

Silberstein I, Behar-Novat E, Nakagomi O, Shulman LM. Identification by Full Genome Analysis of a Bovine Rotavirus Transmitted Directly to, and Causing Diarrhea in a Human Child. *J Clin Microbiol* 51(1): 182-189, 2013

6) 中込とよ子, 中込 治: ロタウイルス感染症とロタウイルスワクチン. *メディカル・テクノロジー* 40(9):1005-1008, 2012

## 2. 学会発表

1) Nakagomi T, Doan YH, Dove W, Iturriza-Gomara M, Ngwera B, Nakagomi O, Cunliffe N. Full-genome analysis of G8 rotavirus strains in Malawi over a 10-year-period. The 11th International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses. Puerto Rico, USA. November 27 - December 1, 2012.

2) Nakagomi O, Do LP, Doan YH, Nakagomi T. Genotype G2 strains in Japan in the global and evolutionary context. The 10th International Rotavirus Symposium. Bangkok, Thailand. September 19-21, 2012.

3) Doan YH, Nakagomi T, Aboudy Y, Silberstein I, Behar-Novat E, Nakagomi O, Shulman LM. Identification by full genome

analysis of a bovine rotavirus transmitted directly to, and causing diarrhea in a human child. The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and the 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium. Nagasaki, Japan. December 10-12, 2012.

4) Nakagomi O. Molecular epidemiology of gastroenteritis viruses from the global perspective. The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and the 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium. Nagasaki, Japan. December 10-12, 2012.

5) 木下さやか, 中込とよ子, 中込 治. 秋田県由利地区における過去 10 年間のロタウイルス胃腸炎入院発生率の変動. 第 53 回日本臨床ウイルス学会, 豊中市. 平成 24 年 6 月 16-17 日

6) 中込 治, 中込 とよ子. ネパールで急激に増加した GII.13 ノロウイルス株の分子基盤. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 平成 24 年 11 月 13 日-15 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ウイルス性下痢症の疫学、ワクチンと疾病負担に関する研究

小児の急性胃腸炎の原因としてのノロウイルスの分子疫学：  
ゲノグループ、ゲノタイプ GII.4 変異株の世界的分布

研究代表者 中込 治 (長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座・教授)

研究要旨

ノロウイルスはロタウイルスに次ぐ小児の急性下痢症の原因ウイルスである。ロタウイルスに関しては、世界保健機関がワクチン定期接種への導入を勧奨しているため、今後、ロタウイルスの減少に応じ、ノロウイルスの相対頻度が増加することが予想される。しかし、小児の散発性下痢症におけるノロウイルスの地球規模での遺伝子型頻度に関しては報告がない。本研究は、このようなノロウイルスに関する基盤情報を確立することによって、ウイルス性下痢症対策に資することを目的に行った。ノロウイルスの遺伝子群、遺伝子型頻度の調査は、2004年～2012年に発表された小児の急性散発性急性胃腸炎の原因としてのノロウイルスが記載されている文献のシステマティックレビューにより行った。とくに、ノロウイルスの遺伝子型頻度については2010年に再定義された分類に統一するため、それぞれの論文で報告されているウイルス株について、DNAデータベースにさかのぼり、ダウンロードした塩基配列を独自に再解析した上で評価した。小児の散発性胃腸炎の原因となるノロウイルスの96%は遺伝子群GII型であり、そのうちGII.4型がカプシド領域で70%、ポリメラーゼ領域で60%を占める主要な型であった。ポリメラーゼ領域とカプシド領域の境界で起こったリコンビナントはノロウイルスの実に26%であったが、GII.4型では、ほとんどが非リコンビナント株であった。本研究により、アジアの発展途上国で重要性を増しているノロウイルスに対するワクチン開発に際し、GII.4型と、それに次ぐGII.3型を候補とすることが適切であることが示された。本研究はノロウイルスの遺伝子型の世界における分布を初めて示したものであり、ノロウイルス研究における重要な研究基盤情報である。

A. 研究目的

ノロウイルスはカリシウイルス科に所属するプラス鎖1本鎖RNAウイルスであり、ゲノムが非常に大きな多様性を示すことが知られている(図1)。また、ノロウイルスは世界各地で急性胃腸炎の原因として医学上重要なウイルスである。ノロウイルス胃腸炎は疫学的にみると以下の4つの類型に分けられる。(1)食中毒を

含め、主として成人における急性胃腸炎の集団発生。(2)医療関連施設における主として高齢者の急性胃腸炎の集団発生。(3)乳幼児における散発性急性胃腸炎。(4)成人における散発性急性胃腸炎。このうち(3)の乳幼児の散発性急性胃腸炎の原因としてはロタウイルスが最も重要なものとされ、二つのワクチンが開発され世界中でその予防に使用されるよう

になった。

ノロウイルスは近年ロタウイルスに次いで重要なことが明らかにされてきたが、健康成人における集団発生例とは異なり、どのような遺伝子型のウイルスが病気の原因になっているかということについての全体像は全く不明の現状である。

そこで本研究ではノロウイルスの遺伝子解析が広く行われるようになった 2004 年以降の

研究論文を対象にシステマティックレビューを行うことにより、小児における散发性急性胃腸炎の遺伝子群(ゲノグループ)、遺伝子型(ゲノタイプ)の世界における分布の全体像を明らかにし、今後の疫学研究、とくにワクチンによる予防戦略策定の基盤とすることを目的とした。

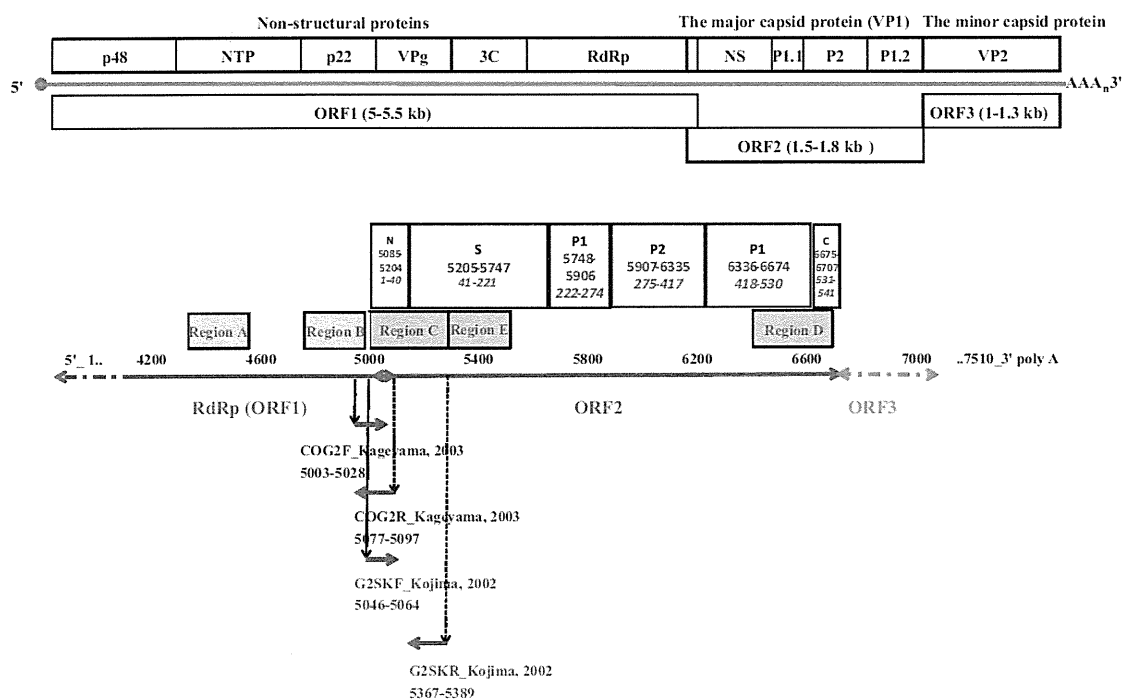


図 1. ノロウイルスのゲノムの構成と臨床検体からのノロウイルス検出に使われるゲノムの領域 (Region A～Region D)。

## B. 研究方法

2004 年～2012 年に発表された文献のシステマティックレビューは、「胃腸炎およびノロウイルス」、「genogroup, genotype, GII.4 variants」をキーワードとして、PubMed および Google Scholar を用いて検索し、非英語論文は除外した上で、次の基準を満たした研究論文を解析対象にした。(1)12 ヶ月以上の期間に渡る研究。(2)18 歳以下の小児における散

発性胃腸炎の研究。(3)2004 年～2012 年に発表された研究。ノロウイルスのゲノタイプについては 2010 年に再定義された分類に統一するため、それぞれの論文で報告されているウイルス株について、DNA データベースにさかのぼり、ダウンロードした塩基配列を独自に再解析した上で評価した。

(倫理面への配慮)

本研究はデータベース上に公開されている既存の文献情報をシステマティックに解析したものであるため、該当しない。

### C. 研究結果

ノロウイルスには GI と GII の2つのゲノグループがあるが、小児の散発性胃腸炎の原因としての GII が 96%と主体を占めた。このうち、GII.4 はカプシド領域のゲノタイプ約 70%及びポリメラーゼ領域のゲノタイプ約 60%を占める最も重要なゲノタイプであった。GII.4 に次ぐゲノタイプはカプシド領域では GII.3(16%)、ポリメラーゼ領域では GII.5(14%)であった(図2)。

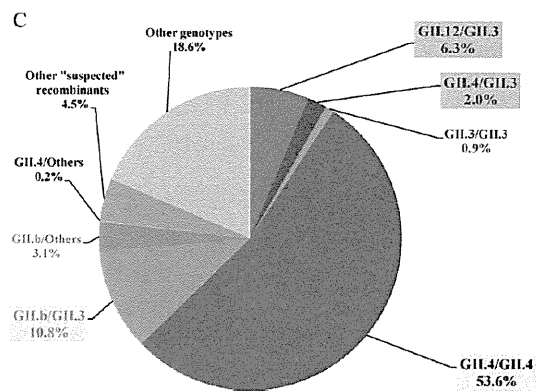
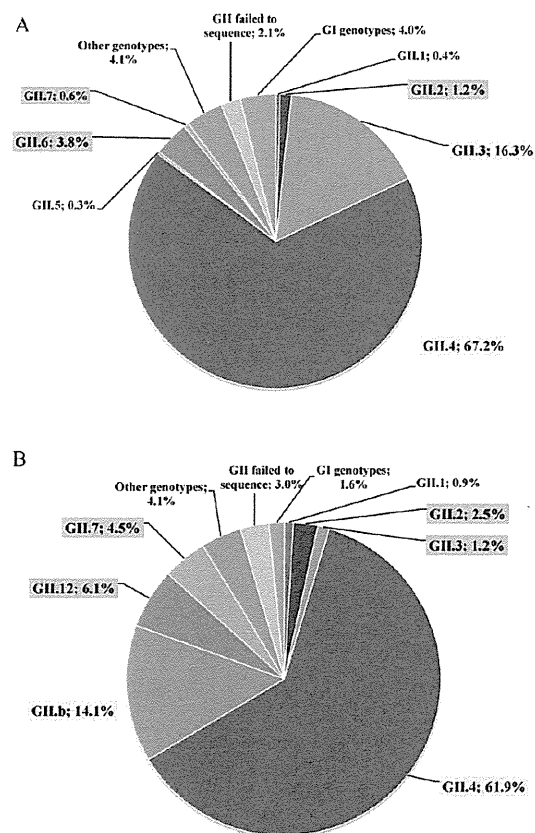


図2. 地球規模でのノロウイルスのゲノタイプの相対頻度。A:カプシド領域のゲノタイプの相対出現頻度, B:ポリメラーゼ領域のゲノタイプの相対出現頻度, C: ポリメラーゼ領域/カプシド領域のゲノタイプの組合せの相対出現頻度

また、ノロウイルスはポリメラーゼ領域を含む ORF1 領域とカプシドタンパク質をコードする OR2 との接続領域でリコンビネーションを起こすことが知られているが、その頻度が 26%に及んでいることがわかった。リコンビナントの構成は、ポリメラーゼ領域が GII.6, GII.12 あるいは GII.4 をもつものと、カプシドゲノタイプが GII.3 のノロウイルスであることが示された(図3)。

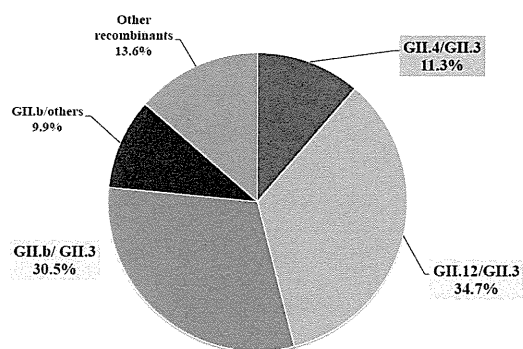


図3. ORF1 領域と OR2 との接続領域で起こったリコンビナントのゲノタイプの構成の相対頻度。

最も重要なカプシドおよびポリメラーゼ領域のゲノタイプである GII.4 をもつノロウイルスは、ほとんどが非リコンビナント株であったが、カプシド領域に次々と変異を生じ、GII.4/2002、GII.4/2004、GII.4/2006b、および GII.4/2008 などの変異株が 2~3 年おきに大流行を起こしながら出現し、なかでも GII.4/2006b は今日に至るまで大きな流行を起こしている、きわめてヒト集団に馴化した株であることが分かった(図 4,表 1)。

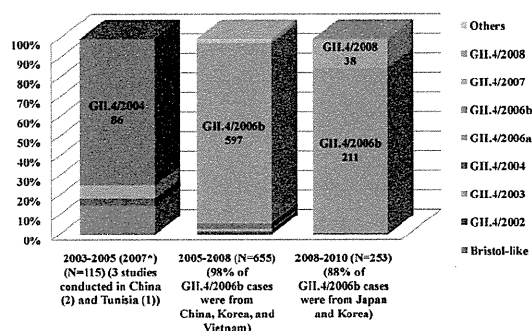


図 4. GII.4 変異株の相対出現頻度

表 1. ノロウイルス GII.4 変異株の分類、出現時期、出現地域

Name of variants (NoroNet.RIVM)	Other commonly used name(s)	Periods (bold letters: prevalent years)	Locations <sup>a</sup>	Notes
Camberwell	CHDC2094	1974	USA	Prototype (Ref: 126)
Bristol	Camberwell, MD145-12	1987-1994	AUS, USA	Sporadic (before the pandemic era)
1996	Lordsdale, Bristol	1987-1995-2003	UK, USA, FIN, FRA, JP, CHN	Sporadic (before the pandemic era)
2001	US95/96; Grimsby	1995-1997-2002	Worldwide	The first pandemic variant
2002CN	Emmen; Kaiso; 2001 Japan	2000-2002	NEL, JP	Minor
2002	Lanzhou, Houston, 2001 Henry	2000-2002	CHN, USA	Minor
2002	Farmington Hills	2001-2002-2004-2008	Worldwide	Pandemic
2003	Sakai; 2005; 2003 Asia	2001-2004-2005-2007	HK, CHN, JP, THA, VN, USA	Pandemic-mostly in Asia
2004	Hunter	2003-2004-2006-2007	Worldwide	Pandemic
2006a	Yerseke; Laurens; V4	2006-2007-2008	Worldwide	Pandemic
2006b	Minerva, Den Haag	2005-2006-2009-2010	Worldwide	Pandemic (the most successful variant)
2007	Cairo; Osaka 2007; 2007a	2005-2007-2008-2009	Worldwide	Minor
2008	Apeldoorn	2008-2009	S AF, AUS, BEL, GER, JP, KOR	Emergent with pandemic potential
2010	New Orleans	2008-2009-2010	USA, FRA, HUN, BEL, AUS, KOR, HK, JP	Emergent with pandemic potential

<sup>a</sup> AUS, Australia; BEL, Belgium; CHN, China; FIN, Finland; FRA, France; GER, Germany; HK, Hong Kong; HUN, Hungary; JP, Japan; KOR, Korea; NEL, The Netherlands; SAF, South Africa; THA, Thailand; USA, The United States of America; VN, Vietnam.

#### D. 考察

ノロウイルスは RNA ウィルスであり、RNA ウィルスの特徴としてゲノムが非常に大きな変異性をもっている。また細胞培養での分離や実験動物に感染せず、生物学的性状が明らかにできないという問題を抱えてきた。そこでノロウイルスの分類は最もよく保存されていると推定された RNA ポリメラーゼ領域の型別によって行われてきた(Region A, 図1)。一方、ゲノムの解明が進むにつれカプシド領域を使った型別も、ウィルスの抗原性を反映すると推定されることから広く行われるようになった。1 本鎖の RNA であるためゲノムのどこをとって型別をしても同じ結果が出るのが一般的であれば問題は無いが、ノロウイルスにはリコンビネーションが4分の1の臨床検出株に起こっていること

が本研究により示された。そこで本研究では既存の論文について、詳細に分析し、ゲノムのどの部分を解析し、どのような型別を行っているかを明確にした上で、ノロウイルスのゲノタイプ分布の現状を明らかにした。また、あいまいである現状に対して、カプシドゲノタイプとポリメラーゼゲノタイプの 2 つを明確に区別して表記するよう提案した。

さらに、ロタウイルスワクチンの普及により小児の重症下痢症が減少することが期待され、ノロウイルスの小児期における重症下痢症の原因としての相対的役割が増大すると想定される。従って、ノロウイルスに対する防御免疫の形成の上から重要と思われるカプシドゲノタイプの上からすると GII.4 と GII.3 が 3/4 以上を占めることを明らかにした意義は大きい。すな

わちワクチンを開発するとすれば、これら 2 つのゲノタイプによる感染を予防できるワクチンを開発すべきであると提案する。

#### E. 結論

本研究は小児期の散発性胃腸炎の原因となるノロウイルスのゲノタイプの世界における分布の現状を世界で初めて示したものであり、ノロウイルス研究における重要な研究基盤情報を提供するものである。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) Doan YH, Nakagomi T, Nakagomi O.

Repeated circulation over 6 years of intergenogroup mono-reassortant G2P[4] rotavirus strains with genotype N1 of the NSP2 gene. *Infect Genet Evol* 12(6):1202-1212, 2012

###### 2) Nakagomi T, Nakagomi O, Dove W, Doan YH, Witte D, Ngwira B, Todd S, Duncan Steele A, Neuzil KM, Cunliffe NA: Molecular characterization of rotavirus strains detected during a clinical trial of a human rotavirus vaccine in Blantyre, Malawi. *Vaccine* 30 Suppl 1: A140-151, 2012

###### 3) Noguchi A, Nakagomi T, Kimura S, Takahashi Y, Matsuno K, Koizumi H, Watanabe A, Noguchi H, Ito T, Ohtsuka M, Uemura N, Takeda O, Komatsu A, Kikuchi W, Komatsu M, Fukaya H, Miura S, Toda H, Nakagomi O, Takahashi T: Incidence of intussusception as studied from a hospital-based retrospective survey over a 10-year period (2001-2010) in Akita Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 65(4): 301-305, 2012

###### 4) Matthijnsens J, Nakagomi O, Kirkwood CD, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M. Group A rotavirus universal mass vaccination: how and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes? *Expert Rev Vaccines* 11(11):1347-54, 2012

###### 5) Doan YH, Nakagomi T, Aboudy Y, Silberstein I, Behar-Novat E, Nakagomi O, Shulman LM. Identification by Full Genome Analysis of a Bovine Rotavirus Transmitted Directly to, and Causing Diarrhea in a Human Child. *J Clin Microbiol* 51(1): 182-189, 2013

###### 6) 中込とよ子, 中込 治: ロタウイルス感染症とロタウイルスワクチン. *メディカル・テクノロジー* 40(9):1005-1008, 2012

##### 2. 学会発表

###### 1) Nakagomi T, Doan YH, Dove W, Iturriza-Gomara M, Ngwera B, Nakagomi O, Cunliffe N. Full-genome analysis of G8 rotavirus strains in Malawi over a 10-year-period. The 11th International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses. Puerto Rico, USA. November 27 - December 1, 2012.

###### 2) Nakagomi O, Do LP, Doan YH, Nakagomi T. Genotype G2 strains in Japan in the global and evolutionary context. The 10th International Rotavirus Symposium. Bangkok, Thailand. September 19-21, 2012.

###### 3) Doan YH, Nakagomi T, Aboudy Y, Silberstein I, Behar-Novat E, Nakagomi O, Shulman LM. Identification by full genome analysis of a bovine rotavirus transmitted directly to, and causing diarrhea in a human

- child. The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and the 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium. Nagasaki, Japan. December 10-12, 2012.
- 4) Nakagomi O. Molecular epidemiology of gastroenteritis viruses from the global perspective. The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and the 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium. Nagasaki, Japan. December 10-12, 2012.
- 5) 木下さやか, 中込とよ子, 中込 治. 秋田県由利地区における過去 10 年間のロタウイルス胃腸炎入院発生率の変動. 第 53 回日本臨床ウイルス学会, 豊中市. 平成 24 年 6 月 16~17 日
- 6) 中込 治, 中込とよ子. ネパールで急激に増加した GII.13 ノロウイルス株の分子基盤. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 平成 24 年 11 月 13 日~15 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 狂犬病の病原性と治療法開発に関する研究

### 狂犬病ウイルス街上毒の N 型糖鎖と病原性との関連ならびに 侵淫国で利用可能な狂犬病迅速診断法の有用性評価

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

狂犬病は狂犬病ウイルスを原因とする致死性脳炎で、世界では毎年 55,000 人以上が死亡している公衆衛生上重要な人獣共通感染症の一つである。狂犬病の死亡率はほぼ 100%で、治療法は未だ確立されていない。治療法の確立のためには、狂犬病ウイルスの増殖機構や病原性発現機構を解明することが重要である。街上毒(野外流行株)である 1088 株を用いた解析では、これまでに G 蛋白質第 194 位への N 型糖鎖の追加が培養細胞での増殖性亢進とマウスにおける末梢感染時の病原性低下に関与していること明らかにした。今回、多くの固定毒(実験室馴化株)で認められる第 247 位への N 型糖鎖の追加を有する 1088 株変異株が得られ、その性状解析を行ったところ、培養細胞での増殖性亢進とマウスにおいて末梢感染時の病原性低下が認められた。しかし、その弱毒化は第 194 位への N 型糖鎖の追加の場合と異なり、宿主免疫系を強く誘導することによらないことが示唆され、その機構を解明することは狂犬病治療法の確立のための新たな手掛かりとなると考えられた。

一方、狂犬病の実験室内確定診断法は煩雑で時間とコストがかかるため、多くの流行国では負担となっており、それがために正確な発症数の把握や疾病対策に活かせていないことが多い。我々がこれまでに開発したイムノクロマト法を用いた、狂犬病ウイルスの抗原診断法(RICT法)と血清中のウイルス中和抗体価を測定する抗体診断法(RAPINA法)は、狂犬病の流行国でも安価で、簡便に利用でき、今後広くアジアやアフリカなどの狂犬病流行国で利用が進むことが期待された。

#### A. 研究目的

狂犬病ウイルスは通常、感染動物の咬傷を介して末梢組織に感染し、その後、中枢神経系に侵入してそこで増殖することにより致命的な脳炎を引き起こすが、その神経侵襲能や神経病原性発現機構、宿主からの免疫回避機構についてはまだ不明な点が多い。これらを明らかにすることは、不治の病である狂犬病の

治療法確立につながるものと考えられる。

昨年度までに、ウイルス G 蛋白質第 194 位への N 型糖鎖付加が、街上毒(野外流行株) 1088 株の培養神経系細胞における増殖性亢進とマウス末梢感染時の弱毒化に関与することを明らかにしたが(Yamada et al, Virus Res. 2012)、興味深いことに多くの街上毒の G 蛋白質には第 37 位および 319 位の 2 ヶ所にのみ N



型糖鎖付加部位が認められるが、実験室順化株である固定毒の G 蛋白質にはそれら 2 ヶ所に加えて、第 158 位、204 位もしくは 247 位に N 型糖鎖付加部位が認められる。最近、街上毒 G 蛋白質第 158 位、204 位もしくは 247 位に N 型糖鎖の追加も、培養細胞におけるウイルスの増殖性を亢進させることも明らかにした (Yamada et al, J. Gen. Virol., 2013)。しかし、固定毒で認められる N 型糖鎖付加部位が、病原性に関与しているかどうかは不明である。今回、G 蛋白質第 247 位に N 型糖鎖付加部位をもつ街上毒変異株が得られたので、その病原性について解析を行った。

一方、狂犬病の実験室内確定診断法は煩雑で時間とコストがかかるため、多くの流行国では負担となっており、それがために正確な発症数の把握や疾病対策に活かせないでいることが多い。これまでに我々はイムノクロマト法を利用した狂犬病ウイルスの迅速抗原診断法を開発した (Nishizono et al, Microbiol Immunol., 2008)。さらに不活化狂犬病ウイルスを用いた競合イムノクロマト法に基づく新たな中和抗体価の測定法 (Shiota et al., J Virol Methods., 2009) も開発した、この両診断法の有用性を広く狂犬病流行国であるアジアをフィールドに評価することも目的とした。

## B. 研究方法

狂犬病ウイルス街上毒には 1970 年代に米国でウッドチャックより分離された 1088 株を使用した。G 蛋白質第 247 位に N 型糖鎖が追加された 1088 株の D247N 変異株 (N5B#10-28 株および N5B#15 株) は 1088 株の NA 細胞での連続継代および限界希釈法によるクローニングを経て得られた。これら 3 株について細胞での増殖性やマウスにおける病原性等の性状解析および比較を行った。マウスを使用した実

験については大分大学の動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。

RICT 法は狂犬病ウイルス粒子中に最も多く含まれる N 蛋白質に対するモノクローナル抗体 (MAb) をテストストリップ上に塗布したもので、同じ MAb に金コロイド粒子を標識したものにウイルス抗原が結合すると、テストストリップのライン上で捕捉されバンドが確認されるもので、その検出感度は  $1.0-2.0 \times 10^3$  FFU/ml で RT-PCR 法によるウイルス核酸検出法の 1/10 程度の検出感度である。手技は至って簡単で図 5 に示す通りで、脳乳剤を調整すれば 15 分で結果が判定できる。この検出系を用いて、タイ、スリランカ、ブータンなどで捕獲され、標準法の免疫蛍光抗体法で狂犬病の確定診断がついた脳材料を用いて、その検出力を検討した。

一方 RAPINA 法はホルマリンで不活化した狂犬病ウイルス CVS 株を用いて、ウイルス中和活性を有する 2 種類の抗 G 蛋白質に対する MAb との競合法により血清中の中和抗体の検出を行うものである (図 6)。この RAPINA と RFFIT の一致率は 96-98% で非常に高い相関が得られている (Shiota et al., J Virol Methods., 2009)。この検出系を用いて、国内とタイでワクチン接種を受けたヒト (323 例) とイヌ (527 例) の血清を用いて、さらに大規模な評価を行った。また、この RAPINA 法では原血清を 8 倍に希釈し検討することで、中和抗体価を半定量的に比較することも可能であり、国際標準法のウイルス中和試験 (RFFIT 法) での中和抗体価が、0.5 未満、0.5~4.0、4.0 以上の 3 群間における RFFIT 法を基準にした RAPINA 法と既に市販されている ELISA 法との診断一致率の比較も試みた。

## C. 研究結果

両 D247N 変異株の全長ゲノム塩基配列を

決定し、それぞれ 1088 株のそれと比較したところ、N5B#15 株には G 蛋白質に 2 つ (S148P および D247N)、L 蛋白質に 2 つ (T137A および N2046S) のアミノ酸変異が認められ、N5B#10-28 株にはその 4 つの変異に加えてさらに G 蛋白質に 1 カ所 (R196I) アミノ酸変異が認められた。ウェスタンブロット法により、両変異株の G 蛋白質には N 型糖鎖が追加されていることが確認された (図 1)。両変異株は親株 1088 株に比べて NA 細胞での増殖性が著しく亢進していた (図 2)。3 株の成熟マウス (ddY、雌、6 週齢) における病原性についても検討した。脳内接種 (i.c.,  $10^2$  FFU) ではいずれもマウスに致死感染を起こしたが、末梢感染 (右後肢筋肉内接種, i.m.) では、1088 株感染の場合に比べ変異株感染では死亡率が著しく低下していた (表 1)。右後肢筋肉内接種 ( $10^6$  FFU) 後 7 日目において、すべての感染マウスで脳内にウイルス遺伝子の存在が確認されたことから、変異株の神経侵襲性は保たれていることが分かった (図 3)。同じマウスを用いて感染 7 日目での抗狂犬病ウイルス中和抗体価を測定したところ、非感染マウス群に比べ感染マウス群ではいずれも有意な中和抗体価の上昇が認められたが ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney U-test)、1088 株感染群、N5B#10-28 株感染群および N5B#15 感染群の間に中和抗体価について有意な差は認められなかった ( $P > 0.9$ , Mann-Whitney U-test) (図 4)。

病獣の新鮮脳材料を用いた RICT 法の評価では、イヌ 228 匹 (タイ) で鋭敏度 95%、特異度 98%、ネコ 115 匹 (スリランカ) で鋭敏度 74%、特異度 100%、その他の動物 (スリランカ) で鋭敏度 89%、特異度 100%であった (表 2)。またグリセロールで 4°C に保管してあった検体を用いても、ウシとイヌ (ブータン) で鋭敏度 90%、特異度 100%であった。これらの手技、判定は

全て現地の獣医師が実施・判定し、何の困難も無く施行することが可能であった (Ahmed et al. Am J Trop Med Hyg., 2012)。

一方、狂犬病ウイルス中和抗体価を迅速・簡便に測定できる RAPINA 法では、国際標準法であるウイルス中和試験 (RFFIT 法) で感染防御に十分なレベルである 0.5 国際単位/mL を境界にして抗体保有の陽性と陰性を区別したところ、ヒト血清で 98% の一致率、イヌ血清で 96% の一致率を示した (表 3)。また、原血清を 8 倍に希釈した後、RAPINA 法に供したところ、半定量的に中和抗体価を測定することも可能となり、標準法である RFFIT 法との一致率は、ヒト血清で 88% (71/80,  $k=0.83$ )、イヌ血清で 87.6% (153/134,  $k=0.81$ ) であった。現在唯一市販されている ELISA 法に比べ、はるかに高い一致率を示した (表 4) (Nishizono et al. Vaccine., 2012)。

表 5 に現行の狂犬病ウイルス中和抗体価の測定法と RAPINA 法との比較を示すが、簡便性・価格などの点で、明らかに有用であることが判った。

#### D. 考察

G 蛋白質第 194 位への N 型糖鎖追加の場合と同様に、第 247 位への N 型糖鎖追加 1088 株はマウスにおいて末梢感染時のみ病原性低下が認められた。しかし、今回の 1088 株 D247N 変異株は他の部位にも変異が認められ、また、第 247 位に N 型糖鎖を有しながらも末梢感染での病原性が高い固定毒も存在するため、第 247 位への N 型糖鎖付加は弱毒化に関与していない、もしくは context dependent に関与している可能性が考えられた。第 247 位に糖鎖付加部位をもつ狂犬病ウイルスが米国のコウモリ (*Eptesicus fuscus*) より分離されており、そのコウモリおよびマウスに対する病原

性は低かったという報告がある (Davis et al, Arch. Virol., 2013)。したがって、自然界においてコウモリ間ではこのような N 型糖鎖追加により弱毒化した狂犬病ウイルスが循環しているのかもしれない。治療 (ミルウォーキー・プロトコル) により狂犬病から生還した患者の報告 (Willoughby et al, N. Engl. J. Med., 2005) について、その中で治療が成功した背景としてコウモリ由来の弱毒型狂犬病ウイルスに感染した可能性を挙げているが、そうである蓋然性は低くはなく、実際にミルウォーキー・プロトコルの成功率も低いことから、この治療法は通常の (多くがイヌによる強毒型による) 狂犬病に対してはほとんど効果はないのかもしれない。

また、今回の D247N 変異株は第 194 位への N 型糖鎖追加の場合とは異なり、末梢感染時における中和抗体の誘導は親株感染の場合と同程度であった。また、固定毒の弱毒化機構の一つとして、血管脳関門の透過性亢進による免疫担当細胞の脳内への浸潤の増加が報告されているが (Phares et al, J. Immunol., 2006 等)、このような証拠も得られなかった (data not shown)。したがって、D247N 変異株の弱毒化は宿主の免疫応答を強く誘導することによるものではなく、未知の機構によるものであり、それを解明することは狂犬病治療法確立のための手掛かりになるのではないかと考えられた。

RICT 法による狂犬病ウイルス抗原の迅速診断は、高価な設備 (蛍光顕微鏡、インキュベーター) や試薬 (蛍光標識抗体) などを必要とせず、ウイルス流行国での幅広い利用が期待される。今後脳乳剤以外にも、唾液を用いたウイルス蛋白の検出が RICT 法により可能かどうかを検討することで、病獣の開頭をせずにより簡便な診断が可能かを検討したい。

また RAPINA 法も、これまで生のウイルスを

利用して行われていたウイルス中和試験の煩雑さを一挙に解消できる可能性が示され、ウイルス流行国でのヒトの追加免疫の必要性の評価や動物 (特にイヌ) へのワクチン効果の持続を評価する上で、有用性が非常に高いと考えられる。さらに我が国においても海外渡航の際の狂犬病ワクチンの追加免疫の必要性についての外来での判断や動物検疫の現場において利用価値が高いと思われる。現在、RAPINA 法の臨床使用に向けた申請作業の途中であり、今後広く海外でも使用できるように普及を図っていきたい。

#### E. 結論

狂犬病ウイルス G 蛋白質第 247 位への N 型糖鎖付加は、弱毒化に関与している可能性が示唆された。また、それによる弱毒化は未知の機構によるものであり、その解明は狂犬病治療法確立につながるものと考えられた。

我々の開発したイムノクロマト法による狂犬病ウイルスの抗原診断法 (RICT 法) と血清中のウイルス中和抗体価測定診断法 (RAPINA 法) は、狂犬病の流行国でも安価で、簡便に利用でき、今後広くアジアやアフリカなどの狂犬病流行国で利用が進むことが期待された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hosssain M, Ahmed K, Bulbul T, Hossain S, Rahman A, Biswas M N U, Nishizono A. Human rabies in rural Bangladesh. *Epidemiol Infect* 140(1):1964-1971, 2012
- 2) Yamada K, Park CH, Noguchi K, Kojima D, Kubo T, Komiya N, Matsumoto T, Mitui MT, Ahmed K, Morimoto K, Inoue S, Nishizono A. Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells

- resulted in attenuation: Potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus. *Virus Res* 165(1): 34-45, 2012
- 3) Ahmed K, Wimalaratne O, Dahal N, Khawplod P, Nanayakkara S, Rinzin K, Perera D, Karunanayake D, Matsumoto T, Nishizono A. Evaluation of a monoclonal antibody-based rapid immunochromatographic test for direct detection of rabies virus in the brain of humans and animals. *Am J Trop Med Hyg* 86(4):736-740, 2012
  - 4) Nishizono A, Yamada K, Khawplod P, Shiota S, Perera D, Matsumoto T, Wimalaratne O, Mitui MT, Ahmed K. Evaluation of an improved rapid neutralizing antibody detection test (RAPINA) for qualitative and semiquantitative detection of rabies neutralizing antibody in humans and dogs. *Vaccine* 30(26): 3891-3896, 2012
  - 5) Virojanapirom P, Khawplod P, Sawangvaree A, Wacharapluesadee S, Hemachudha T, Yamada K, Morimoto K, Nishizono A. Molecular analysis of the mutational effects of Thai street rabies virus with increased virulence in mice after passages in the BHK cell line. *Arch Virol* 157(11): 2201-2205, 2012
  - 6) Jamil KM, Ahmed K, Hossain M, Matsumoto T, Ali MA, Hossain S, Hossain S, Islam A, Nasiruddin M, Nishizono A. Arctic-like rabies virus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 18(12): 2021- 2024, 2012
  - 7) Yamada K, Noguchi K, Nonaka D, Morita M, Yasuda A, Kawazato H, Nishizono A. Addition of a single N-glycan to street rabies virus glycoprotein enhances virus production. *J Gen Virol* 94(2): 270-275, 2013
  - 8) Watanabe I, Yamada K, Aso A, Suda O, Matsumoto T, Yahiro T, Ahmed K, Nishizono A. Relationship between Virus-Neutralizing Antibody Levels and the Number of Rabies Vaccinations: a Prospective Study of Dogs in Japan. *Jpn J Infect Dis* 66(1): 17-21, 2013
2. 総説
    - 1) 山田健太郎, 西園 晃: イムノクロマト法による狂犬病とデング熱の迅速診断法. *臨床と微生物*. 39(6): 713-719, 2012
    - 2) 西園 晃, 山田健太郎: ラブドウイルス. *ウイルス*. 62(2): 183-196, 2012
  2. 学会発表
    - 1) 山田健太郎, 野口賀津子, 西園 晃. G タンパク質第 247 位に N 型糖鎖が追加された狂犬病ウイルス街上毒変異株の性状解析. 第 154 回日本獣医学会, 盛岡市. 2012 年 9 月 14-16 日
    - 2) 山田健太郎, 野口賀津子, 西園 晃. G タンパク質への N 型糖鎖の追加が狂犬病ウイルス街上毒の増殖性・病原性に与える影響. 第 60 回ウイルス学会総会, 大阪市. 2012 年 11 月 13-15 日
    - 3) 西園 晃, 渡辺一平. 渡航前狂犬病ワクチン接種後の中和抗体価の推移～ウイルス中和試験と迅速診断法による評価～. 第 16 回日本渡航医学会学術集会, 大阪. 2012 年 7 月 21-22 日
    - 4) 西園 晃, 渡辺一平. 狂犬病ワクチン接種

後の中和抗体価の推移～ウイルス中和試験と迅速診断法による評価～. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会, 横浜市. 2012 年 11 月 17-18 日

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

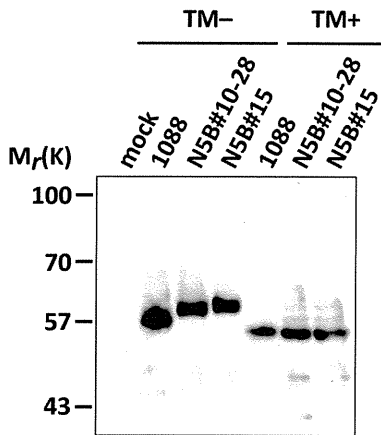


図 1 : D247N 変異株 G 蛋白質における N 型糖鎖付加

各ウイルス株を NA 細胞に感染させ、N 型糖鎖付加阻害剤であるツニカマイシン非存在下 (TM-)・存在下 (TM+) で培養した。細胞中の G 蛋白質はウェスタンブロットにより検出した。mock は非感染細胞を示す。

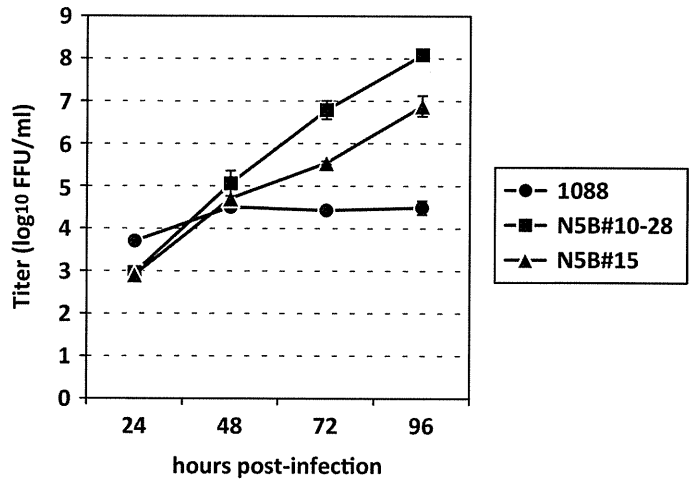


図 2 : D247N 変異株の NA 細胞における増殖性

各ウイルス株を NA 細胞に感染させ (moi of 0.01), 一定時間培養後に培養上清を回収し、ウイルスカ価を測定した。

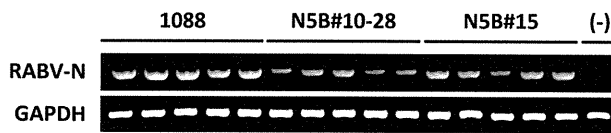


図 3 : D247N 変異株の神経侵襲性

各ウイルス株 ( $10^6$  FFU) をマウスの右後肢筋肉内に接種し、7 日目に脳から RT-PCR によりウイルス RNA (RABV-N) およびマウスのグリセルアルデヒド -3- リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 mRNA (GAPDH) の検出を行った。(-) は非感染マウスを示す。

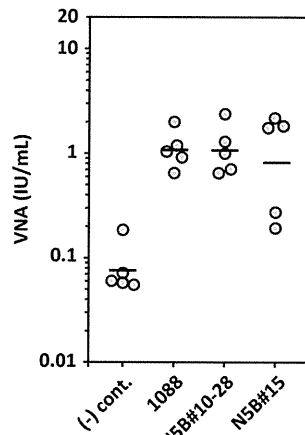


図 4 : D247N 変異株の末梢感染における中和抗体の誘導

各ウイルス株 ( $10^6$  FFU) をマウスの右後肢筋肉内に接種し、7 日目に採血・血清分離を行い、血清中の抗狂犬病ウイルス中和抗体価 (VNA) を測定した。(-) cont. は非感染マウスを、図中のバーは幾何平均値を示す。

表 1 : D247N 変異株の成熟マウスにおける病原性

strain	i.c.		i.m.	
	$10^2$ FFU	$10^6$ FFU	$10^5$ FFU	$10^4$ FFU
1088	10/10/10 (100)	18/20/20 (90)	11/14/20 (55)	8/ 9/20 (40)
N5B#10-28	8/ 8/10 (80)	4/15/20 (20)	1/ 5/20 (5)	0/ 2/20 (0)
N5B#15	10/10/10 (100)	3/16/20 (15)	4/ 7/20 (20)	3/ 3/20 (15)

Dead/Sick/Total (mortality %)

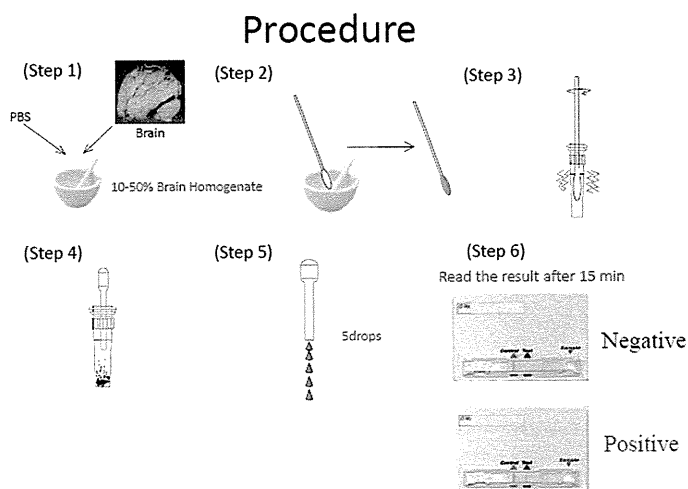


図5 RICT法の概略

乳鉢で10-50%の脳乳剤を作成し、変性剤を含むバッファーと混じ、テストストリップに滴下し、15分後に目視判定。

表2 RICTを用いた各種動物脳からの狂犬病ウイルスの検出

<新鮮な脳組織を使用>					<グリセロール保存試料>	
Country	Thailand	Sri Lanka	Sri Lanka	Sri Lanka	Country	Bhutan
Species	Dog	Cat	Other animals	Human	Species	Cow, dog
(n=)	(228)	(115)	(47)	(86)	(n=)	(27)
Sensitivity	0.95	0.74	0.89	0.99	Sensitivity	0.90
Specificity	0.98	1.0	1.0	0.08	Specificity	1.0
Accuracy	0.96	0.91	0.98	0.86	Accuracy	0.93

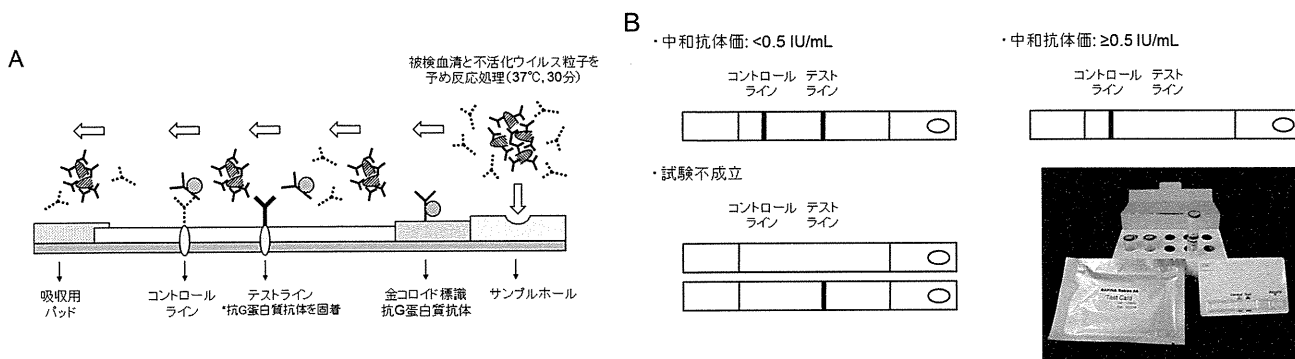


図6 RAPINAの原理と判定

- A) RAPINA法の原理。被検血清中に中和抗体が存在し、不活化ウイルス粒子中のG蛋白質の中和エピトープに結合すると、キット中の抗G蛋白質中和モノクローナル抗体との結合が阻害される (Shiota et al., J Virol Methods., 2009 より改変)。
- B) サンプルホールに混合液を滴下して15分後に判定を行う。テストラインのみバンドが認められなければ、中和抗体価が0.5 IU/mL以上であると判定する。このとき、例えば被検血清を8倍希釈していた場合には4.0 IU/mL以上と判定する (Nishizono et al. Vaccine., 2012 より改変)。

表3 ヒトとイヌの血清中のウイルス中和抗体価の有無（RAPINA 法と RFFIT 法での比較）

Human		RAPINA (EIU/ml)		Total	Dog		RAPINA (EIU/ml)		Total
		Band (+)	Band (-)				Band (+)	Band (-)	
RFFIT (IU/ml)	< 0.5	138	1	139	RFFIT (IU/ml)	< 0.5	174	1	175
	≥ 0.5	2	182	184		≥ 0.5	8	344	352
Total		140	183	323	Total		182	345	527

表4 ヒトとイヌの血清中のウイルス中和抗体価の有無（RAPINA 法と RFFIT 法での比較）

		RAPINA (EIU/mL)				ELISA (EU/ml)						RAPINA (EIU/ml)				ELISA (EU/ml)			
		<0.5	0.5-4.0	4.0≤	total	<0.5	0.5-4.0	4.0≤	total			<0.5	0.5-4.0	4.0≤	total	<0.5	0.5-4.0	4.0≤	total
RFFIT (IU/mL)	<0.5	26	0	0	26	23	3	0	26	RFFIT (IU/mL)	<0.5	44	0	0	44	42	2	0	44
	0.5-4.0	1	22	5	28	5	23	0	28		0.5-4.0	4	54	3	61	6	53	2	61
	4.0≤	0	3	23	26	1	17	8	26		4.0≤	0	12	36	48	0	18	30	48
	total	27	25	28	80	29	43	8	80		total	48	66	39	153	48	73	32	153

表5 抗狂犬病ウイルス抗体検出法のパフォーマンスの比較

項目	RFFIT	ELISA	RAPINA
検出抗体	中和抗体	中和抗体および 非中和抗体	中和抗体および 非中和抗体
定量性	定量的	定量的	定量的／半定量的
設備・備品	蛍光顕微鏡 安全キャビネット 超低温フリーザー CO <sub>2</sub> インキュベーター ピペットマン	ELISAリーダー インキュベーター ボルテックスミキサー ピペットマン	インキュベーター ピペットマン
消耗品	96-wellプレート 細胞用培地 細胞用シャーレ・フラスコ FITC標識抗体 チップ	チップ	チップ
抗原	生ウイルス	精製G蛋白質	不活化ウイルス粒子
バイオセーフティ 施設	必要	不要	不要
所要時間	24時間	3時間	1時間



## ハンタウイルス感染症の診断法に関する研究

研究分担者 有川 二郎 (北海道大学大学院医学研究科・教授)

### 研究要旨

腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)は、ブニヤウイルス科ハンタウイルスを原因とする急性熱性疾患で、ハンタウイルス感染症と総称される。両疾患は、持続感染したげっ歯類を自然宿主とする人獣共通感染症である。ウイルスと宿主が共に進化してきたと考えられるため、特定の種類のげっ歯類が様々な血清型や遺伝子型のウイルスを保有している。そのため、その生息地域に一致して流行が発生し、HFRS は中国、極東ロシアや欧州を中心に広くユーラシア大陸全域で、また HPS は南北アメリカ大陸で流行が報告され、公衆衛生上の大きな問題となっている。本研究では、ハンタウイルス感染を広く検出する、特異性に優れ、迅速なスクリーニング用血清診断法と血清型鑑別診断法を、ELISA 法、代替中和試験法およびイムノクロマト法(ICG)として開発した。さらに、インドネシおよびベトナムにおける腎症候性出血熱(HFRS)患者の発生状況と流行地の特定を図り、病原巣げっ歯類を同定することを試みた。さらにスリランカにおいて、ウイルスとげっ歯類の共進化の関連を明確にする事を試みた。

### A. 研究目的

急性熱性疾患で腎臓の機能障害を特徴とする腎症候性出血熱(HFRS)と呼吸器障害を特徴とするハンタウイルス肺症候群(HPS)は、ブニヤウイルス科に分類される RNA ウイルスであるハンタウイルスを原因ウイルスとする。両疾患は、持続感染したげっ歯類を自然宿主とする人獣共通感染症である。特定の種類のげっ歯類が、その血清型や遺伝子型毎に自然宿主となるため、自然宿主となるげっ歯類の生息地域に一致して流行が発生する。すなわち、HFRS の流行は中国、極東ロシアや欧州を中心に広くユーラシア大陸全域で、また HPS は南北アメリカ大陸で報告され、公衆衛生上の大きな問題となっている。このため、ハンタウイルスの診断は患者のみでなく、宿主げっ歯類の感染の有無の確認も重要である。また、血

清型によってヒトへの病原性の強弱が異なる傾向があるため、感染ウイルス型の特定は、自然宿主げっ歯類の種類の推測、また、輸入症例では流行国の特定、さらに病原性の強弱の予想をもとに封じ込め対策や初期の治療方針の選択等に有用な情報を提供する。本研究では簡便で迅速な血清診断法として、イムノクロマトグラフィー(ICG)を作製することを試みる。

ユーラシア大陸では、Hantaan virus (HTNV)、Seoul virus (SEOV)、Dobrava virus (DOBV)、Thailand virus (THAIV)、および Puumala virus (PUUV)の少なくとも5種のハンタウイルスが HFRS の原因となることが分かっている。また北米と南米では Sin Nombre virus (SNV)、Carrizal virus (CAZV)、Black Creek Canal virus (BCCV)、Andes virus (ANDV)および Lagna Negra virus (LANV)など少なくとも

5種のウイルスが HPS 関連ウイルスとして知られている。上記のウイルスに対する抗体を検出するために、少なくとも三種類の抗原が必要となる。抗ハンタウイルス抗体の保有が明らかになった場合、さらに罹患血清型を明らかにする必要がある。本来、血清型鑑別には生きたウイルスを用いる中和試験が必要とされる。しかしながら、HPS 関連ウイルスの多くが分離されていないこと、分離されてもウイルスの病原性が高く封じ込め設備が必要であるため、中和試験による解析はほとんど行われていない。このため、代替法として、組換え蛋白を抗原として用いる安全な血清診断法の開発を進めている。我々はこれまで多くの血清型のハンタウイルスの核蛋白(ヌクレオキャプシッド蛋白)から共通抗原部位を削除した組換え核タンパク抗原を遺伝子工学的に調整し、血清型を鑑別する診断法の確立を目指してきた。本研究では、南米および北米の HPS 関連ウイルスについても本代替中和法を確立する事を目的とする。

本研究では、はじめにこれまで ELISA に用いていた組換え抗原をイムノクロマトグラフィー(ICG)法へ応用することを試みた。これをげっ歯類および患者血清を用いて評価した。ICG 法によるスクリーニングと代替中和法を組み合わせる事で、簡便、迅速かつ安全な血清診断システムの構築を試みた。さらに、インドネシア、ベトナムにおける腎症候性出血熱(HFRS)患者の発生状況と流行地の特定を図り、病原巣げっ歯類を同定することを試みた。さらにスリランカにおいて、ウイルスとげっ歯類の共進化の関連を明確にする事を試みた。

## B. 研究方法

抗原:スクリーニング ELISA および ICG 用抗原として、抗原的に異なる3つのハンタウイルスのグループを検出するために、三種類の抗

原を用意した。すなわち、ネズミ亜科げっ歯類を宿主とするウイルス(HTNV, SEOV, DOBV, THAIV), ハタネズミ亜科げっ歯類を宿主とするウイルス(PUUV)および南北アメリカ大陸由来ウイルス(ANDV, SNV, LANV および多くの病原性不明のウイルス)の三種類である。抗原性の強い核(N)タンパクの N 末端の 103 アミノ酸を大腸菌ベクターを用いて pET43.1 ベクターによって NUS タグとともに発現させ、溶解・精製した。それぞれ、HS103 (HTNV と SEOV 共通抗原性があるため), PUU103, AND103 とした。血清型鑑別診断 ELISA 用抗原として、各ハンタウイルス組換え N 蛋白の全長(全長抗原)あるいは N 末端の 50 から 100 アミノ酸を欠損したもの(それぞれ 50 抗原、または 100 抗原)をバキュロウイルス発現ベクター系を用いて昆虫細胞(High Five cell)中に発現させた。発現細胞を凍結融解、超音波処理した後、抗原として用いた。

ELISA: ELISA は基本的には既報の方法に従った (Araki et al J. Clin Microbiol. 2001)

イムノクロマト法:グラスファイバーコンジュゲートパッド(GFCP103000、MILIPORE 社)と展開担体として、Hi-Flow Plus 240 Membrane Card (MILIPORE 社)を用いた。ラット抗体検出にはウサギ抗ラット IgG 標識 Colloidal Gold WRGH2 (Wine red chemical 社)を用いた。ラット抗体検出用 ICG ストリップには HS103 抗原を塗布した。ヒト抗体検出には Protein A 標識 Colloidal Gold (EY LABORATORIES)を用いた。抗原の塗布は以下の三種類を試みた。すなわち、①1種類の抗原を一枚のストリップに塗布、②三種類の抗原を別々に三本のラインとして一枚のストリップに塗布、③三種類の抗原を混合して一枚のストリップに塗布を準備した。

実験感染および自然感染ラット血清: 実験用ラット WKAH/hkm6週齢に HTNV, SEOV, THAIV, DOBV を接種し、麻酔下で経時的に採血した。また、SEOV 陽性スポットであるベトナムハイフォン市の港湾およびハノイ市バスセンターでドブネズミを捕獲し、陽性例を確認した。これら陽性ドブネズミより得られた血清を、自然感染ラット血清とした。血清は 56 度 30 分の非働化を行い、ICG 法の評価に使用した。

血清: HPS 患者とげっ歯類血清をアルゼンチン国立ウイルス研究所の Deria Enria 博士から分与された。PUUV 感染の軽症型 HFRS (nephropathia epidemica; NE) 患者血清、はスウェーデンウメア大学病院臨床微生物学教室 Clas Ahlm 教授から分与された。HFRS と HPS ウイルス抗体陽性げっ歯類血清は研究分担者がこれまでの保存しているものを使用した。ICG のラット血清に対する評価を行うため、実験動物由来血清を実験動物中央研究所より分与された。

アジアにおける患者発生状況と流行地の特定: インドネシアのサウザンドアイランド諸島においてラットおよびヒトのハンタウイルスの血清疫学的調査を行った。また、ベトナムの南部サイゴン港および北部ハイフォン港およびハノイ市街地でラットの疫学的調査を行った。これらの陽性ラットについてハンタウイルス遺伝子の配列を決定し、系統樹解析を行った。また THIAV 様ウイルスの確認されたスリランカ (Gamage et al 2011) Kandy 地区で捕獲されたラットの種を特定するため、ミトコンドリア DNAcytb 遺伝子 1140bp と核由来の Mclr 遺伝子 954bp を解析した。

(倫理面からの配慮について)

ヒト血清については保有研究施設等で予インフォームドコンセントを得た後、分与されたも

のである。用いた血清(動物血清は)の採血では、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. ラット血清診断における ICG 法の評価:  
陽性群として実験感染ラット、自然感染ラット合計 58 検体、陰性群として実験用ラット血清および野外捕獲ラットを用いてラット IgG 抗体検出用 ICG の評価を行ったところ、感 100%、特異 99.6%であり、スクリーニング法として有効である事が明らかとなった。実験動物と野外例において感度と特異性に差は認められなかった。

2. 患者血清診断における ICG 法の評価:  
①、②、③のストリップについて評価を行ったところ、陰性ヒト血清の数が検体と少ないものの偽陽性反応は見られず高い特異性があることが分かった。また、HFRS, NE, HPS 患者血清についてホモの組み合わせでの特異性は①のストリップでそれぞれ 100%, 91%, 100%、②のストリップでそれぞれ 98%, 95%, 100%、③のストリップでそれぞれ 98%, 91%, 100%であった。NE で若干感度が低かったが、急性期血清の割合が高く ELISA でも抗体検出が困難であったこと、ろ紙血清で分与を受け質的な劣化が低い感度の原因であると考えられた。また、②のストリップでは一度の試験で罹患ウイルスのグループの特定が可能であった。NE と HPS 患者血清の一部では交差反応が認められたが、バンドの強さで鑑別が可能であった。HFRS 患者血清ではほとんど交差反応は認められなかった。

### 3. 鑑別診断法の開発:

南米由来、ANDVとLANVに加えて北米および中米由来のハンタウイルスである、SNVおよびBCCV、カリザールウイルス(CARV)についてN末端の約100アミノ酸を削除した鑑別診断抗原を準備し、それぞれのウイルスに対するヒト血清とげっ歯類血清を用いてELISAを実施した。その結果、いずれのウイルスに対する血清も、ホモの抗原に対してヘテロ抗原に対するよりも高い吸光度を示し、鑑別診断が可能であった。

### 4. アジア諸国の流行状況:

インドネシア・サウザンドアイランド諸島は50年以上前からヒトが暮らし、オランダ支配時代には検疫地区となった島である。高い人口密度があり、ヒトの生活に依存したラット類が多く捕獲される。調査の結果、この島々はSEOVの常在地であること確認し、その宿主はドブネズミであることが明らかとなった。この地域の熱性疾患患者30名を調べたところ、抗ハンタウイルス抗体は検出されなかった。ベトナムにおいては調査したサイゴン港、ハイフォン港、およびハノイ市街のバスセンターすべての3カ所で捕獲されたラットからSEOVが検出された。ハイフォン港およびハノイ市街でSEOVと同時にレプトスピラを保有しているラットが多く見られた。さらに、E型肝炎ウイルスを持っていることも明らかとなり、都市部のドブネズミがSEOVのみならず、他の多くの病原体の宿主となっている可能性が考えられた。スリランカでは、Kandyで捕獲されたげっ歯類のミトコンドリアDNAcytbおよびMclr遺伝子を解析した結果、スリランカのクマネズミが独自の遺伝子系統を有していることが明らかとなった。新旧の二つのクマネズミが侵入した形跡があること、交雑も進みつつあることが明らかとなった。また、

KnadyのBadicota属のラット(n=24)の解析の結果、すべて*B. bengalensis*であり、これまでに報告されたcytb遺伝子と比較して変化は見られなかった。ハンタウイルスが宿主げっ歯類と共進化すると仮定した場合、このlesser bandicoot ratはKandyにおけるTHAIV様ウイルスのホストである可能性が高いと考えられた。今回のラット類からはハンタウイルスの配列は得られなかった。しかしながら、上記のインドネシアおよびベトナムのドブネズミから、ハンタウイルスの配列を得て系統樹解析を行った結果、これらがすべてSEOVであり、東アジアの系統とは異なる、東南アジア系統をあらたに形成することが明らかとなった。

### D. 考察

ラットを対象としたICG法が、実験動物のみならず、野外感染ラット血清においても有効であることが明らかとなった。一般に、げっ歯類はハンタウイルスに持続感染することから、この方法は迅速に野外でスクリーニングできることから、効率的に情報を集めることを可能にすることが期待される。ヒトICG法も検出感度91-100%、特異性100%と実用化が期待されるストリップを作製することができた。NE患者血清においてのみ、およそ90%のやや低い検出感度が感染初期血清にみられた。今後IgM検出ストリップを開発する必要があると考えられた。HPSウイルスに関しても、PUU103抗原への交差は見られたものの、感染初期も含めて診断することができた。開発した①から③のストリップはそれぞれ有効であった。使用する地域によって、また、他にどのような抗原ラインを組み合わせるかが可能であると考えられた。これらのICGを使用したスクリーニングの後、代替中和