

分担研究報告書

日本人デング感染例における感染ウイルス血清型特異的 IgM 抗体検出

分担研究者 名和 優(埼玉医科大学微生物学教室)

共同研究者 高崎智彦(国立感染症研究所ウイルス1部)

伊藤美佳子(国立感染症研究所ウイルス1部)

倉根一郎(国立感染症研究所ウイルス1部)

研究要旨 デングの血清診断法として開発されたウイルス特異的 IgM 抗体検出のための酵素免疫吸着測定法(IgM-ELISA)は、デングウイルス血清型間の交差反応性の存在により感染ウイルス血清型の同定は困難である。デングの血清診断法としての IgM-ELISA の有用性を高める目的で、反応系にタンパク変性試薬を添加することによって感染ウイルス血清型に特異的な IgM 抗体の検出につき検討した。

A. 研究目的

デングは熱帯・亜熱帯地域に流行するウイルス感染症で、世界保健機関によれば年間数百万人の患者発生と、数万人規模の死亡があると推計されている。本研究事業の実施により、1999年以來4年間に100例以上の日本人海外旅行者のデングが確認され、新興感染症としての重要性が認識された。

本研究の目的は、デングの血清診断に応用する目的で開発されたデングウイルス特異的 IgM 抗体検出のための酵素免疫吸着測定法(IgM-ELISA)を、国内で広く実施する為の改良であって、その要点は、IgM-ELISA を用いてウイルス血清型同定の可能性を検討した。一般にデングの診断は、発熱後1週間程度の急性期では血清中よりウイルス遺伝子 RNA の検出により感染ウイルスの同定が可能である。解熱後の回復期では、主

として血清中のデングウイルス特異的 IgM 抗体検出で診断可能であるが、4つのウイルス血清型間の免疫学的交差反応により、デングウイルス感染は診断できても、感染ウイルス血清型の同定は困難とされている。デング患者の症例管理、症状とウイルス血清型との関係といった臨床病理学的解析には、病期に関係なく感染ウイルス血清型同定が望まれる。

今回われわれは、デング IgM-ELISA の反応系にタンパク分子構造を可逆的に変性させる薬剤、チオシアン酸ナトリウム(NaSCN)を添加し、デングウイルス特異的 IgM 抗体と抗原との血清型特異的反応の出現を観察した。ELISAへNaSCNを添加することにより、デングウイルス高度免疫マウス抗体とデングウイルス抗原との血清型特異的反応が出現したことが既に報告されている

(Nawa, M. Microbiol. Immunol. Vol. 36: 721-730, 1992)。本研究は、以上の結果をもとに、ヒトでの実地応用の可能性につき検討した。

B. 研究方法

IgM-ELISA は、本研究事業による補助金を得て開発し、既に論文発表された方法を用いた (Nawa et al. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 7, 2000; Nawa et al. Journal of Virological Methods, 92, 2001; Takasaki et al. Journal of Virological Methods, 102, 2002)。

1 型-4 型のプロトタイプ Dengue ウイルスは蚊由来 C6/36 cell へ感染し、4-5 日後の感染培養上清をベータプロピオラクトン不活化抗原として用いた。IgM-ELISA に用いた血清検体は、国立感染症研究所ウイルス 1 部にて Dengue 感染の診断に供された日本人海外旅行者血清の 77 症例 (135 検体) 由来であった。Dengue 患者血清中の抗 Dengue ウイルス IgM 抗体と Dengue ウイルス抗原との間のウイルス血清型特異的反応、および血清型間の交差反応を識別する目的で、ウイルス抗原検出用の酵素標識したフラビウイルス特異的モノクローナル抗体 IgG (D1-4G2) の希釈液にチオシアン酸ナトリウム (NaSCN) を最終濃度 0.5 M に添加して測定した。

(倫理面への配慮)

ヒト血清検体の使用に際しては、予め研

究目的で使用されることが同意されたもので、かつ、2 重盲験法で個人情報の漏出を防止した。

C. 研究結果

NaSCN の SCN^- イオンは一般にカオトロピック・イオンと呼ばれ、水溶液中で分子の疎水結合に変化を与えると説明されている (Avrameas, S. and Ternyck, T. Biochem. J. vol. 102: 37c-39c, 1976)。カオトロピック・イオンの性質を利用して、これまでにアフィニティー・クロマトグラフィーより抗原あるいは抗体の回収用バッファーとして使われてきた (Dandlinker, W. B. and de Saussure, V. A. Immunochemistry, vol. 5: 357-365, 1968)。Inouye らは、rubella, rota そして日本脳炎ウイルス感染において、ウイルス感染後の IgG 抗体と抗原との結合性がカオトロピック物質である塩酸グアニジンの存在で変化したことを観察し、タンパク変性物質の存在下での "stringent immunosorption" 法で抗原性の相違を識別できたと報告した (J. Clin. Microbiol. Vol. 20: 525-529, 1984)。

1) NaSCN 添加が IgM-ELISA へ与える影響 (図 1)。

IgM-ELISA の反応原理では、被検血清中に存在する Dengue ウイルス特異的 IgM 抗体を、抗ヒト IgM ヤギ抗体 (IgG) で捕捉する。NaSCN の添加は、抗ヒト IgM 抗体による血清中の IgM の捕捉に影響しなかった [図 1 (a)]。また、IgM-ELISA において、ウイル

ス抗原検出用の酵素標識した D1-4G2 IgG 希釈液に添加した時、ウイルス抗原検出に有意な反応性低下は観察されなかった [図 1 (b)]。

2) 被検血清中の IgM 抗体と、ウイルス抗原との反応に対する NaSCN の影響 (図 2)。

フラビウイルス特異的 D1-4G2 IgG でコーティングした ELISA 用プレートへ 1 型から 4 型の Dengue ウイルス抗原を捕捉した。市販の IgG 吸収キット (ImmunoPure (G) IgG Purification Kit, Perbio Science, Belgium) で IgG の吸収された患者血清を、プレートのウイルス抗原と反応させた。0.5M NaSCN は Protein G 吸収血清の希釈液に添加した。Dengue ウイルス抗原と反応した血清中の IgM 抗体は、酵素標識した抗ヒト IgM ヤギ抗体 (IgG) で直接検出した。

図 2 は 1 型 Dengue ウイルス感染の確定診断された患者血清を用いて、IgM 抗体とウイルス抗原との反応を、NaSCN 添加前後で比較した結果を示す。NaSCN の添加されていない反応条件では、1 型 (D1)、3 型 (D3) および 4 型 (D4) ウイルス抗原に対して交差反応が観察された [図 2 (a)]。0.5M NaSCN を添加した後では、全体に反応レベルの低下が観察されたが、D1 の反応は、D2、D3 および D4 と比較して有意に高かった [図 2 (b)]。Dengue ウイルス IgM 抗体の血清型特異的反応が、NaSCN の添加によって現われた。図 2 の反応条件は、フラビウイルスのエンベロープ糖 (E) タンパク分子のエピトープに対する D1-4G2 抗体で捕捉されたウ

イルス粒子、あるいは E タンパクと IgM との反応であったと考えられた。E タンパク分子の立体構造が NaSCN の存在で変化した結果、IgM 抗体と抗原との反応性が変化し、結果として血清型特異的反応が出現したと考えられた。

3) ヒト血清検体を用いて、NaSCN 添加が IgM-ELISA 測定にあたる影響を示す (図 3)。

4 価の Dengue ウイルス抗原を用いた時の IgM 抗体陽性および陰性血清で得られた反応を吸光度で示す。IgM-ELISA に 0.5M NaSCN を添加すると、ウイルス抗原および未感染コントロール抗原ともに IgM 抗体との反応が低下した。とくに、未感染コントロール抗原と被検血清との非特異的反応がおおきく低下した。ウイルス抗原および未感染コントロール抗原との反応で得られた吸光度値の比 (P/N ratio) で評価する現在の基準では、見かけの数値が大きくなって、そのままでは NaSCN 添加前後での成績を比較できなかった。

4) NaSCN 添加前後での IgM-ELISA の Cut off 値の決定。

0.5M NaSCN 添加前後で抗原抗体反応が大きく変化する IgM-ELISA を比較するため、Cut off 値を決定した。図 4 は、Dengue 流行地への渡航経験のない日本国内に居住する 22 名の血清で得られた IgM-ELISA 結果を P/N ratio で示す。NaSCN 添加前後での平均の P/N ratio はそれぞれ 1.802 および

17.945であった。標準偏差(SD)はそれぞれ0.2402および4.3729となった。Cut off 値を Ave. +2SD とした時の値は、NaSCN 添加の前後で2.28および26.60であった。図4では Cut off 値を越えなかったものは21/22例であったので、この値をもとに以後の測定をおこなった。

5) RT-PCR で感染ウイルスの同定された症例の IgM-ELISA 測定結果(表1)。

RT-PCR で急性期に感染ウイルスの同定された8症例の血清を用いた。4価、およびD1からD4までのウイルス抗原を用いて、0.5M NaSCN 添加前後で得られた IgM-ELISA 結果を示す。NaSCN -/+での cut off 値をそれぞれ2.28および26.60とした時、NaSCN 未添加では7/8例が IgM 陽性で、5/7例で RT-PCR および IgM-ELISA での型特異性が一致した。NaSCN 添加後の IgM 陽性数は5/8例と2例少なかったが、RT-PCR 結果との一致率は5/5例(100%)であった。02-38/1を除く7例の IgM-ELISA 結果(P/N ratio)は、NaSCN 添加と関係なく感染ウイルス血清型に対する値がその他の血清型より大きな数値を示した。NaSCN を添加した時の反応は、感染ウイルス血清型に対する反応が交差反応より強調されて出現した。

6) NaSCN を添加した IgM-ELISA のデング診断への応用性の観察(図5)。

IgM-ELISA で感染ウイルス血清型の判定を行う場合の有用性について、発病日との関係を観察した。一般に発病後の初期〔急

性期〕は後期〔回復期〕と比較して抗体価が低い。IgM-ELISA は発病3日後より抗体の検出が可能であった。しかし発病6日後までは、感染ウイルス血清型に一致した IgM 抗体の検出は困難であった。0.5M NaSCN を IgM-ELISA に添加した時、発病6日以後19日後までの血清(20検体)でどれか1つのウイルス血清型に対する強い IgM 抗体反応が観察され、感染したウイルスの血清型の推定が可能であった。

D. 考察

デングの診断は感染症診断の一般法則にない、患者体内よりデングウイルスを分離同定する必要がある。ウイルスの検出可能な時期を過ぎた場合、IgM 抗体の検出でデングの診断が可能である。IgM-ELISA による血清診断ではしかし、感染ウイルス血清型の判定は困難である。その原因は、デングウイルスの血清学的交差反応性に由来する。これまで我々は IgM-ELISA を日本人デング患者の診断に用いてきたが、RT-PCR で検出されたウイルス血清型と一致した抗原に対して、他の抗原よりも強い IgM 抗体反応を示す症例を多数観察した。今回の実験観察では全18例のウイルス遺伝子が検出された症例を用いた(未発表)。ウイルス遺伝子と IgM-ELISA での血清型の一致した症例数は13/18(72.2%)であった。IgM-ELISA に0.5M NaSCN を添加した時の一致症例数は16/18(88.8%)であった。IgM-ELISA への0.5M NaSCN 添加が IgM 検出

率を低下させ、測定法の性能を低下させることはなかった。

E. 結論

デングの血清診断を目的に確立した IgM-ELISA へ可逆的タンパク変性作用を示すチオシアン酸ナトリウム (NaSCN) を添加した。薬剤添加後に感染ウイルスの血清型に対する IgM 抗体反応が交差反応より強く現われた。デングウイルス感染例において、RT-PCR によるウイルス遺伝子検出できない場合、感染ウイルス血清型の判定が必要な際に、補助的な検査法としての有用性があった。

F. 健康危険情報

実験はすべて生物学的安全基準にしたがって実施された。

G. 研究発表

1. 研究発表

現在 Dengue Bulletin に投稿中である。

2. 学会発表

第 51 回日本ウイルス学会総会 [平成 15 年 10 月、京都市] において発表された。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

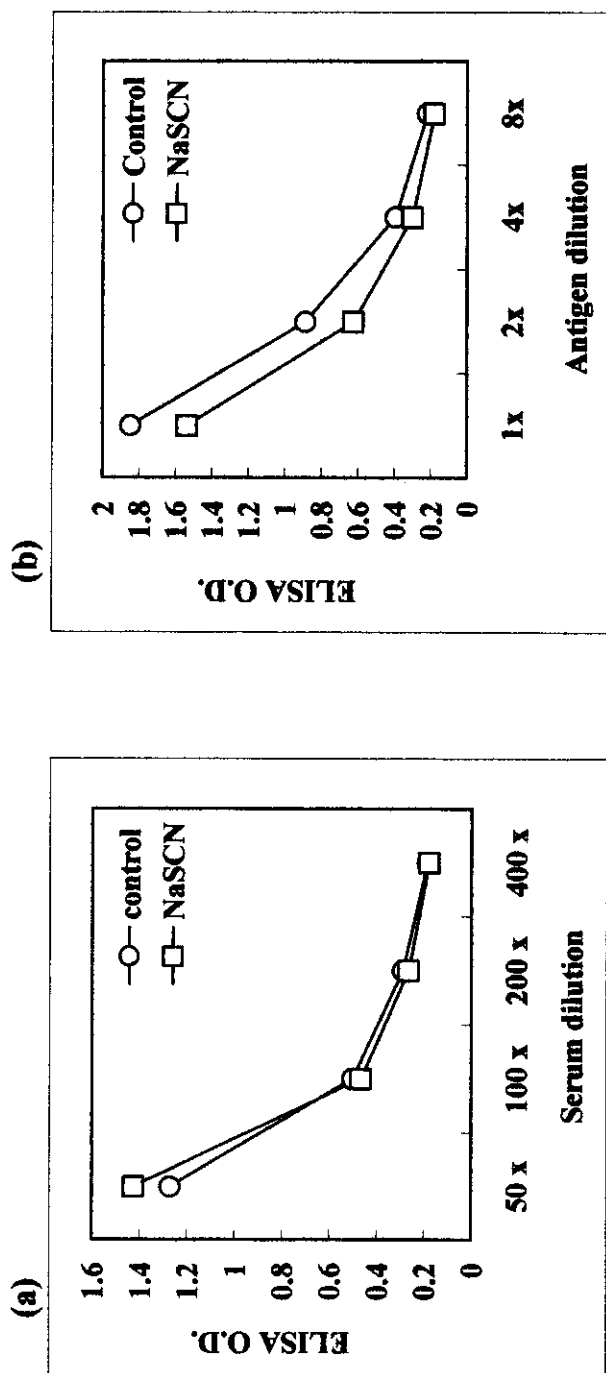


図1 NaSCN添加がIgM-ELISA へ与える影響
 (a) 抗ヒトIgM抗体と患者血清中のIgM抗体との反応への影響
 (b) デングウイルス抗原と検出酵素標識モノクローナル抗体との反応への影響

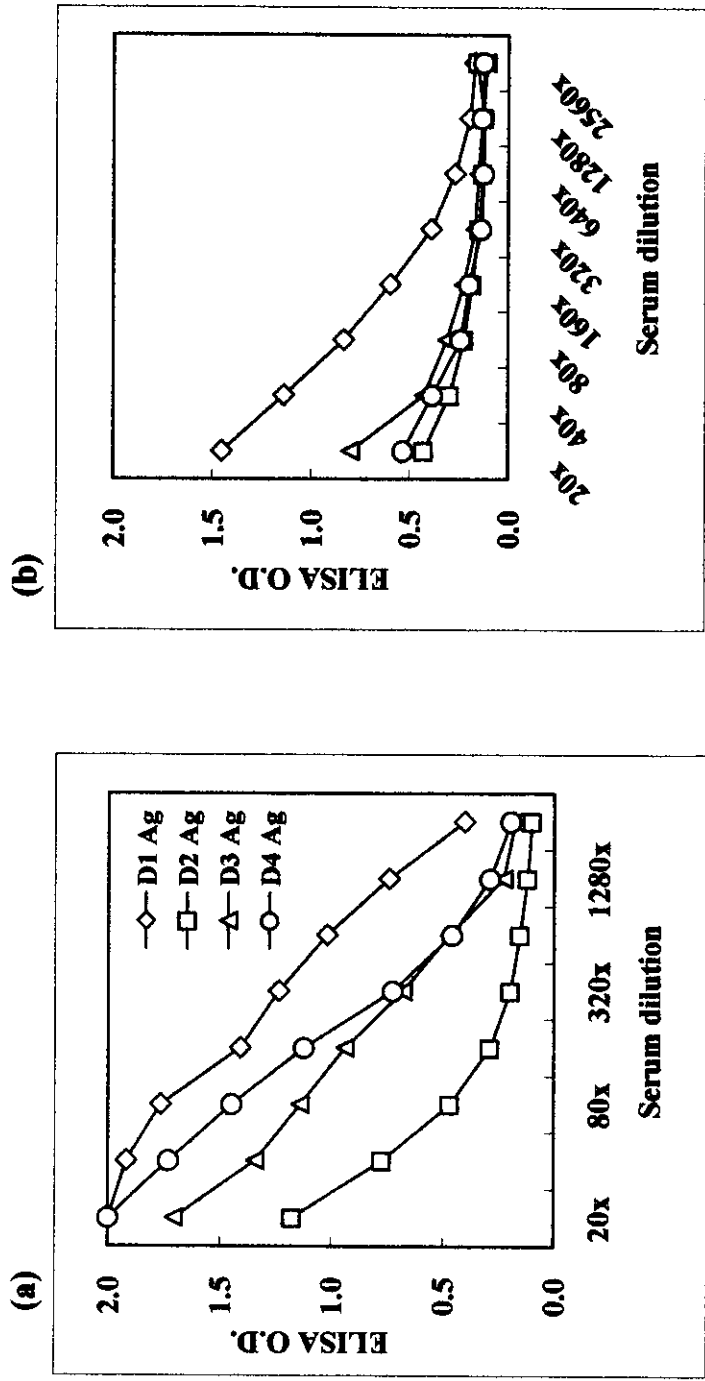


図2 NaSCN添加がIgM-ELISAへ与える影響
 (a) Protein G 吸収後のD1感染者血清とウイルス抗原との反応を酵素標識抗ヒトIgMヤギ抗体で検出した。
 (b) 0.5 M NaSCN存在下で(a)と同一条件で観察した。

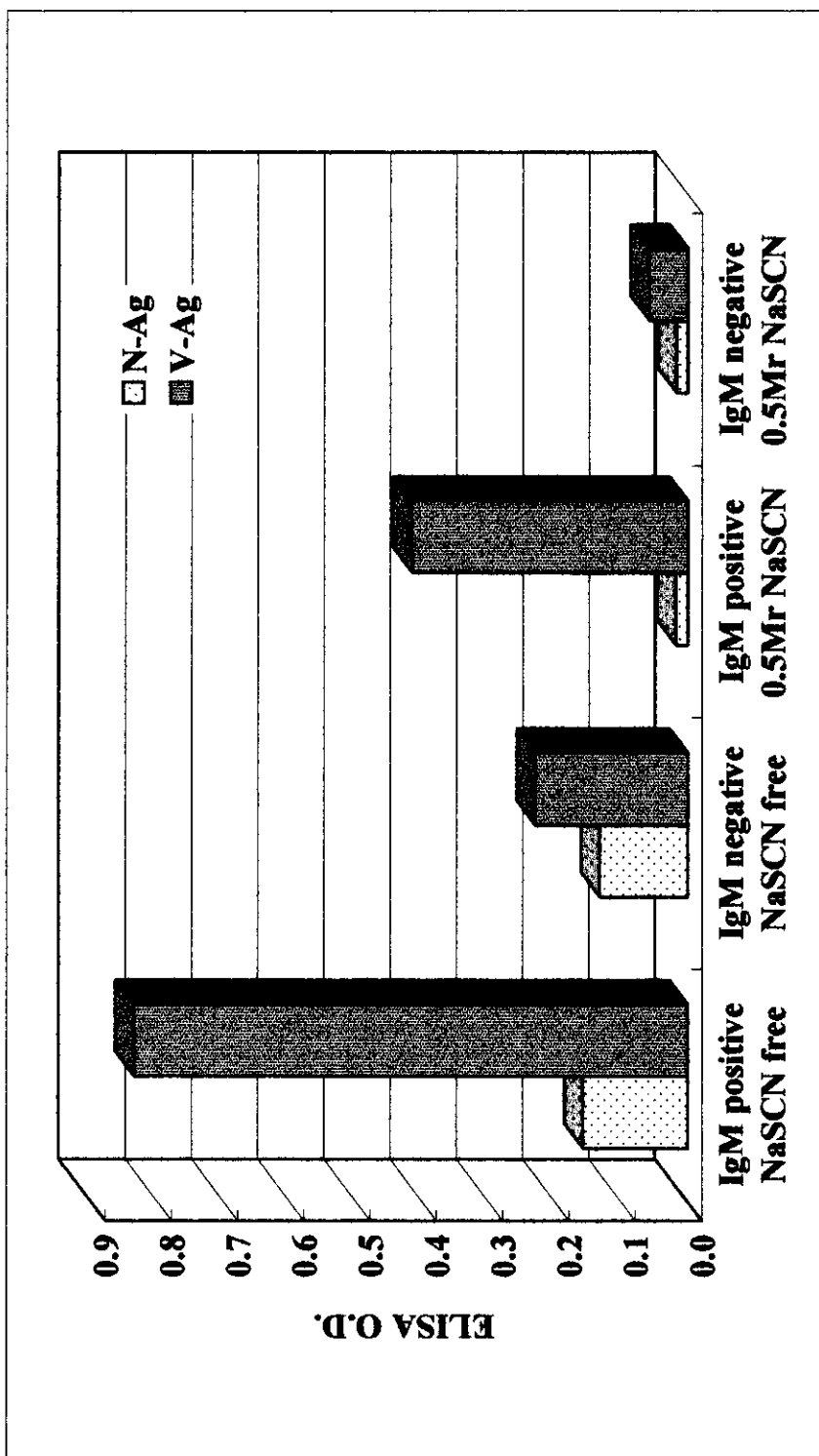


図3 NaSCNをデングIgM-ELISAへ添加前後における抗原・抗体反応の変化

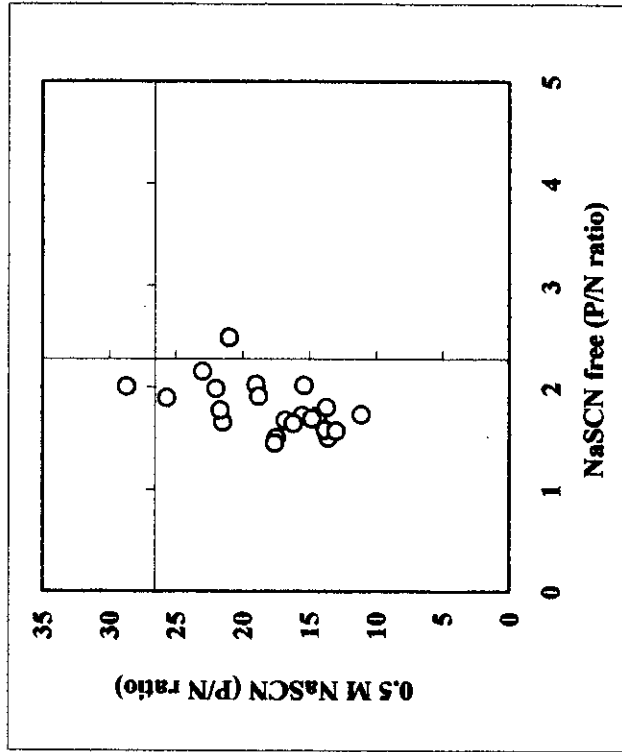


図4 デング流行地へ渡航歴のない日本人血清22例のデングIgM-ELISA測定結果
 X軸とY軸は、P/N ratio = 2.28 および 26.60で交差する。

病日	NaSCN free		0.5 Mr NaSCN	
	判定可	判定不可	判定可	判定不可
1				
2				
3		◎		◎
4		◎●		◎●
5	◎●	◎		◎◎
6	◎●	◎	◎◎	◎◎●
7	●●	●	●●●	●
8	●●	◎●	◎●●	●
9		●	●	
10		●	●	
11		●	●	
12				
13	●		●	
14	●●		●●	
15	●		●	
16				
17		●	●	
18				
19	●●●		●●●	
検体数	15(2)	12(5)	20(3)	7(4)

シンボル1個は1検体を表す。◎はウイルスRNAの検出された検体
 カッコ内はRNAの検出された検体数を示す。

図5 0.5 M NaSCN添加とウイルス血清型特異的反応、および病日との関係

表1 RT-PCRでウイルス遺伝子の検出された8症例のIgM-ELISAへのNaSCN添加の効果

Specimen	dengue viral assay antigens				RT-PCR		Des day
	Tetra	D1	D2	D3	D4	D3	
00-40/2	1.20	1.47	2.29	1.42	5.67	D3	4
01-04/2	5.76	4.89	52.18	7.96	4.49	D2	7
01-45/1	1.35	1.13	4.77	1.71	0.81	D2	6
01-62/2	4.64	3.07	1.75	6.55	0.89	D3	6
02-07/1	1.72	2.76	1.46	6.33	1.39	D1	5
02-21/2	1.30	1.12	1.44	1.19	2.41	D4	19
02-20/2	5.54	7.55	6.78	6.41	3.37	D1	8
02-38/1	1.03	1.36	1.13	1.27	0.27	D1	5

数値は P/N ratio で表す。下段は 0.5 M NaSCN 添加後の結果を示す。
 CUT off 値は、NaSCN 添加の前後でそれぞれ 2.28 および 26.60 であった。
 Tetra, Tetra valent antigen; Des day, Disease day.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

ブタにおける日本脳炎ウイルスサーベイランス

分担研究者 高崎智彦(国立感染症研究所)
協力研究者 根路銘令子、田島 茂、伊藤美佳子 (国立感染症研究所)
小川知子 (千葉県衛生研究所)
吉田靖子 (東京都立健康安全研究センター)
尾西 一 (石川県保健環境センター)
神田政宏 (静岡県西部食肉衛生検査所)
佐原啓二 (静岡県環境衛生科学研究所)
杉山 明 (三重県科学技術振興センター保健環境研究部)
沖 浩臣 (和歌山県環境衛生研究センター)
山西重機 (香川県環境保健研究センター)
渋谷 香 (高知県衛生研究所)
桑山 勝 (広島県保健環境センター)
甲木和子 田端康二 (熊本県保健環境科学研究所)
糸数清正 (沖縄県衛生環境研究所)

研究要旨

1990年以降、日本脳炎患者の発生は、毎年10人以下であるが、2001年には和歌山県で11年ぶりに患者が発生し、2002年には13年ぶりに広島県で患者が発生している。ブタの抗体調査によれば、依然として関東以西のブタの間では日本脳炎ウイルスは、依然として蔓延している。我々は2002年春より「日本脳炎ワクチンの有効性評価」を狙いの一つとして、12都県地方衛生研究所との共同研究の形で、ブタにおける「日本脳炎ウイルスサーベイランス」を開始した。

近年アジア諸国では、我々が今回2002年のブタ血清から分離したウイルスと同様に、抗原性や遺伝子型でワクチン株(3型)と異ったウイルス(1型)が多数分離されている。本研究において我々は、新しくブタから分離されたウイルスを抗原的、遺伝学的並びに進化的に解析するだけでなく、その病原性をマウスにおける中枢神経毒性及び中枢神経侵入性の面から調査し、ワクチン株との比較を試みた。その抗原性の変異は、現行ワクチンで防御可能な程度である。また新分離株を含む遺伝子1型のウイルス遺伝子には、共通して68-80番目の塩基の欠失が認められた。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルスは、毎年夏期になると九州、四国地方からブタの間で流行し始め、近畿・東海・北陸・関東地方へと侵淫地域を拡大する。近年の日本脳炎患者の発生数は10人以下であるが、依然としてブタの間

では夏期にウイルスが蔓延しているのが、現状である。

現行日本脳炎ワクチンは「マウス脳由来不活化ワクチン」であり、国際的に認められている唯一の日本脳炎ワクチンである。また、現行ワクチン株(Beijing-1株)は、

1949年に中国北京市でヒトから分離された日本脳炎ウイルスで、日本では1989年接種のワクチンより、それまでのNakayama-NIH株から、免疫性が高く、抗原性が野外分離株により近いとされるBeijing-1株に変更になり、以来15年が経過している。現行ワクチンの開発国である我が国は、その有効性についても責任が大きいものとする。そこで我々は、2002年春より「日本脳炎ワクチンの有効性評価」を狙いの一つとして、12都県地方衛生研究所との共同研究の形で、ブタにおける「日本脳炎ウイルスサーベイランス」を開始した。日本脳炎ウイルスを分離しその分子疫学的解析を実施した結果、ブタから分離されたウイルスは、ワクチン株と異なり遺伝子型1型であった。近年アジア諸国では、我々が今回2002年のブタ血清から分離したウイルスと同様に、抗原性や遺伝子型でワクチン株から大きく変異したウイルスが多数分離されている。本研究において我々は、新しくブタから分離されたウイルスを抗原的、遺伝学的並びに進化学的に解析するだけでなく、その病原性をマウスにおける中枢神経毒性および中枢神経侵入性の面から調査し、ワクチン株との比較を試みた。

B. 研究方法

1. ウイルス分離

分離ブタ血清の採取法

日本脳炎ウイルスIgM抗体が陽性となった時点より、1週ないし2週前のブタ血清をウイルス分離材料として用いた。

ウイルス分離法

分離は株化細胞による分離法を主として用いた。各施設で、乳のみマウス脳内接種法が得意な場合は、マウスによる分離を実施した。使用した細胞はVero細胞（アフリカミドリザル腎臓由来）およびC6/36細胞（ヒトスジシマカ由来）を用いた。

遺伝子解析

分離したウイルスのうち、増殖の良いものから、E領域に設定した5つのプライマーペアを用いてRT-PCR法により遺伝子を増幅し、ABI prism 310遺伝子解析装置を用いてE領域の遺伝子解析を実施した。

抗原性および病原性解析

分離ウイルスの抗原性の解析は、ワクチ

ン株及び分離ウイルスに対するマウス高度免疫血清を作製し、それを用いたHAI試験並びにブランク中和試験により行った。分離ウイルスの病原性を調べるために、ウイルス増殖の良いsw/Chiba/88/2002とsw/Hiroshima/25/2002ウイルスの、哺乳マウス脳における中枢神経毒性(LD₅₀/mouse)をワクチン株Beijing-1のそれと比較した。

C. 研究結果

9県のブタ血清から日本脳炎ウイルスが複数株分離され、その内8株のEタンパク領域について遺伝子配列を決定した結果、それらはいずれもワクチン株の3型とは異なる遺伝子1型であった(図1)。何れの分離ウイルス(Vero細胞由来)も、ワクチン株(マウス脳由来)同様の高い感染価(PFU/ml)を示し、分離ウイルスのブランクサイズはワクチン株の十倍以上の大きさを示した(図3)。HA試験における至適pHは、ワクチン株はpH6.4、分離ウイルスではpH6.6である傾向が見られた。

ワクチン株Beijing-1の高度免疫抗血清に対する中和抗体価(log₁₀)は、Beijing-1、Nakayama-NIH株の3.60、3.02に比べて、sw/Hiroshima/25/2002以外の分離株は2.56-2.60と1log程度低い値を示し、抗原性の変異が示唆された。sw/Hiroshima/25/2002は3.52と高く反応し、ワクチン株に抗原性が類似していることが示唆された(表1)。哺乳マウス脳における中枢神経毒性試験の結果は、ワクチン株のBeijing-1で最も早く、採用した全ての希釈で4日目に発症が見られ、LD₅₀は7日目で5pfuであった。同時に実験に供した2株の分離ウイルスの内sw/Chiba/88/2002は、ウイルス量の多いグループで6日目から重症化及び死亡が認められ、LD₅₀は8日目で125pfuであり、中枢神経毒性の程度はBeijing-1株の1/25であった。sw/Hiroshima/25/2002は一番ウイルスの濃い希釈で6日目に、1匹の麻痺発症が見られた以外に症状は認められなかった。

新分離ウイルスの内、5株のウイルス及び2株のワクチン株について3'NTR領域の塩基配列を決定したところ、新分離株を含む遺伝子1型のウイルス遺伝子には、共通

して 68-80 番目の塩基の欠失が見られることが明らかになった。

D. 考察

本邦における日本脳炎患者数は、1980 年代には、20 から 40 例の範囲にとどまっていたが、1990 年に 11 年ぶりに 50 例を越えた。しかし、1991 年の 13 例の後、1992 年以降患者数は 10 例を越えない。しかしながら、2001 年には和歌山県で 11 年ぶりに患者が発生し、2002 年には 13 年ぶりに広島県で患者が 3 例発生している。このような状況から我々は、現在わが国で日本脳炎ウイルスの増幅動物であるブタの間で、どのような株が流行しているのかを検討した結果、遺伝子型 1 型が分離された。以前から、石川県・東京都でブタから分離されたウイルスが 1 型であることが報告されていたことから、現在ブタの間で主として侵淫しているウイルスは、ワクチン株である北京株の遺伝子型 3 型と異なり、1 型であることが示唆された。今後、本邦のウイルス株が 1 型に置き換わっているのか、1 型と 3 型が混在しているのか、サーベイランスを続行し明らかにする必要がある。分離ウイルスを用いて、高度免疫抗血清を作製し、抗原性を解析したところ、現行ワクチン株との変異が示唆されたが、現行ワクチンで防御可能な程度であった。

また、哺乳マウス脳における中枢神経毒性は、遺伝子型 1 型のほうが、やや弱い可能性が示唆された。新分離株を含む遺伝子 1 型のウイルス遺伝子には、共通して 68-80 番目の塩基の欠失が認められた。この欠失を利用すれば、遺伝子型 1 型および 3 型を容易に区別する病原体診断法を開発出来るものと考えられる。

E. 結論

現在ブタの間で主として侵淫しているウ

イルスは、ワクチン株である北京株の遺伝子型 3 型と異なり、1 型である。その抗原性の変異は、現行ワクチンで防御可能な程度である。新分離株を含む遺伝子 1 型のウイルス遺伝子には、共通して 68-80 番目の塩基の欠失が認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

高崎智彦、根路銘令子、倉根一郎. 2002 年日本におけるブタから分離された日本脳炎ウイルスの解析. 病原体検出情報 24(7) 153. 2003

桑山勝、高尾信一、福田伸治、島津幸枝、宮崎佳都夫、倉根一郎、高崎智彦、山田堅一郎、根路銘令子、伊藤美佳子、笠松淳也、中村就一、宮脇弘幸、香川治子、青山範子、越智一秀、原田和歌子、時信弘. 2002 年に発生した日本脳炎 3 事例についての詳報—広島県. 病原体検出情報 24(7) 152-153. 2003

2. 学会発表

根路銘令子、高崎智彦、野村秀和、山田堅一郎、伊藤美佳子、倉根一郎. 日本脳炎ウイルスのサーベイランスブタ血清からのウイルス分離とその解析および日本脳炎を疑われる患者検体からのウイルス分離. 第 38 回日本脳炎生態学研究会 2003 年 5 月 (小樽)

根路銘令子、高崎智彦、野村秀和、倉根一郎. 日本脳炎ウイルスのサーベイランス：ブタ血清からのウイルス分離とその解析. 第 51 回日本ウイルス学会総会、2003 年 10 月 27 日—29 日 (京都)

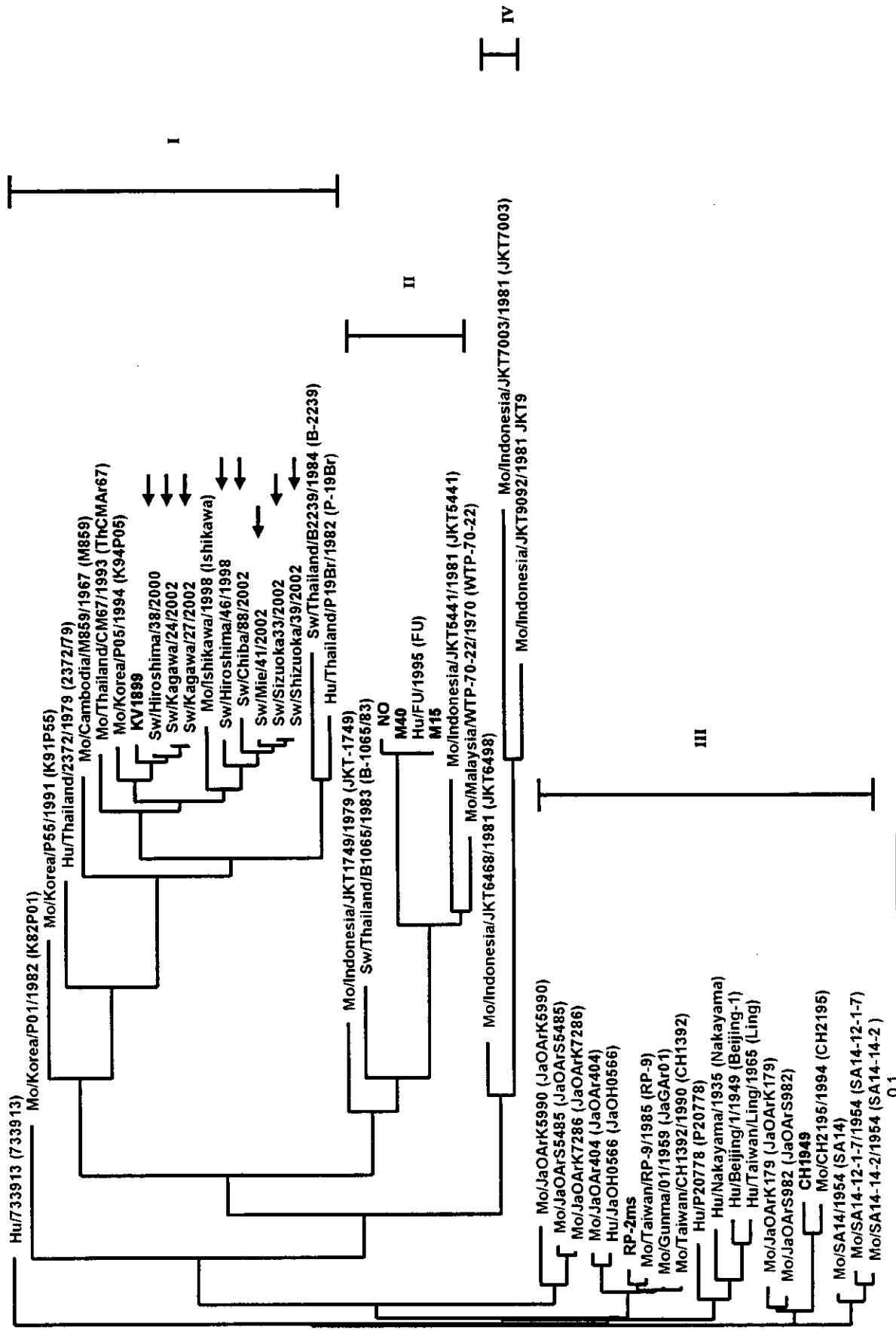
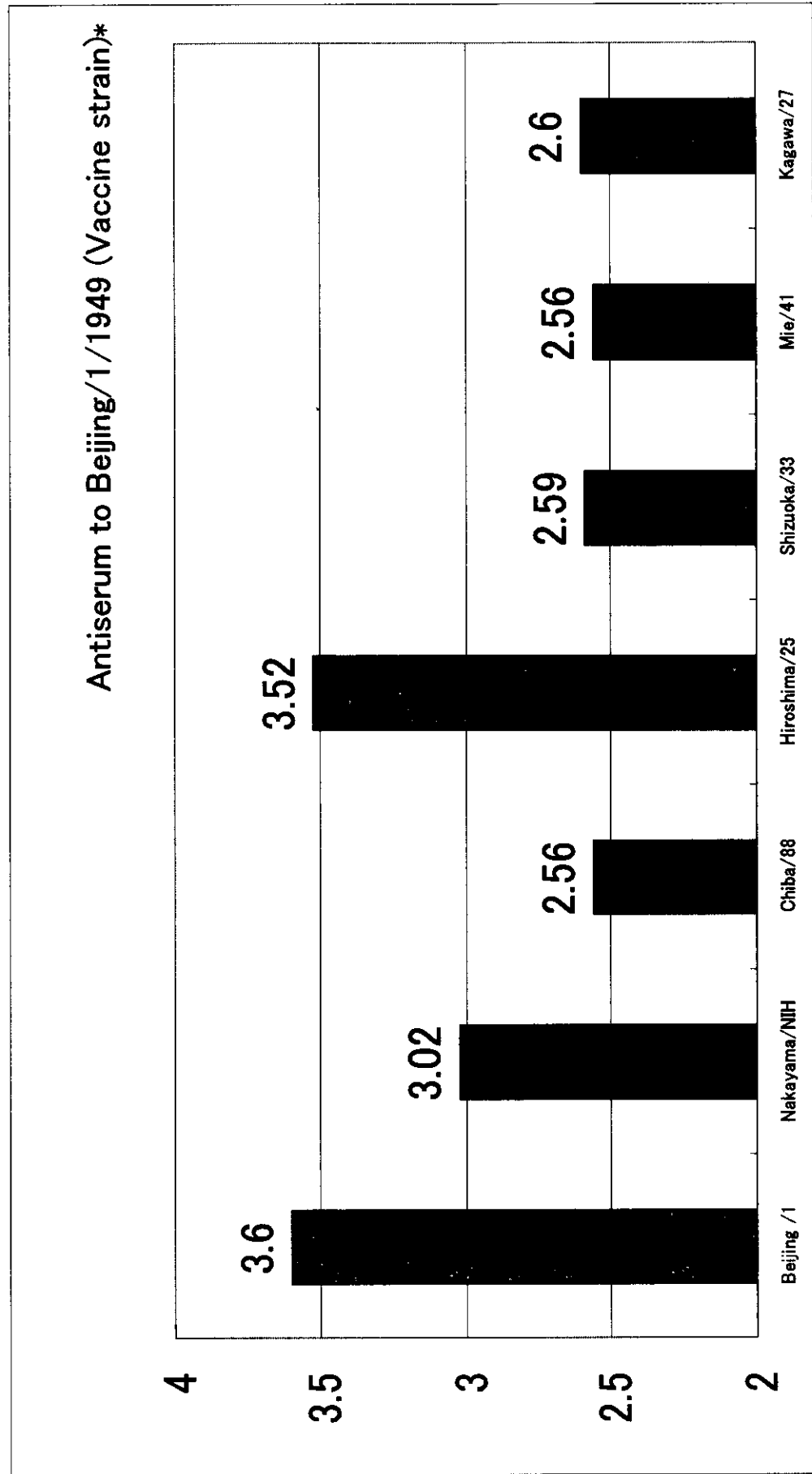


Fig. 1 Phylogenetic tree of the E protein genes of a total of 50 Japanese encephalitis viruses. The name of the virus isolates are referred by the new nomenclature which we proposed last year, and also put their old name in parenthesis. Arrows indicate viruses isolated in this study.

Fig. 2 Comparative analysis of the antigenic variation of the reference strains and 2002-swine isolates based on the plaque neutralization.



分担研究報告書

中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱の分子疫学

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、倉根一郎(国立感染症研究所)

唐 青(中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所)

研究要旨:クリミア・コンゴ出血熱(CCHF)の流行地である中国新疆自治区で1966-88年の間に分離されたCCHFウイルスのS-RNA遺伝子の分子系統学的解析から、この地域のCCHF流行地には、3種類[1966-S型(1966年分離株)、1970-S型(1970, 1979年分離株)、1975-S型(1975, 1978, 1984, 1988年分離株)]のCCHFウイルスが存在する。2001年の流行は、1966-S型の再興により、2002年は1966-S型と1975-S型によることが明らかになった。また、2002年に捕獲したダニの16S-ribosomal DNAの分子系統学的解析から、*Hyalomma*属と*Dermacentor*属の2種類のダニが存在したことが推定された。一方、M-RNA遺伝子の分子系統学的解析からは、中国のCCHFウイルスは、1966年型、1970年型(1970年、1979年分離株)、1975年型(1975年、1978年分離株)、1984年型(1984年、1988年分離株)の4型に分類された。また、タジキスタン、イラク分離株は1975年型に分類され、パキスタン分離株は、1975年型(SR3_Pakistan株)と1984年型(Matrin株)に分類されるものがあった。1970年型とロシア分離株は、いずれにも分類されなかった。特に、1970年型は他の型と最も分子系統的に離れていることが明らかになった。

A. 目的と意義:

クリミア・コンゴ出血熱(CCHF)ウイルスは、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類され、3分節の(-)RNAをゲノムとする。CCHFは感染症法で1類感染症に分類され、アフリカ以外にも分布する唯一のウイルス性出血熱である。アフリカ以外では、クリミア半島から中国新疆にかけて広範囲の国、地域で毎年CCHFの流行が報告されている。これまでに、中国の新疆ウイグル自治区で1966-88年の間に分離された7株のM-RNAの全遺伝子配列を決定して比較検討した結果、この地域には、CCHFウイルスが3型存在することが明らかになった。また、2001年の流行時の患者、ダニからRT-PCRにより増幅されたS-RNA遺伝子全長の配列の比較から、2001年に分離されたウイルスは1966年に分離されたウイルスの再興によることが明らかになった。また、35年間にウイルス遺伝子の変異がほとんど起きないことも明

らかになった。今年度は、2002年のCCHFの流行時に患者、ダニからRT-PCRにより増幅されたS分節の遺伝子配列を決定し、流行に関与したウイルス型を同定した。また、同一地域にCCHFウイルスが3型併存する理由を考察した。

B. 材料と方法:

1) RT-PCR: 中国の新疆ウイグル自治区の流行地(図1)で2002年のCCHF流行期(4から5月)に、急性期の患者血清およびダニからRNAを抽出した。ランダムヘキサマーp(dN)₆で1st strand cDNAを作製した。ここまでの実験は、中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所において唐青博士との共同研究で行った。患者からの血液採取にあたっては、説明をし同意を得た。1st strand cDNAを鋳型として種々のプライマーを用いてS-RNA分節を標的としたPCRを行い、PCR産物からdirect

sequenceにより塩基配列を決定した。

2)ダニの16S-ribosomal DNAのPCR:ダニからRNA抽出後のextractからDNAを抽出した。16S-ribosomal DNAを標的にPCRを行い、その配列を決定し、GenBankに登録されているダニribosomal DNA配列と比較し、ダニの種類を推定した。

3)M-RNA配列の系統的解析:これまで、中国以外のCCHFウイルスのエンベロップ蛋白等をコードするM-RNA全長の遺伝子配列に関するデータがほとんどなかったため、特にM-RNAにコードされるmucin様蛋白のアミノ酸配列に極めて多様性がある理由が不明であった。今年度に旧ソ連、イラク、パキスタン等のCCHFウイルスのM-RNA全長の配列が決定されたため、これらと中国株の分子系統的解析を行った。

C. 結果:

1)RT-PCR:6人の急性期のCCHF患者血清からPCR産物が得られた。流行地で採取されたダニは、2-6匹をプールしてRNA採取した結果、45プールのダニ材料のうち5プールからPCR産物が得られた。得られたS-RNAのPCR産物の遺伝子配列をGenBankに登録されているCCHFウイルスの部分配列と比較した結果、患者由来5検体、ダニ由来2検体は、1966-S型(1966年分離株)(1966年分離株66019株/2001年流行)に、患者由来1検体、ダニ由来3検体は、1975-S型(1975, 1978, 1984, 1988年分離株)に分類された(図2)。

2)ダニの16S-ribosomal DNAのPCR:45プールのダニ材料のうち4プールから16S-ribosomal DNA-PCR産物が得られた。このPCR産物の遺伝子配列をGenBankに登録されているダニRibosomal DNA遺伝子配列と比較検討した結果、2サンプルが*Hyalomma*属に2サンプルが*Dermacentor*属に分類された(図3)。

3)M-RNA配列の系統的解析:2003年にロシア、英国、米国から複数のCCHFウイルス株のM-RNAの全配列が決定された。これまでに、M-RNAの部分遺伝子配列からNJ法による分子系統的解析を行った結果では、中国の2株(7001, 79121;1970年型)はウズベキスタン分離株と、2株(8402, 88166;1984年型)はパキスタン分離株と、2株(75024, 7803;1975年型)

はタジキスタン分離株と同じ系統に属した。今回、全遺伝子配列・アミノ酸配列から同様の解析を行った結果、1975年型にタジキスタン、イラク分離株が分類され、パキスタン分離株は、1975年型と1984年型に分類されるものがあった。ロシア分離株は、いずれの中国分離株とも異なる型に属した(図4)。M-RNAのmRNAからは、ムチン様蛋白、p35, G2, G1 (G1, 2はエンベロップ蛋白;ムチン様蛋白、p35は、機能等不明;図5参照)がコードされるが、機能不明のムチン様蛋白部位(約250アミノ酸からなる)は、ウイルス型間で極めてvariableで、アミノ酸のホモロジーがウイルス株間で20%しかないものもある。そこで、M-RNAにコードされるOpen reading frame (Orf)を5'-側から約850 bases(N末端から約250アミノ酸)のFurin切断コンセンサス配列(R-X-R/K-R)までのムチン様蛋白部位と、それ以外(p35-G2-G1)のconserved regionについて比較した(表1)。また、ムチン様蛋白部位とそれ以外(p35-G2-G1)の部位のそれぞれアミノ酸配列に基づいた分子系統的解析を行った結果、いずれの部位で解析しても全アミノ酸配列に基づく解析(図4)と同様の結果が得られた。

D. 考察:

これまでCCHF流行地である中国新疆自治区で1966-88年の間に分離されたCCHFウイルスのS-RNA遺伝子配列による分子系統的解析から、この地域には3型[1966-S型(1966年分離株)、1970-S型(1970, 1979年分離株)、1975-S型(1975, 1978, 1984, 1988年分離株)]のCCHFウイルスが存在することが明らかとなった。同地域での2001年の流行は流行地に存在する3種類のCCHFウイルスのうち、1966-S型と同じ系統に属するウイルスにより、2002年の流行は1966-S型と1975-S型によることが明らかになった。

一方、M-RNAの配列からは、中国のCCHFウイルスは、1966年型、1970年型(1970年、1979年分離株)、1975年型(1975年、1978年分離株)、1984年型(1984年、1988年分離株)の4型に分類された。これは、S-RNAの部分配列と比べてM-RNA全長の方が情報量が多いこと、M-RNAの方が株間の変異が多いこと

により、より詳細に解析できるためと思われる。また、1975 年型にタジキスタン、イラク分離株が分類され、パキスタン分離株は、1975 年型 (SR3_Pakistan 株) と 1984 年型 (Matin 株) に分類されるものがあった。1970 年型とロシア分離株は、いずれにも分類されなかった。特に、1970 年型は他の型と最も分子系統的に離れていることが明らかになった。ムチン様蛋白の機能は不明であるが、この領域がウイルスの型間で極めて variable であること理由は、依然不明である。

ベクターのダニは、タジキスタン (*Dermacentor niveus*)、パキスタン (*Hyalomma anatolicum*)、ロシア (*Hyalomma marginatum*)、ナイジェリア (*Hyalomma excavatum*) が主なダニとして同定されている。また、宿主ダニ種と CCHF ウイルス型とが関連するという仮説が提出されている。中国流行地では、2002 年には、*Hyalomma asiaticum* が宿主ダニ種として同定されているが、今回の解析から、*Hyalomma* 属と *Dermacentor* 属の 2 種類のダニが存在したことが推定された (図 3)。この結果は、2002 年に CCHF ウイルスが 2 型流行に関与したことを考慮すると、ダニ種特異的にウイルス型が存在する可能性を示唆する。今後、より詳細な分子疫学的解析を行い、この可能性を検証する必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. (2003): Analysis of linear B-cell epitopes of the nucleoprotein of ebola virus that distinguish ebola virus subtypes. Clin Diagn Lab Immunol. 10(1):83-7.
- 2) Tang, Q., Saijo, M., Han, L., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Xinjung, W., Kurane, I., and Morikawa, S. (2003) Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by recombinant

nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays. Journal of Virological Methods, 108: 111-116.

- 3) Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, M.E.G., Calaor, A.B., Hernandez, M., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2003): Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. Epidemiology and Infection, 130(3):533-9.
- 4) Tang Q, Saijo M, Zhang Y, Asiguma M, Dong T, Han L, Shimayi B, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2003) A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever diagnosed with recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems. Clinical and Diagnostic Laboratory immunology 10(3):489-91.
- 5) Maeda, A., Lee, B-H., Yoshimatsu, K., Saijo, M., Kurane, Arikawa, J. and Morikawa, S. (2003): The Intracellular Association of the Nucleocapsid Protein (NP) of HantaanVirus (HTNV) with Small Ubiquitin-Like Modifier-1 (SUMO-1) Conjugating Enzyme 9 (Ubc9). Virology, 305: 288-297.
- 6) 森川 茂 (2003) : ラッサウイルス 日本臨床 61 巻増刊号 3 (通巻 821 号) 539-543
- 7) 森川 茂 (2003) : フィロウイルス 日本臨床 61 巻増刊号 3 (通巻 821 号) 544

- 8) 森川 茂(2003):マールブルグ病、総合臨床 (増刊:感染症診断・投薬ガイド) Vol 52, 601-604
- 9) 森川 茂 (2003): ウイルス性出血熱のその検査、モダンメディア、第49巻第4号、103-109
- 10) Ikegami, T., Niikura, M., Saijo, M., Miranda, M.E., Calaor, A.B., Hernandez, M., Acosata, L.P., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2003) Antigen-capture Enzyme-linked Immunosorbent Assay that specifically detects Reston Ebola Virus nucleoprotein. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 10: 552-557
- 11) Lee BH, Yoshimatsu K, Maeda A, Ochiai K, Morimatsu M, Araki K, Ogino M, Morikawa S, Arikawa J. (2003) : Association of the nucleocapsid protein of the Seoul and Hantaan hantaviruses with small ubiquitin-like modifier-1-related molecules. Virus Res., 98(1):83-91.
- 12) T. Sakamoto, H. Ushijima, S. Okitsu, E Suzuki a, K. Sakai, S. Morikawa, and W. E.G. Muller (2003) : Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and reporter gene. J. Virol. Meth. 114 159-166
- 13) 森川 茂(2004):ウイルス性出血熱、アニムス、第9巻第1号、15-20
- 14) Nikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Saijo, M., Kurane, I., and Morikawa, S. (2004): Modification of Endothelial Cell Functions by Hantavirus : Extension of TNF-alpha-induced hyper-permeability of hantavirus-infected endothelial cell monolayers. Arch. Virol. in press
2. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
特許取得:該当なし
3. 学会発表
- 1) 西條政幸, 唐青, 森川茂, 前田秋彦, 倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱に対するリバビリンによる治療経験. 第13回抗ウイルス化学療法研究会, 2003年1月, 津田沼
 - 2) 板村繁之, 森川茂, 田代真人. 重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスの感染性とゲノムの不活化. 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003年10月, 京都.
 - 3) 森川茂, 板村繁之, 西藤岳彦, 西條政幸, 小田切孝人, 倉根一郎, 田代真人. 重症急性呼吸器症候群(SARS)の血清診断法. 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003年10月, 京都.
 - 4) 板村繁之, 二宮愛, 西藤岳彦, 森川茂, 西條政幸, 小田切孝人, 倉根一郎, 田代真人. RT-PCR法による重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスの検出感度の検定. 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003年10月, 京都.
 - 5) 西條政幸, 森川茂, 前田秋彦, 倉根一郎. 急性期クリミア・コンゴ出血熱患者におけるウイルス血症と液性免疫応答. 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003年10月, 京都.
 - 6) 鈴木映子, 岩坂正和, 上野照剛, 林京子, 巽正志, 森川 茂, 沖津祥子, 牛島廣治. HIV-1の cell to cell fusionにおける gp41-mediated fusion. 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003年10月, 京都.