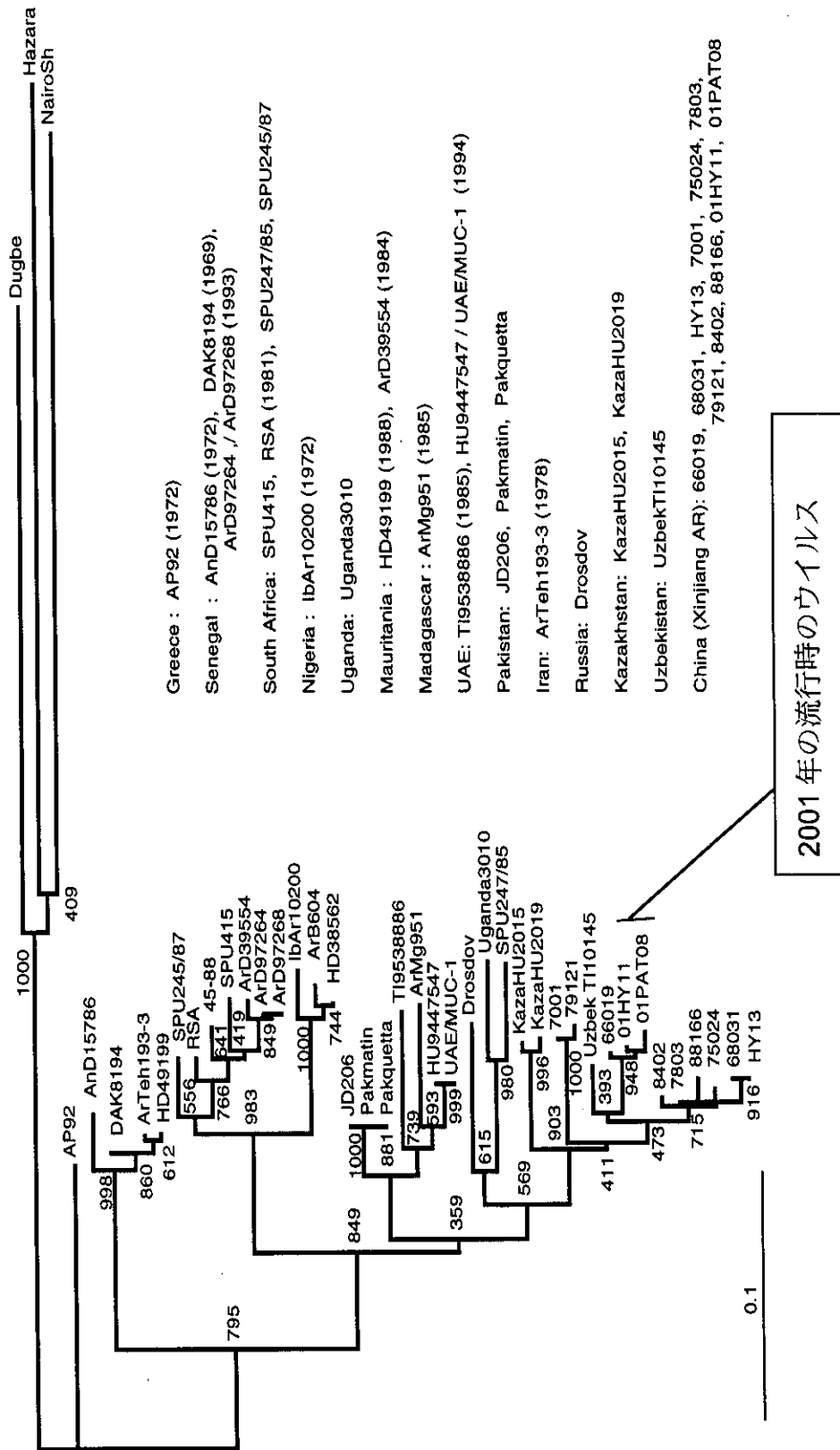


図 3. CCHF ウイルスの部分 S-RNA 配列による分子系統樹



## エボラウイルスの血清診断法の開発に関する研究

分担研究者 森川 茂 (国立感染症研究所ウイルス第一部第一室長)

協力研究者 池上 徹郎、西條 政幸、吉川 泰弘\*、倉根 一郎 (国立感染症研究所ウイルス第一部、\*東大 獣医学専攻 実験動物)

研究要旨: レストンエボラウイルス(EBO-R)感染症を検査・診断するための抗体検出系および抗原検出系を作製した。抗体検出系として感度・精度の高い蛍光抗体法および IgG-ELISA が作製された。これらの系を用いて野生カニクイザル血清の EBO-R 抗体保有状況を調べた結果、その保有率が非常に低いことが明らかとなった。一方、EBO-R の核蛋白を特異的に検出できる感度・精度の高い抗原捕捉 ELISA が作製された。これを用いて迅速に種の鑑別が可能になった。

### A. 研究目的

エボラウイルスにはザイール(EBO-Z)、スーダン(EBO-S)、コートジボアール(EBO-CI)、レストン(EBO-R)の4種が報告されている。このうち、EBO-Rのみヒトに病原性がないと考えられている。エボラウイルス感染症は霊長類を介する人畜共通感染症であり、輸入サルを介してウイルスが国内に侵入する危険がある。これまでに、エボラウイルス感染症の迅速診断法を開発してきたが、今年度は、EBO-R と他のエボラウイルス種感染を鑑別する診断法の開発を目的とした。

### B. 研究方法

1) EBO-R 抗体を検出するための間接蛍光抗体法(IFA)の開発: pKS336 プラスミドの EF-BOS プロモーター下流に EBO-R NP の ORF を挿入したものを、HeLa 細胞にトランスフェクションした。EBO-R NP を安定に発現する細胞を選択し、IFA に用いた(EBO-R-IFA)。IFA は、検体を加えて反応後、FITC-抗ヒト IgG を加えて反応させ、蛍光顕微鏡下で観察した。EBO-R NP 免疫ウサギ血清 3 検体、1996 年のフィ

リピンでの EBO-R 流行時に採血されたカニクイザル血清 16 検体、EBO-R 非流行施設の健常カニクイザル血清 96 検体について反応性を調べた。さらに同様に作製した EBO-Z NP を安定に発現する HeLa 細胞を用いた IFA (EBO-Z-IFA)と、EBO-R 抗体の検出感度を比較した。

2) EBO-R および EBO-Z の部分 NP を用いた IgG-ELISA の開発: エボラウイルスの NP は 739 アミノ酸より成るが、アミノ末端半分は疎水性で抗原性に乏しく、カルボキシル末端は親水性で抗原性に富むことがわかっている。そこで、EBO-R の部分 NP として R $\Delta$ C(アミノ酸残基(aa) 360-739)、R $\Delta$ 5(aa 360-461)、R $\Delta$ 6(aa451-551)、R $\Delta$ 7(aa 541-640)、R $\Delta$ 8(aa631-739)を作製した。同様に EBO-Z の部分 NP として Z $\Delta$ C、Z $\Delta$ 5、Z $\Delta$ 6、Z $\Delta$ 7、Z $\Delta$ 8 を作製した。これらを ELISA プレートにほぼ同量となるようにコートし、検体を加えて反応させた後、抗ヒト IgG-HRPD を反応させ、ABTS 基質を加えて OD(405)を測定した。健常カニクイザル血清 72 検体を用いて各部分 NP における OD 値より GST における OD 値を差し引いた

値の平均値+3SD を算出し、カットオフ値を決定した。EBO-R 免疫ウサギ血清 2 検体、EBO-Z 免疫ウサギ血清 4 検体、EBO-Z 免疫カニクイザル血清 3 検体(免疫後 7、30、73 日目)、EBO-R 感染カニクイザル血清 10 検体について IgG-ELISA における反応性を調べた。

3) 過去にアジアより輸入された野生カニクイザルの EBO-R 抗体保有状況 : 1) および 2) で作製した IFA および IgG-ELISA を用いて、1979 年から 1987 年までの間に東南アジアより日本に輸入された野生カニクイザル血清 1,992 検体(マレーシア由来 626 検体、インドネシア由来 667 検体、フィリピン由来 699 検体)を検索した。EBO-R-IFA によって一次検査を行い、40 倍希釈で陽性だった血清について、IgG-ELISA での反応性を調べた。

4) EBO-R の NP を特異的に検出できる抗原捕捉 ELISA 法の開発 : 6His-tag を N-末端に付加した EBO-R の NP を組み換えバキュロウイルスを用いて作製し、組み換え NP をマウスを免疫した。モノクローナル抗体(MAb)の作製は常法に基づいて行った。GST 融合蛋白として発現した EBO-R の部分 NP を用いて IgG-ELISA を行い、MAb のエピトープを決定した。抗原捕捉 ELISA は、モノクローナル抗体をコートした ELISA プレートに、検体を加えて反応後、抗 EBO-R NP ウサギ血清/抗ウサギ IgG-HRPD を順次反応させ、ABTS 基質を加えて OD(405)を測定することにより行った。コントロール抗原には、His-EBO-R NP を用いた。健常カニクイザル血清 79 検体の ELISA OD 値の平均値+3SD を算出し、カットオフ値を決定した。EBO-R 感染カニクイザルの血清 2 検体、肝臓 2 検体、脾臓 3 検体の抗原捕捉 ELISA における反応性を調べた。

### C. 研究結果

1) EBO-R 抗体を検出するための IFA の開発 : EBO-R-IFA、EBO-Z-IFA とともに、EBO-R NP 免疫ウサギ血清 3 検体、EBO-R 感染カニクイザル血清 16 検体より EBO-R 抗体を検出した。EBO-R-IFA では、免疫ウサギ血清 1 検体、EBO-R 感染カニクイザル血清 11 検体が EBO-Z-IFA よりも高い抗体価で EBO-R 抗体を検出した。一方、健常カニクイザル血清 96 検体はすべて EBO-R-IFA で陰性だった。以上より、EBO-R-IFA は高い精度と感度で EBO-R 抗体を検出することがわかった。

2) EBO-R および EBO-Z の部分 NP を用いた IgG-ELISA の開発 : EBO-R NP もしくは EBO-Z NP 免疫ウサギ血清では、 $\Delta C$  および  $\Delta 8$  の部分蛋白で EBO-R、EBO-Z 間の高い交叉反応がみられた。EBO-Z 免疫カニクイザル血清では  $\Delta C$  および  $\Delta 6$  で交叉反応がみられた。EBO-R 感染カニクイザル血清 10 検体はすべて R $\Delta C$  および Z $\Delta C$  に反応した。これらのうち、6 検体および 5 検体がそれぞれ R $\Delta 6$  および R $\Delta 8$  に強く反応した。

3) 過去にアジアより輸入された野生カニクイザルの EBO-R 抗体保有状況 : EBO-R-IFA ではマレーシア由来血清 9 検体、インドネシア由来血清 8 検体、フィリピン由来血清 1 検体が陽性を示した。これらのうち 10 検体が IgG-ELISA で R $\Delta C$  に反応した。さらに R $\Delta 6$  または R $\Delta 8$  に反応したのは 6 検体であった。

4) EBO-R の NP を特異的に検出できる抗原捕捉 ELISA 法の開発 : 32 個の MAb が作製された。そのうち、Res2-6C8 および Res2-1D8 は、IFA で EBO-R とのみ反応した (図 1)。これ

らの MAb は抗原捕捉 ELISA で高感度に EBO-R NP を検出できることがわかった (図 2)。Res2-6C8 と Res2-1D8 はそれぞれ aa636-639(4 アミノ酸)、aa636-643(8 アミノ酸)からなるリニアエピトープを認識することがわかった。アライメントの結果、EBO-Z、EBO-S には同じアミノ酸配列は存在しなかった。一方、EBO-R ペンシルバニア分離株(1989)ではこのエピトープ配列は保存されていた。これらの MAb は IFA で EBO-Z および EBO-S の NP とは反応せず (図 1)、抗原捕捉 ELISA でも EBO-Z NP を全く検出しなかった (図 2)。さらに、Res2-6C8 と Res2-1D8 は抗原捕捉 ELISA で EBO-R 感染カニクイザルの臓器、血清より EBO-R NP 抗原を検出できた。

#### D. 考察

昨年度までの研究で、ヒトに高い病原性を示すフィロウィルス of the 診断系を作製した (EBO-Z および マールブルグウィルスの NP を安定に発現する HeLa 細胞株を用いた IFA、精製組み換え NP を用いた IgG-ELISA、EBO-Z NP に対する IgM 抗体検出系、EBO-Z、EBO-S、EBO-R の NP を検出するための抗原捕捉 ELISA の開発)。今年度は、フィリピンのカニクイザルの間で流行した EBO-R の検出・診断系を作製した。抗体検出系として、EBO-R NP を安定に発現する HeLa 細胞を用いた IFA、EBO-R および EBO-Z の部分 NP を用いた IgG-ELISA を作製したが、ともにカニクイザル血清より EBO-R 抗体を検出する感度・精度に優れており、感染歴のある個体の同定に利用できるものと考えられる。実際に、過去にアジアより輸入されたカニクイザル血清 1,992 検体について EBO-R 抗体の保有状況を調べた結果、その保有率は非常に低いことが明らかとなった。これより EBO-R 抗体検出系

は血清疫学にも利用できることが示唆された。

一方、EBO-R の急性期感染個体より特異的に EBO-R NP を検出できる抗原捕捉 ELISA を作製した。この抗原捕捉 ELISA は EBO-R NP を特異的に検出できるため、以前に作製したエボラウィルス種交叉性の MAb である 3-3D を用いた抗原捕捉 ELISA と併用することによって迅速にヒトへの病原性の強いエボラウィルス種と病原性の無いレストン種を鑑別できるようになった。

今回の研究によって、アジアのサル類におけるエボラウィルス感染症の診断系が確立された。また、迅速なエボラウィルス種の鑑別が可能になった。

#### E. 結論

ウィルス性出血熱の原因ウィルスのなかでサルを介して輸入される危険のあるエボラウィルス抗体、抗原の高感度で特異的な診断法が確立した。さらに、ヒトへの病原性の強いウィルス種と弱いウィルス種の迅速鑑別を可能にした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ikegami, T., Calaor, A. B., Miranda, M. E., Niikura, M., Saijo, M., Kurane, I., Yoshikawa, Y., and Morikawa, S. (2001) Genome structure of Ebola virus subtype Reston: differences among Ebola subtypes. *Arch. Virol.*, 146, 2021-2027.
- 2) Ikegami, T., Miranda, M.E.G., Calaor, A.B., Manalo, D.L., Miranda, N.J., Niikura, M., Saijo, M., Une, Y., Nomura, Y., Kurane, I., Ksiazek, T.G., Yoshikawa, Y., Morikawa, S. (2002) Histopathology of cynomolgus macaques naturally infected with Ebola virus

subtype Reston in the Philippine outbreak in 1996. *Exp. Anim.*, 51, 447-455

- 3) Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, M.E., Calaor, A.B., Hernandez, M., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y., Morikawa, S. (2002) Development of an immunofluorescence method for the detection of antibodies to Ebola virus subtype Reston by the use of recombinant nucleoprotein-expressing HeLa cells. *Microbiol. Immunol.*, 46, 633-638
- 4) Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, M.E., Calaor, A.B., Hernandez, M., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y., Morikawa, S. Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of reston Ebola virus. *Epidemiol. Infect.*, in press.
- 5) Ikegami, T., Niikura, M., Saijo, S., Miranda, M.E., Calaor, A.B., Hernandez, M., Acosta, L.P., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y., Morikawa, S. Specific detection of Reston Ebola virus nucleoprotein by antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiol. Immunol.*, in submission.

## 2. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得:

- 1) 特願 2001-111478 (平成 13 年 4 月 10 日出願): エボラウイルスを認識するモノクローナル抗体
- 2) 特願 2001-314854 (平成 13 年 10 月 12 日出願): クリアミア・コンゴ出血熱ウイルスを認識するモノクローナル抗体
- 3) 出願委託中: レストンエボラウイルスを認識するモノクローナル抗体

## 3. 学会発表

- 1) エボラウイルスレストン株 NP、VP35、VP40、GP の塩基配列の解析: 池上徹郎、森川茂、新倉昌浩、西條政幸、緒方もも子、A.B.Calaor、M.E.Miranda、倉根一郎、吉川泰弘 第 48 回日本ウイルス学会、三重、2000
- 2) Histopathological studies of cynomolgus monkeys naturally infected with Ebola virus, subtype Reston, in the Philippines in 1996: Ikegami, T., Morikawa, S., Niikura, M., Saijo, M., Ogata, M., Une, Y., Nomura, Y., Calaor, AB., Miranda, ME., Kurane, I., Yoshikawa, Y. Thirty-Forth Joint Working Conference on Viral Disease Inuyama, 2000(July 20-22)
- 3) エボラウイルスレストン株自然感染サル of 病理組織学的研究: 池上徹郎、森川茂、新倉昌浩、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、A.B.Calaor、M.E.Miranda、宇根有美、野村靖夫、倉根一郎、吉川泰弘 第 130 回日本獣医学会、大阪、2000
- 4) エボラウイルスレストン株自然感染サル of 病理組織学的研究: 池上徹郎、森川茂、新倉昌浩、西條政幸、緒方もも子、A.B.Calaor、M.E.Miranda、倉根一郎、吉川泰弘 第 48 回日本ウイルス学会、三重、2000
- 5) 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: 池上徹郎、A.B.Calaor、M.E.Miranda、新倉昌浩、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、吉川泰弘、森川茂 第 132 回日本獣医学会、岩手、2001
- 6) 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: 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 第 49 回日本ウイルス学会、大阪、2001
- 7) エボラウイルスレストン株の部分発現核蛋白を用いた IgG-ELISA 系の開発: 池上徹郎、

西條政幸、新倉昌浩、前田秋彦、緒方もも子、  
M.E.Miranda、A.B.Calaor、M.Hernandez、  
D.L.Manalo、倉根一郎、吉川泰弘、森川茂  
第 134 回日本獣医学会、岐阜大学、2002  
8) エボラウイルススレ斯顿株を特異的に検出  
する抗原捕捉 ELISA の開発：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（共同研究者：A.B.Calor、  
M.Hernandez、D.L.Manalo、L.Acosta、  
M.E.Miranda）、第 50 回日本ウイルス学会、  
札幌メディアパーク・スピカ、2002

図1. Res2-6C8とRes2-1D8の種特異性 (IFA)

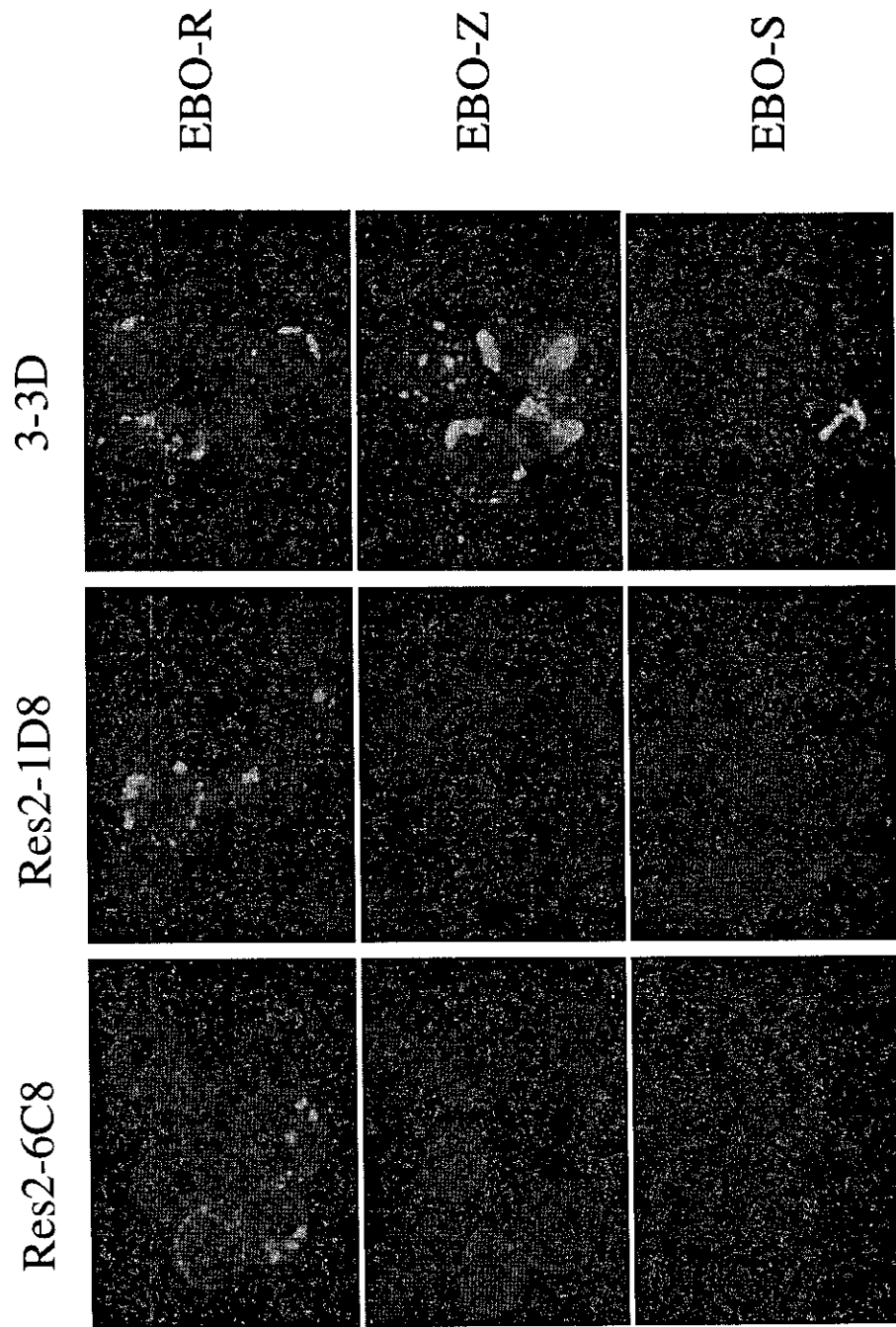
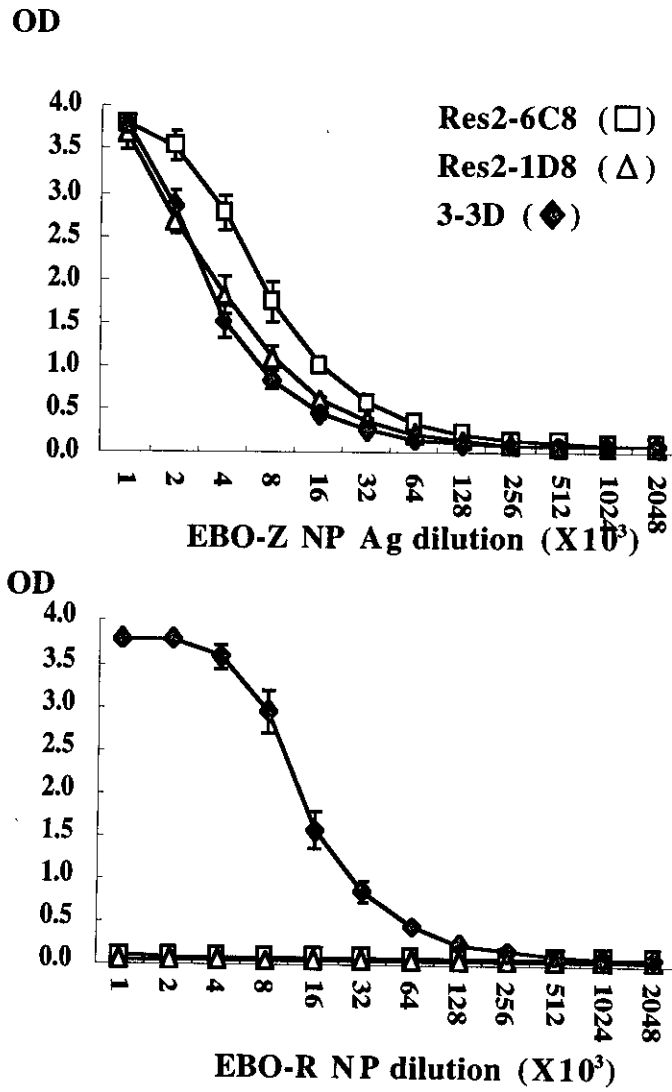


図 2. 抗原捕捉 ELISA での EBO-Z と EBO-R-NP の検出





20020619

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

**Detection of immunoglobulin G to Crimean–Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by recombinant nucleoprotein–based enzyme–linked immunosorbent and immunofluorescence assays.**

Qing T, Saijo M, Lei H, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Xinjung W, Kurane I, Morikawa S.

J Virol Methods. 2003 Mar; 108(1): 111–6.

**Recombinant nucleoprotein–based enzyme–linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean–Congo hemorrhagic fever virus.**

Saijo M, Qing T, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Prehaud C, Kurane I, Morikawa S.

J Clin Microbiol. 2002 May; 40(5): 1587–91.

**Importance of C–terminus of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase for maintaining thymidine kinase and acyclovir–phosphorylation activities.**

Saijo M, Suzutani T, Niikura M, Morikawa S, Kurane I.

J Med Virol. 2002 Mar; 66(3): 388–93.

**Bone marrow transplantation in a child with Wiskott–Aldrich syndrome latently infected with acyclovir–resistant (ACV(r)) herpes simplex virus type 1: emergence of foscarnet–resistant virus originating from the ACV(r) virus.**

Saijo M, Yasuda Y, Yabe H, Kato S, Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S.

J Med Virol. 2002 Sep; 68(1): 99–104.

**Genetic diversity of the M RNA segment among Crimean–Congo hemorrhagic fever virus isolates in China.**

Morikawa S, Qing T, Xinqin Z, Saijo M, Kurane I.  
Virology. 2002 Apr 25; 296(1): 159–64.

**Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean–Congo hemorrhagic fever virus.**

Saijo M, Qing T, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Sakai K, Prehaud C, Kurane I, Morikawa S.  
J Clin Microbiol. 2002 Feb; 40(2): 372–5.

**Development of an immunofluorescence method for the detection of antibodies to Ebola virus subtype Reston by the use of recombinant nucleoprotein–expressing HeLa cells.**

Ikegami T, Saijo M, Niikura M, Miranda ME, Calaor AB, Hernandez M, Manalo DL, Kurane I, Yoshikawa Y, Morikawa S.  
Microbiol Immunol. 2002; 46(9): 633–8.

**Histopathology of natural Ebola virus subtype Reston infection in cynomolgus macaques during the Philippine outbreak in 1996.**

Ikegami T, Miranda ME, Calaor AB, Manalo DL, Miranda NJ, Niikura M, Saijo M, Une Y, Nomura Y, Kurane I, Ksiazek TG, Yoshikawa Y, Morikawa S.  
Exp Anim. 2002 Oct; 51(5): 447–55.

**The intracellular association of the nucleocapsid protein (NP) of hantaan virus (HTNV) with small ubiquitin–like modifier–1 (SUMO–1) conjugating enzyme 9 (Ubc9).**

Maeda A, Lee BH, Yoshimatsu K, Saijo M, Kurane I, Arikawa J, Morikawa S.  
Virology. 2003 Jan 20; 305(2): 288–97.

**Genotypic and phenotypic characterization of the thymidine kinase of ACV-resistant HSV-1 derived from an acyclovir-sensitive herpes simplex virus type 1 strain.**

Saijo M, Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Morikawa S, Kurane I.

Antiviral Res. 2002 Dec; 56(3): 253-62.

**Analysis of linear B-cell epitopes of the nucleoprotein of ebola virus that distinguish ebola virus subtypes.**

Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurata T, Kurane I, Morikawa S.

Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jan; 10(1): 83-7.

**The distribution of molybdenum in the tissues of wild ducks.**

Mochizuki M, Sasaki R, Yamashita Y, Akinaga M, Anan N, Sasaki S, Hondo R, Ueda F.

Environ Monit Assess. 2002 Jul; 77(2): 155-61.

**Cadmium contamination in wild birds as an indicator of environmental pollution.**

Mochizuki M, Hondo R, Kumon K, Sasaki R, Matsuba H, Ueda F.

Environ Monit Assess. 2002 Feb; 73(3): 229-35.

**Swift and definite serotyping for isolated *Listeria monocytogenes* strains.**

Ueda F, Sugamata M, Aota M, Mochizuki M, Yamada F, Hondo R.

New Microbiol. 2002 Apr; 25(2): 165-71.

**Simultaneous analysis for multiple heavy metals in contaminated biological samples.**

Mochizuki M, Hondo R, Ueda F.

Biol Trace Elem Res. 2002 Summer; 87(1-3): 211-23.

**Secretion and dynamics of herpes simplex virus in tears and saliva of patients with Bell's palsy.**

Abiko Y, Ikeda M, Hondo R.

Otol Neurotol. 2002 Sep; 23(5): 779-83.

**Detection of varicella zoster virus DNA in tear fluid and saliva of patients with Ramsay Hunt syndrome.**

Hiroshige K, Ikeda M, Hondo R.

Otol Neurotol. 2002 Jul; 23(4): 602-7.

**Cryopreservation and primary culture of cerebral neurons from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*).**

Negishi T, Ishii Y, Kawamura S, Kuroda Y, Yoshikawa Y.

Neurosci Lett. 2002 Aug 2; 328(1): 21-4.

**Chronological and spatial analysis of the 1996 Ebola Reston virus outbreak in a monkey breeding facility in the Philippines.**

Miranda ME, Yoshikawa Y, Manalo DL, Calaor AB, Miranda NL, Cho F, Ikegami T, Ksiazek TG.

Exp Anim. 2002 Apr; 51(2): 173-9.

**Analysis of cDNA coding MHC class II beta chain of the chimpanzee (*Pan troglodytes*).**

Hatta Y, Kanai T, Matsumoto Y, Kyuwa S, Hayasaka I, Yoshikawa Y.

Exp Anim. 2002 Apr; 51(2): 133-42.

**輸入動物等に関する実態調査について**

森雅美, 長谷山路夫, 太田周司, 田中義枝

日本検疫医学会雑誌. 4 巻, Page26-37(2002)

**爬虫類のクリプトスポリジウム感染. *Cryptosporidium infectious in reptiles***

黒木俊郎, 宇根有美, 遠藤卓郎

日本野生動物医学会. (2003.3)

**動物実験と福祉 (特集)実験動物の福祉**

吉川泰弘

アニテックス.Vol. 15 No. 1, Page18-22

**日本の BSE(いわゆる狂牛病)をめぐる問題. 日本の BSE リスク分析**

吉川泰弘

長野県食品衛生推進大会シンポジウム資料

**生命科学と実験動物**

吉川泰弘

学術の動向. Page31-34(2002.09)

**野兎病 生涯教育シリーズ 51 感染症の診断・治療ガイドライン 追補**

吉川泰弘

日本医師会雑誌. 127 巻 8 号, Page1375-1377(2002.04)