



図-1 オオミュビトビネズミ



図-2 シナイスナネズミ



図-3 ヒメミュビトビネズミ



図-4 カイロトゲネズミ



図-5 アフリカチビネズミ



図-6 リチャードソンジリス



図-7 アメリカアカリス



図-8 バナナリス



図-9 コロンビアジリス



図-10 デグー



図-11 シマリス



図-12 ピグミージェルボア

# リスやヤマネの仲間、野生げっ歯類 腎障害起こす菌、検出

# 輸入ペットは 病気を運び屋?

ペット用に輸入されるリスやヤマネの仲間など野生のげっ歯類は、種によっては半数から八割に腎臓を患うレプトスピラ菌が検出されるなど、人にも感染する人獣共通感染症の原因体を持つものが多いことが厚生労働省の調査で明らかになった。

佐原地を捕まえてくる野生げっ歯類は年間約十万人が日本に輸入され、ペントシロップなどを販売しているが、病原体検査は行われていない。調査を依頼した手塚清美麻布大助教授(獣医学)は「人間への感染の危険性を考え、実験室内に持ち込まれるのは危険だ」としている。

手塚助教授は昨年五月から七月、動物販売業者から購入した九種類、百四十四匹の感染状況を調べた。アフリカ、中国、中国などが原産国だった。

ネは、十匹のうち五匹がレプトスピラに感染していた。国内ではこれまで犬などから分離されたものとは異なる菌種だった。エンリス、コロンボリスリスなどからは、下痢の原因となる原虫のシマルシアやクリプトスポリジウムが見つかった。

レプトスピラは、秋の細菌で、げっ歯類やネコ、犬、猫などのペットが感染する可能性がある。動物の尿や糞に含まれた水や土壌から人に感染し、レプトスピラ症を引き起こす。重症化すると腎臓(おしり)などに、狭す



ビグミージェルボア (宇根有英麻布大助教授提供)

食中毒の原因となる菌。色アトウ線菌は、ヒゲミシエルボアで三十九匹、ビグミージェルボアで三十七匹から分離された。

出血、腎臓病などの症状が認められ、日本では一九七〇年代前半まで年間五十人以上の新規が報告されたが、最近では発生頻度がよくなる。検査数は少なく、五匹はアフリカ、中国など毎年数千人の患者が誕生している国も多い。

歴代野良猫の人が不正認識と報告  
北海道警  
北海道警の資金問題で、道警は十日、一九九五―九七年度の旭川中央署と一九九八―二〇〇〇

掲載新聞  
神奈川新聞 茨城新聞 静岡新聞 山梨新聞 信濃毎日新聞 福井新聞 中日新聞  
京都新聞 西日本新聞 中国新聞 山陽新聞 高知新聞 愛媛新聞 四国新聞  
大分合同新聞 宮崎日日新聞 北日本新聞 東奥日報 デーリー東北

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症 研究事業）  
輸入動物に由来する新興感染症侵入防止対策に対する研究  
分担研究報告

B ウイルスの潜伏感染に関する血清疫学的研  
蛍光ELISA法によるSHBV・HSV-1,2型の血清学的診断法の確立

分担研究者 本藤 良 日本獣医畜産大学獣医学部 教授  
協力研究者 植田富貴子 日本獣医畜産大学獣医学部 助教授  
斉藤 彩 日本獣医畜産大学獣医学部・獣医学科  
吉川 泰弘 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授  
大屋 智香 東京大学大学院農学生命科学研究科 院生

研究要旨

Simian herpes B virus (SHBV) および Herpes simplex virus-1,2 (HSV-1,2) 型の構造糖蛋白 (gD, gG) を抗原とした蛍光ELISA法による、高感度で特異性の高い血清学的診断法の開発を試み、その実用性について検討した。

1. 至適反応条件および至適抗原濃度の条件下において、各抗血清の希釈度に対比した、蛍光単位の標準反応曲線が得られ、それに対比した血清の最終希釈度をもって、高感度で各特異性の高い抗体価をもとめ得た。
2. SHBVのgD抗原では、HSV-1,2型感染血清との交叉反応も低く、SHBV特異抗体の検出が可能であった。
3. HSV-1,2型の各gG抗原では、SHBV感染血清との交叉反応もなく、HSV-1,2型の特異抗体の検出とHSV-1,2型の重複感染例も特異的に識別が可能であった。
4. 本法において、SHBV感染ザルから、HSV-1型の特異抗体が検出された。これにより、サルにおけるSHBVとHSV-1型の識別および両者ウイルスの複合感染が起こり得ることを明らかにした。

A. 研究目的

Simian herpes B virus (SHBV) 感染の血清学的確定診断は、近縁ヘルペス、特に Herpes simplex virus-1,2 (HSV-1,2) 型との抗原交叉性が高いことから、両者ウイルスの複合感染の場合、その確定診断が困難とされている。従って、本研究では、SHBVおよびHSV-1,2型の構造糖蛋白 (gD, gG) を抗原とした、各特異抗体の検出による血清学的診断法の確立を目的とした。

B. 研究方法

1. 方法：蛍光ELISA法で実施した（図1）。 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼと4MUG（基質）を用い、Fluoroscanで、その反応産物である4MUの蛍光単位を測定した。
2. 抗原：各ウイルス構造発現糖蛋白およびELISA抗原を用いた。SHBV抗原は、SHBV-gD（棚林らJ.Clin. Microbiol.39,3025,01）抗原、およびHSV-1,2型抗原は、HSV-1,2-gG（ABI社）とHSV-1,2-ELISA（BGN社）抗原を用いた。

3. 抗血清：SHBV感染アカゲザルおよびHSV-1,2型感染免疫ウサギ血清。第2次反応抗体は、ビオチン標識抗ヒト(AQI社)、抗サル(RKL社)、抗ウサギIgG(CMN社)血清を用いた。
4. 検体：アカゲザルおよびヒト血清を用いた。SHBV感染および健常アカゲザル血清、24検体。HSV-1型感染ヒト血清(8症例)、HSV-2型感染ヒト血清(2症例)、HSV-1,2型重複感染ヒト血清(3症例)の13検体。健常ヒト血清、13検体を用いて検討した。

○倫理面への配慮：ヒト血清については、提供者から研究目的に対応した紙上発表のご了解を得た。また、症例検体に関しては、すでに紙上発表(J.Infection 43,206,2001.)された検体を分与されたものである。

## C. 研究結果

### 1. 反応条件の設定

反応条件の設定はBox testsで検討した。BSAのBlocking、使用各抗原および第2次の各抗血清に関しては、使用濃度に依存した至適反応条件が得られた。また、得られた至適反応条件と至適抗原濃度の条件下において、各抗血清の希釈度に対比した標準反応曲線が得られ、その反応曲線に対比した血清の最終希釈度をもって、各特異性の高い抗体価をもとめ得ることが可能であった(図2、3、4、5、表1、2)。

### 2. SHBVのgD抗原の特異性

SHBVにおけるgD抗原の特異性の検討では、HSV-1,2型感染免疫血清およびヒト感染症例において、両者間での交叉反応も低く、SHBV特異抗体の検出が可能であり、実用的である結果が得られた(図3、表1、2)。

### 3. HSV-1,2型のgG抗原の特異性

HSV-1,2型の各gG抗原におけるHSV-1,2型間およびSHBV間との特異性の検討では、SHBV感染サル血清およびHSV-1,2型感染免疫血清およびヒト感染症例において、両者間で交叉反応もなく、HSV-1,2型の特異抗体の検出とHSV-1,2型の重複感染例も特異的に識別が可能で、その抗体価をもとめ得た(図4、5、表1、2)。

### 4. SHBV感染ザルでの実用性

SHBV感染ザルでの実用性について、健常ザルを含めた24検体を用いて検討した。その結果を(表1)に示した。SHBV-gD抗原では、12検体のアカゲザルからSHBV特異抗体が検出された。また、1症例(表1-No.7, ID:1401)において、HSV-1型特異抗体が検出された。この結果により、サルにおけるSHBVとHSV-1型の複合感染が起こり得ることを明らかにした。

### 5. HSV-1,2型感染症例での実用性

HSV-1,2型感染症例での実用性について、健常者を含めた26検体を用いて検討した。その結果を(表2)に示した。各gG抗原では、SHBV感染血清との交叉反応もなく(表1)、HSV-1,2型の各特異抗体が検出された。また、HSV-1,2型の重複感染例も特異的に識別が可能であった(表2-No.23,24, ID:K-2,K-3)。

## D. 考察

SHBVの自然感染は東南アジア産のマカク属のサルが主で、ニホンザルも含まれている。SHBV感染ザルの多くは不顕性感染の経過をとり、ヘルペスウイルスの特性から後根神経節に潜伏感染を起こし、ストレスや免疫低下などの要因により再活性化を繰り返す。この過程で口腔内粘膜、唾液、結膜などからウイルスが分泌され、咬傷や引っかき傷などの接触感染によって伝播す

ると考えられている。感染ザルでは軽症（不顕性感染、口腔内潰瘍）であるが、ヒトに感染すると致死的な脳脊髄炎症状を引き起こし、致命率は約50%とされている。

現在まで、本邦での感染症の発生例は報告されていないが、ウイルス感染等の実験にサル類の使用が増加していることに加えて、最近ではペットや動物園などの展示サルからヒトへの感染も懸念されている。このような現状において、HSV-1,2型感染者においてもその潜伏感染と再活性化により、終生ウイルスと抗体を保有することになる。従って、SHBV感染ザルからのヒトへの感染が起こり得た場合、その両者ウイルス感染の類別診断が必要とされる。本研究において、SHBVとHSV-1,2型の高感度で各特異抗体の検出可能な血清学的診断法を確立したことは、潜伏感染SHBVの再活性化によるヒトへの感染およびヒトからサルへのHSV感染が起こり得た場合の確定診断およびその血清疫学的な感染様式を解析する上で重要な基礎的知見となり得るものと考えられる。

## E. 結 論

SHBV感染の血清学的確定診断は、近縁ヘルペス、特にHSV-1,2型との抗原交叉性が高いことから困難とされている。従って、本研究では、SHBVの構造糖蛋白（gD）およびHSV-1,2型の構造糖蛋白（gG）を抗原とした、蛍光ELISA法により、高感度で各特異抗体の検出可能な血清学的診断法を確立した。

本法により、SHBV感染ザルにおいて、HSV-1型特異抗体が検出されたことから、SHBVとHSV-1型の重複感染が起こり得ることを明らかにした。また、HSV-1,2型感染症例では、HSV-1,2型の各特異抗体の検出とHSV-1,2型の重複感染例も特異的に識別が可能である結果を得たことから、その

実用性を明らかにした。

以上、類別可能な血清診断法を確立したことは、潜伏感染SHBVの再活性化によるヒトへの感染およびヒトからサルへのHSV感染が起こり得た場合の確定診断およびその血清疫学的な感染様式を解析する上で重要な基礎的知見となり得るものと考えられる。

## F. 健康危険情報

諸外国における本感染症のヒトでの発生状況をみると、現在までに少なくとも30数例が報告されている。そのなかには潜伏ウイルスの再活性化とみられる再発症例や2次感染例も含まれている。現在まで、本邦での感染症の発生例は報告されていないが、ウイルス感染等の実験にサル類の使用が増加していることに加えて、最近ではペットや動物園などの展示サルからヒトへの感染なども懸念されていることで、本ウイルスと近縁で特に抗原交叉性が高いとされるHSV-1,2型との血清学的類別診断法の確立と血清疫学的な感染様式の解析が重要視されている。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Chika OYA, Yoshitsugu OCHIAI, Takashi TAKANO, Yojiro TANIUCHI, Fukiko UEDA, Yasuhiro YOSHIKAWA, Ryo HONDO.  
Specific detection and identification of herpes B virus by a PCR microplate hybridization assay. J. Clin. Microbiol. 42 (5) .1869,2004.
2. Chika OYA, Yoshitsugu OCHIAI, Takashi TAKANO, Yojiro TANIUCHI, Akikatsu FUJIMA, Fukiko UEDA, Yasuhiro YOSHIKAWA, Ryo HONDO.  
Epidemiological study on the herpes B

virus infection in seropositive cynomolgus monkeys by a PCR microplate hybridization assay. J. Clin. Microbiol. (submitted)

2) 学会発表

1. 小柳寿文、大屋智香、落合由嗣、植田富貴子、吉川泰弘、本藤良。

Bウイルス感染のDNA診断あと分子疫学に関する基礎的研究

(5) 輸入カニクイザルにおける三叉神経節潜伏Bウイルスの動態。

第137回日本獣医学会発表(2004)

2. 大屋智香、小柳寿文、落合由嗣、植田富貴子、吉川泰弘、本藤良。

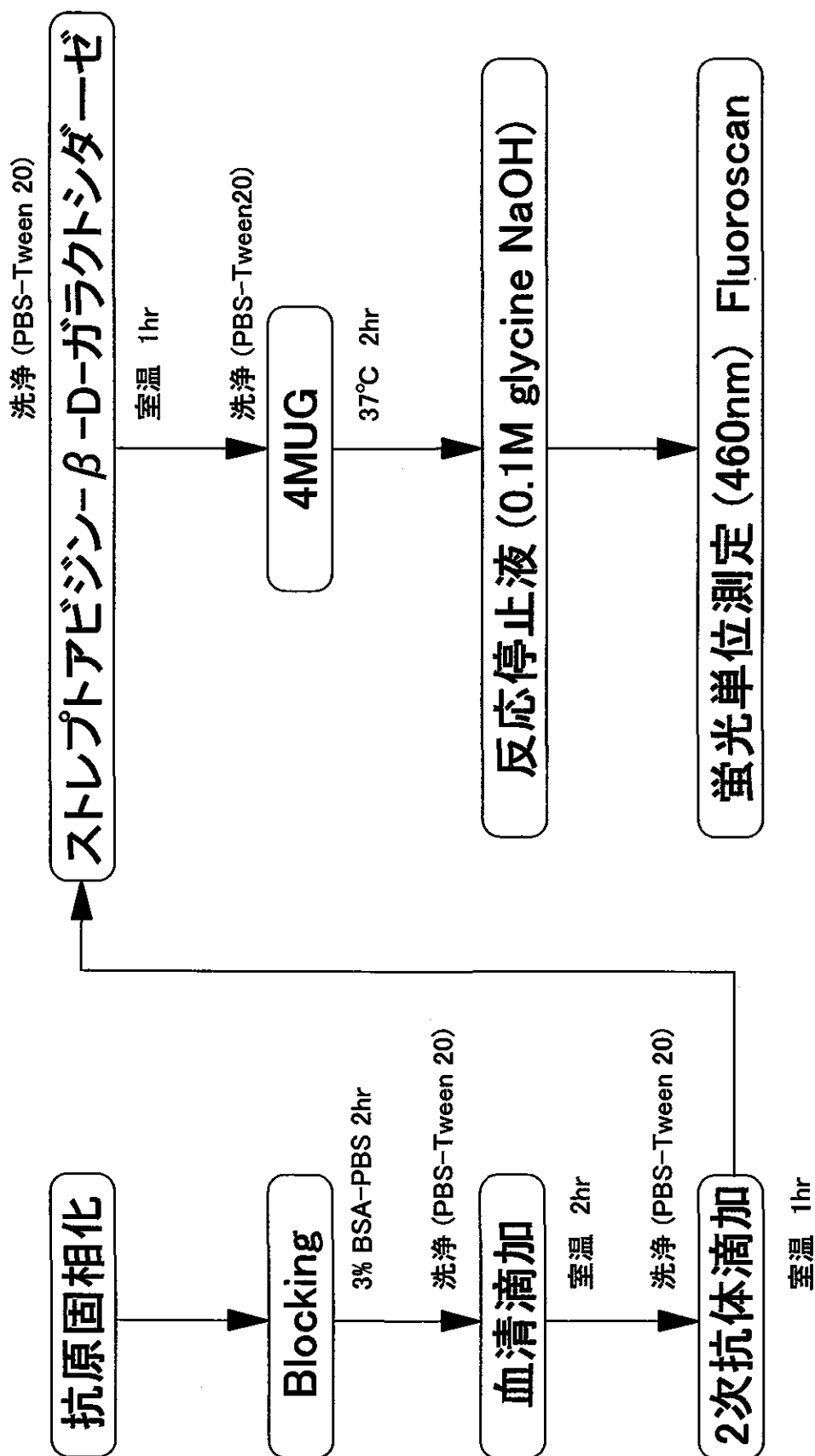
カニクイザル三叉神経節におけるBウイルス潜伏感染の動態。

第52回日本ウイルス学会学術集会発表(横浜)、(2004)

3. 斉藤彩、藤間昭勝、大屋智香、植田富貴子、鈴木恵真子、小枝暁子、今岡浩一、棚橋清、庄司紘史、吉川泰弘、本藤良。

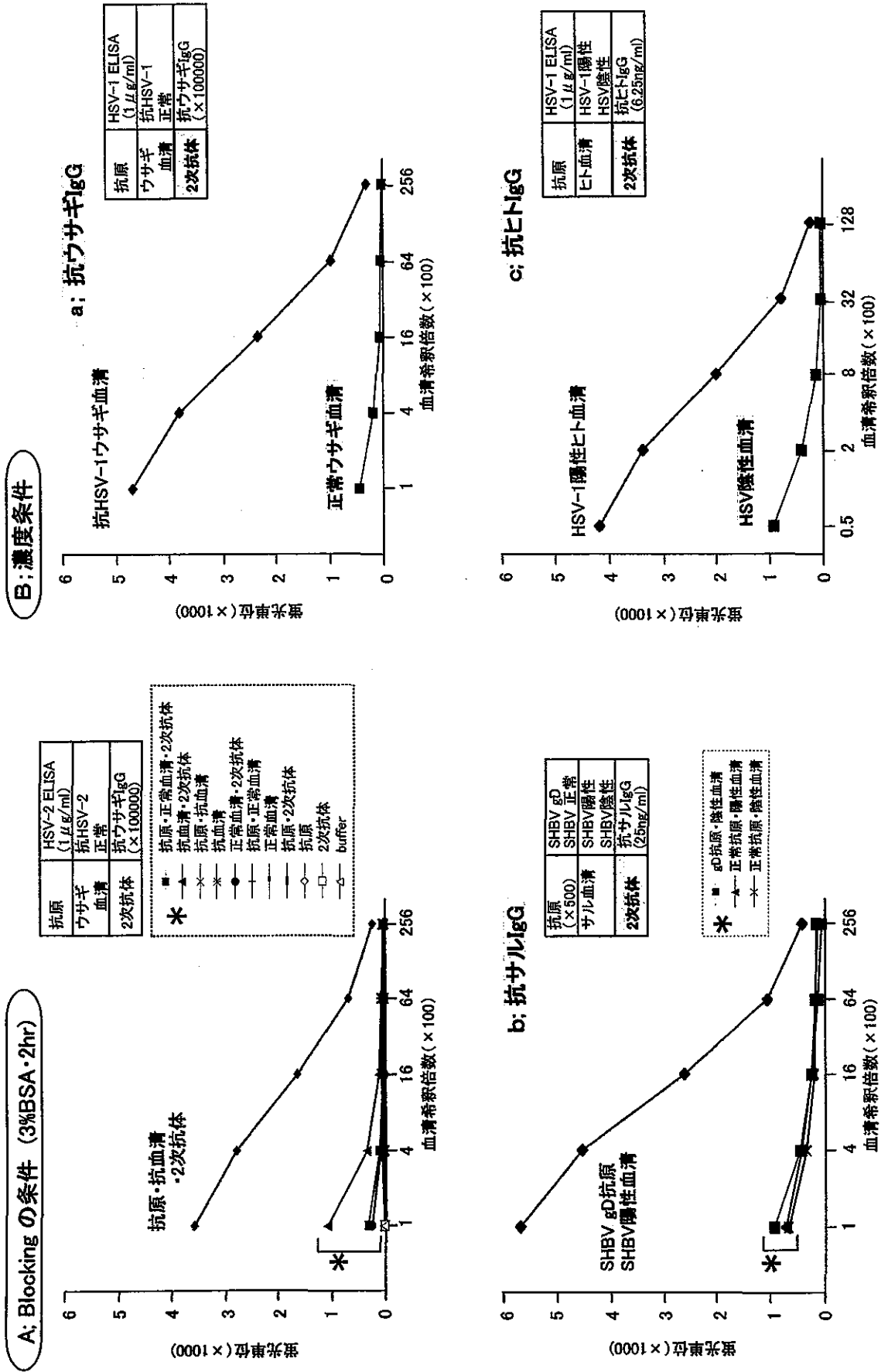
Bウイルスおよび単純ヘルペスウイルスの構造糖蛋白(gD,gG)抗原の診断への応用。 第139回日本獣医学会発表(和光)、(2005)

図1. 蛍光ELISA法



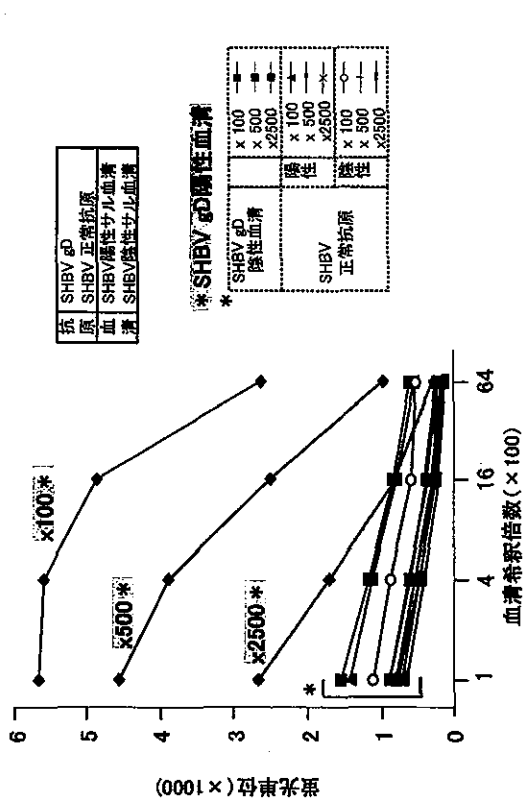


# 図2: 蛍光ELISA法の反応条件の設定

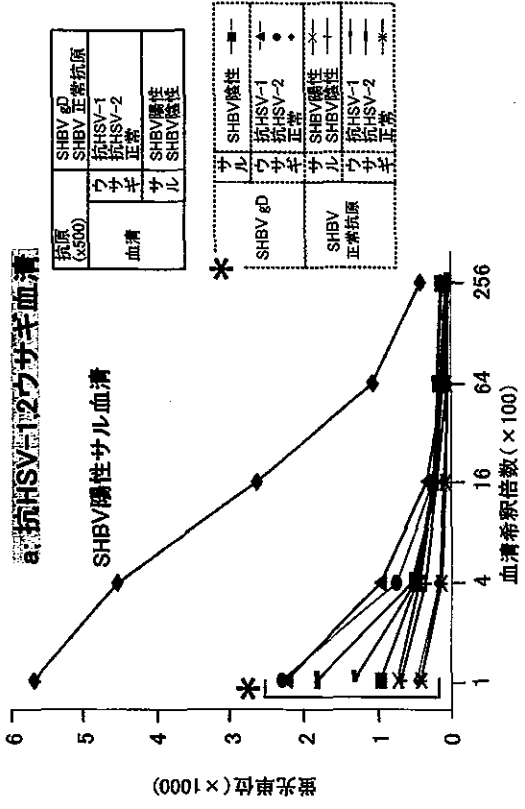


# 図3: 蛍光ELISA法におけるSHBVgD抗原の濃度条件と特異性

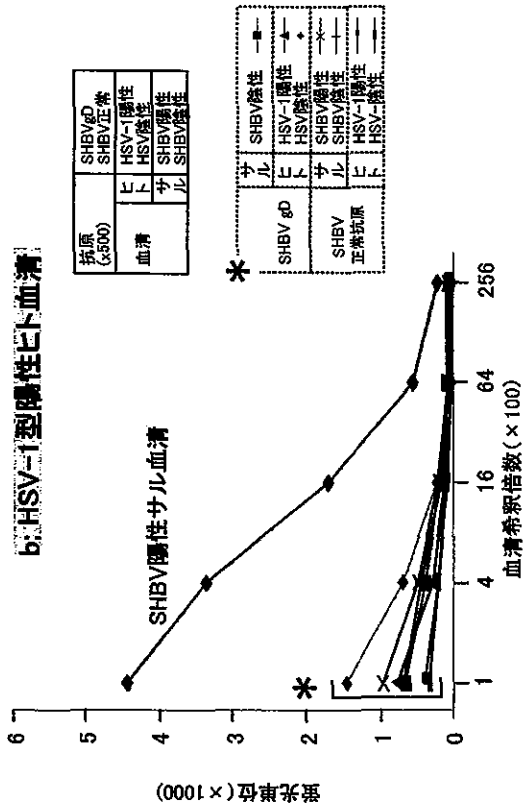
A: SHBV gD 抗原の濃度条件



B: SHBV gD 抗原の特異性



b: HSV-1型陽性ヒト血清



c: HSV-2型陽性ヒト血清

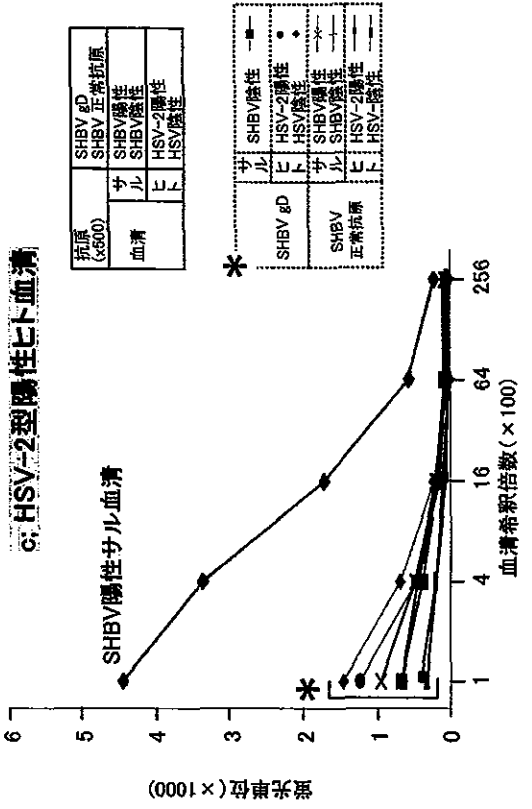
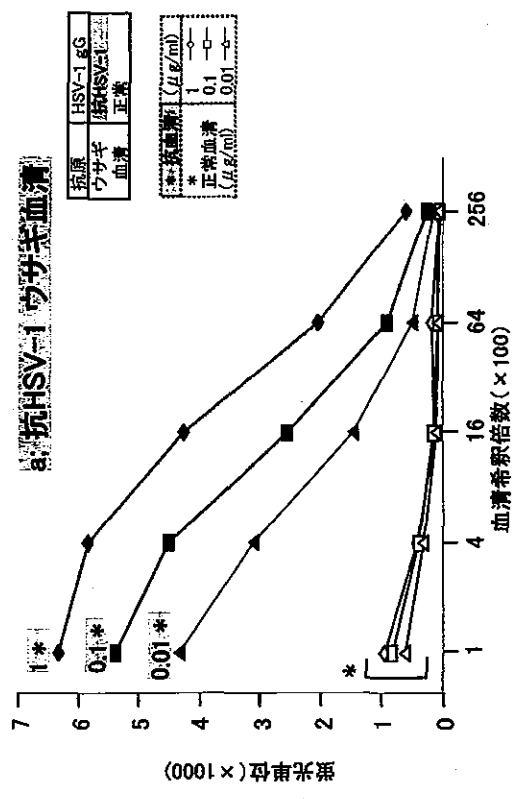
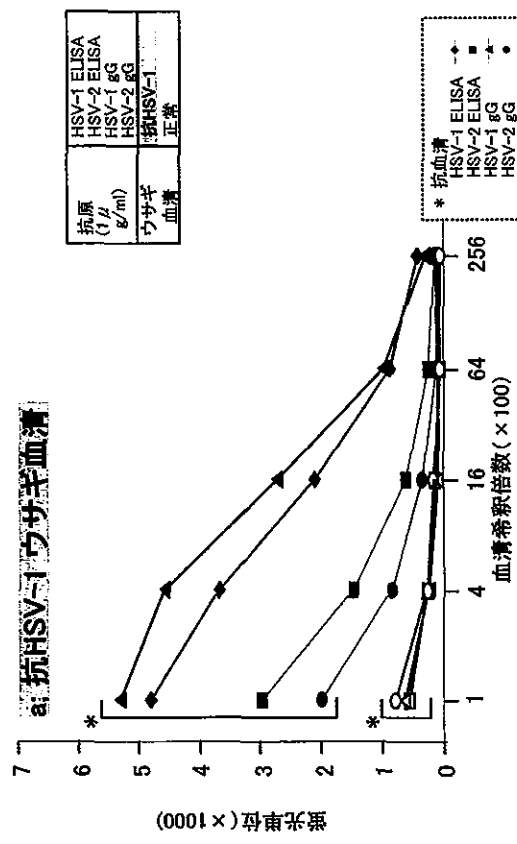


図4: 蛍光ELISA法におけるHSV抗原の濃度条件と特異性 (抗HSVウサギ血清)

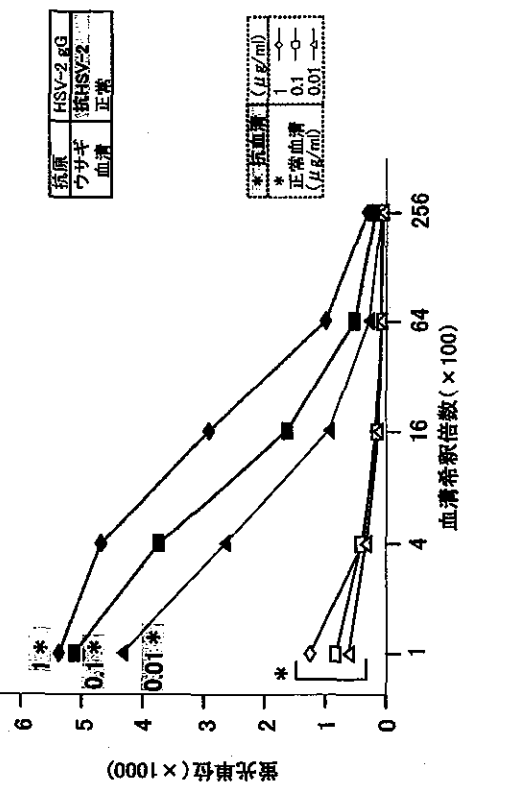
A: HSV-1,2 gG 抗原濃度条件



B: HSV-1,2 gG 抗原の特異性



A: HSV-1,2 gG 抗原濃度条件



B: HSV-1,2 gG 抗原の特異性

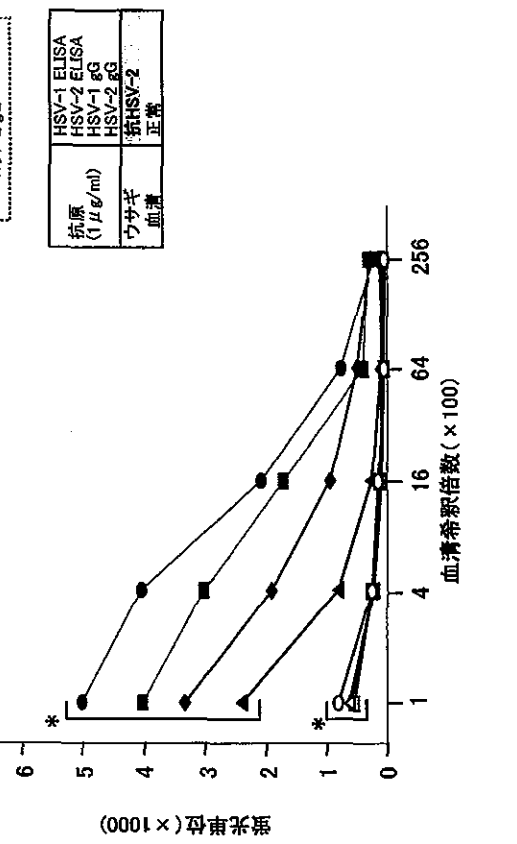
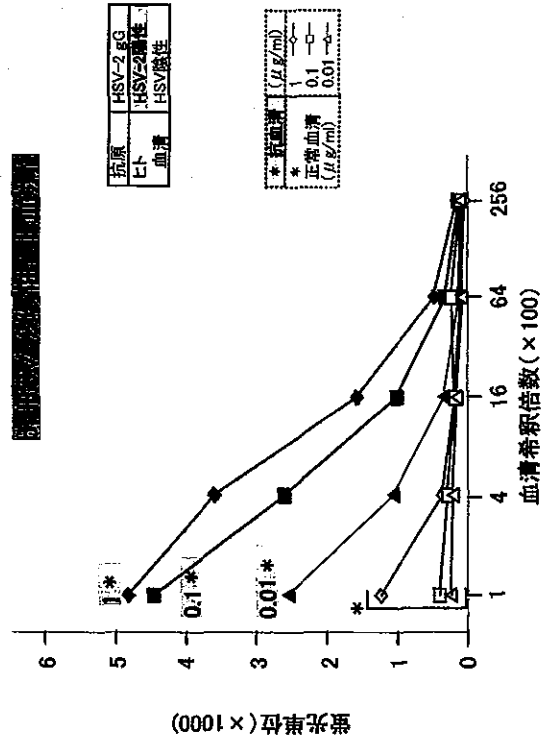
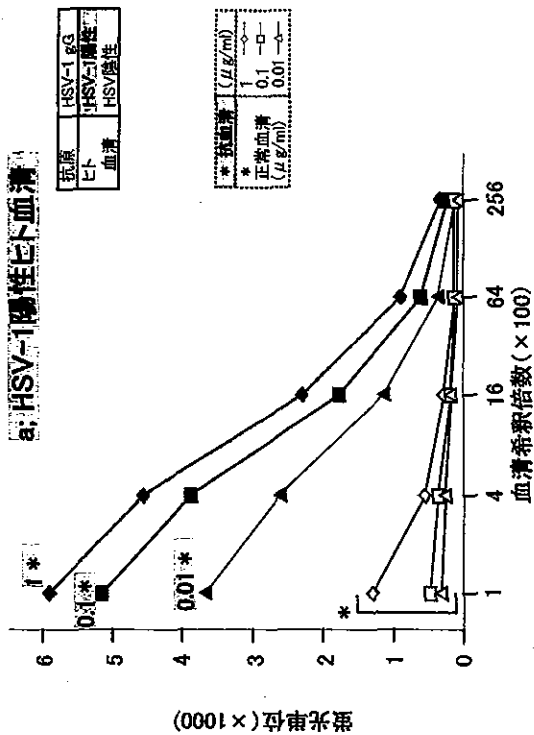


図5: 蛍光ELISAにおけるHSV抗原の濃度条件と特異性 (抗HSV陽性ヒト血清)

A: HSV-1,2 gG 抗原濃度条件



B: HSV-1,2 抗原の特異性

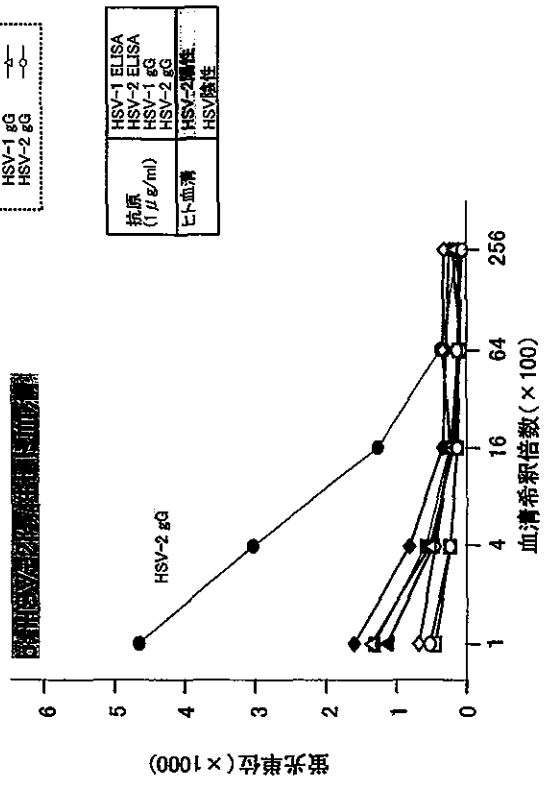
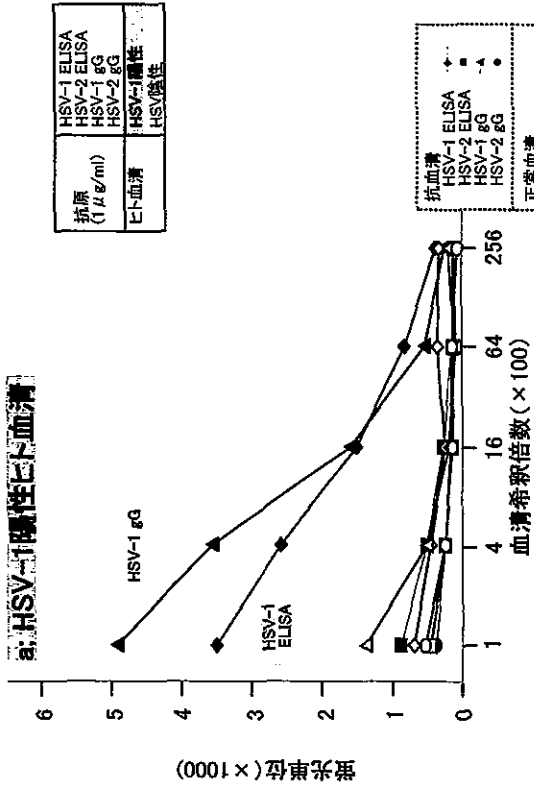


表1. アカゲザルにおけるSHBVおよびHSV抗体価の測定

No.	ID	抗原 性	SHBV gD		HSV-1 gG		HSV-2 gG		HSV-1 ELISA		HSV-2 ELISA	
			判定	抗体価 ( $\times 100$ )	判定	抗体価 ( $\times 100$ )	判定	抗体価 ( $\times 100$ )	判定	抗体価 ( $\times 100$ )	判定	抗体価 ( $\times 100$ )
1	1308	F	+	2	-	<1	-	<1	+	2	-	<1
2	1333	M	+	32	-	<1	-	<1	+	8	-	<1
3	1371	M	+	32	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
4	1373	M	+	32	-	<1	-	<1	+	8	-	<1
5	1379	F	+	32	-	<1	-	<1	+	32	-	<1
6	1386	F	+	32	-	<1	-	<1	+	32	+	8
7	1401	M	+	64	+	16	-	<1	+	32	+	8
8	1402	M	+	16	-	<1	-	<1	+	16	+	4
9	1403	M	+	10	-	<1	-	<1	+	10	-	<1
10	1413	M	+	32	-	<1	-	<1	+	32	+	2
11	1416	F	+	10	-	<1	-	<1	+	16	+	4
12	1417	F	+	8	-	<1	-	<1	+	8	-	<1
13	1309	M	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
14	1376	F	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
15	1381	F	判定 不能		判定 不能		判定 不能		判定 不能		判定 不能	
16	1383	F	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
17	1385	F	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
18	1395	F	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
19	1404	F	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
20	7	M	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
21	8	F	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
22	9	F	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
23	10	F	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
24	11	F	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1

抗原濃度: SHBV gD ( $\times 500$ )、HSV-1,2 gG (0.1  $\mu\text{g/ml}$ )、HSV-1,2 ELISA (1  $\mu\text{g/ml}$ )

サル症例

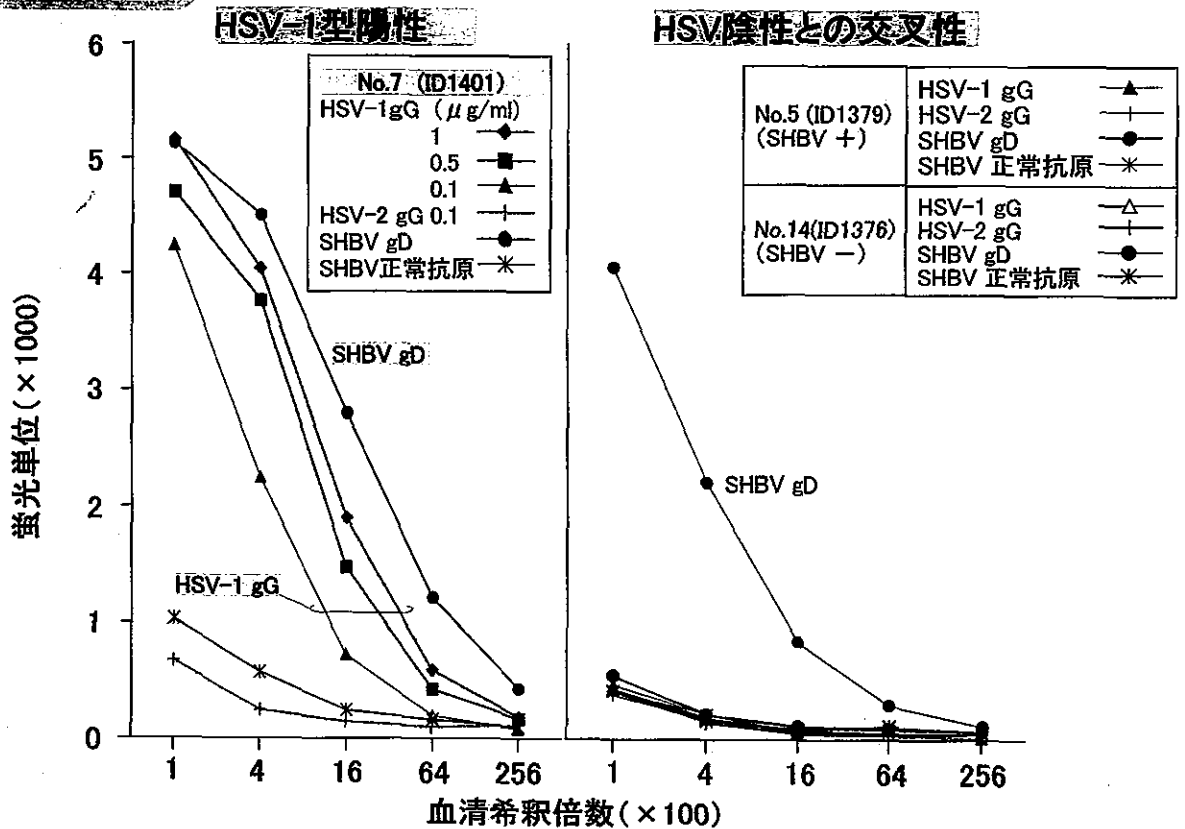
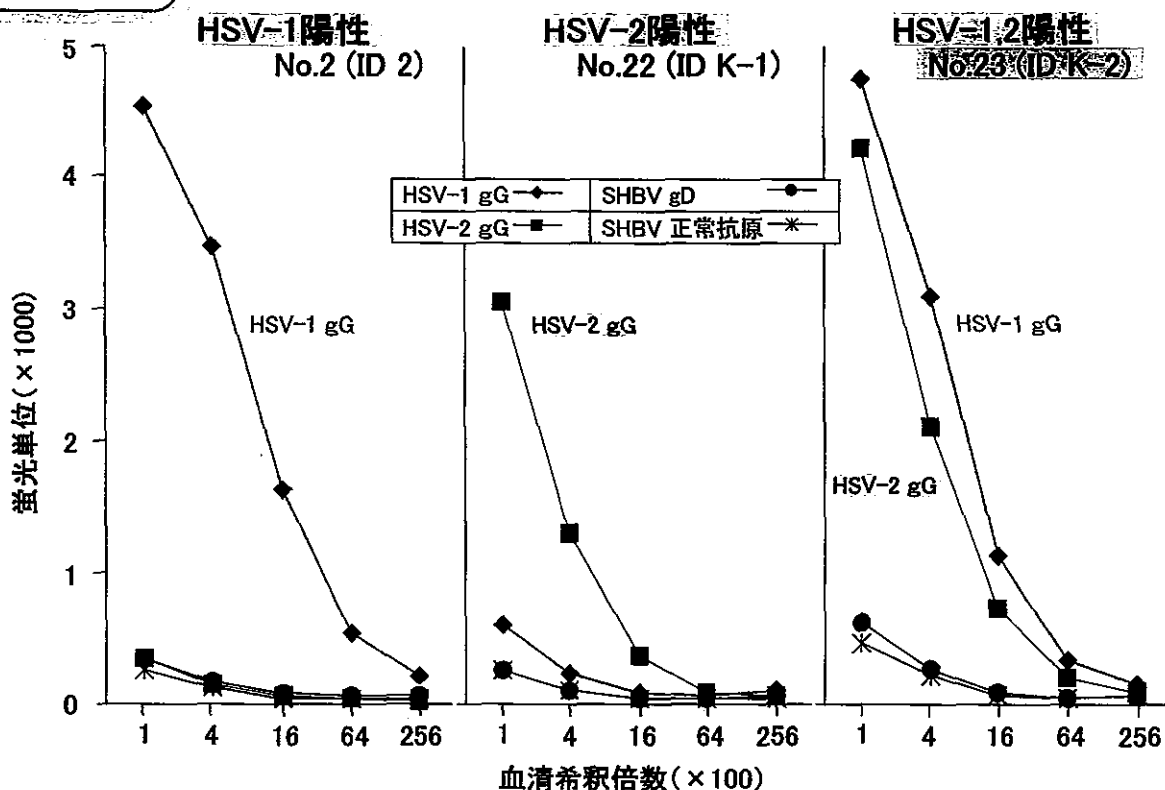


表2. ヒト血清検体におけるSHBVおよびHSV抗体価の測定

No.	抗原 ID	SHBV gD		HSV-1 gG		HSV-2 gG		HSV-1 ELISA		HSV-2 ELISA	
		判定	抗体価 (×100)	判定	抗体価 (×100)	判定	抗体価 (×100)	判定	抗体価 (×100)	判定	抗体価 (×100)
1	1	-	<1	###	32	-	<1	###	32	-	<1
2	2	-	<1	###	64	-	<1	###	32	+	2
3	6	-	<1	###	32	###	8	###	32	-	<1
4	7	-	<1	###	32	-	<1	###	32	###	2
5	8	-	<1	###	32	-	<1	###	32	###	2
6	9	-	<1	###	32	-	<1	###	32	-	<1
7	12	-	<1	###	64	-	<1	###	32	###	4
8	20	-	<1	###	64	-	<1	###	64	###	4
9	21	-	<1	###	32	-	<1	###	64	##	4
10	3	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
11	4	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
12	5	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
13	10	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
14	11	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
15	13	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
16	14	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
17	15	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
18	16	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
19	17	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
20	18	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
21	19	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
22	K-1*1	-	<1	-	<1	###	8	+	4	+	4
23	K-2*2	-	<1	###	32	###	32	###	2	###	2
24	K-3*1	-	<1	###	8	##	4	###	32	+	2
25	K-4*1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
26	K-5*1	-	<1	-	<1	###	8	-	<1	-	<1

\*1: 髄膜炎、\*2: 脊髄炎  
 抗原濃度: SHBV gD (×500)、HSV-1,2 gG (0.1 μg/ml)、HSV-1,2 ELISA (1 μg/ml)

ヒト症例



厚生労働省科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)  
輸入動物に由来する新興感染症侵入防止対策に関する研究  
分担研究報告

マールブルグウイルス抗原検出 ELISA の開発

分担研究者 森川 茂(国立感染症研究所ウイルス第1部第1室室長)  
協力研究者 西條政幸(国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官)  
倉根一郎(国立感染症研究所ウイルス第1部部长)

研究要旨:フィロウイルス科マールブルグ様ウイルス属に分類されるマールブルグウイルスは、エボラウイルスと同様にヒトにおいて致死率の高い出血熱を引き起こす。本研究においては、マールブルグウイルスの組換え核蛋白に対する単クローン抗体を作製し、それを捕捉抗体とした抗原検出 enzyme-linked immunosorbent assay (Ag-capture ELISA) 系を開発した。Ag-capture ELISA に有用な2クローンの単クローン抗体(2A7と2H6)が得られた。それはマールブルグウイルスのC-末端側の比較的抗原性の高い部位の構造的エピトープと結合した。これらの単クローン抗体は間接蛍光抗体法においてマールブルグウイルス抗原と反応した。また、マールブルグウイルスと同様に致死率の高い出血熱を起こすエボラウイルスの核蛋白に対しては全く反応しなかった。マールブルグ出血熱患者から得られたサンプルがないために Ag-capture ELISA の診断における有用性は評価されていない。しかし、今回開発されたマールブルグウイルス核蛋白検出 ELISA を、これまでに開発されたエボラウイルスの核蛋白検出 ELISA (J Clin Microbiol 39:3267-3271, 2001; Clin Diagn Lab Immunol 10:552-557, 2003)と併用することにより、フィロウイルス科ウイルスによる出血熱を、的確に診断することが可能になると考えられる。

A. 研究目的.

マールブルグウイルスはフィロウイルス科マールブルグ様ウイルス属に分類される一本鎖 RNA ウイルスである。このウイルスによる出血熱はアフリカで流行する。大掛かりな調査にもかかわらず、現在のところマールブルグウイルスの宿主は明らかでない。マールブルグウイルスの発見は、出血熱様疾患がヨーロッパ(ドイツとユーゴスラビア)で流行した1967年にさかのぼる。ウガンダからドイツと旧ユーゴスラビアに研究用として輸入されたサル(アフリカミドリザル, *Cercopithecus aethiops*)の血液、組織、細胞等を扱った研究者、技術者26名がマールブルグウイルスに感染し、出血熱症状を呈した。さらに6名の2次感染者が発生した。23%の致

死率であった。その後ケニヤやジンバブエで散発的なマールブルグ出血熱が報告され、さらに1998? 1999年にかけてコンゴ民主共和国にて100名を越えるマールブルグ出血熱患者が発生するマールブルグ出血熱の流行が確認された。我が国においては、マールブルグ出血熱は感染症予防に関する法律により1類感染症に指定され、我が国に存在しない感染症ではあるが、的確にしかも迅速にマールブルグ出血熱を診断するためのシステムの構築は急務である。

私たちは、マールブルグウイルスの組換え核蛋白を抗原とした抗体検出システム(IgG ELISA)を開発した(J Clin Microbiol 39:1-7, 2001)。しかし、マールブルグウイルス感染症の血清学的診断には、急性期および回復期のペア血清が

必要であり、迅速な診断には適していない。そこで、本研究では、マールブルグウイルスの組換え核蛋白に対する単クローン抗体を作製し、それを捕捉抗体とした抗原検出 enzyme-linked immunosorbent assay (Ag-capture ELISA)を開発した。

## B. 方法.

1) マールブルグウイルスの核蛋白をコードする遺伝子:マールブルグウイルスの核蛋白をコードする cDNA は、H. D. Klenk 教授 (Phillip 大学, マールブルグ市, ドイツ) から供与を受けた。この遺伝子を用いて、マールブルグウイルスの組換え核蛋白を発現する組換えバキュロウイルスを作製し、また、ザイール型エボラウイルスの核蛋白も、組換えバキュロウイルスを用いて発現させ精製した (J Clin Microbiol 39:1-7, 2001)。

2) マールブルグウイルスの組換え核蛋白の発現:組換えバキュロウイルス感染昆虫細胞で発現されるマールブルグウイルス組換え核蛋白 (His-MBG-rNP)は、Ni<sup>2+</sup>-カラムを用いて精製した。また、マールブルグウイルスの分割された核蛋白は、デザインされたプライマーを用いて増幅されたマールブルグウイルス核蛋白遺伝子を pGEX-2T ベクター (Pharmacia) に挿入し、形質転換された大腸菌で発現させた。つまり、これらの分割された核蛋白は glutathione-S-transferase (GST) が N-末端側に付加された形で発現されている。

3) 抗体. ウサギ抗マールブルグウイルス核蛋白抗体およびウサギ抗エボラウイルス核蛋白抗体 (Journal of Clinical Microbiology 39:1-7, 2001)を、Ag-capture ELISA の検出用抗体として用いた。また、ザイール型エボラウイルスの核蛋白に対する単クローン抗体 3-3D を用いた ( Journal of Clinical Microbiology 39:3267-3271, 2001)。

4) 単クローン抗体の作製:これまでの研究により、マールブルグウイルスの C-末端側の蛋

白 [翻訳開始コドンから数えて 341 番目から 695 番目 (マールブルグウイルス核蛋白は 695 個のアミノ酸からなる)] に強い抗原性があることが明らかにされていた (Journal of Clinical Microbiology 39:1-7, 2001)。そこで、大腸菌で発現・精製されたその部分蛋白 (GST-MBG-NP/C-half, N-末端側に GST が付加された 341 番目から 695 番目のアミノ酸からなる部分蛋白) を BALB/c ウイルスに 3 回免疫し、脾臓を採取した。採取された脾臓から細胞を採取し、マウスミエローマ細胞 (P3/Ag568) と融合させてマールブルグウイルス核蛋白に対する抗体を分泌するハイブリドーマを樹立した。

5) 単クローン抗体のエピトープの決定:作製された単クローン抗体の結合部位 (エピトープ) は、分割された核蛋白に対する反応性を Western blot 法で調べて決定された。

6) 抗原検出 ELISA:作製された単クローン抗体を捕捉抗体として、また、捕捉された核蛋白の検出抗体として当研究室で作製された抗マールブルグウイルス核蛋白ウサギ抗体を用いて、Ag-capture ELISA を先の報告 (Journal of Clinical Microbiology 39:3267-3271, 2001) に従い開発した。

7) マールブルグウイルスに対する単クローン抗体の反応性:作製された単クローン抗体が、実際のマールブルグウイルスの核蛋白に反応するか否かを、マールブルグウイルス感染 Vero 細胞を抗原とした間接蛍光抗体法で検討した。尚、マールブルグウイルス感染 Vero 細胞は、不活化された上で米国疾病予防センター特殊病原体部門から供与された。間接蛍光抗体法の方法は、先に報告した方法に拠った (J Clin Microbiol 39:776-778, 2001)。

## C. 結果

1) 抗原検出 ELISA の捕捉抗体として有用な単クローン抗体の作製. 2 クローンの Ag-capture ELISA に有用な単クローン抗体



(2A7 および 2H6) が得られた (図 1).

2) エピトープの決定. マールブルグウイルスの核蛋白は 695 個のアミノ酸からなる蛋白である. 両単クローン抗体 (2A7 および 2H6) は, C-末端側 100 アミノ酸からなるペプチドと結合することが明らかにされた (図 2, 図 4). 図 2? 4 に示すように, マールブルグウイルス核蛋白の部分ペプチドに対する Western blot 法による反応性の解析により, 単クローン抗体 2A7 は, 翻訳開始コドンから数えて 632? 645 番目からなる部分蛋白と, 単クローン抗体 2H6 は 643? 695 番のアミノ酸からなる部分蛋白と結合することが明らかにされた (図 3, 4). 両単クローン抗体は, とともに核蛋白の C-末端側 100 アミノ酸からなるペプチドの構造的エピトープと強く結合することが明らかにされた (図 2, 図 4)

3) 単クローン抗体のマールブルグウイルスに対する反応性. 単クローン抗体 2A7 および 2H6 は, 間接蛍光抗体法においてマールブルグウイルスの核蛋白と結合することが証明された (図 5).

4) 単クローン抗体のエボラウイルス核蛋白に対する交差反応. エボラウイルスの核蛋白に対する単クローン抗体 3-3D を捕捉抗体としたエボラウイルス核蛋白検出 ELISA (J Clin Microbiol 39:3267-3271, 2001) では, エボラウイルス核蛋白は検出されたが, マールブルグウイルス核蛋白は検出されなかった. 一方, 2A7 または 2H6 を捕捉抗体とした Ag-capture ELISA では, マールブルグウイルス核蛋白は検出されたが, エボラウイルス核蛋白は検出されなかった (図 6D, 6E). また, 単クローン抗体 2A7 も 2H6 も, Western blot 法においてマールブルグウイルス核蛋白に結合するが, エボラウイルス核蛋白には結合しなかった (図 6A, 6B, 6C).

#### D. 考察

これまで私たちはフィロウイルス科エボラ様ウイルス属に分類されるザイール型エボラウイル

ス核蛋白に対する単クローン抗体を用いた抗原検出 ELISA を開発した. このシステムでは, ザイール型エボラウイルス以外のウイルス (スーダン型, レストン型エボラウイルス) の核蛋白も検出できることが明らかにされている (J Clin Microbiol 39:3267-3271, 2001). さらに, レストン型エボラウイルス核蛋白を特異的に検出することのできる抗原検出 ELISA の開発にも成功している (Clin Diagn Lab Immunol 10:552-557, 2003). 今回開発されたマールブルグウイルスの核蛋白検出 ELISA は, マールブルグウイルス核蛋白を, エボラウイルス核蛋白を検出することなく特異的に検出するためのシステムである. 残念ながら, マールブルグ出血熱患者から採取された検体を用いて, Ag-capture ELISA の診断における有用性を評価することはできなかった. そもそも, これらの患者数は非常に少なく, そのような研究は現時点では非常に困難であり, 今回開発された Ag-capture ELISA の診断における有用性を評価するには, さらなる今後の研究が必要である.

興味深いことに, これまでエボラウイルス核蛋白検出 ELISA に有用な単クローン抗体が, エボラウイルスの C-末端側のアミノ酸からなるペプチドと結合するのと同じように, 今回 Ag-capture ELISA に有用な単クローン抗体も, マールブルグウイルス核蛋白の C-末端側のペプチドを認識した. これまでの成績により, フィロウイルスの核蛋白の C-末端側 100 アミノ酸からなるペプチドには構造上共通の特異的特徴があるものと考えられる.

これまで開発されたエボラウイルス核蛋白検出 ELISA と今回開発されたマールブルグウイルス核蛋白検出 ELISA を組合せることにより, フィロウイルスによる出血熱の診断を, 迅速に, しかも, 的確に下せるようになるものと考えられる.

#### E. 結語

マールブルグウイルス核蛋白に対する単クローン抗体を作製し、マールブルグウイルス核蛋白を特異的に検出するための Ag-capture ELISA を開発した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2004) Possible horizontal transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from a mother to her child. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57:55-57.
- 2) Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Modification of endothelial cell functions by hantaan virus infection: prolonged hyper-permeability induced by TNF-alpha of hantaan virus infected endothelial cell monolayers. *Archives of Virology* 149: 1279-92.
- 3) Mizitani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. *Biochemical Biophysical Research Communication* 319: 1228-1234.
- 4) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Importance of Akt signaling pathway for apoptosis in SARS-CoV-infected Vero E6 cells. *Virology* 327: 169-74.
- 5) Mizutani T, Fukushi S, Murakami M, Hirano T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Tyrosine dephosphorylation of STAT3 in SARS coronavirus-infected Vero E6 cells. *FEBS letter* 5;577(1-2):187-92
- 6) Takasuka N, Fujii H, Takahashi Y, Kasai M, Morikawa S, Itamura S, Ishii K, Sakaguchi M, Ohnishi K, Ohshima M, Hashimoto SI, Odagiri T, Tashiro M, Yoshikura H, Takemori T, Tsunetsugu-Yokota Y. (2004): A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *Int Immunol.*, 16(10): 1423-30
- 7) Iwasaki, T., Inoue, S., Tanaka, K., Sato, Y., Morikawa, S., Hayasaka, D., Moriyama, M., Ono, T., Kanai, S., Yamada, A. and Kurata, T. (2004): Characterization of Oita virus 296/1972 of Rhabdoviridae isolated from a horseshoe bat bearing characteristics of both lyssavirus and vesiculovirus. *Arch. Virol.*, 149(6): 1139-1154.
- 8) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2005) Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *Journal of Medical Virology* 75:295-299
- 9) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello D.E., Peiris JSM, Chen P.J., Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: (2005) The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SCID-PBL/hu Mice. *Vaccine (in press)*.
- 10) Saijo, M., Ogino, T., Taguchi, F., Fukushi, S., Mizutani, T., Notomi, T., Kanda, H., Minekawa, H., Matsuyama, S., Hoang Thuy Long, Nguyen Thi Hong

- Hanh, Kurane, I., Tashiro, M., Morikawa, S.. (2005): Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J. Virol. Methods* (in press)
- 11) Saijo, M., Niikura, M., Maeda, A., Kurane, I., Sata, T., Kurata, T., and Morikawa, S. (2005): Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Med. Virol.*, (in press)
- 12) Hatakeyama, S., Moriya, K., Saijo, M., Morisawa, Y., Kurane, I., Koike, K., Kimura, S., and Morikawa, S. (2005): Persisting humoral antiviral immunity among the Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clinical and Diagnostic Laboratory immunology*, in press.
- 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) 小田切孝人, 二宮愛, 板村繁之, 西藤岳彦, 宮島直子, 森川茂, 西條政幸, 田代真人(2004): SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果. *インフルエンザ(メディカルレビュー社)* 5:35-42.
- 15) 森川 茂 (2004): サル痘、感染症の事典、朝倉書店、pp107-109
- 16) 森川 茂 (2004): ラッサ熱、獣医公衆衛生学(第3版)、文永堂出版、pp91-92
- 17) 森川 茂 (2004): 南米型出血熱、獣医公衆衛生学(第3版)、文永堂出版、pp92-93
- 18) 森川 茂 (2004): ニパウイルス感染症、家庭医学大全科、法研、pp2770
- 19) 森川 茂 (2004): リンパ球性脈絡髄膜炎、共通感染症ハンドブック、日本獣医師会、pp230-231
- 20) 森川 茂 (2004): マールブルグ病、感染症の診断・治療ガイドライン2004、日本医師会、pp78-79
- 21) 森川 茂 (2004): サル痘、感染症の診断・治療ガイドライン 2004、日本医師会、pp144-145
- 22) 森川 茂 (2004): ニパウイルス感染症、感染症の診断・治療ガイドライン2004、日本医師会、pp128-129
- 23) 森川茂 (2004): サル痘、新興再興感染症—SARS の教訓[からだの科学(増刊)] 日本評論社、pp188-191
- 24) 森川茂 (2004): 天然痘ワクチンの復活 小児科臨床(特大号/ワクチンのすべて) 67:11
- 25) 西條政幸, 森川茂, 倉根一郎. (2004) クリミア・コンゴ出血熱. *ウイルス* 54:223-228.
- 1)
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) Saijo M, Tang Q, Kurane I, Morikawa S. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. 5th Japan-China Virology Conference. June, 2004, Osaka
- 2) Saijo M. Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. Research activities towards the control of viral hemorrhagic fever (University of Hokkaido). June 2004, Sapporo
- 3) Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Modification of endothelial cell functions by Hantaan virus infection: prolonged heperpermiability induced

by TNF-alpha of Hantaan virus-infected endothelial cell monolayers. International Conference on Hantavirus infections. June 2004, Seoul, South Korea

4) 西條政幸. 母親から感染したと考えられるクリミア・コンゴ出血熱の4歳女児例. 第36回日本小児感染症学会, 2004年11月, 東京

5) 山田靖子, 水谷哲也, 高橋一朗, 福士秀悦, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoV の継代培養による変異ウイルスの出現. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜

6) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. マウスとラットを用いた SARS-CoV 感染モデルの作製. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜

7) 西條政幸, 福士秀悦, 荻野利夫, 田口文広, 水谷哲也, 松山州徳, 倉根一郎, 田代真人, 森川茂. SARS コロナウイルスの組換え核蛋白を抗原とした ELISA 法の開発を評価. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜

8) 森川茂, 長谷川秀樹, 西條政幸, 前田秋彦, 倉根一郎, 尾崎泰子, 佐多徹太郎. 倉田毅, 小島朝人. ワクチニアウイルス LC16m8 株の有効性と遺伝子構造の解析. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜

9) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 須崎百合子, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 長谷川秀樹, 岩田奈織子, 佐多徹太郎, 倉根一郎,

倉田毅, 森川茂. LC16m8 株痘そうワクチンによるカニクイザルにおけるサル痘発症予防効果. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜

10) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. ACE2 発現細胞を用いた SARS コロナウイルス感染の検討. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜

11) 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoV 感染細胞におけるアポトーシスに関するシグナル伝達系の網羅的検討. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜

12) 水谷哲也, 福士秀悦, 村上正晃, 西條政幸, 倉根一郎, 平野俊夫, 森川茂. SARS コロナウイルスの感染に誘導されるシグナル伝達の解析. 第27回日本分子生物学会年会. 2004年12月, 神戸

13) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 西條政幸. Efficient replication of SARS coronavirus on the cells expressin mouse ACE2. 第27回日本分子生物学会年会. 2004年12月, 神戸

14) Saijo M. Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. US-Japan Cooperative Medical Science Program. Joint Panels Symposium on Vector-Borne Infectious Diseases and Control. December 2004, Kyoto