

単価ロタウイルスワクチンが血清型（遺伝子型）の壁を超えて有効に働いていることが示されたと考える。

E. 結論

わが国においてロタウイルスワクチンが承認され、これが定期接種に導入されれば、社会全体においてロタウイルス胃腸炎による大幅な入院数の減少が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) 中込とよ子, 中込 治:世界的に使用されているロタウイルスワクチンのわが国における必要性 臨床とウイルス 37(3): 167-177, 2009
- 2) 中込とよ子, 中込 治:世界的に使われているロタウイルスワクチン. 臨床検査 53: 111-116, 2009
- 2) Cunliffe NA, Ngwira BM, Dove W, Nakagomi O, Nakagomi T, Perez A, Hart CA, Kazembe PN, Mwansambo CC. Serotype G12 rotaviruses, Lilongwe, Malawi. Emerg Infect Dis 15:87-90, 2009
- 3) Castello AA, Nakagomi T, Nakagomi O, Jiang B, Kang JO, Glass RI, Glikmann G, Gentsch JR. Characterization of genotype P[9]G12 rotavirus strains from Argentina: high similarity with Japanese and Korean G12 strains. J Med Virol 81:371-381, 2009
- 4) Cuong N T, Minh N B, Anh D D, Thu N H, Tu N T,

Nam T V, Thuy V T, Ogino M, Alam M M, Nakagomi T, Nakagomi O, Yamashiro T.

Molecular epidemiology of rotavirus diarrhoea among children in Haiphong, Vietnam: the emergence of G3 rotavirus. Vaccine 27 (suppl 5): F75-F80, 2009

- 5) Nakagomi T, Chang BR, Nakagomi O. Rotavirus hospitalization and molecular epidemiology in Northern Japan, 1987-1996. Vaccine 27 (suppl 5): F93-F96, 2009
 - 6) Sherchand JB, Nakagomi O, Dove W, Nakagomi T, Yokoo M, Pandey BD, Cuevas L, Hart CA, Cunliffe NA. Molecular Epidemiology of Rotavirus Diarrhea among Children Aged<5 Years in Nepal: Predominance of Emergent G12 Strains during 2 Years. J Infect Dis 200 (Suppl): 182-197, 2009
 - 7) Gurgel R, Bohland A, Vieira S, Oliveira D, Fontes P, Barros V, Ramos M, Dove W, Nakagomi T, Nakagomi O, Correia J, Cunliffe N, Cuevas L. Incidence of Rotavirus and All-Cause Diarrhea in Northeast Brazil following the Introduction of a National Vaccination Program. Gastroenterology. 137:1970-1975, 2009
- ##### 2.学会発表
- 1) 中込とよ子・中込治:定期接種に導入したロタウイルスワクチンの有効性の検証:ブラジルでの継続調査 第13回日本ワクチン学会学術集会 札幌 (2009.9)
 - 2) Nakagomi T, Patel M, Nakagomi O, Montenegro FMU, Germano EM, Correia NB, Cuevas L, Parashar U, Cunliffe NA, Correia JB.

Effectiveness of monovalent G1P[8] human rotavirus vaccine, Rotarix, in Recife, Brazil against severe rotavirus diarrhoea caused by G2P[4] rotavirus strains. 27th annual meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Brussels, Belgium (2009. 6)

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(地球規模保健課題推進研究事業)

分担者研究報告書

ウイルス性下痢症の病態解析に関する研究

新しい群(Novel Group)に属するブタロタウイルス SKA-1 株の全塩基配列決定

分担研究者 谷口孝喜 藤田保健衛生大学医学部教授

研究要旨:我々は、ロタウイルスには、VP6 の抗原性を指標として A 群～G 群の7つの群が報告されている。しかしながら、D～G 群については遺伝情報が全く報告されておらず、ロタウイルスの群別については、不明確な点が多い。われわれは、1980年に鳥取で分離されたブタロタウイルス SKA-1 株の性状を検討する過程で、本ウイルスの RNA パターンが B 群に類似しているものの、塩基配列が B 群とはかなり異なり、むしろ、最近、中国で報告されている新しい群に属すると思われるヒトロタウイルス B219 株および J19 株と類似していた。

A. 研究目的

ロタウイルスは、わが国のような温帯地域では冬季に集中して発生する、乳幼児にみられる嘔吐下痢症の病原ウイルスである。年間約60万人の乳幼児がロタウイルス下痢症で死亡していると算定されている。ロタウイルスは、ヒトを含むきわめて多くの哺乳動物、鳥類に分布する。ロタウイルスのゲノムは、分節した11本の2本鎖 RNA で構成されるが、ポリアクリルアミド電気泳動法 (PAGE) にて RNA パターンを比較することで、株の異同や群の同定も可能である。A 群ロタウイルスの遺伝子解析はかなりなされているが、それ以外の群については、調査が少ない。そこで、わが国で分離され、A群には属さないブタロタウイルス SKA-1 株について、全塩基配列を決定し、その系統関係を明らかにすることを目的とした。

B. 研究材料と方法

SKA-1 株のブタ感染実験にて採取した小腸内容物を検体とした。

フェノール・クロロホルム法により RNA を抽出して、ポリアクリルアミド電気泳動法 (PAGE) にて RNA パターンを確認した。

Lambden らの方法を改変した、塩基配列非依存の単一プライマーを用いた2本鎖 RNA の遺伝子クローニング法 (Wakuda et al.: J. Virol. Methods, 126:165-169, 2005) により、11本すべての cDNA を調製し、それを利用して塩基配列を決定した。

B群ロタウイルスおよび他のロタウイルスの塩基配列および推定アミノ酸配列をもとに、比較検討した。

C. 研究結果

1. PAGE での RNA パターンの比較では、B群のパターンに類似していたものの B群に典型的なパターンとは言い難かった。

2. 遺伝子クローニング法により、分節 RNA1

~11 の4本の遺伝子に対応する cDNA を得、その遺伝子配列を決定した。分節 RNA1~11 はそれぞれ、VP1, VP2, VP4, VP3, NSP1, VP6, NSP2, NSP3, VP7, NSP4, NSP5 をコードしていた。総塩基数は 18,0015 塩基、総推定アミノ酸数は 5,712 アミノ酸であった。

3. 5' UTR および 3' UTR 配列の比較、各 RNA セグメントの塩基配列および推定アミノ酸配列の系統樹解析において、A群ブタロタウイルスやB群ヒトロタウイルスよりも新しいグループ(群)として報告されているヒトロタウイルス(B219株およびJ19株)に類似していた。各遺伝子の塩基数、推定アミノ酸数、そして、B群および新しい群との塩基配列および推定アミノ酸配列の一致率は以下の通りである。

RNA セグメント 1: 3,534 塩基で、1,167 アミノ酸の VP1 をコードする。Novel group と 72% (塩基配列レベル)、78% (アミノ酸配列レベル)、B群と 60% (塩基配列レベル)、55% (アミノ酸レベル) の一致率であった。

RNA セグメント 2: 3,001 塩基で、982 アミノ酸の VP2 をコードする。Novel group と 73% (塩基配列レベル)、79% (アミノ酸配列レベル)、B群と 56% (塩基配列レベル)、48% (アミノ酸レベル) の一致率であった。

RNA セグメント 3: 2505 塩基で、815 アミノ酸の VP4 をコードする。Novel group と 59% (塩基配列レベル)、52% (アミノ酸配列レベル)、B群と 49% (塩基配列レベル)、<30% (アミノ酸レベル) の一致率であった。

RNA セグメント 4: 2,197 塩基で、719 アミノ酸の VP3 をコードする。Novel group と 64%

(塩基配列レベル)、60% (アミノ酸配列レベル)、B群と<50% (塩基配列レベル)、<45% (アミノ酸レベル) の一致率であった。

RNA セグメント 5: 1,323 塩基で、401 アミノ酸の NSP1 をコードする。Novel group と 62% (塩基配列レベル)、50% (アミノ酸配列レベル)、B群と<45% (塩基配列レベル)、<20% (アミノ酸レベル) の一致率であった。

RNA セグメント 6: 1,286 塩基で、415 アミノ酸の VP1 をコードする。Novel group と 72% (塩基配列レベル)、76% (アミノ酸配列レベル)、B群と 52% (塩基配列レベル)、38% (アミノ酸レベル) の一致率であった。

RNA セグメント 7: 1,003 塩基で、296 アミノ酸の NSP2 をコードする。Novel group と 72% (塩基配列レベル)、74% (アミノ酸配列レベル)、B群と 58% (塩基配列レベル)、49% (アミノ酸レベル) の一致率であった。

RNA セグメント 8: 936 塩基で、266 アミノ酸の NSP3 をコードする。Novel group と 65% (塩基配列レベル)、64% (アミノ酸配列レベル)、B群と 52% (塩基配列レベル)、<40% (アミノ酸レベル) の一致率であった。

RNA セグメント 9: 817 塩基で、255 アミノ酸の VP7 をコードする。Novel group と 64% (塩基配列レベル)、56% (アミノ酸配列レベル)、B群と 48% (塩基配列レベル)、22% (アミノ酸レベル) の一致率であった。

RNA セグメント 10: 747 塩基で、216 アミノ酸の NSP4 をコードする。Novel group と 62% (塩基配列レベル)、35% (アミノ酸配列レベル)、B群と<49% (塩基配列レベル)、<17% (アミノ酸レベル) の一致率であった。

RNA セグメント 11: 666 塩基で、180 アミノ酸の VP1 をコードする。Novel group と 70% (塩基配列レベル)、57% (アミノ酸配列レベル)、B 群と 51% (塩基配列レベル)、28% (アミノ酸レベル) の一致率であった。

D. 考察

B 群として報告されていたブタロタウイルス SKA-1 株は遺伝子解析の結果、B 群ロタウイルスとは言い難く、むしろ新しい群に属すると思われる新規ヒトロタウイルスグループ (B219 株、J19 株) に類似していた。

しかしその一致率は RNA セグメントにより 36 ~ 73% 程度であり、宿主動物種間における各分節での遺伝子の多様性が示唆された。

A 群については、G タイプ、P タイプを規定する VP7 遺伝子、VP4 遺伝子を含め、11 本すべての遺伝子について詳細な分類がなされている。しかしながら、A 群以外のロタウイルスの分類については群別についてさえ明確な基準がない。今後、A 群以外の分類の基準設定に向け、本研究の成果は 1 つの足がかりとなると思われる。

E. 結論

ブタロタウイルス SKA-1 株の全塩基配列を決定し、その系統関係を明らかにした。その結果、SKA-1 株は、最近、新規のヒトロタウイルスグループに属することが示された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Pongsuwanna, R. Guntapong, R. Tacharoenmuang, M. Prapanpoj, M. Kameoka, K. Taniguchi: A long-term survey on the distribution of the human rotavirus G type in Thailand. *J Med Virol* 82(1):157-163, 2010
- 2) Dipanjan Dutta, Parikshit Bagchi, Arunachal Chatterjee, Murti Kant Nayak, Anupam Mukherjee, Shiladitya Chattopadhyay, Shigeo Nagashima, Nobimichi Kobayashi, Satoshi Komoto, Koki Taniguchi, Mamta Chawla-Sarkar: The molecular chaperone heat shock protein-90 positively regulates rotavirus infection. *Virology* 391:325-333, 2009
- 3) Maeno Y, Shinzato M, Nagashima S, Rittling SR, Denhardt DT, Uede T, Taniguchi K: Effect of Osteopontin on Diarrhea Duration and Innate Immunity in Suckling Mice Infected with a Murine Rotavirus. *Viral Immunol* 22(2): 139-144, 2009

2. 学会発表

- 1) Koki Taniguchi
Diversity of rotavirus and procedures for protection against rotavirus gastroenteritis. Seminar on rotavirus disease aspect in Kenya and other countries, Nairobi, July 31, 2009, Kenya
- 2) Sumit Sharma¹, Pratima Ray, Osamu Nakagomi, Koki Taniguchi, Jon Gentsch, Roger I Glass, Vinod K Paul, M.K. Bhan
Serum Neutralizing Antibody Response to G12 Rotavirus in Children with Rotavirus Gastroenteritis at All India Institute of Medical Sciences, Delhi
The 10th International Symposium on double-stranded RNA viruses. Hamilton Island, Australia, June 21-25, 2009 Symposium
- 3) 和久田光毅、實方 剛、佐々木潤、河本聡志、井手富彦、油井晶子、石川隆志、石井潤一、谷口孝

喜： 新しい群に属すると考えられるブタロタウイルス SKA-1 株の全塩基配列決定
第 57 回日本ウイルス学会、2009 年 10 月、東京

- 4) 前野芳正、油井晶子、菅田健、吉川哲史、河本聡志、守口匡子、佐々木潤、浅野喜造、谷口孝喜： ロタウイルス感染による末梢血単核球 MMP-9mRNA の動態
第 57 回日本ウイルス学会、2009 年 10 月、東京

- 5) 實方 剛、中野俊也、谷口孝喜、油井晶子： モンゴル国の急性胃腸炎患者から検出されたヒトロタウイルス
第 57 回日本ウイルス学会、2009 年 10 月、東京

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 |

.....
ロタウイルス感染により誘導される遺伝子検索

研究分担者 浅野正岳 日本大学歯学部・准教授

研究要旨:ロタウイルスの、自然免疫回避機構に関して検索を行う目的で、ヒト大腸癌由来細胞 HT-29 に、RNA ウイルスの増殖副産物である double-stranded RNA (dsRNA)刺激、およびロタウイルスを感染させ、これにより誘導される遺伝子の差違について、マイクロアレー法を用いて検索を行った。その結果、dsRNA 刺激に比較して、ロタウイルス感染により、強い誘導の見られた遺伝子に、type III インターフェロンがあることが判明した。Real-time PCR 法により、type III インターフェロンの発現について更に検索したところ、ロタウイルス感染3時間後に、発現のピークが見られ、また、multiplicity of infection (moi)の上昇に伴って、発現の増強が認められた。ロタウイルス感染では、type I インターフェロンの産生は、細胞内で産生されるロタウイルス由来の non-structural protein1 (NSP1)による自然免疫回避機構の結果、減弱されているが、type I および type III インターフェロンは同様のメカニズムで発現調節されていると考えられており、この現象は、細胞種の違いによるインターフェロンの発現調節という観点で極めて興味深いものと考えられた。

A. 研究目的

ロタウイルスは、感染細胞において、増殖環境をより優位に保つべく、宿主細胞における抗ウイルス作用(特に自然免疫系)を減弱させるシステム(自然免疫回避機構)を有している。type I インターフェロンの誘導に極めて重要な transcription factor である、interferon regulatory factor 3 (IRF3)および NF- κ B のシグナル系が、ロタウイルスの産生する NSP1 により破壊され、機能を喪失するシステムは、その代表的な例である。それでは、自然免疫系の全てが、ロタウイルス感染により活性を失ってしまうのであろうか？本研究においては、ロタウイルス感染により誘導される自然

免疫系の担い手として、どのような遺伝子が誘導されるのかという点に着目し、マイクロアレー法により検索を行った。

B. 研究方法

ヒト腸管上皮細胞 HT-29 を、RNA ウイルスの増殖副産物である double-stranded RNA (dsRNA)100 μ g/ml により刺激し、または、ロタウイルス SA11 を moi 10 で感染させ、0, 1, 8, 16時間後に total RNA を抽出した。DNase により処理した後、cDNA を作成し、マイクロアレーにより発現する mRNA、特に自然免疫系分子の違いについて検討した。また、real-time PCR については、

HT-29 細胞感染後、0, 3, 6, 9, 12, 24時間後に total RNA を回収し、cDNA を作成後、検討した。

C. 研究結果

発現に違いの見られた遺伝子は大きく3群に分けられた。第1群は、dsRNA 刺激により強く誘導されたものであり、RIG-I や MDA5 が属していた。第2群は、dsRNA 刺激およびロタウイルス感染で同等の発現を示したものであり、transcription factor IRF-1 などであった。第3群は、ロタウイルス感染でより強く誘導されたものであり、type III インターフェロンが認められた。type III インターフェロンの誘導は、感染8時間後に約40倍と最大となり、18時間後では約10倍に低下した。また、dsRNA 刺激に比較して、8時間後では、約4倍の発現が認められた。この結果を、real-time PCR 法により、更に詳細に検索したところ、moi 依存的に発現量が増加し、また、感染3時間後に発現のピークがあることが判明した。

D. 考察

Type III インターフェロンは、2007年に発見された新たなインターフェロンであり、type I インターフェロンとは、遺伝子の構造(イントロンの有無)や、レセプターの構成、発現する細胞の種類などが異なっている。遺伝子発現の調節領域を比較した研究では、両者共に、IRF family と NF- κ B の結合領域を有しており、樹状細胞においては、これらの transcription factor により発現が調節されていることが判明している。しかし、ヒト腸管上皮細胞 HT-29 においては、ロタウイルス感染により type III インターフェロンのみ誘導され、type I インターフェロンは誘導されなかった。このことは、細

胞種によって、インターフェロンの発現誘導のメカニズムが異なる可能性が考えられる。今後は、この違いが何であるのかということについて、更に検討する必要があるものと考えられた。

E. 結論

マイクロアレーによる検索の結果、dsRNA 刺激に比較して、ロタウイルス感染により強く誘導される遺伝子として、type III インターフェロンがあることが判明した。この結果は、real-time PCR 法によっても確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Kameoka S, Kuroki Y, Honda K, Kijima N, Matsumoto K, Asano M, Arai Y, Shirakawa T. Diagnostic accuracy of micro-computed tomography for osseous abnormalities in the rat temporomandibular joint condyle. Dentomaxillofacial Radiol, 38, 465-469, 2009.
- 2) Omagari D, Mikami Y, Suguro H, Sunagawa K, Asano M, Sanuki E, Moro I, Komiyama K.. Poly I:C-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in intestinal epithelial cells. Clin Exp Immunol, 156, 294-302, 2009.

2.学会発表

- 1)尾曲大輔、砂川恵伸、浅野正岳、茂呂周、小宮山一雄:日本消化器免疫学会 マウス多量体免疫グロブリンレセプター特異的モノクローナル

抗体によるDSS誘発腸炎への検討 第46回 日本消化器免疫学会（愛媛）（2008. 7）

2) Asano M, Omagari D, Iijima M, Moro I, Komiyama K: Differential distribution of mouse polymeric immunoglobulin receptor in mouse organs. The 14 th International Congress of Mucosal Immunology Philadelphia, USA (2009. 7)

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

下痢症ウイルスの病原性解析

分担研究者 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：2002年～2007年に急性胃腸炎症状で受診した外来患者糞便中の病原因子（ウイルスおよび細菌）の検索を行った結果、ノロウイルスの次にサポウイルスが多く検出された。サポウイルスは、ドラスティックな genogroup の入れ替わりを伴って流行していた。カキ関連食中毒患者糞便より、ノロウイルス、アイチウイルス、アストロウイルスに加え、サポウイルスが検出された。サポウイルス感染患者糞便中の SaV 遺伝子の定量的解析および変異解析を行ったところ、SaV 遺伝子は発症後数日から約2週間、長い例では約1ヶ月間にわたって検出されることを明らかにした。約1ヶ月間の長期感染により SaV 構造タンパク質コード領域にアミノ酸変異を伴う遺伝子変異が生じることを見いだした。サポウイルスの基礎的研究では、ポリプロテインから自身のプロテアーゼによって切断した VP1 タンパク質が粒子を形成し得ることが明らかとなった。

A. 研究目的

サポウイルス（SaV）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 を除く GI、GII、GIV、GV である。SaV 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。SaV は、NoV に近縁なウイルスであり、NoV と同様にカリシウイルス科に属するウイルスである。NoV 同様にウイルス性急性胃腸炎の原因ウイルスとして知られているが、その疫学的研究、基礎研究は NoV に比べて 10 年以上後れを取っている。

本研究では、SaV の感染経路、発生動向を調

べるために、超高感度検出法を用いた分子疫学を行った。また、SaV の複製機構、病原性を調べるため、SaV の粒子形成や、プロテアーゼに関する基礎研究も行った。

B-1. 研究方法（疫学調査）

1. 対象検体

2002年から2009年までに全国衛生研究所に報告された食中毒事例、急性胃腸炎の集団発生事例の糞便検体を対象として調査を行った。また、原因食材としてカキが疑われた事例では、カキを対象として調査を行った。

2. 方法

検体からの RNA 抽出は、定法に従って行った。抽出した RNA は、DNase 処理により混在する DNA

を分解除去した後、逆転写に用いた。サポウイルス ORF1 の構造蛋白質コード領域 (VP1 N-terminal region) に設計したプライマーセットを用いた RT-PCR によりサポウイルス genome RNA を検出した。陽性を呈した場合、RT-PCR の増幅産物を精製し、ダイレクトシーケンスによって増幅産物の塩基配列を決定した。決定した塩基配列は、CaliciWeb データベース上に登録された SaV の塩基配列と Clustal W を用いてアライメントし、Kimura の 2 パラメーター法によって distance を算出して Neighbor Joining 法 (NJ 法) によって分子系統樹を作成した。

B-2. 研究方法 (基礎的研究)

1. cDNA クローン

SaV genogroup II の Mc10 株の cDNA clone を用いて検討を行った。Mc10 株の全長 cDNA を T7 RNA polymerase promoter の下流にクローニングし、genome 末端の poly A 配列下流に Bgl II site を挿入した pT7-Mc10 を構築した。Mc10 株のプロテアーゼに存在する GDCG モチーフを GDGG に変換しプロテアーゼ活性を消失させたプロテアーゼミュータント pT7-Mc10 proM を構築した。さらに、pT7-Mc10 のポリメラーゼ領域に存在する YGDD モチーフを YGAA に変換し、ポリメラーゼの活性を消失させ、sub-genomic RNA の合成ができない pT7-Mc10 RdM を構築した。

2. 方法

T7 RNA polymerase を真核生物の細胞内で発現する組換えワクチニアウイルス vTF7 を COS7 細胞に MOI 0.1 で感染させ、その後 pT7-Mc10 をトランスフェクションした。48 時間後に細

胞を凍結融解を 3 回繰り返すことにより破壊した後、10000g, 30 分間の遠心により細胞上清を得た。その後、50000rpm, 3 時間超遠心により細胞上清に存在する VLPs を沈降させた。沈降した VLPs は、5-30%のスクロース沈降密度勾配遠心法により分離精製した。分離精製した各フラクションを抗 VLP 抗体を用いたウエスタンブロットティング、電子顕微鏡観察を行って VLPs の有無を調べた。

(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

(疫学調査)

カキ関連食中毒患者糞便より、ノロウイルス、アイチウイルス、アストロウイルスに加え、サポウイルスが検出された。患者糞便から検出された SaV の塩基配列と、カキから検出された SaV の塩基配列を比較したところ、98%以上の一致率を示した。2002 年 1 月から 2006 年 3 月までの 11 のカキ関連急性胃腸炎の原因を調べたところ、種々の遺伝子型、遺伝子群のサポウイルスが 2 つの流行事例から検出された。

SaV 集団感染事患者糞便中の SaV 遺伝子の定量的解析および変異解析を行い、SaV 遺伝子が発症後数日から約 2 週間、長い例では約 1 ヶ月間にわたって検出された。約 1 ヶ月間にわたって SaV が体内に存在した症例において、

初期の患者糞便から検出された SaV 構造蛋白質のアミノ酸配列と 1 ヶ月後のそれを比較したところ、複数のアミノ酸変異が存在していた。

SaV 集団感染事例の患者糞便中の SaV 遺伝子の検出、解析を行ったところ、胃腸炎症状を示さない成人から SaV-RNA が検出された。

2007 年に検出された SaV 遺伝子は、そのほとんど全てが genogroup IV に属していた。しかし、2008 年以降は genogroup IV は検出されなくなり、検出される SaV のほとんどが genogroup I であった。

(基礎的研究)

サポウイルスの構造タンパク質は非構造タンパク質のカルボキシ末端 (C 末) に融合蛋白として同一フレーム上にコードされている。COS7 細胞内で ORF1 ポリプロテインを発現させたところ、ウイルスプロテアーゼが予想切断点を認識し構造蛋白が予想されるサイズに切断されたことが抗 Mc10 VLP 抗体を用いたウエスタンブロッティングで確認された。スクロース培養上清から精製したタンパク質を沈降密度勾配遠心法によって 24 フラクション分離し、ウエスタンブロッティングで各フラクションを確認したところ、通常 VLPs が検出されるフラクションに構造蛋白質のシグナルが確認された。このフラクションの全量を、超遠心で沈降させ、沈降物を電子顕微鏡で観察したところ、VLPs が観察された。培養細胞中で ORF1 ポリプロテインから切断された構造タンパク質は、VLPs を形成することが確認された。

C. 考察

(疫学調査)

NoV は、ヒトの体内から排泄されたウイルス

が河川に流入し、海に下り、二枚貝などに濃縮されることが明らかにされている。また、NoV に汚染された二枚貝が NoV の食中毒の一因となっている事も明らかにされている。このような解析が進んでいるのは、NoV の超高感度検出方が開発され、普及しているためである。一方、非細菌性胃腸炎の原因ウイルスの一つとされ、NoV と共によく知られている SaV では、今だ NoV のように普及がすすみおらず、感染症としての啓発活動、疫学調査も大幅に後れを取っている。

本研究の疫学調査により、非細菌性の集団食中毒事例、散發性の胃腸炎事例において、SaV は NoV に次いで多く検出されることが明らかとなった。SaV は集団発生事例が少なく、小児を中心とした比較的穏やかな症状を示す非細菌性胃腸炎を引き起こすとされていたが、集団発生事例数、患者の年齢分布から NoV と同様の特徴を有することが明らかとなった。

NoV では、感染者がウイルスを排泄する期間が 1 週間から長い場合には 1 ヶ月以上に及ぶことが知られている。また、不顕性感染者の存在も報告されている。本研究では、SaV についてこれらを調べたところ、SaV にも NoV 同様の特徴があることが明らかになった。

一方、原因食材調査では、カキから SaV が検出され、汚染二枚貝が SaV の集団食中毒の一因となることも明らかにされた。

以上から、SaV は NoV 同様、不顕性感染者がウイルスを維持しつつ、ヒトからヒトへの感染を繰り返すことによってヒトの中で維持、継代され、河川に流れ出たウイルスが、時として 2 枚貝を汚染し、非細菌性集団食中毒の一因となるという NoV の特徴をそのまま有しているこ

とが考えられた。感染経路の特定や、伝播形態など結論に至には、まだまだ詳細な調査が必要であるが、その一端を捉えることができたのかもしれない。

NoV では、流行する genotype の変化が徐々に起きる事が報告されているが、ここ数年は genotype II/4 (GII/4) が主流を占めていることが知られている。それに対し、SaV は不思議なことに、SaV は流行するウイルスの genogroup がドラスティックに変化していることが明らかになった。何故、突然主流となって流行していた genotype が消失し、新たな genotype が流行するのかは不明である。今後、日本だけでなくグローバルな SaV の疫学調査を行い、原因を研究する必要がある。

(基礎的研究)

SaV の genome 構造は、基本的には NoV と類似しているが、構造蛋白質が ORF1 の C 末に非構造蛋白質と一続きにコードされている点が異なる。つまり、NoV では ORF1 と ORF2、別々のフレームにコードされている非構造蛋白質と構造蛋白質が、一続きに ORF1 にコードされているのである。NoV は ORF2 と ORF3 を有する全長約 2.6 Kb の sub-genomic RNA が、細胞内で genome RNA より転写され、其れが構造蛋白質を供給し、粒子を形成することが知られている。SaV でも構造蛋白質領以降を昆虫細胞や哺乳類細胞で発現させると、VLPs を形成することが知られており、細胞内では sub-genomic RNA が合成され、そこから構造蛋白質が合成されると予想されている。しかし、ヒトに感染する SaV では、今だ sub-genome RNA の細胞内合成が確認されていない。

SaV では genome の構造上、sub-genome RNA の合成が無くとも、ORF1 の翻訳に伴い一続きに合成されるポリプロテインから非構造蛋白質と構造蛋白質が供給可能である。本研究で、ORF1 ポリプロテインが自身のプロテアーゼによって切断を受け、予想されるサイズの構造タンパク質を産生すること、産生された構造蛋白質が VLPs を形成することが明らかとなった。つまり、SaV は NoV と異なり、sub-genomic RNA を細胞内で転写しなくても粒子形成かが可能であることが示唆された。しかし、この違いがサポウイルスの複製にどのような意味を持つのかを明らかにするために、哺乳類細胞内での SaV の複製機構を更に解析する必要がある。

E. 結論

SaV の分子疫学を推進し、サポウイルスの感染経路、ライフサイクルが NoV に似ていることを明らかにした。しかし、SaV が流行株を genogroup のレベルでドラスティックに変化させていることが明らかとなった。

SaV の構造蛋白質が、ORF1 より自身のプロテアーゼにより切り出され、VLPs を形成することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Reiko Nakagawa-Okamoto, Tomoko Arita-Nishida, Shoichi Toda, Hiroto Kato, Hiroyuki Iwata, Miho Akiyama, Osamu Nishio, Hirokazu Kimura, Mamoru Noda,

- Naokazu Takeda, and Tomoichiro Oka. Detection of multiple sapovirus genogroups and genogroups in oyster-associated outbreaks. *Jpn J Infect Dis* 2009;62:63-66
2. Tomoichiro Oka, Mami Yamamoto, Kana Miyashita, Satoko Ogawa, Kazuhiko Katayama, Takaji Wakita and Naokazu Takeda. Self-assembly of sapovirus recombinant virus-like particles from polyprotein in mammalian cells. *Microbiol Immunol* 2009; 53: 49-52
 3. Iwakiri A, Ganmyo H, Yamamoto S, Otao K, Mikasa M, Kizoe S, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Quantitative analysis of fecal sapovirus shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion. *Arch Virol.* 2009;154(4):689-93.
 4. Yoshida T, Kasuo S, Azegami Y, Uchiyama Y, Satsumabayashi K, Shiraishi T, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. *J Clin Virol.* 2009;45(1):67-71.
 5. Ootsuka Y, Yamashita Y, Ichikawa T, Kondo R, Oseto M, Katayama K, Takeda N, Oka T. Molecular characterization of sapoviruses detected in sporadic gastroenteritis cases in 2007 in ehime prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2009;62(3):246-248.
 6. Harada S, Okada M, Yahiro S, Nishimura K, Matsuo S, Miyasaka J, Nakashima R, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Shinozaki K, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan. *J Med Virol.* 2009;81(6):1117-27.
 7. Oka T, Miyashita K, Katayama K, Wakita T, Takeda N. Distinct genotype and antigenicity among genogroup II sapoviruses. *Microbiol Immunol.* 2009 Jul;53(7):417-20.
 8. Kitajima M, Oka T, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K. Development of a broadly reactive nested reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan. *Microbiol Immunol.* 2009 Sep;53(9):531-4.
 9. Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Tsunemitsu H, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Mori H, Nakamura H, Wakita T, Takeda N, Sato H. Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins.

- Virology. 2009 Nov 10;394(1):119-29.
10. 片山和彦 ノロウイルス感染症 臨床検査 ウイルス感染症-最新の動向 70-77, 2009
 11. 片山和彦 ノロウイルス感染症の現状と対策 Medicament News 特集=感染症を巡るトピックス 第 1969 号 1-4 2009
 12. 岡 智一郎 ノロウイルス、サポウイルス感染症「臨床検査」, 53 (6), 665-72, 2009.
 13. 片山和彦 ノロウイルス対策 「高校保健ニュース」, 2009年11月18日号. 株式会社少年写真新聞社
 14. 片山和彦 ノロウイルスについて 「健康教室」, 2010年1月号 通巻894号 東山書房 p74-79
 15. 片山和彦 ノロウイルス、ロタウイルスが特集 最新学校保健安全ハンドブック (書籍) p77-80
2. 学会発表
1. 片山和彦「ノロウイルスの分子疫学」第79回日本衛生学会学術会議、包括的感染症制御研究会セッション-2, 2009年3月、東京
 2. 岡 智一郎、高木 弘隆、遠矢 幸伸、片山 和彦、脇田 隆字、武田 直和「BRETを用いたネコカリシウイルスプロテアーゼ活性検出系の構築」日本薬学会第129年会 2009年3月、京都
 3. 片山和彦「ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイルスのノロウイルス研究への有用性」
 4. 第147回日本日本獣医学会学術集会、日本実験動物医学会シンポジウム、2009年4月2日、栃木県宇都宮市
 5. 岡 智一郎 「ノロウイルスの迅速な検出に向けた取り組み」 第50回日本臨床ウイルス学会 教育セミナー
 6. 岡 智一郎 「サポウイルスの分子疫学」衛生微生物技術協議会 第30回研究会 2009年7月10日
 7. 岡 智一郎「Molecular epidemiology of sapovirus in Japan」平成21年9月10日 第6回 日本-台湾 感染症シンポジウム
 8. 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、佐藤裕徳 「ノロウイルス GII/4 ゲノムとキャプシド構造の自然界での進化」第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月、東京 ワークショップ
 9. 中西章、Benoit Chapellier, 片山和彦、岡智一郎、武田直和 「ノロウイルスを利用した経口ワクチン用ベクター作成の試み」第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月、東京 ワークショップ
 10. 片山和彦、岡智一郎、脇田隆字「ノロウイルスリバーシブルジェネティックシステムのノロウイルスプロテアーゼを利用した制御」第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月、東京 ワークショップ
 11. 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、武田直和、脇田隆字、片山和彦「カリシウイルス

- ス増殖阻害物質スクリーニング系の構築」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京
12. 北島正章、岡 智一郎、遠矢幸伸、高木弘隆、片山浩之、武田直和、片山和彦
「Nested RT-PCR および Real-time RT-PCR によるマウスノロウイルス核酸検出系の構築」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京
13. 北島正章、岡 智一郎、原本英司、片山浩之、大垣眞一郎、武田直和、片山和彦
「多摩川河川水からのサポウイルスの検出および遺伝子解析」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京
14. 片山和彦、岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、脇田隆字「マウスノロウイルスの複製機構の解析」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京
15. 高木弘隆、遠矢幸伸、片山和彦、岡智一郎、杉山和良「マウスノロウイルス (MNV) のエタノール感受性と粒子、遺伝子への影響について検討」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京
16. 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、武田直和、脇田隆字、片山和彦 「バイオセンサー発現細胞を用いたネコカリシウイルス感染検出系の構築」第 32 回日本分子生物学会年会 横浜 2009 年 12 月 9-12 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）

平成 21 年度 分担研究報告書

狂犬病に対する治療法の開発に関する研究

「EB ウイルス形質転換法により樹立された新規ヒト型
狂犬病ウイルス中和モノクローナル抗体の単離と性状解析」

分担研究者： 西園 晃 大分大学医学部微生物学講座 教授

研究要旨：

狂犬病は狂犬病動物から咬まれることでウイルス感染が成立する致死性のウイルス性脳炎で、多くの発展途上国において、重大な公衆衛生問題である。重度の曝露を受けた場合には、ワクチンと同時にヒト (HRIG)もしくはウマグロブリン製剤 (ERIG)の投与が必須であるが、その供給に限界があること、副作用の危険性や高価格であることなどが、特に発展途上国において問題となっている。我々は、これらグロブリン製剤 (RIG)に代替可能な2つの新たなヒト型モノクローナル抗体 (MAb)をワクチン接種過免疫ボランティアから Epstein-Barr virus (EBV)トランスフォーメーション法により樹立した。そのうちのひとつ No.254 はサブクラスが IgG3 であり、固定毒の CVS 株 (33.3 IU/mg), ERA 株 (264.2 IU/mg), HEP-Flury 株 (209.8 IU/mg), そして Nishigahara 株 (209.8 IU/mg)を中和した。さらに、No.254 に対する耐性変異株の G 蛋白推定アミノ酸配列は Antigenic site II に位置する非常に保存性の高いアミノ酸 (Lys198) が変異していた。No.254 の CVS 株に対する 50% focus reduction neutralizing test (FRNT₅₀)は 68 ng/ml, 解離平衡定数 (*K_d* 値)は 3.7×10^{-7} M, で補体活性を有していた。また、No.254 は *in vivo* マウスチャレンジ試験で効果的な中和活性を示した。もうひとつの 4D4 は、サブクラスが IgM で CVS 株と Nishigahara 株を中和した。4D4 に対する耐性変異株の推定アミノ酸配列は、親株と比較すると、Ala242 が変異しており、これは Antigenic site I と VI の間の位置し、神経病毒性に関与するとされる部位を含み、これまで報告のない抗原部位であった。

このように、これら狂犬病ウイルス (RABV)に対するヒト型 MAbs は、将来、曝露後治療に使用されることが期待された。

【研究目的】

狂犬病はラブドウイルス科リッサウイルス属の狂犬病ウイルス(RABV)によって引き起こされる致死性のウイルス脳炎である。狂犬病は感染した家畜や野生動物の唾液によって伝播される。全世界で推定年間約 55,000 人が狂犬病によって亡くなっており、そのほとんどがアジアとアフリカに集中している。ヒトでの潜伏期間の目安は 20~90 日間であるが、2-3 日以内や 1 年以上の場合もある。臨床症状が現れると有効な治療法がなく致死率は 100%である。それ故、曝露後ワクチンを繰り返し接種することが狂犬病の疑われる動物に咬まれた場合の唯一の発症予防手段である。特に WHO の定める Category III にあたる重度な曝露を受けた場合は、咬傷の洗浄とワクチン接種に加え抗狂犬病ウイルスグロブリン製剤(RIG)の投与を含む曝露後治療(PEP)が推奨されている。曝露後できるだけ早急に RIG を投与することは、RABV に対する免疫の活性化を待たずに受動免疫を付与することができ、重度曝露時の対処法として必要不可欠である。

すでに臨床応用されている RIG はヒト由来(HRIG)もしくは、ウマ由来(ERIG)の RIG である。両者は RABV に対するワクチンを接種した過免疫のヒトもしくはウマのプール血清から得られる。HRIG はその供給に限界があるだけでなく、流行地域に住む患者にとって高価である。ERIG も供給には限界があり、またまれにアナフィラキシーなどの副反応を伴う。さらに、これら RIG には未知の病原体が混入している可能性がある。近年、WHO は PEP において HRIG, ERIG の代替としてマウスモノクローナル抗体(MAb)カクテルを利用できる可能性を示している。言

うまでもなく、ヒト由来の RIG は、その他の種から得た MAb に比べ利点が多い。ヒト由来の MAb (HuMAb)には解決すべき問題があるものの世界的な RIG 不足を解消できると考えられる。

RABV の Glycoprotein (G) 蛋白は、ウイルス粒子表面から突き出るホモ三量体構造の 1 型の膜糖蛋白である。G 蛋白はウイルス粒子の宿主細胞への吸着作用を担う反面、RABV に対する宿主拮抗性を賦与する物質となる。先行研究から、マウス MAb パネルとそれぞれの抗体に対する耐性変異株を用いて G 蛋白抗原構造が決定され、それにより主となる 2 つの構造的な Antigenic site II と III を含む、8 つの Antigenic site, I-VI, minor site a と GI が同定された。現行の RIG はポリクローナル抗体であり、ウイルス中和に必要な G 蛋白上の全ての Antigenic site を包括している。PEP に使用される抗体の特性として全ての Antigenic site を包括し、すべての RABV を中和することが必要である。近年、Epstein-Barr virus(EBV)トランスフォーメーション法を用いたヒト・マウスヘテロハイブリドーマ、ヒトグロブリン遺伝子導入マウス、ファージディスプレイ法などの異なる技術を用いて、いくつかの RABV に対する HuMAb が樹立された。これらの中で、RABV に対する HuMAbCR57 と CR4098 とが樹立され、HuMAb のカクテル CR57/CR4098 による PEP は HRIG の代替として安全かつ有効であることが示された。これら 2 つの HuMAb はまったく異なった Antigenic site を認識し、街上毒株の RABV を幅広く中和できる。この HuMAb カクテルは Phase 1 の臨床試験において、その安全性、耐容性が確認された。これは、このような

複数の HuMAb が HRIG の代替として利用可能であり、様々な街上毒株を中和できる可能性があることを示している。しかしながら、これら 2 つの抗体では、それぞれ Antigenic site I と III しか認識することができない。したがって、HuMAb カクテルを発展させるために、RABV の中和のために必要なその他の Antigenic site を認識する HuMAb を準備する必要がある。

本研究において、我々は RABV を中和できる新規の HuMAb を樹立することを目的とし、ワクチン接種過免疫ボランティアから既知の EBV トランスフォーメーション法を用いて 2 つの新規 HuMAb を樹立した。我々が樹立した HuMAb の同定と性状解析のため、*in vitro* および *in vivo* でその中和活性を評価し、それぞれの抗体により認識される Antigenic site を決定した。

【研究方法】

ヒト B リンパ球の調整と EB ウイルス トランスフォーメーション

ヒト B 細胞は研究室で RABV を取り扱っている健康な 2 人の末梢血から採取された。ドナー A は RABV を扱う実験従事者の日本人男性で、複数回の Purified chick embryo cell (PCEC) ワクチン(化血研, Kumamoto, Japan, HEP-Flury 株)接種を受けている。もう一人のドナー B はタイ人女性で日常的に RABV を取り扱う研究者で、Purified vero cell rabies vaccine (PVRV)(VeroRab, Aventis-Pasteur, Lyon, France, Pitman-moore/W138-1503-3M 株)もしくは PCEC (Rabipur, Chiron, Ankleshwar, India, LEP-Flury 株)を複数回接種している。両ボランティアは RABV に対する高

い中和抗体価 (VNA)を保つため、毎年ブースター接種をしている。リンパ球を得るため、両ボランティアは 1 ドースの PCEC ワクチンを皮下より接種した。最後のワクチン接種から 14 日後、両ボランティアの VNA は後述の Rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT)により測定し、十分な抗体価を確認した(A= 1.77 IU/ml, B= 7.30 IU/ml)。この研究は大分大学の倫理委員会の承認を得て行われた。

末梢単核球細胞 (PBLs)は全血から Ficoll-Paque (LSM Lymphocyte Separation medium, ICN Biomedicals Inc, Aurora, OH)を用いて分離した。B リンパ球は磁気ビーズ標識された anti-CD2 抗体 (DynaL, Lake Success, NY) と magnetic particle concentrator (DynaL) により分離した。CD-2 陰性細胞は前駆 B 細胞として回収し、既知の EBV トランスフォーメーション法により不死化した。即ち、10% fetal calf serum (FCS; Equitech-Bio, Inc. Cotton Gin Lane Kerrville, TX, USA)を含む RPMI1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)で培養した B95-8 細胞の培養上清は 1,000 ×g で 10 分間遠心し 0.45µm フィルターを通して接種用 EBV 液として調整した。1 × 10⁶ の B リンパ球は形質転換効率 (TD₅₀)が 10⁴ 程度になるよう 1 ml の B95-8 の培養液に懸濁し、37°C で 2 時間培養した。感染後、細胞は培養液で 2 回洗浄し 96 穴プレート (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA)に 1 × 10⁴ cell/well で分散し、37°C のインキュベーター(5% CO₂, 95% Air)で培養した。

ウイルスとウイルスカ価測定

Challenge virus standard (CVS)株は 2% FCS・Eagle's minimal essential medium (MEM)培地にて Baby hamster kidney (BHK)-21 細胞株で増殖した。我々の研究室で保存されたその他の RABV 株, Evelyn Rokitnicki Abelseth (ERA), High egg passage (HEP)-Flury と Nishigahara 株は単層培養した BHK-21 細胞, もしくはマウス神経芽細胞腫 (Neuroblastoma: NA)細胞によって 37°C, 5%CO₂ 濃度で培養された。マウスチャレンジ試験のため, CVS 株を BALB/c マウスの脳内で増殖させ, 1 % Phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4)にて 20 % 脳乳剤上清として調整した。これらウイルスと CVS 株マウス脳乳剤は使用するまで -80°Cで保存された。

BHK-21 細胞で培養した CVS 株は RFFIT による VNA, HuMAb の 50% focus reduction neutralizing test (FRNT₅₀) の算出と HuMAb の中和耐性変異株の樹立に使用した。ウイルスカ価を測定するため, 10 段階希釈した CVS を 24 穴プレートにて単層培養した NA 細胞に感染させ, 37°Cで培養した。感染 72 時間後, 4%パラフォルムアルデヒドで細胞を固定した。細胞を固定後, メタノールを加え, FITC-conjugated anti RABV nucleoprotein (N) specific monoclonal antibody (FITC-RABV N MAb; Fujirebio Diagnostics, Inc., Malvern, PA, USA)と 37°C, 45 分間反応し, 蛍光顕微鏡で観察し focus forming units/ml (FFU/ml)を算出した。同様に 96 穴プレートに単層培養した BHK-21 細胞に 10 段階希釈した CVS 株を感染させ 37°Cで培養した。24 時間後, 90%アセトンで固定し,

独立した 8 well の感染細胞を観察し tissue culture infectious dose (TCID)₅₀ を求めた。

RFFIT と 50% focus reduction neutralizing test (FRNT₅₀)の測定

RFFIT は先行研究に従って行った。即ち, 96 穴プレートにて, 形質転換細胞の培養上清 (50μl)と等量の 2%FCS-MEM で希釈された CVS 株 (100TCID₅₀)とを混ぜ 5%CO₂ 濃度で 37°C, 90 分培養した。次に BHK-21 細胞 (1x10⁵ cell/well)をそれぞれのウェルに加え 24 時間培養した。最後に細胞を 90%アセトンで固定し, FITC-RABV N MAb と 37°C, 45 分間反応させ, 蛍光顕微鏡で観察した。樹立された RABV に対するクローンの CVS, ERA, HEP-Flury と Nishigahara 株に対する中和力価 (international unit: IU)の決定のため, WHO の国際標準品 [RAI: Anti-rabies Immunoglobulin, Equine, National Institute for Biological Standards & Control (NIBSC)]と比較し, Spearman-Kärber 法により算出した。狂犬病の発症を防ぐのに必要な RFFIT 力価は 0.5 IU/ml 以上であると定義されている。

段階希釈した HuMAb (0.1 ml)と等量の CVS 株 (2000 FFU/ml)とを 37°Cで 90 分間反応させ, この反応液を 24 穴プレートで単層培養した NA 細胞にて 1 時間培養した。培養後, 上清を取り除き, PBS で洗浄後, 10%FCS-MEM/ 1%メチルセルロース培地 (Sigma, St. Louis, MO, USA)にて 37°C, 5%CO₂ で 3 日間培養した。その後, 4%パラフォルムアルデヒドで細胞を固定し, PBS で 2 回洗浄し, 上述の方法で FFU を求めた。