

下痢症ウイルスの病原性解析

研究分担者 片山 和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部

協力研究者 岡 智一郎 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨：ノロウイルスの全長遺伝子、非構造蛋白質領域、構造蛋白質領域を哺乳類細胞で発現し、細胞への影響を調べるため、ノロウイルス GII/3 株のゲノム全長 cDNA を、哺乳類プロモーターEF-1 α 下流に組込んだコンストラクトを作製し、細胞内へ導入して発現させた。GII/3 株全長遺伝子を発現した細胞内には全ての非構造蛋白と構造蛋白が発現し、ゲノム RNA の複製とマイナス鎖の合成、サブゲノム RNA の合成が観察された。更に細胞内には、比重 1.40 g/ml のウイルス様粒子が産生された。産生された粒子は、比重 1.40 g/ml を示し、完全長のゲノム RNA と VPg がパッケージされていた。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) は非細菌性急性胃腸炎の主たる病因ウイルスである。本ウイルスは現在 1~5 まで 5 つの遺伝子群 (genogroup I~V, GI~GV) に分類され、このうちヒトに感染するのは GIII, GV を除く GI, GII, GIV である。ノロウイルス粒子は直径 38nm の小型球形ウイルスで約 7.5kb のプラス一本鎖 RNA を遺伝子に持つ。未だヒトに感染する NoV (HuNoV) が増殖可能な培養細胞系は見つかっていない。

本研究では、哺乳類細胞内での NoV 複製を再現するため、リバーシジェネティクスシステムの構築を目指し、NoV GII/3 株の全長遺伝子 cDNA を哺乳類プロモーターEF-1 α 下流にクローニングしたコンストラクトを用いて、ウイルス蛋白の翻訳と切断、さらにウイルス様粒子

(progeny virus ; PVs) の形成を解析した。

B. 研究方法

1. ウイルスとプラスミドコンストラクション

1998 年に埼玉県衛生研究所で同定された NoV GII/3 U201 株を用いた。患者糞便材料から、ウイルスゲノム RNA を抽出後、遺伝子を 2 分割し定法に従って RT-PCR で増幅した。pENTR-D-TOPO vector (Invitrogen) へのクローニング後、数ステップの増幅とクローニングを経て、3'末端にリボザイムを有する全長クローンを作製した。また、全長クローンのプロテアーゼ活性を欠失した変異体クローン、ポリメラーゼ活性を欠失した変異体クローンを作製した。また、構造蛋白質の発現のコントロールとして、サブゲノミック RNA 領域に相当す

るクローンを作製した。これらのクローンを、EF-1 α 哺乳類細胞プロモーターを有する pKS435 ベクターを改変した pKS435gateA3 ベクターに、gateway クローニング法 (Invitrogen) によってサブクローニングし、哺乳類細胞での発現実験に用いた。

2. ウイルス蛋白特異抗体

6種類 (Nterminal protein, NTPase, 3A-like protein, VPg, protease, RNA dependent RNA polymerase; RdRp) と、構造蛋白質 VP1 と VP2 をそれぞれ定法に従って、ヒスタグ蛋白質として大腸菌で発現し、タロンカラムで精製後、ウサギおよびモルモットに接種して抗血清を作製した。

(倫理面からの配慮について)

本研究にあたっては、試料提供者の人権、尊厳、利益が保護されるよう提供試料を厳格に管理、保存した。データについて個人が特定されないよう、特段の配慮をした。動物実験に関しては外注先の「動物の保護及び管理に関する規定」を尊重した。

C. 研究結果

NoV GII/3 U201 株の全長遺伝子を COS7 細胞、293T 細胞、Huh7 細胞にそれぞれトランスフェクションし、ゲノムの発現を調べた。ORF1 にコードされる非構造蛋白質の前駆体 189kDa の発現と、ウイルスポテアーゼによる自己切断により、切断された 6 種類の非構造蛋白質が蛍光免疫染色 (IF)、ウエスタンブロットング (WB) で確認された。プロテアーゼミュータントは、ポリプロテインを切断できないため、189kDa の前駆体蛋白質の発

現のみ認められた。

NoV の非構造蛋白質が機能し、ゲノム RNA の複製、サブゲノム RNA の合成が起きる事を確認するため、ノーザンブロットングにより、細胞内の RNA を検出した。マイナス鎖プローブを用いた場合、ゲノム全長よりも 100 塩基ほど長い、プラスミドから転写された NoV-RNA 7.7kb と、ゲノムサイズの 7.6kb のバンドが確認された。これら 2 つの RNA 分子の 5'末端の塩基配列を決定した結果、プラスミドから転写された RNA と、ゲノムサイズの新生ゲノム RNA が転写されていることが明らかとなった。また、2.6kb のサブゲノミック RNA も検出され、完全長ゲノムからサブゲノミック RNA が転写されていることも明らかになった。プラス鎖プローブを用いた検出では、7.6Kb に複製中間体であるマイナス鎖ゲノム RNA が検出された。以上から、細胞内で合成された非構造蛋白質が機能し、ゲノムの複製とサブゲノムの合成が起きていることが証明された。

次に、合成されたサブゲノム RNA から構造蛋白質 VP1 および VP2 の翻訳が行われていることを、IF で調べた。細胞質には、VP1 と VP2 の発現が認められた。また、VP1 の発現は、非構造蛋白質の発現している細胞のみに認められた。

発現した構造蛋白質が PVs を形成することを確認するため、細胞へ U201 ゲノム全長プラスミドコンストラクトをトランスフェクションしてから 24 時間後の細胞をハーベストし、CsCl 浮上密度勾配遠心法によって PVs の精製を試みた。WB によって VP1 蛋白質を検出し

たところ、1.36 g/ml と 1.40 g/ml, 1.42 g/ml のフラクションに VP1 のシグナルが認められた。ノーザンブロットングにより NoV ゲノムの検出を行ったところ、1.40 g/ml のフラクションにのみ 7.5kB の NoV ゲノムのシグナルが検出された。VPg 抗体による WB を行ったところ、このフラクションにのみ VPg のシグナルが検出された。更に、電子顕微鏡で粒子の有無を確認したところ、1.40 のフラクションに NoV 様粒子が認められた。

C. 考察

NoV の全長遺伝子上には非構造蛋白質をコードする ORF1 と構造蛋白質 VP1 をコードする ORF2、VP2 をコードする ORF3 が存在している。Huh7 細胞に、NoV 感染患者の便より NoV を分離精製した後、精製した NoV から NoV-RNA を抽出して、トランスフェクションすると、NoV が培養上清に産生される。しかし、新たに産生された NoV は、Huh7 に感染することができないことが明らかにされている。つまり、NoV が培養細胞で増殖できないのは、ウイルスの吸着、侵入から脱核、ゲノム RNA の放出までのいずれかのステップに問題があるためと考えられている。

そこで、我々は 2006 年、侵入から脱核までのステップをジャンプし、細胞内に大量の NoV-RNA を供給して NoV の複製機構を解析するため、T7 プロモーターと組換えワクチニアウイルス T7 を用いたリバーシジェネティクスが試みた。しかし、このシステムは、組換えワクチニアウイルスに由来する蛋白質の影響により、NoV の構造蛋白質の合成阻害が起き、PVs の形成が認められず、NoV の細胞内

複製のモデルとなり得なかった。

本研究では、ヘルパーウイルスの NoV の編訳へ与える影響を排除し、NoV ゲノム発現から粒子形成をモニター可能なリバーシジェネティクスシステムの構築を目指した。本システムでは、非構造蛋白質の合成、protease によるポリプロテインの切断、6 種類の成熟した非構造蛋白質の産生が観察され、更にはゲノムの複製、サブゲノミック RNA 合成及び翻訳、構造蛋白質の合成と一連のウイルス複製行程の進行が細胞内で観察された。そして、核酸と VPg を内包した NoV 様粒子が電子顕微鏡で観察された。

この NoV 様粒子は、核酸を内包しており、患者便材料から抽出精製した感染性 NoV と同じ比重 1.40 g/ml を示したことから、完全な NoV 粒子である可能性が高い。現在、PVs の感染性を調べるすべはないが、PVs が感染性を有する可能性はある。本システムにより、NoV ゲノムを操作し、ノロウイルス蛋白質が細胞へ与える影響調や、NoV のレプリケーション機構を研究することが可能となった。

E. 結論

NoV cDNA から哺乳類細胞を用いて、ヘルパーウイルスを必要としない、リバーシジェネティクスシステムの構築に成功した。本システムは、NoV の病原性発現機構、複製機構を研究するための優れたツールとなる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

1. Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Okui T, ○Katayama K, Takeda N, Oka T. Characterization of sapovirus strains in outbreaks in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis* 61: 504-. 2008
2. Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, ○Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H. 2008. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol* 82: 11247-62. 2008.
3. Wu FT, Oka T, Takeda N, ○Katayama K, Hansman GS, Muo CH, Liang SY, Hung CH, Dah-Shyong Jiang D, Hsin Chang J, Yang JY, Wu HS, Yang CF. Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 14: 1169-71. 2007
4. Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, ○Katayama K, Miyashita K, Takagi H, Tohya Y, Sato H, Takeda N. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J Virol* 81: 6798-806. 2007.
5. Hansman GS, Sano D, Ueki Y, Imai T, Oka T, ○Katayama K, Takeda N, Omura T. Sapovirus in water, Japan. *Emerg Infect Dis* 13: 133-5. 2007
6. Guix, S., Asanaka, M., ○Katayama K, Crawford, S. E., Neill, F. H., Atmar, R. L., Estes, M. K. Norwalk Virus RNA is infectious in mammalian cells. *Journal of Virology* 81:12238-12248. 2007
7. Sharp, T. and the host researcher ○Katayama K. Research Report of JSPS Summer program 2007: 123-124, 2007.
8. Hansman, G. ., Oka, T., ○Katayama K, Takeda, N. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Reviews in medical virology* 17:133-141, 2007.
9. 吉田徹也、粕尾しず子、畔上由佳、宮澤衣鶴、小林正人、白石 崇、岡 智一郎、片山和彦、武田直和 長野県内で発生したサボウイルスによる集団感染性胃腸炎の2事例 IASR Vol. 29 p. 129-132: 2008.
10. 大塚有加、近藤玲子、市川高子、山下育孝、大瀬戸光明、関谷安正、上田哲郎、芝 信明、岡 智一郎、片山和彦、武田直

- 和 結婚式場におけるサボウイルスを原因とする食中毒事例-愛媛県 IASR Vol. 29 p. 198-200: 2008.
11. 片山和彦 「ノロウイルス感染症を予防するには“冬に流行する感染性胃腸炎”」 婦人の友 第102巻 第16号 通巻1267号 p158-161. 2008
 12. 片山和彦 「ノロウイルス感染症」チャイルドヘルス 特集; 詳しく知りたい冬のウイルス感染症 vol.11, no.11 p25-29, 2008.
 13. 片山和彦 ノロウイルス感染症の検査とその意義 アボット感染症アワー <http://radio848.rs.jp.net/abbott/> 2007.
 14. 片山和彦 ノロウイルスの遺伝子型 IASR, <http://idsc.nih.go.jp/pathogen/refer/noro-kaisetu.html> 2007
 15. 片山和彦 ノロウイルス複製系における最近の知見 IASR Vol. 28 p 293-294 : 2007
 16. 片山和彦、岡部信彦 感染症の話、ノロウイルス感染症 IDWR, http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k04/k04_11/k04_11.html 2004, 2007 改訂
 17. 片山和彦 養護教諭のなんでも質問箱 ノロウイルスについて 「心と体の健康」, Vol.11 No.117 Nov. p86-88, 2007.
 18. 本村和嗣, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, Hansman Grant, 横山勝, 片山和彦, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳 「2006 秋冬期シーズンに流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析」病原体微生物情報 (IASR) 10月号 p3-p4 2007.
 19. 片山和彦 ウイルス感染症-最新の動向 ノロウイルス感染症 臨床検査 vol.53 p70-76:2009
 20. 片山和彦 特集=感染症をめぐるトピックス ノロウイルス感染症の対策と治療 MEDICAMENT NEWS 1969号 : 2009
- ## 2. 学会発表
1. 岡 智一郎、山本 真民、宮下 佳奈、グラント・ハンスマン、片山 和彦、脇田 隆字、武田 直和「ネコカリシウイルスプロテアーゼのトランス切断活性の検討」第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 平成19年12月 横浜
 2. 岡 智一郎、片山 和彦、宮下 佳奈、山本 真民、ハンスマン グラント、脇田隆字、武田 直和「サボウイルスプロテアーゼのトランス切断活性」日本薬学会第128年会、2008年3月、横浜
 3. 片山和彦「ノロウイルスの感染症の基礎」第82回日本感染症学会総会シンポジウム ノロウイルス感染症の最前線 平成20年4月17-18日 島根県松江市
 4. Oka T, Iwakiri A, Yamamoto S, Katayama K, Wakita T, and Takeda N. Sequential

- analysis of fecal sapovirus shedding. 第14回国際ウイルス学会、2008年8月10-15日、トルコ（イスタンブール）
5. Oka T, Yamamoto M, Miyashita K, Katayama K, Wakita T, and Takeda N. Role of amino acid residues located upstream from cleavage site on sapovirus ORF1 polyprotein processing. 第14回国際ウイルス学会、2008年8月10-15日、トルコ（イスタンブール）
 6. Kazuhiko Katayama, Grant S. Hansman, Tomoichiro Oka, Yoshiyuki Suzuki, Takaji Wakita and Naokazu Takeda. The newly identified human Norovirus strain HK299 may be recombinant between genogroup. 第14回国際ウイルス学会、2008年8月10-15日、トルコ（イスタンブール）
 7. Tomoichiro Oka, Masaru Yokoyama, Kazuhiko Katayama, Mami Yamamoto, Kana Miyashita, Satoko Ogawa, Kazushi Motomura, Hiroshi Tsunemitsu, Takaji Wakita, Hironori Sato, and Naokazu Takeda. Substrate specificities of calicivirus-encoded 3C-like proteases. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases 2008年10月6日 ベトナム（ハノイ）
 8. 片山和彦、岡智一郎、脇田隆字、武田直和「ノロウイルスプロテアーゼを利用したノロウイルスリバースジェネティクスシステムの制御」第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年會合同大会2008年12月9日（火）-12日（金）神戸ポートアイランド
 9. 片山和彦、村上耕介、鈴木さやか、岡島徹也、灘野大太、岡智一郎、松田幹「ノロウイルス・ウイルス様粒子（VLPs）のヒト腸上皮様 Caco-2 細胞への結合様式とウシ初乳の VLPs 結合抑制効果」第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年會合同大会2008年12月9日（火）-12日（金）神戸ポートアイランド
 10. 岡智一郎、横山勝、片山和彦、恒光裕、山本真民、宮下佳奈、本村和嗣、脇田隆字、佐藤裕徳、武田直和「カリシウイルスプロテアーゼの活性発現に重要なアミノ酸残基の解析」第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年會合同大会2008年12月9日（火）-12日（金）神戸ポートアイランド
 11. 横山勝、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳「カリシウイルスプロテアーゼ分子モデルによる基質認識の解析」第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年會合同大会2008年12月9日（火）-12日（金）神戸ポートアイランド
 12. 片山和彦、岡智一郎、脇田隆字、武田直和「リバースジェネティクスを利用したノロウイルスの病原性発現機構の解析」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山
 13. 片山和彦「ノロウイルスのリバースジェネティクスシステムとその展望」第56

- 回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山
14. 高木弘隆、遠矢幸伸、片山和彦、岡智一郎、武田直和、杉山和良「国内で分離されたマウスノロウイルスの安定性および消毒剤に対する感受性の検討」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山
 15. 岡智一郎、横山勝、片山和彦、恒光裕、山本真民、宮下佳奈、本村和嗣、守宏美、中村浩美、脇田隆宇、佐藤裕徳、武田直和「カリシウイルスプロテアーゼの基質認識に影響する切断部位上流アミノ酸残基の解析」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山
 16. 横山勝、岡智一郎、片山和彦、山本真民、宮下佳奈、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳「サポウイルスプロテアーゼの基質認識に関わるアミノ酸残基の解析」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山
 17. 北島正章、岡智一郎、片山和彦、原本英司、片山浩之、武田直和、大垣真一郎「河川中のノロウイルスを指標にした地域流行株の把握」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山
 18. 吉田徹也、粕尾しず子、畔上由佳、内山友里恵、薩摩林一代、白石崇、岡智一郎、片山和彦、武田直和「長野県内で発生したサポウイルスによる集団感染性胃腸炎の2事例」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山
 19. 本村和嗣、横山勝、岡智一郎、中村浩美、守宏美、Hansman Grant、片山和彦、田中智之、真崎宏則、星野和彦、藤本恭、秋山美徳、木村博一、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳「ノロウイルスの免疫淘汰と周期的流行の分子機序」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山
 20. 原田誠也、岡田峰幸、岡智一郎、八尋俊輔、西村浩一、松尾繁、中島龍一、篠崎邦子、片山和彦、武田直和「サポウイルスによる散発性下痢症の地域流行-熊本-」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山
 21. 植木洋、庄司美加、山本美和子、阿部勝彦、伊藤文明、池田義文、西尾治、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛「カキを用いたサポウイルスの環境調査」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山
 22. 飯塚節子、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛「サポウイルスとノロウイルスが検出された食中毒事例」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山
 23. 岩切章、山本正悟、岡智一郎、片山和彦、武田直和「リアルタイムRT-PCR法を用いた急性胃腸炎患者糞便中のサポウイルス排泄期間の解析」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山
 24. 小澤一弘、岡智一郎、片山和彦、本村和嗣、中村浩美、守宏美、佐藤裕徳、武田直和「調理従事者を対象としたノロウイ

「知的財産権の網羅的検出調査」第56回日本ウィ ルス学会学術集会、2008年10月、岡山	なし 1. 特許取得 なし 2. 実用新案登録 なし 3. その他
H. 知的財産権の出願・登録状況	

「狂犬病に対する治療法の開発」

研究分担者 西園 晃 大分大学医学部微生物学講座 教授

研究要旨：

今年度得られた研究成果は以下の2点に大別される。I) 狂犬病侵淫地での媒介動物(主にイヌ)の実験室内診断をより迅速に行うために、狂犬病ウイルスN蛋白を特異的に認識する単クローン抗体を利用したイムノクロマト法による抗原迅速診断アッセイ系を開発した。同一の単クローン抗体を用いた金コロイド標識による抗原検出系では、脳乳剤中のウイルス抗原を鋭敏度95.5%、特異度92.8%で検出できた。一方、異なった2種類の単クローン抗体を用いた検出系では鋭敏度93.2%、特異度100%の検出力であった。この狂犬病ウイルス検出系は安価、短時間(15分)で狂犬病の診断をフィールドで行うことが可能とし、狂犬病の侵淫状況の調査に多大な貢献をすることが期待された。

II) 狂犬病の感染防御にはウイルス表面のG蛋白に対する中和抗体が重要な役割を果たしており、その測定には生きたウイルスを用いた感染中和試験が最も一般的とされているが、測定できる施設は一部に限られている。そこで今回われわれはイムノクロマトグラフィー法の原理に基づき、狂犬病のG蛋白を検出できる単クローン抗体でキットを構築し、不活化した狂犬病ウイルスと血清を反応後、このキットに添加することで中和抗体の存在を定性的に測定する迅速検査法を開発し、狂犬病ワクチン接種者、未接種者計42サンプルを検討した。従来の中和試験をGolden standardとした場合のRAPINA testの感度、特異度、一致率はそれぞれ100%、82.6%、90.5%であり、陽性反応的中率、陰性反応的中率はそれぞれ100%、82.6%であった。生ウイルス、培養細胞や蛍光顕微鏡を使用せず、検査時間も2時間程度と短く、今後スクリーニング検査として有用な方法と考えられた。

I. 抗狂犬病ウイルス単クローン抗体を用いた狂犬病の迅速診断系の構築

A. 研究目的

現在、狂犬病の感染は、感染病獣の脳組織を用いた免疫蛍光抗体法や遺伝子増幅法などの実験室診断により行われる。この場合訓練を受けた医師・獣医師や解剖の設備、安全キャビネットや蛍光顕微鏡など診断のための施設の完備が必要とされる。単クローン抗体#10-41-F2と#87-3E2は以前に我々が確立したもので、狂犬病ウイルス構成蛋白群との反応性から内部核(N)蛋白を認識する抗体である。今回、金コロイド粒子を標識した標識単クローン抗体と、

ニトロセルロースフィルター膜状に固着させた単クローン抗体との間でウイルス抗原を捕捉し検出する系をイムノクロマト法を利用することで作成した。

この方法を用い、狂犬病動物の脳組織または唾液中に含まれる狂犬病ウイルス抗原を迅速高感度に検出し、狂犬病動物または狂犬病患者の確定診断を、これまでの脳組織を用いた診断法に依らずに行えるか否かを検討することを目的とした。

B. 研究方法

本技術はニトロセルロース膜の両端に濾紙を固着させ、一方の端の濾紙に金コロイド粒子であらかじめ標識しておいた単

クローン抗体#10-41-F2 を結合させてある。狂犬病ウイルスを含んだ検体を濾紙の端に滴下すると、検体は濾紙中の標識#10-41-F2 抗体と結合し濾紙上を進み、その後ニトロセルロース膜上の検出バンドの位置に固着させてある#10-41-F2 抗体に捕捉されて陽性のバンドとして確認できる(図1)。今回われわれは陽性バンドの位置に#10-41-F2 抗体を用いたものを type I キット、#87-3E2 抗体を用いたものを type II キットと命名し、その性能を比較検討した。

1. キットの性能を検討するため、CVS-11 株 1×10^7 FFU/ml を 2% FCS 入りイーグル培養液で 10 倍段階にて 10^{-2} まで 9 段階希釈したものを、RNA 抽出試薬(Isogen, ニッポンジーン)を用いウイルスゲノム RNA を抽出、狂犬病ウイルス N 遺伝子特異的プライマーで cDNA を合成の後、同部分の 660 塩基長を増幅できるプライマーセットで増幅し、アガロースゲル電気泳動で確認した。

またキットのウイルス特異性を検討するため、われわれが保有しているリッサウイルスの中から、リッサウイルスゲノタイプ 1 型(古典的狂犬病ウイルスである HEP-Flury 株、ERA 株、RCEH 株、Nishigahara

株、1088 街上毒株)、これ以外のリッサウイルス(ラゴスウイルス、モコラウイルス、デュビンハーゲウイルス)、またリッサウイルス属が属するラブドウイルス科の水疱口内炎ウイルス、大分 296 ウイルスの BHK 感染培養上清、または感染脳乳剤を使用した。さらに感染研獣医部井上博士より供与された大腸菌組み換え狂犬病ウイルス N 蛋白質との反応も検討した。

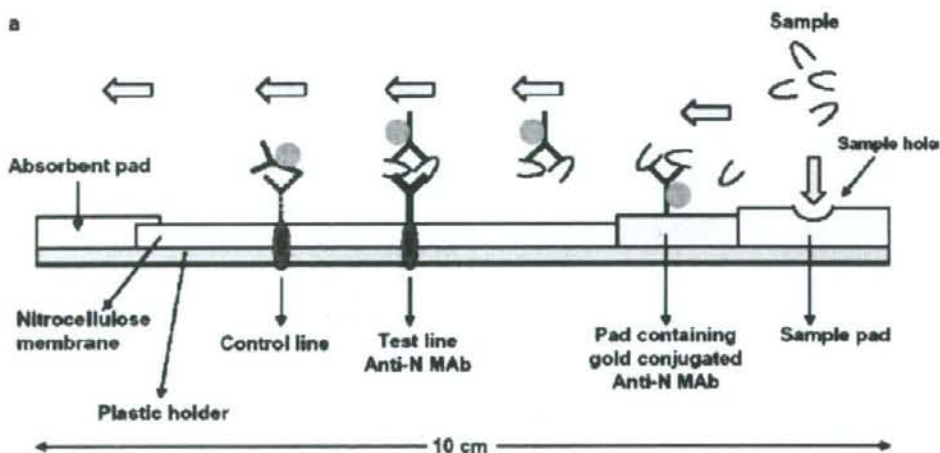
2. キットの鋭敏度と特異度を検討するために、タイ赤十字協会 Queen Saobavha Memorial Institute の Pakamat Khawplod 博士より 80 検体のイヌ脳ホモジネート検体を用いて検討を行った。これらの検体は、あらかじめ N 蛋白質に対する蛍光抗体観察にて陽性を確認できているものを含んでいる

C. 研究結果

1. 検出感度

本キットは 10^4 Focus forming units/0.1 ml の狂犬病ウイルス CVS-11 株を検出可能であった。また PCR 法と比較するとその感度は 1/100 程度であった(図2~3)。Type I キットのほうが若干検出感度に優れていた。

図1 検出系の概要



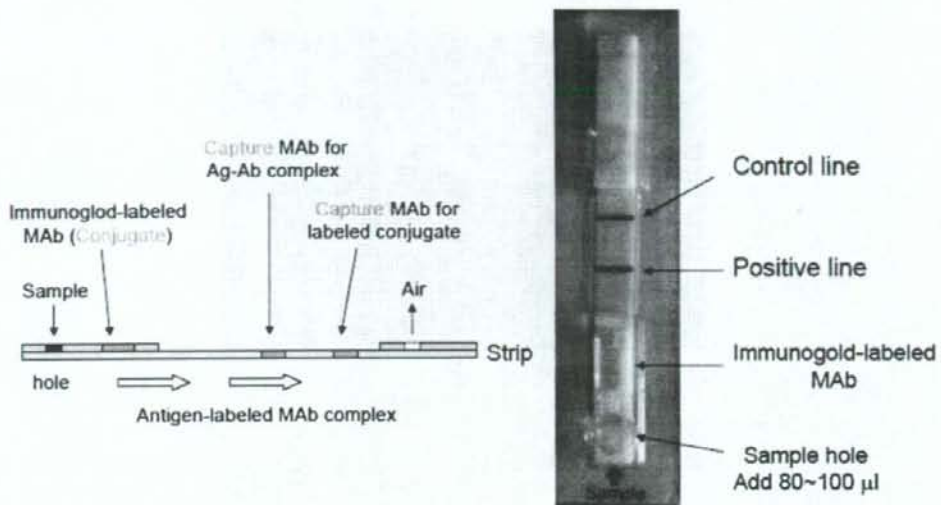
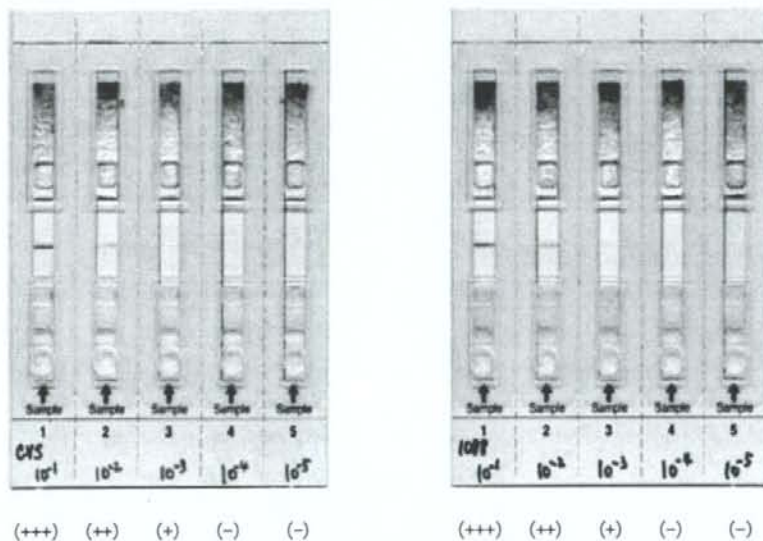


図2、3 キットの検出感度の検討

使用した狂犬病ウイルス：CVS-11 strain 1×10^7 FFU/ml 1088 脳乳剤 1×10^7 FFU/ml



上記図2の左サンプル (CVS-11 株 1×10^7 FFU/ml) を 2% FCS 入りイーグル培養液で 10 倍段階、 10^{-2} まで 9 段階希釈したものを、RNA 抽出試薬 (Isogen, ニッポンジーン) を用いウイルスゲノム RNA を抽出、狂犬病ウイルス N 遺伝子特異的プライマーで cDNA を合成の後、同部分の 660 塩基長を増幅できるプライマーセットで増幅後、アガロースゲル電気泳動で確認した (図3)。

lane 1 & 11: 分子量マーカー, lane 2-9: $10^0 - 10^{-2}$ FFU/ml, lane 10: culture media



(図3)

(++) (+) (+) (+) (+) (-) (-) (-) (-) (-) (-) 判定

RT-PCR では 10^2 コピーが検出限界であった。これよりキットの検出感度は RT-PCR に 1/100 程度と考えられた。

2. キットの特異性の検討

本キットはリッサウイルスゲノタイプ 1 型 (古典的狂犬病ウイルスである HEP-Flury 株, ERA 株, RCEH 株, Nishigahara 株, 1088 街中毒株) を広く検出すること

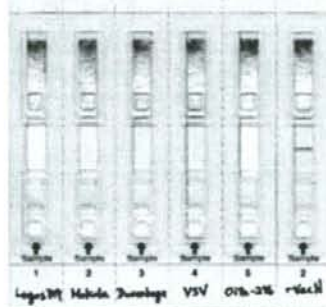
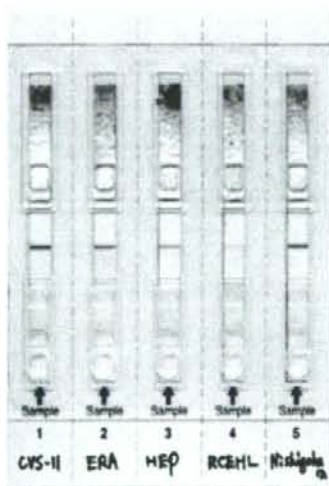
が可能であり、これ以外のリッサウイルス (ラゴスウイルス、モコラウイルス、デュビンハーゲウイルス) には反応しなかった。またリッサウイルス属が属するラブドウイルス科の水疱口内炎ウイルス、大分 296 ウイルスに対しても交差反応性を示さなかった (図4)。特異性に関しては、type I, II 共に差はなかった。

図4 各種ウイルスに対する反応特異性

狂犬病ウイルス CVS-11 株, ERA 株, HEP-Flury 株, RCEH 株, Nishigahara 株)

リッサウイルス属ウイルス: ラゴスウイルス (Lagos B19), モコラウイルス, デュビンハーゲウイルス

ラブドウイルス科ウイルス: 水疱口内炎ウイルス, 大分 296 ウイルス



(図4)

Table 1 Ability of ICT to detect RABV, *Lyssavirus*, *Rhabdovirus* and other canine viruses.

Virus	Origin	Result		
		Type 1	Type 2	
RABV	CVS-11	culture sup	+	+
	ERA	culture sup	+	+
	HEP-Flury	culture sup	+	+
	Nishigahara	culture sup	+	+
<i>Lyssavirus</i>	1088	SMB	+	+
	Lagos B-19	SMB	-	-
	Mokola	SMB	-	-
<i>Rhabdovirus</i>	Duvenhage	SMB	-	-
	VSV	culture sup	-	-
Other viruses	Oita-296/1972	SMB	-	-
	CAV2	culture sup	-	-
	CHV	culture sup	-	-
	CPV	culture sup	-	-
	CCV	culture sup	-	-
	CDV	culture sup	-	-

SMB: 10% sucking mouse brain.

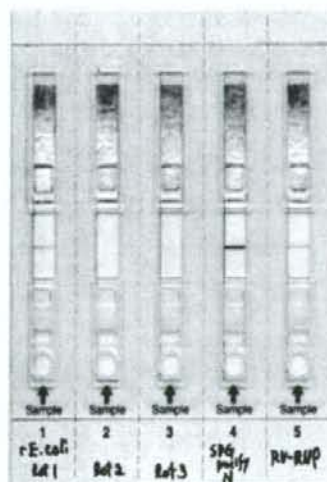
3. モノクローナル抗体#10-41-F2 と#87-3E2 が認識する抗原エピトープ#10-41-F2 は狂犬病ウイルス内部核蛋白のエピトープ III (源らにより報告済み) を認識し、#87-3E2 は同のエピトープ II (源らにより報告済み) を認識するものであることが、ヌクレオプロテインに対するモノクローナル抗体パネルを用いて確認

された。

3. 組み換え大腸菌に発現させた内部核蛋白とも本キットはよく反応し、検出感度は精製蛋白で 10ng/ml オーダーであった (図 5)。

図 5 組み換え大腸菌発現 CVS 株 N 蛋白 (N9.5//pQ/pQE9 DH5a) を用いた検出限界の検討

レーン 1: 667 µg/ml, レーン 2: 46 µg/ml, レーン 3: 4 µg/ml, レーン 4: ショ糖密度勾配法にウイルス粒子より精製した N 蛋白 43 µg/ml, レーン 5: RV RNP (180 µg/ml)



(図 5)

Table 2 Concordance of ICT kit and FAT

	Type 1		Type 2	
	+	-	+	-
FAT +	42/44	2/44	41/44	3/44
FAT -	4 ¹ /36	32/36	0/36	36/36

¹Very faint band, clearly identified as a negative.

5. 鋭敏度と特異度

80 検体のイヌ脳ホモジネートを用いた検討では、検出感度で同一の単クローン抗体 (#10-41F2) を用いた抗原検出系では、脳乳剤中のウイルス抗原を鋭敏度 95.5%、特異度 92.8% で検出できた。一方、異なった 2 種類の単クローン抗体 (#10-41F2 と #87-3E2) を用いた検出系では鋭敏度 93.2%、特異度 100% の検出力であった (表)

D. 考察

通常の狂犬病の実験室診断では、病獣の解剖施設、バイオセーフティーキャビネットの元での脳乳剤または印圧標本作成、蛍光標識抗体との反応、蛍光顕微鏡下での観察と複数のステップが必要である。今回開発した狂犬病ウイルス迅速診断系は、解剖施設とバイオセーフティーキャビネットさえ完備していれば、それ以上の狂犬病診断のための実験室を完備していな、または診断用抗体の購入のままなら無い施設でもその診断を可能にするものと考えられる。今後は、イヌをはじめとする感染病獣の唾液を用いて、より広範囲での狂犬病の感染診断を行い正確な疫学情報の収集と、狂犬病予防策の立案に役立つことが期待される。

E. 結論

狂犬病ウイルス N 蛋白に対する単クローン抗体を用いて、イムノクロマト法の原理によって狂犬病ウイルスを、病獣の検体から迅速かつ鋭敏、特異的に検出できアッセイ系を開発した。本検査方法は、設備の整っていない流行地での、狂犬病の実験室診断に大きな力を発揮することが期待される。

II. 抗狂犬病ウイルス糖タンパクモノクローナル抗体を用いて構築した迅速狂犬病ウイルス検出系を利用した血清中和抗体計測システム開発と評価

A. 研究目的

狂犬病の臨床的特徴は、ひとたび発病すればほぼ 100% 死亡すること、潜伏期が通常 1~3 ヶ月と長いことである。発病した場合有効な治療法はないため、狂犬病感染動物に咬まれた後、定められた間隔で繰り返し狂犬病ワクチンを接種する暴露後発症予防が狂犬病死を免れるための唯一有効な手段である。一方、狂犬病ウイルスの取り扱い者、獣医師、狂犬病侵襲地への旅行者へは予防的なワクチンの接種、つまり暴露前接種が行われる。

狂犬病感染予防には狂犬病に対する中和抗体価が重要な役割を果たしており、WHO と Office International des Epizooties (OIE) は 0.5 IU/ml 以上を十分な中和抗体価と定義している。その測定方法は迅速蛍光フォーカス抑制試験 rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) が最も推奨されているが、測定に 2 日を有すること、生きた狂犬病ウイルスを使用すること、細胞 (BHK 細胞などの感受性細胞) が必要なこと、蛍光顕微鏡が必要なことなどから、測定できる施設は一部に限られている。また一部の発展途上国では *in vivo* の感染評価系としてマウス脳内接種試験も未だに行われているが、同様に労力、動物実験施設、時間を要する。

そこで今回われわれはイムノクロマトグ

ラフィー法の原理に基づき、狂犬病の G 蛋白を検出できるキットを構築し、不活化ウイルスと血清をインキュベート後、このキットに添加することで感染性ウイルスが中和抗体により消費されることで、間接的に中和抗体価の存在を定性的に測定する方法を開発することを研究の目的とした。

B. 研究方法

1. ワクチン接種者血清

過去に狂犬病ワクチン接種の既往のあるもの (n=27)、接種既往のないもの (n=10) から血清サンプルを得た。接種既往者のうち 5 名はワクチンの追加接種も行い、計 42 サンプルについて検討を行った。使用されていたワクチンは化血研製ヒト用組織培養狂犬病ワクチン (PCEC) がほとんどであった。それぞれの参加者から採血を行い、遠心分離にて血清を分離した後、56°C、30 分にて補体の非働化を行い、測定まで -20°C にて保存された。本研究はすべて大分大学医学部 IRB の承認を得て行った。

2. 使用したウイルスとその不活化法

RFFIT 用に使用したウイルスは、Challenge virus standard (CVS-11) 株で、本ウイルスは 2% FBS を含む Eagle's MEM 培地で baby hamster kidney epithelial cell line (BHK-21) にて増殖し、回収した。

不活化 CVS-11 ウイルスは、以下のように調整した。BHK 細胞に CVS-11 を m. o. i. 0.1 で感染させ、4 日後に培養上清を回収し、4°C 2,800 回転、10 分間の遠心により細胞を沈殿させ、上清を回収した。上清に 37%ホルムアルデヒド (ホルマリン) を最終濃度 0.05% となるように加え、37°C 48 時間攪拌した。その後、ホルマリン処理した培養上清を 16,000g 24 時間高速遠心し、上清を除去した後、沈殿物を当初の液量の 1/10 の PBS に懸濁した。その後、4°C 24 時間 PBS にて透析し、最終標品とした。4batch 作成した最終標品の蛋白濃度 (Lowry 法にて測定) はいずれも 1.5~1.8mg/ml であり、ほぼ一定であった。また最終標品をマウス神経芽細胞腫 NA-C1300 細胞または BHK-21 細胞に添加し、24 時間後 FITC-標識抗狂犬病ウイルス抗体を反応させ、蛍光顕微鏡下にて

観察し、感染能力が残存していないことを確認 (不活化の確認) した。

3. 迅速蛍光フォーカス抑制試験 (RFFIT)

狂犬病中和抗体価は RFFIT 法にて測定された。それぞれの血清サンプルは 96 穴プレートにて、2% FBS を含む Eagle's MEM 培地を使用することで 2 倍段階希釈を行った。すべてのサンプルは duplicate にて測定された。段階希釈血清に 30~100 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose) の CVS-11 ウイルスをそれぞれの well に接種し 37°C、5% CO₂ 存在下にて 90 分インキュベートした。その後 BHK-21 細胞 (1.0 × 10⁶ cells/ml) をそれぞれの well に加え、再度 24 時間 37°C にてインキュベートした。その後プレートを 90% アセトンで固定し、FITC-標識抗狂犬病ウイルス抗体 (Fujirebio Diagnostics, Inc., Malvern, PA, USA) と 37°C で 45 分反応させた。50% 蛍光フォーカス抑制濃度は Spearman-Kärber 法にて計算された。中和抗体価は WHO 標準血清との比較により international units (IU/ml) で示された。

4. イムノクロマト法による中和抗体価の判定 (RAPINA test)

狂犬病ウイルスの G 蛋白を検出できるキットをイムノクロマトグラフィーの原理に基づき作製した。まず当教室で作成された狂犬病ウイルスの G 蛋白に対するモノクローナル抗体 #4-4 (サブクラスは IgG1 で G 蛋白の中和エピトープ II を認識する。標準ウイルス CVS に対する中和活性は 1mg/ml の精製抗体で 130.51 IU/ml) を作製、キットの nitrocellulose membrane の test zone に 0.75 μg/strip で固定した。Control zone には purified goat anti-mouse IgG を 0.70 μg/strip で固定した。またもう一つの G 蛋白に対するモノクローナル抗体 #4-12 (サブクラスは IgG2a で G 蛋白の中和エピトープ II を認識する。標準ウイルス CVS に対する中和活性は 1mg/ml の精製抗体で 67.15 IU/ml) を金コロイドで標識し、パッドに吸収させた。ウイルスサンプルは sample hole に滴下された後、ニトロセルロース膜上を進み、検体中に G 蛋白が含まれていれば、パッド部分の抗体と結合し、抗原-抗体複合体が形成される。これはさ

らに進んで、test zone 部のもう一つの抗 G モノクローナル抗体でトラップされ、この部位で発色し赤色のバンドとして確認できる。(Nishizono A. et al. Microbiology and Immunology 2008, 52: 243-249) (図 1A)。本キットのウイルス検出限界は不活化ウイルス総蛋白量に換算して $250 \text{ ng}=1.6 \times 10^5$ focus forming unit であった。

次にこのキットを使用し、迅速中和抗体価 (Rapid neutralizing antibody: RAPINA) の定性的測定系を構築した。まず WHO の国際標準血清 0.5 IU/ml、1.0 IU/ml を使用、不活化した CVS-11 ウイルスと 90 分インキュベート後キットに添加し、30 分後に判定。0.5 IU/ml の標準血清で処理したウイルスでバンドが確認 (つまり 0.5 IU/ml では不活化ウイルス中の G 蛋白を中和できないことを意味する) され、1.0 IU/ml の標準血清処理ではバンドが確認できない (つまり 1.0 IU/ml では不活化ウイルスの G 蛋白を中和できることを意味する) 不活化ウイルスの量をあらかじめ決定した。ホルマリン不活化ウイルス (1.5mg/ml) を使用した場合、おおよそ 6 μ g に相当する。次にそれぞれの血清サンプルを決定した不活化ウイルスと 90 分インキュベートし、同様にキットに添加し 30 分後に判定を行った。判定は RFFIT の結果を知らない 3 名により blind で行われた (図 1B) (図 2)。

RAPINA test の精度は RFFIT 法での中和抗体価を Golden standard として評価された。ここでの sensitivity は中和抗体価 0.5 IU/ml 以上有するものがキットで陰性に出る確率、specificity は中和抗体価 0.5 IU/ml 未満のものがキットで陽性に出る確率、陽性反応的中率はキットで陽性 (バンドが陽性) ものが中和抗体価 0.5 IU/ml 未満である確率、陰性反応的中率はキットで陰性 (バンドが陰性) のものが中和抗体価 0.5 IU/ml 以上である確率を示す。

C. 研究結果

同じサンプルの中和抗体価の検討を RFFIT 法と RAPINA test にて行った。RAPINA にて陽性、陰性と判断されたそれぞれのサンプルの RFFIT における中和抗体価を示す (Fig. 2)。RAPINA test での陽性のバンドが確認された (つまり中和抗体価を有しない)

ものには RFFIT にて 0.5 IU/ml 以上有するものはいなかったが、RAPINA test で陰性 (中和抗体価を有するもの) の中には RFFIT での中和抗体価が 0.5 IU/ml 以下のものも認められた。1.0 IU/ml 以上の中和抗体価を有するものはすべて RAPINA でも陰性であった。(図 3)

この結果から RAPINA test の精度を RFFIT 法での中和抗体価を Golden standard として評価した。表 1 に示す通り、感度 100%、特異度 82.5%、一致率 90.5%、陽性反応的中率 100%、陰性反応的中率 82.5% であった。偽陰性は陰性者 23 名のうち 4 名で確認されたが、いずれもワクチン接種既往者で RFFIT 法における中和抗体価は 0.4 IU/ml 付近であった。ワクチン未接種者では 1 例も偽陰性は確認できず、感度 100%、特異度 100% であった。1.0 IU/ml 以上の中和抗体価を有するものでは感度は 100% であった。(表 1)

D. 考察

狂犬病は狂犬病ウイルスにより引き起こされる致死性の神経ウイルス感染症であり、狂犬病感染動物に咬まれたり、傷口が唾液で汚染されたりすることにより感染する。ワクチンの普及、狂犬病免疫グロブリンの使用にも関わらず、世界中で年間約 55000 人が死亡している。狂犬病感染予防の点では、狂犬病に対する中和抗体価が唯一狂犬病に対する免疫を獲得しているかどうかの目安となるが、年間 10 億人以上いると言われているワクチン接種者の多くは十分な中和抗体価を獲得しているかどうかの確認はされていない。狂犬病ワクチンの免疫効果について WHO は 0.5 IU/ml 以上を十分な中和抗体価と定義している。その測定方法は RFFIT が最も一般的であるが、測定に 2 日を有すること、生きたウイルスを使用すること、感受性細胞が必要なこと、蛍光顕微鏡が必要なことなどから、測定できる施設は一部に限られている。このことが狂犬病ワクチン接種後の中和抗体価獲得の評価を困難にしている原因の一つとして考えられ、より簡便で迅速な中和抗体価測定方法が望まれる。

狂犬病中和抗体価の評価方法として、マ

ウス脳内接種試験、RFFIT、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)などが開発され利用されている。マウス脳内接種試験は現在でも一部の発展途上国にて行われている検査であるが、マウスを使用し、14日を有することなど簡便性に欠けている。ELISA法は測定時間が短く、バイオセーフティーを必要としない点で有用な方法である。しかしながらELISAによる測定は、厳密には全ウイルス蛋白に対する特異抗体を測定しているものであり、正確には中和抗体価とは一致しない。またELISAの吸光度測定のためのプレートリーダーなどの機器も必要である。

われわれの開発した方法は、イムノクロマトグラフィ法の原理を利用し、狂犬病中和抗体価を測定する初めての報告である。不活化ウイルスと血清サンプルを培養後、このキットに添加することで中和抗体価の検出を定性にて測定する方法である。この方法では、サンプルはまず不活化ウイルスとインキュベートされ、その後G蛋白を検出するキットに供される。その際ウイルスのG蛋白が存在すればキット上にバンドが確認される、バンドが確認されないことはつまりウイルスのG蛋白が存在しなくなったか、あるいはマスクされていることになる。狂犬病の中和抗体価は狂犬病ウイルスの表面G蛋白と関連していると言われており、今回の結果は中和抗体価と判断してもよいと考えられる。またこの方法は2時間で結果を得られるという迅速性に優れている。

今回ワクチン未接種者10名とワクチン接種者27名で42サンプルについて検討を行った。RAPINA testではRFFIT法をGolden standardとした場合のavailabilityは感度100%、特異度82.5%、一致率90.5%であり陽性反応的中率100%、陰性反応的中率82.5%であった。偽陰性は陰性者23名のうち4名で確認されたが、いずれもワクチン接種既往者でRFFIT法における中和抗体価は0.4 IU/ml付近であった。0.5 IU/ml付近の中和抗体価は注意深く扱われるべきであり、この方法の結果からだけでなく、ワクチンの接種状況などから中和抗体価の測定は総合的に行われるべきである。ワクチ

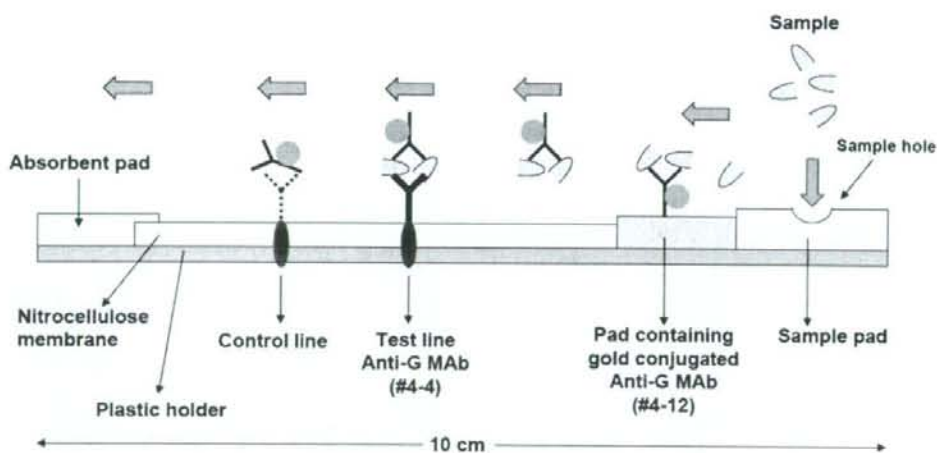
ン未接種者では1例も偽陰性は確認できず、感度100%、特異度100%であった。それらの参加者は他のウイルスに対するワクチンを過去に接種していることから、今回の方法は狂犬病ウイルス以外のウイルスに対しcross-reactivityはないと考えられる。また1.0 IU/ml以上の中和抗体価を有するものでは感度は100%であった。狂犬病ワクチン接種をスケジュール通り行うと多くは1.0 IU/ml以上の中和抗体価を有することから、ワクチン接種者においてRAPINAは有用であると考えられる。

日本においては、2006年36年ぶりの狂犬病輸入感染例が2例認められた。その後日本では海外旅行者の狂犬病に対する危機が増加し、ワクチン接種を希望するものも増加している。そのようなワクチン接種後の中和抗体価獲得の確認に、今回の方法は非常に有用であると考えられる。

E. 結論

今回われわれが開発したRAPINA testは、生きた狂犬病ウイルス、感受性細胞、蛍光顕微鏡を使用せず、検査時間も2時間程度と短いという利点があり、臨床現場での簡便性と迅速性、および安全性に優れている。今後はヒト以外のサンプルでも検討する必要がある。将来的にはワクチン接種者の中和抗体価の有無の確認、ヒト以外の動物のワクチン接種の有無やその効果、あるいは不顕性感染の有無についてもスクリーニング検査として利用できる方法である。

☒ 1(A)



☒ 1(B)

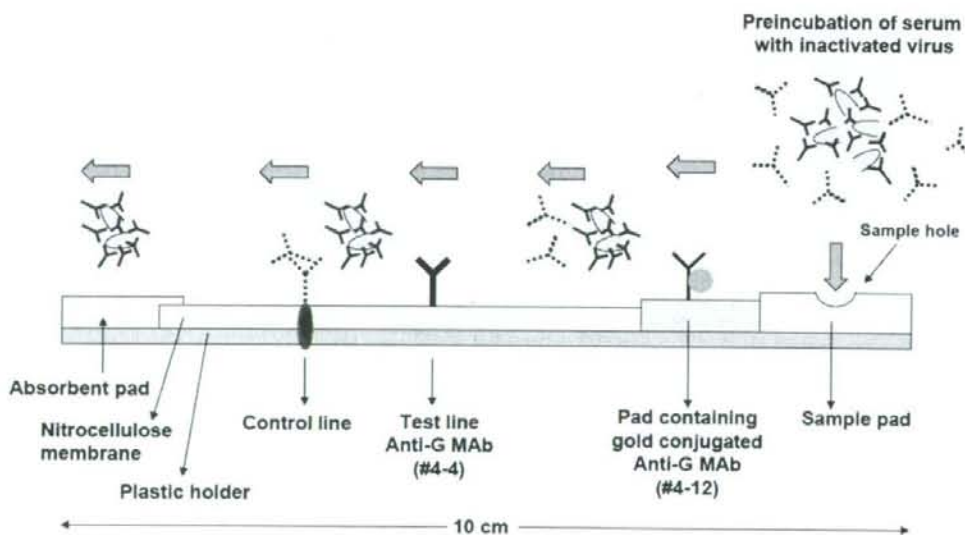


図 2

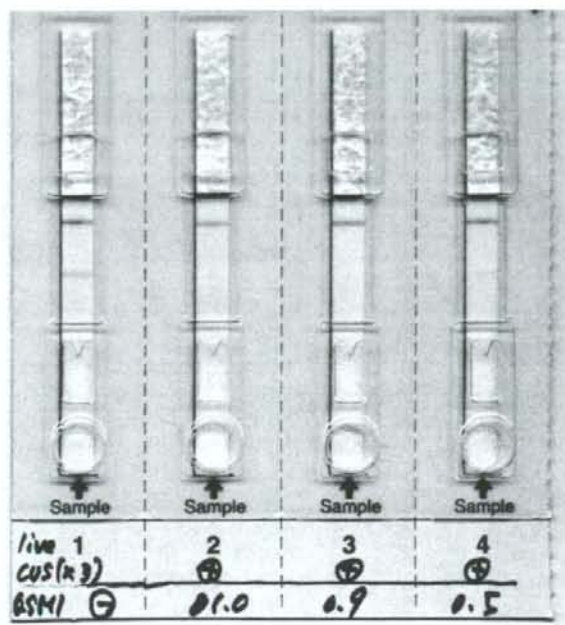


図 3 キットでの陽性(中和抗体価なし)、陰性(中和抗体価あり)と RFFIT での中和抗体価の
相関

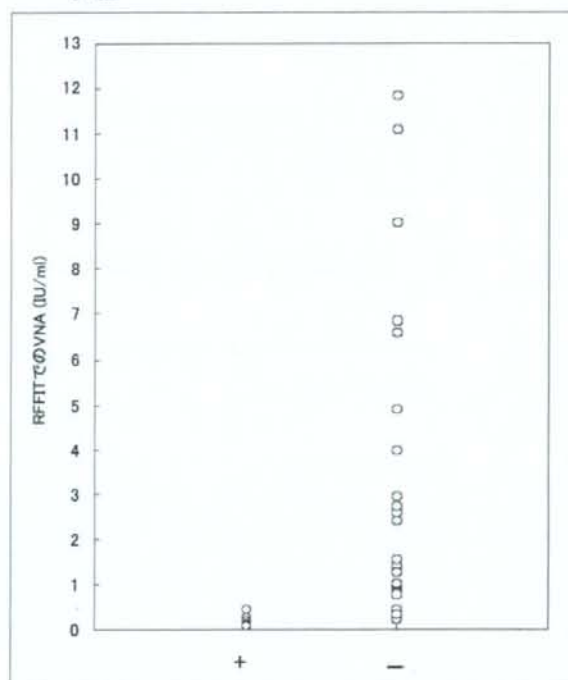


表1 RAPINA test の鋭敏度、特異度

cut off 0.5						
		VNA				
		0.5 IU/ml 未満	0.5 IU/ml 以上			
キット	+	19	0	19	sensitivity	100.0%
	-	4	19	23	specificity	82.6%
		23	19	42	accuracy	90.5%
					陽性反応の中 率	100.0%
					陰性反応の中 率	82.6%

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shibuya T, Yamashiro T, Masaike Y, Ohuchi M, Uechi G, Nishizono A. Identification of a human monoclonal Fab with neutralizing activity against H3N2 influenza A strain from a newly constructed human Fab library. **Microbiol Immunol.** 2008; 52(3): 162-70.
- 2) Nishizono A, Khawplod P, Ahmed K, Goto K, Shiota S, Mifune K, Yasui T, Takayama K, Kobayashi Y, Mannen K, Tepsumethanon V, Mitmoonpitak C, Inoue S, Morimoto K. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. **Microbiol Immunol.** 2008; 52(4):243-9.
- 3) Shiota S, Khawplod P, Ahmed K, Mifune K, Nishizono A. A pilot study on intradermal vaccination of Japanese rabies vaccine for pre-exposure immunization. **Vaccine.** 2008 Sep 26;6441-6444.

2. 総説

- 1) 西園 晃: 変貌する感染症 人類の備えは十分か? 「狂犬病」, 総合臨床, 57 (11), 2667-2672, 2008

3. 学会発表

- 1) 塩田星児, Kamruddin Ahmed, 三舟求真人, 西園 晃: 狂犬病ウイルス迅速診断キットの開発とその評価。第82回日本感染症学会総会。平成20年4月
- 2) 西園 晃: 狂犬病ウイルス。第7回みちのくウイルス塾(日本ウイルス学会後援)平成20年7月
- 3) K. Ahmed, P. Khawplod, A. Nishizono :

A Simple and Rapid Immunochromatographic Test Kit for The Diagnosis of Rabies. XIV International Congress of Virology, Istanbul, Turkey, Aug., 2008

- 4) 塩田星児, 後藤和代, 西園 晃: 狂犬病ウイルス感染成立における樹状細胞の役割とワクチン効果。第45回日本ウイルス学会九州支部総会。平成20年10月
- 5) 塩田星児, 松本 昂, Khawplod Pakamatz, 後藤和代, Kamruddin Ahmed, 万年和明, 三舟求真人, 西園 晃: 狂犬病中和抗体価迅速測定キットの開発とその評価。第56回日本ウイルス学会。平成20年10月
- 6) 塩田星児, Kamruddin Ahmed, 万年和明, 三舟求真人, 西園 晃: 狂犬病中和抗体価迅速測定キットの開発とその評価。第12回日本ワクチン学会。平成20年11月
- 7) Ahmed K: Devropment of Diagnostic Methods for Rabies. 仙台 人獣共通感染症国際シンポジウム。平成20年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

狂犬病ウイルス中和抗体判定具
特願2008-251787

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし