究官）
ホランド・チェン（カロリンスカ研究所教授）

研究要旨 BKウイルス（BKV）はヒトポリオーマウイルスとして知られている。このウイルスに対する成人の抗体保有率は高いが、病気との関連はまだ明らかではない。また、抗体検出を目的とした診断系が構築されていない。本研究では、組換えバキュロウイルスを用いてBKVのウイルス様中空粒子（rBK-VLP）を作製し、これを用いた抗体検出EIAおよび抗原検出EIAを樹立した。高感度と特異性を併せ持つ検出系が確立できたことから、BKVの疫学調査及び病気との関連を究明する手段が確立できた。

A. 研究目的

BKウイルス（BKV）は約5,000塩基の2本鎖環状DNAを遺伝子にもつヒトポリオーマウイルスのひとつである。電子顕微鏡では直径約50nmの球状粒子として観察される。ウイルス粒子はVP1、VP2およびVP3の3種類の構造蛋白から構成され、これらの中で42kDaのVP1は構造蛋白の外側を構成する主要な蛋白で、感受性を有する細胞への吸着に重要である。また、VP1にはポリオーマウイルスに共通な抗原部位が存在する。BKVはアカゲザル初代腎臓細胞やVero細胞で増殖するが、最大感染価に達するまでに3-4週間を要することや、この時点でもなお産生されるウイルスはかなり低いことから、複製機構や粒子構成機構は未だ明らかではない。成人の大部分はこれらのウイルスに感染していると考えられ、抗体保有率は高いが、いまだ病気との関連は明らかではない。疫学に関しても十分な知見が得られているとはいえない。本実験では、組換えバキュロウイルスを用いて作製した組換えBKウイルス様中空粒子（rBK-VLP）の三次構造を解析し、ネイティブなウイルスとの抗原性、免疫原性を比較した。また、BKV抗体検出系および抗原検出系へrBK-VLPが応用可能であるかを検討した。

B. 研究方法

1) 組換えBKV中空粒子

BKV DNAを鋳型としてPCRでBKウイルス構造蛋白領域VP1の全長領域を増幅後、トランスファベクターpVL1393にクローニングしpVLVP1を構築した。バキュロウイルス野生株のDNA（バキュロゴールド）とpVLVP1を用いリポフェクション法でSf9細胞に共感染し、ポリヘドリンプロモータ下流にVP1配列をもつ組換えバキュロウイルスを作製した。ブラック法で純化した組換えバキュロウイルスをSf9細胞で培養し、種ウイルスとして4℃で遮光して保存した。組換えバキュロウイルスをTn5細胞に感染してVP1蛋白を発現させた。蛋白の発現、粒子の形成などはSDS-PAGE法、ウェスタンブロット法、電子顕微鏡で観察した。三次構造は精製粒子をクリオ電顕で観察し、画像をコンピュータ処理して構築した。

2) 抗体検出EIA

EIA法による抗BKV IgGおよびIgM抗体の検出は以下のように行った。

- ・ 100 μ l の精製したBKV VP1 VLPs (1 μ g/ml) を96-wellのマイクロプレートの各ウェルに加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩コーティングした。
- ・ 150 μ lの 5% スキムミルク入りPBS-T を加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩あるいは37 $^{\circ}$ Cで2時間ブロッキングをおこなった。
- ・ PBS-Tで6回洗滌した。
- ・ 血清を1%スキムミルク入りPBS-Tで200倍に希釈し、100 μ lを各ウェルに加え、37 $^{\circ}$ Cで一時間反応させた。
- ・ PBS-Tで6回洗滌後、抗ヒトIgG F(ab)2-HRPを1%スキムミルク入りPBS-Tで5,000倍に希釈し、100 μ lを各ウェルに加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。抗ヒトIgM(5Fcu)-HRPの場合は同様に1,000倍に希釈して使用した。
- ・ PBS-Tで6回洗滌した。
- ・ 100 μ lのOPD発色試薬を各ウェルに加え、室温で遮光して30分間反応させた。
- ・ 50 μ lの4N硫酸を各ウェルに加えて反応を停止し、492nmでOD値を測定した。

3) ウイルス抗原捕獲EIA

精製したBKV-VLPsをウサギに免疫して高力価の抗BKV-VLPs抗体を作製後IgG分画を精製した。二次抗体は精製した兎抗BKV-VLPs IgG抗体HRPで標識し、次のようにウイルス抗原捕獲EIA法を樹立した。

- ・ ウサギ抗BKV-VLPs IgG抗体を(1 μ l/ml) 96wellのマイクロプレートに100 μ l/wellで入れ、4 $^{\circ}$ Cで一晩コーティングした。
- ・ Blocking : 5%スキムミルク (150 μ l/well) で4 $^{\circ}$ C、一夜、あるいは37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。
- ・ PBS-Tで6回洗滌した。
- ・ 抗原 (サンプル) を100 μ l/well加え、37 $^{\circ}$ Cで一時間反応させた。
- ・ PBS-Tで6回洗滌した。
- ・ HRP標識ウサギ抗BKV VLPs IgG (1:2000希釈) を100 μ l/well加え、37 $^{\circ}$ Cで一時間反応させた。
- ・ PBS-Tで6回洗滌した。
- ・ OPD発色試薬を100 μ l/well加え、室温で遮光して30分反応させた。
- ・ 50 μ l/wellの4N硫酸を加えて反応を中止し、492nmのOD値を計測した。

C. 研究結果

1) 組換えウイルス様中空粒子の構造

組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞Tn5でBKウイルス構造蛋白VP1 (42kDa) は良好に発現した。発現蛋白は感染細胞の核内に感染後2日目に出現し、4日目にピークに達した。細胞質には見られなかった。一方、この蛋白は4日目から培養細胞上清に現れ、7日目にピークに達した。この培養上清を塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で解析したところ、4本の明瞭なバンドが得られた、それぞれのバンドを回収し、遠心法で濃縮後電子顕微鏡で観察したところいずれにおいても粒子が形成されていた。1.29g/cm³と1.30/cm³のバンド (バンドAおよびB) は直径26nmと50nmの中空粒子の混合物、1.33/cm³のバンド (バンドC) は直径50nmの中空粒子、1.35/cm³のバンド (バンドD) は直径50 nmの非中空粒子であった。バンドDの粒子が比較的均一であったのでこの粒子を濃縮し、300粒子を選択してクリオ電顕で観察後、コンピュータ画像解析によって3次構造を推定した。rBKV VLPの構造はネイティブなSV40やネコポリオーマウイルスのそれらと類似し、72個のカプソメアが認められた。これらのうち12個は5回対称軸上に、60個は隣接するペンタマーで囲まれているためT=7の表面格子をもっていた。したがって、一個の粒子は360個のサブユニットで構成されていた。

2) 健常日本人の抗体保有状況

バンドDから得られた中空粒子を抗原として、健常日本人、373人の抗BKV IgG抗体保有率をEIA法で調べた。0~70歳までの各年齢層で高い抗体保有率を示し、69% (259/373) が抗BKV IgG抗体を保有していることが明らかになった。5歳以下の年齢群でIgG抗体の保有率は他の群より低い、既に50%の抗体保有率を示し、これより高い年齢群では保有率は急上昇し保有率に変動はみられなかった。

3) 出血性膀胱炎の診断

抗原検出EIA法の検出感度は、rBKV VLPを抗原としたとき0.78ng/ml、すなわち3x10⁷コピー/mlの検出が可能であった。陰性対照として用いた、ノーウォークウイルスVLPsやE型肝炎ウイルスVLPsとの非特異性反応は観察されなかった。抗体検出