

厚生労働科学研究費
国際医学協力研究事業

ウイルス性感染症の診断、疫学及び 予防に関する研究

平成18年度 総括研究報告書

平成19（2007）年3月

主任研究者 倉根一郎
国立感染症研究所ウイルス第1部

目 次

I	総括研究報告	(ページ)
	ウイルス性感染症の診断、疫学及び予防に関する研究	1
	主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第1部）	
II	分担者研究報告	
1	ウイルス感染症の疫学	11
	分担研究者：高島郁夫（北海道大学大学院獣医学研究科）	
2	フラビウイルスの検査法	15
	分担研究者：小西英二（神戸大学医学部保健学科）	
3	フラビウイルスの疫学	23
	分担研究者：竹上 勉（金沢医科大学総合医学研究所）	
4	日本脳炎の予防法開発	26
	分担研究者：倉田 毅（富山県衛生研究所）	
5	ハンタウイルス感染症の診断法	29
	分担研究者：有川二郎（北海道大学大学院医学研究科）	
6	ハンタウイルス感染症の疫学	35
	分担研究者：苅和宏明（北海道大学大学院獣医学研究科）	
7	サル痘ウイルスの診断法の開発	40
	分担研究者：西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第1部）	
8	ウイルス性下痢症の診断法確立	45
	分担研究者：武田直和（国立感染症研究所ウイルス第2部）	
9	ウイルス性下痢症の病態解析	48
	分担研究者：谷口孝喜（藤田保健衛生大学医学部）	
10	ウイルス性下痢症の疫学	50
	分担研究者：中込 治（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）	
11	狂犬病ウイルスの分子疫学	53
	分担研究者：井上 智（国立感染症研究所獣医科学部）	
12	狂犬病に対する治療法の開発	56
	分担研究者：西園 晃（大分大学医学部）	
13	狂犬病の診断法の開発	68
	分担研究者：森本金次郎（国立感染症研究所ウイルス第1部）	

III	研究成果の刊行に関する一覧表	77
VI	研究成果の刊行物・別刷	81

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

総括研究報告書

ウイルス性感染症の診断、疫学及び予防に関する研究

主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部 部長）

研究要旨：アルボウイルス感染症、ウイルス性下痢症、ウイルス性出血熱、狂犬病を中心に、特にアジアにおいて問題となるウイルス感染症に関し、(1) 診断、検査法の確立と、疫学調査による国内外における流行状況の解明、(2) 各種病原体の解析に基づく病態形成機序の解明、(3) ワクチン等予防治療法確立のための基盤確立、を目的して研究を進めた。アルボウイルス研究においては、わが国に存在するフラビウイルスである日本脳炎ウイルスとダニ媒介性脳炎ウイルスを鑑別する検査法が確立された。ウイルス性出血熱研究においてはインドにおいて不明熱患者中にハンタウイルス感染者が確認された。また、アジアおよび極東ロシアにおけるハンタウイルスウイルスとげっ歯類との関係が明らかとなった。ウイルス性下痢症の研究においては、ロタウイルスのリバースジェネティクス系が開発された。また、ロタウイルス流行株の分子基盤が示唆された。狂犬病研究においてはフィリピンおよびタイにおける流行株の分子疫学的特徴が明らかとなった。

分担研究者：

有川二郎：北海道大学大学院医学研究科
教授

井上 智：国立感染症研究所 室長

荻和宏明：北海道大学大学院獣医学研究科
助教授

倉田 毅：富山県衛生研究所 所長

小西英二：神戸大学医学部 助教授

西條政幸：国立感染症研究所 主任研究官

高島郁夫：北海道大学大学院獣医学研究科
教授

竹上 勉：金沢医科大学 教授

武田直和：国立感染症研究所 室長

谷口孝喜：藤田保健衛生大学医学部 教授

中込 治：長崎大学大学院医歯薬総合研究
科 教授

西園 晃：大分大学医学部 教授

森本金次郎：国立感染症研究所 室長

A. 研究目的

日本およびわが国を取りまくアジア地域においては、依然として多くのウイルス感染症が問題となっている。アルボウイルス感染症においては、デング熱患者が東南アジアを中心に多数発生している。ウイルス性下痢症は東南アジアの幼児を中心に流行しているが近年、日本においてもノロウイルス感染症等の流行がおり死者も発生したことから大きな問題となっている。腎症候性出血熱は中国、ロシアを中心に多数の患者発生を記録している。狂犬病は、東南アジア諸国では多数の死者を記録しており、日本においても昨年 36 年ぶりの輸入症例が 2 例確認された。本研究においてはアルボウイルス感染症、ウイルス性下痢症、ウイルス性出血熱、狂犬病を中心に、特にアジアにおいて問題となるウイルス感染症につき、(1) 診断法の確立と普及、疫学調査により国内外における流行状況を解明する、(2) 各種病原体の解析をもとに病態形成機序を解明する、(3) ワクチン等予防治療法確立のための基盤を確立する、ことを目的とする。

B. 研究方法

1. アルボウイルス感染症

診断法開発：感染性を持たないウイルス様粒子を抗原に用い、安全で特異性に優れた ELISA による血清診断法を開発する。また、抗体の細胞傷害活性を利用した新たな抗体測定法を開発する。

疫学調査：流行地において節足動物を採集しウイルスを分離する。さらにウイルスの性状を解析する。

ワクチン開発：ウイルス様粒子ワクチン開発へ向けて産生細胞株等の基盤検討を行う。

2. ウイルス性出血熱；

疫学調査：アジア地域でハンタウイルス感染症患者及び野生げっ歯類の疫学調査を実施しウイルスを分離する。流行地において宿主となるげっ歯類を同定する。ウイルスの遺伝子の系統解析とげっ歯類の遺伝子の系統解析の成績からウイルスとげっ歯類の共進化の関連を明らかにする。

3. ウイルス性下痢症；

診断法開発：ロタウイルスとサポウイルスの疫学調査に利用できる診断法を開発する。

疫学：ロタウイルスを分離し、これらのウイルス株の血清学的性状と遺伝子性状を調べる。

ワクチン開発：ロタウイルスのリバースジェネティクス系の開発を行い新世代ワクチンへの基盤を確立する。

4. 狂犬病；

疫学調査：フィリピンおよびタイにおいてイヌ間で流行している狂犬病ウイルス株の遺伝子解析を行い、各国における狂犬病ウイルス株の特徴を明らかにする。

病態解明：狂犬病ウイルスに対する樹状

細胞の免疫応答を明らかにすることにより、狂犬病特有な感染病態の機序を解明する。

C. 研究結果

1. アルボウイルス感染症：

ダニ媒介性脳炎ウイルスの非感染性粒子を用いてダニ媒介性脳炎ウイルス特異的抗体検出用の ELISA 法を確立した。日本脳炎ウイルス抗体との交叉性がないことを確認した。

日本脳炎ウイルス NS1 特異的抗体を、NS1 発現細胞への細胞障害活性を用いることにより測定する方法を確立し、ELISA 法や免疫染色法との相関を確認した。

石川県で採集した蚊から分離された日本脳炎ウイルスに遺伝子タイプ 1 型と 3 型のウイルスが混在していた。

日本脳炎ウイルスの非感染性粒子を用いたワクチン開発の基盤技術を確立した。

2. ウイルス性出血熱：

インドおよびベトナムにおいて不明熱患者およびげっ歯類のハンタウイルス調査を行った。インドにおいて不明熱患者中にハンタウイルス感染患者を見出した。また、げっ歯類の調査から東南アジアのソウルウイルスは独自のクレイドを形成する可能性が示唆された。

ロシアボルガ川流域でげっ歯類におけるハンタウイルス調査により、ヨーロッパヤチネズミの肺より Puumala 型ハンタウイルス遺伝子が検出された。この地域のヒトハンタウイルス感染におけるヨーロッパヤチ

ネズミの役割が示唆された。

コンゴ盆地型と西アフリカ型サル痘ウイルスを区別し、さらにサル痘ウイルス遺伝子を高感度かつ迅速に検出するための定量的リアルタイム PCR 法を確立した。

3. ウイルス性下痢症：

秋田県において優勢な G1 ロタウイルス株の相対検出率の増加と VP7 遺伝子の変化との関連を解析した。G1 ロタウイルス株の相対的検出頻度が増加する時には、多様な G1-VP7 遺伝子プールの中から、抗原決定部位にアミノ酸置換をもった VP7 遺伝子をもつ G1 株が急性株として流行することが明らかとなった。

T7RNA ポリメラーゼ発現 rDIs、ヘルパーウイルスとしてのヒトロタウイルス KU 株、および P8 特異的 VP4 中和単クローン抗体の利用により、ロタウイルスのリバースジェネティクス系の開発に成功した。

サポウイルスの全長遺伝子およびサブジェノミック RNA に相当する遺伝子領域を組換えバキュロウイルスで発現した。比重 1.27 g/ml と 1.32 g/ml の 2 種類のウイルス様粒子が産生された。

4. 狂犬病：

フィリピンで流行する狂犬病ウイルス株の遺伝子解析を子なった。アジア諸国で流行するウイルス株と近いクラスターを形成しているが、アジア大陸で流行している株とは異なることが明らかとなった。

タイ国バンコク市で流行している狂犬病

ウイルス G 遺伝子の塩基配列を解析した。ウイルス表面タンパクの外側に出ている領域は塩基置換の頻度が少なく、ウイルス粒子内の領域は塩基置換の頻度が多いことが明らかとなった。

狂犬病ウイルス ERA 株と CVS 株に対する樹上細胞の反応性が大きく異なることが明らかとなった。

D. 考察

日本および他のアジア地域においては、依然として多くのウイルス感染症が問題となっている。アルボウイルス研究においては、わが国に存在するフラビウイルスである日本脳炎ウイルスとダニ媒介性脳炎ウイルスを鑑別する検査法が確立された。本方法は今後の疫学的研究において有用である。

ウイルス性出血熱研究においてはインドにおいて不明熱患者中にハンタウイルス感染者が存在することから、南アジアや東南アジアにおけるハンタウイルス感染症の研究をさらに進めていく必要があることが明らかになった。

ウイルス性下痢症の研究においては、ロタウイルスのリバースジェネティックス系が世界で初めて開発された。今後この系を用いることによって、病原性の解明、新型ワクチンの開発等の研究が大きく進展することが期待される。

狂犬病研究においてはフィリピンおよびタイにおける流行株の分子疫学的特徴が明らかとなった。平成 18 年、日本人 2 名がフィリピンにおいて狂犬病ウイルスに感染し

発症した。これらの事例から狂犬病がアジアにおいて大きな問題であることが再認識された。また感染地の確認等のためにも、アジア各国での狂犬病ウイルス株の基礎データの蓄積が重要である。

E. 結論

アルボウイルス研究においては、わが国に存在するフラビウイルスである日本脳炎ウイルスとダニ媒介性脳炎ウイルスを鑑別する検査法が確立された。ウイルス性出血熱研究においてはインドにおいて不明熱患者中にハンタウイルス感染者が確認された。また、アジアおよび極東ロシアにおけるハンタウイルスウイルスとげっ歯類との関係が明らかとなった。ウイルス性下痢症の研究においては、ロタウイルスのリバースジェネティックス系が開発された。また、ロタウイルス流行株の分子基盤が示唆された。狂犬病研究においてはフィリピンおよびタイにおける流行株の分子疫学特徴が明らかとなった。

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

Itoda, I., Masuda, G., Suganuma, A., Imamura, A., Ajisawa, A., Yamada, K., Yabe, S., Takasaki, T., Kurane, I., Totsuka, K. and Negishi, M.: Clinical features of 62 imported cases of dengue fever in Japan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 75(3): 470-474, 2006.

- Hamano, M., Lim, C.K., Takagi, H., Sawabe, K., Kuwayama, M., Kishi, N., Kurane, I. and Takasaki, T.: Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan. *Epidemiology and Infection* In press 2007
- Obara, M., Yoshii, K., Kawata, T., Hayasaka, D., Goto, A., Mizutani, T., Kariwa, H., and Takashima, I.: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of tick-borne encephalitis using subviral particles. *J. Virol. Methods*. 134:55-60, 2006
- Jun-ichi Imoto and Eiji Konishi: Dengue tetraivalent DNA vaccine increases its immunogenicity in mice when mixed with a dengue type 2 subunit vaccine or an inactivated Japanese encephalitis vaccine. *Vaccine* 25, 1076-1084, 2007
- Pattamadilok, S., Lee, B. H., Kumperasart, S., Yoshimatsu, K., Okumura, M., Nakamura, I., Araki, K., Khoprasert, Y., Dangsupa, P., Panlar, P., Jandrig, B., Kruger, D. H., Klempa, B., Jakel, T., Schmidt, J., Ulrich, R., Kariwa, H. and Arikawa, J.: Geographical distribution of hantaviruses in Thailand and potential human health significance of Thailand virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 75: 994-1002, 2006
- Okumura, M., Yoshimatsu, K., Kumperasart, S., Nakamura, I., Ogino, M., Taruishi, M., Sungdee, A., Pattamadilok, S., Ibrahim, I. N., Erlina, S., Agui, T., Yanagihara, R. and Arikawa, J.: Development of Serological Assays for Thottapalayam Virus, an Insectivore-Borne Hantavirus. *Clin. Vac. Immunol.* 2007: in press.
- Lee, B. H., Yoshimatsu, K., Araki, K., Okumura, M., Nakamura, I., Arikawa, J.: A pseudotype vesicular stomatitis virus containing Hantaan virus envelope glycoproteins G1 and G2 as an alternative to hantavirus vaccine in mice. *Vaccine* 24: 2928-34, 2006
- Baek, L. J., Kariwa, H., Lokugamage, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., Kang, J. I., Moon, S. S., Chung, S. Y., Kim, E. J., Kang, H. J., Song, K. J., Klein, T. A., Yanagihara, R., Song, J. W.: Soochong virus: An antigenically and genetically distinct hantavirus isolated from *Apodemus peninsulae* in Korea. *J. Med. Virol.* 78: 290-7, 2006
- Shirato, K., Miyoshi, H., Kariwa, H., and Takashima, I.: The kinetics of proinflammatory cytokines in murine peritoneal macrophages infected with envelope protein-glycosylated or non-glycosylated West Nile virus. *Virus Res.* 121:11-16, 2006
- Baek, L.J., Kariwa, H., Lokugamage, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., Kang, J.I., Moon, S.S., Chung, S.Y., Kim, E.J., Kang, H.J., Song, K.J., Klein, T.A., Yanagihara, R., and Song J.W.: Soochong virus: an antigenically and genetically distinct hantavirus isolated from *Apodemus peninsulae* in Korea. *J. Med. Virol.* 78:290-297, 2006
- Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, lacking B5R membrane protein expression protects monkeys from monkeypox. *Journal of Virology* 80:5179-5188, 2006
- Wu FT, Oka T, Katayama K, Wu HS, Donald Jiang DS, Miyamura T, Takeda N, Hansman GS: Genetic diversity of noroviruses in Taiwan between November 2004 and March 2005. *Arch Virol* 151:1319-1327, 2006
- Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS: Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Arch Virol* in press
- Oka T, Yamamoto M, Katayama K, Hansman GS, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N: Identification of the cleavage sites of sapovirus open reading frame 1 polyprotein. *J Gen Virol* 87:3329-3338, 2006
- Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, White PA, Takeda N: Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 78:1347-1353, 2006
- Oka T, Hansman GS, Katayama K, Ogawa S, Nagata N, Miyamura T, Takeda N: Expression of sapovirus virus-like particles in mammalian cells. *Arch Virol* 151:399-404, 2006

- Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N: Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch Virol* 151:1291-1308, 2006
- Hansman GS, Takeda N, Katayama K, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA: Genetic diversity of Sapovirus in children, Australia. *Emerg Infect Dis* 12:141-143, 2006
- Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N: Enhancement of sapovirus recombinant capsid protein expression in insect cells. *FEBS Lett* 580:4047-4050, 2006
- Hansman GS, Guntapong R, Pongsuwanna Y, Natori K, Katayama K, Takeda N: Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens. *Arch Virol* 151:551-561, 2006
- Komoto, S., Sasaki, J., Taniguchi, K.: Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 4646-4651, 2006
- Komoto, S., Taniguchi, K: Reverse genetics systems of segmented double-stranded RNA viruses including rotavirus. *Future Virology*, 1:833-846, 2006
- Rahman, M., Matthijnsens, J., Yang, X., Delberke, T., Arijs, I., Taniguchi, K., Iturriza-Gomara, M., Iftekharuddin, N., Azim, T., Ranst, M.V.: Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J. Virol.*, 81: 2382-2390, 2007
- Nakagomi T, Takahashi Y, Arisawa K, Nakagomi O. A high incidence of intussusception in Japan as studied in a sentinel hospital over a 25-year period (1978-2002). *Epidem Infect* 134: 57-61, 2006
- Hoshino Y, Honma S, Jones RW, Santos N, Nakagomi O, Nakagomi T, Kapikian AZ, Touless ME. A rotavirus strain isolated from pig-tailed macaque (*Macaca nemestrina*) with diarrhea bears a P[6]:G8 specificity. *Virology* 345: 1-12, 2006
- Ahmed HM, Coulter JB, Nakagomi O, Hart CA, Zaki JM, Al-Rabaty AA, Dove W, Cunliffe NA. Molecular characterization of rotavirus gastroenteritis strains, Iraqi Kurdistan. *Emerg Infect Dis* 12: 824-826, 2006
- Nakagomi O, Nakagomi T, Arisawa K. A lack of significant association between the electropherotype or G-serotype of the infecting strain and disease severity of rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol* 151:1947-1950, 2006
- Sato A, Iizuka M, Nakagomi O, Suzuki M, Horie Y, Konno S, Hirasawa F, Sasaki K, Shindo K, Watanabe S. Rotavirus double-stranded RNA induces apoptosis and diminishes wound repair in rat intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 21: 521-530, 2006
- Uchida R, Pandey BD, Sherchand JB, Ahmed K, Yokoo M, Nakagomi T, Cuevas LE, Hart CA, Nakagomi O. Molecular epidemiology of rotavirus diarrhea among children and adults in Nepal: detection of G12 strains with P[6] or P[8] and a G11P[25] strain. *J Clin Microbiol* 44: 3499-3505, 2006
- Pakamatz K., Y. Shoji , S. Ubol , C. Mitmoonpitak, H. Wilde, A. Nishizono, I. Kurane, K. Morimoto: Genetic analysis of dog rabies viruses circulating in Bangkok. *Infection Genetics and Evolution.* 6, 235-240, 2006
- Yamagata J, Ahmed K, Pakamatz K. Y. Mannen K, Xuyen D. K, Loi H. H, Dung N.V, A. Nishizono, : Molecular epidemiology of rabies in Vietnam. *Microbiology and Immunology* In press
- Park, C.-H., Kondo, M., Inoue, S., Nguchi, A., Oyamada, T., Yoshikawa, H. and Yamada, A.: The Histopathogenesis of Paralytic Rabies in Six-Week-Old C57BL/6J Mice Following Inoculation of the CVS-11 Strain into the Right Triceps Surae Muscle. *J.Vet.Med.Sci.* 68:589-595, 2006.
- Hotta, K., Motoi Y., Okutani, A., Kaku, Y., Noguchi, A., Inoue, S. and Yamada, A.: Role of GPI-anchored NCAM-120 in rabies virus infection. *Microbes Infect.* XX:1-8, 2006.
- 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 arginine at position 333 in glycoprotein. *Virus Res.* 119, 208-215 (2006).

竹上 勉：日本脳炎ワクチン、化学療法の領域、22: 31-37, 2006

荻和宏明：げっ歯類とハンタウイルス感染症、ANIMATE, 特別号 1: 124-131, 2006

荻和宏明、谷川洋一、萩谷友洋、Lokugamage, K., Lokugamage, N., Nur Hardy Bin Abu Daud, 好井健太朗、高島郁夫：齧歯類とハンタウイルス感染症。獣医畜産新報、59:633-638, 2006

西條政幸. ウイルス講座「天然痘」、感染制御 2: 342-346, 2006

西條政幸. 根絶されたはずの天然痘の今。小児科臨床 60:149-154, 2007

大日康史、井上 智：我が国の飼育犬に狂犬病が侵入した場合の伝播と流行拡大の数理モデルによる解析：人と動物の共通感染症最前線 3、獣医畜産新法、9: 279-281、2006

井上 智：狂犬病の発生リスクと診断・検査システムの重要性、家畜衛生学雑誌、32: 7-8、2006

2. 学会発表

1) 国際学会

Yoshii, K., Goto, A., Obara, M., Kawakami, K., Kariwa, H., and Takashima, I.: Involvement of conserved region of flavivirus prM protein in virus particle budding. 40th Joint Working Conference on Viral Diseases, Sendai, (2006, 7)

Kariwa, H., Tanikawa, Y., Nur Hardy A.D., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.: Establishment of animal model for Puumala virus infection in Syrian hamsters. 40th Joint Working Conference on Viral Diseases, Sendai, (2006, 7)

Eiji Konishi, Mizue Shoda, Tomoyuki Suzuki, Takashi Kondo, Satoru Arai, Keiko Tanaka-Taya and Nobuhiko Okabe: Continued transmission and need for booster doses in an endemic country. Vaccines for Viral Infections in Developing Countries Workshop, Yokohama

(2006).

Tomohiro Ishikawa, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Souichi Nukuzuma, Takashi Kondo, Eiji Konishi: A West Nile DNA vaccine elicits effective immune responses in mice by simultaneous administration with the commercial inactivated vaccine. Fortieth Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program, Sendai (2006).

Takegami T, Murakami M, Kamimura K, Ota T: Japanese encephalitis virus isolation from mosquitoes in Ishikawa, Japan and inhibitory effect of RNAi on JEV replication. 7th Asia-Pacific Congress of Medical Virology New Delhi (2006, 11)

Yoshimatsu, K. Okumura, M. Nakamura, I., Taruishi, M. Pattamadilok, S. Kumperasart, S., Chandy, S., Sridharan, G Ibrahim, I. N., Erlina, S., Truong, N. and ARIKAWA, J.: Prevalence of hantavirus antibody in humans and rodents in southeast asia: U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 40th Joint Working Conference on Viral Diseases. Sendai (2006. 7)

Ibrahim IN, Erlina S, Sumarno, Ariati Y, Yoshimatsu K, Arikawa J: Rodents, Shrews, Ektoparasites and Diseases at Thousand Islands District, Jakarta Province, Indonesia: 3rd International Conference on Rodent Biology and Management. Hanoi (2006, Aug 28 - Sep 1)

Rost S, Pelz HJ, Bajomi D, León V, Yoshimatsu K, Song KJ, Mueller CR: Novel sequence variants of the VKORC1 gene in rodents from potential warfarin-resistance areas in Europe, East-Asia and both Americas.: 3rd International Conference on Rodent Biology and Management. Hanoi (2006, Aug 28 - Sep 1)

Yoshimatsu K, Okumura M, Nakamura I, Taruishi M, Pattamadilok S, Kumperasart S, Chandy S, Sridharan Ibrahim IN, Erlina S, Truong N, Arikawa J: Prevalence of hantavirus antibody in humans and rodents in southeast asia: 3rd International Conference on Rodent Biology and Management. Hanoi (2006, Aug 28 - Sep 1)

Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC18m8, lacking B5R membrane protein expression protects monkeys from monkeypox. 12th International Conference of Infectious Diseases, Lisbon, Portugal (2006. 6)

Yokote H, Shinmura Y, Satou A, Kanehara T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Kurata T, Hashizume S. Safety and efficacy of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in animals. 12th International Conference of Infectious Diseases, Lisbon, Portugal (2006. 6)

Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Kurata T, Hashizume S. Safety and efficacy study of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in animals. ASM Biodefence Research Meeting, Washington DC, USA (2006. 2)

Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N : Expression and Self-Assembly of Virus-Like Particles from the Full-Length Sapovirus Genome in Insect Cells. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 40th Joint Working Conference on Viral Diseases. Sendai (2006. 7)

Komoto, S., Sasaki, J., Taniguchi, K.: Reverse genetics for rotavirus: U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, The 40th Joint Working Conference on Viral Diseases. Sendai (2006. 7)

Taniguchi, K., Sakon, N., Wakuda, M., Yui, A., Maeno, Y., Yoshikawa, T., Asano, Y.: Two topics on rotavirus researches: Antigenemia in human rotavirus infection and development of reverse genetics system for rotavirus. The 6th China-Japan International Conference of Virology. Shanghai, China (2006, 6)

Nakagomi T, Nakagomi O, Ueda S.: A whole-virion inactivated rotavirus vaccine: an alternative approach to immunization against rotavirus diarrhea. The Fortieth Joint Working Conference on Viral Diseases: US-Japan Cooperative Medical Science Program, Sendai (2006. 7)

Nakagomi O, Glass RI.: Prospect for and challenges to rotavirus vaccines. The Fortieth Joint Working Conference on Viral Diseases: US-Japan Cooperative Medical Science Program, Sendai (2006. 7)

Nakagomi O, Uchida R, Pandey BD, Sherchand JB, Ahmed K, Yokoo M, Nakagomi T, Cuevas LE, Hart CA.: Molecular epidemiology of rotavirus in Nepal: An emergent threat of G12 strains. The Ninth Double-stranded RNA Virus Symposium. Cape Town, South Africa (2006. 10)

Morimoto K.: Rabies situations in the world – the virus structure, pathogenesis, diagnosis and control. 中国狂犬病防疫研討会 南京市中国 2006年5月

Morimoto K.: Rabies detection Academic conference on Rabies in 2006, Beijing, October

2) 国内学会

好井健太郎、後藤明子、小原真弓、川上和江、伊川綾江、荻和宏明、高島郁夫：ウイルス様粒子を用いたフラビウイルスの粒子形成機構の改正、および診断法・予防法への応用：第 141 回日本獣医学会、つくば (2006, 3)

荻和宏明、Lokugamage, N., 谷川洋一、萩谷友洋、Lokugamage, K., 吉松組子、有川二郎、高島郁夫：タイリクヤチネズミに保有されるハンタウイルスの分離の試み：：第 141 回日本獣医学会、つくば (2006, 3)

原田祐里、好井健太郎、伊川綾江、荻和宏明、高島郁夫：レプリコンを利用したウエストナイルウイルスとダニ媒介性脳炎ウイルスのキメラウイルス様粒子の作製：第 142 回日本獣医学会、山口 (2006, 9)

白戸憲也、三次洋嗣、荻和宏明、高島郁夫：エンベロープ蛋白の糖鎖付加配列の有無がウエストナイルウイルス感染マウス腹腔マクロファージからの炎症性サイトカインの分泌に及ぼす影響：第 142 回

日本獣医学会、山口 (2006, 9)

好井健太郎、小原真弓、後藤明子、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス様粒子を用いた ELISA 法による血清疫学的診断法の開発：第 54 回日本ウイルス学会、名古屋(2006, 11)

中内美名、好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫：SARS コロナウイルスのウイルス様粒子の作製：第 54 回日本ウイルス学会、名古屋(2006, 11)

石川知弘、Peter W Mason、小西英二：3' 非翻訳領域の欠失により抑制される日本脳炎ウイルス増殖能の哺乳類細胞内における回復。第 41 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2006)。

山中敦史、小西英二：デング抗体依存性感染増強活性の簡便な測定法。第 41 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2006)。

井本淳一、石川知弘、小西美佐子、村上賢二、林 昌宏、濱野正敬、高崎智彦、倉根一郎、小西英二：ブタにおける日本脳炎 DNA ワクチンおよびタンパクワクチンの混合投与による中和抗体の誘導。第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (2006)。

山中敦史、小西英二：デング抗体依存性感染増強活性及び中和活性の簡便・迅速な測定法。第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (2006)。

北井陽子、近藤高志、小西英二：ウマのウエストナイルウイルス感染と日本脳炎ウイルス感染を鑑別する ELISA 法の確立。第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (2006)。

糸田川優、山中敦史、小西英二：デング 1 型及び 3 型ウイルスに対するマウスモノクローナル抗体を用いた中和活性及び抗体依存性感染増強活性の解析。第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (2006)。

山中敦史、小西英二：デング抗体依存性感染増強試験に及ぼす補体の影響。第 13 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (2007)

北井陽子、近藤高志、小西英二：補体媒介性細胞傷害を利用した日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定法：ウマ血清における検討。第 13 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (2007)。

村上 学、上村 清、及川陽三郎、竹上勉：石川県における野外蚊からの JEV 分離。第 41 回 日本脳炎ウイルス生態学研究会、長崎、(2006. 5)

竹上 勉、村上 学、奴久妻聡一：日本脳炎ウイルス非構造蛋白 NS4a 及びゲノム 3' UTR 変異とウイルス病原性、第 54 回日本ウイルス学会、名古屋 (2006, 11)

村上 学、奴久妻聡一、竹上 勉：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける siRNA の抗ウイルス作用とマウスの自然免疫応答、第 54 回日本ウイルス学会、名古屋 (2006, 11)

竹上 勉、村上 学、太田隆英、奴久妻聡一：日本脳炎ウイルス病原性と関わるウイルス非構造蛋白 NS4a 及びゲノム 3' UTR の変異、日本分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋、(2006, 12)

吉松組子、奥村恵、垂石みどり、中村一郎、有川二郎：クマネズミ (*Rattus rattus*) 由来ハンタウイルス：第 54 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋 (2006. 11)

垂石みどり、吉松組子、荒木幸一、奥村恵、中村一郎、梶野喜一、有川二郎：ハンタウイルス持続感染モデルマウスにおけるウイルス特異的 T 細胞の解析：第 54 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋 (2006. 11)

奥村恵、吉松組子、垂石みどり、中村一郎、有川二郎：TULA 型ハンタウイルス鑑別診断系の作成と PUU 型との抗原性比較：第 54 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋 (2006. 11)

西條政幸、網康至、須崎百合子、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、緒方もも子、福

士秀悦、水谷哲也、倉根一郎、佐多徹太郎、
倉田毅、森川茂. サル痘ウイルス Zr-599 株
(コンゴ盆地型) と Liberia 株 (西アフリ
カ型) の霊長類における病原性. 第 54 回日
本ウイルス学会学術集会, 名古屋
(2006. 11)

衛藤真理子、大野貴文、野口 章、井上 智、
須永 裕: 国際標準法による輸入犬の狂犬病
ワクチン抗体保有状況調査: 第 141 回日本獣
医学会学術集会、つくば (2006、3)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も
含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書

ウイルス感染症の疫学

分担研究者 高島 郁夫 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

研究要旨:ダニ媒介性脳炎(TBE)と日本脳炎(JE)の臨床症状が類似しており、血清学的な試験では TBE ウイルスと日本脳炎ウイルスの間の交差反応が高いため、鑑別診断の開発の必要がある。本研究では TBE ウイルス Oshima 5-10 の prM/E タンパクを哺乳動物細胞において発現させたところ培養上清中に準ウイルス粒子(SP_s)が分泌された。この SP_sを用いて TBE ウイルス特異的な IgM と IgG 抗体を検出でき酵素抗体法(ELISA) (各々 SP-IgG ELISA, SP-IgM ELISA と呼ぶ)を開発した。ロシアハバロフスクの脳炎患者からの中和抗体陽性の 83 例の血清中、82 例が SP-IgG ELISA 陽性となり、98.8%の高い感度を示した。この値は市販の ELISA キットの値より高かった。中和試験陽性の 17 検体のうち、16 検体(94.1%)が SP-IgM ELISA で陽性であった。中和試験で判定できなかった 15 例の患者血清の内、11 例が SP-IgM ELISA で陽性となった。SP-IgG と SP-IgM ELISA は JE ウイルス抗体とは交差反応を示さなかった。この結果は今回の ELISA が TBE 特異抗体の検出に有用であることを示している。

A. 研究目的

ダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に属し、重篤な脳炎を起す人獣共通感染症の原因ウイルスである。TBE ウイルスにはヨーロッパ型、シベリア型および極東型の3つの主要な遺伝子型がある。各種のダニ媒介性脳炎の血清学的診断法が用いられているが、中和試験は特異性が高いため、2つ以上のフラビウイルスが存在する地域で使用されている。しかし中和試験は生ウイルスを用いるため高度安全実験室で熟練した技術が必要とされ、処理検対数が限られまた反応に時間がかかるなどの制限がある。

今回 TBE ウイルスの PrME タンパクを哺乳動物細胞に発現させたところ上清に準ウイルス粒子(SP_s)が分泌された。そこで本研究では、SP_sを用いて安全で精度の高い血清反応として ELISA を開発した。

B. 研究方法

ウイルス、血清、中和試験; JE ウイルス JaGAR-01 株と TBE ウイルス Oshima5-10 株を用いた。被検血清は 1998 年ロシアハバロフスクで TBE を疑われた患者からの血清を用いた。JE 陽性血清はネパールの患者血清 10 例である(国立感染症研究所 倉根一郎博士より分与)。中和試験は 96 穴プレート上の BHK 細胞を用いて、フォーカス減少法によ

り実施した。

プラスミドとタンパクの発現;組み換え蛋白発現は、TBE ウイルス RNA を鋳型として合成した cDNA の prM、E 蛋白領域を発現ベクター-pCAGGS プラスミドにクローニングし、得られたプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクトして行った。

ELISA の術式;SP-IgG ELISA は単クローン性抗体 1H4 を 96 穴プレートにコートし、次に TBE ウイルス SPs、被検血清、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体を順に反応させ、最後に p-ニトロフェニールフォスフェートによる呈色反応を行った。SP-IgM ELISA は 96 穴プレートに抗ヒト IgM 抗体をコートし、次に被検血清、TBE ウイルス SPs、ビオチン標識単クローン性抗体 1H4、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビンを順に反応させ、最後にテトラメチルベンチジンにより呈色反応を行った。

(倫理面への配慮)

すべての検体は脳炎を発症した患者の診断を目的として採取され、結果は患者の診断に用いられた。

C. 研究結果

1) SP-IgG ELISA TBE を疑われた 95 例の血清について中和試験と SP-IgG ELISA で感度と特異性を比較した。83 例の中和試験陽性血清は SP-IgG ELISA で 82 例が陽性で感度は 98.8% (82/83) であった (Table 1)。中和試験で陰性であった 12 例の血清は SP-IgG ELISA ですべて陰性で、特異性は 100%

(12/12) であった。

2) SP-IgM ELISA

34 例の患者の組血清について中和試験と SP-IgM ELISA の成績を比較した。中和試験で陽性と判定された 17 例のうち SP-IgM ELISA では 16 例が陽性と判定された。中和試験で陰性の 2 例の血清は SP-IgM ELISA においても 2 例とも陰性であった。中和試験で判定不能であった 15 例の血清のうち、11 例が SP-IgM ELISA で陽性となった。

3) JE ウイルスとの交差反応

JE 患者血清 10 例について SP-ELISA について交差反応性を調べた。10 例はすべて SP-IgG または SP-IgM ELISA において陰性であった。

D. 考察

本研究では PrME を含むプラスミドをトランスフェクトした哺乳動物細胞上清より回収した抗原を用いた新しい ELISA を開発し、中和試験と比較した。

SP-IgG ELISA は中和試験と比較して高い感度 (82/83、98.8%) と特異度 (12/12、100%) を有していた。これらの成績は SP-IgG ELISA が中和試験に代わる血清診断法となりうることを示している。SP-IgG ELISA の抗原として用いた SPs は培養上清から精製も固定もなしで濃縮されただけのものであり、E-タンパク特異的な単クローン性抗体が捕捉抗体として用いられた。これにより SP-IgG ELISA の高い感度と特異度が得

られたのかも知れない。

SP-IgM ELISA は中和試験よりも優れた血清診断法であることが示された。17 例の中和試験で陽性血清のうち 1 例のみが SP-IgM ELISA で陰性であった。組血清で 15 例は中和試験で判定ができなかったが、SP-IgM ELISA においては 11 例が陽性で 4 例が陰性であった。

黄熱ウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルスや JE ウイルス等のフラビウイルスの感染やワクチン接種においては交差反応性抗体が誘導されることが判明している。今回開発した IgG-, IgM-ELISA は JE ウイルスにほとんど交差反応性を示さなかった。この理由は不明であるが、今回使用した抗原がフォルマリン等の不活化処理を施していなかったことに原因しているかも知れない。

新しく開発した ELISA 系は TBE ウイルスと JE ウイルスの両者が流行している日本において TBE の疫学調査や診断に有用であると考えられた

E. 結論

TBE の血清学的診断法として、SPs を抗原に用いた SP-IgG ELISA と SP-IgM ELISA を開発した。両法とも感度と特異性に優れた精度の高い診断法であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

Obara, M., Yoshii, K., Kawata, T., Hayasaka, D., Goto, A., Mizutani, T., Kariwa, H., and Takashima, I.: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of tick-borne encephalitis using subviral particles. *J. Virol. Methods*. 134:55-60, 2006

2.学会発表

1) 好井健太郎、後藤明子、小原真弓、川上和江、伊川綾江、苺和宏明、高島郁夫: ウィルス様粒子を用いたフラビウイルスの粒子形成機構の改正、および診断法・予防法への応用: 第 141 回日本獣医学会、つくば (2006, 3)

2) 苺和宏明、Lokugamage, N., 谷川洋一、萩谷友洋、Lokugamage, K., 吉松組子、有川二郎、高島郁夫: タイリクヤチネズミに保有されるハンタウイルスの分離の試み: 第 141 回日本獣医学会、つくば(2006, 3)

3) 原田祐里、好井健太郎、伊川綾江、苺和宏明、高島郁夫: レプリコンを利用したウエストナイルウイルスとダニ媒介性脳炎ウイルスのキメラウイルス様粒子の作製: 第 142 回日本獣医学会、山口(2006, 9)

4) 白戸憲也、三次洋嗣、苺和宏明、高島郁夫: エンベロープ蛋白の糖鎖付加配列の有無がウエストナイルウイルス感染マウス腹腔マクロファージからの炎症性サイトカインの分泌に及ぼす影響: 第 142 回日本獣医学会、山口(2006, 9)

5) 好井健太郎、小原真弓、後藤明子、苺和

宏明、高島郁夫:ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス様粒子を用いた ELISA 法による血清疫学的診断法の開発 :第 54 回日本ウイルス学会、名古屋(2006, 11)

6) 中内美名、好井健太郎、苅和宏明、高島郁夫:SARS コロナウイルスのウイルス様粒子の作製:第 54 回日本ウイルス学会、名古屋(2006, 11)

7) Yoshii, K., Goto, A., Obara, M., Kawakami, K., Kariwa, H., and Takashima, I.: Involvement of conserved region of flavivirus prM protein in virus particle budding. 40th Joint Working Conference on Viral Diseases, Sendai, (2006, 7)

8) Kariwa, H., Tanikawa, Y., Nur Hardy A.D., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J.,

Takashima, I.: Establishment of animal model for Puumala virus infection in Syrian hamsters. 40th Joint Working Conference on Viral Diseases, Sendai, (2006, 7)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（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

新規日本脳炎ウイルスNS1抗体測定法：補体媒介性細胞傷害の利用

分担研究者 小西 英二 神戸大学医学部医療基礎学講座 助教授

研究要旨

日本脳炎ウイルス（JEV）のNS1抗体測定は、不活化ワクチン接種集団の中で自然感染個体を識別する方法となる。すでに免疫染色を利用した測定法を開発したが、結果を肉眼で判定するため、検査者によって結果が異なる可能性が否定できなかった。本研究では、ヒト血清中のNS1抗体測定を目的として、補体媒介性細胞傷害を利用した新しい測定法を確立した。具体的には、NS1発現細胞を被検血清と氷上で静置した後、ウサギ補体を加え、放出された乳酸脱水素酵素活性により細胞傷害率を測定する。すでにELISA法が確立されているウマ血清を用いて新規法を評価した結果、新規法は免疫染色法やELISA法と有意の相関を示した。また、一点法でも終末点法でも測定結果を示すことが可能であった。さらに、新規法は操作が簡便であり、結果を客観的に得ることができた。

A. 研究目的

日本脳炎はヒトやウマに致死的な脳炎を引き起こす。過去には年間千例以上を示した患者や患畜数は近年減少した。ワクチンの効果や蚊の減少に起因すると考えられている。一昨年、ワクチン接種による副反応の問題から勧奨接種が中止となり、ワクチン接種率が低下傾向にある。日本脳炎の再興が懸念されるため、日本脳炎ウイルス（JEV）の自然感染状況の詳細なる調査が必要である。

国立感染症研究所はブタにおけるJEV感染を監視しており、現在でもJEVが活動していることを示してきた。しかし、豚舎が民家から離れた位置に移動した現在は、ブタにおける自然感染率が必ずしもヒトの自然感染率を反映するとは限らず、ヒト自体を対象とした自然感染状況の調査が必要と考えられる。

本研究室では、JEV自然感染状況を調査するために、NS1抗体測定法を開発してきた。すなわち、免疫染色に基づく方法と、ELISA法である。免疫染色法は、感度の高

い方法であるが、結果を肉眼で判定するため、検査者によって結果が異なる可能性が否定できなかった。一方、ELISA法は、結果を数値で得るため、免疫染色法より客観的な方法であった。また、免疫染色法は行程がやや煩雑であるのに対して、ELISA法は簡便であり、多数の検査が必要な疫学調査にはより適した方法であった。

これまで、ウマ血清においては免疫染色法とELISA法の両方が確立できた。しかし、ヒトでは免疫染色法のみで測定可能であり、ELISA法は種々の検討にもかかわらず成功しなかった。その理由として、ヒト血清では非特異反応が大きいために、不顕性感染により誘導される低いレベルのNS1抗体が測定誤差の範囲内に収まってしまふことが考えられた。

本研究では、免疫染色法に代わり疫学調査に有用な新しいNS1抗体測定法として、補体媒介性細胞傷害を利用した測定法の確立を試みた。ヒト血清中の抗体測定を目的とするが、今回は第1段階として、予備的にウマ血清を用いて評価した。ウマ血清にお