

図 7、マールブルグウイルス出芽に関する Nedd4.1 の機能ドメイン

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立
及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：HPS ウイルス（ハンタウイルス）の診断法と分子疫学

研究分担者：有川二郎（北海道大学大学院医学研究科）

研究要旨：ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類され、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因ウイルスである。両疾患ともに持続感染したげっ歯類を感染源とする人獣共通感染症である。HPS の流行はアメリカ・アルゼンチン等を中心に広く南北アメリカ大陸全域で報告され、公衆衛生上の大きな問題となっている。本研究では、迅速にハンタウイルス感染を検出し、さらに鑑別するための血清診断法の開発、広い範囲のハンタウイルスをカバーする PCR 法の開発について検討を行う。また、近年続々と食虫類由来ハンタウイルスが発見・報告されている。これらの新規ウイルスの診断法を準備し、あらたな感染症の蔓延に備える必要がある。

A. 研究目的

げっ歯類由来ハンタウイルスはその宿主によって以下の3群に分けられる。

1) ラットやマウスに近縁なげっ歯類を宿主として腎症候性出血熱(HFRS)を起こすネズミ亜科由来ウイルス、2) HFRSの原因となるハタネズミ亜科由来ウイルス、3) 新世界ネズミを宿主としてハンタウイルス肺症候群(HPS)を起こすアメリカネズミ亜科由来ウイルス。これに加えて、ハンタウイルスの中で最も異なるグループとして、近年再発見および発見された食虫類由来ウイルスが注目を集めている。我々は効率よく食虫類由来ハンタウイルスを検出する単クローン抗体の作成を試みた。

HPS に関連したウイルスは数多く報告されているが、未だその多様性の全貌は明らかになっていない。また、HPS ウイルスの取扱には BSL3 以上の高度安全実験施設が必要なことから、ハンタウイル

スの分類の重要な指標である交差中和試験の結果が少なく、ウイルス型と病原性の関連には不明な点が多い。少なくとも南米・アルゼンチン由来アンデスウイルス(ANDV)が北米由来ウイルスのシンノプレウイルス(SNV)より病原性が高く、ヒトからヒトへの感染例も多く報告されている。一方、南米由来ラグナネグラウイルス(LNV)の病原性は低く分布の重なるアンデスウイルスとはその病原性が大きく異なっている。本研究では南米・北米由来ウイルスの cDNA を収集し、その遺伝子配列の確認と抗原性のバリエーションについて解析し、ウイルス型鑑別診断系を確立することを試みた。

B. 研究方法

1. 食虫類由来ハンタウイルスに対するモノクローナル抗体の作成：食虫類由来ハンタウイルスの代表株であるトックパラヤンウイルス(TPMV)の組換え核蛋

白をマウスに免疫し、その脾臓細胞を用いて常法に従ってミエロマと融合し、単クローン抗体作成を試みた。

2. 北米・南米由来ウイルスの診断法の

確立: N 末端トランケート核蛋白抗原を用いた鑑別診断システムを構築するために、データベース場の HPS 関連ウイルスの核蛋白のアミノ酸配列を比較した。型特異的領域の配列からいくつの核蛋白型が存在し、何種類の鑑別抗原を用意すべきを検討した。さらに、カナダ国立微生物病研究所および北海道大学大学院獣医学研究科荻和宏明博士より北米・南米由来ウイルスの遺伝子の分与を受けた。この中から同所的に存在する SNV, ELMCV を選び、組換え抗原を発現させ、自然宿主血清および SNV 患者血清を用いて代替中和試験としての、鑑別システムの検討を行った。

(倫理面からの配慮について)

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ないと判断された。

C. 研究結果:

1. 単クローン抗体の作成: これまでに TPMV の核蛋白に対して 3 クローンが確立された。IFA パターン、Western blot での反応性は様々であることから、独立したクローンと考えられた。現在、競合阻害試験およびトランケート抗原への反応性によるエピトープマッピングを進めている。

2. 北米・南米由来ハンタウイルスの血清診断法の開発: HPS 関連ウイルス核蛋白の変領域のタイプが少なくとも 5 種類見つかかり、代替中和法で鑑別できる可

能性が示された (図 1)。北米南部の同一地域に存在しヒトに対して病原性をもつ SNV, と弱毒型と考えられている ELMCV の鑑別診断システムの構築を試みた。SNV 感染ヒト血清およびシカネズミ血清、ELMCV 感染カヤマウス血清を用いたところそれぞれ特異的な反応パターンを示し、本鑑別システムが有効である可能性が示された (図 2)。

D. 考察

本研究では急務を要する HPS 関連ウイルスの診断法を筆頭に最終的に 4 グループのハンタウイルスについてそれぞれ血清診断法および遺伝子診断法を開発することを目的としている。さらに新規にグループを形成しつつある、食虫類由来ウイルスについても診断法を確立することも必要である。ネズミ亜科由来のグループについては、これまでの研究で血清診断法・鑑別法・遺伝子診断法のそれぞれで標準的診断法を示すことができている。HPS 関連ウイルスについては幸いなことに、今回数株の cDNA および抗血清について分与を受けることができ、代替中和法について検討することが可能となった。しかしながら未だその検体数が少なく、診断法を十分に評価することは難しい。今回は北米由来ウイルスのみのシステム構築となったが、来年度の課題として南米由来ウイルスのシステムの評価があげられる。すでに抗原の準備は終了しているので、宿主げっ歯類血清および患者血清の収集を継続してすすめてゆく必要がある。

食虫類由来ウイルスについても今後も情報収集を続け、血清診断法を含めた診断法開発のための材料の入手に努力する必要があると考えられる。

E. 結論

ハンタウイルスはその病原相動物によって、ネズミ亜科由来、ハタネズミ亜科由来、アメリカネズミ亜科由来、および食虫類由来ウイルスの4つのグループに分けられ、その多様性から血清診断および遺伝子診断法はそれぞれについて必要である。特にHPS関連ウイルスについては病原性・多様性および抗原性に関する情報が混乱しており、これを整理して診断・鑑別法を準備することが防疫上重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

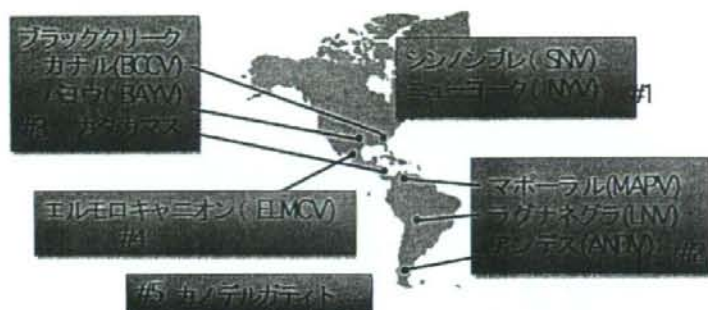
1. 有川二郎：「ハンタウイルス肺症候群」新臨床内科学（第9版）（2008.3）
2. 有川二郎：「ハンタウイルス」ウイルスハンドブック No.10 2. 呼吸器系ウイルス（2008.4）（p25～27）
3. Chandy, S., Yoshimatsu, K., Ulrich, R., G., Mertes, M., Okumura, M., John, T., Balraj, V., Muliyl, J., Mammen, J., Abraham, P., Arikawa, J., Sridharan, G.,: Seropidemiological study on hantavirus infections in India. ELSEVIER/Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 102.70-74, 2008
4. 有川二郎：「ハンタウイルス肺症候群（HPS）」特集 輸入感染の可能性のある希少感染症 Vol.24, No.11,(2008.10) 化学療法領域『医科ウイルス学』南江堂
5. Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Hatsuse, R., Okumura, M., Nakamura, I., Arikawa,

J.,: Lack of vertical transmission of Hantaan virus from persistently infected dam to progeny in laboratory mice. Arch Virol in press

6. Yamamoto, H., Li, Tian-Cheng., Koshimoto, C., Ito, K., Kita, M., Miyashita, N., Arikawa, J., Yagami, K., Asano, M., Tezuka, H., Suzuki, N., Kurosawa, T., Shibahara, T., Furuya, M., Mohri, S., Sato, H., Ohsawa, K., Ibuki, K., Takeda, N.,: Serological Evidence for Hepatitis E Virus infection in Laboratory Monkeys and Pigs in Animal Facilities in Japan. Exp. Anim. 57(4), 367-376, 2008
 7. Arai, S., Ohdachi, D. S., Asakawa, M., Kang, H. J., Mocz, G., Arikawa, J., Okabe, N., Yanagihara R. : Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotichus talpodeis*). Proc Natl Acad Sci USA, 105 (42): 16296-301, 2008
 8. 有川二郎：「10ハンタウイルス」バイオセーフティの事典 病原微生物とハザード対策の実際 [バイオメディカルサイエンス研究会] 編集 (P285～P287) 2008.12.10
 9. 有川二郎：「腎症候性出血熱」小児疾患診療のための病理生理 小児内科 40 増刊号 第4版 (P1222～P1225) 2008
 10. Nakamura, I., K. Yoshimatsu, B. H. Lee, M. Okumura, M. Taruishi, K. Araki, H. Kariwa, I. Takashima, and J. Arikawa. : Development of a serotyping ELISA system for Thailand virus infection. Arch Virol 153:1537-42, 2008
- ### 2. 学会発表
1. Yoshimatsu, K., Taruishi, M., Arikawa,

- J., Analysis of the hantavirus-specific CD8+ T cell response in mice. The 7th Japan-China International Conference of Virology, University of Tokyo, School of Medicine, 2008
2. 土佐紀子、吉松組子、有川二郎 マウスの異常行動における環境エンリッチメントの効果 第55回日本実験動物学会総会 (2008.5)
 3. 吉松組子、垂石みどり、有川二郎 マウスのハンタウイルスに対する細胞性免疫応答の解析: 第55回日本実験動物学会総会 (2008.5)
 4. Okumura, M., Yoshimatsu, K., Kumperasart, S. Nakamura, I., Taruishi, M., Sungdee, A. Pattamadilok, S., Yanagihara, R., Arikawa, J.: Antigenic profile of thottapalayam virus and development of a serodiagnostic assay. XII International Congress of Virology Istanbul, Turkey (2008.8)
 5. Kariwa, H., Miyashita, D., Hernandez, C., Romero-Almaraz, M., Ramos, C., Seto, T. Murata, R., Bin Abu Daud, N., Ishizuka, M. Nakauchi, M., Yoshii, K., Yoshimatsu, K. Arikawa, J., Takashima, I.: Epidemiological Investigation of Hantavirus Infection in Mexico. XII International Congress of Virology, Istanbul, Turkey (2008.8)
 6. Endo, R., Ishiguro, N., Shirkoohi, R., Teramoto, S., Ariga, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J.: Seroepidemiology of human bocavirus infection in Japan. XII International Congress of Virology, Istanbul, Turkey (2008.8)
 7. 新井智、大館智志、浅川満彦、有川二、Mocz Gabor, 岡部信彦、Yanagihara Richard: Newfound Hantavirus Sequences in the Japanese Shrew Mole (*Urotrichus talpoides*) 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008.10)
 8. Nur hardy Abu Daud, 莉和宏明、石塚万里子、瀬戸隆弘、宮下大輔、真田崇弘、中内美名、好井健太郎、前田秋彦、吉松組子、有川二郎、Evgeniy Tkachenko, 高島郁夫: Genetic and antigenic characterization of Puumala virus strain DTJ-Ufa-97 Isolated from a patient of hemorrhagic fever with renal syndrome. 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008.10)
 9. 駒貴明、吉松組子、垂石みどり、遠藤理香、海老原秀喜、有川二郎: 新世界ハンタウイルス感染の血清型鑑別診断法の確立: 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008.10)
- 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

図1.南北アメリカ大陸のハンタウイルス肺症候群(HPS)原因ハンタウイルス



平成19~20年度

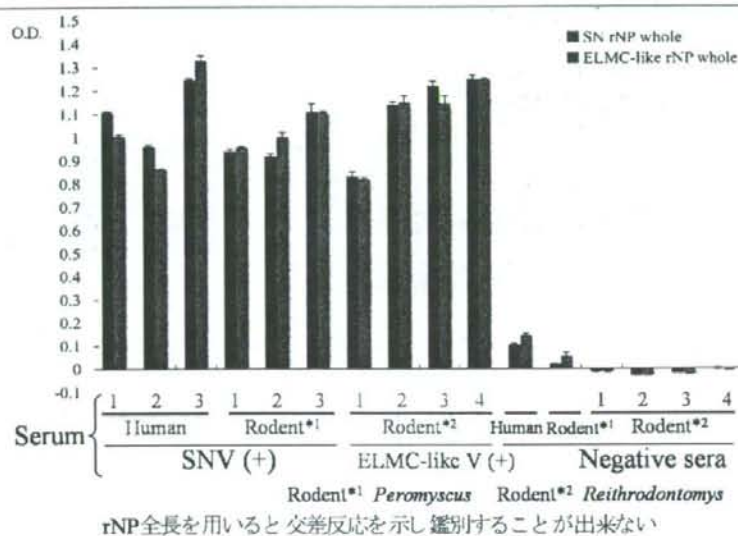
- ・ 南北アメリカのHPS/ハンタウイルスの分類(5グループ)
- ・ PCR汎用(スクリーニング)プライマーの検討
- ・ アンデス・シンノンブレウイルス鑑別診断用組換抗原の開発(代替中和法)
- ・ アルゼンチン研究者との共同研究開始



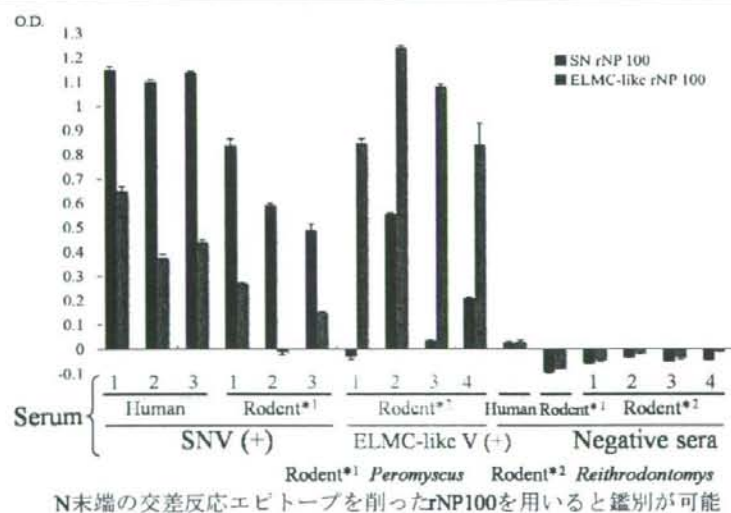
ハンタウイルス抗原、抗体、遺伝子検出によるスクリーニング・鑑別診断法の確立

図2.新大陸のハンタウイルス Group1 と Group4 の鑑別 ELISA

E. coli derived rNP whole using serotyping ELISA



Baculovirus derived rNP 100 using serotyping ELISA



厚生労働科学研究費 新興・再興感染症研究事業

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立 及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：チクングニヤ熱実験室診断法の確立と本邦輸入症例から
分離されたウイルスの性状解析

研究分担者 林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部）

協力研究者 高崎智彦、小滝 徹、倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：チクングニヤウイルス（CHIKV）感染症はアフリカ、インド洋諸島、インド、東南アジアの熱帯・亜熱帯地域を中心として流行地域が拡大しており、再興感染症の一つとして重要な感染症である。CHIKV はネッタイシマ蚊、日本にも生息するヒトスジシマ蚊等によって媒介される、トガウイルス科アルファウイルス属の一本鎖(+)RNA ウイルスである。CHIK 熱は発熱・関節炎・発疹の3主徴を呈し、時に出血傾向が認められるためデングウイルス感染症の鑑別疾患としても重要である。日本では2007年に初めてスリランカからの輸入症例が2例確認され、2009年までに計5例の輸入症例が確認されている。本研究ではCHIKVに対する適切な検査体制を整えると共に、CHIK 輸入症例患者よりCHIKVを分離し、分離ウイルスの性状及び遺伝学的特徴を詳細に解析した。

A. 研究目的

チクングニヤウイルス(CHIKV)はトガウイルス科アルファウイルス属に分類される一本鎖(+)RNA ウイルスで、直径70nmのエンベロープを有する球状粒子であり、蚊によって媒介される。チクングニヤ(CHIK)熱の特徴は発熱・関節炎・発疹の3主徴であり、時に出血傾向を呈する。近年の流行は2005年にインド洋に位置するコモロ諸島、モーリシャス島等の島々で発生し、2006年にはスリランカ、インド西部に流行が拡大、さらに2007年にはイタリア、シンガポールで流行が報告された。またフランス、米国、オーストラリア、香港、台湾等で輸入症例が報告されている。本邦では2007年に初めて2例のスリランカからの輸入症例が確認さ

れた。本研究の目的はCHIKVに対する適切な検査体制を整えると共にCHIK 輸入症例患者血清よりCHIKV分離を試み、その性状を解析し現在流行のCHIKV株と比較・検討することである。検査体制を整え、性状解析を行うことにより現在の輸入症例数の把握、今後の予防・治療法等の検討が可能となる。

B. 研究方法

実験室内診断：

血清診断法として In house IgM 捕捉 ELISA 法を用いて特異的 IgM 抗体の検出を行った。さらに病原体診断法として RT-PCR 法及びリアルタイム PCR 法によるウイルス遺伝子検出を行い、遺伝子解析を行った(図

1)。

合成 CHIKV RNA を用いた患者血清中の RNA コピー数の検討:

CHIKV の E1 蛋白質領域をプラスミドベクターにクローニングし、目的 RNA を得た。得られた合成 RNA の吸光度と分子量からコピー数を算出しリアルタイム PCR 法において検量線を作製した。得られた検量線から血清中のウイルス RNA コピー数をリアルタイム PCR 法の結果より算出した。

ウイルスと培養細胞:

CHIKV 中和試験においては CHIKV S27 株を用いた。ウイルス分離およびウイルス中和試験にはサル腎由来の Vero 細胞を用いた (American Type Culture Collection)。

ウイルス精製:

30% (w/v)-60% (w/v) ショ糖密度勾配遠心法にて 25,000rpm で 3 時間遠心しウイルスを精製した。精製したウイルスは電子顕微鏡にて観察した。

ウイルス中和試験:

ウイルス中和試験は Vero 細胞を用いた 50% フォーカス減少法にて検討した。得られた患者血清を非動化し、10 倍希釈後 2 倍段階希釈を行った。希釈した患者血清とウイルスを等量混合後し 37°C 1 時間中和反応を行った。各血清-ウイルス反応液を Vero 細胞に接種し、37°C で 90 分吸着後 1% メチルセルロースを重層し 37°C にて培養した。10% ホルマリンにて固定後メチレンブルーにて感染細胞を染色しウイルス中和抗体価を算出した。

C. 研究結果

症例:

患者は 50 代女性。スリランカに約 1 週間滞在し帰国後 1 日で発症した。発熱、関節痛、筋肉痛、鼻出血を呈した。患者の急性期血清および回復期血清を用いて CHIK 熱

の診断を行った。

実験室内診断:

RT-PCR、リアルタイム PCR により急性期患者血清より CHIKV が検出された。患者血清中の CHIKV RNA コピー数は 1.8×10^9 RNA copies/ml であった (図 2)。検出されたウイルスの E1 蛋白質領域の遺伝子を解析した結果、近年流行中のレユニオン島分離株の遺伝子配列と 99% 一致した。血清学診断の結果は特異的 IgM、中和抗体陽性であり、患者は CHIK 熱と実験室内診断された。

ウイルス分離:

Vero 細胞を用いたウイルス分離の結果、激しい細胞変性効果が観察され、CHIKV 遺伝子が検出された。またウイルス培養上清を精製・濃縮し形態的観察を行ったところ直径約 70nm のウイルス粒子が観察された。さらに分離した CHIKV よりブランク形成能の異なるウイルス株をサブクローニングしたところ増殖能の異なる 2 種のウイルス株を得た。

遺伝子解析:

分離した 2 株のウイルスの遺伝子解析および系統樹解析を行ったところ両ウイルスは近年インドで流行しているウイルス株とクラスターを形成した (図 3)。従って現在スリランカで流行している株とインドで流行している株には関連性があることが示唆された。

D. 考察

これまでに我々は RT-PCR 法、リアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子検出法、IgM 捕捉 ELISA 法、50% ブランク減少法を用いた中和法による診断法を確立し、合計 5 例の輸入症例を診断した。

また第 2 例の急性期の患者血清から CHIKV を分離した。遺伝子解析の結果これは現在インド洋を中心に流行している

CHIKV 株と一致することが明らかとなった。ペア血清を用いた血清診断の結果、IgM および中和抗体の上昇が検出された。以上の結果より患者は CHIK 熱と実験室診断された。

さらに分離した CHIKV よりブランク形成能の異なる 2 種のウイルス株が分離されたことから本患者の体内においては少なくとも 2 種のウイルス株が増殖していたことが示唆された。また 2 株の遺伝子解析・系統学的解析を行ったところ現在インドを中心に流行している CHIKV 株とクラスターを形成することが明らかとなったため現在スリランカで流行している株とインドで流行している株には関連性があることが示唆された。

現在も CHIKV の流行は続いており、流行国へ渡航する際には蚊による吸血の予防などの対策が必要である。

E. 結論

急速な輸送手段の発達とネッタイシマ蚊、ヒトスジシマ蚊の分布拡大、熱帯雨林地域への人口拡張により世界の熱帯・亜熱帯地域、特に東南アジアにおいてチクングニヤ熱は今後も流行が続くことが予想される。さらに 2009 年 2 月までに日本において 5 例の輸入症例が確認されている。チクングニヤ熱の治療法は確立されておらず、CHIKV の動向にはヒト、蚊、気候、環境等の要因が複雑に関わり、その状況の予測は困難であるため CHIKV の我が国への侵入は予断を許さない。ワクチンが実用化されていない現在、旅行先におけるチクングニヤ熱の流行状況を把握し、蚊対策に十分考慮すると共に、医療機関、地域住民、行政、研究機関の一層の協力体制を確立することが重要である。

F. 健康危険情報

2007 年初頭に 2 例のスリランカからの輸入症例が日本で初めて確認された。2008 年秋には 1 例のインドからの輸入症例が、続く 2009 年初頭にはマレーシアからの輸入症例およびインドネシアからの輸入症例がそれぞれ 1 例確認された。現在もインドおよび東南アジア地域を中心にチクングニヤ熱は流行が拡大しており、本邦にも媒介蚊であるヒトスジシマ蚊が生息するため早期の防疫体制の確立が求められる。

G. 研究発表

1. 論文発表

林 昌宏, チクングニヤ熱, 化学療法の領域, 24 (11):1606-1613, 2008

2. 学会発表

1. C. Lim, T. Takasaki, T. Nishibori, K. Watanabe, M. Ito, A. Kotaki, I. Kurane. Two Chikungunya Virus Strains with Different Characteristics isolated from One Patient Who Returned to Japan from Sri Lanka. 42nd Joint Working Conference on Viral Diseases, Japan-US Cooperative Medical Science Program (Nagasaki, Japan) 2008/5/27-28.
2. C. Lim, T. Takasaki, T. Nishibori, K. Watanabe, M. Ito, A. Kotaki, I. Kurane. Two Chikungunya Virus Strains with Different Characteristics isolated from One Patient Who Returned to Japan from Sri Lanka. XIV. International Congress of Virology (Istanbul, Turkey) 2008/8/10-15.
3. C. Lim, T. Nishibori, K. Watanabe, M. Ito, A. Kotaki, I. Kurane., T. Takasaki. Chikungunya Virus Isolated from a Patient Who Came Back to Japan from Sri Lanka: Isolation of two strains with different characteristics. The West Nile virus 2009

National Conference (Savannah, GA,
USA) 2009/2/19-20.

4. 林 昌宏. チクングニヤ熱の疫学と実
験室診断法. 衛生微生物技術協議会第
29回研究会(東京都)2008年6月24-25.
5. 林 昌宏、西堀武明、渡辺香奈子、小
滝 徹、伊藤美佳子、倉根一郎、高崎
智彦. チクングニヤ熱輸入症例患者血
清より分離された CHIKV の性状解析.
第56回日本ウイルス学会(岡山県)
2008年10月26-28日
6. 林 昌宏. チクングニヤ熱検査法. 平
成20年度希少感染症診断技術研修会
(東京都)2009年2月24-25日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

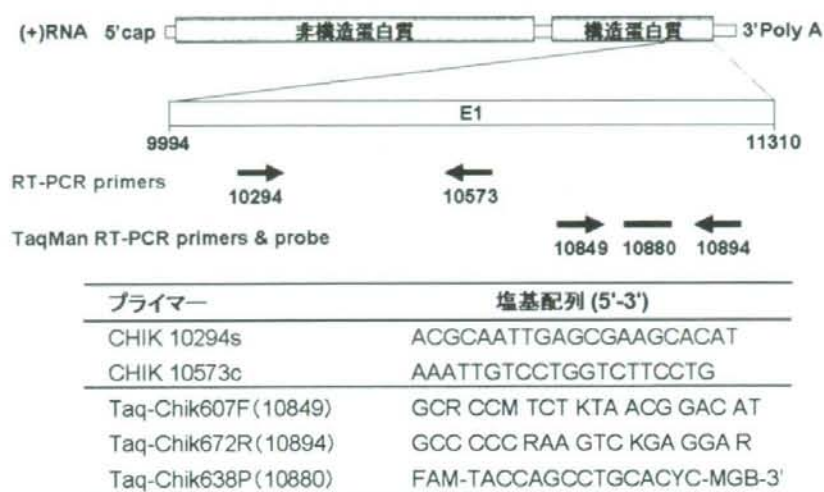


図1. チクングニヤウイルス検出プライマーの設計: チクングニヤウイルスの E1 蛋白質領域に RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR のプライマーを設計した。

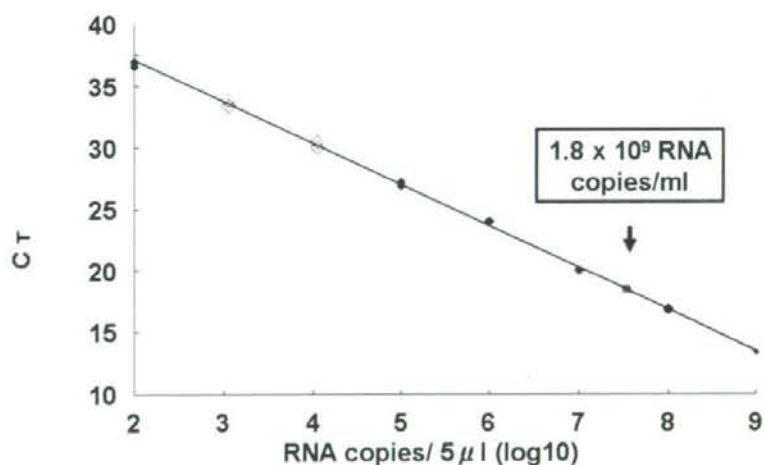


図2. 標準 CHIK RNA の作製と Real Time RT-PCR による患者血清中の CHIK RNA の検出: CHIK ウイルスの E1 蛋白質領域の一部をクローニングし標準 RNA を作製、Real Time RT-PCR において患者血清中の RNA 量を測定した。矢印は検量線における患者サンプル中の RNA 量を示す。

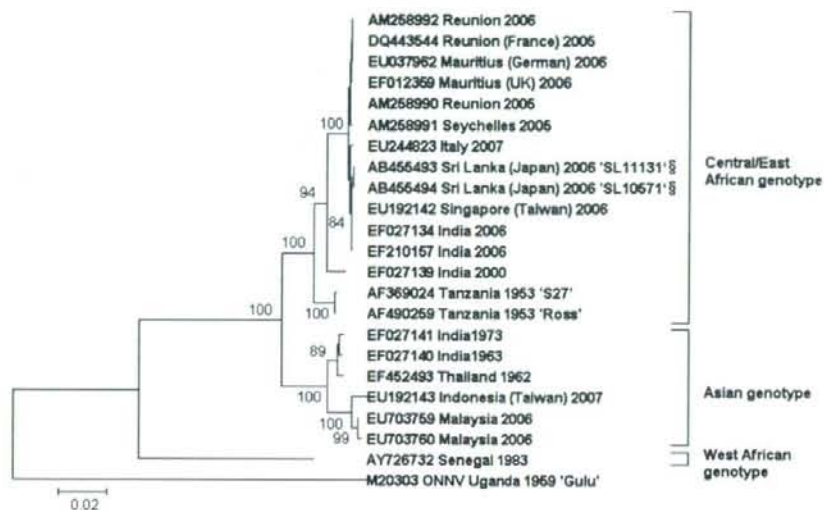


図3. 患者から分離されたウイルスの系統学的解析：本研究で分離した2株のチクングニヤウイルス (§) のEI領域の塩基配列を系統学的に解析した結果、両ウイルスはインドで分離されたウイルスとクラスターを形成した。

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立
及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：リフトバレーウイルスの診断法と抗ウイルス薬の検討

研究分担者：福士秀悦 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨：リフトバレー熱ウイルス(RVFPV)の抗原検出法の確立を目的として、コア蛋白質(NP)に対する単クローン抗体を作製した。これを抗原補足用抗体として抗原検出 ELISA に用いたところ、1ng 以下のリコンビナント NP あるいは、15.6~125 PFU の RVFPV を検出することができた。作製した単クローン抗体のうち、1種類 (C10-54) は NP 全長の高次構造を認識した。他の 2 種類 (D5-56 および G2-36) は NP のアミノ酸 195-201 の部位を認識した。この認識部位は、すべての RVFPV の NP のアミノ酸配列で保存されていた。これらの結果から、本研究で作製した単クローン抗体を用いることにより、高感度かつ特異的な抗原検出 ELISA が可能であると考えられた。

A. 研究目的

リフトバレー熱は、リフトバレー熱ウイルス(RVFPV)の感染が原因となって起こる、アフリカに古くから常在する急性の熱性疾患である。日本では感染症法で 4 類感染症に分類されている。また、家畜伝染病予防法で法定伝染病に指定されていて、ウイルスの取り扱いが規制されている。主に蚊によって媒介されるウイルス感染症であるが、ウシ、ヒツジなど感染家畜の血液や体液との接触により人に感染する例も多い。感染患者の 1-2% は出血熱を起こし、高い致死率を示すことから、他の出血熱、例えばエボラ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱などとの鑑別診断が重要である。RVFPV の不活化ワクチンおよび生ワクチンが家畜用に実用化されているが、いまだに東アフリカを中心に流行がみられている。これまで、日本でリフトバレー熱が発生したことはないが、輸入感染症として患者が発生する可能性がある。

RVFPV はブニヤウイルス科、フレボウイル

ス属に属するネガティブ鎖 RNA ウイルスである。RVFPV 構造蛋白質のうち、コア蛋白質(NP)はウイルス粒子あるいは感染細胞中に最も多く含まれることから、抗原検出法のターゲットとして適している。本研究では、RVFPV 抗原検出 ELISA およびシュードタイプウイルスを用いた血清中の中和抗体検出法の開発と、抗ウイルス薬の検討を行う。平成 19 年度は、RVFPV 抗原検出 ELISA を構築するための RVFPV に対する単クローン抗体を作製し、これらの反応性を検討した。平成 20 年度は、作製した単クローン抗体を用いて、抗原検出 ELISA 法を構築した。また、単クローン抗体の抗原認識部位(エピトープ)について解析した。

B. 研究方法

RVFPVヌクレオキャプシド蛋白質に対する単クローン抗体の作製 (図 1 にフローチャートを示す) :

1) RVFPV(MP12株)のヌクレオキャプシド

蛋白質(NP)をコードする遺伝子をバキュロウイルス発現用トランスファーベクター-pAcYM1にクローニングし、組換えバキュロウイルス作製用プラスミドpAcRVFV-NPを作製した。

- 2) 昆虫細胞Tn5にpAcRVFV-NPとバキュロウイルスAcNPV由来ゲノムをトランスフェクトし、RVFV-NPを発現する組換えバキュロウイルスAcRVFV-NPを得た。
- 3) AcRVFV-NPを感染させたTn5から組換えRVFV-NP蛋白質を精製した。この組換えRVFV-NP蛋白質を抗原としてマウスに免疫し、単クローン抗体G2-36, D5-59, C10-54を得た。

RVFV感染細胞に対する単クローン抗体の反応性の検討:

RVFV-MP12株の感染細胞をスライドグラス上に固定し、単クローン抗体を反応後、蛍光ラベル二次抗体を加え、蛍光顕微鏡を用いて単クローン抗体の反応特性を調べた(図2)。

抗原検出ELISA:

抗原補足抗体として、本研究で作製した単クローン抗体を用いた。ELISAプレート1wellあたり125 ngの単クローン抗体を4℃で固定した。オーバーナイト後、PBS-0.05% tween 20 (PBS-T)でwashし、5%スキムミルクを含むPBS-T (PBS-T-M)を用いて室温で2時間ブロッキングした。次にPBS-Tでwash後、RVFV抗原(リコンビナントNPあるいはRVFV培養上清をNP40およびUV処理で不活化したものをPBS-T-M希釈したもの)を加え、37℃で1時間インキュベートした。PBS-Tでwash後、ウサギ抗RVFV-NP血清を検出用抗体として加え37℃で1時間インキュベートした。PBS-Tでwash後、HRPラベルした抗ウサギIgG抗体を加え、37℃で1時間インキュベートした。PBS-Tでwash後、

HRP基質溶液を加え、30min 後の460 nmの吸光度を測定した(図3)。

単クローン抗体のエピトープの解析:

- 1) 得られた単クローン抗体のエピトープを調べるため、RVFV-NPの全長およびNPの欠失体をコードするcDNAを大腸菌発現ベクターにクローニングした。
- 2) 大腸菌で発現させたRVFV-NP全長および様々な欠失体に対する、単クローン抗体のエピトープをウエスタンブロットで検討した。

C. 結果

RVFV 感染細胞に対する単クローン抗体の反応性:

作製した単クローン抗体を用いた蛍光抗体法により、RVFV 感染細胞に対する反応性を検討した(図4)。単クローン抗体 G2-36, D5-59, C10-54 ともに、RVFV 感染 Vero 細胞に反応し、非感染細胞には反応しなかった。これらのことから、いずれの抗体も RVFV に特異的であると考えられた。

抗原検出 ELISA:

作製した単クローン抗体を補足用抗体、ウサギ抗 RVFV-NP 血清を検出用抗体として用いた(図3)。まず、バキュロウイルス発現系で作製した組換え RVFV-NP 蛋白質を精製し、これを抗原として用いたところ、1ng 以下の RVFV-NP でも検出可能であった。一方、同様に作製した南米出血熱ウイルスの組換え NP (Sabia virus NP) は検出されなかった(図5)。次に RVFV-MP12 株の培養上清を抗原として抗原検出 ELISA に用いた。単クローン抗体 D5-59, C10-54,

および G2-36 はそれぞれ、31.3, 15.6 および、125 PFU の RVFV を含む培養上清からウイルス抗原を検出できた (図 6)。3 種類の単クローン抗体を MIX して補足抗体として用いた場合でも、同様の感度であった (結果は示さず)。

単クローン抗体の抗原認識部位：

これらの単クローン抗体のエピトープ領域について検討するために、まず、RVFV-NP 全長および 5 種類の欠失体を大肠菌で発現させた (図 7)。これらの蛋白質に対する、単クローン抗体の反応性をウエスタンブロットで調べた。単クローン抗体 C10-54 は NP 全長にのみ反応したことから、この抗体は NP 全長を含む高次構造を認識する可能性が考えられた。一方、単クローン抗体 G2-36 および D5-59 は NP の C 末端側領域を認識した。さらに C 末端側の領域を細分化した欠失体を作製し、これらのエピトープについてウエスタンブロットで詳細に検討したところ、G2-36 および D5-59 は NP の C 末端側の 195-201 番目のアミノ酸 (TFTQPMN) を認識することが明らかになった (図 8)。

データベース上に登録されている RVFV NP のアミノ酸配列をアライメントしたところ、今回明らかになった、G2-36 および D5-59 エピトープはすべての RVFV 株で保存されていた。一方、近縁のフレボウイルス属ではこの部分の配列は異なっていた (図 9)。

D. 考察

出血熱を引き起こすウイルスは多くが RNA ウイルスであり、遺伝子変異により、

RT-PCR では検出出来ない場合がある。また、これらのウイルスはマクロファージに感染するため、全血からの抗原検出の感度は、PCR の感度と同等である場合が多い。したがって、抗原検出 ELISA は出血熱ウイルス感染の実験室診断法として重要である。本研究で作製した RVFV-NP に対する単クローン抗体 G2-36, D5-59, C10-54 は蛍光抗体法で RVFV 感染細胞に特異的に反応した。このことから、これらの抗体は RVFV の抗原検出用に有用であると考えられた。単クローン抗体を補足用抗体として用いた抗原検出 ELISA では 1ng 以下の組換え RVFV NP あるいは、15.6-125 PFU の RVFV を検出することができた。これらの単クローン抗体のうち、G2-36, D5-59 のエピトープはすべての RVFV で保存されていた。また、C10-54 は NP 全長に反応した。本研究で作製した単クローン抗体を用いることにより、感度、特異性ともに優れた抗原検出が可能となった。今後は、感染動物材料などを含めた臨床材料を用いて感度、特異性を検討する必要がある。また、RVFV 検出のための RT-PCT 法を構築し、RVFV 感染の実験室診断法の一つとして確立するとともに、その感度、特異性について抗原検出 ELISA との比較を行う予定である。

E. 結論

- (1) 本研究で作製した RVFV-NP に対する単クローン抗体は、RVFV 抗原に特異的に反応した。
- (2) 単クローン抗体を補足抗体として用いた抗原検出 ELISA により RVFV を高感度に検出することができた。
- (3) エピトープの解析から、これら

の抗体は RVFV の抗原検出用に有用であると考えられた。

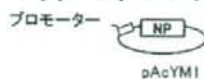
F. 論文発表

1. Yamao T, Eshita Y, Kihara Y, Satho T, Kuroda M, Sekizuka T, Nishimura M, Sakai K, Watanabe S, Akashi H, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Miyata T, Sakata A, Hosokawa M, Nakashima M, Kashige N, Miake F, Fukushima S, Nakauchi M, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. : Novel virus discovery in field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). *Arch Virol.* 2009;154(1):153-8.
2. Fukushima S, Watanabe R, Taguchi F. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for analysis of virus entry mediated by SARS coronavirus spike proteins. *Methods Mol Biol.* 2008;454:331-8.
3. Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K, Maejima M, Fukushima S, Morikawa S, Taguchi F. Entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein. *J Virol.* 2008 Dec;82(23):11985-91.
4. Watanabe S, Mizutani T, Sakai K, Kato K, Tohya Y, Fukushima S, Saijo M, Yoshikawa Y, Kurane I, Morikawa S, Akashi H. Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). *J Clin Virol.* 2008 Sep;43(1):56-9.
5. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushima S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol.* 2008 Jun;172(6):1625-37.
6. Ami Y, Nagata N, Shirato K, Watanabe R, Iwata N, Nakagaki K, Fukushima S, Saijo M, Morikawa S, Taguchi F. Co-infection of respiratory bacterium with severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Microbiol Immunol.* 2008 Feb;52(2):118-27.
7. Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushima S, Mizutani T, Iizuka I, Sakai K, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains. *Jpn J Infect Dis.* 2008 Mar;61(2):140-2.

G. 知的財産権の出願・登録状況
現在出願予定はない。

(図1)RVFV-NPに 対するモノクローナル 抗体の作製

RVFV NP cDNAをバキュロウイルストランスファー
ベクターへクローニング



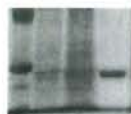
組換えバキュロウイルス作製



昆虫細胞での発現



昆虫細胞

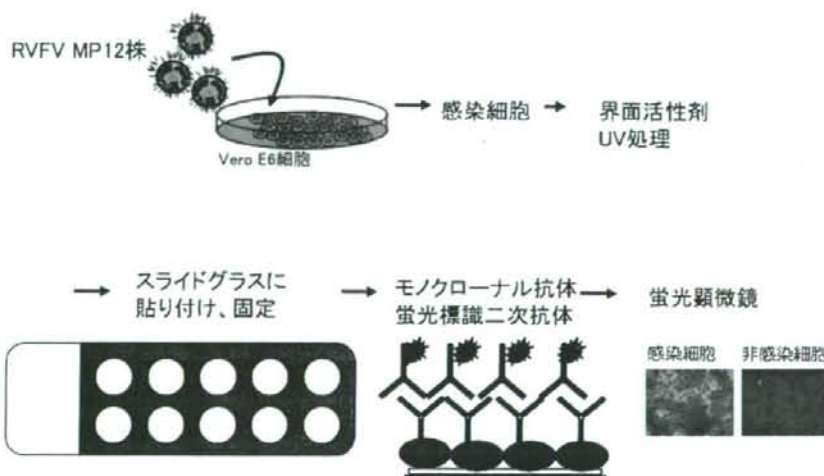


BALB/cマウスへ免疫

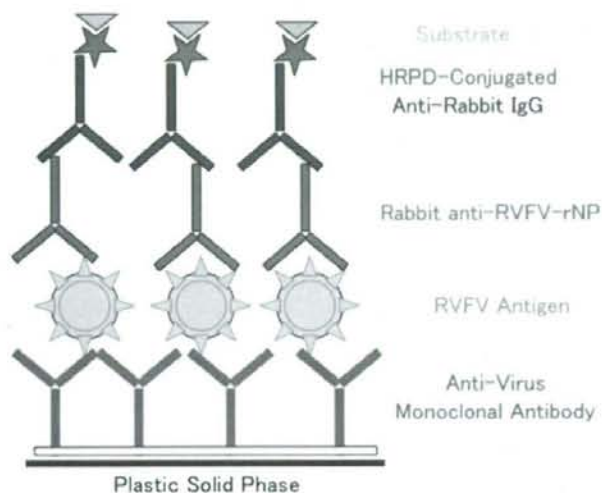
単クローン抗体

G2-36、D5-59、C10-54

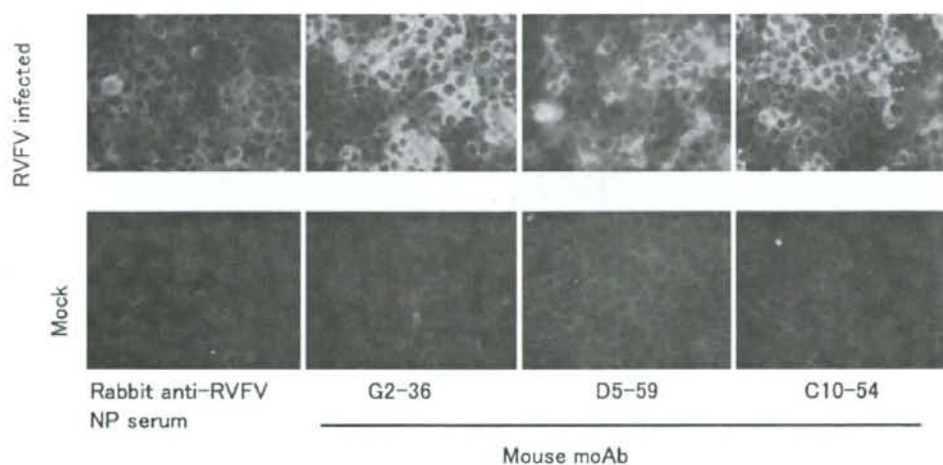
(図2)モノクローナル抗体の反応性(蛍光抗体法)



(図3) Antigen capture-ELISA

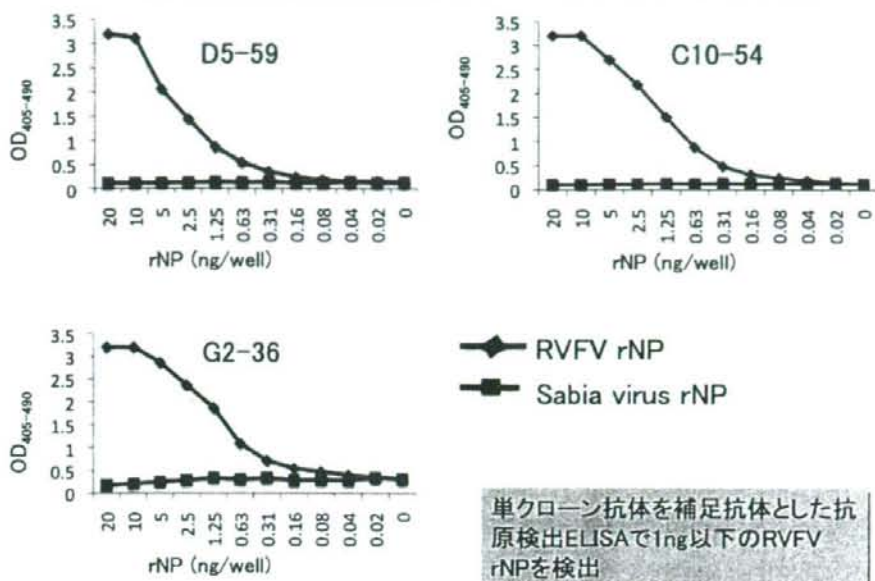


(図4) モノクローナル抗体の反応性-蛍光抗体法-

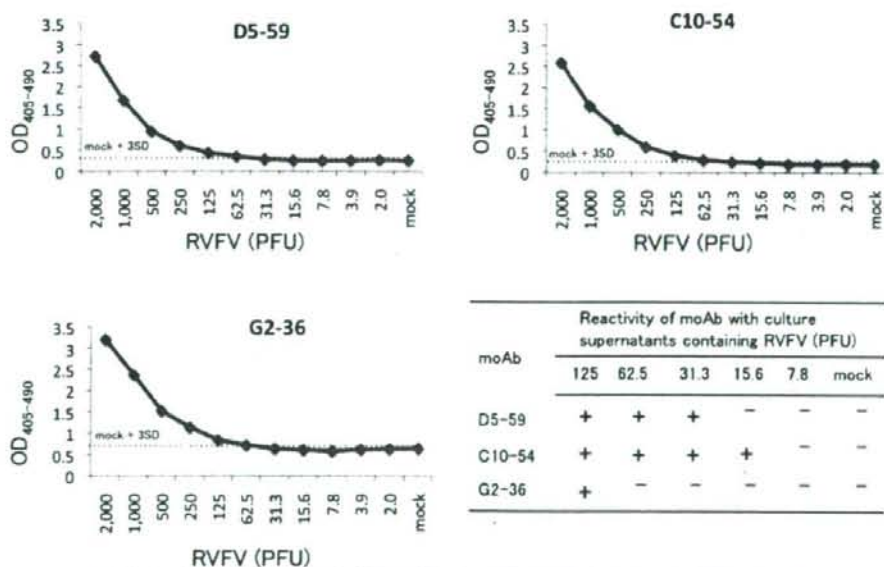


モノクローナル抗体はRVFV感染細胞に特異的に反応した

(図5) 抗原検出ELISA -リコンビナントNP-



(図6) 抗原検出ELISA -ウイルス培養上清-



15.6~125 PFUのRVFVを含む培養上清からウイルス抗原を検出