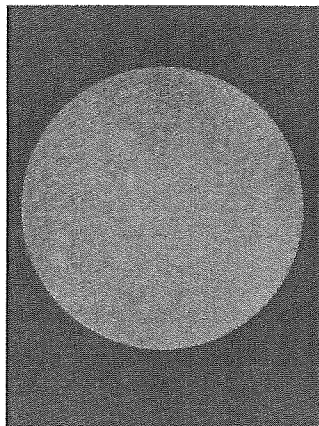
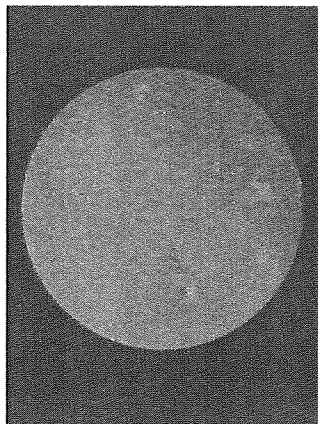


図5 ヒトFabによる代表的なウイルス増殖抑制のIFA像

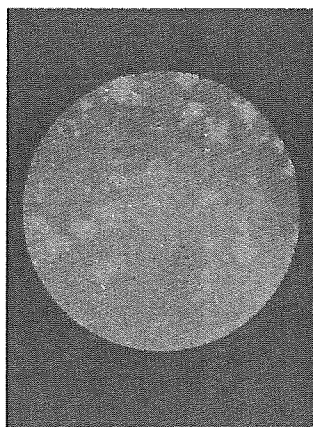
EP5G3 (1:2)



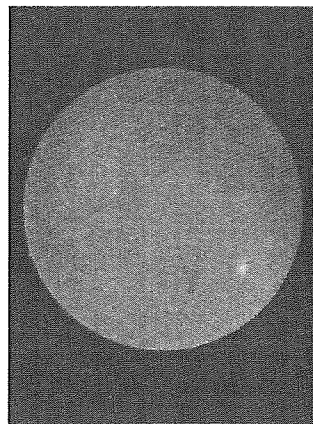
GD2D12 (1:2)



Virus only



RV-vaccinated serum (1:1024)



緑色蛍光蛋白質遺伝子（GFP）組換え狂犬病ウイルスを利用した
新規中和抗体測定法

[分担研究者] 森本金次郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：GFP-組換え狂犬病ウイルスを中和抗体測定に用いることにより、蛍光標識抗体を必要としない中和抗体測定法を開発した（GFP法）。タイ国赤十字 Queen Saovabha Memorial Institute において保管されているヒト血清 25 サンプル、イヌ血清 18 サンプル、ウマ血清 15 サンプルにおいて、従来の方法（タイ赤十字における中和抗体測定の標準法：RFFIT法）と新規 GFP 法により中和抗体価を測定、統計処理により信頼性を検討した。両法により得られた抗体価には強い相関関係があることが示された。この新規 GFP 法は高価な蛍光標識抗体を用いない簡便な方法として有用であることが示された。

A. 研究目的

血清中の狂犬病ウイルス中和抗体が狂犬病の発症防止に重要な役割を果たしていることが知られている。また、狂犬病ワクチンの有効性の検討には中和抗体価の測定が必要不可欠である。現在、最も信頼されている方法として rapid fluorescent focus inhibition test（RFFIT法）が広く用いられている。この方法は一定量のウイルスと段階希釈した血清を混ぜ、ウイルス感染細胞数の変動を測定することにより、その血清の抗体価を算出する方法である。多くの研究室では市販されている FITC-anti rabies antibody を使用して、感染細胞を蛍光抗体標識し、蛍光顕微鏡により観察し、抗体価を算出している。

GFP を発現する組換え狂犬病ウイルス

を用いることで、FITC-標識抗体を使用することなく、直接ウイルス感染細胞を観察することができるようになった。このウイルスを用いることで、高価な FITC-anti rabies antibody を必要としないで中和抗体価を算出する方法（GFP法）を開発し、従来の方法との比較検討を行った。

B. 研究方法

1) GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルスの作出

HEP-Flury 株ゲノム cDNA プラスミドの G 遺伝子と L 遺伝子の間に GFP 遺伝子を挿入し、GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルス・プラスミドを作製した。そのプラスミドをヘルパー・プラスミド（N, P, L, G のそれぞれの蛋白質を発現する）と共に

BHK-21 細胞にトランスフェクトし、GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルスを回収した。このウイルスを rHEP-GFP と呼ぶ(図 1A)。

2) 免疫蛍光染色

狂犬病ウイルス感染細胞は FITC-抗狂犬病 N 蛋白質抗体を用いた免疫蛍光法で観察した。GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルス (rHEP-GFP) は蛍光標識抗体を使用せずに blue excitation filter を用いた蛍光顕微鏡下でも観察可能となった。

3) ウイルス中和抗体価の測定

タイ国赤十字 Queen Saovabha Memorial Insitute において保管されている 25 のヒト血清、18 のイヌ血清、15 のウマ血清において、従来の方法 (タイ赤十字における中和抗体測定の標準法: RFFIT 法) と GFP 法により得られたウイルス中和抗体価の値を測定、統計処理により信頼性を検討した。攻撃ウイルス (HEP-Flury 株あるいは CVS 株) を 50% 中和する最も高い希釈倍率を中和抗体価とし、WHO の抗狂犬病標準抗体を用いて、国際単位 (IU) に換算した。

C. 研究結果

1) GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルス (rHEP-GFP) の性状解析

rHEP-GFP ウイルスとその親株である cDNA より得られた rHEP 株、オリジナルの HEP-Flury 株の増殖をマウス NA 細胞で調べた。3 株においてその増殖には大きな違いが見られなかった。外来 GFP 遺伝子を挿入したことによる、増殖の遅れなどは観察されなかった。また、rHEP-GFP

ウイルス感染細胞内ではウイルス蛋白質の発現に加えて、GFP が発現していることが観察された。

2) 中和抗体価の測定

同一の血清を用いて 3 つの方法において測定した

(A) [RFFIT 法] タイ赤十字において従来より行われている方法: チャレンジウイルスとして CVS 株を用い、FITC-標識抗体を用いて、蛍光陽性細胞を観察する。

(B) [FITC 法]: チャレンジウイルスとして rHEP-GFP 株を用い、FITC-標識抗体を用いて、蛍光陽性細胞を観察する。

(C) [GFP 法]: チャレンジウイルスとして rHEP-GFP 株を用い、GFP の発現による蛍光陽性細胞を観察する。

以上の 3 法により各々の血清の中和抗体価を算出した。

まずは、FITC 法と GFP 法の値を比較することで、蛍光測定の違いによる値の相関関係を調べた (両方ともチャレンジウイルスとして rHEP-GFP 株を用いている)。ヒト、ウマ、イヌ血清とも両法の値に強い相関関係が示された ($R^2=0.98$)。

さらに、RFFIT 法と GFP 法の値を比較した。ヒトとウマの血清は Chiron 社の RCEC ワクチンを接種されている。RCEC ワクチンは LEP-Flury 株を種ウイルスとしており、これは HEP-Flury 株と近縁の株である。又、イヌ血清は Rhone Merieux 社の Rabisin ワクチンを接種されている。このワクチンは Pitman-Moore 株より製造されており、この株は CVS 株と近縁である。従って、ヒトとウマ血清を RFFIT 法と GFP 法で測定する場合、GFP 法は近縁

の HEP-Flury 株をチャレンジウイルスとして使用しており homologous challenge による測定となる。一方、RFFIT 法は heterologous challenge による測定となる。逆に、イヌ血清を測定する場合、RFFIT 法は近縁の CVS 株をチャレンジウイルスとして使用しており homologous challenge となり、GFP 法は heterologous challenge となる。ヒト血清とウマ血清を RFFIT 法と GFP 法で測定した値の相関関係を図 1B、イヌ血清を RFFIT 法と GFP 法で測定した値の相関関係を図 1C に示す。どちらも強い相関関係を示した。また、homologous challenge の方が若干高い中和抗体価を示すことも分った。

D. 考察

ヒト、ウマ、イヌの血清を用いて、3 種類の方法において、中和抗体価の測定を行った。3 種類の測定法において、その測定値に大きな違いはみられず、強い相関関係が示された。GFP 法が GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルスを用いた新たな中和抗体測定法として利用可能であることを示した。

WHO は狂犬病ウイルスに対する中和抗体の値として、その防御には 0.5 IU 必要としている。RFFIT 法と GFP 法を比べて、両者は強い相関関係があるが、低い値を示した時に注意が必要であることが分った。RFFIT 法、GFP 法とも検査する血清に接種したワクチン株と近縁の株をチャレンジウイルスとして用いた場合、若干高い値を示すことが示された。0.5 IU 付近の値を示した血清においては、接種したワクチンの株が何であるかを考慮し

て判断をくださなければならない。

E. 結論

GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルス rHEP-GFP を用いた中和抗体測定法 (GFP 法) は現在広範に使用されている RFFIT 法と変わらない測定法であることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Khawplod, P., Inoue, K., Shoji, Y., Wilde, H., Ubol, S., Nishizono, A., Kurane, I., Morimoto, K. A novel rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) of rabies virus using a recombinant rabies virus visualizing a green fluorescent protein. *Journal of Virological Methods*, 125, 35-40 (2005)

2) Morimoto, K., Shoji, Y., Inoue, S. Characterization of P gene-deficient rabies virus. The propagation, pathogenicity and immunogenicity. *Virus Research*, 111, 61-67 (2005).

3) Motoi, Y., Inoue, S., Hatta, H., Sato, K., Morimoto, K., Inoue, S., Yamada, A. Production of rabies neutralization antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine*, 23, 3026-3032 (2005).

4) Motoi Y., Inoue S., Hatta H., Sato K.,

Morimoto K., Yamada A. Detection of Rabies-Specific Antigens by Egg Yolk Antibody (IgY) to the Recombinant Rabies Virus Proteins Produced in Escherichia coli. Japanese Journal of Infectious Diseases, 58, 115-118 (2005).

5) Nakamichi K, Saiki M, Sawada M, Yamamuro Y, Morimoto K., Kurane I. Double-stranded RNA stimulates chemokine expression in microglia through vacuolar pH-dependent activation of intracellular signaling pathways. J. Neurochemistry 95, 273-283 (2005).

6) Nakamichi K, Saiki M, Sawada M, Takayama-Ito M, Yamamuro Y, Morimoto K., Kurane I. Rabies virus-induced activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways regulates expression of CXC and CC chemokine ligands in microglia. J Virol. 79,11801-11812 (2005).

7) Ito-Takayama, M., Inoue, K., Shoji, Y., Inoue, S., Iijima, T., Sakai, T., Kurane, I., Morimoto, K. A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by

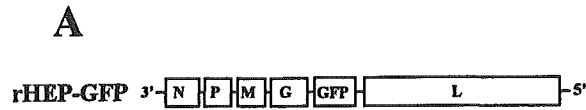
single amino acid substitution to atguanine at position 333 in glycoprotein. Virus Res. in press (2006).

8) Khawplod, P., Shoji, Y., Ubol, S., Wilde, H., Mitmoonpitak, C., Nishizono, A., Kurane, I., Morimoto, K. Genetic analysis of dog rabies viruses circulating in Bangkok. Infection, Genetics and Evolution, in press (2006).

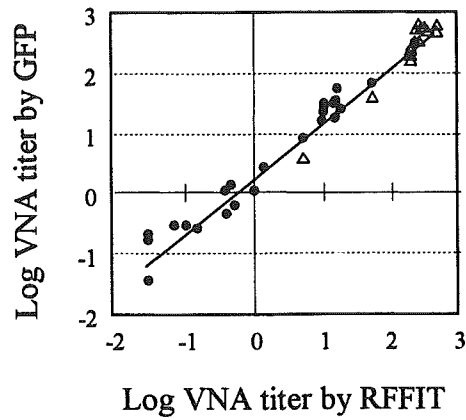
9) 森本金次郎、伊藤（高山）睦代：狂犬病ワクチン 日本臨床 増刊 臨床免疫（下）－基礎研究の進歩と最新の臨床－ 63巻増刊号5 654－658 日本臨床社（2005）

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし



B



C

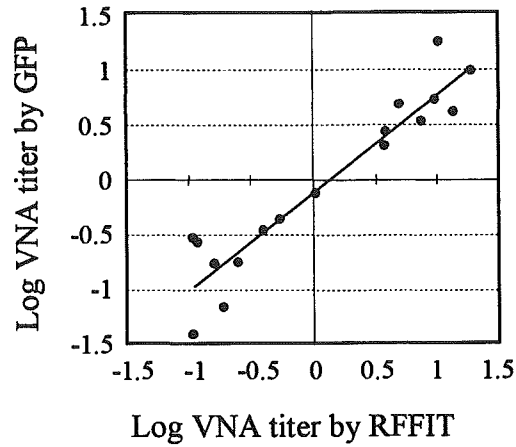


図1 (A) GFP-組換え狂犬病ウイルスの遺伝子構成
 (B) RFFIT法とGFP法による中和抗体価の相関関係
 ヒト血清 (●) ウマ血清 (△) $y = 0.93x + 0.24$,
 $R^2 = 0.98$
 (C) イヌ血清のRFFIT法とGFP法による中和抗体価の
 相関関係 $y = 0.89x - 0.12$, $R^2 = 0.90$

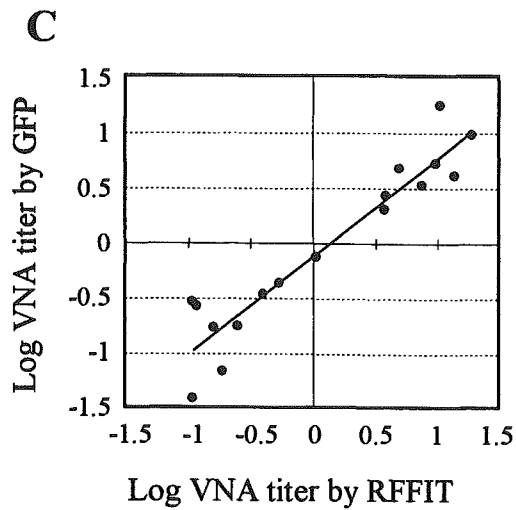
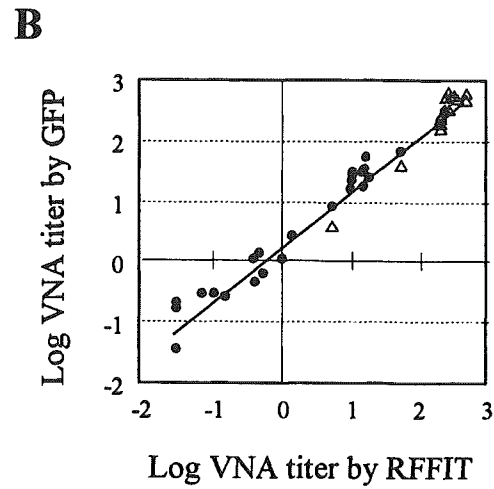
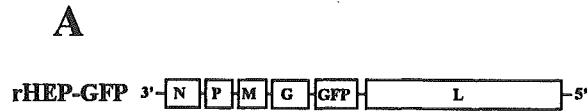


図1 (A) GFP-組換え狂犬病ウイルスの遺伝子構成
 (B) RFFIT法とGFP法による中和抗体価の相関関係
 ヒト血清 (●) ウマ血清 (△) $y = 0.93x + 0.24$, $R^2 = 0.98$
 (C) イヌ血清のRFFIT法とGFP法による中和抗体価の
 相関関係 $y = 0.89x - 0.12$, $R^2 = 0.90$

ウイルス性感染症の診断、疫学および予防に関する研究

狂犬病ワクチン改良の基礎的研究

分担研究者 河合明彦 京都大学薬学研究科 教授

研究要旨

本研究では狂犬病ウイルス糖タンパク質(G)のコンフォメーションエピトープを認識する種々の抗Gモノクローナル抗体(mAb)を用いて、ウイルス不活化条件を再検討するという立場から狂犬病ワクチン改善の基礎となる問題を検討した。まず可溶性のウイルス糖タンパク(Gs)はGタンパクのC末端側をわずかに15%ほど欠如するだけであるが免疫原性を欠如するという大きな違いがある。そこで、まず種々のmAbを用いてGsタンパクの抗原性を調べたところ、1-30-44抗体のみが反応せず、ほかのmAbはすべて反応した。1-30-44抗体は強い中和活性をもつ抗Gモノクローナル抗体の一つで、この抗体が認識するエピトープはGタンパクのコンフォメーションの変換により影響を受けることから、この抗体との反応性の保持状態を評価することによりワクチンの性能を試験管内で評価する方法となる可能性がある。つぎに、狂犬病ワクチンの製造に用いられているBPLで不活化した狂犬病ウイルス粒子の抗原性を見ると1-30-44抗体との反応性が特に影響を受けやすいことが分かった。一方、0.1-0.3%ホルマリンで不活化したウイルス粒子の1-30-44抗体との反応性をみると不活化前と同じ程度に保持していた。そこで、不活化条件の異なる種々の試作ワクチンを作成し、マウスを2回感作して血清中の抗体価を比較したところ、1-30-44抗体との反応性が維持されたホルマリン不活化ワクチンを接種したマウスではBPL不活化ワクチン接種マウスよりも数倍高い中和抗体価の上昇が見られた。一方、ELISA法によりウイルス特異的な抗体量を比較すると大きな差が見られなかった。このことから、ウイルス不活化条件により誘導される抗体に質的な違いが生じ、ホルマリン不活化のように1-30-44抗体に対する抗原性の保持状態がよいと中和力の強い抗体が選択的に誘導されることが強く示唆された。

A. 研究目的

世界的に見ると狂犬病による人患者はあまり減少傾向が見られず、年間5万人前後の人が犠

牲になっている。多くの国では病犬による咬傷からの感染例が多く、そのために曝露後ワクチン接種が行われ、狂犬病ワクチンの需要はここ

10年以上変わっていない。しかし、人用のみならずイヌ用のワクチンの供給に関しても量的には十分とはいえず、またワクチンは高価でもあり、需給については健全なバランスがとれていない。このために、狂犬病患者の発生の多い国における犬の予防的ワクチン接種率が低く、犬の狂犬病発生率も高い。このような現状から、犬用、人用いずれのワクチンについても、その性能の向上や低コスト化が強く求められている。

しかし、ワクチンの製造コストや性能向上についての研究がまだまだ十分とはいえず、ワクチン製造工程のうち、特にウイルスの大量増殖系の改善やウイルス不活化条件の改善が重要と思われる。本研究では、ウイルス不活化条件の改善によりワクチン製品の性能向上および低コスト化を達成することを目的として、研究を行った。なお、抗原性の保持状態の評価には、Gタンパクのコンフォメーションエピトープを認識する色々の中和モノクローナル抗体(mAb)を用いた。なかでもmAb #1-30-44は構造変換によって形成されたり失ったりするエピトープを認識する抗体で、この抗体に対する反応性が大きく変化する場合はGタンパクの構造変換を伴っていることが強く示唆される。

B. 研究方法

狂犬病ウイルス：主に日本における人用ワクチンの製造に用いられている狂犬病ウイルスHEP-Flury株を用いたが、一部の実験には日本における犬用ワクチンの製造に用いられているNishigahara株も用いた。

精製ウイルスの準備：培養細胞（ハムスター腎臓由来のBHK-21細胞）を用いて殖やしたウイ

ルスをPEG沈殿法により濃縮し、超遠心によりさらに濃縮・精製した。

不活化ワクチンの試作：精製した狂犬病ウイルスを β -プロピオラクトン(BPL)、ホルマリンあるいは紫外線照射法を用いて不活化し、その抗原性、免疫原性を比較検討した。

試作ワクチンの性能試験：抗原性の保持に関する試験管内試験法として、12種類のコンフォメーションエピトープを認識する抗Gモノクローナル抗体との反応性を調べた。動物に対する免疫原性の試験として、マウスに2週間間隔で2回接種し、さらに2週間後に採血して血清を分離した。

抗体価のアッセイ：狂犬病ウイルス(HEP-Flury株)に対する中和抗体価はフォーカス形成法で残留感染価を調べる方法によった。また、特異的抗体量の定量は精製ウイルスを抗原としたELISAにより行った。

C. 研究結果

1) Gsタンパクの問題

Gsタンパクは可溶性のウイルス糖タンパク質で、ウイルス感染細胞が合成するウイルス糖タンパク質の5-10%を占めるが、培地中に放出される成熟粒子のもつ糖タンパク質の総量とほぼ同じ量に達する。Gsタンパクは本来のGタンパクがもつ膜貫通ドメインからC末端側全体を欠如するため、サイズ的にはGタンパクと比べて15%ほど小さい程度であるが、このタンパクの重要な特徴の一つは免疫原性がほとんどないことで、この点からGsタンパクはウイルス粒子表面のGタンパクとは大きく異なる。Gsタンパクが抗G mAbとの反応性を保持しているかどうかという点が重要関心事となるが、我々の12種

類のmAbとの反応性を見たところ、1-30-44抗体との反応性を欠如していたが、他のすべてのmAbとの反応性は保持していた。ちなみに、1-30-44エピトープを形成するアミノ酸配列はGsタンパクにも保持されている。従って、Gsタンパクが免疫原性を欠如することと、Gタンパクの構造変換による1-30-44エピトープの欠如とは密接な関連性があることが示唆される。この観点から、ウイルス不活化後の糖タンパクのmAbとの反応性の変化を調べることによってワクチンとしての抗原性の維持の程度を評価することができるようになる可能性がある。

2) 不活化処理後のウイルス糖タンパク質の抗原性について

狂犬病ウイルスをいくつかの方法で不活化した後の抗原性の保持状態をウイルス中和作用のある種々の抗Gモノクローナル抗体との反応性を指標として調べた。まず、0.04%のBPLで不活化した場合には、12種類のmAbに対するエピトープを見ると、11種類のmAbに対する抗原性は比較的保持されていたが、mAb#1-30-44に対するエピトープの保持が非常に悪かった。その原因として、一つはBPLはタンパク質のアシル化およびアルキル化をもたらし、抗原決定基も修飾を受けることが考えられ、またBPLは水と速やかに反応して酸が生じてpHが急速に低下するので、糖タンパクは構造変換を来し、その結果表面に現れた部位もBPLによって修飾を受けることになり、抗原性が変化するだけでなく、酸性化によって起こった構造変換した状態からもとの構造に戻れなくなることも考えられる（因みに、1-30-44エピトープは酸性pH条件下でGタンパク分子の構造変換が誘導されて失わ

れる）。

ホルマリン不活化は3-10%のホルマリンではエピトープ部位の修飾により1-30-44エピトープが大きく損なわれるが、0.1-0.3%辺りでは1-30-44エピトープは比較的よく保持されることが分かった。また、紫外線照射による不活化では、どのmAbに対する抗原エピトープも比較的よく保存されており、損なわれる程度は一番少なかった。なお、ホルマリン不活化ではGタンパク分子の架橋により高分子化が起こるが、BPL不活化では高分子化が起こらなかった。

3) 不活化条件の異なる試作ワクチンの免疫原性の比較

6ヶ月齢のddy系マウス（各群5匹ずつ）に試作ワクチンを2週間空けて2回接種し（接種量は各個体当たりのウイルスタンパク質量が同じになるように接種した）、さらに2週間後に採血した。各血清について、ウイルス中和抗体価およびELISA法による抗G抗体量を測定した。その結果、中和抗体価は個体差が大きいものの、平均値で比較すると中和抗体価の上がり方には不活化法によって大きな違いが見られた。まず、紫外線不活化した試作ワクチンは中和抗体価の上がり方が一番低かった。BPLによる不活化は紫外線不活化よりもいくぶん抗体価は高かったが、ホルマリン不活化に比べるとかなり低いものであった。また、ホルマリンの濃度の違いは中和抗体価の上がり方の違いとして逆の相関関係が見られたが、精々で2倍程度の違いであった。ところが、ELISA法で各血清中の狂犬病ウイルス特異的な抗体量を比較すると、どの方法で不活化した場合でも大きな違い

が見られなかった。このことは不活化法（言い換えれば、1-30-44抗体に対する残留抗原性の程度）によって誘導される抗体に質的な違いが生じることを示唆している。

D. 考察

モノクローナル抗体#1-30-44は2つの異なる領域が接近することで形成されるコンフォメーションエピトープであるが、免疫原性の欠如するGsタンパクはこの抗体によって認識されないことから、コンフォメーションがネイティブなものから不活性（レセプター認識能がないなど）のものに変換していることが明らかとなり、このことが免疫原性を失うこととも関連していることが強く示唆された。また、1-30-44エピトープの有無がワクチンの善し悪しに関しても非常に重要な情報を与えてくれことが強く示唆された。

BPLによる不活化では1-30-44エピトープに対して大きなダメージを与えることから、ワクチン製造のためのウイルス不活化剤としては適さないことが予測された。実際にマウスに接種した時の免疫原性がかなり損なわれていて、中和抗体の上がり方が非常に低かった。しかし、ELISAによって推定された抗体量には他の方法と比べて大きな差が見られなかった。このことから、抗原刺激で作られる抗体量には差が見られないものの、抗体の質的な違いがワクチンの善し悪し、すなわちウイルス不活化法の違いによって出てくることが分かった。

ホルマリン不活化では、抗体量が多くならずに、中和抗体価が高くなるという結果が得られたことから、他の不活化法とは大きく異なる。この点をさらに、紫外線不活化法の結果と一緒

に考察してみる必要がある。紫外線不活化ではタンパクをあまり損ねることがない代わりに、構造的な柔軟性をも保つために、生体に接種した時にはGタンパクがpH7付近でも構造変換を起こして（生体内では抗原刺激が行われるような部位ではpHが7.4よりもやや酸性側に傾く傾向があると予測され、環境変化に敏感に反応するGタンパクの構造変換により1-30-44エピトープが失われる可能性がある）、Gsタンパクと同じ構造になりやすいために、良い抗体を産生するリンパ球を刺激する機会を失う可能性が予測される。実際に、紫外線照射ウイルスをワクチンとして接種した抗体価の上がり方は最も低かった。紫外線照射ウイルスの場合、おそらく樹状細胞を介しての抗原刺激は問題ないとしても、構造変換のためにコンフォメーションエピトープを認識するリンパ球を刺激する機会が少なくなることも考えられる。ホルマリン不活化の場合には最も高い抗体価が得られたのは、ホルマリン処理によってGタンパク分子内および分子間に架橋がかかって構造的に安定化しているために、コンフォメーションエピトープに対する抗体を産生するBリンパ球を刺激する機会が得られやすいためと思われる。今回得られた結果は1-30-44抗体が認識するエピトープを保持するようにウイルス粒子を不活化することによって、いっそう優れたワクチンを作成することができることを実証することができた。

E. 結論

今回我々が狂犬病ウイルスの不活化についていくつかの不活化方法を比較検討した結果、従来狂犬病不活化ワクチン製造に用いられてきた

BPLを用いる方法はワクチンの性能 (=免疫原性) に重要なダメージをもたらすもので、特に1-30-44抗体に対する抗原性の維持という観点から好ましいものではないことが分かった。これに対して、0.1-0.2%程度の低濃度のホルマリンで不活化する方法は、試験管内でのテストにおいて抗原性の維持がよいことが証明されたばかりでなく、動物実験においてもウイルス中和抗体の上がり方も数倍高く、従来のワクチン製造工程の改善に有用と思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takashi Irie, and Akihiko Kawai. Further studies on the mechanism of rabies virus neutralization by mAb #1-46-12. *Microbiol. Immunol.* **49**:721-731, 2005.

Krit Thirapanmethee, Naohiro Ootaki, Mai Sakai, Chah Keng Lien, and Akihiko Kawai. Further studies on the soluble form (Gs) of rabies virus glycoprotein (G): Molecular structure of Gs protein and possible mechanism of the shedding. *Microbiol. Immunol.* **49**:733-743, 2005.

Harufusa Toriumi and Akihiko Kawai. Structural difference recognized by a monoclonal antibody #404-11 between the rabies virus nucleocapsid (NC) produced in virus infected cells and the NC-like structures produced in the nucleoprotein (N) cDNA-transfected cells. *Microbiol. Immunol.* **49**: 757-770, 2005.

2. 学会発表

吉田明日香, 河合明彦. 狂犬病ウイルスの dimerの役割について. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005年, 横浜), 演題番号3D02.

栃倉匡文, Thirapanmethee Krit, 河合明彦. 狂犬病ウイルスGタンパク質の1-30-44エピトープ陽性となる立体構造の有無と免疫原性との関係について. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005年, 横浜), 演題番号P1106.

オウ ピリン, 河合明彦, 栃倉匡文. 狂犬病ウイルス (RV) G蛋白質発現細胞で見られる膜融合活性の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005年, 横浜), 演題番号P1107.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当せず.

厚生科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担研究報告書

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

ハンタウイルス感染症の疫学的研究

分担研究者 荻和 宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 助教授

研究要旨

ハンタウイルスはげっ歯類を病原巣動物として自然界に分布し、人が感染すると腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)などの重篤な疾病を引き起こす。日本においてはドブネズミと北海道のエゾヤチネズミにがハンタウイルスの病原巣動物となっている。エゾヤチネズミの保有するウイルスはヨーロッパなどで HFRS を引き起こす Puumala 型に非常に近縁であることが判明している。Puumala 型のウイルスには定量的なウイルス検出法やワクチンの評価に用いることのできるような確立した感染動物モデルが存在しないことから、本ウイルスに対するワクチン開発は非常に遅れていた。そこで、ハンタウイルスのヌクレオキャプシド蛋白質 (NP) を標的とした抗原検出用 ELISA とウイルスの S 遺伝子を標的とした Real-time PCR を開発した。NP 免疫ウサギ血清を捕捉抗体に用い、Puumala 型ハンタウイルス感染マウス血清を検出用抗体に使用することにより、NP の検出を行った。その結果、ウイルスの感染価と ELISA の吸光度との間にほぼ直線的な関係が得られたことから、本 ELISA によって NP を定量的に検出することが可能となった。次にウイルス RNA の S 遺伝子を標的とした TaqMan Real-time PCR 法の確立を試みた。蛍光強度が 0.2 を上回る PCR のサイクル数を Ct 値としたところ、Ct 値はウイルス感染価とウイルス遺伝子のいずれに対しても相関係数 0.98 以上の強い正の相関を示すことが明らかになった。したがって、本 Real-time PCR により、ウイルス遺伝子の定量的な検出が可能になった。Puumala 型ウイルスに感受性の高い実験動物を検索するための一環として、4 週令のシリアンハムスターに Puumala 型ハンタウイルスを皮下接種し、抗原検出 ELISA と Real-time PCR を用いてハムスターの肺におけるウイルスの増殖様式を解析した。感染 14 日目にウイルス抗原とウイルス RNA がピークに達し、抗体の上昇する 28 日目以降はウイルス抗原は検出されなくなるものの、ウイルス RNA は 3 日目から 70 日目まで継続して検出された。成熟した実験動物にハンタウイルスを感染させてウイルスがこのように活発に増殖し、しかも持続感染が成立する動物実験系はこれまでほとんど報告がなく、シリアンハムスターと Puumala 型ハンタウイルスを用いた動物実験系がワクチンや抗ウイルス剤の評価に有用であることが明らかになった。

A. 研究目的

ハンタウイルスはげっ歯類を自然宿主とする、マイナス一本鎖の RNA ウイルスで、Hantaan 型、Seoul 型、Puumala 型など 20 種類以上のウイルス型の存在が知られている。本ウイルスは人に感染すると腎症候性出血熱 (HFRS) やハンタウイルス肺症候群 (HPS) などの重篤な疾患を引き起こす。現在中国などで、Hantaan 型と Seoul 型ハンタウイルスに対するワクチンが実用化されているが、欧州やヨーロッパロシアに分布する Puumala 型ハンタウイルスに対するワクチンは未だ開発されていない。そこで本研究では、まず短時間でウイルスを定量的に検出可能な 2 つの診断法 (抗原検出 ELISA と Real-time PCR) の開発を試みた。次に、ワクチン評価用の実験動物を検索するための第一歩として、ゴールデンハムスターに Puumala 型ハンタウイルスを接種し、抗原検出 ELISA と Real-time PCR で感染動物体内のウイルスの検出を試みた。

B. 研究方法

1. ハンタウイルス株

Vero E6 細胞に Puumala 型の Sotkamo 株を感染させ、14 日間培養を行った。感染細胞の培養上清を回収し、ウイルスストックとして $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で使用時まで保存した。

2. 抗原検出 ELISA

Sotkamo 株のウイルスストックもしくはハンタウイルス感染エゾヤチネズミの肺を高濃度塩化カリウム、TritonX-100 等を含む lysis buffer で可溶化して検体とし、ハンタウイルスの Nucleocapsid

protein (NP) を抗原検出用 ELISA で検出した。ELISA の術式は以下の通りである。

- (1) 抗 NP ウサギ血清、(2) ブロッキング、(3) 検体、(4) 抗 NP モノクローナル抗体、(5) ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体、(6) 基質 (オルトフェニレンジアミン)、(7) 吸光度の測定。

3. Real-time PCR

ハンタウイルスの S 遺伝子を標的として TaqMan Real-time PCR 用のプライマーとプローブを調整した。RNA の抽出は型のごとく行い、逆転写反応を行った後、TaqMan Real-time PCR を実施した。蛍光強度が 0.2 を上回る PCR のサイクル数を Ct 値とし、段階希釈したウイルスストックごとに Ct 値を求めた。

4. ゴールデンハムスターへのウイルス接種

4 週齢のゴールデンハムスターに Puumala 型ハンタウイルスの Sotkamo 株を 3.3×10^3 ffu/head で皮下接種した。接種後 3 日、7 日、14 日、28 日、42 日、55 日、および 70 日目にそれぞれ 2~3 匹の動物から血液及び各臓器を採取した。

C. 研究結果および考察

ストックウイルス液を用いて、今回開発を行った抗原 ELISA でウイルスの NP が検出できるかどうかについて検討を行った。その結果、ウイルスの感染価と ELISA の吸光度との間にほぼ直線的な関係が得られたことから、本 ELISA によって NP が定量的に検出できることが可能となった。次にウイル

ス RNA の S 遺伝子を標的とした TaqMan Real-time PCR 法の確立を試みた。蛍光強度が 0.2 を上回る PCR のサイクル数を Ct 値としたところ、Ct 値はウイルス感染価とウイルス遺伝子のいずれに対しても相関係数 0.98 以上の強い正の相関を示すことが明らかになった。したがって、本 Real-time PCR により、ウイルス遺伝子の定量的な検出が可能になった。

Puumala 型ハンタウイルスの感染動物としての有用性を明らかにするために、ゴールデンハムスターにウイルスを接種し、抗原 ELISA と Real-time PCR で肺中のウイルスの検出を行った。ハムスターにウイルスを接種後、採材に供するまで毎日動物の観察を行ったが、死亡及び元気消失は見られなかった。抗ハンタウイルス抗体は接種後 14 日目から上昇し始め、28 日目以降から 70 日目まで一定のレベルを維持し続けた。NP は接種後 7 日目で検出され始め、14 日目にもっとも多量に発現した。しかし 28 日目以降は検出されなくなった。ウイルス遺伝子は接種後 3 日目から 70 日目まで継続的に検出されたが、14 日目でピークを迎え、若干減少した後、28 日目から 70 日目までほぼ一定のレベルを維持した。これらのことからゴールデンハムスターは臨床症状は示さないものの、Puumala 型ハンタウイルスに感受性であることが明らかになった。

D. 結論

今回開発を試みた抗原検出 ELISA と Real-time PCR で Puumala 型ハンタウイルスが定量的に検出できることが明らかになった。また、自然宿主であるヨーロッパヤチネズミを除き、Puumala 型ハンタウイルスが成熟した実験

動物においてよく増殖する系はこれまで存在しなかったことから、本モデルがワクチン開発などの評価系として有用である可能性が示唆された。今後は本モデルにおいて、ワクチン候補物質を投与後、ウイルスによる攻撃実験を行い、本モデルの有用性について、さらに検討する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 苅和宏明 ハンタウイルス感染症
Virus Report 2005; 2(2): 27-34.
- 2) 高島郁夫、早坂大輔、後藤明子、好井健太郎、苅和宏明 日本と極東ロシアのダニ媒介性脳炎ウイルスの系統解析と病原性 ウイルス 2005; 55(1): 35-44.
- 3) Kogaki H, Uchida Y, Fujii N, Kurano Y, Miyake K, Kido Y, Kariwa H, Takashima I, Tamashiro H, Ling AE, Okada M. Novel rapid immunochromatographic test based on an enzyme immunoassay for detecting nucleocapsid antigen in SARS-associated coronavirus. J Clin Lab Anal. 2005; 19(4):150-9.
- 4) Yoshii K, Hayasaka D, Goto A, Kawakami K, Kariwa H, Takashima I. Packaging the replicon RNA of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus into single-round infectious particles: development of a heterologous gene delivery system. Vaccine. 2005; 23(30):3946-56.
- 5) Shirato K, Miyoshi H, Kariwa H, Takashima I. Related Articles, Links
Detection of West Nile virus and

- Japanese encephalitis virus using real-time PCR with a probe common to both viruses. *J Virol Methods*. 2005; 126(1-2):119-25.
- 6) Goto A, Yoshii K, Obara M, Ueki T, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion. *Vaccine*. 2005; 23(23):3043-52.
2. 学会発表
- 1) 苅和宏明：野生げっ歯類を対象としたハンタウイルス感染症の比較疫学的研究：第 139 回 日本獣医学会学術集会、和光(2005,3)
- 2) 谷川洋一、苅和宏明、萩谷友洋、Nandadeva Lokugamage、Kumari Lokugamage、館敦史、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：野生げっ歯類からのハンタウイルス抗原検出用 ELISA の開発：第 139 回 日本獣医学会学術集会、和光(2005,3)
- 3) 野田寛、苅和宏明、浅野淳、安居院高志、倉野義裕、内田好昭、藤井信之、高島郁夫：重症急性呼吸器症候群 (SARS) コロナウイルスに対するモノクローナル抗体エピトープ解析：第 139 回 日本獣医学会学術集会、和光(2005,3)
- 4) 野田寛、苅和宏明、浅野淳、安居院高志、倉野義裕、内田好昭、藤井信之、岡田政久、高島郁夫：重症急性呼吸器症候群 (SARS) コロナウイルスのヌクレオキャプシドに対するモノクローナル抗体の性状解析：第 140 回 日本獣医学会学術集会、鹿児島(2005, 9-10)
- 5) 谷川洋一、苅和宏明、萩谷友洋、Nur Hardy Bin Abu Dand、Nandadeva Lokugamage、Kumari Lokugamage、館敦史、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：ゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*) における Puumala 型ハンタウイルスの感染様式の解析：第 140 回 日本獣医学会学術集会、鹿児島(2005, 9-10)
- 6) 伊川綾恵、好井健太郎、川上和江、後藤明子、小原真弓、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス組み換え蛋白を用いた ELISA 法による野鼠血清スクリーニング法の開発：第 140 回 日本獣医学会学術集会、鹿児島(2005, 9-10)
- 7) 中村一郎、吉松組子、奥村恵、YANAGIHARA Richard、苅和宏明、高島郁夫、有川二郎：食虫類由来ハンタウイルス (トツタパラセンウイルス) のリンクスにおける感受性の検討：第 140 回 日本獣医学会学術集会、鹿児島(2005, 9-10)
- 8) 好井健太郎、後藤明子、小原真弓、伊川綾恵、苅和宏明、高島郁夫：フラビウイルス prM 蛋白のアミノ酸配列保存領域のウイルス粒子出芽への影響：第 53 回 日本ウイルス学会、横浜(2005, 11)
- 9) 伊川綾恵、好井健太郎、後藤明子、小原真弓、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス組み換え蛋白を用いた ELISA 法による野鼠血清スクリーニング法の開発：第 53 回 日本ウイルス学会、横浜(2005, 11)

- 10) 苅和宏明、谷川洋一、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：ゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*)における Puumala 型ハンタウイルスの感染様式の解析：第 53 回 日本ウイルス学会、横浜(2005, 11)
- 11) 中村一郎、吉松組子、奥村恵、垂石みどり、苅和宏明、高島郁夫、有川二郎： タイランド型ハンタウイルス感染症の血清診断系の開発：第 53 回 日本ウイルス学会、横浜(2005, 11)
- 12) Yoshii K, Goto A, Hayasaka D, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Single point mutation in tick-borne encephalitis virus prM protein induces a reduction of virus particle secretion. 13th International Congress of Virology. San Francisco, U.S.A., 2005, July.
- 13) Arikawa J, Pattamadilok S, Lee B-H, Kumperasart S, Yoshimatsu K, Okumura M, Nakamura I, Araki K, Khoprasert Y, Dangsupa P, Panlar P, Jandrig B, Kruger DH, Klempa B, Jakel T, Schmidt J, Ulrich R, Kariwa H. Serological detection and antigenic and genetic characterization of Thailand virus, genus hantavirus, in humans and rodents in Thailand. 13th International Congress of Virology. San Francisco, U.S.A., 2005, July.
- 14) Takashima I, Shirato K, Goto A, Kariwa H. Viral envelope glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. 13th International Congress of Virology. San Francisco, U.S.A., 2005, July.
- 15) Kariwa H, Lokugamage K, Lokugamage N, Miyamoto H, Iwasa MA, Hagiya T, Araki K, Tachi A, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Genetic and antigenic characterization of hantavirus isolates in Amur and Far East genotypes. 13th International Congress of Virology. San Francisco, U.S.A., 2005, July.
- 16) Kariwa H, Tanikawa Y, Lokugamage K, Lokugamage N, Nur Hardy Bin Abu Daud, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Puumala virus infection in several rodent species of laboratory animal.
- 17) Yoshii K, Konno A, Goto A, Hayasaka D, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Single point mutation in tick-borne encephalitis virus prM protein induces a reduction of virus particle secretion. 13th International Congress of Virology. San Francisco, U.S.A., 2005, July.

厚生科学研究費補助金(国際医学研究協力研究事業)

分担研究報告書

ウイルス感染症の診断, 疫学および予防に関する研究

ハンタウイルス感染症の診断法

分担研究者 有川 二郎 北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設 教授

研究要旨:これまでに、2種類のハンタウイルス(Thailand (THAIV))および Thottapalayam virus (TPMV) の血清診断用 NP 抗原を開発し、また、モノクローナル抗体 E5/G6 の認識する NP 上のエピトープも決定した。この結果に基づき今年度は、TPMV 抗原に E5/G6 認識エピトープを導入し抗原固着のためのタグ配列を持つ診断抗原を開発した。これらの抗原を用いることにより、E5/G6 抗体で Hantaan (HTNV), Puumala (PUUV), SinNombre (SNV), TPMV の4種類の組み換え抗原を同等にプレートに固着して ELISA を行うことが可能となり、ハンタウイルス血清抗体網羅的スクリーニングシステムが完成した。HTNV に陽性を示した場合、さらに、HTNV/SEOV/DOBV/THAIV の鑑別 ELISA によって簡便に罹患ウイルスタイプを決定することが可能となった。これらのシステムを用いて、タイの不明熱患者から TPMV 抗体陽性例を、ベトナムの健常人・不明熱患者・港湾労働者血清から SEOV 抗体陽性例を、さらに、インドの不明熱患者血清から THAIV 罹患と思われる例を見いだした。さらにインドネシアで捕獲されたスunks に抗体陽性例を見いだした。本システムを用いて疫学的調査を拡大することで、新たな感染例が明らかになるものと考えられる。

A. 研究目的

ハンタウイルスはブニヤウイルス科ハンタウイルス属に分類される RNA ウイルスである。ハンタウイルスは、げっ歯類媒介性の人獣共通感染症である、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因となる。ハンタウイルスのうち、Hantaan (HTNV)、Seoul (SEOV)、Dobrava (DOBV)および Puumala (PUUV)の少なくとも4つの血清型が HFRS の原因となる。また Sin Nombre virus を始めとするアメリカネズミ亜科のげっ歯類

によって媒介されるハンタウイルスは HPS の原因ウイルスである。HTNV および SEOV および DOBV はネズミ亜科のげっ歯類、そして PUUV はハタネズミ亜科のげっ歯類によって媒介される。3つのグループのウイルスは互いに抗原性が大きく相違していることから、ハンタウイルス感染症の血清診断には少なくとも3種類の異なった血清型のハンタウイルスが必要であると考えられる。また、げっ歯類からハンタウイルス抗原を検出する場合でも、3種類の抗血清が必要である。

南アジア地区はげっ歯類の発生した地域と考えられており、げっ歯類の種類が豊富である。また、研究報告は少ないもののこれまでに、病原性との関連が明らかでないハンタウイルスが数多く報告されている。不明熱とされている中にハンタウイルス感染症が存在する可能性も考えられている。インドにおいて食虫目のスルクスより分離されたハンタウイルス Thottapalayam virus (TPMV)は最も特殊なハンタウイルスである。げっ歯類でも、タイの *Bandicota indica*から分離された THAIV が報告されている。本研究では、これらのウイルスに罹患した患者あるいは齧歯類・食虫類を検出することを目的として、TPMV 診断抗原に改良を加えた。すなわち、これまでに確立した診断抗原と同様にモノクローナル抗体 E5/G6 のエピトープをタグを導入し、既報の各種ハンタウイルス抗原と同時に抗原捕捉 ELISA を行うことによって血清の反応性を比較検討できる系を確立した。

B. 研究方法

ウイルス: THAIV は韓国の HFRS reference center よりまた、TPMV はハワイ大学の R. Yanagihara 博士から分与された。

「抗原」: TPMV および THAIV を Vero E6 細胞に感染させ、感染細胞をガラスプレート上に固着後アセトン固定し、間接蛍光抗体法(IFA)抗原とした。また、感染細胞を SDS で処理したものを Western blotting 抗原とした。TPMV NP の全長(アミノ酸: 全長抗原)をプラスミドベクターを用いてバキュロウイルスベクター(AcNPV:BAC-TO-BAC GIBCO BRL)を用いて昆虫細胞(High Five)に発現させた。その際、昨年度の分析結果を考慮し、3 カ所のアミノ酸変異を導入し E5/G6 抗体との結合エピト-

プを導入した。組み換えバキュロウイルス感染細胞は SDS で処理し、Western blotting 抗原とした。また、ガラススライドに固着後アセトン固定し IFA 抗原とした。

「ELISA、Western blotting, 中和試験」: Western blotting 中和試験は既報の方法に従った (Araki et al. *J. Clin Microbiol.* 2001)。

「患者血清、免疫血清」: HTNV/SEOV に感染した中国・韓国・日本の患者血清、タイおよびインドの不明熱患者血清、インドネシアで捕獲されたスルクス血清を用いた。TPMV を接種したマウス血清・スルクス血清、組み換え核蛋白を免疫されたウサギ血清を用いた。

(倫理面からの配慮について)

用いた患者血清は何れも、韓国、中国、タイ、インドの研究所から分与されたものであり、それぞれの研究所で既に研究目的で使用が認められているものであり、さらに無記名で分与されたものであることから、倫理面からの問題はない。各種免疫血清の採血は、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものであり、動物福祉の観点からも問題はないと判断された。

C. 研究結果

TPMV:E5/G6 抗体エピトープタグを導入した組み換え TPMV 抗原:

E5/G6 抗体と結合することが IFA で確認された。一方、野生型組み換え TPMV 抗原は反応しなかった。また、タグ導入抗原に対し TPMV 感染マウス血清は IFA 抗体価 12800 と強く反応し、これは野生型組み換え抗原と同等の反応であることから、導入したタグが感染時に誘導される抗体の反応性に影響を与えないことが明らかとなった。このタ

グ導入抗原を E5/G6 抗体を用いてプレートに固着し、ELISA 系の検討を行った。大腸菌発現組み換え TPMV 抗原に対するウサギの抗血清、TPMV 感染スunks血清を陽性コントロールとして用いて ELISA 系の最適化を行った。

疫学的研究成果:

タイ国立衛生研究所: Sirima Patamadilok と共同で進めている疫学調査において、IFA で TPMV に何らかの反応を示した不明熱患者 11 血清 (検査総数 194 血清/158 患者由来、デング熱、日本脳炎、レプトスピラ症検査陰性) について、今年度開発した TPMV 診断 ELISA, Western blot, 中和試験を行った。その結果、同一患者からの 2 血清が低いながらもすべての試験法で抗体が検出され、TPMV 関連ウイルスのヒトへの感染を示唆する初めての例となった。しかしながら、この抗体は急性期および回復期で抗体価の変化がなく、IgM 抗体も検出されなかったことから、疾患との関連は不明である。

インドネシア国立衛生研究所: Ima Nurisa Ibrahim と共同で進めている疫学調査において、ジャカルタ近郊の Thousand island 諸島で捕獲された 11 匹のスunksのうち 2 匹から抗 TPMV 抗体が検出された。そのうち一匹では WB 抗体および中和抗体も確認された。また、同地域のドブネズミおよびクマネズミからは多数の抗 SEOV 陽性例が検出された。種の特定とともに現在解析を進めている途中である。また、84 例の不明熱患者血清については 1 例の抗 SEOV 抗体が検出されたが抗体価は低く IgM は検出されなかった。

インドキリスト教病院 (Verolle): Sara Chandy と進めている疫学調査において、インドで行われた市販キットによる検査 (母数不明) で陽性例となった

もの 12 例のうち 4 例で抗ハンタウイルス抗体を検出した。うち 3 例: 腎機能不全患者、1 例: 不明熱患者であった。また上記 4 例のうち 2 例が鑑別 ELISA で THAIV 型の感染が示唆され、2 例は鑑別不能であった。ベトナム国立衛生研究所の Truong Ninh と共同で進めている疫学調査において、ベトナム北部 8 省由来の健常人・不明熱患者・港湾労働者合計 2500 名について調べたところ、北部 3 省由来の 12 例 (Haiphong 港の労働者 6/150, Thanh Hoa 省患者 3/146, HaNam 省の健常人 2/158 患者 1/58、から抗体が検出された。血清型鑑別 ELISA の結果、多くが SF_{OV} 感染によるものと考えられたが、HaNam および Thanh Hoa 省の陽性例では鑑別不能の例も得られた。齧歯類については、Thanh Hoa 省、Ha Nam 省、Tay Nguyen 省から得られた 255 例の齧歯類農地 HaNam 省および Tay Nguyen 省から得られた血清に 7/48, 1/61 とそれぞれ陽性例が確認された。また、Haiphong 港で捕獲されたラット類で 14/120 の陽性が確認された。

D. 考察

昨年度までに進めていた TPMV についての抗原性の解析およびエピトープタグの解析を基にエピトープタグを持つ TPMV 抗原を作成した。これですべてのハンタウイルス感染症をスクリーニングすることが可能となる 4 種類の診断抗原をそろえることができた。すなわちユーラシア大陸で HFRS の原因となるハンタウイルスを検出する HTNV, PUUV 抗原、および、アメリカ大陸で HPS の原因となるウイルスを検出するための SNV 抗原、および食虫目由来ハンタウイルスを検出する TPMV 抗原である。HTNV 関連ウイルスのうち病原性を持つこ