

- 27) Yazaki, M., Atsuta, Y., Kato, K., Kato, S., Taniguchi, S., Takahashi, S., Ogawa, H., Kouzai, Y., Kobayashi, T., Inoue, M., Kobayashi, R., Nagamura-Inoue, T., Azuma, H., Takanashi, M., Kai, S., Nakabayashi, M., Saito, H. Japan Cord Blood Bank Network.: Incidence and risk factors of early bacterial infections after unrelated cord blood transplantation. *Biological Blood and Marrow Transplantation* 15:439–446, 2009
- 28) Isoyama, K., Oda, M., Kato, K., Nagamura-Inoue, T., Kai, S., Kigasawa, H., Kobayashi, R., Mimaya, J., Inoue, M., Kikuchi, A., Kato S.: Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children with AML in Japan. *Bone Marrow Transplantation* 45:69–77, 2010
- 29) Kudo, K., Ohga, S., Morimoto, A., Ishida, Y., Suzuki, N., Hasegawa, D., Nagatoshi, Y., Kato, S., Ishii, E.: Improved outcome of refractory Langerhans cell histiocytosis in children with hematopoietic stem cell transplantation in Japan. *Bone Marrow Transplantation* (in press)
- 30) Yagasaki, H., Kojima, S., Yabe, H., Kato, K., Kigasawa, H., Sakamaki, H., Tsuchida, M., Kato, S., Kawase, T., Muramatsu, H., Morishima, Y., Kodera, Y.: Tacrolimus/Methotrexate versus cyclosporine/methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia who received bone marrow transplantation from unrelated donors: results of matched pair analysis. *Biological Blood and Marrow Transplantation* 15:1603–1608, 2009
- 31) Ohga, S., Kudo, K., Ishii, E., Honjo, S., Morimoto, A., Osugi, Y., Sawada, A., Inoue, M., Tabuchi, K., Suzuki, N., Ishida, Y., Imashuku, S., Kato, S., Hara, T.: Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatric Blood Cancer* 54:299–306, 2010
- 32) Mizuno, T., Sugiura, S., Kimura, H., Ando, Y., Sone, M., Nishiyama, Y., Nakashima, T.: Detection of cytomegalovirus DNA in preserved umbilical cords from patients with sensorineural hearing loss. *European Archives of Oto-rhino-laryngology* 266: 351–355, 2009
- 33) Wada, K., Mizoguchi, S., Ito, Y., Kawada, J., Yamauchi, Y., Morishima, T., Nishiyama, Y., Kimura, H.: Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7. *Microbiology and Immunology* 53:22–29, 2009
- 34) Nomura, Y., Kimura, H., Karube, K., Yoshida, S., Sugita, Y., Niino, D., Shimizu, K., Kimura, Y., Aoki, R., Kiyasu, J., Takeuchi, M., Hashikawa, K., Hirose, S., Ohshima, K.: Hepatocellular apoptosis associated with cytotoxic T/naturalkiller-cell infiltration in chronic

- active EBV infection. *Pathology International* 59:438–442, 2009
- 35) Ito, Y., Shibata–Watanabe, Y., Kawada, J., Maruyama, K., Yagasaki, H., Kojima, S., Kimura, H.: Cytomegalovirus and Epstein Barr virus coinfection in three toddlers with prolonged illness. *Journal of Medical Virology* 81:1399–1402, 2009
- 36) Tanaka–Kitajima, N., Iwata, N., Ando, Y., Sakurai, H., Iwami, M., Tsuzuki, K., Kondo, M., Ito, Y., Kimura, H.: Acute retinal necrosis caused by herpes simplex virus type 2 in a 3– year–old Japanese boy. *European Journal of Pediatrics* 168:1125–1258, 2009
- 37) Kimura, H., Miyake, K., Yamauchi, Y., Nishiyama, K., Iwata, S., Iwatsuki, K., Gotoh, K., Kojima, S., Ito, Y., Nishiyama, Y.: Identification of Epstein–Barr virus (EBV)–infected lymphocyte subtypes by flow cytometric in situ hybridization in EBV–associated lymphoproliferative diseases. *Journal of Infectious Diseases* 200: 1078–87, 2009
- 38) Ushijima, Y., Goshima, F., Kimura, H., Nishiyama, Y.: Herpes simplex virus type 2 tegument protein UL56 relocalizes ubiquitin ligase Nedd4 and has a role in transport and/or release of virions. *Virology Journal* 6: 168, 2009
- 39) Cohen, J.I., Kimura, H., Nakamura, S., Ko, Y.–H., Jaffe, E.S.: Epstein–Barr virus Associated Lymphoproliferative Disease in Non–Immunocompromised Hosts. *Annals of Oncology* 20: 1472–1482, 2009
- 40) Iwata, S., Wada, K., Tobita, S., Gotoh, K., Ito, Y., Demachi–Okamura, A., Shimizu, N., Nishiyama, Y., Kimura, H.: Quantitative Analysis of Epstein–Barr Virus (EBV)–Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. *Journal of General Virology* (in press)
- 41) Funahashi, Y., Iwata, S., Ito, Y., Kojima, S., Yoshikawa, T., Hattori, R., Gotoh, M., Nishiyama, Y., Kimura, H.: Multiplex Real–time PCR Assay for Quantifying BK Polyomavirus, JC Polyomavirus, and Adenovirus DNA Simultaneously. *Journal of Clinical Microbiology* (in press)
- 42) Miura, Y., Kawakami, Y., Otsuka, M., Hachiya, M., Yamanoi, T., Ohashi, K., Suzutani, T., Yamamoto, T.: Cutaneous cryptococcosis in a patient with cirrhosis and hepatitis C virus infection. *Acta Dermato–Venereologica* 90:106–107, 2010
- 43) Hashimoto, K., Ishibashi, K., Ishioka, K., Zhao, D., Sato, M., Ohara, S., Abe, Y., Kawasaki, Y., Sato, Y., Yokota, S., Fujii, N., Peebles, R.S. Jr, Hosoya, M., Suzutani, T.: RSV replication is attenuated by counteracting expression of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) molecules. *Virology* 391:162–170, 2009
- 44) Ishibashi, K., Tokumoto, T., Shirakawa, H., Hashimoto, K., Kushida, N., Yanagida, T., Shishido, K., Aikawa, K., Yamaguchi, O., Toma, H., Tanabe, K., Suzutani, T.: Association between antibody response against cytomegalovirus strain–specific

- glycoprotein H epitopes and HLA-DR. *Microbiology and Immunology* 53:412-416, 2009
- 45) Soeta, N., Terashima, M., Gotoh, M., Mori S., Nishiyama, K., Ishioka, K., Kaneko, H., Suzutani, T.: An improved rapid quantitative detection and identification method for a wide range of fungi. *Journal of Medical Microbiology* 58:1037-1044, 2009
- 46) Kaneko, H., Ishiko, H., Ohguchi, T., Tagawa, Y., Aoki, K., Suzutani, T., Ohno, S.: Nucleotide sequence variation in the hexon gene of human adenovirus type 8 and 37 strains from epidemic keratoconjunctivitis patients in Japan. *Journal of General Virology* 90:2260-2265, 2009
- 47) Takagi, S., Masuoka, K., Taniguchi, S.: High incidence of haemophagocytic syndrome following umbilical cord blood transplantation for adults. *British Journal of Haematology* 147:543-553, 2009
- 48) Nishida, A., Yamamoto, H., Taniguchi, S. et al.: T-cell post-transplant lymphoproliferative disorder in a patient with chronic idiopathic myelofibrosis following allogeneic PBSC transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2009.
- 49) Matsuno, N., Wake, A., Taniguchi, S. et al.: Impact of HLA disparity in the graft-versus-host direction on engraftment in adult patients receiving reduced-intensity cord blood transplantation. *Blood* 114:1689-1695, 2009
- 50) Araoka, H., Taniguchi, S., Yoneyama, A. et al.: Monobactam and aminoglycoside combination therapy against metallo-beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* screened using a 'break-point checkerboard plate. *Scandinavian Journal of Infectious Disease* 42:231-233, 2010

## 2.学会発表

- 1) 塩田智之, 森川茂, 飯塚愛恵, 倉根一郎, 西條政幸: 293T細胞を用いたHSV-1組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用. 第19回日本抗ウイルス療法研究会, 東京(2009. 6)
- 2) Bukbuk, D.N., Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., George, A., Shuetsu, F., Mizutani, T., Kurata, T., Kurane, I., Morkawa, S.: Recombinant nucleocapsid protein-based diagnosis of and seroepidemiological study on Lassa fever. The 109th ASM General Meeting, Philadelphia, PA (2009.05)
- 3) Saijo, M., Ami, Y., Suzuki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Iizuka, I., Shiota, T., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Pathology of monkeypox in nonhuman primates leading to the difference in virulence between Gongo Basin and West African strains. 43rd Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program and Special

- Minisymposium on enterovirus 71,  
Philadelphia, PA (2009.07)
- 4) 西條政幸, 網至康, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 新村靖彦, 横手公幸, 飯塚愛恵, 塩田智之, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂. 痘そうワクチンLC16m8およびLister株免疫時におけるIMVおよびEEV蛋白に対する抗体応答とサル痘予防効果. 第13回日本ワクチン学会学術総会, 札幌(2009.09)
  - 5) 中道一生, 伊藤陸代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 脳脊髄液中のJCポリオーマウイルスを検出するためのリアルタイムPCR検査系の確立と進行性多巣性白質脳症(PML)の診断支援. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
  - 6) 酒井宏治, 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 松井珠乃, 網至康, 平井理香, 須崎百合子, 水谷哲也, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 藤本嗣人, 山田靖子, 岡部信彦, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 森川茂. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
  - 7) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. SARS-CoV感染動物における宿主Th1/Th2バランスと重症化の関連. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
  - 8) 塩田智之, 飯塚愛恵, 森川茂, 倉根一郎, 水口雅, 西條政幸. 293T細胞を用いた単純ヘルペスウイルスならびに水痘帯状疱疹ウイルス組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
  - 9) 森川茂, 福士秀悦, 酒井宏治, 永田典代, 長谷川秀樹, 松井珠乃, 水谷哲也, 平井理香, 網至康, 緒方もも子, 西條政幸, 山田靖子, 岡部信彦, 佐多徹太郎, 倉根一郎. カニクイザルの致死的イヌジステンパーウイルス感染事例の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
  - 10) 飯塚愛恵, 塩田智之, 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 水口雅, 森川茂. 痘そうワクチンLC16m8株の温度感受性に関する解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
  - 11) 水谷哲也, 前田健, 渡辺俊平, 久和茂, 吉川泰弘, 明石博臣, 中内美名, 酒井宏治, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. ウイルスの網羅的検出法(RDV法ver 3.1)を用いたコウモリ由来新規 $\beta$ ヘルペスウイルスの同定. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
  - 12) 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, Austin Ure, Victor Romanowski, 森川茂. 南米出血熱の実験室診断法の開発. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
  - 13) 中道一生, 伊藤陸代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 定位微量投与系を用いたマウスポリオーマウイルスの脳における持続感染様式の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)

- 14) 岩田奈織子, 永田典代, 辻隆裕, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 横田恭子, 水谷哲也, 西條政幸, 森川茂, 佐多徹太郎. SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの免疫効果と副作用について. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 15) 佐山勇輔, 福士秀悦, 斎藤麻理子, 飯塚愛恵, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 鈴木陽, 神垣太郎, 玉記雷太, 倉根一郎, 押谷仁, 森川茂. フィリピンのレストンエボラウイルス感染症のウイルス遺伝子解析と感染状況の実態調査. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 16) 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 塩田智之, 飯塚愛恵, 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 佐多徹太郎, 倉田毅, 森川茂. コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルスの臓器親和性と病原性. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 17) Yamada, S., Kosugi, I., Shindo, K., Fukui, Y., Katano, H., Yashiro, K., Higashi, C., Tsuda, M., Kurane, I., Inoue, N. Screening and characterization of chemical compounds that inhibit early phase of CMV and VZV infections. 第14回国際ヘルペスウイルス感染症学会, 大阪(2009.10)
- 18) Yamada, S., Kato, M., Katano, H., Fukui, Y., Tsuda, M., Tsutsui, Y., Nozawa, N., Kurane, I., Inoue, N. Characterization of guinea pig CMV GP129 and GP131, orthologs of HCMV UL128 and UL130, which are essential for efficient viral growth in vivo but not in vitro. 第14回国際ヘルペスウイルス感染症学会, 大阪(2009.10)
- 19) 井上直樹, 神道慶子, 福井良子, 永野瑛子, 倉根一郎, 山口十四文. 水痘帯状疱疹ウイルス及びサイトメガロウイルスの前初期蛋白による転写活性化機能を阻害する抗ウイルス化合物の解析. 第19回抗ウイルス療法研究会, 東京(2009.6)
- 20) 山田壮一, 小杉伊三夫, 片野晴隆, 倉根一郎, 井上直樹. GFP組換えマウスサイトメガロウイルスを用いたin vivo imagingによる抗ヘルペスウイルス薬in vivo評価系の確立. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 21) 田辺公一, 山越 智, 大野秀明, 宮崎義継. 血清による*Candida albicans*のazole系抗真菌薬感受性の変化の検討. 第56回日本化学療法学会東日本支部総会, 東京(2009.10)
- 22) 大野秀明. 真菌性髄膜炎に対する抗真菌薬療法. 第14回日本神経感染症学会総会, 宇都宮(2009.10)
- 23) 大川原明子, 山越 智, 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *C. albicans*細胞壁表層のマンナン構造の違いによる初期免疫応答の解析. 第83回日本感染症学会総会, 東京(2009.4)
- 24) Ishida-Okawara A, Ohno H, Yamagoe S, Kaneko Y, Niimi M, Miyazaki Y. Evaluation of mycological character and early immune response against different structures of cell surface mannan of *Candida albicans*. 109<sup>th</sup> General Meeting,

- American Society for Microbiology, Philadelphia (2009. 5)
- 25) Ishida-Okawara A, Ohno H, Yamagoe S, Kaneko Y, Niimi M, Miyazaki Y. Characterization of mycological features of putative  $\alpha$ -type mannosyltransferase deleted *Candida albicans*. The 17<sup>th</sup> Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, Tokyo (2009. 5)
- 26) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Effects of antifungal combinations against *Candida* biofilms and stress response. 49<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco (2009. 9)
- 27) Ueno, T., Katano H., Yamamoto, H., Taniguchi, S., Eizuru, Y., Sata, T., Ogawa-Goto, K.: Establishment of rapid phenotypic susceptibility testing for anti-HCMV drugs using PML assay. 14<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Kobe, Japan (2009. 10)
- 28) 上野智規, 栄鶴義人, 片野晴隆, 佐多徹太郎, 後藤希代子: PML法を用いたHCMV臨床分離株の細胞指向性の解析 第24回ヘルペスウイルス研究会, 三島 (2009. 7)
- 29) 石上雅敏, 木内哲也, 後藤秀実: 当院におけるHCV陽性患者に対する肝移植の現状(シンポジウム): 第27回日本肝移植研究会, 三島 (2009.7).
- 30) 石上雅敏, 木内哲也, 後藤秀実: 肝移植後におけるHBVワクチンによるHBs抗体獲得効果-HBVキャリア症例とHBc抗体陽性ドナー非HBV症例との違い(ワークショップ: 肝移植前後の肝炎ウイルス対策): 第13回日本肝臓学会大会, 京都 (2009.10).
- 31) 後藤研誠, 伊藤嘉規, 河辺慎司, 鈴木英太郎, 木村宏: 肝移植後小児例におけるインフルエンザワクチンの有効性・安全性に関する検討: 第41回日本小児感染症学会学術集会, 福井 (2009.11).
- 32) 木村 宏, 河邊慎司, 後藤研誠, 伊藤嘉規, 岩田誠子, 西山幸廣: FISH法を用いたEBV関連リンパ増殖性疾患の非侵襲診断および病態解析: 第57回日本ウイルス学会学術集会, ワークショップ, 東京 (2009. 10)
- 33) Kimura H., Miyake K, Yamauchi Y, Iwata S, Kawabe S, Gotoh K, Ito Y, Nishiyama Y: The 34th International Herpesvirus Workshop, July 26, 2009, Ithaca, USA (2009.7)
- 34) 岡崎友亮, 西山恭子, 石岡 賢, 金子久俊, 錫谷達夫. 正常細菌叢中に存在する真菌の新しい定量法. 第63回日本細菌学会東北支部総会. 盛岡(2009. 8)
- 35) 西山恭子, 岡崎友亮, 石岡 賢, 金子久俊, 錫谷達夫. 培養によらない分子生物学的手法を用いた腔常在細菌叢の検討. 第63回日本細菌学会東北支部総会. 盛岡, (2009. 8)
- 36) 辻 正徳, 荒岡 秀樹, 石綿 一哉, 中野 伸亮, 山本 久史, 森 有紀, 内田直之, 和気 敦, 牧野 茂義, 米山 彰子, 谷口 修一: 同種造血幹細胞移植後の呼吸器ウイルス感染症に関する検討.

第32回日本造血細胞移植学会総会, 浜松(2010. 2)

上野智規, 後藤希代子, 入江伸吉, 片野晴隆, 佐多徹太郎

H. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得

特許 第4299724号「ヘルペスウイルス前初期遺伝子産物の検出方法」発明者:

2. 実用新案登録

なし

3. その他

I. なし

## II. 分担研究報告書



厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)  
研究分担者報告書

臓器移植患者の予後および QOL の向上のための真菌やウイルス感染症  
の予防・診断・治療に関する研究(H21-新興-一般-009)

LCM ウイルス感染の診断システムの開発

研究代表者 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第1部第3室室長

研究要旨:リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(lymphocytic choriomeningitis virus, LCM ウイルス)は、アレナウイルス科アレナウイルス属に分類され、ネズミなどのげっ歯類が媒介する人獣感染症の一つである。近年 LCM ウイルスに感染して死亡した患者が臓器提供者(ドナー)となり、そのドナーより実質臓器の提供を受けた移植患者が LCM ウイルスに感染し死亡するという感染事例が報告されている。本研究ではリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染症の診断法を確立した。組換えバキュロウイルスにより発現・精製された LCM ウイルス組換え核蛋白(NP)に対する単クローン抗体およびポリクローナル抗体を作製し、これらの抗体を用いた LCM ウイルス蛋白を検出する抗原検出 ELISA 法を開発した。またこの単クローン抗体を用いた間接蛍光抗体法により LCM ウイルス検出することが可能となった。本研究で作製した単クローン抗体を用いることにより、抗原検出 ELISA 法が確立され、さらにこの単クローン抗体を用いることにより病理組織中の LCM ウイルス抗原を検出することが明らかにされた。さらに、旧世界アレナウイルスの L 遺伝子を検出するプライマーセットを用いて行った RT-PCR 法により、LCM ウイルス遺伝子を高感度に検出できることが確認された。抗原検出やウイルス遺伝子増幅検査による LCM ウイルス感染症の診断システムを確立した。

A. 研究目的

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(以下、LCM ウイルス)は、アレナウイルス科アレナウイルス属に分類され、その宿主は野生のげっ歯類である。LCM ウイルス感染ネズミでは病気を起こすことはなく、持続感染を起こし生涯ウイルスを排出し続ける。ヒトは感染ネズミの唾液、尿、糞などに接触することで感染する。実験動物やペットのハムスターなどもヒトへの感染源となり、人獣共通感染症の一つである。ヒトが LCM ウイルスに感

染しても症状を呈しないこともあるが、インフルエンザ様症状から無菌性髄膜炎、脳炎など多彩な臨床症状を呈することもある。妊婦がこのウイルスに感染すると、経胎盤感染を起こし胎児に感染が広がり、水頭症や脈絡網膜炎など、胎児に先天的異常を起こすことが知られている(先天性 LCM ウイルス感染症と呼ばれる)。米国では 50 例以上の先天性 LCM ウイルス感染症例が報告されている。また臓器移植などの免疫抑制患者では致死性の出血熱様症状を示すこともあ

る。

近年、臓器提供者(ドナー)が LCM ウイルスに感染していて、そのドナーより実質臓器の提供を受けた移植患者(レシピエント)が LCM ウイルスに感染し死亡するという感染事例が報告されている。

一方、わが国ではヒトにおける LCM ウイルス感染の報告はないものの、港湾地区のネズミから LCM ウイルスが分離されていることから、日本人においても国内外で感染する危険性がある。わが国でも LCM ウイルス感染症の診断システムを整備することが重要である。本研究では、LCM ウイルスの主要構造蛋白である核蛋白(NP)の組換え蛋白を用いたウイルス抗体の検出、LCM ウイルス NP 特異的抗体を作製し、その単クローン抗体を用いた抗原検出 ELISA 法やウイルス遺伝子を検出する RT-PCR 法などの LCM ウイルスの感染症の診断システムの確立を目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 組換え LCM ウイルスの NP に対する単クローン抗体の作製.

1) 組換え LCM ウイルスの組換え核蛋白(rNP)の発現. 常法に従い LCM ウイルスの S-遺伝子をバキュロウイルスのトランスファクターに組み込み、それをバキュロウイルス DNA とともに昆虫細胞 *Tn5* にトランスフェクションし、組換え LCM ウイルス核蛋白(LCMV-rNP)を発現する組換えバキュロウイルス(*Ac*-LCMV-NP)を作製した。

2) *Ac*-LCMV-NP を用いて *Tn5* 細胞感染させて発現させた LCMV-rNP を精

製した。この LCMV-rNP を抗原としてウサギに免疫して、を LCMV-rNP に対するポリクローナル抗体(ウサギ抗血清)を得た。またこの組換え LCMV-rNP を BALB/c マウスに免疫した。抗体が十分上昇した時点で脾臓を採取し、脾臓細胞とミエロマ細胞を融合させて LCMV-rNP に対する単クローン抗体を分泌するハイブリドーマを樹立した。

2. 抗原検出 ELISA. 単クローン抗体を補足抗体として、また LCMV-rNP に対するポリクローナル抗体を検出抗体とした抗原検出 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を開発した。約 400ng の単クローン抗体を ELISA プレートの各ウェルに 4°C (12 時間)でコーティングした。0.05% tween-20 を加えた PBS (PBS-T) で洗浄後、5% スキムミルクを加えた PBS-T (ブロッキング液)を用いて 37°C で 1 時間ブロッキングした。PBS-T で洗浄後、LCM ウイルス抗原(組換え発現蛋白 rNP または LCMV 感染培養上清)を加え、37°C で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、LCMV-rNP に対するポリクローナル抗体を 37°C で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、HRP 標識-抗ウサギ IgG 抗体を加え、37°C で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、HRP 基質 ABTS 溶液で発色させ、吸光度を測定した。

### 3. 単クローン抗体のエピトープ解析.

1) 単クローン抗体が結合するエピトープを解析するため、LCMV-NP の全長(1-558 アミノ酸)および様々な欠失体をコードする cDNA を GST 融合

- 大腸菌発現用ベクターにクローニングした。
- 2) 単クローン抗体の LCMV-NP 全長及び様々なトランケート LCMV-NP 蛋白に対する反応性をウェスタンブロット法で検討した。
  4. 間接蛍光抗体法. LCM ウイルス M1 株を感染させた VeroE6 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, FITC 標識抗マウス IgG 抗体で染色し, 蛍光顕微鏡を用いて間接蛍光抗体法によりウイルス抗原を検出した。
  5. LCM ウイルス遺伝子を検出する RT-PCR 法の整備. Vieth ら(Trans R Soc Trop Med Hyg 101:1253-1264, 2007)により開発された旧世界アレナウイルスの L 遺伝子を検出するプライマーセットを用いた RT-PCR 法を検討した。Forward プライマー (LVL 3359D\_Y+, LVL 3359G\_Y+) および Reverse プライマー (LVL 3754A\_R-, LVL 3754D\_R-)を用いた。LCM ウイルス WE 株を感染させた VeroE6 細胞の培養上清を 10 倍階段希釈し, High Pure Viral RNA kit (Roche) を用いてウイルス RNA を抽出した。ランダムプライマー-p(dN)<sub>6</sub> を用いて逆転写した cDNA を合成し, それをテンプレートとした 2 step RT-PCR [Titan One Tube RT-PCR kit (Roche)]を整備した。反応条件は, 50°C30 分, 94 度 2 分, 45 サイクルの (94°C30 秒, 55°C30 秒, 68 度 1 分), 68°C7 分である。
  1. 組換え LCM ウイルスの NP に対する単クローン抗体の作製. Ac-LCMV-rNP 感染 Tn5 細胞では LCMV-rNP は効率よく発現された。6 クローンの抗 LCMV-rNP 抗体分泌ハイブリドーマ ( 25-2-E2-25 , 25-2-E5-27 , 24-2-E3-30 , 24-2-E3-31 , 24-1-E10-42, 24-1-E10-71) が樹立された。これらの単クローン抗体は ELISA 法や蛍光抗体法によっても, LCM ウイルスの NP と結合することが確認された。
  2. ウイルス抗原検出. LCMV-NP に対する単クローン抗体を用いた抗原検出 ELISA では, LCM ウイルス Armstrong 株及び WE 株ともに高感度に検出された。プラークアッセイ法によりウイルス感染価との比較をしたところ, 約  $1 \times 10^5$  PFU/ml のウイルス量を要することが明らかにされた (図 1)。LCMV-NP に対する単クローン抗体を用いて, 感染細胞中のウイルス抗原は, 間接蛍光抗体法により特異的に検出された (図 2)。
  3. 単クローン抗体の認識するエピトープ解析. 単クローン抗体の認識するエピトープを各種 GST 融合トランケート LCMV-NP との反応性解析して明らかにした。6 クローンの単クローン抗体の反応パターンは 2 グループに分類された。すなわち, アミノ酸領域 335-433 と 423-558 の重複部分のアミノ酸 423-433 に反応する 2 クローン (25-2-E2-25, 25-2-E5-27) とアミノ酸領域 335-433 に反応する 4 クローン ( 24-2-E3-30 , 24-2-E3-31 , 24-1-E10-42, 24-1-E10-71) に分類された (図 3)。

### C. 研究結果

4. ウイルス遺伝子検出. Viethらが報告した旧世界アレナウイルス用プライマーを用いた RT-PCR 法により, LCM ウイルスを感染させた VeroE6 細胞の培養上清 ( $10^{6-7}$  PFU/ml)を one-step RT-PCR では  $10^5$  希釈(約 0.1 PFU 相当)まで, 2-step RT-PCR 法では  $10^7$  希釈(約 0.001 PFU 相当)までと, 高感度にウイルス遺伝子が検出されることが確認された(図4).

#### D. 考察

アレナウイルスの NP はウイルス粒子の構造蛋白であるが, ウイルス感染細胞や持続感染細胞にも最も多く含まれるウイルスタンパク質である. 本研究で作製された単クローン抗体が高感度かつ特異的に LCM ウイルス NP に結合し, 抗原検出 ELISA 法や病理組織中のウイルス抗原検出においても有用であることが確認された.

LCM ウイルスはアレナウイルス科アレナウイルス属に分類され, ラッサウイルス(ヒトにウイルス性の出血熱であるラッサ熱を引き起こす)などととも旧世界アレナウイルスグループに分類される. アレナウイルスは RNA ウイルスで遺伝子変異が非常に多く, RT-PCR で検出できない株が容易に出現し, LCM ウイルス株間のユニバーサルなプライマーの設計が困難であると考えられていた. しかし, Vieth ら報告(2007)の旧世界アレナウイルスを検出できる mix 塩基を含むプライマーセットが用いられた RT-PCR 法により LCM ウイルス(Armstrong 株と WE 株)の遺伝子が高感度に検出された. このプライマーセットが LCM ウイルス感染症の診断に有用であることが確認された. 臓器移植により

LCM ウイルスに感染したレシピエントの移植後 4-5 週間後の血漿や血清, 尿中のウイルス遺伝子が  $10^{5-7}$  copies/ml of RNA extract との報告があることから, この RT-PCR 法により感染早期に迅速に LCM ウイルス感染を診断が可能であると考えられる.

2003 年以降, LCM ウイルスに感染していたヒトがドナーとなり, そのドナーより臓器提供を受けたレシピエントが LCM ウイルスに感染し死亡するという事例が, アメリカで 3 例, オーストラリアで 1 例報告されている. 2006 年にはオーストラリアで, ヨーロッパを旅行し帰国 10 日後に脳出血で死亡した 57 歳男性ドナーより, 3 人のレシピエントが腎臓と肝臓を提供されたが, 臓器移植後に脳症を伴う熱性疾患を発症し 3 人全員が移植後 4~5 週間で死亡するという事例が報告されている. この事例ではドナーはフランスにおいて LCM ウイルスに感染したと考えられている.

わが国では, ヒトにおける LCM ウイルス感染の報告は今のところなく, 臨床医にとっても LCM ウイルス感染症は感染性疾患としてあまり認識されていない. しかし LCM ウイルスの自然宿主はげっ歯類で, 海外で LCM ウイルス感染動物との接触することにより感染する危険性がある. また国内では, 1990 年代に大阪港湾地域に生息するノネズミから LCM ウイルスが分離同定され, 横浜港に生息するノネズミでも抗体が検出されている. 海外でのヒトの LCM ウイルス感染源はペットとして飼育されているハムスターであることが多い. 実際, 米国での 2005 年の臓器移植 LCM ウイルスに感染し 4 名のレシピエントのうち 3 名が死亡した事例では,

ドナーの感染源はペットのハムスターであった。ハムスターなどのげっ歯類はわが国でもペットとして広く使用されているが、ペットの LCM ウイルス感染の検査などは行われていない。

本研究で開発された LCM ウイルス検出法が LCM ウイルス感染症に対する診断システムが臓器移植に由来する LCM ウイルス感染の早期診断のみならず治療法の開発やげっ歯類における感染状況の実態調査を通じた感染予防対策へも有用であると考えられる。

#### E. 結論

本研究では、LCM ウイルスの主要構造蛋白である核蛋白 (NP) の組換え蛋白を用いてウイルス抗体の検出、また LCM ウイルス NP 特異的抗体を作製し、その単クローン抗体を用いた抗原検出 ELISA 法およびウイルス遺伝子を検出する RT-PCR 法による LCM ウイルスの感染症の診断システムを確立した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Iizuka, I., Saijo, M., Shiota, T., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Ogawa, M., Nakauchi, M., Kurane, I., Mizuguchi, M., Morikawa, S.: Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for

monkeypox virus infections. *Journal of Medical Virology* 80:1102-1108, 2009

2) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Iizuka, I., Shiota, T., Sakai, K., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. *Journal of General Virology* 90:2266-2271, 2009

3) Nakauchi, M., Fukushi, S., Saijo, M., Mizutani, T., Ure, A.E., Romonowski, V., Kurane, I., Morikawa, S.: Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. *Clinical and Vaccine Immunology* 16:1132-1138, 2009

4) Saijo, M.: Emerging and re-emerging infection threats to society. *Journal of Disaster Research* 4:291-297, 2009

5) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I.: Diagnostic systems for viral hemorrhagic fevers and emerging viral infections prepared in the National Institute of Infectious Diseases. *Journal of Disaster Research* 4:315-321, 2009

6) Morimoto, K., Saijo, M.: Imported rabies cases and preparedness for rabies in Japan. *Journal of Disaster Research* 4:346-357, 2009

7) Yagi, T., Hattori, H., Ohira, M., Nakamichi, K., Takayama-Ito, M., Saijo, M., Shimizu, T., Ito, D., Takahashi, K., Suzuki, N.:

Progressive multifocal  
leukoencephalopathy developed in  
incomplete Heerfordt syndrome, a rare  
manifestation of sarcoidosis, without  
steroid therapy responding to cidofovir.  
Clinical Neurology and Neurosurgery  
12:153-156, 2010

## 2.学会発表

- 1) 塩田智之, 森川茂, 飯塚愛恵, 倉根一郎, 西條政幸: 293T細胞を用いたHSV-1組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用. 第19回日本抗ウイルス療法研究会, 東京(2009.6)
- 2) Bukbuk, D.N., Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., George, A., Shuetsu, F., Mizutani, T., Kurata, T., Kurane, I., Morkawa, S.: Recombinant nucleocapsid protein-based diagnosis of and seroepidemiological study on Lassa fever. The 109th ASM General Meeting, Philadelphia, PA (2009.05)
- 3) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Iizuka, I., Shiota, T., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Pathology of monkeypox in nonhuman primates leading to the difference in virulence between Gongo Basin and West African strains. 43rd Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program and Special Minisymposium on enterovirus 71, Philadelphia, PA (2009.07)
- 4) 西條政幸, 網至康, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 新村靖彦, 横手公幸, 飯塚愛恵, 塩田智之, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂. 痘そうワクチン LC16m8およびLister株免疫時におけるIMVおよびEEV蛋白に対する抗体応答とサル痘予防効果. 第13回日本ワクチン学会学術総会, 札幌(2009.09)
- 5) 中道一生, 伊藤陸代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 脳脊髄液中のJCポリオマウイルスを検出するためのリアルタイムPCR検査系の確立と進行性多巣性白質脳症(PML)の診断支援. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 6) 酒井宏治, 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 松井珠乃, 網康至, 平井理香, 須崎百合子, 水谷哲也, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 藤本嗣人, 山田靖子, 岡部信彦, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 森川茂. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 7) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. SARS-CoV感染動物における宿主Th1/Th2バランスと重症化の関連. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 8) 塩田智之, 飯塚愛恵, 森川茂, 倉根一郎, 水口雅, 西條政幸. 293T細胞を用いた単純ヘルペスウイルスならびに水痘帯状疱疹ウイルス組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京(2009.10)
- 9) 森川茂, 福士秀悦, 酒井宏治, 永田典代, 長谷川秀樹, 松井珠乃, 水谷哲也, 平井理香, 網康至, 緒方もも子, 西條政幸,

- 山田靖子, 岡部信彦, 佐多徹太郎, 倉根一郎. カニクイザルの致死性的イヌジステンパーウイルス感染事例の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 10) 飯塚愛恵, 塩田智之, 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 水口雅, 森川茂. 痘そうワクチンLC16m8株の温度感受性に関する解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 11) 水谷哲也, 前田健, 渡辺俊平, 久和茂, 吉川泰弘, 明石博臣, 中内美名, 酒井宏治, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. ウイルスの網羅的検出法(RDV法ver 3.1)を用いたコウモリ由来新規 $\beta$ ヘルペスウイルスの同定第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 12) 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, Austin Ure, Victor Romanowski, 森川茂. 南米出血熱の実験室診断法の開発. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 13) 中道一生, 伊藤陸代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 定位微量投与系を用いたマウスポリオーマウイルスの脳における持続感染様式の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 14) 岩田奈織子, 永田典代, 辻隆裕, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 横田恭子, 水谷哲也, 西條政幸, 森川茂, 佐多徹太郎. SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの免疫効果と副作用について. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 15) 佐山勇輔, 福士秀悦, 斎藤麻理子, 飯塚愛恵, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 鈴木陽, 神垣太郎, 玉記雷太, 倉根一郎, 押谷仁, 森川茂. フィリピンのレストンエボラウイルス感染症のウイルス遺伝子解析と感染状況の実態調査. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 16) 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 塩田智之, 飯塚愛恵, 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 佐多徹太郎, 倉田毅, 森川茂. コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルスの臓器親和性と病原性. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 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

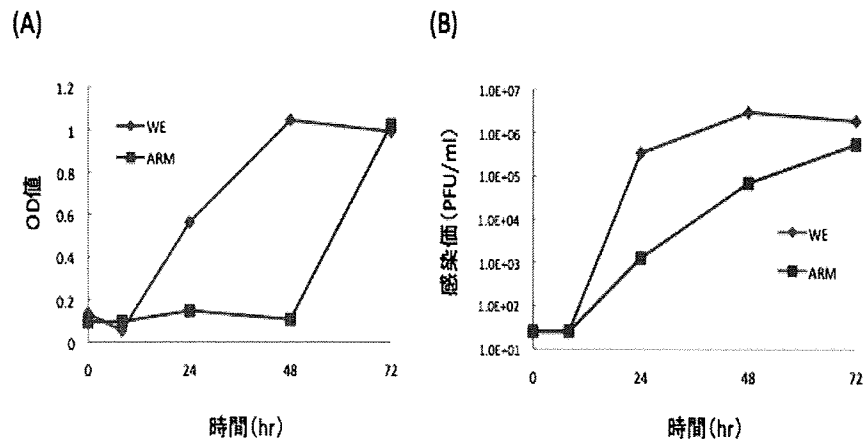


図 1. Vero 細胞に LCM ウイルス WE 株または Armstrong 株を感染させた後の培養上清をサンプルとして LCM ウイルス抗原検出 ELISA における OD 値 (A) と感染価 (B).

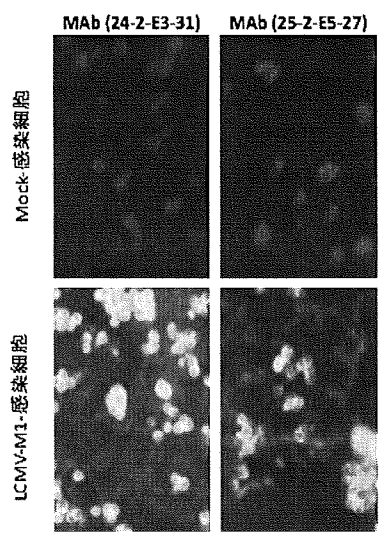


図 2. 単クローン抗体 24-2-E3-31 および 25-2-E5-27 を用いた間接蛍光抗体法による LCM ウイルス抗原の検出.



	MAb	
	Group A (25,27)	Group B (30, 31, 42, 71)
LCMV-rNP1-2 (1-166 aa)	-	-
LCMV-rNP1-3 (1-256 aa)	-	-
LCMV-rNP1-4 (1-343 aa)	-	-
LCMV-rNP1-5 (1-433 aa)	+	+
LCMV-rNP1-6 (1-558 aa)	+	+
LCMV-rNP2-6 (71-558 aa)	+	+
LCMV-rNP3-6 (157-558 aa)	+	+
LCMV-rNP4-6 (247-558 aa)	+	+
LCMV-rNP5-6 (335-558 aa)	+	+
LCMV-rNP1 (1-80 aa)	-	-
LCMV-rNP2 (71-166 aa)	-	-
LCMV-rNP3 (157-256aa)	-	-
LCMV-rNP4 (247-343 aa)	-	-
LCMV-rNP5 (335-433aa)	+	+
LCMV-rNP6 (423-558aa)	+	-

図3. 単クローン抗体(24-2-E3-31 および 25-2-E5-27)のLCMウイルスの核蛋白に対するWestern Blotting 法における反応性

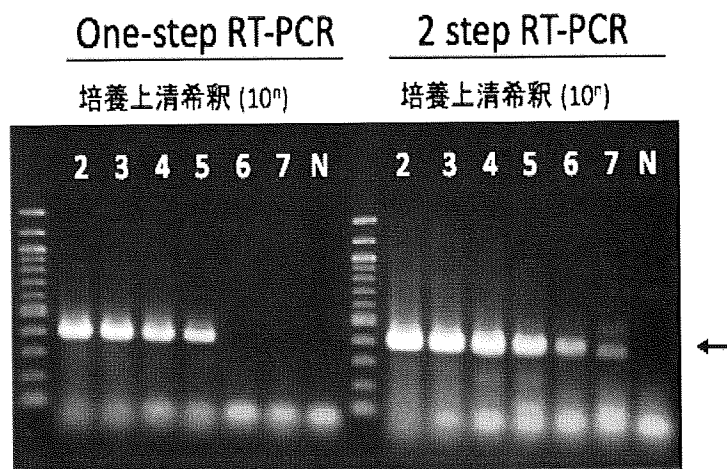


図4. Viethらが報告した旧世界アレナウイルス用プライマーを用いたLCMウイルス遺伝子検出.

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)  
研究分担者研究報告書

臓器移植患者の予後および QOL の向上のための真菌やウイルス感染症の  
予防・診断・治療に関する研究(H21-新興-一般-009)

感染初期過程を阻害する新規抗ヘルペスウイルス化合物の  
作用点解析と個体レベルでの評価

研究分担者 井上 直樹 国立感染症研究所ウイルス第1部 室長

**研究要旨** サイトメガロウイルス(CMV)及び水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の感染初期過程を阻害する新規抗ウイルス薬の開発を目的として、ランダム化合物ライブラリーのスクリーニングで同定された化合物のいくつかについて、その作用機序を解析した。また、GFP 発現組換えマウスサイトメガロウイルス(MCMV-GFP)を用いた *in vivo* imaging 法を確立し、ガンシクロビルをモデルとして個体における化合物の簡便な評価法として有用であることを示した。さらに、この評価法において、スクリーニングで同定した化合物 DPPC が一定の効果を示した。

#### A. 研究目的

現在用いられている、ないしは FDA により認可されている抗ヘルペスウイルス薬は、サイトメガロウイルス(CMV)の前初期蛋白 IE2 に対するアンチセンス RNA であるフォミビルセンを除き、DNA 複製を阻害する核酸基質アナログである。これらの核酸基質アナログの抗ウイルス薬は有効であるが、耐性株の出現、副作用、投与方法などのため使用上の制約があり、作用機序の異なる新規薬剤の開発が求められている。特に、臓器移植においては CMV 感染症を防ぐために核酸基質アナログであるガンシクロビル(GCV)が用いられているが、骨髄機能抑制の副作用により好中球減少が生じ、結果として細菌・真菌などの日和見感染症を増悪化させるため、生存率など移植全体としてみた場合には、決して満足できる結果をもたらさない。さらに、欧米では移植時の CMV 感染症の予防の観点から、移植当初から GCV 投与を行なう方策がとられており、このことは耐性株の出現頻度を高める結果に繋がる可能性をもっている。

新規抗ヘルペスウイルス薬の検索や耐性株の検出には、依然として感染性ウイルス力価を計測する生物学的方法が有効であるが、増殖の遅い CMV 及び水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)では、時

間と労力がかかりすぎ、迅速な対応が求められる耐性株検出やマススクリーニングが伴う新規薬剤の検索には困難が生じている。このため、耐性株の検出については、耐性が予想される変異を遺伝子レベルで同定する方法が普及しつつある。しかし、すべての耐性変異に対応することは現実的ではない。

欧米などで開発が進められている新規薬剤は、カプシド蛋白の成熟過程やゲノムのパッケージング過程に対する阻害剤などである。その中で有望視され、第 3 相臨床試験まで進んだマリバビルも十分な効果が得られず頓挫し、現在、有力な新規抗 CMV 候補薬がない状況にある。

我々は、ウイルス前初期蛋白により活性化される初期遺伝子プロモーターを利用し、酵素反応による化学発光を指標として容易に力価を測定できるレポーター細胞株を CMV 及び VZV についてそれぞれ樹立し、これらのレポーター細胞株を用いて CMV 及び VZV の感染初期過程を阻害する抗ウイルス薬の検索をこれまで行ってきた。本研究では、これらのスクリーニングで同定された化合物について、その抗ウイルス活性の程度を決定するとともに作用機序を明らかにする。さらに、こうした

新規化合物を少数の動物を用いて迅速に評価できる系を構築する。

## B. 研究方法

### 1. ウイルス株及び細胞株

MeWo 細胞(ATCC より購入)及びヒト 2 倍体細胞 HLF(human lung fibroblast: CDC 組織培養施設より分与)は, 10%牛胎児血清(FBS)添加 Dulbecco's MEM(DMEM)培地にて培養した. VZV P-Oka 株(基盤研山西博士より分与)を MeWo 細胞ないしは HLF 細胞で培養した. 我々が樹立した VZV レポーター細胞 MV9G は, 100  $\mu$ g/ml G418 及び 10%FBS 添加 DMEM にて培養した. マウス CMV(MCMV)(浜松医大筒井博士より分与)は, 10%FBS 添加 DMEM を用いて NIH3T3 細胞で増殖させた. EGFP 発現 MCMV 及び DsRed2 発現 MCMV は, 相同組換え法により m128 遺伝子領域に MCMVe1 プロモーターに制御される EGFP もしくは DsRed 発現カセットを導入することにより構築された(浜松医大小杉博士より分与).

### 2. プラーク形成阻害アッセイ

12 穴プレートにまき込んだ線維芽細胞に 50-100PFU/穴でウイルスを接種し 1-2 時間培養後, 接種液を除き, 2 倍階段希釈した薬剤, 1%メチルセルロース, 4%FBS を含む MEM 培地で培養した(VZV 7-8 日, MCMV 4-5 日). 2% crystal violet を含む 10%フォルマリンで固定染色後プラーク数を実顕微鏡下で測定し, 薬剤によるプラーク形成阻害率を薬剤濃度に対する linear regression 法にて解析し EC50 を求めた.

### 3. 細胞毒性アッセイ

生存細胞が産生する ATP 量に基づいて生存細胞数を測定するアッセイ(CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega)を用いて, 薬剤の細胞毒性を測定した.

### 4. 蛍光抗体法

アセトン固定した感染細胞を希釈した抗 VZV IE62 モノクローナル抗体(Chemicon)と 1 時間反応させ, PBS 洗浄後, さらに, FITC 標識抗マウス抗

体と反応後蛍光反応の観察を行った.

### 5. リアルタイム PCR 及び RT-PCR

感染細胞からの DNA 及び RNA サンプルの精製は, 市販キット(キアゲン QIAamp DNA minikit, RNeasy Plus mini kit)をそれぞれ用いた.

リアルタイム PCR には, 市販キット(Applied Biosciences, TaqMan Universal PCR Master Mix)を用いた. HSV1 及び VZV のゲノムコピー数の測定は, gB 及び IE62 遺伝子をそれぞれ標的とした. 細胞当たりのコピー数を求めるために, ヒトアルブミン遺伝子のコピー数を測定した(Gault et al., 2001).

リアルタイム RT-PCR には, 市販キット(Applied Biosciences, One-step RT-PCR Master Mix)を用いた.

### 6. マウス感染実験と in vivo imaging

組換えMCMV感染マウスを2%イソフルランで吸入麻酔し, うつ伏せにし, BALB/cの場合には体毛による蛍光を避けるためバリカンで除毛後, 撮影を行う. 蛍光シグナルはCambridge Research & Instrumentation社製のin vivo imaging装置 Maestroを用いて検出した. この装置は, 液体結晶フィルター, 励起フィルター, 照射装置, CCD検出装置からなる. データ収集条件は, binning (resolution) factor が2 でapertureは1.25 f/stopとした. 取り込んだ蛍光データは人為的な色変換をおこない, グレースケールの個体のイメージを重ね合わせた. シグナル強度は, Meta Imaging Software version 6.1 (Molecular Device) を用いて単位面積当りの蛍光量として測定した.

### 7. 病理染色

皮膚組織は10%フォルマリンを含む緩衝液で固定後, パラフィン包埋切片を調製し, HE染色した. また, 免疫組織染色は, 1次抗体としてラット抗 MCMV ie1及びie3抗体(Ishiwata et al., 2006; 浜松医大小杉博士より分与)を, 2次及び3次抗体としてビオチン化ウサギ抗ラットF(ab')<sub>2</sub>抗体とペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いて行った. DABにより染色した.

(倫理面への配慮)

動物実験は、実験動物委員会の承認を得て、動物愛護の精神のもとに適切に行った。組換え DNA 実験は、大臣確認申請に対する承認を得ることを含め、法に基づき適切に行った。

## C. 研究結果

### 1. 抗 VZV 化合物の作用機序

#### 1) HSV に対する抗ウイルス活性

スクリーニングにより同定された抗 VZV 化合物について、VZV に加え HSV1 に対する抗ウイルス活性を、感染細胞中のウイルス DNA をリアルタイム PCR で定量することで検討した。表1に示すように、同じアルファヘルペスであっても各化合物の抗 HSV 活性には違いがあった。

#### 2) 50%VZV 増殖阻害濃度の決定

表1に示した中で、133G4 は抗 VZV と抗 CMV 活性があり、前初期蛋白による遺伝子活性化を阻害するユニークな化合物であることをすでに明らかにしている。そこで、次に抗 VZV 活性が強いと思われる 141B3 と 35B2 の2つの化合物について 50%阻害濃度(EC50)をプラーク減少法により決定した。その結果、アシクロビルの EC50 が 8.9 $\mu$ M (2 $\mu$ g/ml)の条件下で、それぞれ EC50 が 0.32 $\mu$ M 及び 0.80 $\mu$ M であった。また、50%細胞毒性濃度(CC50)は、ともに 80 $\mu$ M 以上であり、選択係数 SI は 100 以上であった。

#### 3)作用機序の解析

VZV DNA の感染後の細胞内量を経時的に解析した結果から、141B3 と 35B2 の2つの化合物は、DNA 複製もしくはそれ以前の過程を阻害することが明らかとなった。ともに初期遺伝子の転写発現を阻害する一方、35B2 のみが前初期遺伝子 ORF62 の転写発現を阻害した。従って、141B3 は前初期遺伝子発現以前を、35B2 は IE62 蛋白の翻訳後修飾や DNA 複製などを阻害している可能性が示された。

### 2. 個体における抗 CMV 活性の迅速評価法の確

立

#### 1) 組換え MCMV の培養細胞における増殖性

GFP 発現組換え MCMV を個体での抗ウイルス活性評価に用いるにあたり、その増殖能が親株の Smith と同様であることを一段増殖実験により細胞レベルで確認した。産生された細胞外及び細胞内ウイルス量を感染力価として測定したところ、親株及び組換え株間で差を認めなかった。また、組換え MCMV の GCV 及び DPPC に対する感受性は、親株と変わらなかった。

#### 2) HR1 マウスを用いた in vivo imaging の検討

CBA マウス由来で、免疫学的には正常だが遺伝的欠損により体毛が発達しない HR1 マウス 5 匹を用い、組換え MCMV に PFU を皮下接種後、経時的にシグナル検出を行った。その結果、図 1 に示すように、2-3 日をピークとして、ウイルス感染を GFP 蛍光シグナルとして検出可能であること、個体間での差がそれほど大きくないことが明らかになった。しかしながら、MCMV-GFP を  $1 \times 10^6$  PFU から 10 倍階段希釈し接種し検出限界を検討したところ、 $1 \times 10^4$  PFU からしか蛍光を検出できず、 $1 \times 10^6$  PFU との間の接種量でも定量性は見られなかった。CBA マウスは MCMV 抵抗性であることが知られていることから、感受性であることが知られる BALB/c マウスを次に検討した。

#### 3) BALB/c マウスを用いた in vivo imaging の検討

図 2A に示すように、接種後4日かかるものの 100PFU でも蛍光が検出された。蛍光が検出されるまでの日数とウイルス接種量に一定の相関がみられた。蛍光が観察される期間の蛍光量を積算した陽性曲線下面積(AUC)を求めると、接種したウイルス量との間に良好な相関が認められた(図 2B)。

#### 4) EGFP と DsRed2 組換え MCMV の比較

一般的には、長波長の蛍光の方が体内組織による吸収が少ないため、in vivo imaging に適するとされるので、同一の骨格で唯一発現する蛍光蛋白が DsRed2 である MCMV-DsRed2 との比較を行ったところ、DsRed2 では蛍光が観察されるまでの日