

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

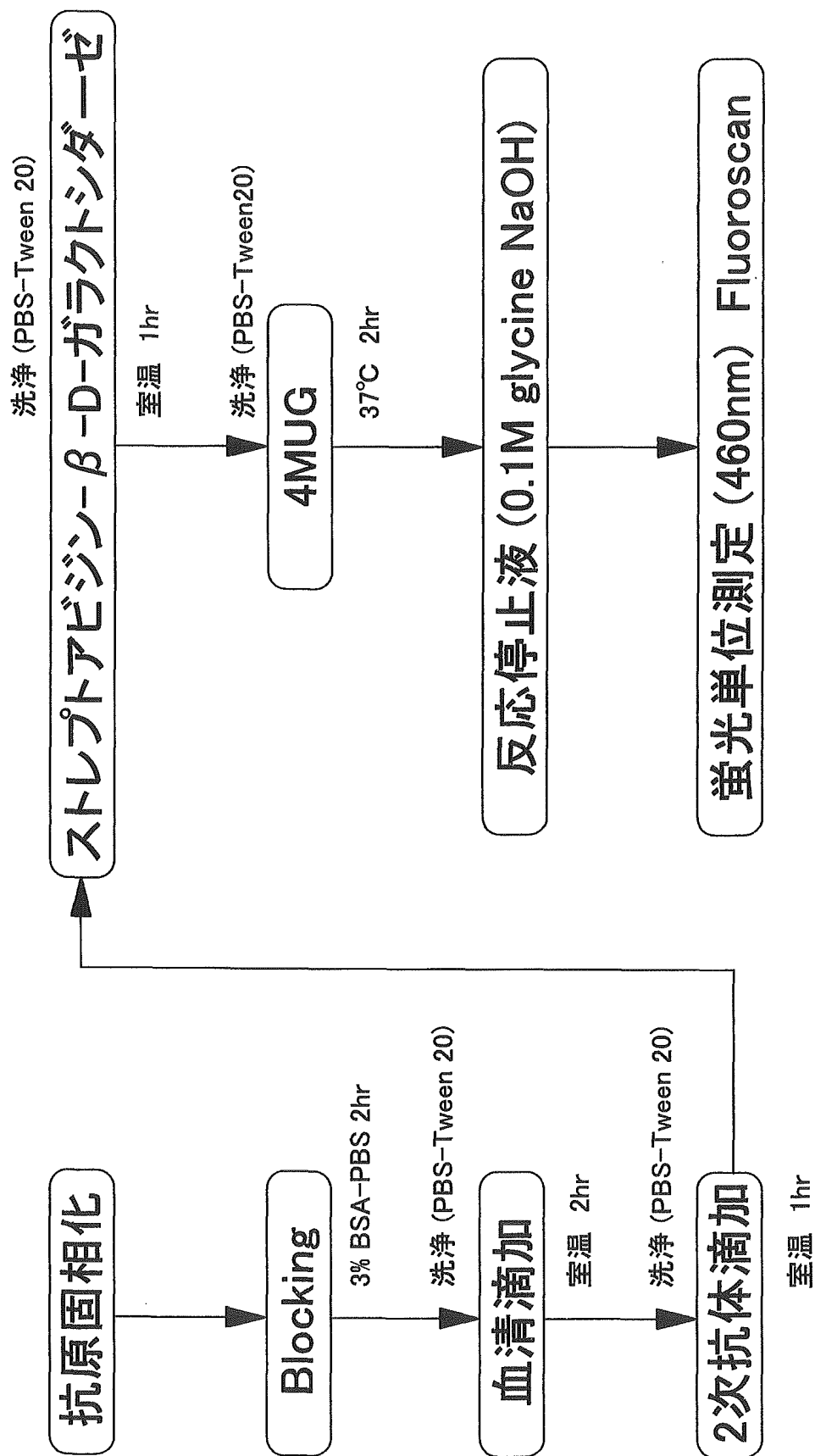


図2: 蛍光ELISA法の反応条件の設定

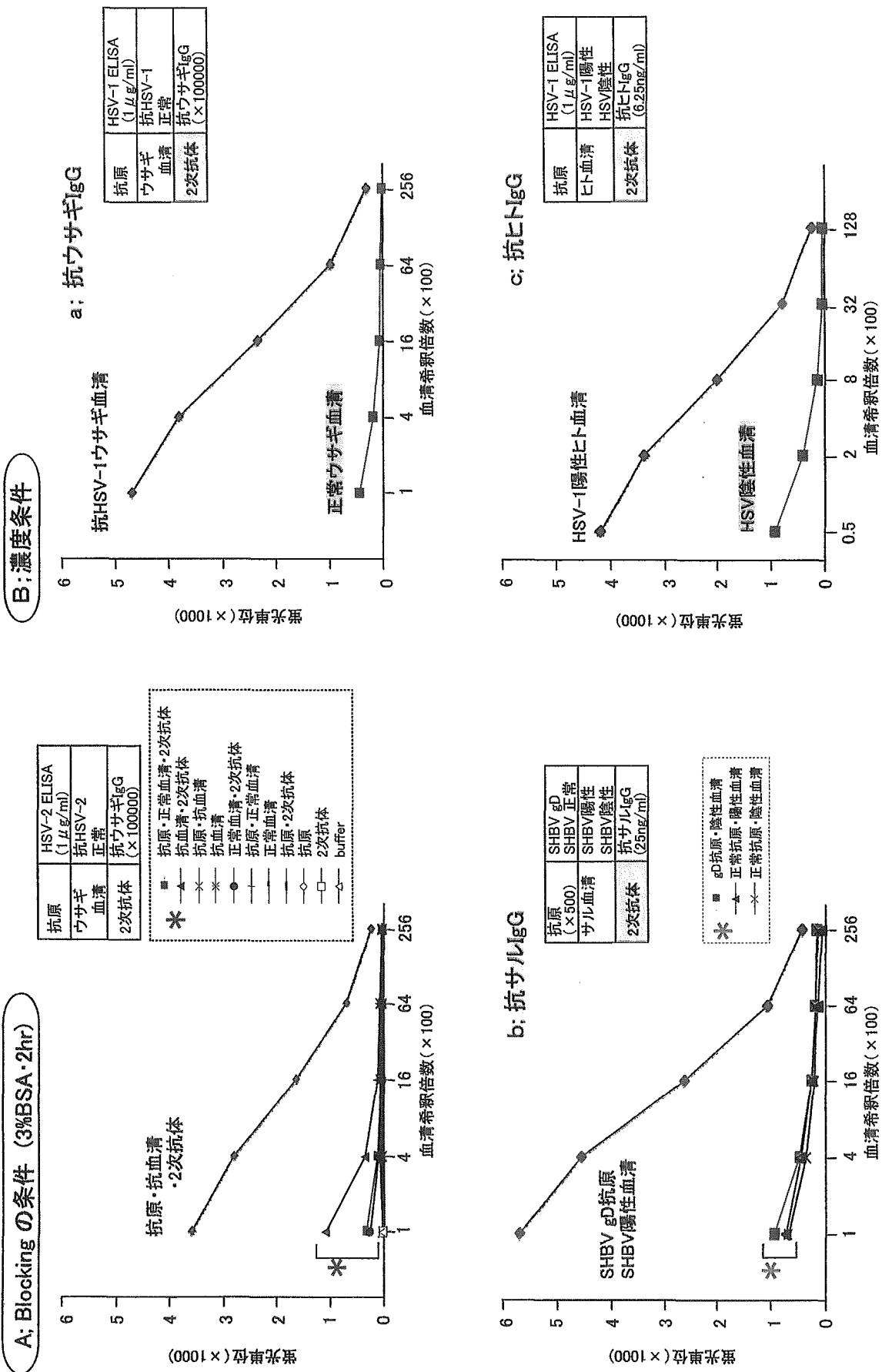
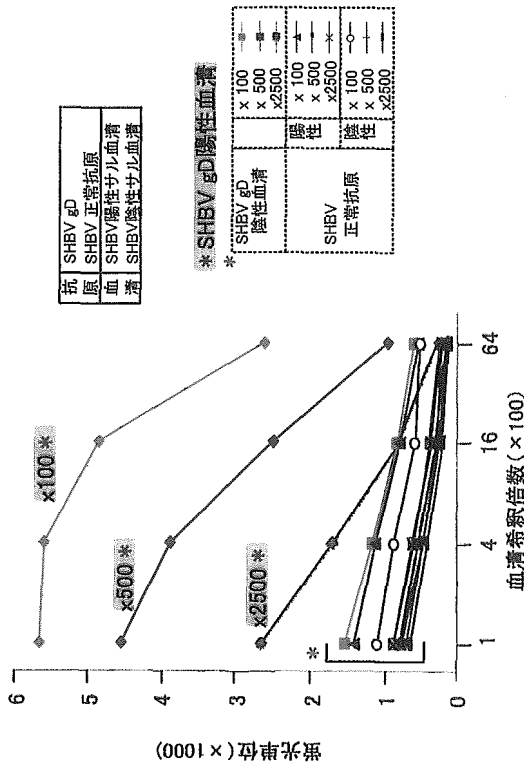
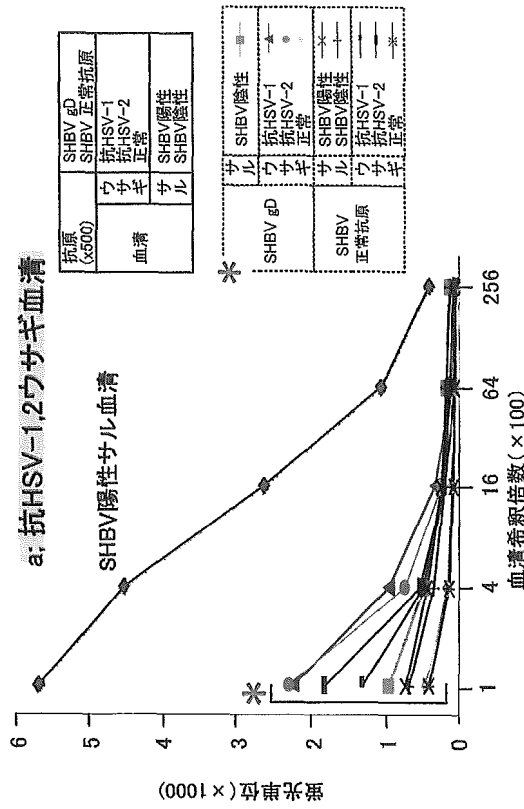


図3: 蛍光ELISA法におけるSHBVgD抗原の濃度条件と特異性

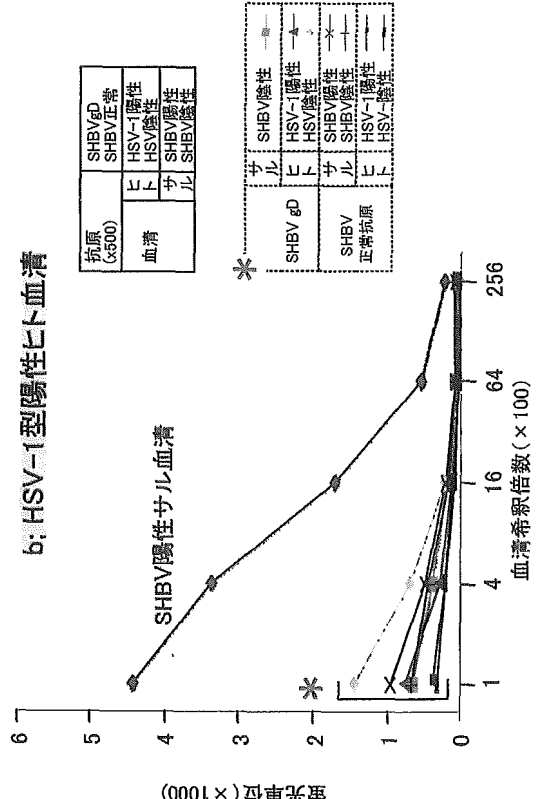
A: SHBV gD 抗原の濃度条件



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

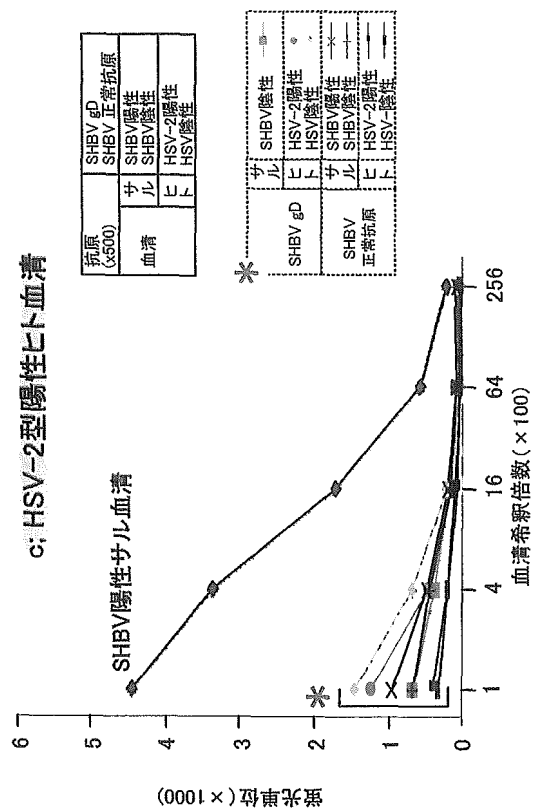
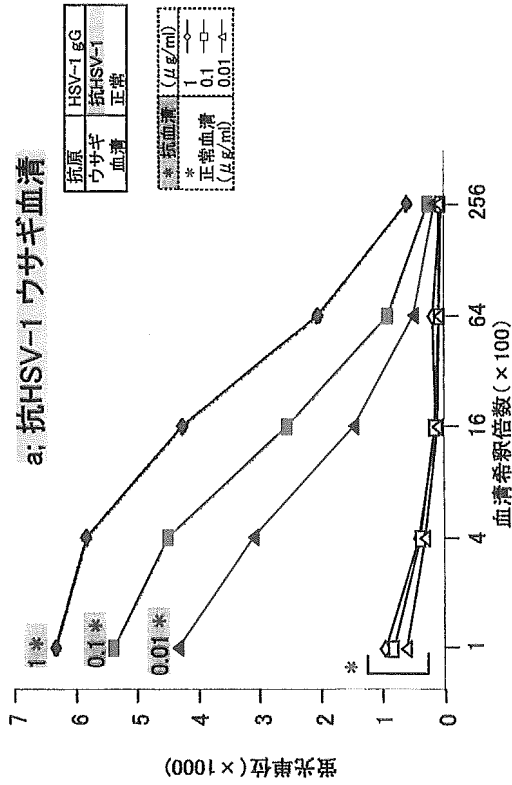
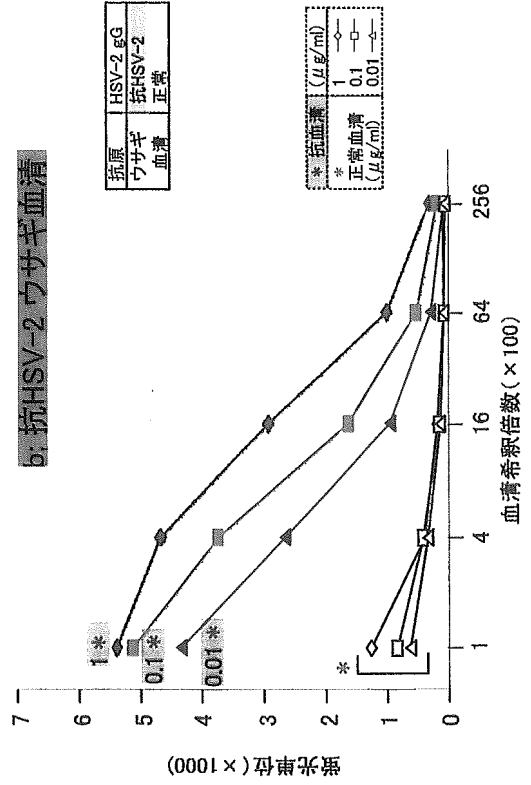


図4: 蛍光ELISA法におけるHSV抗原の濃度条件と特異性 (抗HSVウサギ血清)

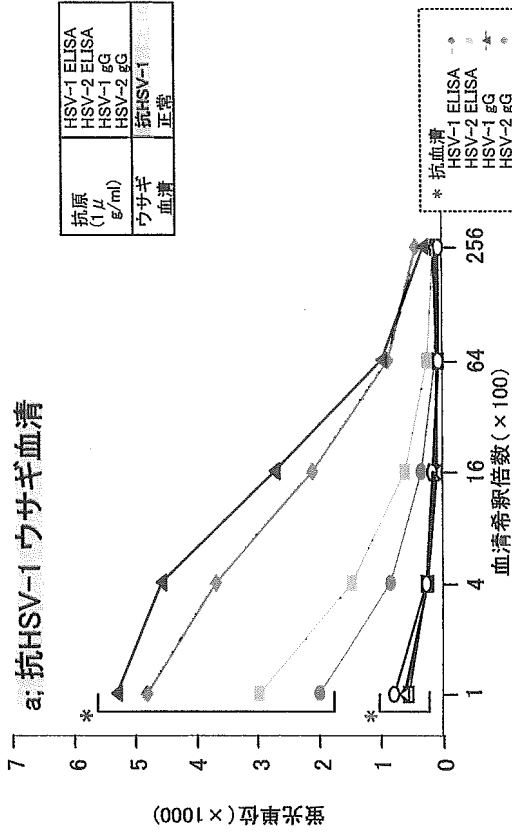
A: HSV-1,2 gG 抗原濃度条件



b. 抗HSV-2 ウサギ血清



B: HSV-1,2 gG 抗原の特異性



b. 抗HSV-2 ウサギ血清

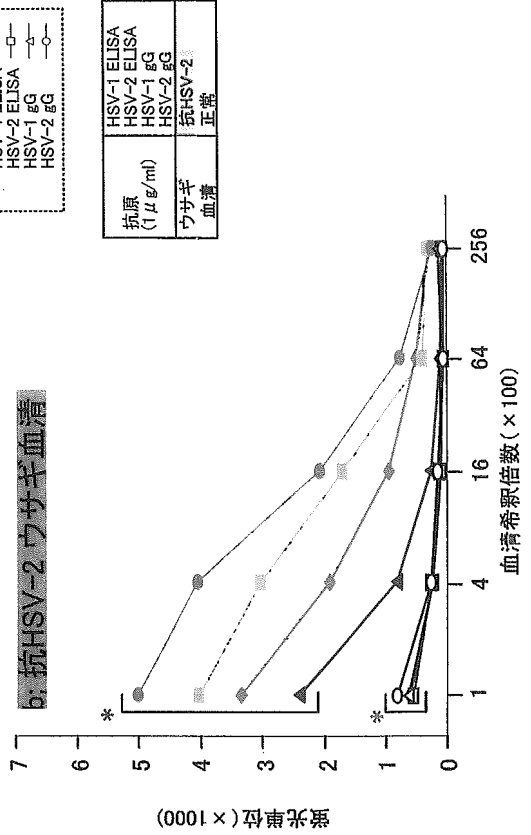
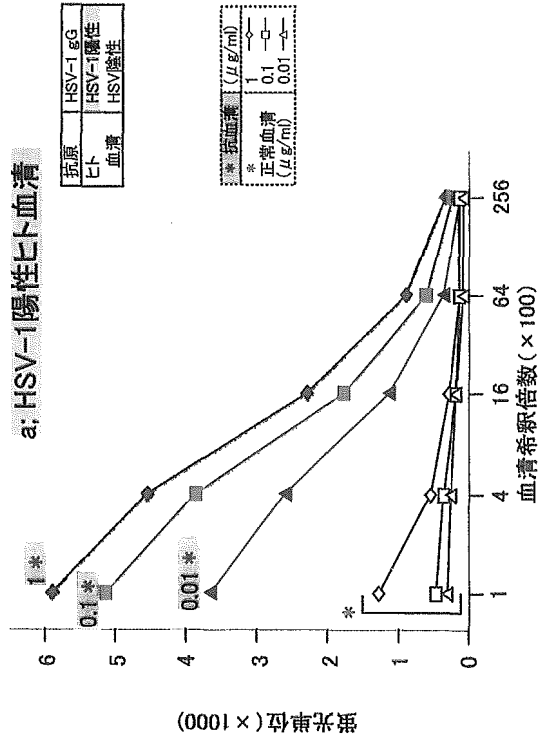
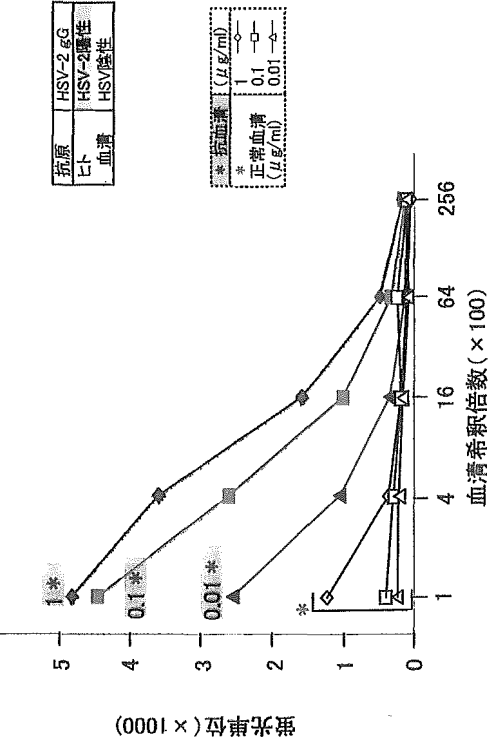


図5: 蛍光ELISAにおけるHSV抗原の濃度条件と特異性 (抗HSV陽性ヒト血清)

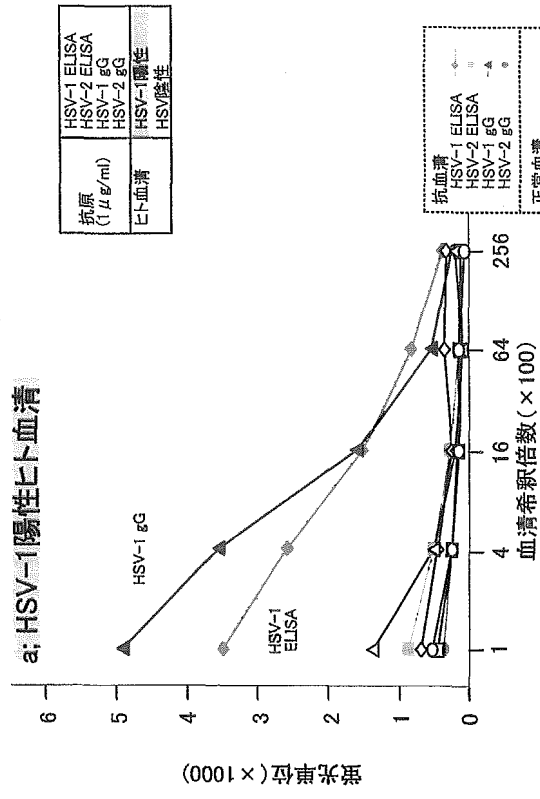
A: HSV-1,2 gG 抗原濃度条件



b: HSV-2陽性ヒト血清



B: HSV-1,2 抗原の特異性



b: HSV-2陽性ヒト血清

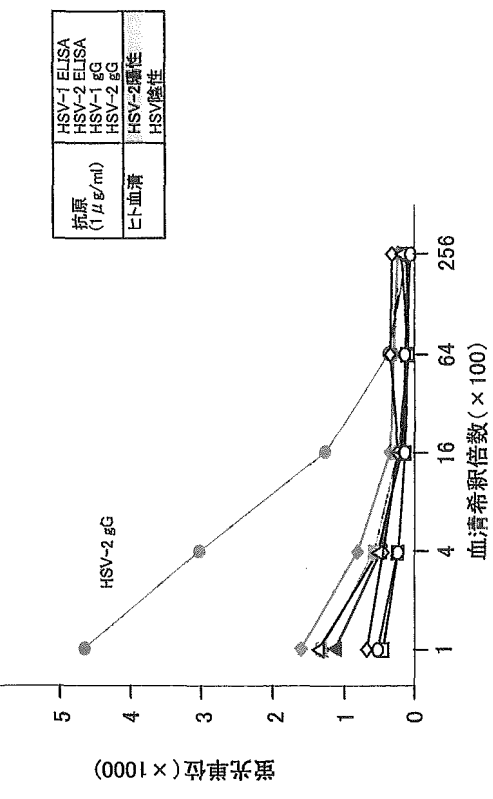


表1. アカゲザルにおけるSHBVおよびHSV抗体価の測定

No.	抗原		SHBV gD		HSV-1 gG		HSV-2 gG		HSV-1 ELISA		HSV-2 ELISA	
	ID	性	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	1308	F	+	2	-	<1	-	<1	+	2	-	<1
2	1333	M	卅	32	-	<1	-	<1	++	8	-	<1
3	1371	M	卅	32	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1
4	1373	M	++	8	-	<1	-	<1	++	8	-	<1
5	1379	F	卅	32	-	<1	-	<1	++	4	-	<1
6	1386	F	卅	32	-	<1	-	<1	卅	32	++	8
7	1401	M	卅	64	卅	16	-	<1	卅	32	++	8
8	1402	M	++	16	-	<1	-	<1	卅	16	++	4
9	1403	M	++	16	-	<1	-	<1	++	16	-	<1
10	1413	M	卅	32	-	<1	-	<1	卅	32	+	2
11	1416	F	++	16	-	<1	-	<1	卅	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 (×500)、HSV-1,2 gG (0.1 μg/ml)、HSV-1,2 ELISA (1 μg/ml)

サル症例

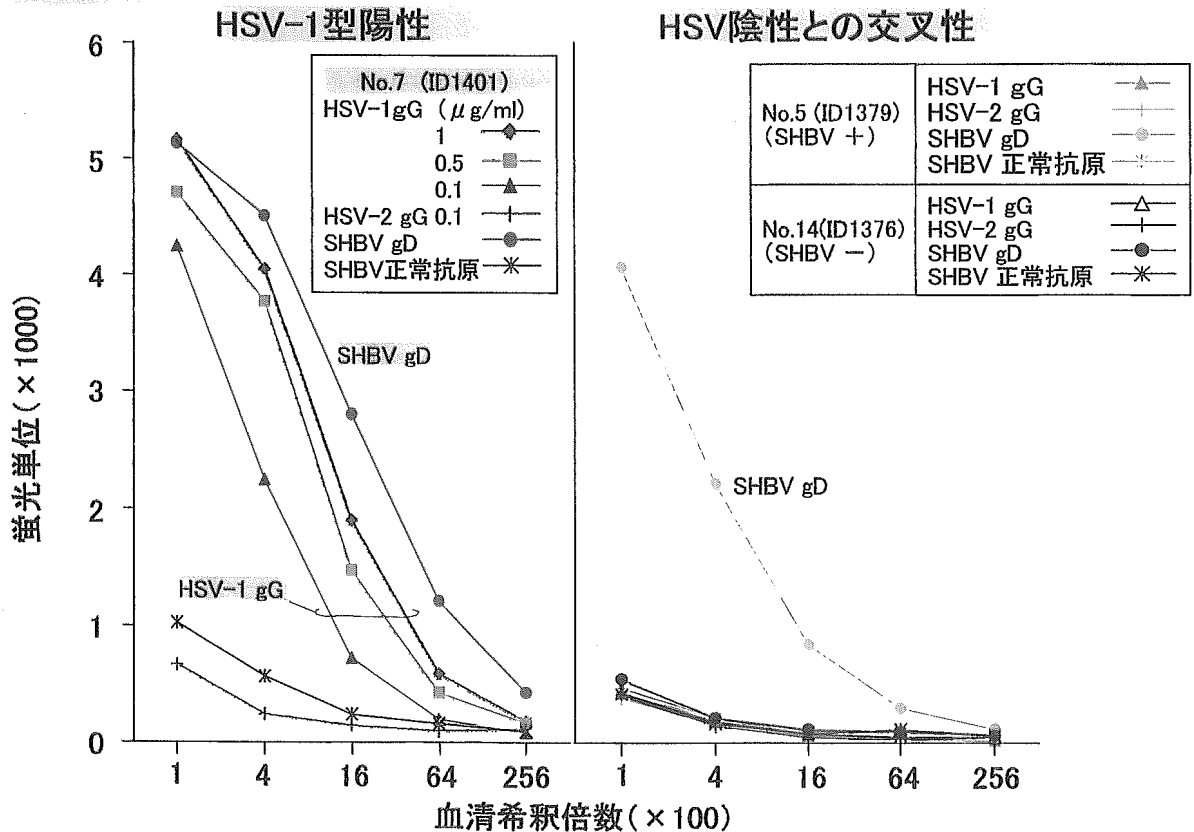
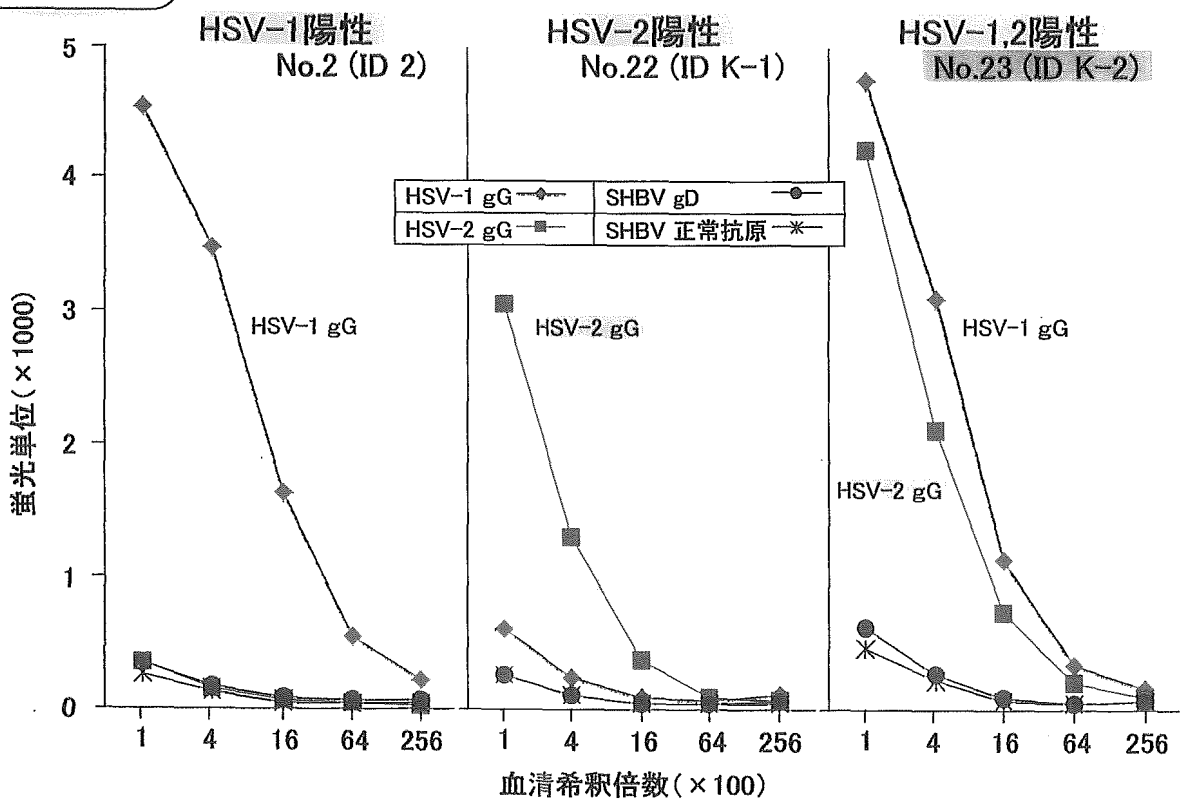


表2. ヒト血清検体におけるSHBVおよびHSV抗体価の測定

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	+++	8	+++	8	+	4	-	<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、Ni²⁺-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, 田代眞人(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, 田代眞人, 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

図 1. 単クローン抗体 2A7 (■) または 2H6 (●) を捕捉抗体とした Ag-capture ELISA のマールブルグウイルスの組換え核蛋白の検出感度.

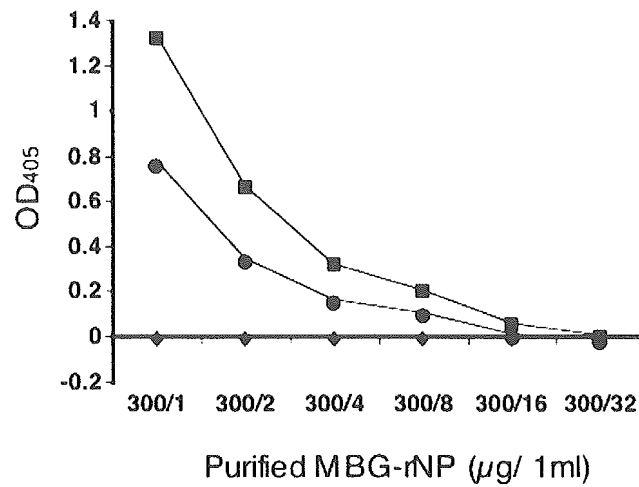


図 2. 単クローン抗体 2A7 のエピトープの決定 (パート 2). 線で表された部分蛋白上に示された番号は翻訳開始コドンからのアミノ酸番号である.

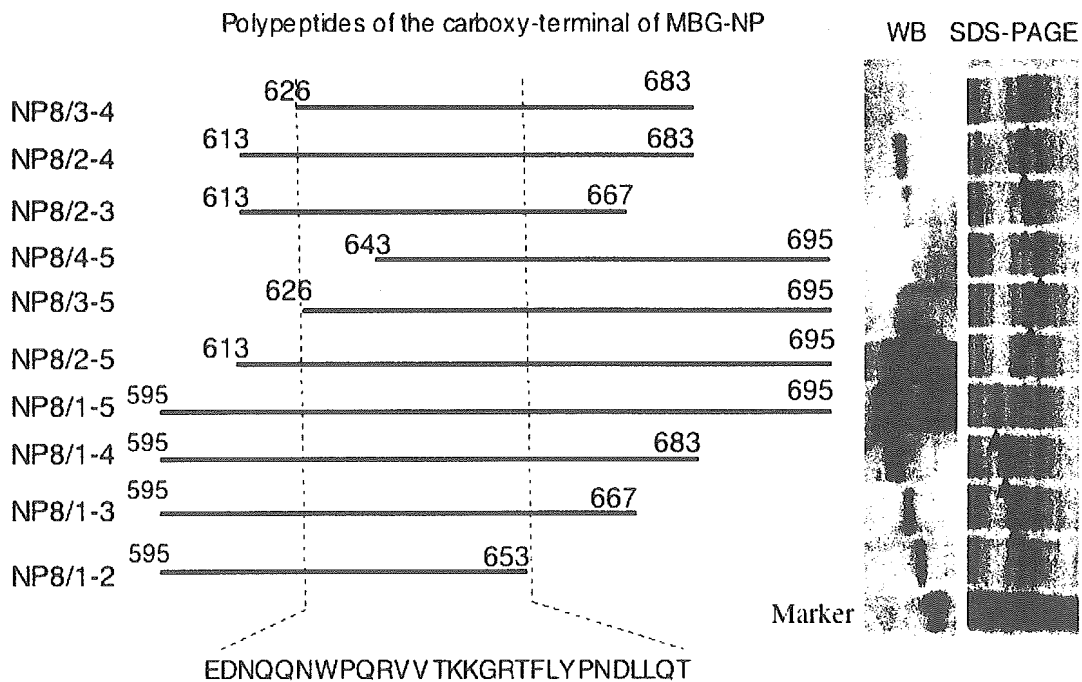


図 3. 単クローン抗体 2A7 のエピトープの決定 (パート 2). 線で表された部分蛋白上に示された番号は翻訳開始コドンからのアミノ酸番号である.

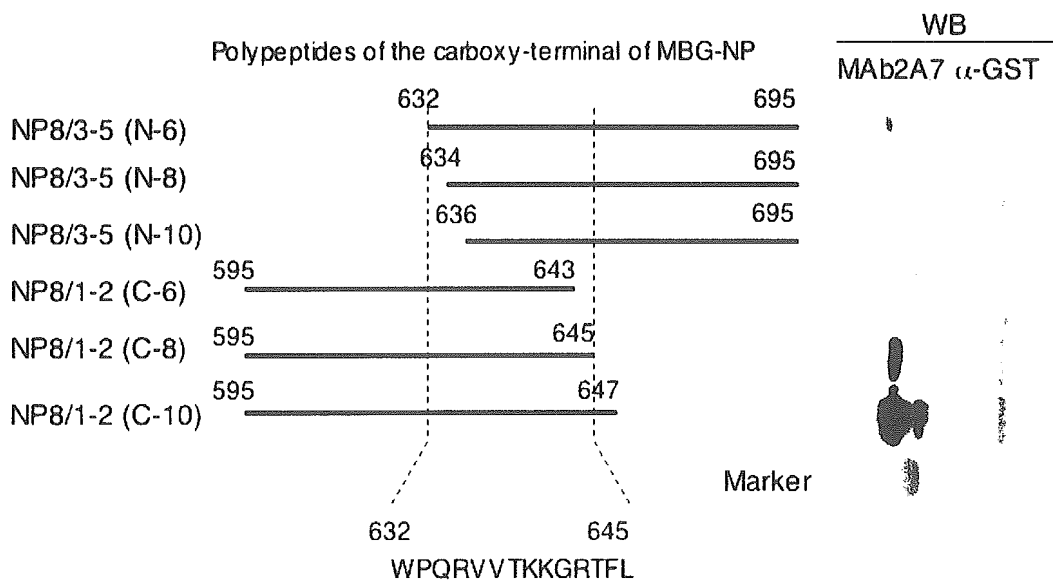


図 4. 単クローン抗体 2H6 のエピトープの決定. 線で表された部分蛋白上に示された番号は翻訳開始コドンからのアミノ酸番号である.

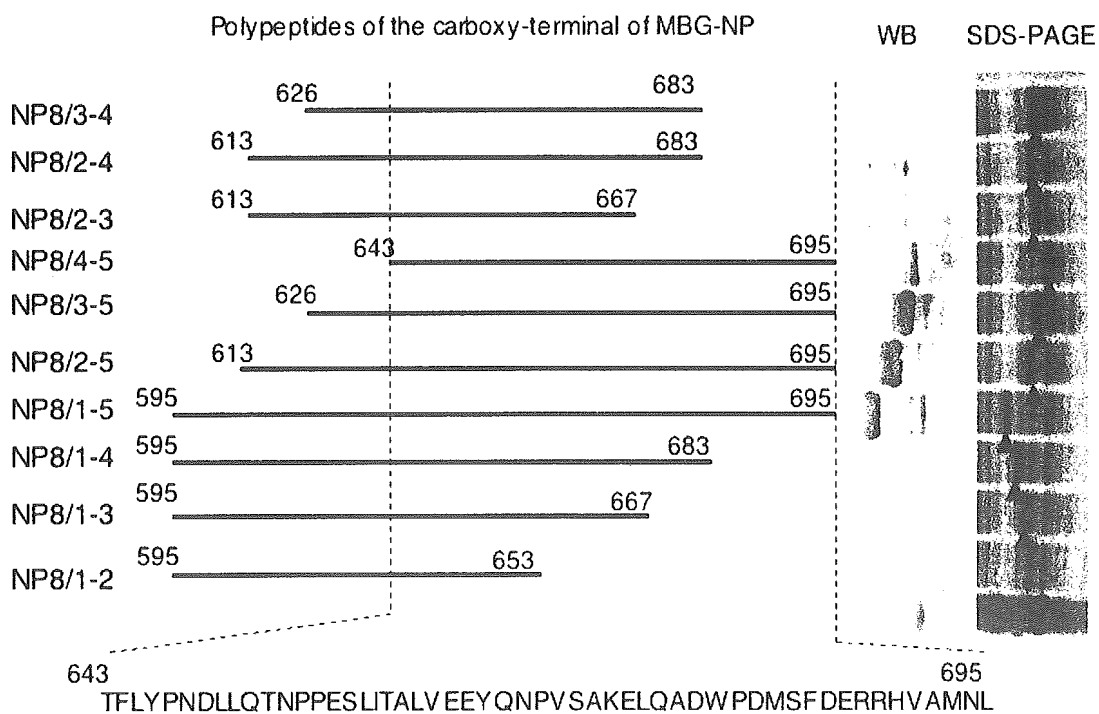


図 5. 間接蛍光抗体法における単クローン抗体 2A7 (A), 2H6 (B) およびウサギ抗マールブルグウィルス核蛋白抗体のマールブルグウィルス感染細胞との反応性. 対照として, 単クローン抗体 2A7 (D) と

2H6 (E) のマールブルグウイルス非感染 Vero 細胞との反応性を示した。

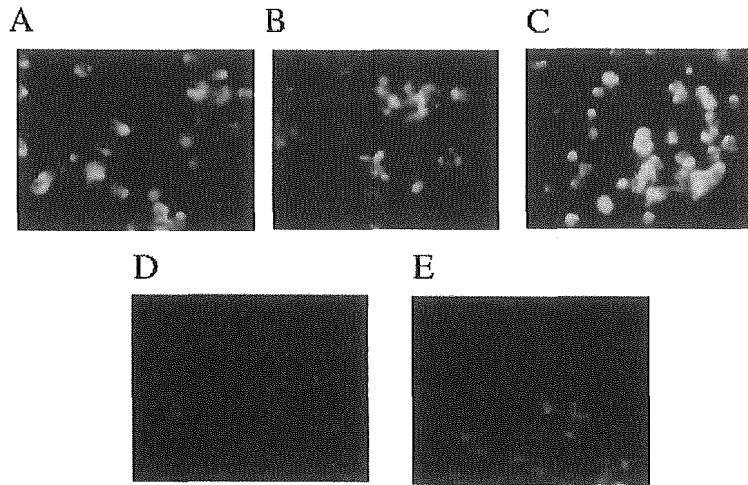
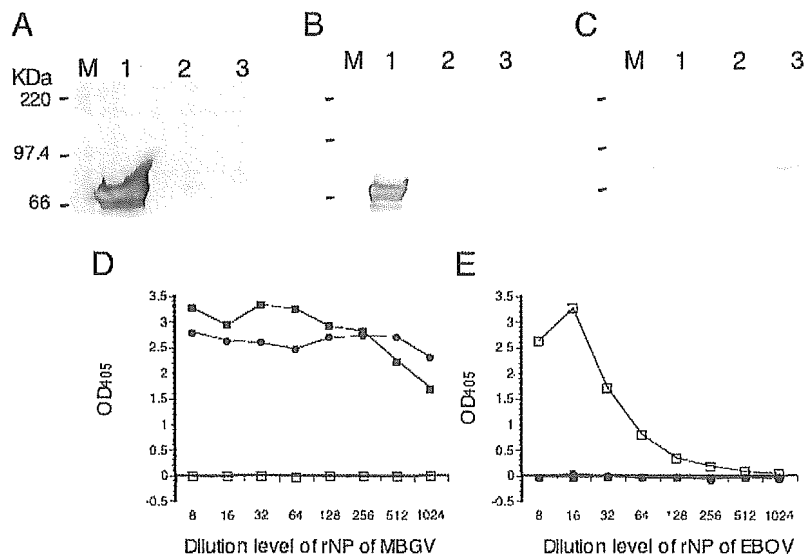


図 6. 単クローン抗体 2A7 (A), 2H6 (B), およびザイル型エボラウイルス核蛋白に対する単クローン抗体 3-3D (C) のマールブルグウイルス核蛋白とエボラウイルス核蛋白に対する Western blot 法における反応性と単クローン抗体 2A7 または 2H6 を捕捉抗体としたマールブルグウイルス核蛋白検出 ELISA によるマールブルグウイルス核蛋白とエボラウイルス核蛋白の検出 (D) および 3-3D を捕捉抗体としたエボラウイルス核蛋白検出 ELISA によるマールブルグウイルス核蛋白とエボラウイルス核蛋白の検出 (E). 尚, 図 A-C におけるレーン 1, 2, 3 は, それぞれマールブルグウイルス核蛋白, 対照, エボラウイルス核蛋白を示し, 図 D, E における ●, ■, および □, はそれぞれ 2A7 を捕捉抗体としたマールブルグウイルス核蛋白検出 ELISA, 2H6 を捕捉抗体としたマールブルグウイルス核蛋白検出 ELISA, 3-3D を捕捉抗体としたエボラウイルス核蛋白検出 ELISA を指す.



厚生労働科学研究費補助金

分担研究報告

翼手目由来のウイルス感染症の疫学的解明

分担研究者 吉川泰弘 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
協力研究者 大松勉 東京大学大学院農学生命科学研究科 大学院生
久和茂 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授
明石博臣 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
遠矢幸伸 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授

研究要旨

近年、翼手目由来もしくは翼手目の関与が疑われるウイルス感染症が世界的に問題となっている。それにも拘らず、これまで翼手目の分類・生態・免疫機能・感染病原体等を含めた統合的研究は行われていない。そこで翼手目に由来する感染症の疫学的解明のための基礎技術の開発および翼手目に関する基盤研究を進めた。

分子遺伝学および分子生物学的検索から翼手目は偶蹄目・奇蹄目・食肉目からなる群に近縁で、免疫応答に関連する蛋白の分子構造にもそれらの群と類似した特徴を持つことが明らかとなった。病理学的解析の結果から、リンパ組織における抗 IgG 抗体陽性 B 細胞の活性化が観察された。In vitro においては、日本の小型コウモリ由来 Yokose virus が肺由来初代培養細胞において CPE を示さないウイルス増殖が観察された。これらの結果は、翼手目が小動物を含めた産業動物全般のウイルスベクターとなりうることを示唆するものとする。

A. 研究目的

近年、ヒトが感染した場合に致命的となる、ラブドウイルスに属する狂犬病を含めたリッサウイルス、およびパラミキソウイルスに属するニパウイルスやヘンドラウイルスなど翼手目に由来するウイルス感染症が世界的に問題となっている。またメナングルウイルスなど、これら以外の病原体も翼手目から分離されており、翼手目がこれまで考えられていた以上に、病原体の宿主動物である可能性が指摘されている。

それにも拘らず、これまで翼手目を対象とした研究は、その超音波機能や生殖戦略、社会行動などに限られており、感染症という視点からの基盤的研究は世界的にも欠落していた。したがって、翼手目の系統分類・生態・免疫機

能・感染病原体等についての研究は極めて稀であり、またそれらの統合的評価も行われていない。そこで本研究では、翼手目に由来する感染症の疫学的解明を目的として、そのための基礎技術の開発および翼手目に関する統合的基盤研究を進めた。

B. 研究方法

(1) 翼手目の系統学的解析: 翼手目は大きく、小翼手亜目と大翼手亜目に分類されており、ルーセットオオコウモリは大翼手亜目に分類されている。しかし、ルーセットオオコウモリは、唯一小翼手亜目が行うエコロケーション機能を保持しており、大翼手亜目のなかでは特異な存在である。そこで、エジプトルーセットオオコウモリの肝臓凍結サンプルより抽出したミトコン

ドリア DNA (mtDNA) についてその全長塩基配列を決定し、データベースより得た、翼手目および他動物種の mtDNA のシーケンス・データとともに系統学的解析を行った。

また、食虫コウモリである小翼手亜目は眼球の神経投射が完全に交差しており、果食コウモリである大翼手亜目は眼球の神経投射は霊長目と同様、両側に投射している。前述したように大翼手亜目の中で唯一、小翼手亜目の特徴であるエコロケーションを行うルーセットオオコウモリについては、これまで眼球の神経投射に関しては報告がなされていない。そこで抱水クロラル麻酔下で網膜に WGA-hRP を注入し視神経から中脳上丘への神経投射を検索した。さらにエコロケーションを行う小翼手亜目では蝸牛と頭蓋骨が分かれているが、エコロケーションを行わない大翼手亜目では霊長目と同様に蝸牛は頭蓋骨に陥入している。しかし、ルーセットオオコウモリの蝸牛については詳細な記載がない。ルーセットオオコウモリの系統発生上の位置を明らかにするため、聴覚系構造についても検討した。

(2) IgG 抗原エピープの交差性から見た翼手目と他動物種の系統学的解析: これまでに行われている翼手目に関する感染病原体の疫学調査は、主としてウイルスに対する中和抗体法によるもので特異的な抗翼手目抗体を用いた広範な検索は行われていない。また、国内に生息する翼手目に関しても今後綿密な疫学調査を行う必要がある。

そのための第一段階としてルーセットオオコウモリ IgG に対する特異抗体を作成した。作成した抗オオコウモリ IgG 抗体が、広く小翼手亜目のコウモリ IgG にも反応し汎用性を持つか否かを検討した。またこの抗 IgG 抗体を用いて

IgG の抗原エピープの交差性から見た翼手目と他動物種との関係を競合性 ELISA 法により検索した。

(3) 翼手目免疫機構の特性解析: 免疫機能に関連する主要な因子として CD4、IFN- α ・ β の遺伝子について蛋白コード領域の全塩基配列を決定し、比較動物学的な検索を行った。また、免疫担当器官である脾臓・リンパ節等についての病理学的な検索を行うとともに、前述の、抗 IgG 抗体を用いてリンパ組織内の免疫グロブリン陽性細胞の分布を免疫組織化学 (IHC) 的手法で検索した。

(4) 翼手目由来初代培養細胞を用いたウイルス感受性の検索: 翼手目由来腎臓および肺の初代細胞培養系を確立した。これらの初代培養細胞を用いて、家畜伝染病の病原体を含む各種ウイルスに対する感受性について、ウイルスの増殖曲線、細胞変性効果 (CPE) の出現の有無、インターフェロン mRNA の発現などについて検索を進めた。

C. 研究結果

(1) 翼手目の系統学的解析: mtDNA の塩基配列を用いた解析の結果は、大翼手亜目が小翼手亜目と共に単系統をなしており、齧歯目や食虫目ではなく偶蹄目・奇蹄目・食肉目からなる群と近縁であるという説を支持するものであった。さらに翼手目内では、大翼手亜目は小翼手亜目のキクガシラコウモリ上科群と同一の祖先から分岐し、それがアフリカを起源として熱帯及び熱帯雨林に沿って東アジアへと広がったという新たな可能性が示唆された。この結果は翼手目の特性を明らかにし、比較動物学的な検索を行っていく上で重要である。