

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

生物テロに使用される可能性の高い細菌・
ウイルス等による感染症の蔓延防止、
予防、診断、治療に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

平成20年 3 月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成 19 年度新興・再興感染症研究事業
「生物テロに使用される可能性の高い細菌・ウイルス等による感染症の
蔓延防止、予防、診断、治療に関する研究」

班 員 名 簿

氏 名	所 属	職 名
佐多 徹太郎	国立感染症研究所 感染病理部	部 長
森川 茂	国立感染症研究所 ウイルス第 1 部	室 長
山田 章雄	国立感染症研究所 獣医科学部	部 長
岸本 壽男	国立感染症研究所 ウイルス第 1 部	室 長
遠藤 卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部	部 長
高橋 英之	国立感染症研究所 細菌第 1 部	主任研究官
高橋 元秀	国立感染症研究所 細菌第 2 部	室 長
牧野 壮一	帯広畜産大学 大動物特殊疾病研究センター	教 授
岩本 愛吉	東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 感染症分野	教 授
松本 哲哉	東京医科大学 微生物学講座	教 授
中村 修	慶応義塾大学 環境情報学部	教 授
山本 保博	日本医科大学	教 授
出口 弘	東京工業大学大学院 総合理工学研究科 知能システム科学	教 授
金谷 泰宏	防衛医科大学校・防衛医学研究センター	准教授
大日 康史	国立感染症研究所 感染症情報センター	主任研究官

目 次

I. 総括研究報告書（平成 19 年度）

生物テロに使用される可能性の高い細菌・ウイルス等による
感染症の蔓延防止、予防、診断、治療に関する研究・・・・・・・・・・ 1

主任研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）

II. 分担研究報告書

1. 生物テロに使用される可能性のあるウイルスを検出する
網羅的定量的 PCR 法の開発・・・・・・・・・・ 7

分担研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）

2. Loop-Mediated Isothermal Amplification 法を用いた
サル痘ウイルス遺伝子検出法の開発・・・・・・・・・・ 11

分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所・ウイルス第 1 部）

3. ニパウイルス等人獣共通感染症に関する診断法の確立・・・・・・・・・・ 15

分担研究者：山田 章雄（国立感染症研究所・獣医科学部）

4. バイオテロを想定したリケッチアの検出法と診断に関する研究・・・・・・・・・・ 19

分担研究者：岸本 壽男（国立感染症研究所・ウイルス第 1 部）

5. 社会不安を誘導することを目的とした故意の汚染に使用される
可能性のある原虫類対策に関する研究・・・・・・・・・・ 27

分担研究者：遠藤 卓郎（国立感染症研究所・寄生動物部）

6. ペスト菌の検出と診断法の確立：ペスト菌 F1 antigen に対するモノクローナル抗体を用いた
直接抗体法によるペスト菌の迅速検出法の開発・・・・・・・・・・ 33

分担研究者：高橋 英之（国立感染症研究所・細菌第 1 部）

7. 細菌毒素クロストリジウム属菌、ブドウ球菌、VERO 毒素	41
分担研究者：高橋 元秀（国立感染症研究所・細菌第2部）	
8. 炭疽、ブルセラ、鼻疽・類鼻疽など危険度レベル3に属する 細菌の検出及び診断法	47
分担研究者：牧野 壮一（帯広畜産大学・大動物特殊疾病研究センター）	
9. バイオテロ関連感染症の臨床診断と治療（1）	55
分担研究者：岩本 愛吉（東京大学医科学研究所・先端医療研究センター・感染症分野）	
10. バイオテロ関連感染症の臨床診断と治療（2）	59
分担研究者：松本 哲哉（東京医科大学・微生物学講座）	
11. バイオテロ対応ホームページ	65
分担研究者：中村 修（慶応義塾大学）	
12. 評価による技術的基盤整備に関する研究：天然痘対応方針の検討のあり方	69
分担研究者：山本 保博（日本医科大学）	
13. 天然痘テロシミュレーションシナリオの作成に関する研究	75
分担研究者：金谷 泰宏（防衛医科大学校・防衛医学研究センター）	
14. SOARS を用いた生物テロシミュレーションに関する研究	81
分担研究者：出口 弘（東京工業大学大学院・総合理工学研究科）	
15. 肺ペスト・炭疽菌を用いたバイオテロの患者発生状況予測モデルの開発と活用	85
分担研究者：大日 康史（国立感染症研究所感染症情報センター）	
III. 研究成果に関する刊行一覧表	97

I. 総括研究報告書

平成19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）
生物テロに使用される可能性の高い細菌・ウイルス等による感染症の蔓延防止、
予防、診断、治療に関する研究

総括研究報告書

主任研究者 佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部 部長）

研究要旨 バイオテロ対策として迅速で特異的な診断法を開発整備し、一次対応者への情報提供を目的とした臨床診断・検査等の対応支援ホームページの作製、天然痘対応指針の改定、そしてさまざまなシナリオを用いたコンピューターシミュレーションによる被害予測および対応評価を可能にし、バイオテロ対策に役立てることを目的とした。バイオテロ病原体等の迅速検査法の開発が進められ、遺伝子診断法のみならず、あらたな抗原や抗体検査法が開発され、充実した。バイオテロ疾患の情報提供手段としてマニュアルのホームページがほぼ完成し、感染症専門医としてのICDへのアンケートによりさらに改善点が明らかとなった。また、バイオテロによるコンピューターシミュレーションが可能となり、感染対策の評価が可能となった。これらの結果により、バイオテロ対策に利用できるツールの整備が進んだ。

分担研究者：

森川 茂（国立感染症研究所ウイルス1部 室長）
山田章雄（国立感染症研究所獣医科学部 部長）
岸本寿男（国立感染症研究所ウイルス1部 室長）
遠藤卓郎（国立感染症研究所寄生動物部 部長）
高橋英之（国立感染症研究所細菌1部 主任研究官）
高橋元秀（国立感染症研究所細菌2部 室長）
牧野壮一（国立大学法人帯広畜産大学大動物特殊疾病研究センター 教授）
岩本愛吉（東京大学医科学研究所先端医療研究センター 教授）
松本哲哉（東京医科大学微生物講座 教授）
H18-19年度
中村 修（慶応大学環境情報学部 教授）
山本保博（日本医科大学救急医学 教授）
出口 弘（東京工業大学大学院総合理工学研究科知能システム科学 教授） H18-19年度
金谷泰宏（防衛医科大学校 防衛医学研究センター 准教授） H18-19年度
大日康史（国立感染症研究所 感染症情報センター 主任研究官） H18-19年度

A. 研究目的

2001年9-10月にアメリカで発生した炭素菌芽胞混入郵便物を用いたテロ事件に続いて、わが国で同様の模倣事件が多発した。わが国では公衆衛生上の被害は発生していないが、これらの事件に対し、バイオテロや新興感染症等の緊急事態における従来以上の迅速な病原体検出法、蔓延防止策、予防、診断、治療法の開発とその普及の必要性がある。現在バイオテロに利用されることが危惧される病原体ならびに感染症には、人獣共通感染症を中心に、節足動物媒介性ウイルス、痘瘡ウイルス、出血熱ウイルス、ニパウイルス、炭疽、ペスト、野兔病、鼻疽、類鼻疽、ブルセラ、Q熱、ボツリヌス毒素、アメーバなどがあり、またSARS等の新興感染症も含まれる。これらの病原体による感染症は現在では一般に稀で、また存在しないものであり、いったん感染すると多くの患者は潜伏期の後、急性発症し高い致死率を示す。従って、バイオテロ対策として迅速な診断システムを開発整備し、感染拡大を防止する必要がある。本研究では1)緊急時に環境材料ならびに臨床検体から、これらのバイオテロ病原体を短時間に検出する実験室診断法の開発と治療薬の効果の検討、ならびに臨床診断、治療への対応に関して検討

することを目的とする。本研究によって病原体に対する網羅的な緊急対応迅速診断法が確立されるとともに消毒、滅菌、治療が早期に行われ、自治体の対応支援とともに、被害の拡大が未然に防がれる。また、開発された技術を各都道府県の衛生研究所等に移転してさらに迅速な緊急時対応の実現を図るとともに、2) 最初に患者を診る臨床医へのバイオテロ関連疾患の知識を普及し、適切な臨床診断法および治療法をマニュアルとして種々の媒体を用いて提供することにより、適切な患者検体の採取と適切な検査診断機関への依頼が可能となり、患者の適切な治療および感染の拡大防止につながる。さらに、現場における人為的感染災害対応の現状と問題点がより明確化され、今後のマニュアルおよび訓練に反映されることにより、バイオテロ災害対応のため国、自治体、感染研や地方衛研、自衛隊等の連携強化などの基盤整備の充実が期待される。平成 18 年度からの追加課題として、3) 天然痘対応指針の改訂を開始し、また、4) シナリオにもとづいた感染の拡大をコンピュータでシミュレーションし被害予測を行う。適切な対応がとられた場合の被害の軽減についてもシミュレーションし、対応策が検討できるようにする。これらによって、事件が発生した場合の緊急対応が可能となり、国民の生物テロに対する不安が軽減されるのみならず、生物テロ事件および模倣事件に対する抑止効果も期待される。

B. 研究方法

現時点で生物テロに利用されることが危惧される病原体として、節足動物媒介性ウイルス、痘瘡ウイルス、サル痘ウイルス、出血熱ウイルス、ニパウイルス、炭疽、ペスト、野兔病、鼻疽、類鼻疽、ブルセラ、Q 熱、ボツリヌス毒素、アメーバ等対象として、1) 緊急時対応可能な迅速実験室診断法を確立する。a) ウイルス検査：環境中からの検出や最新の情報をもとにプライマーの至適化を行い、Realtime PCR 法や LAMP 法の高感度化、患者の臨床症状から病原体が想定できない場合に対応するために未知のウイルスを検出同定できる PCR 法を開発する。テロを想定したシミュレーション実験を行う。ワクチンが実用化されている疾病について

はサイトカイン産生組み換えウイルスなどを作製し基礎的データを作製する。b) リケッチャ検査：*Coxiella burnetii* の特異的迅速検出法と Q 熱の迅速診断法は未だ確立されていないので、抗原および遺伝子検出法をさまざまな方法を駆使して確立する。c) 原虫検査：*Naegleria fowleri* の感染組織での迅速検出法の開発を行い、あわせて *Acanthamoeba sp.* あるいは *Balamuthia mandrillaris* に起因する疾患との鑑別を可能とする検出方法として、免疫染色法ならびに in situ hybrAT-CSA 法の利用を検討する。動物感染モデルから陽性対照を作製し、必要に応じて供給体制を整備する。さらにクリプトスポリジウムによる水系感染に対し、大量の水から効果的に検査ができるようにする。d) 細菌検査：サルモネラ菌、ペスト菌、チフス菌、赤痢菌などの下痢性腸内細菌の検出同定法と治療薬剤に対する薬剤耐性を迅速に調べられる方法を開発する。近縁種との交差が解消されていない野兔病、類鼻疽、ブルセラの特異的迅速検出法として、LAMP 法を作製する。そして免疫学的診断法として ELISA 法を開発する。細菌感染症診断の網羅的スクリーニングシステムの開発を行う。e) 毒素検査：*Staphylococcus aureus* の産生するエンテロトキシン B および *C. septicum* α 毒素の迅速検出法の検討をおこなう。2) 臨床対応の検討：バイオテロは一般には稀な疾患を引き起こすため、バイオテロ関連疾患と気づかなければ発生を把握することさえできない。また感染拡大防止においても臨床医の診断と治療に関する役割は大きい。そのためにも多くの医師が最新の知識を得ておくことが必要となる。したがって、バイオテロや新興感染症関連疾患情報については、可能な限り常時更新され、適時公開されていくことが必要で、わが国の準備態勢を確立し向上させる。バイオテロや新興感染症が発生した際には、初期対応に協力し、当該疾患の臨床的特徴、臨床診断、治療法の研究を行い、マニュアルとして各種媒体での公開を目指す。その情報公開に対し有効かつ効果的なアクセスを可能とする研究開発を行う。3) 天然痘対応マニュアル改訂：平成 16 年度の天然痘対応指針（第 5 版）の改訂をおこなう。4) シミュレーション：シミュレーションモデルを構築してコンピュータを

用いて感染被害を予測し、予防措置に役立てる。

(倫理面への配慮)

ヒトの検体や感染情報を使用する際には、所属機関の研究倫理委員会への申請および許可を受けて行う。動物実験は動物に与える苦痛を最小限にとどめ、各班員所属の動物実験委員会への申請および許可を受けてから、また組換えDNA 実験は当該委員会への申請および許可を受けてから行った。

C. 研究結果

1) 緊急時対応可能な迅速実験室診断法の確立: 生物テロに使用されるウイルスを検出するには、スクリーニングとして網羅的な検索が可能でかつ定量的な方法がのぞましい。この目的にあう Realtime PCR 法を開発しさらに改良を行った。各地研で検査が行えるように、96 ウェルプレート上で 104 種類の既知のウイルスを同時に検出できるシステムを開発した(佐多)。サル痘ウイルスを共通に検出する Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を開発し、評価した。本 LAMP 法は、コンゴ盆地型、西アフリカ型のサル痘ウイルス遺伝子を共に高感度で検出できた(森川)。ニパウイルス抗原検出系に利用する NiV-F, G 蛋白質ウサギ抗血清を作製するとともに、昨年度作製した NiV-N, P 蛋白質ウサギ抗血清の反応性を解析した。F, G 抗血清は ELISA において十分な抗体価が確認された。N, P 抗血清は、NiV 感染細胞において特異的に NiV 抗原を検出することができた。また、抗体検出系の高度化を図る目的で、NiV-N 蛋白質発現細胞を用いた抗体検出 IFA を開発し、種々の動物血清に対する反応性を解析し、動物種によっては、高い非特異反応が認められた(山田)。バイオテロにリケッチアが用いられた場合の迅速検出系として、Taqman MGB プローブを用いた Spotted fever group に共通した検出系を開発した。加えて、ロッキー山紅斑熱の病原体 *R. rickettsii*、発疹チフスの *R. prowazekii*、日本紅斑熱の *R. japonica* をそれぞれ特異的に検出できる系も開発した(岸本)。アメーバ病原体の traceability を確保する目的で国内外の研究機関に保存・研究使用されている *N. fowleri* 主要株およびわ

が国の分離株の遺伝子解析を行い、それぞれの特異配列を明らかとした。赤痢アメーバ検出用 PCR 法を用意し、病理組織標本を用いて *N. fowleri* およびそれ以外の計 4 種のアメーバの鑑別診断が可能となった(遠藤)。ペスト菌の F1 antigen に対するモノクローナル抗体を用いた直接抗体法を用いてホルマリン処理したペスト菌を迅速に検出する方法を確立した(高橋英)。*Staphylococcus aureus Enterotoxin B* (SEB)と *C. septicum* α 毒素(AT)の迅速検出系としてイムノクロマト法の構築を行った。SEB 検出系での実用化にはブロッキング剤等の選定がさらに必要であることがわかった。AT 検出系では反応は特異的で十分実用化できることが明らかとなった。平成 15 年に作製したボツリヌス抗毒素の力価は安定であることが確認された。ボツリヌス毒素検出用ラッセクス凝集反応キットはボツリヌスレファレンスセンターに配付した(高橋元)。炭疽菌の防御抗原に対する抗体を用いた診断法を開発した。野兔病菌に対する特異抗原(FopA-GST 融合タンパク質)の精製を行いながら、もう一つの特異抗原(FopA-His 融合蛋白)の発現及び精製条件の検討を行った。Luminex を使用した鼻疽/類鼻疽の免疫学的検査法を確立した。さらに、バイオテロに関係する病原体を網羅的な遺伝子増幅法の開発も行った(牧野)。

2) 臨床対応の検討: 生物テロ関連疾患の診断・検査・治療マニュアルのホームページ(HP)を作製し、専門家の意見を取り入れながら、修正とアップデートを行ってきた。診療面の支援を積極的に対応可能な体制を作ることを目的として、国内の infection control doctor(ICD)を対象としたアンケート調査を行った。多くの ICD が高い認識をもってはいるものの、自らの施設では準備に至っていない現状が示唆された。また HP について多くの要望が明らかとなり、さらに充実させていく必要がわかった。技術的には常に最新の情報を提供するためにコンテンツ管理システムの試作をおこなった(岩本、松本、中村)。

3) 天然痘対応マニュアル改訂: 天然痘対応指針の改定にむけて検討し、新型インフルエンザ

対応ガイドラインを応用し、ワクチン接種戦略を提示することが必要であった。訓練を通して改訂し、バイオテロおよび新興感染症への対応手法が開発できた（山本）。

4) シミュレーション: 生物テロの被害予測を種々のパラメーターを設定しコンピュータシミュレーションを行うシナリオを作製し、1万人規模の仮想都市における被害見積もりと感染予防対策の効果を検討した。また建物内部のヒトからヒトへの感染確率を実際の教育施設の協力を得て推計した（金谷）。Spot oriented agent role simulator(SOARS)を用いたシミュレーション疫学モデルを用い、机上演習が行えるモデルを作製し、実施した。そして、「感染症対策の机上演習マニュアル」を作製した（出口）。インディビジュアルベースモデルと東京都市圏パーソントリップ調査データを用い、首都圏人口 3300 万人の中で考えられる感染症拡散モデルを構築した。炭疽菌と肺ペストについてシミュレーションを行い、発症者数と探知および対策の開始時期によって相当程度の救命が可能であることが示された（大日）。

D. 考 察

生物テロかどうかも含めて臨床診断が困難な場合もあるため、地研で利用可能なスクリーニング法として網羅的ウイルス検出と定量ができる Realtime PCR 法を開発した。今後は簡易なキットを作成し、地研等へ配付を考えている。これまでに開発されたオルソポックスウイルス共通 LC-PCR、サル痘ウイルス特異的 LC-PCR、痘瘡ウイルス特異的 LC-PCR、大痘瘡ウイルスと小痘瘡ウイルスの鑑別 LC-PCR と今回開発されたサル痘ウイルス特異的 LAMP 法により、オルソポックスウイルスの検出、サル痘ウイルス、痘瘡ウイルス及びこれらの強毒型、弱毒型の鑑別も迅速に行なえることになった。ニパウイルスに関する診断系に使われる抗体が得られ、今後は ELISA や蛍光抗体法、中和試験における陽性対照などに利用可能である。ヒトや動物検体に対するデータを得て、感度や特異度を確認する必要がある。Spotted fever group に共通した迅速かつ簡便な real time PCR 検出系を開発した。加えて、*R. rickettsii*、

R. japonica、*R. prowazekii* をそれぞれ特異的に検出できる系も開発した。検出感度は従来の PCR 法と比較し、少なくとも 100 程度高感度であった。また、本検出法は通常の Real time PCR 系の検出時間よりも早く約 50 分で検出が可能であることから、不明熱患者発生時における、簡便かつ迅速な原因菌同定法と考えられた。*Naegleria fowleri* は 26°C 以上の水温を好む自由生活性のアメーバであるが、鼻腔を介してヒトに感染するときわめて重篤な急性髄膜脳炎（Primary Amoebic Meningoencephalitis : PAM）を引き起こし、大半の患者が 1 週間程度で死亡する。本アメーバはわが国でも生息が確認されているが、自然界からのアメーバの分離、培地への順化など株の確立には相当の専門知識が必要で、生物テロに使用されるとすれば実験室等からの漏出が問題となる。そこで、今回、国内外の研究機関に保存され実験に供されている *N. fowleri* 主要株およびわが国での分離株の遺伝子鑑別ができたので、*N. fowleri* 主要株の traceability が高まった。ペスト菌 DNA を検出するほかに免疫学的な検出方法を確立した。種々の抗原検出が可能な抗体を用いた検出法について検討を続ける。SEB の検出系としてイムノクロマト法では非特異反応の減少が課題として残った。ボツリヌス毒素の簡易検出キットを国内レファレンスセンターに配付できたので、今後とも利用されていく。バイオテロ関連細菌病原体の検出方法には種々の方法を準備しておくことに意義がある。炭疽菌および鼻疽・類鼻疽菌の検出方法はほぼ完成した。野兔病の迅速診断・同定法が本年度作製した抗原で可能となった。今後の課題として網羅的な遺伝子検査法を充実する必要が考えられる。

生物テロ対応マニュアルは第一線の医師のみならず、看護師、臨床検査技師等もその対象範囲に入れ、さまざまな分野の職種においても利用が可能になることを目指している。一般公開をめざして問題点の克服にほぼめどがつき、およその準備が終了した。今回のアンケート調査によって得られた要望を入れて改訂と充実を行い、バイオテロの早期探知に役立てたい。

天然痘対応指針の改訂をめざして研究協力組織を作り、基本方針の策定、さらに訓練を行った。これらにより新型インフルエンザガイド

ラインにワクチン接種法を考慮して指針を完成させる予定である。

生物テロの発生から終息するまでをコンピュータシミュレーションでき、さらに感染対策評価が可能な机上演習システムが完成した。これにより、天然痘やインフルエンザを対象とした検討により、問題点を明らかにできた。今後、このシステムを用いた机上演習を広く行い、地方自治体の状況に合わせた対策の評価が可能である。

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

E. 結 論

緊急時対応可能な迅速実験室診断法の開発が進み充実した。網羅的ウイルス検出 Realtime PCR 法、天然痘との鑑別に必要なサル痘の LC-PCR 法、ニパウイルスの抗原や抗体作製、リケッチャの realtime PCR 法、アメーバの追跡に役立つ塩基配列情報、ペスト菌の迅速蛍光抗体法、SEB や AT の検出系、炭疽、ブルセラ、野兔病、鼻疽、類鼻疽の遺伝子および抗体検出法が行われた。また、バイオテロ発生時の一次対応支援となるバイオテロ対策マニュアルのホームページの公開に向けて準備がほぼできた。天然痘対応指針の改訂が可能となった。また、バイオテロの被害予測と感染対策に利用可能なコンピュータシミュレーションができた。これらの結果により、バイオテロ対策に利用できるツールの整備が進んだ。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

各分担研究者の報告書参照。

2. 学会発表

各分担研究者の報告書参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

II. 分担研究報告書

1. 生物テロに使用される可能性のあるウイルスを検出する網羅的定量的 PCR 法の開発

分担研究者 佐多 徹太郎 国立感染症研究所感染病理部 部長

研究協力者 片野 晴隆 (感染研・感染病理部)

研究要旨 生物テロに使用される可能性のあるウイルスを迅速、かつ高感度にスクリーニングするシステムの開発を行った。昨年度に開発した網羅的定量的 PCR 法を改良し、96 ウェルプレート上で多種類のウイルスを同時に検出可能なシステムの開発を行った。さらに、ウイルス感染培養細胞、臨床検体などからウイルスの検出を試み、その特異性を確認した。本システムでは生物テロに使用される可能性のあるウイルスのみならず、鑑別診断として必要なウイルスを、多くの施設にすでに導入されている通常の定量的 PCR 装置を用いて網羅的に検出できることから、地方衛生研究所等での使用が可能であり、現場に近い施設での迅速な判断が可能になることが期待される。今後、検索に必要なウイルスの絞り込みを行うとともに、第三者による検定や使用プロトコールの作製、輸送、保存法を確立し、さらに実用的なキットの作製を目指す。

A. 研究目的

生物テロに使用される可能性のある微生物には細菌、真菌、ウイルスなどが含まれる。ウイルスは他の微生物と異なり、通常の顕微鏡で観察することができないため、その検出には電子顕微鏡検査や、核酸検査、血清学的検査などが必要である。生物テロは発生後、病原体の同定と封じ込めをできる限り早く行う必要があり、ウイルスが生物テロに使われた際にも迅速に病原体診断ができる検査系の開発が望まれる。定量的 polymerase chain reaction (PCR)はウイルスの検出法として、最も感度が高く、特異性の高い、かつ、検出時間の短い方法である。定量的 PCR 法の中でも、TaqMan PCR は標的遺伝子の一部をプローブとして使用しているため、とりわけ特異性が高く、信頼度も高い。迅速性、高感度、高度な設備を要さない点など、生物テロの現場に必要な検査法の要件を満たすウイルス検査法としてきわめて有望である。我々は TaqMan PCR を使った定量的 PCR 法を応用し、昨年までに多くの種類のウイルスを一度に同時に検出、定量できるような網羅的定量的 PCR 法

(multivirus real time PCR) の開発を目指し、研究を行ってきた。今年度は昨年までに開発したウイルスの網羅的定量的 PCR 法に改良を加え、より簡便、かつ迅速に検出ができるように multiplex real time PCR にシステムを改変するとともに、検索するウイルスの数をさらに追加した。これにより、作業時間の短縮と操作の簡素化、より少ないサンプル量でウイルスの検索ができ、地方衛生研究所など生物テロの現場に近い施設での利用がしやすいシステムの開発を目指して研究を行った。

B. 研究方法

1) 定量的 PCR

陽性コントロールプラスミドの作成法や定量的 PCR の詳細は平成 17, 18 年度の報告書に記載済みである。検出するウイルスとしては感染症法に記載されている第 1 種病原体のうち、エボラ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、痘そう、マールブルグ病、ラッサ熱、および第 2 種病原体の重症急性呼吸器症候群 (SARS)、および第 3—4 種病原体に挙げられたウイルス 26 種類を選択

した。さらに鑑別疾患としてあげられる疾患の原因ウイルスを同定するため、ヘルペスウイルス属、肝炎ウイルスなどウイルスに加え、ヒトパピローマウイルス、ヒトエリスロウイルス B19、エンテロウイルス、インフルエンザウイルスなども標的としてプローブ、プライマーを作成した。標的遺伝子の選定は、これまでの報告を参考に、ウイルス株間により変異の少ない部位を選定した。また、報告がないものに関しては GenBank 等のデータから独自に標的遺伝子を定め、Primer Express (アプライド・バイオシステムズ社)を用いて、プライマー・プローブを設計した。プローブは Taqman Probe (FAM-TAMRA 標識および HEX-BHQ1 標識)を用い、multiplex の定量的 PCR を施行した。Real time PCR 装置は ABI Prism 7900HT (アプライド・バイオシステムズ社)と MX3005P (ストラタジーン社)の二機を試し、反応性が異なることを確認した。PCR の内部標準としてヒト GAPDH および beta-actin 遺伝子の増幅を同時に行った。

2) 検体からの核酸抽出

陽性コントロールには各ウイルスの感染細胞の核酸、または核酸断片を用いた。また臨床検体は国立感染症研究所感染病理部にコンサルテーションケースとして寄せられた原因不明の疾患の病変部サンプルで、生検、剖検、手術標本を含む。得られた検体を2分割し、一つから RNA を、他の一つから DNA を抽出した。核酸抽出は RNA は ISOGEN(ニッポンジーン)、DNA はフェノール・クロロホルム法によった。

(倫理面への配慮)

陽性コントロールプラスミドの作成は DNA 組換え実験であり、当該施設の組み換え DNA 実験委員会の承認のもと行われた。

C. 研究結果

1) multiplex multivirus real-time PCR の確立

昨年度に確立した感染症法の定める特定病原体のウイルス 26 種類に加え、鑑別診断に要するウイルス疾患として、ヒトパピロ

ーマウイルス、ヒトエリスロウイルス B19、エンテロウイルス、インフルエンザウイルスなどに対する定量的 PCR を確立した。これで検出ウイルス数は 104 種類となり、ヒトに疾患を起こす可能性のあるウイルスをほとんど網羅する。いずれも陽性コントロールプラスミドを 10^8 コピーから 10 コピーまで段階希釈した溶液から標準曲線を作成し、それぞれのプローブ、プライマーセットが機能することを確認した。検出感度については 10 コピーを安定的に検出することを各プローブ、プライマーセットで確認した。また、昨年度と同様に、各ウイルスの感染細胞または、ウイルス液そのものから核酸を抽出し、これを各プローブ・プライマーセットに反応させ、特異性の確認を行った。

つぎに、なるべく多くの種類のウイルスを 96 ウェル上で一度に網羅的に検出できるよう、FAM-TAMRA 標識プローブの他に、半数のプローブについて HEX-BHQ1 の標識を行った。FAM-TAMRA 標識プローブと HEX-BHQ1 標識プローブを各ウェルに混和することにより、1 well あたり 2 つのウイルスが検出できるよう、96 ウェルプレートにプローブ・プライマーセットを配した。同一プレート上には FAM-TAMRA 標識プローブと HEX-BHQ1 標識プローブの標準曲線がとれるよう、コントロールを置き、これと比較することにより各ウイルスの大まかなコピー数が推測できるよう、設計した。

このシステムを用いてそれぞれの陽性コントロール核酸を検索したところ、各プローブ・プライマーセットに特異的な反応が認められた。また、FAM-TAMRA 標識プローブと HEX-BHQ1 標識プローブ間には蛍光強度の違いはあるものの、検出感度そのものは差がないことが分かった。

2) 臨床検体への応用

本キットを用いて臨床検体への応用を試みた。20 例の生検標本、および手術標本から DNA および RNA を抽出し、multiplex real time PCR を用いてウイルスの検出を行った。

20 例中、4 例で HHV-6 が、10 例に TTV が、2 例に B19 が検出された。TTV 以外は 1 細胞あたり 1 コピー以下の低コピー数であった。これらのサンプルにつき、個々のウイルスを検出する real time PCR を別々に行ったところ、multivirus real time PCR の結果と近似したコピー数が得られた。TTV は疾患とは関連なく、様々なサンプルから検出され、疾患との関連は否定された。なお、ウイルスが陽性であったサンプルについて病理組織標本を検索し、ウイルスタンパクを検出する免疫組織化学を施行したが、いずれも陰性の結果であり、ウイルス量がすくないことと考え合わせると、これらと疾患との関連は薄いものと考えられる。

D. 考 察

生物テロに使用される可能性のあるウイルスを網羅的なスクリーニングシステムとして multivirus real time PCR を開発した。本システムは 96 ウェルプレート対応の Multiplex real time PCR を応用しており、(1) 96 ウェルプレート一枚から 104 種類のウイルスの検出が可能、(2) 必要核酸量は RNA にして約 10ug、(3) 核酸の添加から PCR 解析まで約 3 時間、といった特徴を備えている。これは生物テロの現場に近い研究機関で、迅速、かつ、正確にウイルス検出がで

きるシステムとして有用なものと期待される。国際法上、所持が禁じられている天然痘などの一部のウイルスについては、依然として実際のウイルスを使った検証ができていないものの、遺伝子断片をコントロールとした実験では各ウイルスの陽性コントロールがそれぞれに該当するウイルスのプロープ・プライマーセットに特異性を持って反応した。スクリーニングの系としては十分機能するものとして期待され、陽性ウイルスが出た場合には個別の real time PCR で確認を取ったうえで、最終確定診断には、各ウイルスの専門家による遺伝子増幅、シーケンス解析やウイルス分離などの検査が行われる。

本スクリーニングシステムでは鑑別診断を広く検査できるよう、ヒトに病原性があるとされるなるべく多くの数のウイルスを標的とした結果、100 種類を超えるプロープ、プライマーセットを作成することになった。実際の生物テロの現場では患者の症状や感染状況などから、ある程度、病原微生物を推測することが可能であり、これらすべての病原体をスクリーニングしなければならぬケースは少ないはずである。今後、状況に応じてスクリーニングするウイルスの数を絞り込み、システムをより簡便化することも可能であろう。本スクリーニングシ

Reporter	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Hex	1.0.E+07	1.0.E+05	1.0.E+03	1.0.E+02	1.0.E+01	NTC	0	0	0	0	0	NTC
FAM	0	0	0	0	0	NTC	1.0.E+07	1.0.E+05	1.0.E+03	1.0.E+02	1.0.E+01	NTC
B Hex	hGAPDH-DNA	JCV	SV40	HPV16	HPV31	HPV52	AAV-1	AAV-3	B19	Adv-A	Adv-C	Adv-E
FAM	beta-actin	BKV	HBV	HPV18	HPV33	HPV58	AAV-2	AAV-5	BocaV	Adv-B	Adv-D	Adv-F
C Hex	HSV-1	VZV	CMV	HHV-7	B virus	Variola (1)	Variola (2)	HIV-LTR	HTLV1			
FAM	HSV-2	EBV	HHV-6	HHV-8	TTV	MPV	MCV	HIV-gag	HTLV2			
D Hex	B2M-RNA	Ebola	CCHFV	Dobrava	Seoul	Sin Nombre	Jurin	Machupo	VEEV	WEEV	Mayaro	CKGV
FAM	hGAPDH-mRNA	Marburg	Hantaan	Puumala	RVFV	Lassa	Quaranta	Sabia	EEEV	Sindbis	Getah	Rubella
E Hex	Entero	CoxA18	Echo6	NLV2	RhinoA	CTBFV	NTC	JEV	SLEV	TBE	FluA(1)	FluA(2)
FAM	Polio	CoxB3	NLV1	Rota	RhinoB	Deng1	Deng2	MVEV	WNV	YFV	FluB	H5N1(1)
F Hex	H5N1(2)	PIV2	Hendra	Measles	RSV-A	Nipah	Lyssa5	CHDPV	OC43	SARS	HCV	HEV
FAM	PIV1	PIV3	Mumps	MetaPV	RSV-B	Rabies	Lyssa6	DVHV	229E	HAV	HDV	GBV

図 1. 96 ウェルプレートを用いた multiplex multivirus real time PCR

各ウェルには HEX-BHQ1 標識プロープ、および FAM-TAMRA 標識プロープ、プライマーが含まれ、一つのウェルで 2 つのウイルスを検出できるように設計した。A 列は HEX、および FAM シグナルのコントロールとしてそれぞれの標準曲線のための希釈系列を置き、各ウイルス量はこの標準曲線を基準に計算される。これにより、各ウェルにおけるおおよかなウイルス量を知ることができる。

システムは生物テロの現場に近い地方衛生研究所などの施設で活用されることを想定して作成した。操作法や、保存、輸送、品質管理を徹底し、常に一定の結果が出るよう、質的コントロールが必要であり、詳細なプロトコールの作成や第3者による評価が今後、必要となろう。

E. 結 論

生物テロに使用される可能性のあるウイルス、および、その鑑別疾患として必要なウイルスを高感度に検出するスクリーニングするウイルスの網羅的定量的 PCR 法を開発した。このシステムは 96 ウェルプレート上で 100 種類以上のウイルスを同時に検出することができ、少量のサンプルから短い作業時間で簡便にウイルスの検出が可能であった。今後、第3者による検定や質的コントロールの方法について検討していく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 片野晴隆、加納基史、菅野隆行、佐多徹太郎. エイズ剖検例の各臓器におけるヒトヘルペスウイルスの定量。第22回 第22回ヘルペスウイルス研究会。2007.5. 福岡市。
- 2) 片野晴隆、加納基史、菅野隆行、佐多徹太郎. エイズ剖検例の各臓器における DNA ウイルスの感染プロファイル。第55回 日本ウイルス学会学術集会。2007.11. 札幌市。

2. Loop-Mediated Isothermal Amplification 法を用いた サル痘ウイルス遺伝子検出法の開発

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 飯塚愛恵、西條政幸、倉根一郎 (感染研・ウイルス第1部)

研究要旨 天然痘（痘瘡）ウイルスは、バイオテロリズムに用いられる危険性が最も高いウイルスであると指摘されている。これまでに、本研究班で痘瘡ウイルスを特異的に検出する Light Cycler (LC)-PCR 及び病原性の高い大痘瘡ウイルスと小痘瘡ウイルス鑑別 LC-PCR、サル痘ウイルス特異的 LC-PCR、オルソポックスウイルス特異的 LC-PCR を開発し、評価した。これらにより、疑い患者発生時の鑑別診断体制は整備された。ヒトのサル痘は、コンゴ民主共和国では毎年流行し、2003 年には米国で輸入齧歯類を起源とするアウトブレイクが起きたことから、輸入感染症として注目されている。また、サル痘特異的 LC-PCR は、強毒なコンゴ盆地型と弱毒な西アフリカ型サル痘それぞれに特異的な方法として開発されたため、2 種類の LC-PCR を行なう必要がある。そこで、本研究では、サル痘ウイルスを共通に検出する Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法を開発し、評価した。その結果、本 LAMP 法は、コンゴ盆地型、西アフリカ型のサル痘ウイルス遺伝子を共に高感度で検出できた。

A. 研究目的

バイオテロリズムの危険性がかねてから指摘されている。天然痘の病原ウイルスである痘瘡ウイルス遺伝子を特異的に増幅・検出する real-time LightCycler polymerase chain reaction (以下、LC-PCR) 法及び類似の症状を呈するサル痘の原因ウイルスであるサル痘ウイルス特異的な LC-PCR をこれまでに開発、評価した。サル痘特異的 LC-PCR は、強毒なコンゴ盆地型と弱毒な西アフリカ型サル痘それぞれに特異的な方法として開発されたため、2 種類の LC-PCR を行なう必要がある。そこで、本研究では、サル痘ウイルスを共通に検出する Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

1) ウイルスと DNA : 国立感染症研究所に保管されているコンゴ盆地型サル痘ウイルスの Zr-599 株、Congo-8 株、および V97-I-008 株と

西アフリカ型サル痘ウイルスの Sierra Leone 株、Copenhagen 株、Anteatan 株、Liberia 株および SEN-79 株を用いた。対象ウイルスとして、ワクチニアウイルス、牛痘ウイルス、キャメルポックスウイルス、エクトロメリアウイルスを用いた。これらを Vero E6 細胞で培養し、Hirt 法により感染細胞からウイルス DNA を抽出した。

2) サル痘ウイルス特異的 LAMP 法 : LAMP 法では、増幅させる領域の 3' 側に向かって F1c、F2c、F3c、5' 側に向かって B1、B2、B3 の 6 領域に対して、4 種類のプライマー (F1P、F3、B1P、B3) を設計し、さらに、増幅効率を上げるためには、Loop-F と Loop-B の 2 種類のループレプライマーを設計する。サル痘ウイルスの遺伝子を特異的に検出する LAMP 法に用いるプライマーは、ATI 遺伝子を標的領域として設計した。増幅反応は、Loop-amp DNA 増幅キット (栄研化学) を用いて、63°C で 1 時間反応させた。増幅された遺伝子を、リアルタイム濁度測定装置 LA-200 (テラメックス社) を用いて

定量的に検出した。これまでに開発したサル痘ウイルス特異的 LC-PCR との比較は、Zr-599 または Liberia 株サル痘ウイルス感染カニクイザルの材料を用いて行なった。

C. 研究結果

1) サル痘ウイルス特異的 LAMP 法の感度：昨年度開発したオルソポックスウイルス共通 LC-PCR によりサル痘ウイルス DNA のコピー数を算出し、LAMP 法の感度を検討した結果、約 100 コピーであった。

2) サル痘ウイルス特異的 LAMP 法の特異性：用いた 8 株のサル痘ウイルス遺伝子は、いずれも同程度の感度で検出できた。一方、対象として用いた他のオルソポックスウイルス遺伝子は、牛痘ウイルスとエクトロメリアウイルス遺伝子は検出されなかったが、ワクチニアウイルスとキャメルポックスウイルス遺伝子は、106 コピー以上反応系に加えると陽性となった。つまり、この 2 種のウイルスでは、サル痘ウイルスと比較して 10,000 倍以上の感度差で検出されることになる。

3) LAMP 法と LC-PCR との比較：Zr-599 または Liberia 株サル痘ウイルス感染カニクイザルの 62 検体中、両方で陽性であった 30 検体において、それぞれの方法で決定されたウイルス遺伝子量の相関を求めると、ピアソンの相関係数 = 0.71 で、正の相関が認められた。

D. 考 察

これまでに、痘瘡ウイルス特異的 LC-PCR と、極めて病原性の強い大痘瘡ウイルスと、比較的病原性の弱い小痘瘡ウイルスを鑑別する LC-PCR も同時に開発した。また、オルソポックスウイルスを網羅的に検出する LC-PCR も開発した。また、サル痘ウイルス特異的 LC-PCR も同様に開発し、サル痘ウイルス感染材料を用いて評価した。

サル痘ウイルス特異的 LC-PCR は、コンゴ盆地型と西アフリカ型特異的 LC-PCR を行なうため、2 種の LC-PCR を行なう必要があるため、本年度は、より簡便な LAMP 法を用いてサル痘ウイルス遺伝子を検出する系を開発した。そ

の結果、LC-PCR と比較すると若干感度は低かったが、臨床検体からの遺伝子検出には有用であることが明らかとなった。

今回開発したサル痘ウイルス特異的 LAMP 法と昨年度までに、開発したサル痘ウイルス特異的 LC-PCR を組み合わせることで、サル痘ウイルスか否かの判定、コンゴ盆地型か西アフリカ型サル痘ウイルスかの鑑別が可能となる。また、昨年度までに開発したオルソポックスウイルス共通 LC-PCR、痘瘡ウイルス特異的 LC-PCR、大痘瘡、小痘瘡ウイルス鑑別 LC-PCR と組み合わせることで、1) オルソポックスウイルスか否かの判定、2) サル痘（コンゴ盆地型、西アフリカ型の鑑別も含む）、痘瘡ウイルス、他のポックスウイルスの識別、3) 大痘瘡ウイルスと小痘瘡ウイルスの識別、が可能となった。これらのバイオテロ対策上の貢献度は高いと考えられる。なお、本研究で開発されたオルソポックスウイルス共通 LC-PCR と痘瘡ウイルス特異的 LC-PCR は、実際に白粉の鑑別依頼において使用され、ポックスウイルスの否定を迅速に行なうことができた。

E. 結 論

これまでに開発されたオルソポックスウイルス共通 LC-PCR、サル痘ウイルス特異的 LC-PCR、痘瘡ウイルス特異的 LC-PCR、大痘瘡ウイルスと小痘瘡ウイルスの鑑別 LC-PCR と今回開発されたサル痘ウイルス特異的 LAMP 法により、オルソポックスウイルスの検出、サル痘ウイルス、痘瘡ウイルス及びこれらの強毒型、弱毒型の鑑別も迅速に行なえる。

(謝辞)

GHSAG laboratory network 及び、その合意により smallpox workshop を開催した CDC のポックスウイルス部門に深謝します。サル痘ウイルス感染実験に協力していただいた、国立感染症研究所の網康至、永田典代、長谷川秀樹博士に深謝します。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Iizuka I, Sakai K, Sata, T, Kurata T, Kurane I, and Morikawa S. : Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains
Running title: LC-PCR for diagnosis monkeypox virus infection. Jpn J Infect Dis, in press.

LC16m8, for protection of nonhuman primates from monkeypox: 41st annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science, Baltimore (2007. 7)

H. 知的財産権の出願・登録（予定を含む）
特許取得：該当なし

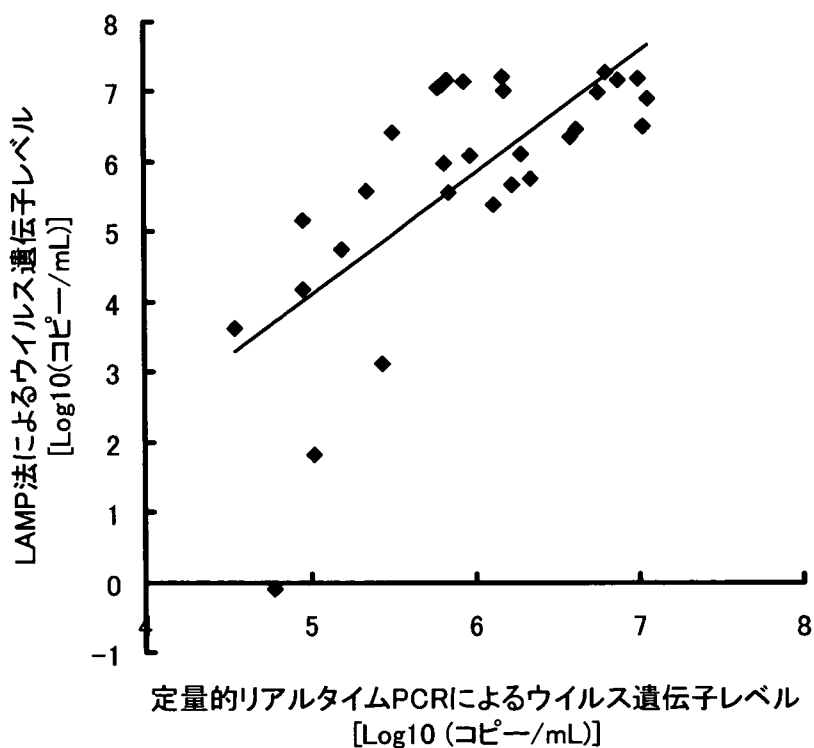
2. 学会発表（国際学会）

- 1) Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Satou A, Nagai C, Terano T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, and Hashizume S : Explicit Comparison of Smallpox Vaccines by PRNT Titer Requires Standardization of PRNT Methods. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance, Vienna 2007
- 2) Yokote H, Shinmura Y, Nagai C, Satou A, Kanehara T, Sasaki T, Matsui H, Terano T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Kurata T, and Hashizume S: Efficacy and Safety Evaluation of Attenuated Smallpox Vaccine LC16m8. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance, Vienna 2007
- 3) Lee SL, Di Caro A, Favier AL, Grolla AR, Lacote S, Morikawa S, Nitsche A, Olivera H, Zimmermann P, and Damon I : Smallpox Diagnostics: Global Preparedness. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance, Vienna 2007
- 4) Shinmura Y, Sasaki T, Matsui H, Kuranaga M, Yokote H, Terano T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, and Hashizume S : Investigation into the Protection Mechanisms of Attenuated Smallpox Vaccine LC16m8. 5th ASM biodefense and emerging diseases research meeting, Washington DC, 2007
- 5) Yokote H, Kanehara T, Satou A, Nagai C, Terano T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, and Hashizume S : Establishment of PRNT Method for Smallpox Vaccines. 5th ASM biodefense and emerging diseases research meeting, Washington DC, 2007
- 6) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Iwata N, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Kurane I, Kurata T, and Morikawa S : Therapeutic vaccination with a highly attenuated vaccinia vaccine,

表1 サル痘ウイルス特異的LAMP法の検出感度と特異性

ウイルス	株	検出感度 (copies)
サル痘ウイルス(コンゴ盆地型)	Zr-599	100
	Congo-8	100
	V97-I-008	100
サル痘ウイルス(西アフリカ型)	Sierra Leone	100
	Copenhagen	100
	Anteatan	100
	Liberia	100
	SEN-79	100
ワクチニアウイルス	Lister	1,000,000
キャメルボックスウイルス	J1E3	1,000,000
牛痘ウイルス	Brighton red	検出できない
エクトメリアウイルス	Hampstead	検出できない

図1 サル痘ウイルス感染サル検体中のLAMP法とLC-PCRにより定量されたウイルス遺伝子コピー数の比較



3. ニパウイルス等人獣共通感染症に関する診断法の確立

分担研究者 山田 章雄 国立感染症研究所 獣医科学部 部長

協力研究者 加来義浩、井上 智、野口 章、奥谷晶子 (感染研・獣医科学部)

研究要旨 人獣共通感染症の病原体 (zoonotic agent) の中には、比較的容易に伝播され、発病率、致死率が高いなどの特徴をもち、発生時にパニックを誘発するなど、社会的な影響が大きいものも少なくない。本課題では、ニパウイルス (NiV) 感染症など、国内での診断体制が整備されていない人獣共通感染症を中心に、発生時・平時の両面に応用できる診断技術の開発・高度化を目的としている。

今年度は、NiV 抗原検出系に利用する NiV-F, G 蛋白質ウサギ抗血清を作製するとともに、昨年度作製した NiV-N, P 蛋白質ウサギ抗血清の反応性を解析した。F, G 抗血清は ELISA において十分な抗体価が確認されたため、次年度以降に抗原検出系での反応性を解析する。N, P 抗血清は NiV 感染細胞において、特異的に NiV 抗原を検出することができた。また、抗体検出系の高度化を図る目的で、NiV-N 蛋白質発現細胞を用いた抗体検出 IFA を開発し、種々の動物血清に対する反応性を解析した。動物種によっては、高い非特異反応が認められたため、2 次抗体やブロッキング剤の選択が課題と考えられた。

A. 研究目的

ニパウイルス (パラミクソウイルス科ヘニパウイルス属 Nipah virus: NiV) 感染症は、1998 年～99 年にかけてマレーシア、シンガポールで初めて発生し、ヒトに致死的な急性脳炎、ブタに主に呼吸器感染症の流行をもたらした新興の人獣共通感染症である。本ウイルスの自然宿主はオオコウモリであり、オオコウモリからブタに感染したウイルスが、その後ヒト、イヌ、ネコなどに伝播したと考えられている。その後、本症はバングラデシュ、インドで散発しており、同地域では NiV がオオコウモリ→ヒトあるいはヒト→ヒトに直接伝播した可能性が指摘されている。

これまでに日本国内での自然発生および、海外からの輸入症例は報告されておらず、本症を疑う症例が出現した場合、迅速に原因病原体を特定するとともに、発生の疫学的背景によっては他の宿主動物における感染状況を調べる必要がある。

昨年度までに遺伝子検出系としてリアルタイム PCR の導入を行い、抗原検出系に利用する NiV-N, P 蛋白質ウサギ抗血清の作製、オオ

コウモリ IgG に対する scFv (single chain variable fragment) の構築を行った。今年度は抗原検出系に利用する NiV-F, G 蛋白質ウサギ抗血清を作製するとともに、昨年度作製した NiV-N, P 蛋白質ウサギ抗血清の、NiV 抗原に対する反応性を解析した。また、抗体検出系の高度化を図る目的で、NiV-N 蛋白質発現細胞を用いた抗体検出 IFA を開発し、種々の動物血清での反応性を解析した。

B. 研究方法

1) DNA 免疫による NiV-F, G 蛋白質ウサギ抗血清の作製

NiV 抗原検出系に利用するための抗血清を大量に確保する目的で、NiV-F, G 蛋白質に対するウサギ抗血清を作製した今回は、非特異反応が極力低い抗血清を得るため、免疫原には NiV-F, G 発現プラスミド (NiV-F/pCAGGS、NiV-G/pCAGGS) を用いた。

免疫には、各蛋白あたりウサギ 2 羽を使用した。具体的には、まず上記プラスミド各 400 μ g を 750 μ l の DW に溶解し、アジュバント DMRIE-C (Invitrogen) 50 μ l と混合した。15 分