

いては、ELISA法が確立されており、免疫染色法とともに比較することにより、より正確な評価が可能である。

B. 研究方法

血清：すべての血清は、日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所の近藤高志博士より分与された。北日本（北海道）、中日本（群馬、埼玉、千葉、愛知）及び南日本（佐賀、大分、鹿児島）の競馬場及び乗馬クラブで1996-2000年に主としてサラブレッド種から採取された検体である。

NS1発現細胞：CHO細胞にJEV中山株のNS1遺伝子をpcDNA3ベクターにより導入した後、薬剤選択および限界希釈法により、ほぼ100%の細胞がNS1を発現するクローンを得た。この安定発現クローンを用いて、免疫染色法および新規法を行った。また、安定発現細胞から培養液に放出されたNS1抗原をELISA法に用いた。

免疫染色法：NS1発現細胞と非発現細胞を混合して作製した抗原（平成16年度厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）研究報告書「日本における近年の日本脳炎ウイルス自然感染状況：8県の住民を対象とした調査」参照）を使用し、ブロッキング液で被覆後、被検血清、ビオチン標識ヤギ抗ウマIgG（H+L）抗体、ABC試薬及びVIP基質を順次反応させた。顕微鏡下でNS1発現細胞と非発現細胞の染色強度の差が確認できる血清の最大希釈度を血清のNS1抗体価とした。

ELISA法：抗原捕捉ELISA法によりNS1抗体値を測定した。すなわち、プレートにウサギ抗NS1抗体を感作し、ウエルあたり3ngのNS1抗原と反応させた。次いで、被検血清、アルカリホスファターゼ標識抗ウマIgG、パラニトロフェニルリン酸と順次反応させた後、吸光度を測定した。各プレートに設けた陽性対照の吸光度の値が0.5になるように各検体の吸光度の値を補正した値をELISA値とし、0.122以上のELISA値を示した検体を陽性とした。

新規法：5 x 10⁴個のNS1発現細胞浮遊液に等量の非働化被検血清を混合し、氷上で30分間静置した。次にウサギ補体を最終濃度10%となるように加え、37℃で2時間保温した。遠心後、上清中の乳酸脱水素酵素

（LDH）量をロシュ社のCytotoxicity Detection Kit Plus (LDH) を用いて測定した。細胞傷害率（% cytotoxicity）は、 $100 \times (A-C)/(B-C)$ により計算した。ただし、Aは被検血清を用いて得られた吸光度、Bは1% Triton X-100で細胞を全て壊したときの吸光度、またCは血清を加えないで細胞から自然に放出されるLDHを反映した吸光度である。

（倫理面への配慮）

ウマ血清の使用は、日本中央競馬会競走馬総合研究所により承認された。

C. 研究結果

濃度依存曲線：階段希釈したウマ血清を用いて細胞傷害率を調べた。ELISA法で陽性の3検体と陰性の1検体を使用した（図1）。陽性検体では細胞傷害が示されたが、陰性検体では認められなかった。また、ELISAで値の高い検体ほど、高い血清希釈度で細胞傷害が示された。さらに、1点の血清希釈度に着目しても、ELISAの値と比例した細胞傷害が示され、一点法でも終末点法でも測定が可能であることが示唆された。

ELISA法と新規法（一点法）の比較：上記の実験（図1）で、弱陽性の検体（ELISA値：0.258）は血清希釈度が1：20の時には細胞傷害を示さなかったことから、一点法の血清希釈度は1：10とした。この条件下で、新規法とELISA法の間には有意で高い相関係数（0.841）が認められた（図2）。

新規法において陽性と陰性を区別するボーダーラインを決定するために、ELISAで陰性と判定された検体の平均細胞傷害率と標準偏差（SD）を求め、暫定的に平均に2倍のSDを加えて求められた23.0%をボーダーラインに設定した（図2）。

このボーダーラインに基づく判定とELISA法での判定を比較した結果を表1に示す。ELISA法に対する新規法の感度は81.5%、特異度は91.7%、一致率は86.3%であった。

一点法と終末点法の比較：次に、新規法の一点法と終末点法の結果を比較した（図3）。終末点法では、細胞傷害率が一点法でのボーダーラインである23.0%を下回らない最高血清希釈度を抗体価とした。その結果、一点法と終末点法の間には、有意に高

い相関が認められた。また、終末点法における抗体価1:10以上をNS1抗体陽性とした時、新規法の一点法と終末点法の一致率は100%であった。

ELISA法と新規法（終末点法）の比較：新規法の終末点法とELISA法の結果には、一点法とELISA法の比較（図2）同様、高い相関が認められた（図4）。感度、特異度、一致率に関しては、新規法の一点法と終末点法の一致率が100%であったため、表1と同じであった。

免疫染色法と新規法の比較：新規法の一点法と免疫染色法の結果にも有意な相関が認められた（図5）。しかし、ELISAとの相関よりも相関係数がやや低かった。同様に、終末点法と免疫染色法の間でも相関関係が認められたが、やや低い相関係数が示された（図6）。免疫染色法に対する新規法の感度は83.3%、特異度は85.1%、一致率は84.3%であった（表2）。

D. 考察

誘導される抗体レベルが低い場合、ELISA等の単なる抗原抗体反応をベースにした方法では、非特異反応の相対的な高さのために測定困難な場合がある。患者に誘導される高いレベルのNS1抗体はELISAで測定できるが、自然感染により誘導される低いレベルのNS1抗体を検出することは難しい。

本研究で開発した新しいNS1抗体測定法は、補体媒介性細胞傷害を利用した。すなわち、NS1発現細胞の表面にはNS1抗原が存在し、抗原に特異結合した抗体のFc部分に補体が結合することによりカスケード反応が起こる。次いで形成されたC5b-9複合体が細胞膜を傷害する。

被検血清にNS1抗体が存在しない場合、細胞傷害は起こらない。しかし、NS1抗体が存在する場合は細胞傷害が起こり、細胞からLDHが放出される。放出されるLDH量は細胞傷害の程度と比例することから、LDHが基質を分解することにより得られた吸光度はNS1抗体量を反映することになる。

上述のように、免疫染色法は結果の判定を肉眼で行うが、ELISA法や新規法では数字で結果を得ることができる。新規法との

比較において、免疫染色法がELISA法より相関係数が低くなったのは、このためであると考えられる。

新規法は、すべての反応を96ウエルのマイクロプレートで行うため、簡便であり、多数検体を短時間に処理する疫学調査に適する。抗原として用いる細胞を培養しておく必要があるため抗原分子のみを用いるELISA法に比較してやや煩雑な面があるが、反応回数はELISA法より少なく（ELISA法の5回に対して新規法は3回）、試験に費やす時間も短い（ELISA法の約5時間に対して新規法は3~4時間）。

ウマ血清を用いて、新規法は従来の免疫染色法に代替するNS1抗体測定法になり得る事が示された。少数のヒト血清を用いた予備試験では新規法によりNS1抗体を測定することが可能であった。ELISA法が適用できないヒトにおけるJEV自然感染状況調査への適用に期待できる。

E. 結論

補体媒介性細胞傷害を利用した方法により、ウマ血清中のNS1抗体の測定が可能であった。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Jun-ichi Imoto and Eiji Konishi: Dengue tetravalent 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

2. 学会発表

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).

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)。

H. 知的財産権の出願・登録状況

「ウエストナイルウイルス感染の鑑別方法」小西英二、国立大学法人神戸大学、特願 2006-236527

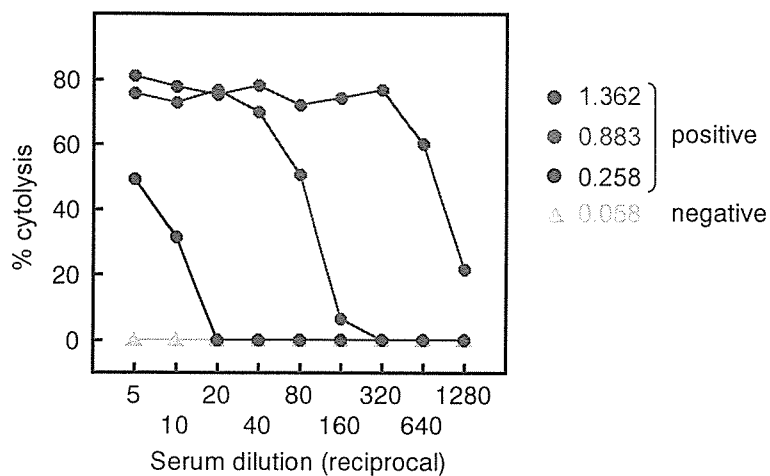


図 1. 各希釈度のウマ血清における細胞傷害率。血清希釈度は、細胞と混合する前の希釈度を表す。NS1 抗体値の異なる 4 種の血清を用いた。NS1 抗体値は、ELISA 法により求められ、その値を右側に示す。

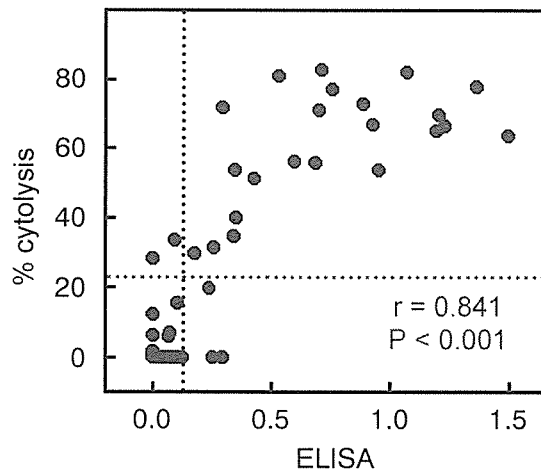


図 2. ELISA 法と新規法（一点法）の定量的比較。点線はボーダーラインを示す（ELISA 法では 0.122、新規法では 23.0%）。

表1. ELISA法と新規法の定性的比較。

New assay	ELISA		Total
	Positive	Negative	
Positive	22	2	24
Negative	5	22	27
Total	27	24	51

Sensitivity = 81.5%
 Specificity = 91.7%
 Consistency = 86.3%

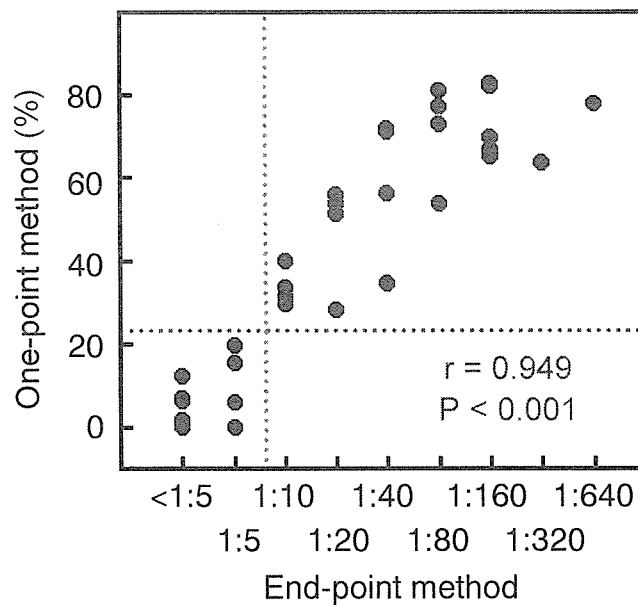


図 3. 新規法における一点法と終末点法の比較。点線はボーダーラインを示す。一点法では 23.0%以上を、終末点法では 1:10 以上を陽性とした。

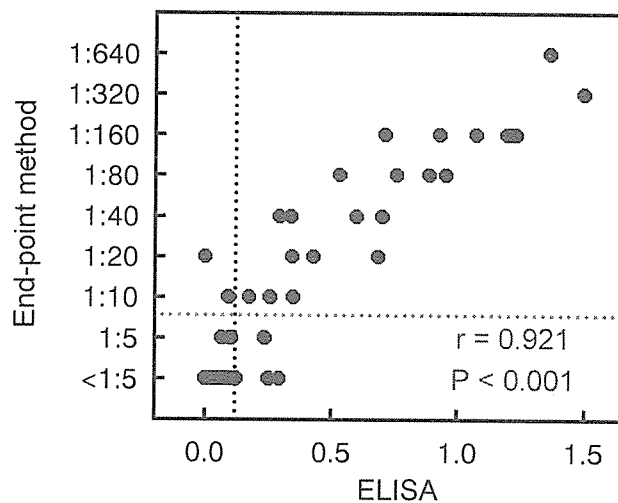


図 4. ELISA 法と新規法（終末点法）の定量的比較。点線はボーダーラインを示す。ELISA 法では 0.122 以上を、新規法では 1:10 以上を陽性とした。

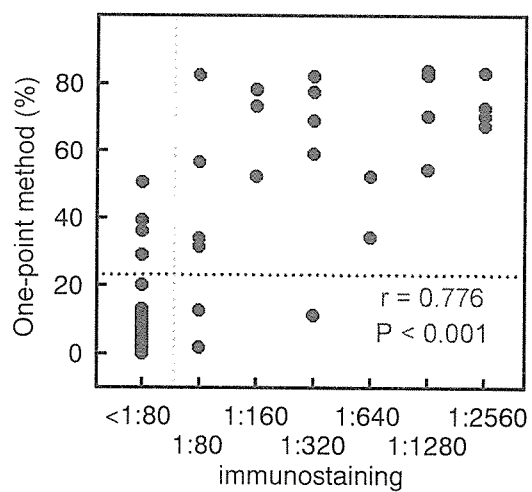


図 5. 免疫染色法と新規法（一点法）の定量的比較。点線はボーダーラインを示す。免疫染色法では 1:80 以上を、新規法では 23.0%以上を陽性とした。

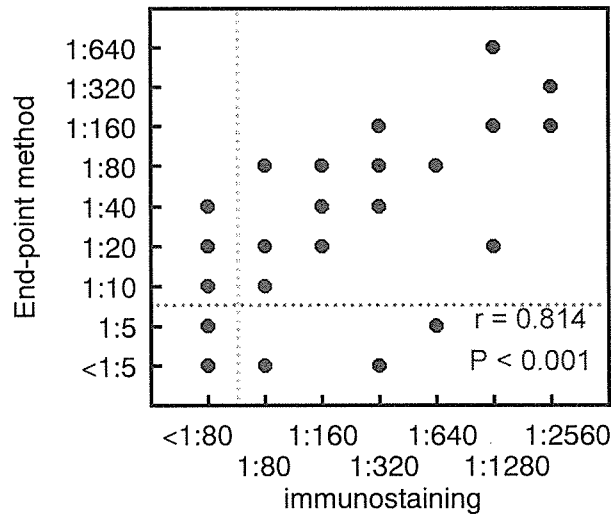


図 6. 免疫染色法と新規法（終末点法）の定量的比較。点線はボーダーラインを示す。免疫染色法では 1:80 以上を、新規法では 1:10 以上を陽性とした。

表 2. 免疫染色法と新規法の定性的比較。

New assay	Immunostaining		Total
	Positive	Negative	
Positive	20	4	24
Negative	4	23	27
Total	24	27	51

Sensitivity = 83.3%
 Specificity = 85.1%
 Consistency = 84.3%

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究： 日本脳炎ウイルスの疫学

分担研究者 竹上 勉 金沢医科大学総合医学研究所分子腫瘍学研究部門 教授

研究要旨：近年の日本国内における日本脳炎患者数は年間 10 名に満たない数で推移している。しかしながら、国内において日本脳炎ウイルス(JEV)がいなくなったわけではないことは明らかである。我々は石川県における野外蚊からの日本脳炎ウイルス(JEV)の分離を継続して行い、また JEV の病原性についての解析を行っている。最近では 2005 年に 1,759 匹、2006 年には 1,458 匹の蚊を採取し、RT-PCR 法及び培養 Vero 細胞を用いてウイルス分離を行っている。PCR 陽性サンプルの中から最終的に得られた分離ウイルスについてはヌクレオチド配列を決定した結果、遺伝子タイプ 1 型のウイルスであった。他方で遺伝子タイプ 3 型ウイルスも分離しており、現在の日本国内においては異なる遺伝子型ウイルスが混在していること、またこうした JEV 分布が北陸地域にもあり、そこには遺伝子タイプの異なるウイルス(1 型及び 3 型)が共存していることを示している。一方で、分離ウイルスの特徴であるゲノム RNA3' UTR におけるヌクレオチド欠失の生物学的意義を分子生物学的に解析し、ウイルス蛋白合成への影響があることを明らかにした。さらにこの差異はマウスに対する毒性にも影響していることが示唆された。

A. 研究目的

近年の日本国内における日本脳炎患者数は年間 10 名に満たない数で推移している。しかしながら、国外における流行拡大をみるまでもなく、日本脳炎ウイルス(JEV)がいなくなったわけではないことは明らかである。一昨年のインドでの大流行はよく知られているが、世界的には日本脳炎感染者は数万人になる。日本における JEV のウイルス分布状況を把握すること、さらにウイルス病原性発現の解明は、国内での日本脳炎発症に対する警戒を怠らず、脳炎大流行を抑えるためにも重要な課題といえる。我々は 1998 年以来、石川県における野外蚊から JEV の分離を試みている。本研究は定点、定時期での JEV 分布状況を調べ、また新分離ウイルス株の生物学的特性を遺伝子レベルから解析することを目的とする。

B. 研究方法

蚊の採集: 蚊採集のために蚊帳及びドライアイスによる CO₂ 採集法を用いた。蚊帳を張る場所は豚舎に近い稲田で行っている。

蚊の破碎液: 蚊 40 匹を 1 プールとして乳鉢にて PBS を入れ、破碎した。破碎液は遠心(10,000 x g、10 分間)にて分画した。

RNA 抽出及び RT-PCR: 蚊破碎液を材料として Isogen 試薬を用いて RNA 抽出を行った。得られた RNA を用いて RT-PCR を行った。RT-PCR では JEV 特異的プライマーのエンペロープ(E)蛋白、NS4a 蛋白領域、さらに 3' 末端領域のプライマーを用いた。

ウイルス分離法: ウイルス分離のために培養細胞株 Vero 細胞を用いた。24 穴プレートを用い、5% 牛胎児血清入りの MEM 培養液の中で Vero 細胞を継代し、そこに蚊抽出液を吸着させた。4-5 日間の培養の後、細胞変性の有無でウイルス存在を確認した。培養上清液については、さらに BHK 細胞を用いたウ

イルス力価を計測した。

遺伝子解析法: ウイルスゲノムに対応した複数のプライマーを用意し、PCR 産物をテンプレートにして直接的塩基配列解析法によりヌクレオチド配列を決定する。

機能解析: ゲノム RNA 末端 3' UTR の機能についてはルシフェラーゼレポーター法を用いて蛋白合成への影響を調べる。

(倫理面からの配慮について)

組換え DNA 実験については金沢医大組換え DNA 安全委員会への申請許可の基に行い、マウス実験における注意事項は金沢医大動物委員会申請許可等を受けて行っている。

C. 研究結果

採集蚊数は 2005 年に 1,759 匹、2006 年には 1,458 匹であったが、蚊破砕液を用いて RT-PCR 法によって複数の陽性サンプルを得た。さらに Vero 細胞利用のウイルス分離によって少なくとも 1 種類の JEV を分離し、E 蛋白、NS4a 蛋白等の遺伝子解析を行った。E 蛋白の比較からみても分離ウイルス (Ishikawa-K05) の遺伝子タイプは 1 型であり、3' UTR 領域にはヌクレオチド欠失がみられたヌクレオチド欠失 3' UTR を含む発現ベクターを構築し、ルシフェラーゼレポーター法によって調べた結果、蛋白合成活性は 3 型ウイルス (JaGAR01) のその 50% 程であった。また分離ウイルス (Ishikawa-K05) をマウスに接種し、毒性を調べたところ、マウスに対する毒性は JaGAR01 株の 1/100 ~ 1/1000 であった。

C. 考察

新たに分離したウイルス株 (Ishikawa-K05) についての遺伝子解析の結果から、3' UTR ヌクレオチド欠失はウイルス病原性に影響を及ぼすことが明らかになった。Ishikawa-K05 株のマウスに対する病原性は低下していたが、他の領域における変異に起因する生物活性への影響も推察される。ただし、現在、国内において分布しているウイルスが全て毒性が低下していることにはならない。引き続き分布ウイルスの分離、遺伝子レベルからの解析を継続していくことが重要といえる。我々は JEV 感染対策として RNAi の活用を検討しており、細胞レベル及びマウス感染実験でウイルス増殖抑制効果があることを確認している (Murakami

et al., 2005)。近い将来起こる可能性のある日本脳炎の感染、流行を防ぐためには先に述べたようにウイルスの遺伝子解析と共に、ウイルス複製制御の解析を行っていく必要がある。

E. 結論

日本国内各地に JEV は分布している。石川県下で分離された JEV 新分離株の遺伝子タイプは 1 型であり、その病原性は以前の JEV 株よりも低いものであったが、今後のウイルス変動に注目すべきである。

F. 健康危険情報

病原性のある日本脳炎ウイルスが北陸においても、野外蚊が保有し、存在していることに注意が必要であろう。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takegami T: Japanese encephalitis virus RNA synthesis *in vivo* and *in vitro*. J Kanazawa Med Univ, 30: 560-566, 2005
- 2) Tateishi U, Hasegawa T, Nojima T, Takegami T, Arai Y: MRI features of extraskeletal myxoid chondrosarcoma. Skeletal Radiol. 35, 27-33, 2006
- 3) Guo J, Higashi K, Ueda Y, Oguchi M, Takegami T, Toga H, Yokota H, Katsuda S, Tonami H, Yamamoto I: Microvessel density: Correlation with FDG uptake and prognostic impact in lung adenocarcinomas. J Nucl Med 47:419-425, 2006
- 4) Ota T, Maeda M, Murakami M, Takegami T, Suto S, Tatsuka M: Activation of Rac1 by Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor- β with defective isoprenyl-binding pocket. Cell Biology International, (in press) (2006)
- 5) Ota T, Maeda M, Suto S, Zhou X, Murakami M, Takegami T, Tatsuka M: RhoGDI β lacking the N-terminal regulatory domain suppresses metastasis by

promoting anoikis in v-src transformed cells.

Clinical and Experimental Metastasis (in press) (2006)

- 6) 竹上 勉: 日本脳炎ワクチン, 化学療法の領域, 22: 31-37, 2006

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)

- 4) 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)
- 5) 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）
分担者研究報告書

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

新規ワクチンによる日本脳炎の予防

分担研究者 倉田 毅 富山県衛生研究所 所長

研究要旨

東南アジアからインドに及ぶ日本脳炎流行を予防するには、広範な予防接種に伴う財政圧迫を最小限に止める、より安価・安全な新規ワクチンを必要とする。そこで、我々が開発した日本脳炎ウイルスVLP(Virus-Like Particle)抗原のバイオプロデューサー細胞技術を用いて、新規VLPワクチンの実用化を視野に入れた研究開発を進めた。即ち、GMPに対応した、①混入リスク因子の検討、②産生細胞株と細胞培養用牛胎児血清(FBS)の検討をふまえ、③細胞株とFBSロットを選定して、④VLP抗原産生活性を比較し、GMP合致細胞株樹立に着手した。

A. 研究目的

東南アジア～インドにおける重大なフラビウイルス感染症の1つである日本脳炎は、一昨年インドで大流行を引起し、ワクチンによる予防の有効性・重要性を示した。現存する唯一のワクチンは我国の感染マウス脳由来ワクチンであるが、脳物質の混入リスクを負う。そのため、組織培養由来ワクチンが我国で開発され、脳由来ワクチンとの交代が今後の課題となっている。

しかし、流行地域の人口数・経済状況による財政負担がワクチン接種の障壁となる。そこで、我々のバイオプロダクター細胞技術(特願 2002-229597)による安価なVLP日本脳炎ワクチンは大きく貢献できよう。ただ、本技術で使用したRK-13細胞はバイオ医薬品製造株としての国際的承認がない。

そこで、①既承認株中からVLP産生可能なRK-13細胞に代る細胞株の検索、②樹立過程に必須ながらリスク因子迷入源となる牛胎児血清(FBS)の検討を

実施して、GMP対応のVLP抗原大量生産細胞株を樹立することを目的とした。

B. 研究方法

培養細胞株：RK-13細胞は当研究室継代株、ATCC・CCL-37の5代継代株；Vero細胞、MRC-5細胞は阪大微研会より分与のワクチン製造株；CHO細胞はATCCより購入のCCL-61株、理化学研究所より購入の3種の接着性及び浮遊細胞株；その他の細胞は当研究室継代株、を用いた。ウイルス：阪大微研会より分与のJEV北京株を用いた。プラークアッセイ：Vero細胞を用いて定法によりウイルス価を測定した。蛍光抗体法・ウエスタンブロット法：チャンバースライド上で培養した感染細胞をアセトン固定し検索標本に用いた。ウイルス抗原はSDS-PAGE後トランスファーした。抗体は何れもウサギ抗-JEV血清を用いた。ELISA：E蛋白抗原量をサンドイッチELISAで定量した。FBSのBVDV RNA検出：FBSから抽出

した全 RNA より BVDV(牛ウイルス性下痢症ウイルス)の 5'末端非翻訳領域を RT-nested PCR 法で増幅し RNA ゲノムを検出した。

(倫理面からの配慮について)

該当事項なし。

C. 研究結果

(1) RK-13 細胞が JE-VLP 高産生細胞株に転換可能であった要因として、JEV 感染低感受性、或は、ウイルス増殖に伴う細胞融合・細胞融解抵抗性であることが考えられる。そこで、ワクチン製造に用いられる JEV 増殖用 Vero 細胞と RK-13 の比較検討を行った。

まず、50 或は 100pfu の JEV を単層細胞に接種しプラーク形成の有無を調査したところ、Vero 細胞では 3 日目には観察されたが、RK-13 細胞には 5 日後でも生じなかった。

低ウイルス量(moi=0.1)の JEV 感染で Vero 細胞は、感染 2 日をピークに 2×10^8 pfu/ml 以上のウイルス価を示し、細胞融合・巨細胞形成・細胞融解を生じた。また、間接蛍光抗体法でウイルス抗原が強陽性であった。これに対して RK-13 細胞では、CPE も観察されず、ウイルス抗原陰性で、培養上清中のウイルス価は Vero 細胞の約 1/1,000 の低値を示し、接種ウイルス量の 3 倍程度の上昇しか観察されなかった。

また、高ウイルス量(moi=5)で感染させても RK-13 細胞培養上清には接種ウイルス量の 1/100(2×10^5 pfu)以下の感染価しか検出されず、細胞抽出液及び培養上清超遠心画分何れにもウエスタンブロットで Vero 細胞に観察される JEV E 蛋白は検出されなかった。

(2) JEV 感染に対して RK-13 細胞と同様の性質を保持する培養細胞株を見出すため、ワクチン製造、バイオ医薬品製造においてこれまでに使用・承認されている細胞株の JEV 感染感受性を調査した。その結果、MRC-5 ヒト 2 倍体細胞及び

CHO チャイニーズハムスター由来細胞が JEV 感染に抵抗性であった。

(3) JEV と同一血清型に属する WNV の E 蛋白発現ベクターを用いて、MRC-5、CHO 細胞における VLP 産生活性をトランスフェクション系で RK-13 細胞と比較した。その結果、CHO 細胞培養上清中には RK-13 細胞を上回る E 蛋白の放出が ELISA で示された。この E 蛋白はピリオンを沈降させる超遠心条件で沈降画分に濃縮された。一方、MRC-5 細胞は細胞増殖が極めて緩慢で、かつ、使用したトランスフェクション試薬の細胞毒性に対して感受性が高いため、E 蛋白発現量は微量であった。

(4) GMP 対応の VLP 発現細胞株を樹立するには、培地添加 FBS 中の BVDV 迷入否定試験が必要となる。そこで、培地 100 μ l 抽出核酸の RT-PCR で BVDV RNA を同定できる高感度検出法を確立し、国際獣疫事務局が BSE/FMD 非感染国に指定した原産国の FBS 22 ロットを調査した。その結果、BVDV RNA 陰性 FBS を 2 ロット見出した。塩基配列解析では、陽性 FBS RNA は GenBank 登録の BVDV 生ワクチン株配列とは異なる型であった。ロットサイズの大きい陰性ロットを使用 FBS に選定した。

D. 考察

JEV ワクチン製造に用いる Vero 細胞は高いウイルス増殖支持能を持つ。しかし、VLP 産生細胞への転換を試みると、発現ウイルス蛋白による CPE で死滅するか、樹立過程で発現が停止するか、発現しても極微量である。

これに対して、我々がバイオプロデューサー開発に用いた RK-13 細胞は、CPE を生ずることも無く、長期・安定・大量に VLP を産生し続ける。本研究において、RK-13 細胞の JEV 感染低感受性・CPE 抵抗性が VLP プロデューサーとして優れた形質を発揮した要因であることが明らかになった。

しかしながら、我々の RK-13 細胞は BVDV 陰性であるものの、樹立開始以前の継代歴等履歴の記録に不明部分が存在する。明確な履歴を持つ ATCC・RK-13 (CCL-37)細胞は、BVDV に汚染されていることが報告されており、ワクチン・医薬品等の製造に用いるには、陰性化の過程が必須で、承認には困難を伴い、開発費圧力は価格上昇をもたらす。

従って、RK-13 細胞と同等の JEV 感染抵抗性・VLP 発現活性を持つ細胞株を、ワクチン製造・医薬品製造等に使用・承認された細胞の中から選別することが重要になる。本研究において、この条件に必要なかつ十分に合致する細胞株を見出すことに成功した。

他方、培地添加 FBS が迷入ウイルス等のリスク源となる。ATCC の RK-13 細胞等多数の細胞株の BVDV 汚染は培養用 FBS が原因である。バイオ医薬品製造国際ガイドラインで否定試験が要請されるウイルス中、56°C・30 分非動化処理で不活化が困難なのは BVDV である。大線量の γ 線照射が推奨されているが、BVDV-free FBS は重要なポイントである。本研究でも調査した大多数の FBS ロットが BVDV ゲノム陽性であった。しかし、ロットサイズの大きな陰性 FBS に遭遇することができた。

以上の結果、実用化開発研究移行への基盤は整ったと思われる。現在、選定した細胞株の迷入ウイルス否定試験を終了し、選定した FBS を用いた培養系で GMP 合致細胞株樹立研究を進めている。

E. 結論

GMP に対応した安価な新規日本脳炎ワクチン開発のため、①JEV 感染・CPE 誘導抵抗性、かつ、VLP 産生高活性細胞をワクチン/医薬品製造使用・承認株から選別し、②リスク因子 free FBS を選別し、③これらを用いて VLP 産生細胞株樹立に着手した。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

ハンタウイルス感染症の診断法

分担研究者 有川 二郎 北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設 教授

研究要旨:昨年度までの研究で、アジアにおけるハンタウイルス感染症の流行を診断するために、新たに2種類のハンタウイルス(Thailand (THAIV))および Thottapalayam virus (TPMV)抗体を検出・鑑別する系を確立した。一次スクリーニングとして、Hantaan (HTNV)/Puumala (PUUV)/Sin Nombre (SNV)/TPMV 抗原を用いたスクリーニング ELISA を実施する。その後、HTNV に陽性の場合にはさらに HTNV/Seoul (SEOV)/Dobrava (DOBV)/THAIV の鑑別 ELISA を用いて、罹患ウイルスタイプを決定する。今年度はこの系を用いて疫学的調査を行い、インドおよびベトナムにおける不明熱患者・齧歯類の調査を継続した。その結果、インドで不明熱患者の中から新たな陽性例を見いだした。ベトナムでは齧歯類の疫学的調査を継続して行き、分子疫学的調査を拡大した。その結果東南アジアの SEOV は独自のクレイドを形成する可能性が示された。さらに、診断・鑑別を行うことのできる範囲を拡大するため、PUUV 関連ウイルスの中で Tula virus (TULAV)と PUUV の診断抗原を作成し、中和抗体価と比較することによって鑑別抗原の必要性について検討した。

A. 研究目的

ハンタウイルス感染症は、げっ歯類媒介性の人獣共通感染症で、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)が知られている。ハンタウイルスのうち、Hantaan (HTNV)、Seoul (SEOV)、Dobrava (DOBV) および Puumala (PUUV)の少なくとも4つの血清型がHFRSの原因となる。また Sin Nombre virus (SNV)を始めとするアメリカネズミ亜科のげっ歯類によって媒介されるハンタウイルスはHPSの原因ウイルスである。HTNV および

SEOV および DOBV はネズミ亜科のげっ歯類、そして PUUV はハタネズミ亜科のげっ歯類によって媒介される。3つのグループのウイルスは互いに抗原性が大きく相違し交差反応性が低いことから、ハンタウイルス感染症の血清診断を行うためには少なくとも3種類の抗原が必要であると考えられる。また、げっ歯類からハンタウイルス抗原を検出する場合でも、3種類の抗血清が必要である。

げっ歯類は南アジア地区を起源に発生したと考えられており、このためアジアには特にネ

ズミ亜科のげっ歯類げっ歯類の種類が豊富である。また、研究報告は少ないものこのまでに、病原性との関連が明らかでないハンタウイルスが数多く報告されている。このため、不明熱とされている症例の中にハンタウイルス感染症が存在する可能性も考えられている。タイではネズミ亜科齧歯類である *Bandicota indica* から分離された THAIV が報告されている。また、インドにおいて食虫目のスクスより分離されたハンタウイルス Thottapalayam virus (TPMV) は他のハンタウイルスとは抗原的にも遺伝子配列の比較においても最もへただったハンタウイルスである。本研究では、これらのウイルスに罹患した患者あるいは齧歯類・食虫類を検出することを目的として、TPMV を含むスクリーニングシステムを確立してきた。診断抗原にモノクローナル抗体 E5/G6 のエピトープのタグを導入し、これまでに確立した既報の各種ハンタウイルス抗原と同様に 抗原捕捉 ELISA を行うことによって血清の反応性を比較検討できる系を確立した。さらにアジア地区にはハタネズミ亜科の齧歯類も多く棲息し、極東地区では病原性は明らかではないものの少なくとも3種類の PUUV 関連ウイルスも報告されている。その中にはヤチネズミ属 (*Clethrionomys* 属) 由来とハタネズミ属 (*Microtus* 属) 由来のものがあり、これらの感染を鑑別する系を準備しておく必要があると考えられる。

本年は PUUV とヨーロッパハタネズミ由来 Tula virus (TULV) の核蛋白遺伝子から、ネズミ亜科由来ハンタウイルス鑑別診断抗原にな

らって鑑別抗原を作成し、ヨーロッパの HFRS 患者血清を用いてその有用性を検討した。

B. 研究方法

ウイルス：TULV および PUUV およびその cDNA クローンはヘルシンキ大学の A. Plyusnin 博士より分与された。

「抗原」：ハンタウイルスを Vero E6 細胞に感染させ、ガラスプレート上に固着後アセトン固定し、間接蛍光抗体法(IFA)抗原とした。また、感染細胞は SDS で処理し、Western blotting 抗原とした。TULV NP の全長 (アミノ酸：全長抗原) をバキュロウイルスベクター (AcNPV:BAC-TO-BAC GIBCO BRL) を用いて昆虫細胞(High Five)に発現させた。その際、昨年度の分析結果を考慮し、2カ所のアミノ酸変異を導入し E5/G6 抗体との反応性を確保した。組み換えバキュロウイルス感染細胞は SDS で処理し、Western blotting 抗原とした。また、ガラススライドに固着後アセトン固定し IFA 抗原とした。

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

「患者血清、免疫血清」：HTNV/SEOV に感染した中国・韓国・日本の患者血清、タイおよびインドの不明熱患者血清、ベトナムで捕獲されたスクス血清を用いた。陽性コントロールとして、TULV を接種したマウス血清・ハタネズミ血清を用いた。

(倫理面からの配慮について)

・用いた感染血清 (患者血清) は何れも、韓国、

中国、タイ、インド、フィンランド、スウェーデン、ドイツの研究所から分与されたものである。当該研究所で既に研究目的で使用が認められているものであり、さらに無記名で分与されたものであることから、倫理面からの問題は無い。各種免疫血清の採血は、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものであり、動物福祉の観点からも問題は無いと判断された。

C. 研究結果

(1) インド不明熱患者血清の調査

インド南部の不明熱患者から5例のハンタウイルス抗体陽性例を確認した。1例は弱いIgMのみが検出され、鑑別ELISAによる罹患ウイルスの特定はできなかった。その他の4例はHTNVに対し弱い陽性であり、蛍光抗体法でも陽性は確認された。

(2) ベトナム齧歯類およびスunksの調査

ベトナム北部の中国との国境付近の Vinhphuc 省およびハノイ市の Haibatrung 地区のマーケットで捕獲された100頭の動物の血清および分子疫学調査を行った。その結果 Haibatrung 地区のドブネズミのみから陽性が検出され、その陽性率は16%であった。クマネズミからは陽性例は検出されなかった。また、捕獲場所を特定した場合には陽性率が30%となる地点があり、陽性コロニーが局在している可能性が示された。また、驚くべきことにマーケット周辺では51頭のラットに対して22頭のスunksが捕獲され、食虫類に分類されるスunksも住家性の生態を示す可能性が示されている。これらをTPMV抗原を用いてスクリーニングしたところ陽性例は見つからなかった。これまでにスunksの血清反応を測定するために、系統化されたインドネシア由来スunks血清を用

いて、Protein Aを2次抗体とする系を確立してきた。しかしながら、今回のベトナム由来スunks血清はProtein Aとの反応性が弱いため、種の特異性を含め、2次抗体の検討が必要である。Haibatrung地区のドブネズミからはSEOVのゲノムが検出された。これから得られた塩基配列は、昨年度までに明らかにしたベトナム国際貿易港 Haiphong 港由来 SEOV の配列と同じグループに属するものの、独自の配列を持っていた。また、これらのベトナム由来 SEOV と最も近縁なのはインドネシア由来 SEOV であることが明らかとなった。

(3) ハタネズミ亜科由来ハンタウイルスの鑑別抗原の作成と評価

PUUVとTULVの全長抗原をバキュロウイルスベクターを用いて作成した。しかしながら、TULVはそのアミノ酸配列から抗原補足抗体E5/G6との反応性が弱く、PUUVとの反応性の比較が難しいことが分かった。そのため、反応性を高める変異を導入した結果、安定したELISA系を構築することができた。ヨーロッパのHFRS患者血清で反応性を確認したところ、やはり、全長抗原は交差反応性が高いことが示された。これらの血清を中和試験で確認したところ、PUUVに対して高い中和抗体価を示し、PUUV感染であることが確認された。PUUV感染に紛れる可能性のあるTULV感染を簡便に検出するためには、鑑別抗原を用意する必要があることが明らかとなった。現在、N末端を削除した鑑別抗原を作成中である。また、これらの鑑別系を評価するために、TULV感染血清が必要である。そのため、日本で系統化された日本産ホンドハタネズミにPUUVとTULVを接種し、陽性血清を準備した。それぞれのウイルスに対する

抗体の上昇が確認され、今後のシステムの評価に有用であると考えられた。

D. 考察

昨年度までに進めていたすべてのハンタウイルス感染症をスクリーニングすることが可能となる 4 種類の診断抗原をそろえたスクリーニング系を用いて、疫学調査を継続した。すなわちユーラシア大陸で HFRS の原因となるハンタウイルスを検出する HTNV, PUUV 抗原、および、アメリカ大陸で HPS の原因となるウイルスを検出するための SNV 抗原、および食虫目由来ハンタウイルスを検出する TPMV 抗原である。HTNV 関連ウイルスのうち病原性を持つことが知られている HTNV, SEOV, DOBV, THAIV に関しては血清型鑑別診断 ELISA の構築が終了し、迅速に血清型を予測することができる。

本年度は、完成したシステムを用いて一部の疫学調査を開始した。引き続きインド Verolle 周辺のハンタウイルス抗体陽性例を血清型鑑別 ELISA で調べた結果、THAIV 感染が示唆される例と、鑑別不能例が見つかった。このことは THAIV の自然宿主である *Bandicota indica* がインドにも広く分布していることに関連すると考えられる。しかしながら、鑑別不能例の存在は、インド南部に新規の HTNV 関連ウイルスが存在する可能性を示唆している。

また、ベトナムでは港湾地区を中心に SEOV 感染がヒトおよびラットで確認されていたが、今年度はハノイ中心部での SEOV 感染がラットで確認された。この SEOV の遺伝子を

RT-PCR で増幅し G2 領域の 1101 塩基の配列を得ることができた。従来 SEOV の分子疫学的解析において G2 領域の 330 塩基を用いる方法が広く使われている。この領域は高感度で増幅可能で疫学調査に有効であり、かつ系統樹解析でもほぼ良い結果を得ることができるとされている。しかしながら、類似のウイルスの系統解析を行う目的では説得力のある結果を得られなかった。この領域の解析ではインドネシアとベトナムのウイルスが類似であり、また、日本の大阪由来 B-1 ウイルスが同じ系統に属してしまう。しかしながら、今回得られた 1,101 塩基の解析では B-1 ウイルスは日本のウイルスと同じ系統に属し、ベトナムのハノイ由来・Haiphong 港由来ウイルスの系統は別に分岐する結果が得られた。一方 B-1 ウイルスは札幌由来株などとともに日本由来ウイルスと同じ系統に属した。このおよそ 1,100 塩基を増幅するプライマーセット (SEOMF1936/M12) も 330 塩基を増幅するプライマーセット (SEOMF1936/SEOMR2353) とほぼ同様の頻度で増幅することができ、さらに得られる配列情報はより有用であることが明らかとなった。これはハンタウイルスの分子疫学を進める上での方法論的な収穫であった。

ハノイ中心部のスunksについては設定した 2 次抗体がうまく働いていないことから、形態的には類似であるが (捕獲時の全個体の写真が保存されているため明らかである)、別種の食虫類の可能性も考えられる。遺伝子を用いた種の同定法などについて食虫類の専門家との

連携が必要であると考えられた。

昨年度までの調査でベトナムのヒト血清陽性例に鑑別不能例が確認されている。また、インドでも、鑑別不能例が確認された。これらの結果はアジア地区においてハンタウイルスが予想以上のバリエーションで存在し、ヒトに感染しうることを示唆すると考えられ、例数を重ねたさらなる解析が必要と考えられる。また、多様なハンタウイルス感染を検出し、鑑別するためにも、今まで解析を進めてこなかったハタネズミ亜科由来ハンタウイルス感染症の検出および簡便な鑑別方法の確立は調査を進める上で重要であると考えられる。さらに、南北アメリカ大陸には HPS の原因となる SNV 関連ウイルスが多種類存在する。これらのウイルスは抗原性に交差反応性が高いため、中和試験以外の鑑別法は現在のところ無い。さらに、数十種類もの多種のアメリカネズミ亜科に属する齧歯類がそれぞれ独自のハンタウイルスを持つとされている。HPS ウイルスを使った中和試験の代替法として鑑別診断 ELISA を導入することで、安全に宿主齧歯類を推測する系が確立できると考えられる。今後は本研究を通じて確立した鑑別診断法を HPS 関連ウイルスにも応用して行くことも必要であろう。これにより輸入症例を鑑別し、罹患地域を推測するために有用な情報を得られることが可能になると考えられる。

E. 結論

本研究によって、TPMV, THAIV, PUUV, TULV を加えたさらに広範囲なハンタウイル

ス感染症の血清診断体制を整えた。また、インドおよびベトナムでの調査の結果から未知のハンタウイルス感染症の発見が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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.
- 3) 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
- 4) 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 Diseases at Thousand Islands District, Jakarta Province, from *Apodemus peninsulae* in Korea. J. Med. Virol. 78: Indonesia: 3rd International Conference on Rodent Biology and Management. Hanoi (2006, Aug 28 – Sep 1) 290–7, 2006

6) Rost S, Pelz HJ, Bajomi D, León V, Yoshimatsu K, Song KJ, Mueller CR: Novel sequence variants of the

2.学会発表

- 1) 吉松組子、奥村恵、垂石みどり、中村一郎、有川二郎: VKORC1 gene in rodents from potential クマネズミ(*Rattus rattus*)由来ハンタウイルス: 第54回日本 warfarin-resistance areas in Europe, East-Asia and 本ウイルス学会学術集会、名古屋 (2006.11) both Americas.: 3rd International Conference on Rodent Biology and Management. Hanoi (2006, Aug 28 – Sep 1)
- 2) 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 Pattamadilok S, Kumperasart S, Chandy S, Sridharan G, ウイルス学会学術集会、名古屋 (2006.11) Ibrahim IN, Erlina S, Truong N, Arikawa J: Prevalence of hantavirus antibody in humans and rodents in southeast 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) asia: 3rd International Conference on Rodent Biology and Management. Hanoi (2006, Aug 28 – Sep 1)

4) 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, 知的財産権の出願・登録状況 あれば記入してください。

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)	1. 特許取得 なし
	2. 実用新案登録 なし

5) Ibrahim IN, Erlina S, Sumarno, Ariati Y, Yoshimatsu K, Arikawa J: Rodents, Shrews, Ektoparasites and その他
なし

厚生科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担者研究報告書

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

ハンタウイルス感染症の疫学的研究

分担研究者 荻和宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 助教授

研究要旨

ハンタウイルスはげっ歯類を病原巣動物として自然界に分布し、人が感染すると腎症候性出血熱 (HFRS) やハンタウイルス肺症候群 (HPS) などの重篤な疾病を引き起こす。日本においてはドブネズミと北海道のエゾヤチネズミがハンタウイルスの病原巣動物となっているが、20 年以上も HFRS の発生はみられていない。一方、ロシアにおいては極東地区でセズジネズミやハントウアカネズミなどによって媒介される重症型の HFRS が流行している。また、同じロシアでもウラル山脈の西側では比較的軽症型の HFRS が流行している。特にボルガ川流域では年間 6,000 から 8,000 名もの HFRS 患者の発生が報告されており、ロシア国内で最も患者発生数の多い地域となっている。しかしながら、この地域における HFRS の媒介動物は明らかにされておらず、ハンタウイルスの疫学的調査の実施が望まれていた。そこで、ボルガ川中流域の中核都市であるサマラ市において、げっ歯類の疫学調査を行い、ハンタウイルスの感染状況の解明を試みた。サマラ市郊外の森林において 145 匹の野生げっ歯類を捕獲し、血液、肺、腎臓、脾臓、肝臓を採取した。血清中の抗ハンタウイルス抗体を ELISA にて測定したところ、ヨーロッパヤチネズミでのみ陽性例が 6 例 (8.8%) 認められた。ヨーロッパヤチネズミの肺から RT-PCR によりウイルス遺伝子を増幅し、塩基配列の決定を行ったところ、本ウイルスは Puumala 型のハンタウイルスであることが明らかになった。以上のことから、ロシアのボルガ川流域の HFRS 多発地帯ではヨーロッパヤチネズミが病原巣動物となり、PUUV の感染によって患者発生が起きていることが強く示唆された。

A. 研究目的

ハンタウイルスはげっ歯類を自然宿主とする、マイナス一本鎖の RNA ウイルスで、Hantaan 型、Seoul 型、Puumala 型など 20 種類以上のウイルス型の存在が知られている。本ウイルスは人に感染すると腎症候性

出血熱 (HFRS) やハンタウイルス肺症候群 (HPS) などの重篤な疾患を引き起こす。ロシアのボルガ川流域では年間 6,000 から 8,000 名もの HFRS 患者の発生が報告されており、ロシア国内で最も患者発生数の多い