






表2. FU施設におけるエルシニア発生状況

1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	真性Yp症数	Ypリスザル数	Yp合計(含疑似)	'83	'85	'90	'95	'00	'01	'02	'03	'04	'05	
			キヤピバラ									7	1	8	16				3	1		1	3		
												1	1	5	8	5	1	5	1	3	1	4	1	3	0
												8	1	2	5	6	9	11	16	2	1	10	4	5	10
												83													

 マーラ  
 クモザル  
 リスザル



 リスザル  
 リスザル



 リスザル  
 リスザル

 リスザル  
 リスザル

 リスザル  
 リスザル

 リスザル  
 リスザル

 リスザル  
 リスザル

 リスザル  
 リスザル

合計：真性および疑似エルシニア症の合計  
 リスザル数：エルシニア症で死亡したリスザル数  
 Vac：ワクチン接種

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（吉川班）

## B ウイルスの潜伏感染に関する血清疫学的研究

（Ⅱ） $\alpha$ -ヘルペスウイルス感染における血清疫学的解析

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  
大森 優紀 日本獣医畜産大学獣医学部・獣医学科  
古賀 敦子 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

### 研究要旨

展示集団飼育チンパンジー 77 頭を対象に、 $\alpha$ -Herpesvirus の Simian herpes B virus (SHBV) および Herpes simplex virus-1,2 (HSV-1,2) 型における感染状況を血清疫学およびその家系系統樹から解析した。

- 1) HSV-1 型感染では、1.3%が抗体陽性で、HSV-1 型単一感染の実態を明らかにした。感染様式では、展示集団飼育環境下でのヒトからの感染が示唆された。
- 2) HSV-2 型感染では、47%が陽性で、HSV-2 型単一感染の実態を明らかにした。♂が 56%、♀が 44%で、雄に高い傾向がみられた。また、HSV-2 型が本対象群内での主要を占め、群内における水平感染が示唆された。
- 3) HSV-1,2 型重複感染では、1.3%が陽性でチンパンジー集団群において重複感染が起こり得ることを明らかにした。また、本対象群内での水平感染による重複感染であることが示唆された。
- 4) SHBV と HSV-2 型複合感染では、2.6%が陽性で、複合感染の起こり得ることを明らかにした。また、野生での SHBV 感染の後に、飼育環境下での水平感染による HSV-2 型感染であることが示唆された。

### A. 研究目的

$\alpha$ -Herpesvirus の 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た。平成 16 年度の本研究班における報告書において、SHBV および HSV-1,2 型の構造糖蛋白 (gD,gG) を抗原とした蛍光 ELISA 法により、各特異抗体の検出による血清学的診断法を確立した。本研究では、その実用性を視点において、展示集団飼育環境下におけるチンパンジーを対象に、 $\alpha$ -ヘルペスウイルスの感染状況の把握を目的として、血清疫学的解析を試みた。

### B. 研究方法

1. 方法：平成16年度の本研究報告書で明らかにした蛍光 ELISA 法で実施した。  
 $\beta$ -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：表 1. に示した、 $\alpha$ -ヘルペスウイルスゲノム上の gD、gG 遺伝子領域の塩基配列の相同性およびアミノ酸配列の相同性を解析して、各ウイルス構造発現糖蛋白を抗原として用いた。SHBV 抗原は、SHBV-gD（Tanabayashi k, et al: J.Clin.Microbiol.39,3025,01）抗原、および HSV-1,2 型抗原は、HSV-1,2-gG（ABI 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。第二次反応抗体は、ピオチン標識抗ヒト（AQI 社）、抗サル（RKL 社）、抗ウサギ IgG（CMN 社）血清を用いた。
4. 検体：S・展示集団飼育チンパンジー、77 頭の血清を用いた。チンパンジーの由来は、野生由来 41 頭、展示飼育場由来（F1/F2）36 頭。年齢層は、0-9 歳（5 頭）、10-19 歳（28 頭）、20-29 歳（35 頭）、30 歳以上（9 頭）。

○倫理面への配慮：チンパンジー血清については、提供団体が研究目的に対応した紙上公表しているもので、倫理面を配慮して採血されたものである。

## C. 研究結果

### 1. 第二次抗体の特異性

チンパンジー血清における蛍光 ELISA 法での第二次抗血清の至適使用条件をチンパンジー血清と抗サル IgG 抗体および抗ヒト IgG 抗体を用いて、各濃度における Box tests で検討した。その結果を図 1. に示した。

各使用濃度に依存し、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た。抗サル IgG 抗体よりも抗ヒト IgG 抗体での反応系が約 2 倍の高感度で、その相同性の高いことが示唆された。これにより、抗ヒト IgG 抗体の至適濃度条件を用いることで各特異性の高い抗体価をもとめ得ることが可能となった。

### 2. HSV-1,2 型の gG 抗原の特異性

使用、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を試みた。その結果を、図 2-A、図 2-B、図 3-A に示した。

SHBV 感染サル血清および HSV-1,2 型感染免疫血清において、各抗原間とでの交叉反応もなく、HSV-1,2 型および SHBV 特異抗体の検出が可能であった。これにより、HSV-1,2 型の重複感染例および SHBV との複合感染例も特異的に識別が可能となった。

### 3. SHBV の gD 抗原の特異性

使用、SHBV における gD 抗原の特異性の検討を試みた。その結果を、図 3-B、に示した。SHBV-gD 抗原は、HSV-1,2 型感染免疫血清、ウサギ正常血清およびサル正

常血清との反応では血清希釈濃度の高いところで対照正常抗原（vero 細胞調製）と同等の低非特異反応が起こり得るが、特異反応蛍光値との差は大きいことから、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。

#### 4. $\alpha$ -Herpesvirus 感染の血清疫学

展示集団飼育チンパンジー 77 頭を対象に、 $\alpha$ -Herpes virus の SHBV および HSV-1,2 型における感染状況を血清疫学のおよび家系系統樹的に解析した。その結果を、表 2.、図 4.、表 3.、図 5.、表 4.、図 6.、および図 7, 8, に示した。

1) HSV-1 型感染では、1.3%が抗体陽性で、HSV-1 型単一感染が示唆された。また、陽性事例は、展示飼育場由来（F1/F2）の 7 歳齢雄の若いチンパンジーで、展示集団飼育環境下でのヒトからの感染が示唆された。

2) HSV-2 型感染では、47%が陽性で、HSV-2 型単一感染が示唆された。♂が 56%、♀が 44%で、雄に高い傾向がみられた。また、野生および F1/F2 由来間においては有意差はみられなかったが、野生由来チンパンジーでは 21 歳齢以上の中高齢層における抗体陽性で、HSV-2 型が本対象群内での主要を占め、群内における水平感染によることが示唆された。

3) HSV-1,2 型重複感染では、1.3%が陽性でチンパンジーにおいても重複感染が起こり得ることが明らかになった。また、陽性事例は、F1/F2 由来の 12 歳齢雄の若いチンパンジーで、本対象群内での水平感染による重複感染であることが示唆された。

4) SHBV と HSV-2 型複合感染では、2.6%が陽性で、複合感染の起こり得ることを明らかにした。野生由来の雄・雌、各 1 頭で、23 歳齢以上の中高齢層で陽性であった。また、その感染様式は野生での SHBV 感染の後に、集団飼育環境下での水平感染による HSV-2 型感染であることが示唆された。

#### D. 考 察

$\alpha$ -Herpesvirus における 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、そ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による接触感染の主要感染源になり得ると考えられている。また、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。一方、HSV-1,2 型は、ヒトの主要ヘルペスウイルスで、1 型は口唇ヘルペス、2 型は陰部ヘルペスの主要起因ウイルスとされている。HSV-1,2 型感染者においてもその後根神経節における潜伏感染と再活性化により終生ウイルスを保有することになる。従って、各ウイルスの特異抗体の保有調査は、確定診断と感染様式の解析を行う上で重要である。

$\alpha$ -Herpesvirus の 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、両者ウイルスの複合感染の場合、その確定診断が

困難とされていた。平成16年度の本研究班の報告書において、SHBV および HSV-1,2 型の構造糖蛋白 (gD,gG) を抗原とした蛍光 ELISA 法により、各特異抗体の検出による血清学的診断法を確立し、輸入アカゲザルにおいて SHBV と HSV-1, および 2 型の複合感染の起こり得ることを明らかにした。この事実は、サル類の飼育環境下において、ヒトヘルペスの主要ウイルス、HSV-1,2 型がサル類に感染を起こすことにより、その確定診断を行う上で誤診を伴う可能性があることで重要な知見である。

従って、本研究では、その実用性を視点において、展示集団飼育環境下におけるチンパンジーを対象に、 $\alpha$ -Herpesvirus の感染状況の把握を目的として、血清疫学および家系系統樹的解析を試みた。本研究で重要なことは、展示集団飼育環境下におけるチンパンジーにおいて、HSV-1 型、2 型の単一感染、HSV-1,2 型の重複感染、および SHBV 感染の野生由来チンパンジーに、展示集団飼育環境下において水平感染と考えられる HSV-2 型の複合感染を示唆する結果が得られたことである。また、その伝播様式の詳細は不明であるが、チンパンジーの集団生活の習性と  $\alpha$ -Herpesvirus の特性および抗体陽性チンパンジーの家系系統樹解析から、最初にヒトから飛沫感染によりチンパンジーに HSV 感染を起こし、それが水平感染を主として集団群内に拡散感染を起こし得たものと考えられる。

本研究は、潜伏感染 SHBV および HSV の再活性化によるヒトへの感染、あるいはヒトからサルへの 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今後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 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、その実用性を視点に、展示集団飼育環境下におけるチンパンジーを対象に、 $\alpha$ -Herpesvirus の感染状況を血清疫学および家系系統樹から解析を試みた。

HSV-1 型、2 型の単一感染、HSV-1,2 型の重複感染、および SHBV 感染の野生由来チンパンジーに、展示集団飼育環境下において水平感染と考えられる HSV-2 型の複合感染の実態を明らかにした。今後、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 SHBV 感染症のヒトでの発生状況を見ると、現在までに少なくとも 30-40 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重要視されている。従って、 $\alpha$ -Herpesvirus の SHBV 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は重

要課題の一つである。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Kazue Uchida, Michiyo Shinohara, Shin-ichi Shimoda, Uykari Segawa, Rei Doi, Atushi Gotoh and Ryo Hondo. Rapid and sensitive detection of Mumps virus RNA Directly from Clinical Samples by Real-Time PCR. *Journal of Medical Virology* 75: 470-474, 2005.
2. Fukiko UEDA, Kyoko YUGAMI, Mariko MOCHIZUKI, Fumiya YAMADA, Kunitoshi OGASAWARA, Akikazu FUJIMA, Hiroshi SHOJI and Ryo HONDO. Comparison of genomic structures in the serovar 1/2a *Listeria monocytogenes* isolated from meats and listeriosis patients in Japan. *Japanese Journal of Infectious Disease* 58(5), 289-293, 2005.
3. Fukiko UEDA, Kunitoshi OGASAWARA and Ryo HONDO. Analysis of molecular evolution of *Listeria monocytogenes* isolated from Japanese meats and environment. *Japanese Journal of Infectious Disease* 58(5), 320-322, 2005.
4. Mariko MOCHIZUKI, Makoto MORI, Mayumi AKINAGA, Kyoko YUGAMI, Chika OYA, Ryo HONDO and Fukiko UEDA. Thallium contamination in wild ducks in Japan. *Journal of Wild Disease* 41(3), 664-668, 2005.
5. Fukiko UEDA, Reiko ANAHARA, Fumiya YAMADA, Mariko MOCHIZUKI, Yoshitsugu Ochiai and Ryo HONDO. Discrimination of *Listeria monocytogenes* contaminated commercial Japanese meats. *International Journal of Food Microbiology* 105(3), 455-462, 2005.
6. Fukiko UEDA, Kunitoshi OGASAWARA and Ryo HONDO. Characteristic of *Listeria monocytogenes* isolated from Imported meat in Japan. *Japanese Journal of Infectious Disease* 59(1), 54-56, 2006
7. Fumiya Yamada, Fukiko Ueda, Yoshitsugu Ochiai, Mariko Mochizuki, Hiroshi Shoji, Kiyoko Ogawa-Goto, Tetsutaro Sata, Kunitoshi Ogasawara, Akikazu Fujima and Ryo Hondo. Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells. *Journal of Microbiological Methods* (in press)
8. 本藤 良、斎藤彩、植田富貴子。特集：動物由来ウイルス感染症、Bウイルス感染症。日本臨床63(12)、2189-2195、2005

### 2) 学会発表

1. 斎藤彩、藤間勝昭、大屋智香、植田富貴子、鈴木恵真子、小枝暁子、今岡浩一、棚林清、庄司紘、吉川泰宏、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回日本獣医学会学術集会、2005。
2. 関本容子、清家一生、植田富貴子、山田文也、小笠原邦敏、望月真理子、本藤 良。  
*Listeria monocytogenes*汚染の分子疫学に関する基礎的研究5、*Listeria monocytogenes*分離株の分子進化的解析。第139回日本獣医学会学術集会、2005。
3. 高橋知子、松館宏樹、長谷川和弘、高橋雅輝、大窪富士子、瀬川俊夫、落合由嗣、植田富貴子、本藤 良。と場に搬入された牛におけるリステリア菌の保有状況とL. m分離株のゲノム構造の

特性。第140回日本獣医学会学術集会、2005。

4. 植田富貴子、望月眞理子、岩堀満月、川崎麻衣子、古賀敦子、小守忍、伊藤健護、須田詩織、早川一生、本藤 良。愛玩動物飼育用缶詰の安全性についての研究（2. 市販ネコ用缶詰中の必須元素含量）。第140回日本獣医学会学術集会、2005。
5. 小笠原邦敏、植田富貴子、望月眞理子、山田文也、青木英雄、木田中、中野恵、本藤 良。*Listeria monocytogenes*汚染の分子疫学に関する基礎的研究6、*Listeria monocytogenes*輸入株における分子進化学的解析。第140回日本獣医学会学術集会、2005。

表1  $\alpha$ -ヘルペスウイルスゲノムにおける糖蛋白質(gG,gD)領域の相同性

塩基配列の相同性			アミノ酸配列の相同性		
	HSV-1・gG	HSV-2・gG		HSV-1・gG	HSV-2・gG
HSV-2・gG	31 %		HSV-2・gG	36 %	
SHBV・gG	29 %	39 %	SHBV・gG	30 %	37 %
	HSV-1・gD	HSV-2・gD		HSV-1・gD	HSV-2・gD
HSV-2・gD	85 %		HSV-2・gD	78 %	
SHBV・gD	57 %	59 %	SHBV・gD	65 %	63 %
	HSV-1・gG	HSV-2・gG		HSV-1・gG	HSV-2・gG
SHBV・gD	31 %	37 %	SHBV・gD	26 %	26 %

図1

二次抗体の特異性

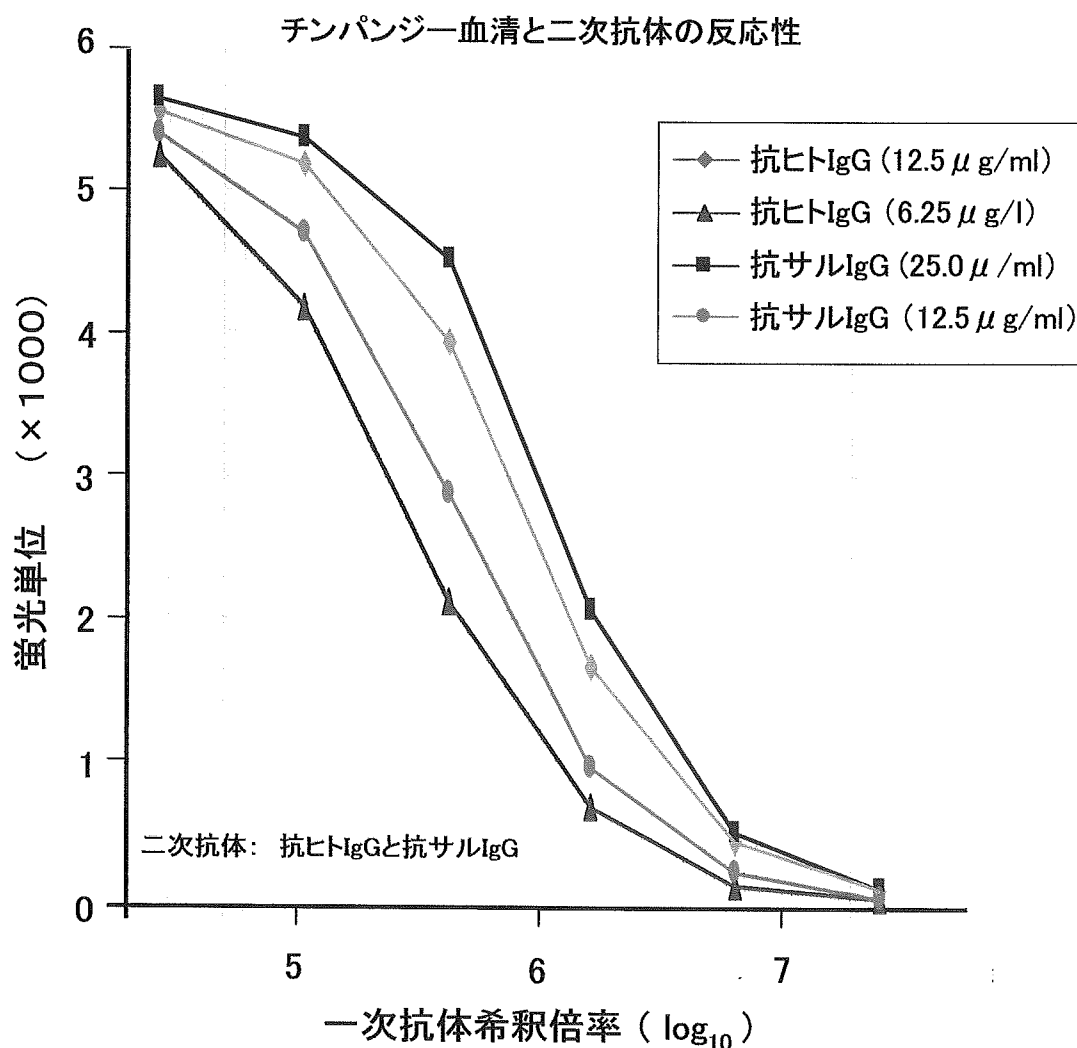




図2-A

HSV-1・gG抗原の特異性

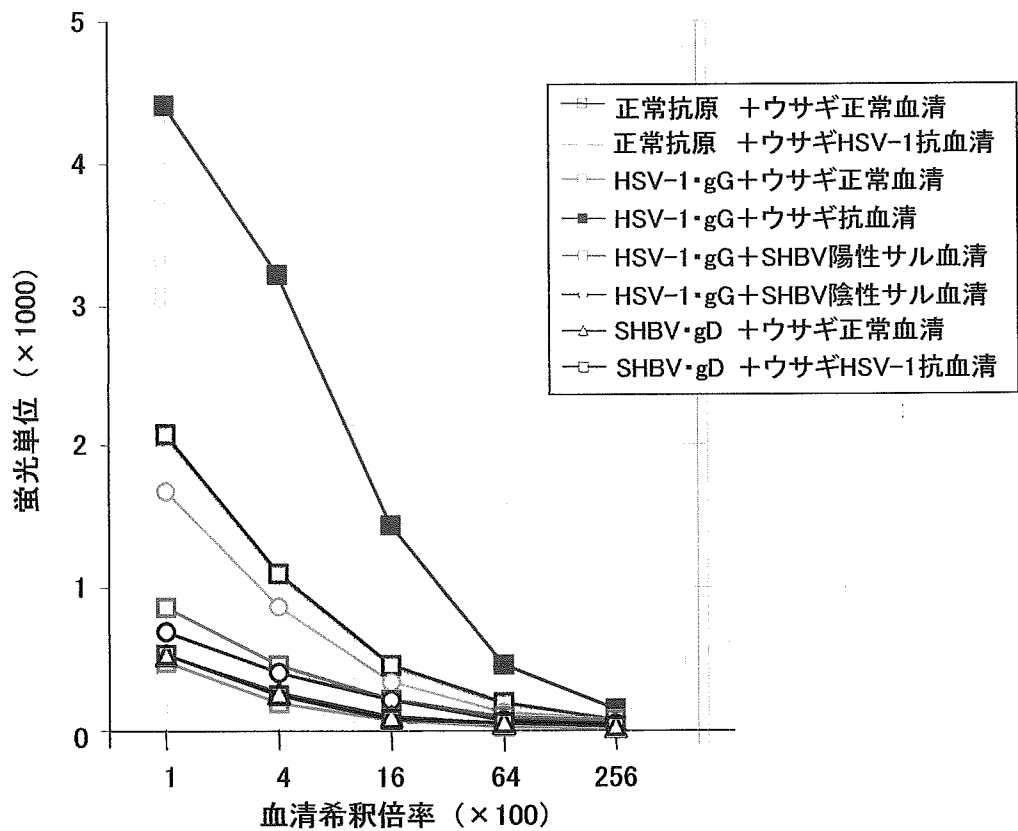


図2-B

HSV-2・gG抗原の特異性

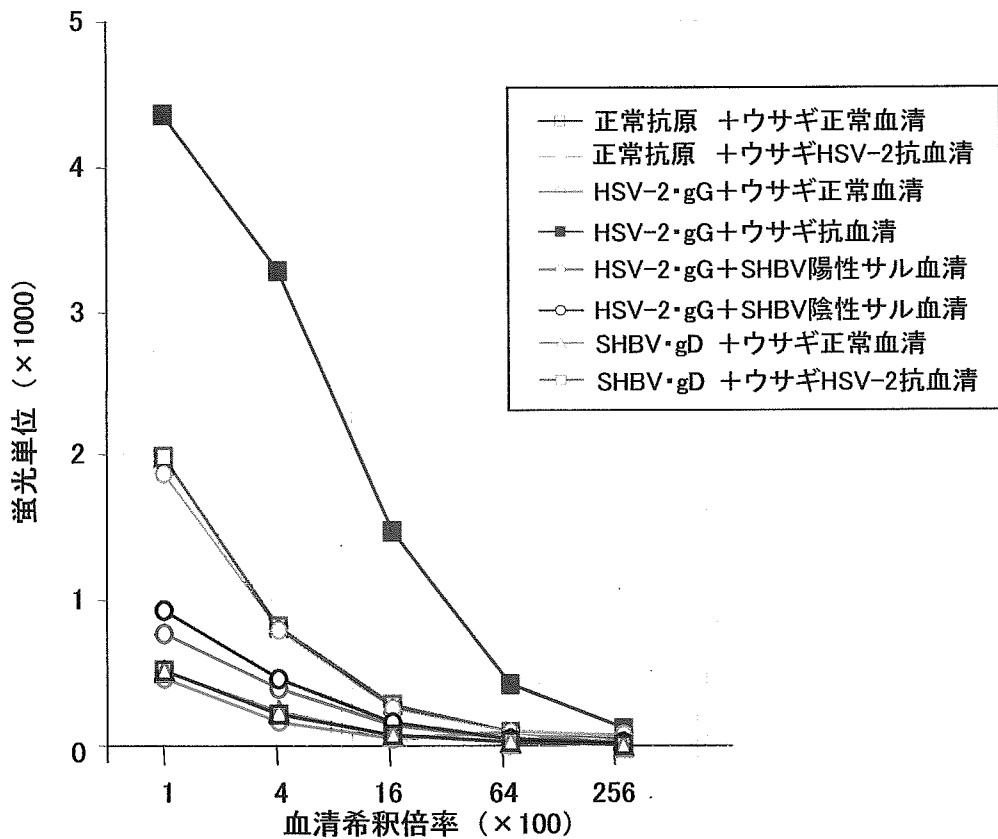


図3-A

HSV-1, 2・gG抗原の特異性

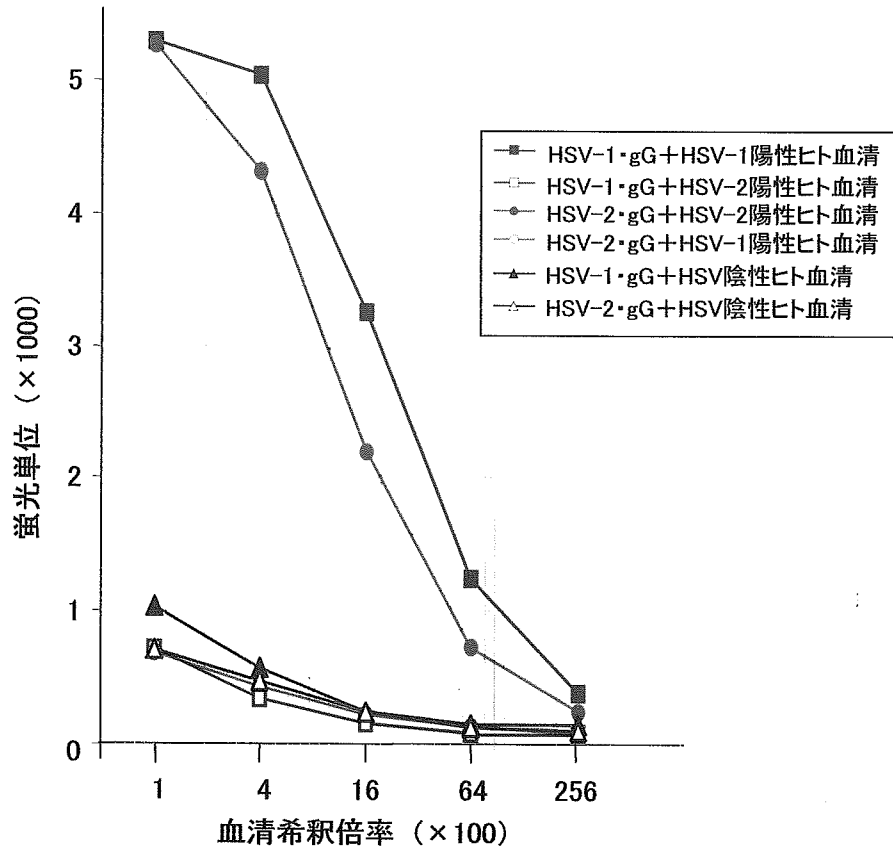


図3-B

SHBV・gD抗原の特異性

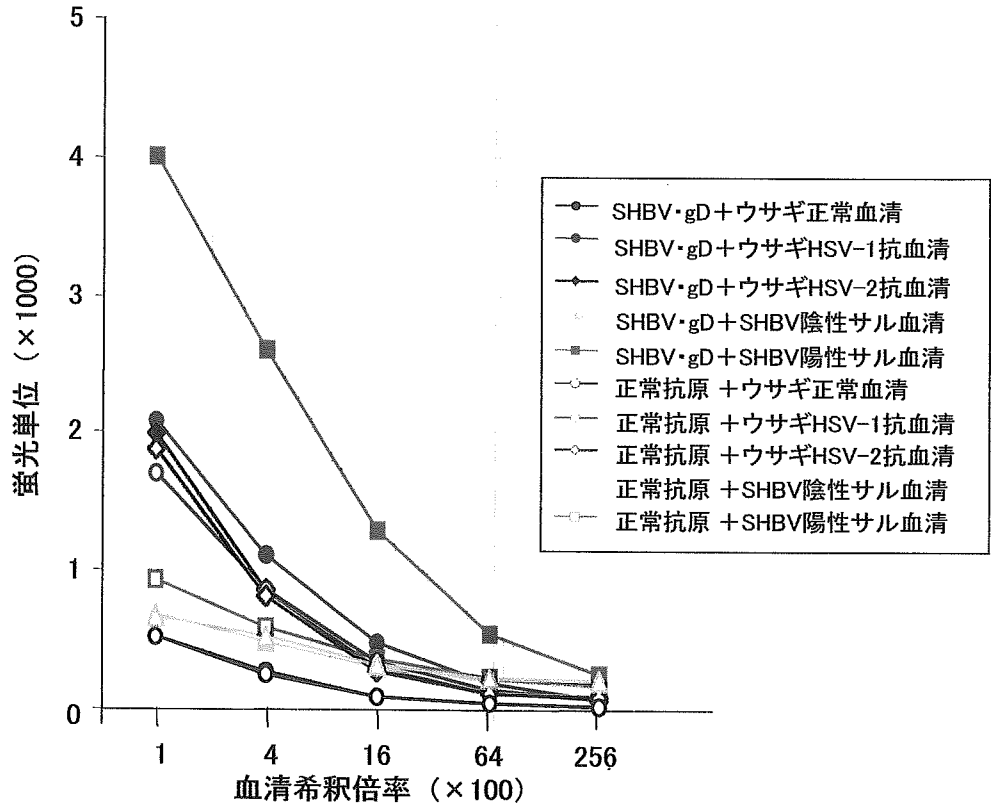


表2 チンパンジーにおける $\alpha$ -Herpesvirusの抗体保有状況

ウイルス種	陽性検体数 (%)	陽性検体の性別 (%)	陽性野生検体 (%)	F <sub>1</sub> / F <sub>2</sub> (%)
1 HSV-1	1 (1.3%)	♂ 1 (100%) ♀		1 (100%)
2 HSV-2	36 (46.8%)	♂ 20 (56%) ♀ 16 (44%)	11 (30.6%) 11 (30.6%)	9 (25.0%) 5 (13.9%)
3 HSV-1 HSV-2	1 (1.3%)	♂ 1 (100%) ♀		1 (100%)
4 HSV-2 SHBV	2 (2.6%)	♂ 1 (50%) ♀ 1 (50%)	1 (50.0%) 1 (50.0%)	
5 陰性	37 (48.1%)	♂ 17 (46%) ♀ 20 (54%)	5 (13.5%) 12 (32.4%)	12 (32.4%) 8 (21.6%)
計	77	77	41	36

図4

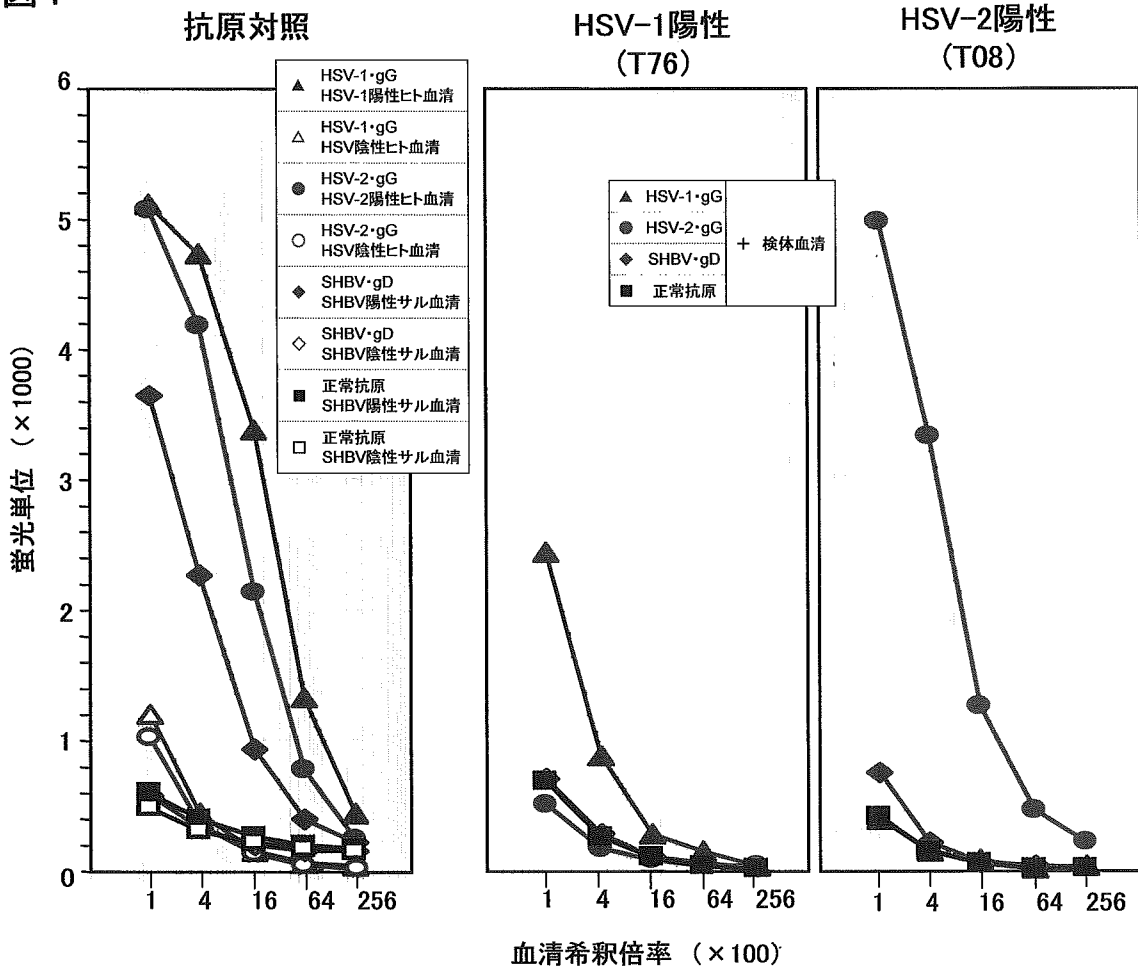


表3. チンパンジーにおける $\alpha$ -Herpesvirusの抗体保有状況

性別と年齢の関係

ウイルス種	陽性検体数 (%)	年齢 (%)		0-9歳	10-19歳	20-29歳	30歳以上
		性別 (%)					
1 HSV-1	1 (1.3%)	♂	1 (100%)	1 (100%)			
		♀					
2 HSV-2	36 (46.8%)	♂	20 (56%)	1 (2.8%)	6 (16.7%)	8 (22.2%)	5 (13.9%)
		♀	16 (44%)		4 (11.1%)	9 (25.0%)	3 (8.3%)
3 HSV-1 HSV-2	1 (1.3%)	♂	1 (100%)		1 (100%)		
		♀					
4 HSV-2 SHBV	2 (2.6%)	♂	1 (50%)			1 (50.0%)	
		♀	1 (50%)				1 (50.0%)
5 陰性	37 (48.1%)	♂	17 (46%)	3 (8.1%)	9 (24.3%)	5 (13.5%)	
		♀	20 (54%)		8 (21.6%)	12 (32.4%)	
計	77		77	5	28	35	9

図5

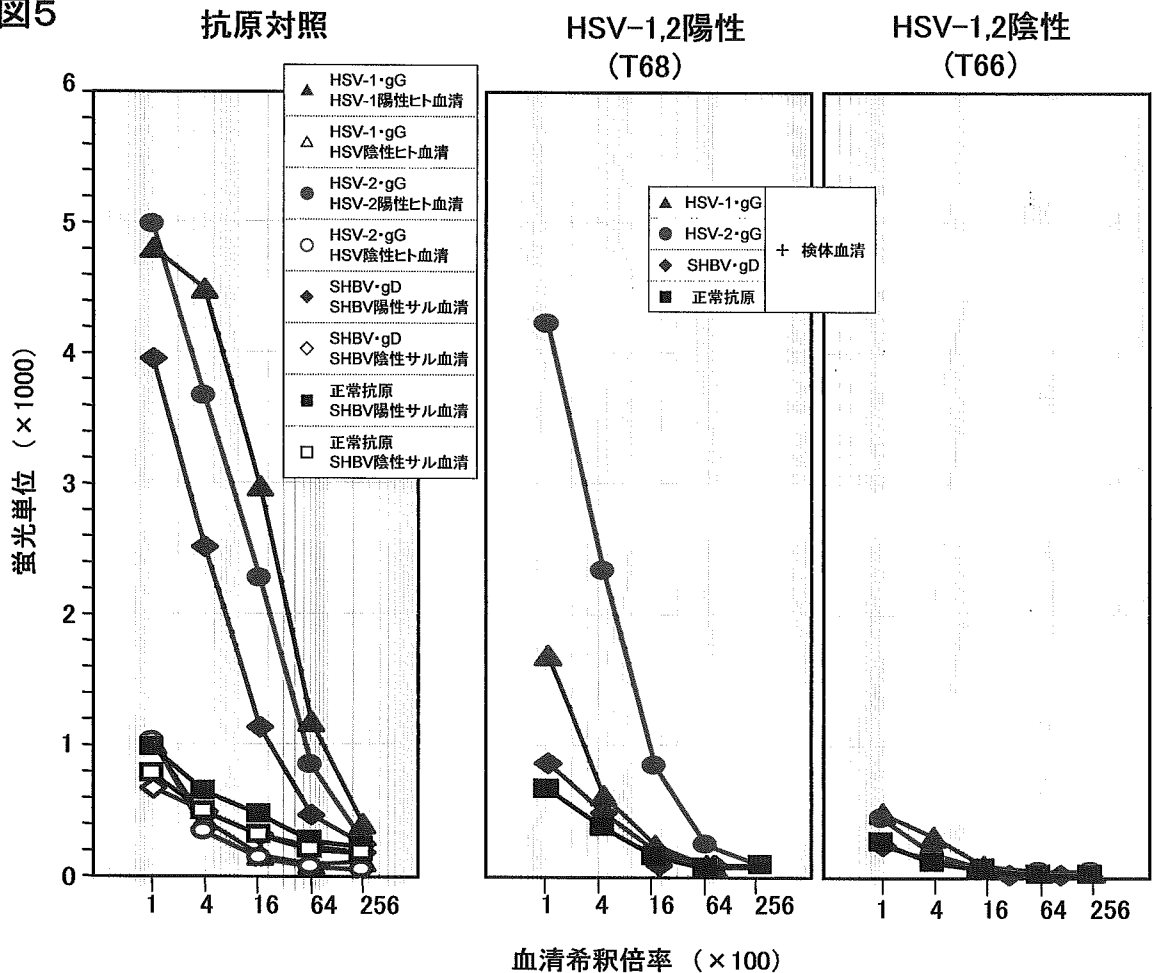


表4. チンパンジーにおける $\alpha$ -Herpesvirusの抗体保有状況

由来と年齢の関係

	ウイルス種	陽性検体数 (%)	年齢 (%)				
			性別 (%)	0-9歳	10-19歳	20-29歳	30歳以上
1	HSV-1	1 (1.3%)	野生				
			F <sub>1</sub> /F <sub>2</sub>	1 (100%)	1 (100%)		
2	HSV-2	36 (46.8%)	野生			14 (38.9%)	8 (22.2%)
			F <sub>1</sub> /F <sub>2</sub>	14 (39%)	1 (2.8%)	10 (27.8%)	3 (8.3%)
3	HSV-1	1 (1.3%)	野生				
	HSV-2		F <sub>1</sub> /F <sub>2</sub>	1 (100%)	1 (100%)		
4	HSV-2	2 (2.6%)	野生			1 (50.0%)	1 (50.0%)
	SHBV		F <sub>1</sub> /F <sub>2</sub>				
5	陰性	37 (48.1%)	野生			17 (45.9%)	
			F <sub>1</sub> /F <sub>2</sub>	20 (54%)	3 (8.1%)	17 (45.9%)	
計		77	77	5	28	35	9

図6

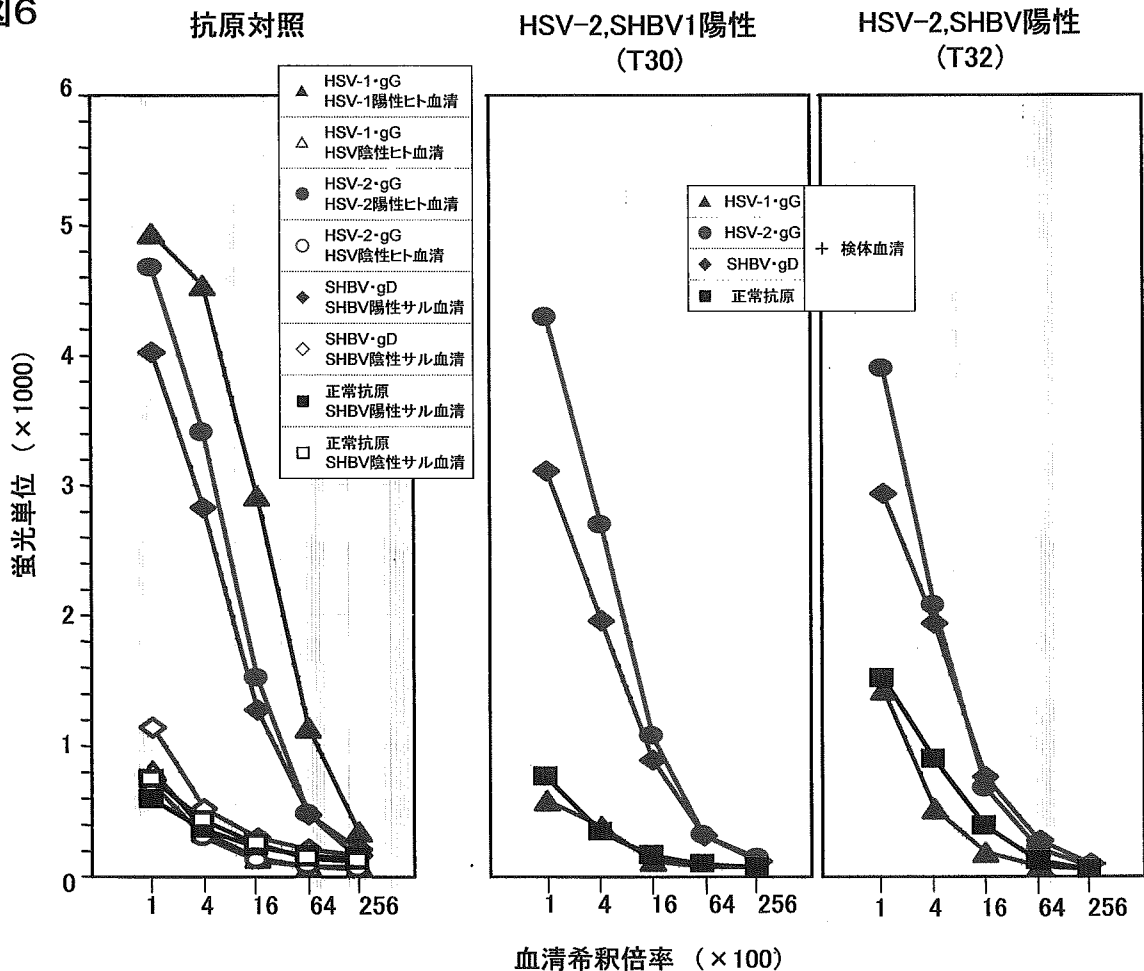
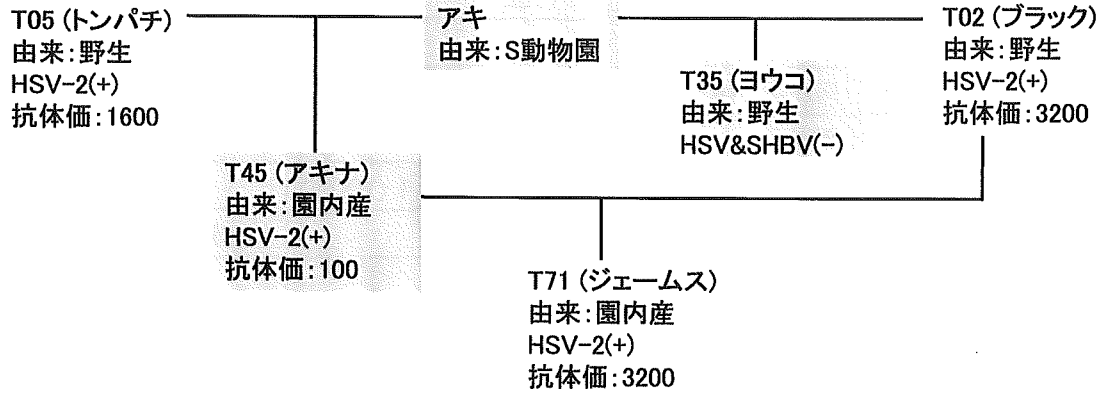


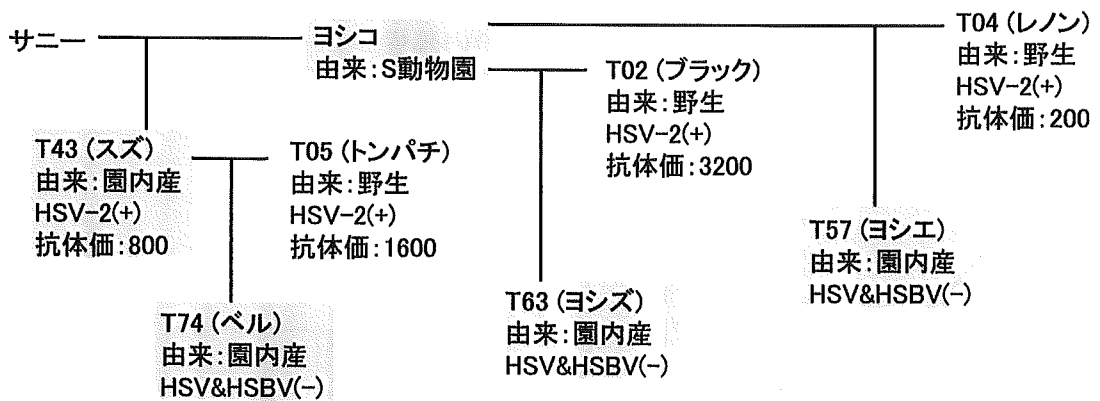
図7. チンパンジーの家系図

雄 雌

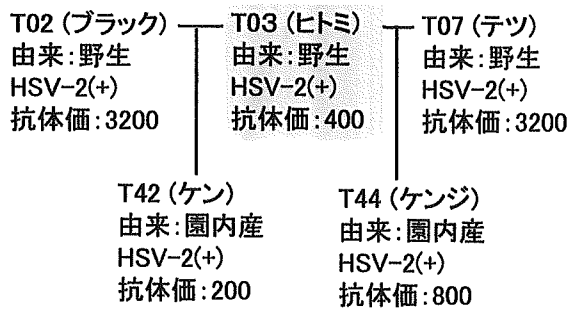
家系図1



家系図2



家系図3



家系図4

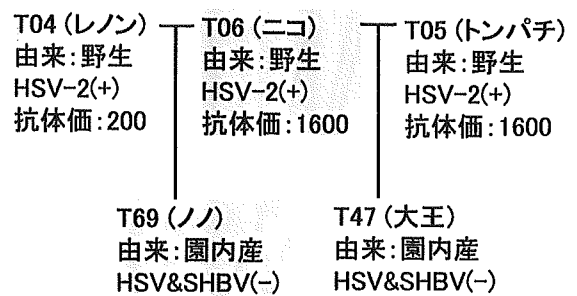
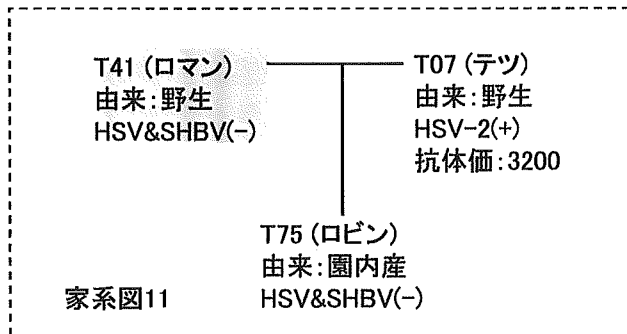
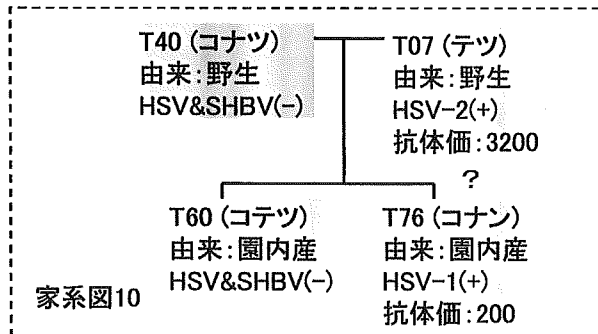
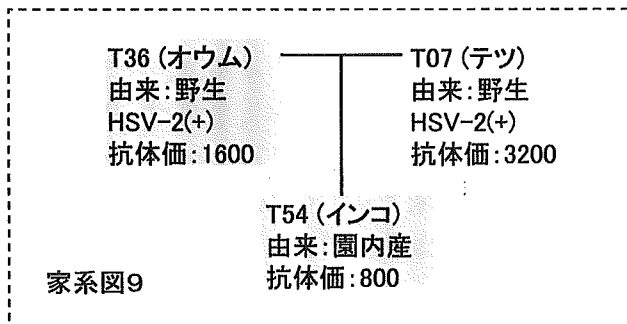
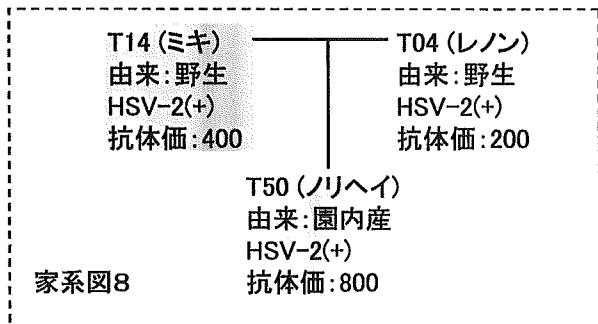
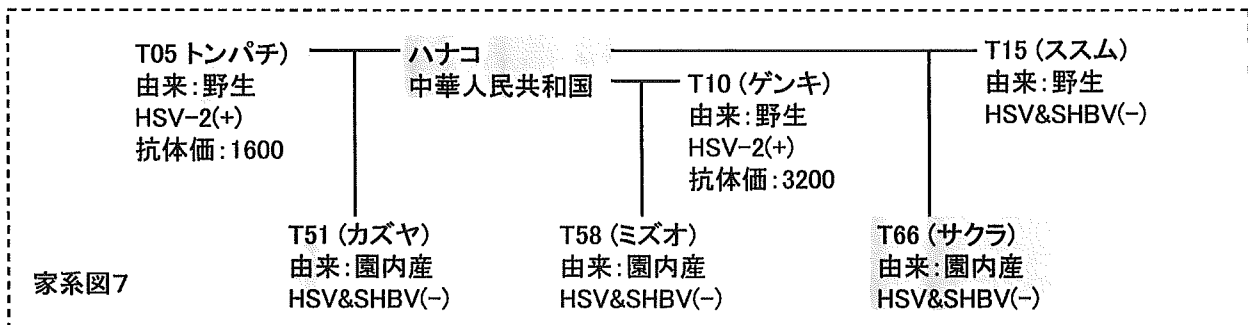
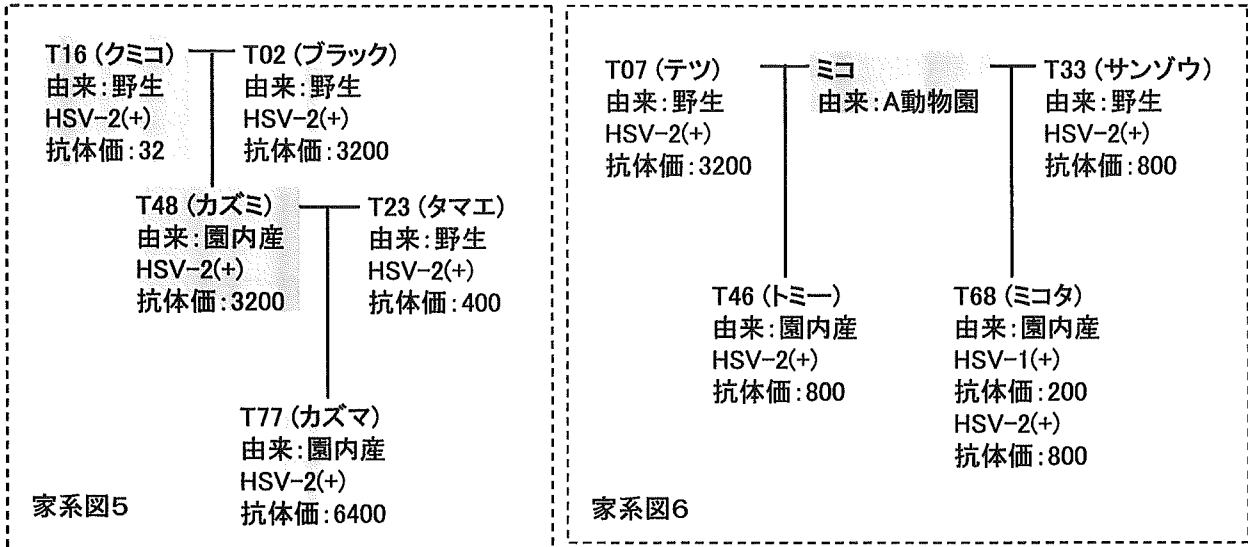


図8. チンパンジーの家系図

雄 雌



## ラッサウイルスの抗原検出法の開発と評価

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部部長)

Dr. Alain Georges (P4 Laboratory, INSERM)

Dr. MC Georges Courbot, Dr. Marianneau Philippe (Pasteur Institute, Lyon)

研究要旨: アレナウイルスによる出血熱には、アフリカに広く分布するラッサウイルスによるラッサ熱と南米に分布する新世界アレナウイルスによる南米アレナウイルス出血熱(アルゼンチン出血熱、ボリビア出血熱、ベネズエラ出血熱、ブラジル出血熱)がある。これらは、本研究班で対象とする感染症の中で最も重要な感染症の一つである。特にラッサ熱は感染症法で一類感染症に指定される重要な感染症であり、1987年には輸入症例が報告されている。ラッサウイルスはレベル4に分類されるため、BSL4 実験室が稼働していない日本ではウイルス培養ができず、これまで診断体制が十分整備されていない。本研究では、ラッサウイルスの核蛋白(NP)に対する単特異抗体を作製し、これを用いた抗原検出 ELISA を開発し、その有効性を評価した。その結果、ラッサ熱患者の発症初期の診断に有効であることが明らかとなった。

### A. 研究目的.

アレナウイルスによる出血熱には、アフリカに広く分布するラッサウイルスによるラッサ熱と南米に分布する新世界アレナウイルス(フニン(Junin)ウイルス、マチュポ(Machupo)ウイルス、ガナリト(Guanarito)ウイルス、サビア(Sabia)ウイルス)による南米アレナウイルス出血熱(アルゼンチン出血熱、ボリビア出血熱、ベネズエラ出血熱、ブラジル出血熱)がある。これらは、本研究班で対象とする感染症の中で最も重要な感染症の一つである。特にラッサ熱は感染症法で一類感染症に指定される重要な感染症である。ラッサウイルスはレベル4に分類されるため、BSL4 実験室が稼働していない日本ではウイルス培養が出来ず、これまで診断体制が十分整備されていない。本研究では、ラッサ熱の原因ウイルスであるラッサウイルスの核蛋白

(NP)に対する単特異抗体を作製しこれを用いた抗原検出 ELISA を開発し、その有効性を評価することを目的とする。

### B. 方法.

- 1) ラッサウイルスの NP : N 末端に his-tag を付加したラッサウイルス NP を組換えバキュロウイルスに昆虫細胞で発現させ Ni<sup>2+</sup>-カラムにより精製した。
- 2) ポリクローナル抗体: 組換えラッサウイルス NP をウサギに免疫して作製した。
- 3) 単特異抗体の作製: 組換えラッサウイルス NP を Balb/c マウスに免疫し、脾臓を採取した。採取された脾臓から細胞を採取してマウスミエローマ細胞 (P3/Ag568) と融合させてラッサウイルス NP に対する単特異抗体を分泌す



るハイブリドーマ株を樹立した。

- 4) 単特異抗体のエピトープの決定：作製された単特異抗体の認識するエピトープ領域は、GST 融合部分ラッサウイルス NP に対する反応性により決定した。
- 5) 抗原検出 ELISA：作製された単特異抗体を捕捉抗体として、また、捕捉されたラッサウイルス NP の検出抗体としてウサギポリクローナル抗体を用いて、抗原補足 ELISA を開発した。
- 6) 抗原補足 ELISA の感度：組換えラッサウイルス NP を希釈して抗原検出限界を決定した。
- 7) ラッサウイルス感染動物からの抗原検出と RT-PCR との比較：RT-PCR は、既に報告されているプライマー (36E2: 5'-acc ggg gat cct agg cat t-3' 及び 80F2: 5'-ata taa tga tga ctg ttg ttc ttt gtg ca-3') を用いた。1 x 10<sup>4</sup> focus forming unit (ffu) のラッサウイルス (AV 株) をハムスターに皮下接種して、継時的に血液を採取した。採取した血液から抗原補足 ELISA により抗原検出を、抽出した RNA から RT-PCR によりゲノム検出を行なった。さらに、P4 Laboratory, INSERM で開発された quantitative one step RT-PCR によりウイルス血症レベルを測定した。本実験は、フランス、リヨン市の INSERM の P4 Laboratory で行なった。
- 8) 抗原検出 ELISA の交叉性：ラッサウイルスに最も近縁な Mopeia ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCM ウイルス)、Junin ウイルス (アルゼンチン出血熱の原因ウイルス) との交叉性を検討した。

### C. 結果

- 1) 単特異抗体の作製：8 クローンの単特異抗体を作製した。これらの単特異抗体の

認識するエピトープは、表 1 に示すように、クローン 2-26 がラッサウイルス NP の 421-440 アミノ酸 (Pepscan 解析からは 437-443 アミノ酸の DLFATQP 配列)、4A5 が 21-370 アミノ酸領域からなる conformational epitope、6C11 が 41-60 アミノ酸 (Pepscan 解析からは 41-47 アミノ酸の GLDFSEV 配列) であった。他の 5 クローンは認識する領域が特定できなかった。6C11 は、LCM ウイルスとも交叉した。

- 2) 抗原補足 ELISA の開発：これらの単特異抗体を捕捉抗体として抗原検出 ELISA の感度を検討した結果、クローン 4A5 を用いた場合が最も高感度であり、組換えラッサウイルス NP に対する検出感度は 80pg であった (図 1)。
- 3) ラッサウイルス感染動物からの抗原検出と RT-PCR との比較：ラッサウイルス感染ハムスターから継時的に採取した血液からの抗原検出を、抗原検出 ELISA で行なった結果、感染後 4 日で 5 検体中 1 検体から検出でき、感染 11 日では 5 検体全てから抗原が検出できた。一方、RT-PCR でも、感染後 4 日で 5 検体中 1 検体から検出でき、感染 11 日では 5 検体全てから抗原が検出できた。Quantitative one step RT-PCR によりウイルス血症レベルを解析した結果、感染 4 日で 100-1,000 ffu/mL、感染 11 日で 10,000-100,000 ffu/mL であった (図 2)。
- 4) 抗原検出 ELISA の交叉性：ラッサウイルスに最も近縁な Mopeia ウイルスは、開発した抗原検出 ELISA で検出できた。RT-PCR でも同様に Mopeia ウイルスが検出できた。LCM ウイルス、Junin ウイルスとは交叉しなかった。

### D. 考察

アレナウイルスによる出血熱には、アフリカに広く分布するラッサウイルスによるラッサ熱と南米に分布する新世界アレナウイルス（フニン (Junin) ウイルス、マチュポ(Machupo) ウイルス、ガナリト(Guanarito) ウイルス、サビア(Sabia) ウイルス) による南米アレナウイルス出血熱（アルゼンチン出血熱、ボリビア出血熱、ベネズエラ出血熱、ブラジル出血熱）がある。これらは、本研究班で対象とする感染症の中で最も重要な感染症の一つである。特にラッサ熱は感染症法で一類感染症に指定される重要な感染症である。ラッサウイルスは野生齧歯類（マストミス）を宿主動物とし、持続感染動物の血液、体液、尿中にウイルスが排泄され、ヒトへの感染源となる。ラッサ熱は、ナイジェリア、リベリア、シエラレオネ、セネガル、ギニア等のサハラ以南西アフリカで毎年流行している。雨期に比べて乾期に流行することが多い。これらの地域でのラッサ熱による年間死亡数は、5,000人程度と考えられている。ラッサ熱流行地からの海外渡航者、帰国者が潜伏期間中に移動して流行地以外で発症する事例がたびたび報告されている。日本でも1987年シエラレオネからの輸入症例が報告されている。このため、ウイルス性出血熱のなかでは、日本で今後ラッサ熱患者が発生する可能性が最も高いと考えられる。

しかし、ラッサウイルスはレベル4に分類されるため、BSL4実験室が稼働していない日本ではウイルス培養ができず、これまで診断体制が十分整備されていなかった。本研究では、ラッサ熱の原因ウイルスであるラッサウイルスの核蛋白(NP)に対する単特異抗体を作製しこれを用いた抗原検出ELISAを開発し、その有効性を評価した。ラッサウイルスの構造蛋白には、GP (G1, G2), NP, L 蛋白があり、最も多量に含まれるのが核蛋白である NP である。我々は、

既にラッサウイルスと LCM ウイルスの NP を組換え蛋白として種々の系で発現し、抗体検出系を開発している。しかし、ラッサ熱患者の発症初期の診断には、抗体が検出できない場合も多いため、抗原検出や RT-PCR によるゲノム検出は不可欠である。

ラッサ熱患者では、発症時の血中ウイルス力価が  $4 \log_{10}/\text{mL}$  以上で、かつ GOT が 150 以上の場合死亡率は高く、血中ウイルス力価が  $1.3 \log_{10}/\text{mL}$  以下の場合予後は良好と言われている。本研究から、抗原検出 ELISA の感度は  $3 \log_{10}/\text{mL}$  程度と考えられるため、本法で抗原が検出された場合には、直ちにリバビリン投与を開始することが必要である。

## E. 結語

ラッサウイルス NP に対する単特異抗体を作製し、ラッサウイルスを高感度に検出する抗原検出 ELISA を開発できた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Mizutani T, Fukushi S, Iizuka D, Inanami O, Kuwabara M, Takashima H, Yanagawa H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Inhibition of cell proliferation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006 Mar 1;46(2):236-43.
2. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEBS Lett.* 2006 Feb 20;580(5):1417-24. Epub 2006.
3. Tang Q, Zhao XQ, Wang HY, Simayi B, Zhang YZ, Saijo M, Morikawa S, Liang GD, Kurane I. [Molecular epidemiology

- of Xinjiang hemorrhagic fever viruses] *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2005 Dec;19(4):312-8. Chinese.
4. Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda A, Kurane I, Maeno G, Kimura J, Hirama C, Yoshida T, Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, Kojima A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J Virol*. 2005 Sep;79(18):11873-91.
  5. Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 30;102(35):12543-7.
  6. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Miyajima N, Taguchi F, Itamura S, Kurane I, Morikawa S. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Gen Virol*. 2005;86(Pt 8):2269-74.
  7. Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of crimean-congo hemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody. *J Med Virol*. 2005;77(1):83-8.
  8. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. JNK and PI3k/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1741(1-2):4-10.
  9. Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane I. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus. *Antiviral Res*. 2005 ;66(2-3):159-63.
  10. Ohnishi K, Sakaguchi M, Kaji T, Akagawa K, Taniyama T, Kasai M, Tsunetsugu-Yokota Y, Oshima M, Yamamoto K, Takasuka N, Hashimoto S, Ato M, Fujii H, Takahashi Y, Morikawa S, Ishii K, Sata T, Takagi H, Itamura S, Odagiri T, Miyamura T, Kurane I, Tashiro M, Kurata T, Yoshikura H, Takemori T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Jpn J Infect Dis*. 2005;58(2):88-94.
  11. Hatakeyama S, Moriya K, Saijo M, Morisawa Y, Kurane I, Koike K, Kimura S, Morikawa S. Persisting humoral antiviral immunity within the Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(4):520-4.
  12. Endoh D, Mizutani T, Kirisawa R, Maki Y, Saito H, Kon Y, Morikawa S, Hayashi M. Species-independent detection of RNA virus by representational difference analysis using non-ribosomal hexanucleotides for reverse transcription. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(6):e65.
  13. Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NT, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological

- diagnosis of SARS. *J Virol Methods*. 2005;125(2):181-6.
14. Saijo M, Niikura M, Maeda A, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Med Virol*. 2005;76(1):111-8.
  15. 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 DE, Peiris JS, Chen PJ, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine*. 2005; 23 (17-18):2269-72.
  16. Saijo M, Suzutani T, Morikawa S, Kurane I. Genotypic characterization of the DNA polymerase and sensitivity to antiviral compounds of foscarnet-resistant herpes simplex virus type 1 (HSV-1) derived from a foscarnet-sensitive HSV-1 strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(2):606-11.
  17. Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *J Med Virol*. 2005 ;75(2):295-9.
2. 知的財産権の出願・登録（予定を含む）  
特許取得：該当なし
3. 学会発表
    - 1) Mizutani T, Fusushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Importance of JNK and PI3K/Akt signaling pathways for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
    - 2) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of SARS-CoV infections in experimental animals. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
    - 3) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
    - 4) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, protects monkeys from monkeypox. XIIIth International Congress of Virology. 2005年7月, San Francisco, CA, USA
    - 5) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Protection of non-human primates from monkeypox by highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, that lacks expression of B5R membrane protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program 39th Virology Panel Meeting. 2005年7月, San Francisco, CA, USA
    - 6) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 緒方も