

200500678b

厚生労働科学研究費補助金

平成15 - 17年度

新興・再興感染症研究事業

節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及び

ワクチン開発に関する研究(H15 - 新興 - 17)

総合研究報告書

平成18年3月

主任研究者 高崎 智彦

(国立感染症研究所)

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究  
----- 1  
高崎智彦、倉根一郎

### II. 分担研究報告

1. クリミヤ・コンゴ出血熱の分子疫学とウイルス抗原検出による  
高感度診断法の開発 ----- 13  
西條政幸
2. 節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に  
関する研究 ----- 18  
森田公一
3. 2005年度輸入デングウイルス感染症の検査・診断に関する研究 ----- 22  
高崎智彦
4. 我が国における日本脳炎ウイルスサーベイランス ----- 27  
倉根一郎
5. デング血清診断における血清中IgAおよびIgM抗体検出法の確立と  
有用性の検討 ----- 31
6. 蚊類のアルボウイルス感受性ならびに媒介能 ----- 33  
江下優樹
7. 東北地方における疾病媒介蚊の分布域拡大に関する調査研究およびヤブカ寄  
生原虫 *Ascogregarina* spp. を用いた新しい防除法確立に関する基礎的研究  
----- 38  
小林睦生
8. 日本脳炎の疫学及びDNAワクチンの開発に関する研究 ----- 42  
小西英二
9. デングウイルスに対するモノクローナル抗体  
可変領域のアミノ酸配列の解析 ----- 43  
奴久妻聡一
10. 日本脳炎ウイルスに対する免疫の西ナイルウイルスに対する交差中和に関する  
研究、西ナイルウイルスおよび日本脳炎ウイルスDNAワクチンの作製と免疫  
原性・粘膜免疫法に関する研究 ----- 53  
只野昌之

1 1. 新規ワクチン開発を目指したウエストナイルウイルスのリバー ジェネティクス法の確立に関する研究 前田秋彦	55
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	57

節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学およびワクチン開発に関する研究

主任研究者 高崎智彦【平成 17 年度】（国立感染症研究所ウイルス第 1 部 室長）

倉根一郎【平成 15,16 年度】（国立感染症研究所ウイルス第 1 部 部長）

研究要旨：研究要旨：節足動物媒介性ウイルスは数十種がヒトに病気をおこし、新興・再興感染症として、また海外渡航者の増加している日本にとっては輸入感染症として、非常に重要な位置を占める感染症である。本研究は、節足動物媒介性ウイルス感染症を対象とした包括的な研究を行なうものである。本年度の研究では以下の成果が得られた。

（1）日本に侵入する可能性のある節足動物媒介性ウイルスに対する血清診断法と病原体診断法の確立：1）チクングニヤウイルスの病原体診断法、血清診断法の開発および確立を行った。2）クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの中国における分子疫学調査を行ない、核蛋白検出 ELISA 法および TaqMan PCR による高感度診断法を確立した。3）デングウイルス血清診断における IgM 抗体検出法の改良および IgA 抗体検出法の開発とその応用法を確立した。4）デングウイルス 1-4 型遺伝子検出用 TaqMan RT-PCR 法を開発し、技術移転を行い診断・サーベイランスに実用化した。また、新しいデングウイルス遺伝子診断法として RT-LAMP 法を確立した。5）海外からの帰国者に関してデングウイルス感染に対する血清・病原体・遺伝子診断を実施し、多数のデングウイルス感染患者（死亡例 1 例）の存在を明らかにした。6）ウエストナイルウイルス遺伝子検出用 TaqMan RT-PCR 法を確立し、標準化および技術移転した。7）新しいウエストナイルウイルス遺伝子診断法として RT-LAMP 法を開発し、感度および特異性を明らかにした。

（2）媒介節足動物とウイルスの浸淫状況を把握するための技術開発と現状の把握：1）現在日本においてブタの間で流行している日本脳炎ウイルスの遺伝子解析および病原性を解明した。また、無菌性髄膜炎症例の髄液中の日本脳炎ウイルス遺伝子を検出した。さらに日本における近年の日本脳炎自然感染率は 0.2%—3.4%と推定された。2）日本産アカイエカおよびイナトミシオカがウエストナイルウイルスに対して感受性があることを示した。3）東北地方におけるデング熱媒介蚊の分布域拡大状況を明らかにした。4）東北地方（秋田県）における日本脳炎ウイルス媒介蚊（コガタアカイエカ）の分布状況を明らかにした。5）デング熱媒介蚊（ネッタイシマカとヒトスジシマカ）の寄生原虫である *Ascogregarina* spp. に関して生物的防除に利用する可能性を示した。6）大分県のコウモリから分離されたフラビウイルス（Yokose ウイルス）の全遺伝子配列を決定した。

（3）節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチンの開発に向けての基礎的研究：1）デング 4 価ワクチンがマウスにおいて高いレベルの型交差性中和抗体を誘導すること、タ

ンパクワクチンとデング4価DNAワクチンの混合投与によりマウスに高い中和抗体を誘導することを明らかにした。2) ウエストナイルウイルスのリバースジェネティックス法を確立し、中空ウイルス粒子・自己増殖性レプリコンの作製に成功した。3) 無血清培養 Vero E6 でのウエストナイルウイルスの増殖を可能にした。4) E型肝炎ウイルスの中空粒子内にウエストナイルウイルス (WNV) の prM およびE蛋白質を発現したDNAワクチンをパッケージングすることに成功し、WNVの経口DNAワクチンの可能性を示した。5) デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列を解析し、相補性決定領域 (CDR) のアミノ酸配列が中和活性を規定していることを示した。6) デングウイルスは通常マウスに感染しないがマウスの未熟な樹状細胞に感染し、ウイルスが増殖することを示した。

(4) ウエストナイルウイルスに関する啓発活動：ウエストナイル熱、ウエストナイルウイルス、媒介蚊とその対策などに関する一般向け啓発 CD-R (パンフレット解説書を含む) およびビデオの日本語版を医療関係者、各地の諸団体に配布し、ウエストナイル熱に関する理解を深めることに貢献した (CD-R は本報告書裏表紙に添付)。

#### A. 研究目的

分担研究者：

倉根一郎 (国立感染症研究所ウイルス第1部 部長)

小林陸生 (国立感染症研究所昆虫医科学部 部長)

小西英二 (神戸大学医学部医療基礎学講座 助教授)

奴久妻聡一 (神戸市環境保健研究所微生物部 副部長)

江下優樹 (大分大学医学部感染分子病態制御講座 助教授)

只野昌之 (琉球大学医学部ウイルス学講座 助教授)

名和 優 (埼玉医科大学微生物学講座 講師)

森田公一 (長崎大学熱帯医学研究所分子構造解析分野 教授)

西條政幸 (国立感染症研究所ウイルス第一部 主任研究官)

前田秋彦 (北海道大学大学院獣医学研究科 助教授)

森川 茂 (国立感染症研究所ウイルス第1部 室長)

山岡正與 (兵庫県立健康環境科学研究所 センター 研究主幹)

#### A. 研究目的

現在、日本国内で感染しうる節足動物媒介性ウイルスは日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性ウイルスのみである。しかし、世界的にみれば節足動物媒介性ウイルスは数十種のウイルスが人に感染し病気を起こすことが知られており、デングウイルスや黄熱ウイルスのように海外において毎年多数の感染者が発生し、さらに致死的であるものも多い。近年、海外旅行者の増加に伴い、デング熱等に見られるように海外旅行中に感染し帰国後発病する例もあり、診断されずに見逃されている例がかなりの数におよんで

いると考えられる。一方 1999 年よりアメリカで流行しているウエストナイル熱のように過去国内に存在しない節足動物媒介性ウイルスが侵入する可能性も常に存在する。従って厚生労働行政においては、輸入感染症として起こりうる多種の節足動物媒介性ウイルスに対しての診断法を確立しておくこと、さらに、これらのウイルス感染症の日本国内における状況を血清、病原体、ベクターの面から把握することが重要である。ワクチンに関しては日本脳炎、ダニ媒介性脳炎、黄熱に対してのワクチンは実用化されているが、現行ワクチンにはない特徴をもつ新型ワクチン開発の意義は大きい。一方、それ以外の節足動物媒介性ウイルスに対しては実用化されているワクチンがなく、その開発も重要である。以上のことから、本研究は以下の 4 つの目的を有する。(1) 日本に侵入する可能性のある節足動物媒介性ウイルスに対する血清診断と病原体遺伝子診断法を確立し、輸入例や国内発生例に備える。(2) 節足動物媒介性ウイルスの国内状況を血清・病原体及びベクターの面から把握する。(3) 節足動物媒介性ウイルスに対する新ワクチンの開発に関する技術的基盤を確立する。(4) 検査マニュアル等を作成し、確立した診断技術を検疫所や地方衛生研究所等へ移転する。また、ビデオ、CD-ROM、パンフレットなどの手段を用いて広く一般市民への啓発を図る。

## B. 研究方法

(1) 節足動物媒介性ウイルスに対する血清・病原体・遺伝子診断法の確立と疫学調査。

1) クリミア・コンゴ出血熱の核蛋白検出

ELISA 法および TaqMan PCR 法による高感度診断法の開発：Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) ウイルスの組換え核蛋白を抗原とし、さらに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、その CCHF の診断における有用性を急性期の CCHF 患者から得られた血清を用いて評価した。また、病原体診断法としてクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの S-遺伝子の塩基配列に基づいて、TaqMan PCR 法のためのプライマーおよびプローブを設計し、高感度にクリミア・コンゴ出血熱ウイルス遺伝子を定量的に測定するための TaqMan PCR システムを開発した。

2) 輸入デングウイルス感染症の検査・診断：本感染症に対する検査・診断を成田空港検疫所と国立感染症研究所で行い、厚生行政に資することを目的とした。リアルタイム RT-PCR、ウイルス分離、IgM-捕捉 ELISA および IgG-ELISA により IgM および IgG 抗体を測定した。

3) デング血清診断における血清中 IgA 抗体および IgM 抗体検出と有用性の検討：IgA 抗体捕捉酵素免疫吸着測定法 (IgA-ELISA) を用いたデング血清診断の有用性を検討する目的で、すでに確立されている IgM 抗体捕捉酵素免疫吸着測定法 (IgM-ELISA) との間で、デング流行地へ旅行し、帰国後にデングウイルス感染を疑われた日本人 48 症例、86 血清検体を用いた検出感度、特異性等につき比較観察した。

4) チクングニヤ熱の血清診断法の開発：IgM-capture ELISA 法および IgG-indirect ELISA 法を用いた。抗チクングニヤウイル

ス (CHIK) 抗体および類症鑑別のため抗  
デングウイルス (DEN) 抗体について東南  
アジアおよび太平洋州の 5 カ国で採集され  
た有熱患者からの血清 305 検体 (IgG につ  
いては 422 検体) を測定した。

5) 我が国における日本脳炎ウイルスサー  
ベイランス: ①日本脳炎ウイルス IgM 抗体  
が陽性となった時点より、1 週ないし 2 週  
前のブタ血清をウイルス分離材料として用  
いた。分離は株化細胞、一部乳のみマウス  
脳内接種法による分離法を行なった。E 領  
域に設定したプライマーペアおよび 3'  
NCR 領域に設定したプライマーペアを  
用いて RT-PCR 法により遺伝子を増幅し、  
両領域の遺伝子解析を実施した。

6) 我が国の日本脳炎自然感染率の解析:  
日本脳炎の自然感染率は、国立感染症研究  
所血清バンクより分与された血清を用いて、  
JEV の NS1 に対する抗体を検出すること  
により推定した。この血清は、福岡、宮崎、  
愛知、長野、山梨、福島、山形及び秋田県  
の住民から 2001 年に採取されたものであ  
る。

7) ウエストナイルウイルスサーベイラン  
ス: IgM 捕捉 ELISA 法および RT-PCR 法  
で実施した。またリアルタイム  
RT-PCR (TaqMan 法) の技術・感度の標準化  
のため合成 RNA を作製した。

8) LAMP 法を用いたデングウイルス、ウ  
エストナイルウイルス迅速診断法の開発:  
RT-LAMP 増幅は独自にデザインしたプ  
ライマーを用いて栄研化学社の Loopamp  
DNA amplification キットを用い、25  $\mu$  l  
の反応系で 63°C、60 分反応させ、反応産物  
をアガロース電気泳動と Loopamp  
real-time Turbidimeter (LA-200, Teramecs,

Japan) を用いて反応産物濁度を測定する方  
法で実施した。反応系の組成条件は FIP と  
BIP プライマー (50 pmol)、F3 と B3 プ  
ライマー (5 pmol)、F と loop B プライ  
マー (25 pmol) 1400  $\mu$ M 各 dNTP, 0.6 M  
betaine (Sigma, USA), 40 mM Tris-HCl  
(pH 8.8), 20 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
8mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100, 0.125 U  
of AMV-RT (Invitrogen, USA), 8 U *Bst*  
DNA polymerase large fragment (New  
England Biolabs) でありここに、ウイルス  
RNA を混合する方法で行った。

9) 一般向け WNV に関する啓発ビデオ (日  
本語版) の作製とホームページの充実: CDC  
のビデオ CD には、英文脚本があるため、そ  
れを研究協力者により和訳し、映像部分の  
流れに沿って日本語脚本を作成した。この  
ビデオは、成田空港・関西新空港などで放  
映され、旅行者への啓発・情報提供を実施  
した。また、厚生労働省健康局結核感染症  
課を通じて各都道府県・政令市・特別区  
の衛生主管部に CD を配布し、公衆衛生部局担  
当者、医療従事者、動物等取扱業者、一般  
の方等へのウエストナイル熱の普及啓発へ  
の活用を促した。また、日本医師会感染症  
危機管理対策室長にも送付し、活用をお願  
いした。

(2) 媒介節足動物とウイルスの侵淫状  
況を把握するための技術開発と現状の把握。

1) 東北地方におけるデング熱媒介蚊の分  
布域拡大に関する要因解析およびヤブカ寄  
生原虫 *Ascogregarina* spp. に関する基礎的  
研究: ①東北地方でのヤブカの分布調査:  
東北地方でのヤブカの分布調査においては、  
各都市の神社、寺院、公園、古タイヤ集積  
場等の墓石、手水鉢、花立て、プラスチック

ク容器等の人工容器から幼虫を採取し、飼育後種の同定を行った。また、分布規定要因の解析としてメッシュ気候図、人口密度等の情報を GIS の手法で解析する。②ヤブカ寄生原虫 *Ascogregarina* に関する基礎的研究：ネッタイシマカ由来の *Ascogregarina culicis*、ヒトスジシマカ由来の *As. taiwanensis* 原虫オーシストを幼虫に大量に感染させ、蛹を飼育した水からオーシストを回収した。今年、ヤマトヤブカの rDNA の配列を検討し、また、新たにオオクロヤブカおよびトウゴウヤブカから検出された *Ascogregarina* 原虫の系統を保存するために感染実験を繰り返し、オオシストの増殖を試みた。

2) 蚊のウエストナイルウイルス媒介試験に用いるマウスの有用性、およびアカイエカ・イナトミシオカの本ウイルス感受性：①マウスを用いた蚊のウエストナイルウイルス媒介試験の有用性：マウスの有用性を調べるために、ウエストナイルウイルスに感染したアカイエカにマウス吸血の機会を与えて、マウス臓器内のウイルスゲノムの有無を RT-PCR 法で検討した。②イナトミシオカに対するウエストナイルウイルスの感受性試験：感染実験に用いたイナトミシオカは、大阪港湾区域で採集後、実験室内で2世代飼育した個体群を用いた。経口および胸部接種感染後、3組のウエストナイルウイルスプライマーセットの比較および、感染蚊の腹、胸、脚、頭部組織から精製した総 RNA 中のウイルスゲノムの有無を検討した。

3) Yokose ウイルス (YKSV) の遺伝子解析：Yokose ウイルスの RNA を回収して cDNA 合成時の鋳型として用い、フラビウ

イルス間で比較的保存性の高い2領域 (E 領域の1部、NS3 領域の1部) を RT-PCR により増幅後、遺伝子配列を決定し、この配列をもとに5および3 RACE 法により全遺伝子配列を決定した。

(3) 節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチン開発に関する基礎的研究

1) サルにおけるデングウイルス感染増強抗体の解析：カニクイザル各2頭にデングウイルス1型 (デング熱分離株) および2型 (デング出血熱分離株) を、さらに1頭は非感染細胞上清を接種した。感染後、血清を経時的に採取し、ウイルス血症の推移、臨床症状、血小板減少の有無を調べた。さらに血清型特異的中和価、IgM 抗体価、感染増強抗体の推移を検討した。

2) デング4価 DNA ワクチンとタンパクワクチンの混合投与による高力価中和抗体の誘導 (マウスにおける評価)：1型から4型に対する DNA ワクチンの混合液 (各 25  $\mu$ g、計 100  $\mu$ g/匹) を4週齢の BALB/c マウスに3週間隔で2回免疫した。対照として各型に対する単価 DNA ワクチン投与群及び pcDNA3 投与群を設けた。接種は、大腿部に針無注射器 (シマジエット、島津製作所) を用いて行った。採血は、眼窩静脈叢から行い、ELISA 抗体値を個々の血清で、中和抗体価をプール血清で測定した。2次免疫応答を調べるための感染性ウイルスの接種は、 $10^7$  FFU を腹腔内に行った。このデータを基に1型から4型に対する DNA ワクチンの混合液 (各 25  $\mu$ g、計 100  $\mu$ g/匹) および 150ng の EP ワクチンを混合し、4週齢の BALB/c マウスに3週間隔で2回免疫した。接種は、大腿部に針無注射器 (シマジエット、島津製作所) を用いて行った。



単独投与同様に抗体誘導能等を評価した。

3) デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列の解析：デングウイルス免疫マウスをモデルとして、RT-PCR 法にて抗体の抗原認識部位を含む重鎖可変領域を増幅させ、PCR 産物を TA クローニング後、塩基配列を決定しアミノ酸を推定した。

4) ウエストナイルウイルスのリバースジェネティクス法の確立：ウエストナイルウイルス (WNV) のリバースジェネティクスを確立するために、WNV のゲノム RNA より、ウイルスの複製に関与しない構造蛋白質の遺伝子を取り除いた残りの部分の cDNA を合成し、これを WNV のレプリコンとして利用することを試みた。レプリコンの作製は、ウイルス cDNA をプラスミド (pUC19) に組み込んだ。このプラスミドを *In vitro* 転写により WNV レプリコン RNA を合成し、哺乳動物細胞に導入した。

6) E 型肝炎ウイルスのウイルス様中空粒子を用いたウエストナイルウイルスに対する経口 DNA ワクチンの開発：精製した HEV-VLPs を VLP 溶解緩衝液 (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 20mM DTT) で室温、30 分間インキュベートし、VLPs を構成蛋白に開裂させた。次に、目的の WNV DNA ワクチンを加えた後に、CaCl<sub>2</sub> 溶液を滴加して Ca イオン濃度を 5mM まで引き上げ、DNA ワクチンを封入した VLPs を再構築した。

7) マウス樹状細胞におけるデングウイルス感染機構の解析：5.6 週令の BALB/c 及び C57BL/6 マウスの骨髄と脾臓から樹状細胞を分離し、GM-CSF (20ng/ml) 添加 10%FCS RPMI メディウム (20 GM-CSF

Medium) を用いて培養した。3 日後、20 GM-CSF Medium を加え更に 3 日間培養した。培養 6 日後、抗 CD11c magnetic beads (MACS) を用いて、ポジティブセレクション法で CD11c 陽性 (CD11c+) 細胞を単離した。CD11c+細胞は、抗マウス CD11c ハムスター抗体と FITC 標識抗ハムスターウサギ抗体を用いてフローサイトメーターで CD11c+細胞が、90%以上であることを確認した。これらの細胞に Dengue virus type 2 (Den V 2; ニューギニア C 株) を感染させ 3 日後または 7 日後に細胞および上清中のウイルスを間接蛍光抗体および RT-PCR 法により確認した。

(倫理面への配慮) ヒト検体を用いる研究は各研究機関の審査を受け倫理委員会の承認を得た後行われた。動物実験は各研究施設の動物実験委員会による審査を受け承認を得た後行なわれた。また、蚊の飼育および媒介実験は各研究施設の動物実験委員会による審査を受け承認を得た後行なわれた。

## C. 研究結果

(1) 節足動物媒介性ウイルスに対する血清・病原体・遺伝子診断法の確立と疫学調査。

1) ①クリミア・コンゴ出血熱の核蛋白検出 ELISA 法：CCHF ウイルス核蛋白に対する単クローン抗体 1B7 を用いた Ag-capture ELISA を作製した。中国西部の CCHF 患者 20 名 (2001 年 8 人, 2002 年 12 人) から血清が採取され研究に供された。血清 20 検体中 9 検体からウイルスゲノムが RT-PCR による増幅された。そのうち 3 検体が Ag-capture ELISA で陽性を示した。Ag-capture ELISA

で陽性を呈したのは、すべて IgG 抗体、IgM 抗体ともに陰性の検体であった。②クリミア・コンゴ出血熱の TaqMan PCR 法による高感度診断法の開発：TaqMan PCR と nested RT-PCR はほぼ同等の感度を有していた。TaqMan PCR 法では、高感度に、定量的に、しかも、より迅速にクリミア・コンゴ出血熱患者血清中のクリミア・コンゴ出血熱ウイルス遺伝子を増幅し検出することが可能であった。

## 2) 輸入デング感染症の状況：

### 1) 成田空港検疫所での検査成績

熱帯地域から成田空港に帰国した時に不明熱があり、デング感染症検査を実施した総数は 115 症例 (2003 年)、128 症例 (2004 年)、109 症例 (2005 年) であった。これらの検体を特異遺伝子および IgM 抗体の検出により検査・診断した結果、3 年間で合わせて 32 症例でデングウイルス遺伝子陽性であった。

### 2) 国内医療機関からの依頼検査成績

国内医療機関からのデングウイルス感染に関する検査依頼件数は、2003 年は 34 件、2004 年は 54 件、2005 年は 71 件であった。このうち、デングウイルス感染が確認された症例は、2003 年は 23 例、2004 年は 20 例、2005 年は 43 例であった。2003 年は、インドネシア (5 例)、タイ (6 例)、インド (3 例) などの東南アジア以外にフィジー (2 例)、ニューカレドニア (1 例)、セイシェル (1 例) など島国からの帰国者が目立った。2004 年の特記すべきことは、8 月に発生したミクロネシア連邦のヤップ島における日本人旅行者の集団感染事例 (7 名) であり、その後も 9 月、10 月とヤップ島からの輸入症例が続いて発生した。我々の分離

したヤップ島の流行株はデングウイルス 1 型であり、このウイルスの 3' NCR 領域の Variable 部位に遺伝子欠損があることが判明した。これは、デングウイルス 1 型に関しては、初めての株であった。2005 年に関しては、日本人が、現地で出血熱に陥り日本に帰国入院後、死亡した症例があった。また、インドネシアスマトラ島沖地震による津波災害に関連して、我々は 3 月に再び発生したスマトラ島近海のニアス島地震の被災地 (ニアス島) で感染したデング熱患者から、ウイルスを分離することに成功した。このウイルスは、デングウイルス 2 型であり、2004 年に成田空港検疫所でインドネシア、ジャカルタからの輸入症例から分離されたデングウイルス 2 型 (GenBank No.AB180478) と塩基配列において 98.5% という高いホモロジー相同性を示した。

3) デング血清診断における血清中 IgA 抗体および IgM 抗体検出と有用性の検討：これまでに検査に供した 250 例以上の日本人デング被疑者血清での抗体検出率は、IgM 抗体および IgA 抗体とともに 80% 以上であった。発熱を指標として急性期および回復期に 2 回以上採取された血清を用いた抗体応答の観察では、デングウイルス感染後の IgM 抗体および IgA 抗体の上昇が観察された。またデング患者血清中に検出された IgM 抗体は、デングウイルスに対して特異性を示した。反対に、日本脳炎患者血清中に検出された IgM 抗体は日本脳炎ウイルスに対し有意に特異性を示した。以上の結果より、デング患者の血清診断では血清中の IgM 抗体および IgA 抗体測定が有効であった。

### 4) チクングニヤ熱の血清診断法の開発：

チクングニヤ IgM-capture ELISA ではフィジー 4 例 (6.6%)、フィリピン 4 例 (11.2%)、インドネシア 5 例 (5.6%)、バングラデシュ 0 例 (0%)、スリランカ 2 例 (6.8%) の陽性例が認められ、合計 15 例の内 10 例については Dengue IgM も陽性だったため、確実にチクングニヤといえるケースは 5 例 (1.6%) であった。チクングニヤ IgG-indirect ELISA ではフィジー 3 例 (4.9%)、フィリピン 8 例 (9.0%)、インドネシア 22 例 (25.0%)、バングラデシュ 9 例 (5.8%)、スリランカ 2 例 (6.9%) の合計 44 例の陽性が認められた。

5) 我が国における日本脳炎ウイルスサーベイランス：ブタ血清からの日本脳炎ウイルス分離は、2005 年は 10 都県のブタ血清から日本脳炎ウイルス複数株が分離された。沖縄県、熊本県、高知県、香川県、広島県、三重県、石川県、静岡県、千葉県、東京都のブタからであり、表 1 に示す如く、10 都県あわせて 31 株の日本脳炎ウイルスが分離された。なお、現在も分離中のものも数株存在する。2004 年の分離ウイルス株の遺伝子解析を実施したところ、いずれも遺伝子型 1 型ウイルスであった。2004 年の分離株で特記すべきことは、三重県では同じ日に同じ豚舎で分離された日本脳炎ウイルス 2 株 (Sw/Mie/34/2004, Sw/Mie/40/2004) が、E 領域の塩基配列上異なるウイルスである (ホモロジー 98.3%) ことが、判明した (図 1)。一方、香川県の分離株で 3 NCR 領域の Variable 領域に新たな欠損領域を有することウイルスであった点である。また、上記三重県の分離ウイルス株 2 株 Mie34 (Sw/Mie/34/2004) 、 Mie40 (Sw/Mie/40/2004) に関して、その病原性

を検討するために、3 週令のマウスに脳内接種したところ、表 2 の如く LD<sub>50</sub> を示すウイルス力価が、Mie34 が 2.12pfu、Mie40 が 0.25pfu と Mie40 が有意に高い病原性を示した。さらに神経侵襲性を含めた病原性をみるために、ウイルスを腹腔接種した。この場合も、LD<sub>50</sub> を示すウイルス力価が、Mie34 が 3.72pfu、Mie40 が 2.67pfu と Mie40 が少ないウイルス量で LD<sub>50</sub> を示した。

6) 我が国の日本脳炎自然感染率の解析：1,764 検体における NS1 抗体陽性率は、0.5-6.7% (全体では 4.4%) であった。これに基づき、NS1 抗体保有期間 (2 年) で算出される年間自然感染率は 0.2%-3.4% であった。南ほど高い傾向を示した。

(2) 媒介節足動物とウイルスの侵淫状況を把握するための技術開発と現状の把握

1) 東北地方における Dengue 熱媒介蚊の分布域拡大に関する要因解析およびヤブカ寄生原虫 *Ascogregarina* spp. に関する基礎的研究：東北地方におけるヒトスジシマカの分布域調査に関して、2003 年に盛岡では、ヒトスジシマカ幼虫が初めて確認されたが、2004 年の調査 (0/71)、2005 年の調査 (0/29) で同蚊は確認できなかった。これは、2003 年に一時的に盛岡に侵入したヒトスジシマカが定着できなかったと判断された。2004 年の日本海側の調査では、能代市内には相当高密度にヒトスジシマカが分布していることが再確認されたが、能代から北へ約 20km の八森、青森県岩崎、深浦、鱈ヶ沢、弘前では、ヒトスジシマカは確認されなかった。一方、太平洋岸の釜石で初めて確認された。2005 年の日本海側での調査では、能代の北約 20 km の八森町で初めてヒトスジシマカが確認されたが、青森県の岩崎、

深浦、鯉ヶ沢では依然として確認されなかった。4年前に同蚊が確認された気仙沼では市内広域に分布が広がっていた。また、大船渡の港湾地域および2カ所の寺院での捕虫網による採集で初めてヒトスジシマカが確認された。

2) コガタアカイエカに関する調査：コガタアカイエカの分布は琉球から北海道まで、日本脳炎ウイルス(JEV)に対する豚の抗体陽性率から、分布周縁部にあたる東北地方での個体群密度は相当低いことが想像されるが、2005年8月上旬、秋田県大仙市(大曲市)と秋田市内の牛舎でライトトラップによる蚊の捕集を試み、富山県および埼玉県の時同期の捕集成績と比較した。その結果、トラップ・一晩当たりの捕集数は富山県の約1/100、埼玉県の約1/10程度であった。

3) 蚊のウエストナイルウイルス媒介試験に用いるマウスの有用性、およびイナトミシオカの本ウイルス感受性：媒介試験には、吸血意欲を高めるために一度産卵したイナトミシオカを用いた。胸部接種でWNVを蚊に感染させた後、その8日後に、8週令のマウスから吸血する機会を蚊に与えた。複数の感染蚊の入った飼育容器の上部蓋のネットの上にマウス2個体を1時間載せて、蚊の吸血の有無を観察した。5個体のマウスで、毛の逆立ちなどの症状が認められた。全てのマウスは、吸血あるいは刺咬の8-9日後に、臓器内のWNVゲノムの有無をRT-PCR法で検査した。その結果、症状の認められた5個体のマウス中、4個体からウイルスゲノムが検出された。

(3) 節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチン開発に関する基礎的研究

1) サルにおけるデングウイルス感染増強抗体の解析：デングウイルス1型、2型を接種したサル6頭において型特異中和抗体価についても速やかな上昇が認められ、感染後58週まで維持した。U937細胞を用いたデングウイルス感染において、交叉性抗体による感染増強は1:30倍希釈で、型特異抗体は1:300倍希釈で最大値を示した。未希釈血清を使用した場合、交叉性抗体による感染増強は感染後46週以降の血清を用いた場合確認されたが、型特異抗体ではいずれの場合も確認されなかった。このように、異なる血清型のウイルスに対する感染増強抗体が出現したことが*in vitro*において明らかになった。さらに2頭の非免疫群を加え、全頭にデングウイルス2型を接種し、ウイルス血症を確認したが、感染増強抗体による感染の増強を確認できる症状はサルにおいて観察できなかった。再感染後の中和試験による型特異中和抗体価は速やかに上昇し、再感染後1年2ヶ月後まで維持された。交叉性中和抗体価は型特異中和抗体に比較すると減弱した力価を示したが、速やかな上昇が認められ、再感染後1年2ヶ月後まで維持された。このように、再感染による速やかな特異中和抗体の上昇は全頭に認められた。一方、交叉性中和抗体は初感染と再感染時のウイルスの型が異なる時に顕著であり、初感染時の特異中和抗体が十分上昇しなかった検体においては交叉性中和抗体の上昇は認められなかった。

2) タンパクワクチンとの混合投与によるデング4価DNAワクチンのマウスにおける中和抗体誘導能の上昇：DENV2細胞外粒子(EPワクチン：ニュークレオカプシドのない空の粒子型抗原)および現行日本脳

炎不活化ワクチン (JEVAX) の両タンパクワクチン共に、4価 DNA ワクチンとの混合投与群がそれぞれの単独投与群より高い中和抗体価をマウスに誘導した。この上昇は、デングの 4 つの型すべてに対して見られた。接種後の週数により抗体価は変化するが、混合投与群と単独投与群における抗体価の差から、この上昇効果は相乗的であった。また、初回免疫後 13 週目の投与の後、4 型すべてに対して中和抗体価は上昇し、追加免疫の効果が認められた。

3) デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列の解析 : 36 個のハイブリドームから RNA を抽出し H および L 鎖可変領域の RT-PCR を行い解析したところ、すべてのクローンでバンドが検出できた。L 鎖の CDR のアミノ酸配列は H 鎖に比べて相同性が高い傾向を示した。わずかなアミノ酸の違いで中和活性が急激に低下する例として、D2-V-10F1 では 18,000 の中和活性を示していたものが、L 鎖の CDR1 の 2 つのアミノ酸 (25 番目が A→T, 27 番目が R→Q) のみが変わった D2-III-10G7 では中和活性が 320 にまで低下した。

4) ウエストナイルウイルスのリバースジェネティクス法の確立 :

レプリコン RNA を合成し、293T 細胞に導入した。このレプリコン RNA が細胞内で自己増殖することを確認し、完全長の WNV の cDNA を含むプラスミドを構築した。ウエストナイルウイルス cDNA を用いて、*in vitro* 転写反応を行い、完全長のウイルス RNA を合成し、Vero E6 や BHK 細胞に導入したところ、導入後 2 日目より細胞の円形化と浮遊化が観察された。

また、これらの細胞はウイルスの E 蛋白質に対する抗体に反応した。

6) E 型肝炎ウイルスのウイルス様中空粒子を用いたウエストナイルウイルスに対する経口 DNA ワクチンの開発 : HEV-VLPs を VLP 溶解緩衝液で室温、30 分間インキュベートし、VLPs を構成蛋白に開裂させ、目的の DNA ワクチンを加えた後に、CaCl<sub>2</sub> 溶液を滴加して Ca イオン濃度を 5mM まで引き上げ、DNA ワクチンを封入した VLPs を再構築し pCMV(WN/cME) を封入した HEV-VLPs を Caco-2 細胞株 (ヒト大腸癌由来) に接種して、DNA ワクチンの細胞内導入と発現を免疫染色法で確認した。

7) マウス樹状細胞におけるデングウイルス感染機構の解析 : BALB/c 及び C57BL/6 マウスの骨髄と脾臓から DC を分離し、Den V 2 を接種し、感染後 3 日目に細胞のウイルス抗原を間接蛍光抗体法にて確認したところ、細胞質にデングウイルス特異的な蛍光が認められた。また、骨髄 DC の 3 日目と 7 日目の細胞上清から RT-PCR 法により、Den V2 遺伝子が検出された。

#### D. 考察

本研究全体の計画は以下の通りであった。日本国内に存在する、あるいは海外から侵入する可能性のある節足動物媒介性ウイルスに対して、血清・病原体・遺伝子診断法を確立し、その検査法を用いてウイルスの侵淫状況を調査する。一方、媒介節足動物とウイルスの侵淫状況を把握するための技術開発を行い、さらに現状を把握する。次に、上記診断法を用いて、節足動物媒介性ウイルスの国内における侵淫状況を人及びベクターの両面から把握する。ワクチン開

発については、まず節足動物媒介性ウイルスに対する防御免疫を解析し、各ウイルスに対する新型ワクチンに対して防御免疫を誘導することを、動物実験により確認する。以上の研究計画に従い、本研究班は以下のように研究を実施した。節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチンの開発にむけての基礎的研究においては、1) チクングニヤウイルスの血清診断法の開発・確立を行った。2) クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの ELISA 法の開発および TaqMan PCR による高感度診断法を確立した。3) デングウイルス血清診断における IgM 抗体測定法の改良と評価および IgA 抗体検出法の開発とその応用法を確立した。4) 海外からの帰国者に関してデングウイルス感染に対する血清・病原体・遺伝子診断を実施し、多数のデングウイルス感染患者（死亡例 1 例）の存在を明らかにした。節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチン開発に関する基礎的研究においては、1) デング 4 価ワクチンの中和抗体誘導能を示し、タンパクワクチンとデング 4 価 DNA ワクチンの混合投与によりマウスに高い中和抗体を誘導することを明らかにした。2) ウエストナイルウイルスのリバーシジェネティックス法を確立し、中空ウイルス粒子・自己増殖性レプリコンの作製に成功した。3) E 型肝炎ウイルスの中空粒子内にウエストナイルウイルス (WNV) の prM および E 蛋白質を発現した DNA ワクチンをパッケージングすることに成功し、WNV の経口 DNA ワクチンの可能性を示した。4) デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列を解析し、相補性決定領域 (CDR) のアミノ酸配列

が中和活性を規定していることを示した。

5) デングウイルスは通常マウスに感染しないがマウスの未熟な樹状細胞に感染し、ウイルスが増殖することを示した。

6) 我が国における日本脳炎の現状に関しては、日本の住民は近年でも比較的高い率で自然感染を受けていることが示された。この率は、厚生労働省による 2000 年度の感染症流行予測調査の中の JEV 感受性調査で得られた年齢依存の抗体陽性率から推定される自然感染率に近似する。ワクチン接種率は低下しているため、早期の勧奨接種再開が望まれる。また、日本脳炎ウイルスの活動性に関しては、2005 年のブタからの日本脳炎ウイルスの分離株は 3 1 株であり、国内の日本脳炎ウイルスの活動が活発であったと考えられ、静岡県で 8 株、千葉県で 2 株、東京都でも 2 株分離されたことは特筆すべきことである。また、2005 年には静岡県で日本脳炎患者は 1 名報告されており、西日本にくらべて日本脳炎という病気に対して関心が高くない東海、関東で、今後患者発生に注意する必要がある。

以上の研究成果は以下の点で厚生労働行政に貢献する。

1) デングウイルス 1-4 型、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルスおよびチクングニヤウイルスによる感染をより迅速に診断することを可能にし、早期の治療及び予防対策の策定を可能にする。さらに、輸入例を早期に診断することにより治療や国際等に結びつけることができる。2) 1 類感染症であるクリミア・コンゴ出血熱に対する一層迅速な検査法を確立したことにより、患者からの 2 次感染を未然に防ぐこと

を可能にする。3) 日本脳炎ワクチンの必要性について判断基盤を与える。4) ウエストナイルウイルスの日本への侵入時に我が国の感受性蚊の情報をもとに、ベクターのサーベイランスに基づく有効な感染蚊対策と水際対策を可能にする。5) デング熱、ウエストナイル熱に対する新型ワクチン開発を迅速に進めていくことを可能にする。さらに本技術を現在ワクチンのない他の節足動物媒介性ウイルスに応用することを可能にする。

#### E. 結論

クリミア・コンゴ出血熱の核蛋白検出 ELISA 法および TaqMan PCR 法、を開発し有用性を示した。海外からの帰国者についてデングウイルス感染の検査を行った。多くのデングウイルス感染者の存在を明らかにし、死亡例 1 例を確認した。また、デング熱の検査法として IgA 検査法を評価確立した。また、デング熱の鑑別疾患であるチクングニヤ熱の血清診断法を開発した。日本脳炎に関しては、近年のブタの間での流行株である遺伝子型 1 型ウイルスの三重県での分離株中にマウスに強い病原性を示すウイルスが確認された。2005 年の夏季には沖縄県、熊本県、高知県、香川県、広島県、三重県、石川県、静岡県、千葉県、東京都のブタから 10 都県あわせて 31 株の日本脳炎ウイルスが分離された。媒介節足動物の状況の把握においては、東北地方におけるヒトスジシマカの分布域拡大を確認した。さらに、日本のイナトミシオカがウエストナイルウイルスに感受性を有することを確認した。節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチンの開発にむけての基礎的研究

においては、サルにおけるデングウイルス感染後、40 週を過ぎて感染増強抗体が出現し、その後別の血清型デングウイルスを接種したがデング熱様の症状は認められなかった。また、タンパクワクチンとデング 4 価 DNA ワクチンの混合投与によりマウスに高い中和抗体を誘導することを示した。さらに、デングウイルスがマウスにおいても未熟な樹状細胞に感染し、ウイルスが増殖していることが示された。E 型肝炎ウイルスのウイルス様中空粒子 (HEV-VLPs) にデングウイルス粒子構成蛋白 prM および E 蛋白を発現する DNA ワクチンをパッケージングし、培養細胞への接種で、遺伝子導入試薬と同等にウイルス遺伝子導入が可能であることを確認した。

#### E. 健康危険情報

スリランカでデングウイルスに感染した日本人が現地で出血熱に陥り、日本に帰国入院後死亡した症例があった。本症例では、発病後 18 日目に死亡し、その剖検肝臓組織からデングウイルス遺伝子を検出した。

#### G. 研究発表

論文発表 (研究成果の刊行に関する一覧表参照)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

国内特許

1. 名称「DNA ワクチンの中和抗体誘導能を増強するタンパク・DNA 同時投与方法」  
(2003)

# クリミア・コンゴ出血熱の分子疫学とウイルス抗原検出による 高感度診断法の開発

分担研究者 西條政幸(国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官)  
協力研究者 森川 茂 (国立感染症研究所ウイルス第1部第1室室長)  
倉根一郎 (国立感染症研究所ウイルス第1部部長)  
唐 青 (中国ウイルス性疾患予防対策センター)

研究要旨:クリミア・コンゴ出血熱(Crimean-Congo hemorrhagic fever, CCHF)の流行地である中国新疆自治区で1966~88年の間に分離されたCCHFウイルスのS-RNA遺伝子の分子系統学的解析から、この地域のCCHF流行地には、3種類[1966-S型(1966年分離株)、1970-S型(1970, 1979年分離株)、1975-S型(1975, 1978, 1984, 1988年分離株)]のCCHFウイルスが存在する。2001年の流行は、1966-S型の再興により、2002年は1966-S型と1975-S型によることが明らかになった。CCHFウイルス(中国8402株)の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 (ELISA, 以下 Ag-capture ELISA)を開発し、CCHFの診断における有用性をnested reverse-transcription polymerase chain reaction(nested RT-PCR)と比較して検討した。20名のそれぞれの急性期CCHF疑い患者から得られた血清20検体中、RT-PCRで陽性を示したのは9検体であった。Ag-capture ELISAで陽性を呈したものは3検体で、その3検体はRT-PCRでも陽性を呈した。RT-PCRで陽性を呈した検体9検体のうち、CCHFウイルスに対するIgG抗体およびIgM抗体ともに陰性であったものは6検体であり、そのうち3検体がAg-capture ELISAが陽性であった。今回作製された単クローン抗体を用いたAg-capture ELISAでは、8402株の核蛋白が検出される場合と同様の感度でCCHFウイルス(IbAr10200株)の核蛋白も検出された。今回開発されたAg-capture ELISAは、RT-PCRと比較して感度は劣るものの、急性期CCHFの診断に有用と考えられる。また、CCHFウイルスのS-遺伝子の塩基配列に基づいて、TaqMan PCR法のためのプライマーおよびプローブを設計し、高感度にクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの遺伝子を定量的に測定するためのシステムを開発した。今回開発されたTaqMan PCR法では、高感度に、しかもより迅速にクリミア・コンゴ出血熱患者血清中のCCHFウイルス遺伝子を増幅し検出することが可能であった。しかし、nested RT-PCR法と比較して若干感度が劣る。本法はクリミア・コンゴ出血熱の診断のみならず、CCHF患者における病勢の判定にも有用と考えられた。

## A. 研究目的

クリミア・コンゴ出血熱(CCHF)ウイルスは、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類され、3分節の(-)RNAをゲノムとする。CCHFは感染症法で1類感染症に分類され、アフリカ以外にも分布する唯一のウイルス性出血熱である。ヒトは感染ダニ(*Hyalomma* 属)に咬まれたり、ウイルス血症を伴う感染動物(ヒツジなど)の血液や

体液に接触したりしてCCHFウイルスに感染する。また、ヒトからヒトへの感染もまれではなく、CCHF患者の治療にあたった医療関係者がCCHFウイルスに感染する院内感染例も報告されている。さらに、抗RNAウイルス薬のひとつであるリバビリンが、CCHFの治療に有用であるとの報告もある。

アフリカ以外では、クリミア半島から中国新



疆にかけて広範囲の国、地域で毎年 CCHF の流行が報告されている。これまでに、中国の新疆ウイグル自治区で 1966-88 年の間に分離された 7 株の M-RNA の全遺伝子配列を決定して比較検討した結果、この地域には、CCHF ウイルスが 3 型存在することが明らかになった。また、2001 年の流行時の患者、ダニから RT-PCR により増幅された S-RNA 遺伝子全長の配列の比較から、2001 年に分離されたウイルスは 1966 年に分離されたウイルスの再興によることが明らかになった。また、35 年間にウイルス遺伝子の変異がほとんど起きないことも明らかになった。本研究では、2002 年の CCHF の流行時に患者、ダニから RT-PCR により増幅された S 分節の遺伝子配列を決定し、流行に関与したウイルス型を同定した。

国立感染症研究所ウイルス第 1 部では、これまで感染性 CCHF ウイルスを用いることなく CCHF の診断を下せるよう CCHF ウイルスの組換え核蛋白を抗原とした血清学的診断システムを開発してきた。本研究では、さらに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、その CCHF の診断における有用性を急性期 CCHF 患者から得られた血清を用いて評価した。

CCHF の遺伝子診断には、一般的には S-遺伝子の部分遺伝子を、nested RT-PCR 法で増幅する方法が用いられている。つまり、PCR のステップは 2 回必要で、かつ、疑陽性の成績を呈する可能性が高い方法と考えられる。そこで、本研究では、より迅速にしかも定量的に CCHF ウイルスの部分遺伝子を増幅するための TaqMan PCR 法を開発した。

## B. 方法

- 1) 血清. それぞれ 2001 年と 2002 年の春にかけて中国新疆ウイグル自治区において発生した CCHF の流行時に CCHF 疑い患者から採取された血清を用いた。
- 2) RT-PCR 法. RT-PCR: 血清中の CCHF ウイルス部分 S-遺伝子は、先の報告に従い検出した (Clin Diagn Lab Immunol 10:489-491, 2003). 簡単に説明を加えると、中国の新疆ウイグル自治区の流行地で 2002 年の CCHF 流行期

に、急性期の患者血清およびダニから RNA を抽出した。ランダムヘキサマー p(dN)<sub>6</sub> で 1st strand cDNA を作製した。患者からの血液採取にあたっては、説明・同意を得た。1st strand cDNA を鋳型として、S-RNA 分節を標的としたプライマーセットを用いて PCR を行い部分遺伝子を増幅し、direct sequence によりその PCR 産物の塩基配列を決定した。その塩基配列情報をもとに系統樹解析を行った。

- 3) 抗原検出 ELISA: CCHF ウイルスの組換え核タンパクに対する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 CCHF ウイルス核蛋白ウサギ抗体を用いて、Ag-capture ELISA を開発した。
- 4) TaqMan-PCR: Forward プライマーには 5'-GCAGGAACCATTAATCTTG-3' を、reverse primer には 5'-TGCATTGACACGAAAACCTA-3' を用いた。また、TaqMan プロブには 5'-CTCCACTTGAGAGCAGCCTGTTGGT-3' を用いた。これらのプライマーおよびプロブは、S-遺伝子を標的に設計された。血清から Viral Nucleic Acid Purification Kit (Roche Diagnostics 社) を用いて RNA を抽出した。抽出された RNA を鋳型として、ランダムヘキサマー p(dN)<sub>6</sub> をプライマーとして ready-to-go RT-PCR キット (Promega 社) を用いて reverse transcription 反応により cDNA を作製した。作製された cDNA が含まれる反応液 5  $\mu$ l をサンプルとして、LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probe および LightCycler-PCR システム (Roche Diagnostics 社, Mannheim, ドイツ) を用いて試料中に含まれる CCHF 遺伝子を定量的に検出した。ただし、遺伝子検出感度を決定するための標準遺伝子には、濃度が決定されている CCHF ウイルス S-遺伝子の挿入された pGEM-T-easy ベクターを用いた。
- 5) CCHF ウイルスに対する抗体検出: CCHF 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を用いて CCHF ウイルスに対する抗体を検出した (J Clin Microbiol 40:1587-1591, 2001; J Med Virol

75:295-299, 2005).

### C. 結果

- 1) 部分 S-遺伝子塩基配列による分子疫学. 6人の急性期の CCHF 患者血清から PCR 産物が得られた。流行地で採取されたダニは、2-6 匹をプールして RNA 採取した結果、45 プールのダニ材料のうち 5 プールから PCR 産物が得られた。得られた S-RNA の PCR 産物の遺伝子配列を GenBank に登録されている CCHF ウイルスの部分配列と比較した結果、患者由来 5 検体、ダニ由来 2 検体は、1966-S 型 (1966 年分離株) (1966 年分離株 66019 株/2001 年流行) に、患者由来 1 検体、ダニ由来 3 検体は、1975-S 型 (1975, 1978, 1984, 1988 年分離株) に分類された。
- 2) 急性期の CCHF 患者から得られた血清を用いた Ag-capture ELISA の有用性の検討: 中国西部の CCHF 患者 20 名 (2001 年 8 人, 2002 年 12 人) から血清が採取され研究に供された。血清 20 検体中 9 検体からウイルスゲノムが RT-PCR による増幅された。そのうち 3 検体が Ag-capture ELISA で陽性を示した。RT-PCR 陽性の 9 検体中、IgG, IgM 抗体ともに陽性であったものは 6 検体で、残りの 3 検体は IgG 抗体陰性、IgM 抗体陽性であった。Ag-capture ELISA で陽性を示したのは、すべて IgG 抗体、IgM 抗体ともに陰性の検体であった。
- 3) TaqMan PCR と nested RT-PCR. 2002 年流行期の 12 名の急性期患者のうち 6 名から採取された血液から、nested RT-PCR により CCHF ウイルスゲノムが増幅され、CCHF と診断された。また、nested RT-PCR が陰性であったが、CCHF ウイルスに対する IgM 抗体陽性が確認され CCHF と診断された者が 1 例認められた。つまり、12 名中 7 名が CCHF と診断された。Nested RT-PCR で CCHF ウイルスゲノム陽性を示した血清サンプルのうち 4 検体が、TaqMan PCR 法で CCHF ウイルスゲノム陽性と診断された。Nested RT-PCR 陽性であり、TaqMan PCR で陰性と判定された血清は、nested RT-PCR 法においても他の血清に比較して増幅されたウイルスゲノム量が少ないと考えられた。TaqMan PCR 法陽性の患者 4 名の血清中に、 $6 \times 10^4 \sim$

$5 \times 10^9$ /ml コピーのウイルスゲノムが存在することが明らかにされた。

### D. 考察

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

Ag-capture ELISA に関する本研究では、開発された Ag-capture ELISA の CCHF の診断における有用性を実際の患者から得られた血清を用いて評価した。CCHF ウイルスに対する抗体出現前の患者血清の 50% が、この Ag-capture ELISA で陽性を示した。確かに、nested RT-PCR の感度に比較すると、nested RT-PCR 法では IgM 抗体が出現している時期の患者から得られた血清からも、ウイルス遺伝子が増幅されていることから、Ag-capture ELISA は nested RT-PCR よりも感度は低く、この方法だけでは CCHF の正確な診断には不十分であろう。しかし、抗体が出現する前の患者から得られた血清の多くが、Ag-capture ELISA で陽性を示したことは、本法は抗 CCHF ウイルス抗体の出現する前の急性期 CCHF の診断に、特に有用と考えられる。

TaqMan PCR 法による迅速診断法開発に関する本研究では、CCHF ウイルス中国株の S-遺伝子において、株間で比較的保存されている領域に forward プライマーと reverse プライマーを設計し、両プライマーが相補的結合をする部位の間に位置する reverse プライマー側に近接する部位に結合するように TaqMan プローブを設計した。CCHF ウイルス 66019 株の S-遺伝子 (GenBank accession number, AJ010648) において、forward プライマー、reverse プライマーおよび TaqMan プローブが結合する部位は、5' ポジションがそれぞれ 353 番、465 番、432 番に相当する。この部位は比較的保存されている領域

であり、今回設計されたプライマーおよびプローブを用いた TaqMan PCR 法では、CCHF ウイルス中国株の検出は可能であると考えられる。本 TaqMan PCR 法の感度を向上させるためには、CCHF ウイルス中国分離株の遺伝子情報をもとにプライマーおよびプローブの設計が重要と考えられる。実際 nested RT-PCR で陽性を示した 6 サンプル中 4 サンプルのみ TaqMan PCR で陽性を呈した。Nested RT-PCR で薄いバンドが認められ陽性と判定された血清は TaqMan PCR では陰性であり、Nested RT-PCR に比較すると若干感度が劣ると言わざるを得ない。しかし、本診断法では、CCHF ウイルスゲノムを定量的に測定することが可能であることから、CCHF の診断のみならず、病勢や治療効果の判定にも有効であると考えられる。また、血清からウイルスゲノムの抽出および TaqMan PCR の反応の終了まで、ほぼ 2 時間以内で成績を得ることができ、この迅速性も本診断法の利点のひとつであろう。

#### E. 結語

中国新疆ウイグル自治区における CCHF の分子疫学を明らかにした。その情報をもとに、CCHF ウイルスゲノムを定量的に、しかも、迅速に検出するための TaqMan PCR 法を開発した。本法は迅速診断および病勢や治療効果の判定に有用と考えられる。また、CCHF ウイルスの組換え核タンパクに対する単クローン抗体を捕捉抗体とした抗原検出 ELISA 法を開発した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tang Q, Saijo M, Han L, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Xinjung W, Kurane I, Morikawa S. Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays. *Journal of Virological Methods*, 108: 111-116, 2003.
- 2) Tang Q, Saijo M, Zhang Y, Asiguma M, Dong T, Han L, Shimayi B, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. A patient with Crimean-Congo

hemorrhagic fever diagnosed with recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10:489-491, 2003

- 3) 西條政幸. クリミア・コンゴ出血熱. *総合臨床* 52:1241-1244, 2003
- 4) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Possible horizontal transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from a mother to her child. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57:55-57, 2004.
- 5) 西條政幸. ウイルス性出血熱. *化学療法の領域* 20:224-228, 2004 西條政幸, 森川茂, 倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱. *ウイルス* 54:223-228, 2004
- 6) 西條政幸. クリミア・コンゴ出血熱. *感染症の診断・治療ガイドライン 2004. 感染症の診断・治療ガイドライン編集委員会 (監修: 日本医師会感染症危機管理対策室, 厚生労働省健康局結核感染症課)*, p62-63, 2004. 医学書院, 東京
- 7) 西條政幸. ウイルス性出血熱の臨床. *日本臨床* 63:2161-2166, 2005
- 8) 西條政幸. クリミア・コンゴ出血熱. *感染症の辞典 (編集: 国立感染症研究所学会)* p78-79, 朝倉書店, 東京, 2005
- 9) 西條政幸. ウイルス性出血熱. *感染症予防必携第 2 版 (編集: 山崎修道他)* p42-54, 2005. 財団法人日本公衆衛生協会, 東京
- 10) 西條政幸. ラッサ熱, ウイルス性出血熱. *感染症マニュアル (編集: 東京都新たな感染症対策委員会)* p132-135, 2005. 東京都福祉保健局健康安全感染症対策課, 東京
- 11) 西條政幸. エボラ出血熱, クリミア・コンゴ出血熱, マールブルグ出血熱, 痘瘡・ヒトサル痘, ラッサ熱, 黄熱, 狂犬病およびリッサウイルス感染症, HFRS と HPS, B ウイルス感染症, ニパウイルス感染症. *ネオエスカ・感染症アレルギーと生体防御 (編集: 倉田毅)* p62-67, 2005. 同文書院, 東京
- 12) 西條政幸. 新興・再興ウイルス感染症. *小児感染免疫* 17:225-229, 2005
- 13) 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. *Journal of Medical Virology* 75:295-299, 2005
- 14) 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. *Journal of Medical Virology* 77:83-88, 2005
- 15) Tang Q, Zhao XQ, Wang HY, Shimayi B, Zhang YZ, Saijo M, Morikawa S, Liang GD, Kurane I. Molecular epidemiology of Xinjiang hemorrhagic fever viruses. *Zhonghau Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 19:312-318, 2005 (in Chinese)
- 16) 西條政幸. ウイルス性出血熱. 今日の治療指針 2006 (編集:山口徹, 他), p133-134, 2006, 医学書院. 東京
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) 西條政幸, 唐青, 森川茂, 前田秋彦, 倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱に対するリバビリンによる治療経験. 第 13 回抗ウイルス化学療法研究会, 2003 年 1 月, 津田沼
- 2) 西條政幸, 森川茂, 前田秋彦, 倉根一郎. 急性期クリミア・コンゴ出血熱患者におけるウイルス血症と液性免疫応答. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003 年 10 月, 京都.
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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