

洗浄した細胞は 10% FBS、50 µg/ml ペニシリン G を含む RPMI 1640 培地で 24 時間培養した。

4. 野兎病菌 *pdpC* 遺伝子破壊株の相補

pdpC 遺伝子破壊株の相補試験を行うために pNVU1-*pdpC* プラスミドを作出した (図 4A)。本プラスミドは、pOM5 プラスミドの大腸菌 ori (pMB1)、クロラムフェニコール耐性遺伝子 (*camR*)、野兎病菌 ori (*repA*) を含む 3,953 bp の DNA 断片に、野兎病菌 *bfr* 遺伝子のプロモーター (344 bp) の直下に *pdpC* 遺伝子を全長 (pA9) または半分 (pA8) コードする DNA 断片 (3,987 bp) を挿入した。プラスミド DNA は大腸菌 DH5α 株で増幅後、NucleoBond PC 100 (MACHEREY-NAGEL 社) を用いて回収した。弱毒性 SCHU P5 株および *pdpC* 遺伝子破壊株は pNVU1-*pdpC* プラスミドを用いて形質転換を行い、得られたコロニーを CDM で培養し、10%グリセロールを含む CDM に置換後、-80°C で保管した。

5. CFU 測定

J774.1 細胞は、0.1% TritonX-100 を含む CDM で室温 1 分間処理した後、20 倍量の RPMI 1640 で即座に希釈した。このサンプル溶液の 10 倍段階希釈を作成し、ユーゴンチョコレート培地に接種し、37°C で 4-5 日間培養後、コロニーをカウントした。

6. マウスにおける病原性確認

7 週齢のマウス (C57BL/6J♀) は日本 SLC から購入した。これらのマウスに野兎病菌株を経鼻接種しその生残性を観察した。なお、マウス感染実験は国立感染症研究所動

物実験委員会の承認を受け ABSL3 で実施した。

C. 結果

強毒性 SCHU P9 由来 *pdpC* 遺伝子破壊株の作出

野兎病菌 *pdpC* 遺伝子が病原性に関与している可能性を検証する為に、強毒性 SCHU P9 株由来の *pdpC* 遺伝子破壊株作出が必要とされた。ところが、野兎病菌 *F. tularensis* subsp. *tularensis* はホモログスリコンビネーションが不可能との報告があったので、本研究では TargeTron システム (Sigma 社) と野兎病菌用 TargeTron 用プラスミド pKEK1140 を用いて野兎病菌 *pdpC* 遺伝子破壊を試みた。*pdpC* 遺伝子 (3,987 bp) を TargeTron Design Site (Sigma-Aldrich) にアップロードしたところ、イントロン挿入可能箇所の候補として 384|385, 538|539, 1119|1120, 2013|2014, 2806|2807 および 3245|3246 塩基の 6 か所が得られた。TargeTron システム付属説明書に従い、イントロンを含む PCR 産物を作製し、pKEK1140 プラスミドに挿入した (図 2A)。大腸菌 DH5α で増幅後、精製プラスミドを用いて強毒性野兎病菌 SCHUP9 株を形質転換し、カナマイシン耐性コロニーを得た。PCR でイントロン挿入の確認したところ、作成できた破壊株の *pdpC* の挿入部位は、538|539, 1119|1120, 2013|2014 だった (図 2B および C)。それぞれの *pdpC* 遺伝子破壊株を、538ins、1119ins、2013ins と命名した。

pdpC 遺伝子破壊株の病原性確認

得られた 3 系統の *pdpC* 遺伝子破壊株の病原性を評価する為に、マウス由来マクロファージ様細胞株 J774.1 細胞に $\text{moi}=10$ で接種し、接種後 2 および 26 時間目の CFU を測定した (図 3A)。強毒性 SCHU P9 株は弱毒性 SCHU P5 株と比較して 10 倍程度高い増殖を示した。一方、強毒性 SCHU P9 株から作出された *pdpC* 遺伝子破壊株のマクロファージ内増殖性は、弱毒性株と同程度またはそれ以下だった。

マウスに対する病原性を評価するために、 1×10^6 CFU の各菌株をマウスに経鼻接種した。この結果、強毒性 SCHU P9 株を接種したマウスは 5 日目に全て死亡したが、*pdpC* 遺伝子破壊株および弱毒性 SCHU P5 株を接種したマウスは 14 日間生存した (図 3B および C)。

以上の結果より、強毒性野兎病菌の *pdpC* 遺伝子を破壊すると病原性が消失することが明らかとなった。

pdpC 遺伝子破壊株の相補試験

pdpC 遺伝子破壊株の相補試験を行うために pNVU1-*pdpC* プラスミドを作出した (図 4A)。このプラスミドは、pOM5 プラスミドの大腸菌 ori (pMB1)、クロラムフェニコール耐性遺伝子 (*camR*)、野兎病菌 ori (*repA*) を含む DNA 断片に、野兎病菌 *bfr* 遺伝子のプロモーターの直下に *pdpC* 遺伝子の全長 (pA9) または半分 (pA8) をコードする DNA 断片を挿入した。pNVU1-*pdpC* プラスミドを用いて、弱毒性 SCHU P5 株および *pdpC* 遺伝子破壊株を形質転換した。強毒性株、弱毒性株、*pdpC* 遺伝子破壊株、および相補株の J774.1 細胞における増殖性を観察した (図 4B)。この

結果、強毒性株はマクロファージ内で効率よく増殖できるのに対して、弱毒性株および *pdpC* 遺伝子破壊株は限定的だった。また、相補株の増殖は弱毒性株および *pdpC* 遺伝子破壊株より高く、*pdpC* 遺伝子を全長コード (pA9) した相補株は半分コード (pA8) した相補株より増殖性が約 2 倍高かった。

マウスに対する病原性を評価するために、 1×10^6 CFU の強毒性株、弱毒性株、*pdpC* 遺伝子破壊株、および相補株をマウスに経鼻接種した (図 4C および D)。この結果、弱毒性株および *pdpC* 遺伝子破壊株接種群のマウスは、臨床症状を示さず全て生存した。一方、強毒性株および相補株接種群のマウスは全て死亡した。以上の結果より弱毒性株や *pdpC* 遺伝子破壊株でも、機能的な *pdpC* 遺伝子を相補すれば病原性が復帰することが明らかとなった。

D. 考察

野兎病菌は非常に高い病原性と致死性を持つ細菌である。本研究では野兎病菌の病原因子を同定することを目的とし、ゲノム上でたった 1 塩基 (挿入・欠損) しか違いを持たない弱毒性 SCHU P5 株と強毒性 SCHU P9 株を作出した。この 1 塩基は野兎病菌の *pdpC* 遺伝子の中央部に位置し、弱毒性株では 1 塩基欠損によってフレームシフトが発生し、正常な大きさの PdpC タンパク質が生合成できないことが明らかとなった。そこで、強毒性株の *pdpC* 遺伝子破壊株と相補株を作出し、*pdpC* が病原性を規定する遺伝子であるか検証を試みた。この結果、強毒性株の *pdpC* 遺伝子を破壊した株は大きく病原性が低下した。更に、弱毒性株または *pdpC* 遺伝子破壊株を PdpC

タンパク質発現プラスミドで相補すると病原性の復帰が見られた。これらの結果は、野兎病菌の *pdpC* 遺伝子が本菌の病原性発現機構に強く関与していることを強く示唆している。

E. 結論

野兎病菌 *pdpC* 遺伝子は本菌の病原性発揮に非常に重要であることを証明した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

昨年度までの結果 ～まとめ～

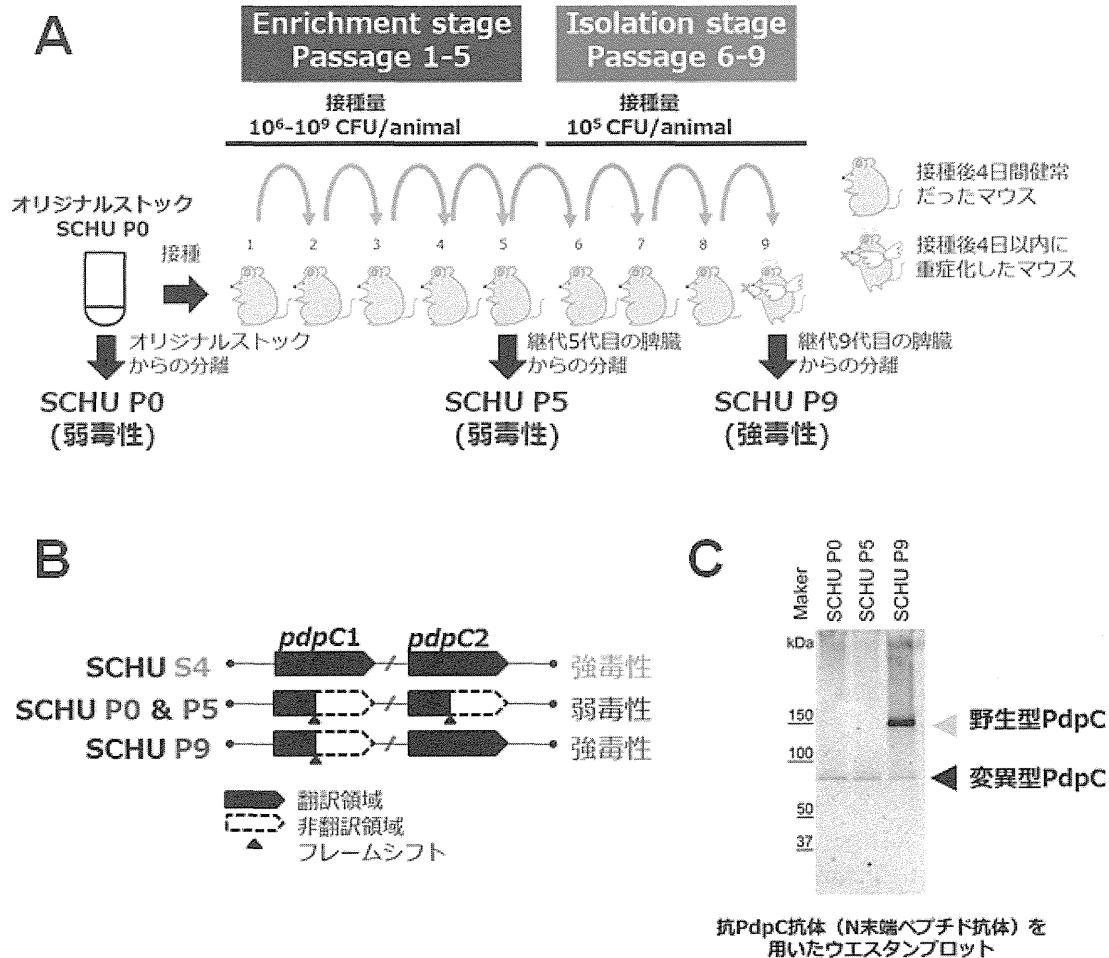


図1. 弱毒性SCHU P5株と強毒性SCHU P9株。

(A) *Francisella tularensis*は、ヒトや動物に野兔病を引き起こす細胞内寄生菌である。本菌は、マウスに対して極微量の菌体(<10 CFU)で感染が成立し、貪食細胞内で増殖後、敗血症を誘発し、死亡させる事が知られている。しかし我々が保管していた本来強毒株である*F. tularensis* SCHU株は、10⁶ CFUをマウスに接種しても非致死的で弱毒化していた。この弱毒化したSCHU株をマウスで9代継代したところ病原性の増強が認められた。そこで、継代前ストック、継代5および9代目のマウス脾臓から、各々 SCHU Passage 0 (P0)、P5およびP9株を分離した。(B) 弱毒株と強毒株の全ゲノム配列を次世代シーケンサーで解析した。この結果、弱毒株 (SCHU P0,P5) の *pdpC1* と *pdpC2* および強毒株 (SCHU P9) の *pdpC1* では、2045塩基目のAが欠損していた。(変異型)。一方、強毒株 (SCHU P9) *pdpC2* のみ全長がコードされていた。(C) ウエスタンブロット解析によって、強毒性SCHU P9株のみが野生型PdpCを産生できることが明らかとなった。

P9強毒株の*pdpC*遺伝子破壊株の作出 (538ins, 1119ins, 2013ins strains; TargetTron)

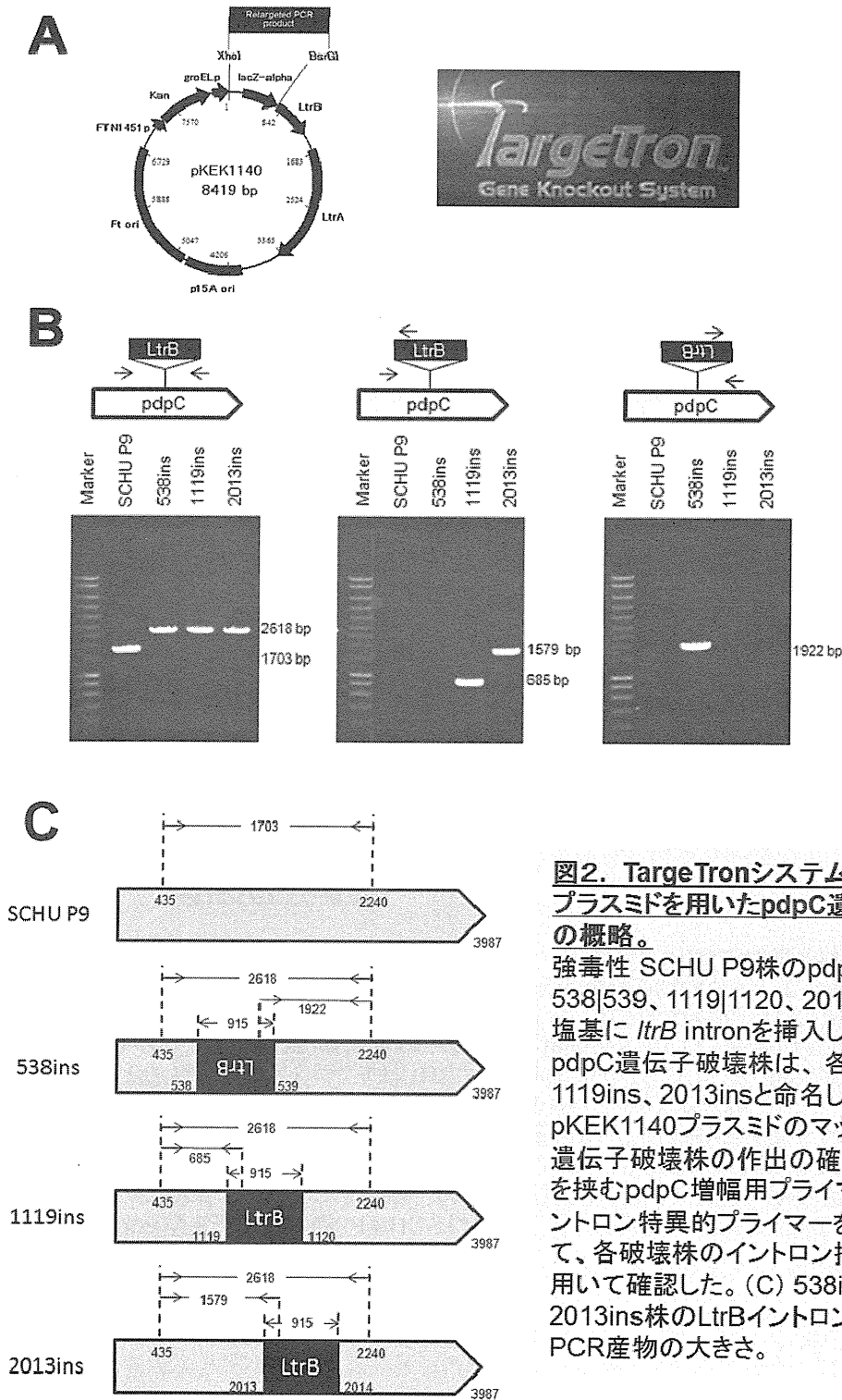


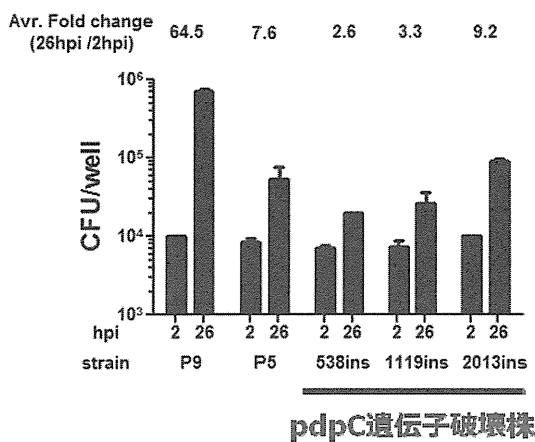
図2. TargetTronシステムとpKEK1140プラスミドを用いた*pdpC*遺伝子破壊株の概略。

強毒性 SCHU P9株の*pdpC*遺伝子の538|539、1119|1120、2013|2014番目の塩基に *ltrB* intronを挿入した。得られた*pdpC*遺伝子破壊株は、各々538ins、1119ins、2013insと命名した。(A) pKEK1140プラスミドのマップ。(B) *pdpC*遺伝子破壊株の作出の確認。イントロンを挟む*pdpC*増幅用プライマーおよびイントロン特異的プライマーを組み合わせ、各破壊株のイントロン挿入をPCRを用いて確認した。(C) 538ins、1119ins、2013ins株の*LtrB*イントロン挿入部位とPCR産物の大きさ。

P9強毒株のpdpC遺伝子破壊株のマクロファージ及びマウスに対する病原性

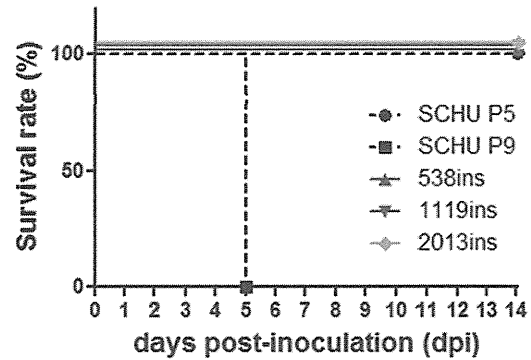
A

Macrophage



✓破壊株はマクロファージで増殖しない
✓マウスでの致死性の欠失

B



C

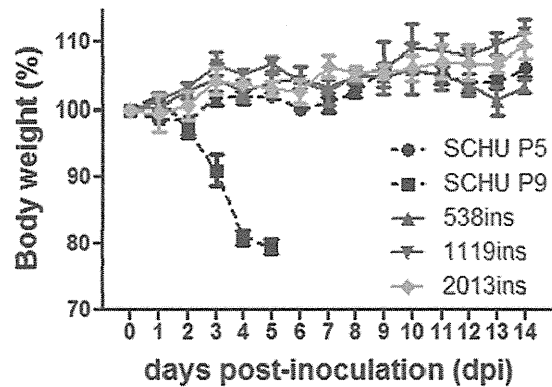


図3 pdpC遺伝子破壊(538ins、1119ins、2013ins)株の病原性確認。

(A) J774.1細胞に弱毒性 SCHU P5、強毒性 SHCU P9、および3種類のpdpC遺伝子破壊株をmoi=10でマクロファージ様細胞株に接種した。感染細胞は、接種後2時間および26時間目に0.1% Triton X-100を含むCDMで可溶化した後、CFUを測定した。(BおよびC) 1×10^6 CFUの弱毒性 SCHU P5、強毒性 SHCU P9、および3種類のpdpC遺伝子破壊株を各4匹のC57BL/6Jに経鼻接種した。接種後の生残数(B)および体重(C)は14日間観察した。

P5弱毒株およびpdpC遺伝子破壊株に PdpC発現プラスミドを導入

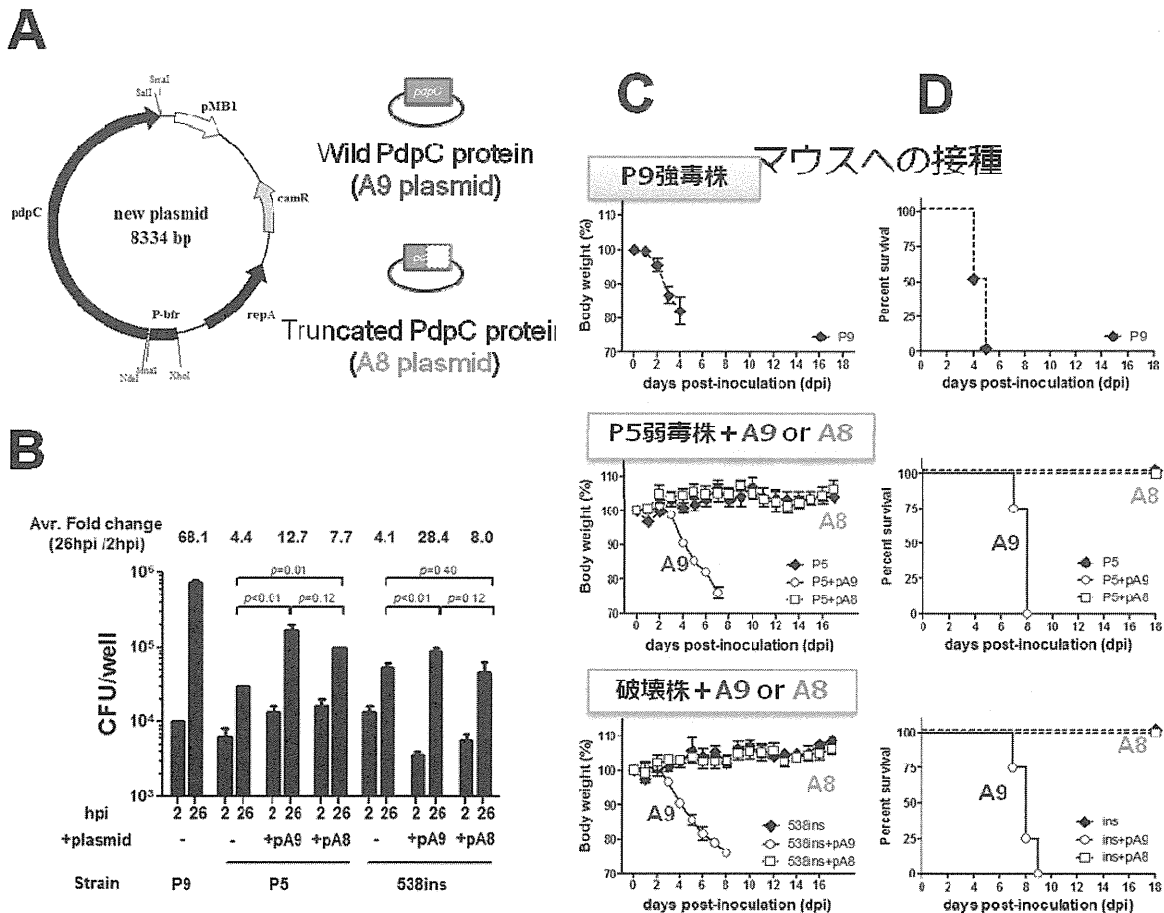


図4. pdpC遺伝子破壊株と相補株の病原性比較。(A) pdpC遺伝子を相補する為のプラスミドのマップ。(B) J774.1細胞に弱毒性 SCHU P5、強毒性 SCHU P9、pdpC遺伝子破壊株、および相補株をmoi=10でマクロファージ様細胞株に接種した。感染細胞は、接種後2時間および26時間目に0.1% Triton X-100を含むCDMで可溶化した後、CFUを測定した。(BおよびC) 1×10^6 CFUの強毒性 SCHU P9、pdpC遺伝子破壊株、および相補株を各4匹のC57BL/6Jに経鼻接種した。接種後の体重(C)および生残数(D)は18日間観察した。

エキノコックスに関する研究

研究分担者 森嶋康之（国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官）

研究協力者 杉山 広（国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官）

山崎 浩（国立感染症研究所 寄生動物部 第二室長）

要旨 エキノコックス症の感染源となるステージである成虫型へ発育分化を誘導した材料を用い、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析をおこなって、処理にともなって特徴的に発現する遺伝子群を同定した。

A. 研究目的

エキノコックス症は、エキノコックス属条虫の幼虫が寄生することによって引き起こされる人獣共通寄生虫症で、ヒトをはじめとする中間宿主動物に致死的な転帰をもたらす。一般的な条虫幼虫感染と異なる強い病原性は、本属条虫のみの特異的な幼虫形態として認められる原頭節の無性生殖能にあると考えられている。すなわち、中間宿主体内において原頭節は無性的に増殖することにより、がん類似の症状を引き起こす。ところが原頭節は、イヌをはじめとする終宿主動物に経口的に摂取された場合、同じ発育ステージである原頭節へ再分化するのではなく、次の発育ステージである成虫へと変化し、有性生殖を行って虫卵を産生し、これが中間宿主への感染源となる。

本研究は、このエキノコックスの原頭節が有する二方向性の分化能に焦点をあて、とくにそのヒトへの感染源となる成虫型発育への方向決定に関わる遺伝子群の同定を試みることを目的とする。

B. 研究方法

エキノコックス原頭節の成虫型への分化誘導は、昨年度報告の人工培養法にしたがっておこなった。すなわち、二次包虫症によって実験室内継

代中の実験動物（スナネズミ）由来の多包虫原頭節を定法にしたがって宿主組織から分離・精製後、1%ペプシン（pH2.0）（処理 I）、1%パンクレアチン・タウロコール酸ナトリウム（pH 8.0）（処理 II）、0.3%トリプシン（処理 III）を用いて連続的に処理し、次いで FBS 加培養液において 38°C-5% CO₂ 条件下で 1 日培養をおこなった。

上記培養により各処理ごとに採取した原頭節から mRNA を調整し、マイクロアレイ（アジレント社製、全搭載遺伝子約 15,000）を用いて、それぞれの遺伝子発現量の測定をおこなった。マイクロアレイによって抽出された変動遺伝子群の評価にあたっては、まず予備的にクラスター解析をおこない、各処理ごとの発現パターンと処理間の整合性の有無を確認した。次いで、各処理がエキノコックス原頭節の成虫型分化へ与えた影響を知るため、隣接する各処理間での遺伝子発現の変化を調べた。すなわち、分離・精製操作のみの未処理原頭節（NT）を出発点とし、以後処理 I 中（T1）、同処理後（T2）、処理 II 中（T3）、同処理後（T4）、処理 III 後（T5）、本培養開始 1 日後（T6）と、経時的サンプリングされた材料から得られた発現量の測定結果について、T1 対 NT（以後 S1 と呼称）から T6 対 T5（同 S6）までの組み合わせを作成し、そ

れぞれ 2 倍以上の発現差が認められる遺伝子について統計学的に有意 (t-test, $P < 0.001$) と判定された遺伝子を選別するとともに、qRT-PCR による発現の確認をおこなった。

C. 結果

クラスター解析の結果、各種の処理によって変動した遺伝子群は、NT から T4 までのクラスターと T5 から T6 までのクラスターとに大別された。さらに前者はペプシン処理の違いとパンクレアチン・胆汁処理の違いによって分けられた。次いで隣接する処理間において見られる遺伝子群の変動に注目して統計学的検討をおこなったところ、発現量 2 倍以上で、かつ統計学的有意差が認められた遺伝子数 (と、そのうち qRT-PCR によって発現確認がなされた遺伝子数) は、S1: 上昇 34 (21)・下降 18 (12)、S2: 上昇 46 (32)・下降 2 (1)、S3: 上昇 98 (71)・下降 23 (9)、S4: 上昇 87 (66)・下降 21 (12)、S5: 上昇 101 (90)・下降 75 (39)、S6: 上昇 66 (49)・下降 58 (37) であった。

これらすべてにアノテーションがなされていないが、発現量が上昇した遺伝子群の上位についてみると、S1 から S2 では切断ポリアデニル化特異因子やヘリカーゼ、テトラスパニン、上皮成長因子、膜貫通受容体、トランスコロン、S3 から S4 では脂質ラフト関連たんぱくやジンクフィンガー、カドヘリン、細胞接着分子、S5 ではグルコースやアミノ酸の輸送に関連する遺伝子群の発現上昇がそれぞれ認められた。

D. 考察

すでに述べたように、エキノコックスの原頭節がもつ二方向性分化は、病原性の発揮を含め、

この寄生虫の生物学的特徴となっている。それにもかかわらず、いずれの方向へ分化したのかは、これまで形態学的な変化の観察にもとづいてのみ判断されるものであり、いつ分化が決定しているのか明らかでなかった。

今回、終宿主体内での発育を模した各種処理によって引き起こされる遺伝子発現の変化を観察した結果、S4 (処理 II) までは形態形成にかかわる遺伝子群に発現上昇が認められること、さらにそれ以降の S5 (処理 III) では、形態形成関連遺伝子に代わり、糖などの膜輸送関連の遺伝子に顕著な発現亢進が認められることから、S4 までの成虫型への分化方向が決定しているものと考えられた。

残念ながらエキノコックスのゲノムプロジェクトがまだ進行中であるが、今後ゲノムアノテーションが早期に整備され、本研究で観察された個々の変動遺伝子間の関係が解明されることが望まれる。

E. 結論

成虫型へ分化誘導したエキノコックス原頭節についてマイクロアレイによる遺伝子発現量の変化を測定し、分化の決定がなされる時期を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

狂犬病ウイルス抗原を簡易に検出する single chain variable fragment (scFv)を利用した
Direct, rapid immunohistochemical test (DRIT) 法の確立に関する研究

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長
研究協力者：加来義浩 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
野口 章 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官

研究要旨：現在、世界の狂犬病患者の 98%はイヌの咬傷が原因とされており、流行地域の検査機関では、発症を疑うイヌ症例の診断を日常的に行っている。近年注目されている狂犬病ウイルス (RABV) 抗原検出法のひとつに、測定が簡便で高価な蛍光顕微鏡を必要しない Direct, rapid immunohistochemical test (DRIT) がある。本研究では、RABV 蛋白質を特異的に認識するビオチン融合タンパク化した single chain variable fragment (scFv)を使用して、DRIT をより簡易化する方法を検討した。これまでに、大腸菌を利用してビオチン融合タンパク化した抗 RABV-P タンパク scFv を発現できるクローン (scFv-P19-biotin) を作出することに成功した。現在、大腸菌で発現させた scFv-P19-biotin タンパクを利用した DRIT 法の確立を進めている。

A. 研究目的

狂犬病患者の 95%以上がイヌの咬傷が原因であり、狂犬病が疑れるイヌに咬まれたヒトは暴露後の予防接種 (PEP) を速やかに開始しなければならないが、加害犬の狂犬病診断を現場で迅速に行うことができれば PEP を中止することができる。

近年、迅速抗原検出法「DRIT 法 (a direct, rapid immunohistochemical test)」が開発されて、蛍光顕微鏡を使用しない安価で簡易な検査法として発展途上国の検査機関で普及が期待されている。そこで、本研究では上記 DRIT 法をより安価かつ簡易な検出系とするために、single chain variable fragment (scFv) を利用した改良型 DRIT 法の開発を検討している。

一昨年度、精製した 4 クローンの抗 RABV-P scFv と 1 クローンの抗 RABV-N scFv をビオチン標識した DRIT 法を構築して、狂犬病ウイルスの抗原を RABV 感染マウス脳の塗抹標本を使用して特異的に検出することに成功した。

今回、検出に使用する抗体にビオチンを簡易に標識する方法として、上記 5 クローンの scFv 遺伝子を PinPoint Xa-3 ベクター (Promega) にクローニングして、大腸菌内で scFv をビオチン化する系の確立を検討した。

B. 研究方法

1) 抗 RABV-P 蛋白質、抗 RABV-N 蛋白質 scFv の発現確認

4 クローンの抗 RABV-P scFv (P19, P38, P80, P115)、1 クローンの抗 RABV-N scFv (N1) 遺伝子をクローニングした PinPoint Xa-3 ベクターを、大腸菌 JM109 に導入した。

①小容量培養：上記の大腸菌を 50ml の LB 培地で培養後、IPTG (最終濃度 9mM) で 30°C で 4 時間誘導し、NB-scFv の発現を試みた。菌液を遠心し、回収したペレットを lysis buffer で処理した後、Talon-His isolation kit (Life Technologies) を用いて、His タグ標識蛋白質である NB-scFv を精製・回収した。蛋白質濃度を測定し、SDS-PAGE で発現を確認できたクローンについては、②の大容量培養を行った。

②大容量培養：上記の大腸菌を 2l の LB 培地で培養後、前述の条件で NB-scFv の発現を試みた。菌液を遠心し、回収したペレットを lysis buffer で処理した後、Ni-NTA (Qiagen) を用いて、scFv を精製・回収した。蛋白質濃度を測定し、SDS-PAGE で発現を確認した。その後、Western blotting を行い、Avidin-HRP を用いて免疫染色することにより、NB-scFv が実際にビオチン化されているかを確認した。

2) NB-scFv (scFv-P19-biotin) の RABV-蛋白質

への結合能の確認

精製した大腸菌発現 RABV-P を SDS-PAGE に供し、Western blotting を行った。メンブレンを scFv-P19 および scFv-P19-biotin により免疫染色を行い、各 scFv 分子の RABV-P への結合能を確認した。1 次抗体として各 scFv、2 次抗体として Protein-L-HRP を用いた。

3) NB-scFv (scFv-P19-biotin) の DRIT における反応性の確認

① RABV 感染細胞 96 穴プレートの作製

マウス神経芽腫由来 MNA 細胞を 96 穴プレートに播きこみ、confluent になった状態で RABV CVS11 株を接種した。48 時間後に培養上清を取り除いた後、細胞をアセトンで固定した。陰性対照として、非感染 MNA 細胞を播きこんだプレートも同様に処理した。

② DRIT

上記プレートに、scFv-P19-biotin を反応させ、Streptavidin-peroxidase complex (KPL)、AEC (Sigma) を用いて検出した (プロトコールの詳細は図 1 を参照)。scFv-P19-biotin は 4 段階 (280, 56, 28, 14 μ g/ml) に希釈し、50 μ l/well で使用した。また陽性対照として、DRIT 従来法に用いている精製抗 RABV-N polyclonal IgG (同仁化学 Biotin Labeling Kit-NH2 で標識済み) を使用した。

C. 研究結果

1) 抗 RABV-P 蛋白質、抗 RABV-N 蛋白質 scFv の発現確認

上記 5 クローンのうち、小容量培養でビオチン融合 scFv の発現が確認できたのは、P19 のみであった (data not shown)。そこで、P19 について大容量培養を行い、発現の確認を行った。SDS-PAGE により、約 45kDa の NB-scFv が確認できた (図 2 左)。蛋白質濃度は 0.28mg/ml であった。また、Western blotting および Avidin-HRP を用いた免疫染色により、同じ分子量のバンドが検出できたことから、P19-biotin が実際にビオチン標識されていることが確認できた (図 2 右)。

2) NB-scFv (scFv-P19-biotin) の RABV-P 蛋白質への結合能の確認

Western blotting および scFv-P19 / scFv-P19-biotin を用いた免疫染色により、約 40kDa の RABV-P 蛋白質が確認できた (図 3)。このことから、NB-scFv (scFv-P19-biotin) でも、scFv-P19 同様、RABV-P 蛋白質に対する結合能を保持していることが確認された。

3) NB-scFv (scFv-P19-biotin) の DRIT における反応性の確認

scFv-P19-biotin で染色した RABV 感染細胞においては、いずれの抗体濃度においても RABV 抗原を検出することはできなかった。一方、ビオチン標識済み抗 RABV-N polyclonal IgG で染色した場合、RABV 感染細胞において、特異的に RABV 抗原を検出することができた (図 4)。

D. 考察

今年度、昨年度に作製した NB-scFv 発現用プラスミド (PinPoint Xa-3 ベクター) 5 クローンを利用して、scFv のビオチン標識を行った。

検討した 5 クローンのうち scFv-P19-biotin のみで NB-scFv の発現が確認されており、ビオチン標識についても Western blotting と免疫染色による RABV-P 検出によって確認できた (図 2 右)。しかしながら、同クローンを DRIT に利用したところ RABV 抗原を検出することができなかった。

非標識の scFv-P19 を大容量培養後に精製した際の蛋白質濃度は 4.84mg/ml であったが、scFv-P19-biotin を精製した際の濃度が 0.28mg/ml であったことから、DRIT で RABV 抗原を検出できなかった理由として scFv-P19-biotin の発現量が著しく低かったことが考えられる。また、これ以外にビオチン化タグが付加したことで scFv の affinity が低下している可能性も考えられた。

一般的に、大腸菌発現系における蛋白質の発現効率は、蛋白質自身の性質のほか、発現プラスミドと大腸菌種の組み合わせで決まることから、① scFv 遺伝子をコードした PinPoint Xa-3 ベクターを、異なる大腸菌を用いて発現させる、② PinPoint Xa-3 ベクターにクローニングした scFv 遺伝子およびビオチン化ペプチドタグ遺伝子を、phagemid pIT2 にリクローニングし、大腸菌 HB2151 により発現させることが今後の課題と考えられた。

E. 結論

本研究では、DRIT 法をより安価かつ簡易な検出系とするために、PinPoint Xa-3 ベクター (Promega) を利用してウイルス抗原の検出に使用する single chain variable fragment (scFv) のビオチン標識を大腸菌内で行う系の確立を試みた。今回、ビオチン標識された NB-scFv を発現するクローン

(scFv-P19-biotin) の作出に成功したが、DRIT に利用した際に RABV 抗原を検出することができなかつた。

現在、DRIT で RABV 抗原を検出できなかつた理由を明らかにするために、scFv-P19-biotin の発現量の改良とビオチン化タグによる scFv の affinity への影響を検証している。

PinPoint Xa-3 ベクター (Promega) を使用して大腸菌内で scFv をビオチン化する系は、ビオチン標識の簡易化とともに、大腸菌を利用することによってビオチン化 scFv を大量に発現・精製できる利点がある。

したがって、本研究によって、安価・大量にビオチン化 scFv を生産することが可能になれば、発展途上国の検査機関で DRIT の普及が容易となり、近隣アジア諸国における狂犬病対策が促進され、わが国への狂犬病の脅威が低減するといった波及効果をもたらし、わが国の公衆衛生行政に多大な貢献をするものと考えられた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

なし

2 口頭発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1: 本研究で用いたDRIT プロトコール

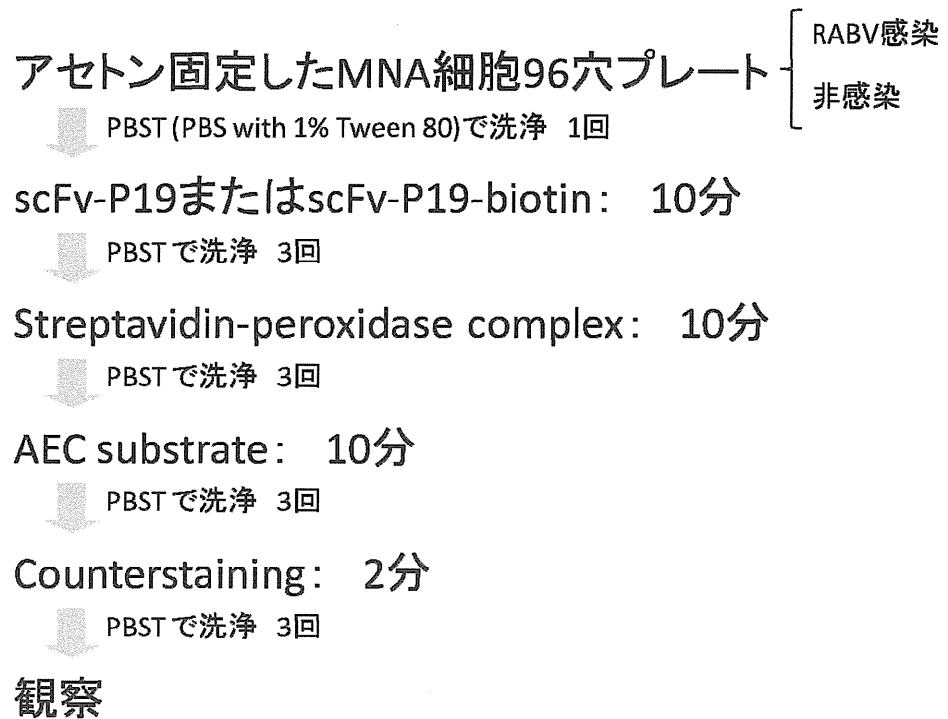


図2: NB scFv (scFv-P19-biotin) : 大腸菌発現 + 精製

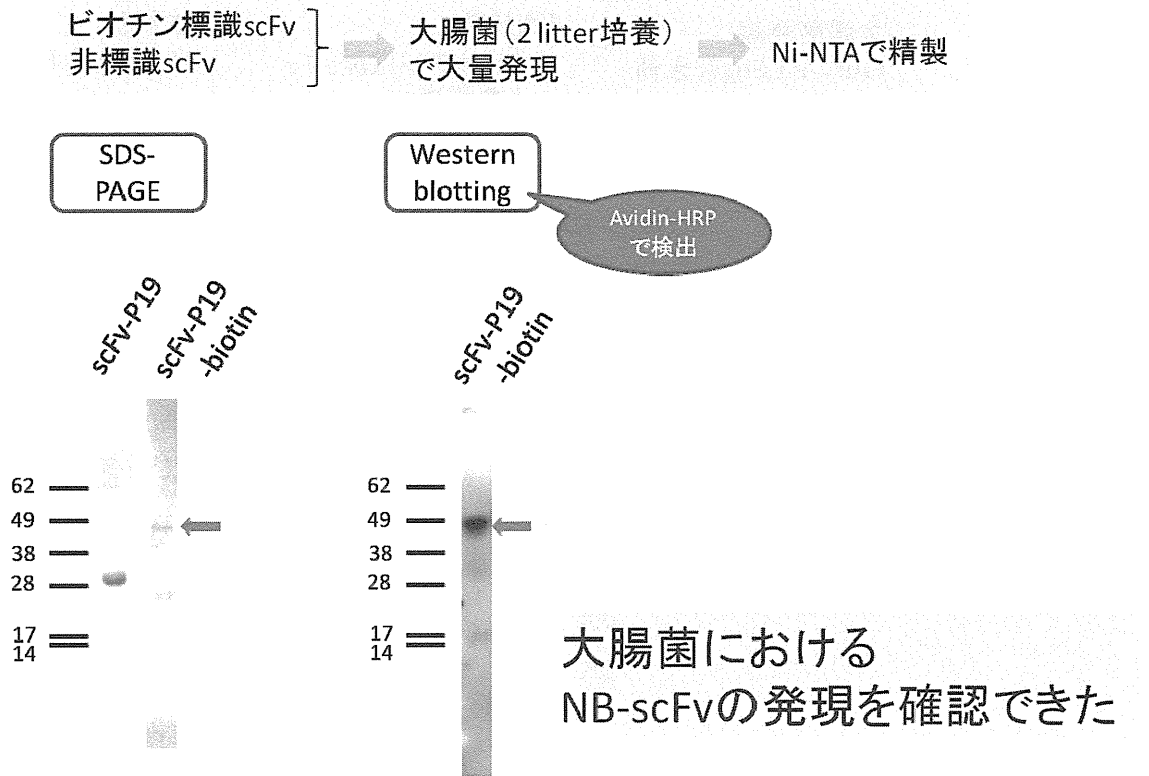
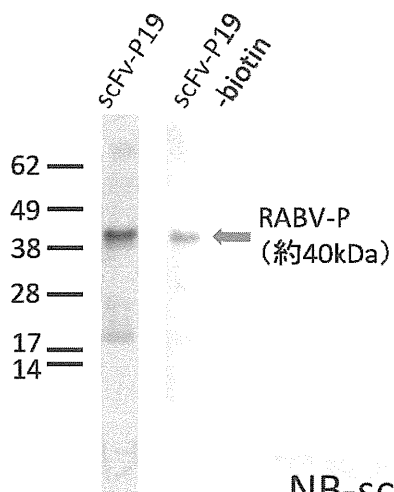
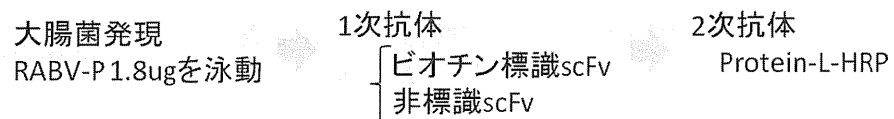
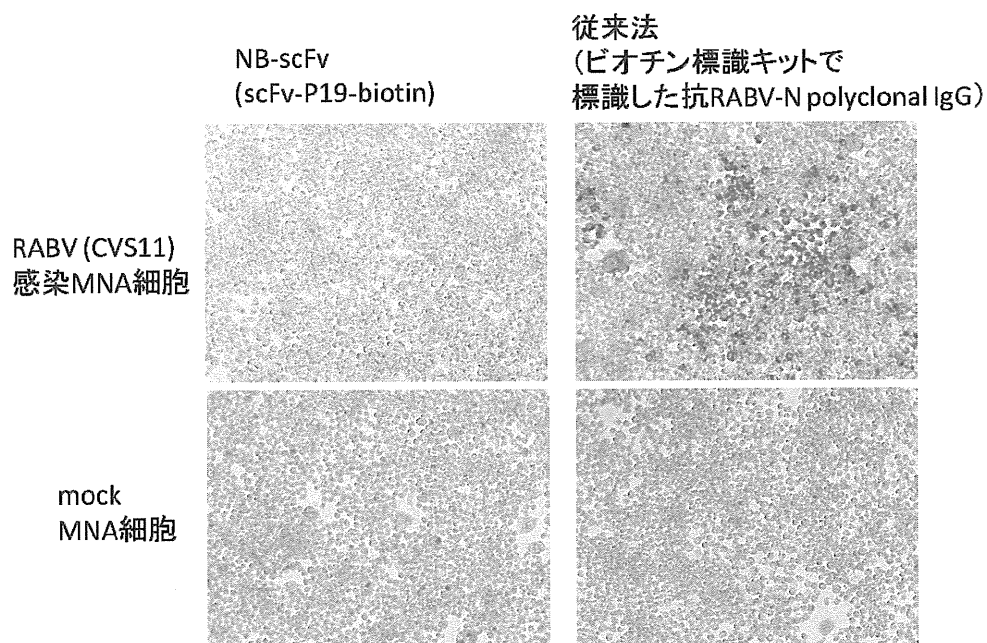


図3: NB scFv (scFv-P19-biotin) : RABV-Pへの結合能



NB-scFv (scFv-P19-biotin)は
RABV-P蛋白質に結合できる

図4: NB scFv (scFv-P19-biotin) : DRITでの反応性



NB-scFv (scFv-P19-biotin)は
RABV-P抗原を検出できなかった

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）
分担研究報告書

狂犬病曝露後免疫 4 回接種法の検討

分担研究者	感染症科	菅沼明彦	がん・感染症センター都立駒込病院
協力研究者	小児科	高山直秀	がん・感染症センター都立駒込病院
協力研究者	感染症科	柳澤如樹	がん・感染症センター都立駒込病院

研究要旨：世界保健機関（WHO）は、狂犬病ワクチン接種歴を有しないものへの狂犬病曝露後免疫に狂犬病ワクチンの 5 回接種を推奨しているが、2009 年に米国では、曝露後免疫を原則 4 回接種への減量することが推奨された。本研究は、海外の狂犬病常在地にて動物咬傷を受傷したもので、狂犬病ワクチン接種歴がないものを対象とし、海外産及び国内産ワクチンを用いた 4 回接種による曝露後免疫について、4 回接種後 2 週間（5 回接種時）に抗体を測定し、その効果を検討した。対象は 18 例（男性 13 例、女性 5 例）、平均年齢 38.1 歳（20-68）であり、渡航地は全例アジア地域であった。国産ワクチンのみ実施されたもの 9 例、海外産ワクチン接種後に国産ワクチンが接種されたもの 9 例であった。全 18 例の狂犬病抗体幾何平均 1.36EU/mL、抗体陽転率（有意抗体価 0.5EU/mL 以上）16 例（89%）であった。狂犬病は発症すると致死性であり、曝露後免疫により限りなく 100%に近い抗体陽転率が求められることから、現時点において 4 回接種法は容認しがたいと思われた。

A.背景

狂犬病は、狂犬病ウイルスによる人獣共通感染症であり、致死的な中枢神経感染症を引き起こす。

昭和 31 年以降、ヒト及び動物の国内感染例は報告されていないが、世界的には途上国を中心に毎年 7 万人以上の感染者が発生していると推測されている。

発症前に狂犬病ウイルスの感染を診断することは不可能であり、狂犬病発症後の治療法も確立されていない。このため、狂犬病常在地域で、狂犬病に感染した動物、または狂犬病に感染する可能性がある動物により受傷した場合は、適切な狂犬病曝露後免疫が必要である。

WHO は、曝露後免疫として、組織培養ワクチンを用いた 5 回接種（0、3、7、14、30 日）を推奨している。国産狂犬病ワクチンは、これに 90 日での接種を加えた、6 回接種が指示されている。

米国においても、1980 年代より 5 回接種による曝露後免疫が採用されていたが、2010 年 3 月に米国の ACIP(Advisory committee on immunization practices)は、狂犬病曝露後免疫における狂犬病ワクチンの接種回数を 4 回（0、3、7、14 日）へ減量することを勧告した（表 1）。¹⁾ 4 回接種法を推奨する根拠として、1) 動物実験で接種回数にかかわらず発症予防効果を認めた、2) ヒト臨床研究で接種後 14 日に十分な中

和抗体価が得られた²⁾、3) 疫学的サーベイランスにて5回未満の狂犬病ワクチン接種とヒト由来抗狂犬病免疫グロブリンを投与したもので狂犬病発症者は確認されなかった³⁾、4) 5回目接種の省略により、渡航費用の軽減、勤務時間減少の抑制、医療従事者の診療時間の確保、ワクチンによる副作用の減少が得られる⁴⁵⁾、などを上げている。また、狂犬病暴露後免疫失敗例の多くは、顔面、頸部を受傷し、ほとんどが受傷後28日以内に発症していることから、5回目接種が発症予防に寄与しなかったことが示されている。⁶⁾

現時点において、WHOは4回接種法を追認していないが、世界的に狂犬病曝露後免疫を再検討する契機になりうると考えられる。今回、国内における狂犬病曝露後免疫希望者での4回接種法の効果を検討したので報告する。

方法

狂犬病流行地域において、狂犬病の可能性を有する哺乳動物に曝露され、狂犬病曝露後免疫を開始し、当院での接種継続を希望されたものを対象とした。曝露後免疫が、現地において海外産ワクチンにより開始されたものと、帰国後に国産ワクチンにより開始されたもののいずれも検討の対象とした。曝露前に狂犬病ワクチン接種歴を有するものは除外した。

4回接種の効果を判定するため、4回接種2週間後となる5回接種時に採血を行い、検体を採取した。採取された検体を用いて、一般財団法人化学及血清療法研究所において狂犬病抗体価が測定された。狂犬病抗体価の測定には、Platelia Rabies

II ELISA (Bio-Rad社)を用いた。狂犬病発症予防に必要とされる有意抗体価は、0.5EU/mLとした。

結果

対象は18例(男性13例、女性5例)、平均年齢38.1歳(20-68)であり、渡航地は全例アジア地域であった。国産ワクチンのみ実施されたものが9例、海外産ワクチン接種後に国産ワクチンが接種されたものが9例であった。現地にてヒト狂犬病免疫グロブリンが投与された例を1例認めた。全18例の狂犬病抗体幾何平均1.36(EU/mL)、抗体陽転例(0.5EU/mL以上)16例(89%)であった。

考察

本研究では、国内における狂犬病曝露後免疫の4回接種の効果をみるため、4回接種2週間後に実施される5回接種時に狂犬病抗体を測定した。米国では、標準法であるRFFIN法による中和抗体を採用し、ELISA法を推奨していないが、中和抗体法は迅速、かつ簡便に行いえない難点がある。今回、Platelia Rabies II ELISA (Bio-Rad社)にて抗体検査を実施したが、標準法との相関性が良好であることが複数の報告により示されている。⁷⁾⁸⁾

国内における狂犬病曝露後免疫は、基本的に海外での動物咬傷を理由として行われることから、海外産ワクチンに引き続いて、国産ワクチンの接種が行われるケースが少なくない。このため、国産ワクチンのみでの曝露後免疫の効果を見ることだけでは現実に即しておらず、海外産ワクチンを接種した後に国産ワクチンを接種したのものも検

討する必要がある。これまで、暴露後免疫 5 回接種法の評価を、国産ワクチンのみの群と海外産ベロ細胞由来ワクチンまたはトリ胚細胞由来ワクチンを接種後に国産ワクチンにて継続接種した群において検討した高山らの報告では、両群とも 5 回接種後 2 週間での抗体陽転率は 100%を示しており、従来法の高い有効性が証明されている。⁹⁾

今回の結果から、4 回接種後 2 週間での狂犬病抗体価が狂犬病抗体幾何平均 1.36EU/mL、抗体陽転率（有意抗体 0.5EU/mL 以上）16 例（89%）との結果が得られた。狂犬病は発症すると救命が困難であるため、狂犬病ワクチンによる暴露後免疫の実施が、狂犬病発症予防に極めて重要である。このため、暴露後免疫により限りなく 100%に近い抗体陽転率が求められることから、上記の結果は容認しがたい。

有意抗体価に満たなかった 2 例は、いずれも海外産ワクチン接種後に国産ワクチンを継続したものであるが、症例数が少ない

ことから、国産ワクチンのみを接種した症例と比較することは困難である。

約 9 割に抗体の陽転化を認めたことから、中和抗体との相関性が良好で、迅速かつ簡便な抗体検査が実施可能ならば、これを基準として、多くの症例で 5 回目の狂犬病ワクチン接種を回避できる可能性があるが、この条件に合致した検査法はない。

今回は対象が少数例にとどまったため、患者背景及び接種ワクチンの差異などによる抗体産生への詳細な分析は行いえなかったが、国内における狂犬病暴露後免疫として、従来の 5-6 回接種を継続することが現実的な対応と考える。

<文献>

- 1) Rupprecht CE, et al. Use of a reduced (4-dose) vaccine schedule for postexposure prophylaxis to prevent human rabies: recommendations of the advisory committee on immunization Practices. *MMWR Recomm Rep.* 2010; 59: 1-9.
- 2) Charles E. Rupprecht, et al. Evidence for a vaccine schedule for human rabies post-exposure prophylaxis in previous non-vaccinated individuals. *Vaccine* 2009; 27: 7141-8.
- 3) Kis Robertson, et al. Seroconversion following incomplete human rabies postexposure prophylaxis. *Vaccine* 2011; 29: 6523-6526
- 4) Krebs JW, et al. Causes, costs and estimates of rabies postexposure prophylaxis treatments in the United States. *J Public Health Manag Pract* 1998; 4: 56-62.
- 5) Dhankhar P, et al. Cost effectiveness of rabies post exposure prophylaxis in the United States. *Vaccine* 2008; 26:4251-5.
- 6) Wilde H. et al, Failure of post exposure rabies prophylaxis. *Vaccine*

2007; 25: 7605-9.

- 7) Yanagisawa, N., et al. Pre-exposure immunization against rabies using Japanese rabies vaccine following the WHO recommended schedule. J Infect Chemother 2010; 16: 38-41.
- 8) Ryan J. Welch, et al. An evaluation of two commercially available ELISAs

and one in-house reference laboratory ELISA for the determination of human anti-rabies virus antibodies. J Medical Microbiol 2009, 58, 806-810

- 9) 高山直秀ら、外国製狂犬病ワクチンに引き続き国産狂犬病ワクチンで狂犬病暴露後発症予防を受けた人々における抗狂犬病抗体価. 感染症学雑誌 2002 年第 76 卷 P882-887

表 1 <変更された狂犬病曝露後免疫のスケジュール>

接種の既往	処置	対応
なし	創部の洗浄	直ちに流水と石鹼にて直ちに洗浄する。 可能ならば抗ウイルス作用のある消毒薬を使用する。
	HRIG	20IU/kg を可能ならば全量創部周辺に浸潤させる。 残量がある場合はワクチン接種部より離して筋注する。
	ワクチン	HDCV または、PCECV 1.0ml を 0、3、7、14 日に接種する。*
あり	創部の洗浄	直ちに流水と石鹼にて直ちに洗浄する。 可能ならば抗ウイルス作用のある消毒薬を使用する。
	HRIG	投与しない。
	ワクチン	HDCV または PCECV1.0ml を 0、3 日に接種する。

HRIG : ヒト由来抗狂犬病免疫グロブリン

HDCV : ヒト 2 倍体細胞ワクチン

PCECV : ニワトリ杯細胞ワクチン

* 免疫不全を有す場合は、0、3、7、14、28 日の 5 回接種を行う