

アジアネット
平成 25 年度 分担研究報告書

分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 発現型シュードタイプ VSV を利用した
狂犬病ウイルス中和試験法の開発

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長
協力研究者：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
濱本紀子 国立感染症研究所獣医科学部、研究生

研究要旨：狂犬病ウイルス (RABV) の中和抗体検査は、イヌの輸出入検疫、地域における免疫保有率の調査等で行われている。現在一般的に行われている RABV 中和抗体検査は、1) 感染性ウイルスを用いる必要がある、2) 蛍光抗体および蛍光顕微鏡を必要とする、3) 測定に手間がかかる、等の課題がある。そこで、より安全かつ簡便に中和抗体を測定できるよう、分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 発現型シュードタイプを利用した中和試験法の開発を試みた。被検血清として狂犬病ワクチン接種イヌ・ヒト血清、対照血清としてイヌ・ヒトの非免疫血清を用いた。Threshold 値、cut-off 値等の陰性 / 陽性判定の基準を定め、各検体に本法を実施した。得られた SEAP 減少曲線を用いて中和抗体価を算出し、従来の中和抗体測定法である RFFIT 法の結果と比較した。その結果、本法の感度・特異性は高く、抗体価についても高い相関を示した。これらから、本法は、安全・簡便かつ多検体処理が可能な中和試験法として期待され、将来的にはイヌや野生動物の抗体サーベイ等に応用可能だと考えられる。

A. 研究目的

狂犬病は、ラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される狂犬病ウイルス (Rabies virus; RABV) を原因とする神経疾患である。RABV は、あらゆる哺乳類に感染することが知られているが、ヒト症例の大半は、発症したイヌからの咬傷に由来する。これまで治療法は確立しておらず、発症後の致死率はほぼ 100%であることから、本症の対策の基本はワクチン接種となる。ヒトでは、感染直後の適時のワクチン接種(曝露後免疫)により発症阻止が可能であるとともに、流行地に渡航する際は事前のワクチン接種が有効な対策となる。またイヌでは、日本の狂犬病予防法では、生後 90 日以上全てのイヌに、毎年ワクチン接種を義務づけており、イヌの輸出入時には血清検査を行い、基準値以上の中和抗体価を保持している必要がある。

狂犬病の中和抗体価の測定は、現在、Rapid

Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) や Fluorescent Antibody Virus Neutralization (FAVN) 等の感染性ウイルスを用いた方法が広く行われており、イヌの輸出入時の抗体検査や、研究目的でヒトのワクチン接種後の抗体モニタリング等に利用されている。これらの方法の基本的な流れは、1) ウイルスを被検血清と混和し、2) 細胞に接種し、3) ウイルス蛋白質を蛍光抗体で染色し、4) 感染細胞を確認する、というものである。しかし、これらの方法には、「作業者に感染リスクがある」「蛍光顕微鏡が必要となる」「96-well プレート上で 1 ウェルずつ観察するため、多検体処理が困難である」といった問題がある。そこで、我々は感染性ウイルスの代わりに、RABV-G 蛋白質を外套したシュードタイプ VSV を用いて、安全・簡便かつ多検体処理可能な中和試験法を確立することを目指した。

B. 研究方法

1) シュードタイプの作製

RABV 固定毒 CVS11 株の表面糖蛋白質 (RABV-G) を外套した SEAP 発現シュードタイプ VSV ("VSV-CVS11-SEAP") を、以下の要領で作製した。まずヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞に、RABV-CVS11 株 G 蛋白質の発現プラスミドを transfection した。48 時間後に、VSV の G 蛋白質を外套した SEAP 発現 VSV シュードタイプ ("VSV-dG-SEAP") を接種した。MEM 培地で 3 回洗浄後、2% FCS-MEM を加え、24 時間培養し、上清を回収した。上清は遠心 (1,600g, 10 分) 後、0.45mm フィルターを通して細胞塊を除き、-80 に保存した。

2) 中和試験

i) 血清

イヌ血清は、被検血清として a) 東京都動物愛護相談センター城南島出張所より提供された収容犬の血清 111 検体、b) 民間の実験動物繁殖施設より購入したワクチン未接種ビーグル犬血清 10 検体を使用した。a) は、提供を受けた数百の検体について、まず RFFIT 法で中和抗体価を算出したうえで、さまざまな抗体価を含むよう配慮して 111 検体を選択した。

ヒト血清は、国立感染症研究所職員からボランティアを募り、提供を受けた血清を使用した (国立感染症研究所「ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会」により承認済み)。この中には、同一ボランティアより提供された、採血時期の異なる血清も含まれる。提供血清はナンバリングして匿名化し、これまでのワクチン接種歴の有無に関する情報以外は検体に付与しなかった。上記のイヌ血清同様、まず RFFIT 法で中和抗体価を算出したうえで、さまざまな抗体価を含むよう配慮して 32 検体を選択した。このうち、10 検体がワクチン未接種提供者の血清であった。

ii) 中和試験

適正濃度に調製したシュードタイプを、2 倍階段希釈した被検血清と混和し、37 で 1 時間反応させた後、96 穴プレート上のマウス神経芽腫由来 MNA 細胞に 3 ウェルずつ接種した。各プレートには、無血清対照 (適正濃度に希釈したシュード

タイプのみ) を 3 ウェルずつ、培地対照 (培地のみ) を 3 ウェルずつ配置した。24 時間後に培養上清を回収し、発色基質 (Sigma 社、SIGMAFAST p-Nitrophenyl phosphate Tablets) を加えた。37 で 2 時間静置後、ELISA プレートリーダーで OD 値 (OD_{405}) を測定した。

iii) 中和抗体価の算出・比較

まず被検血清 / 無血清対照の OD 値から、培地対照ウェルの OD 値の平均を差し引いたうえで、被検血清の OD 値を、無血清対照の OD 値を 100 としたときの相対値で表わした。次にグラフ作成ソフト (Graphpad 社、Prism 5) を利用して、横軸に血清の希釈倍率を、縦軸に OD 相対値をプロットし、反応曲線を作成した。被検血清の OD 値が、無血清対照ウェルの OD 値と比較して 75% 減少したとき、すなわち「無血清対照ウェル OD 値の 25%」の血清希釈 (cut-off 値) を中和抗体価とした (後述)。双方で得られた中和抗体価を比較するため、表計算ソフト (Microsoft 社 Excel 2007) を用いて相関係数を算出した。

C. 研究結果

1) cut-off 値 / threshold 値の設定

cut-off 値は、以前構築した SEAP 発現型シュードタイプ VSV によるニパウイルス (NiV) 中和試験のプロトコール (Kaku et al. J. Virol. Methods 179, pp.226-32, 2012) を参考にして、暫定的に「無血清対照ウェルの OD_{450} 値の 25%」と定めた。まずこの値を用いて threshold 値の検討を行い、矛盾が生じた場合に cut-off 値を見直す、という方針をとった。

続いて、ヒトの陰性血清のうち、ワクチン未接種の 10 検体を用いて threshold 値の設定を行った。これは、中和抗体を含まないはずの検体で、どのくらいの非特異反応が想定されるかをあらかじめ検証し、「中和抗体価の算出に利用する血清希釈」の範囲を設定するためのものである。その結果、ワクチン未接種血清でも、低希釈ではシュードタイプの感染を阻害するものがあり、もっとも顕著なものでは、血清希釈 10 倍で cut-off 値 (無血清対照ウェル OD 値の 25%) を下回っていた (data not shown)。反応曲線が cut-off 値を下回ると中和抗体陽性と判断されてしまうた

め、これらの血清を陰性と判断できるように、threshold 値を「血清希釈 20 倍」に設定した。すなわち、20 倍以下で認められる反応は、非特異反応と定義付け、中和抗体価の算出には利用しないこととした。続いてワクチン未接種のイヌ血清に対しても同様の解析を行い (data not shown)、threshold 値を「血清希釈 5 倍」に設定した。

2) RFFIT との比較

まず RFFIT 法により中和抗体価を算出し、international unit =IU 0.1 を cut-off 値として陰性・陽性血清に分けた。続いて、シュードタイプを用いた中和試験を行い、中和抗体価を算出した。上述の threshold 値の血清希釈 (ヒト血清 ×20、イヌ血清 ×5) までに cut-off 値を下回ったものが陽性、そうでないものを陰性と判定した。

i) イヌ血清

シュードタイプ法で得られた結果を RFFIT 法の結果と比較すると、感度は 100%、特異性は 96.9%であった (図 1)。全 111 検体のうち、双法の結果が食い違ったのは 1 検体であり、これは RFFIT 法の cut-off 値 0.1 にきわめて近い検体であった。双法の抗体価を比較したところ、RFFIT 陽性全 79 検体では、相関係数の 2 乗は 0.773 であった。これを $IU < 10$ の 55 検体に絞ると 0.889 という高い値が得られた (図 2)。

ii) ヒト血清

ヒト血清では、RFFIT 法とシュードタイプ法の結果は全て一致しており、感度 / 特異性はともに 100%であった (図 3)。双法の抗体価を比較したところ、RFFIT 陽性全 21 検体では、相関係数の 2 乗は 0.657 だったが、これを $IU < 5$ の 14 検体に絞ると 0.886 という高い値が得られた (図 4)。

iii) cut-off 値、threshold 値の評価

上述のとおり、本法と RFFIT 法の結果を比較した場合、感度 / 特異性がともに高く、抗体価の相関も高かったことから、「無血清対照ウェル OD 値の 25%」を cut-off 値に、1:5 (イヌ血清) / 1:20 (ヒト血清) を threshold 値とすることは妥当であると考えられた。

D. 考察

本課題では、SEAP 発現型シュードタイプ VSV を用いて、新たな RABV 中和試験を構築するにあたり、初めに中和試験のパラメーターとして、「陽性 / 陰性の境界となる血清希釈」 (cut-off 値) と、「中和抗体価の算出に利用する最低血清希釈」 (threshold 値) の設定を行った。まず cut-off 値について、以前構築した SEAP 発現型シュードタイプ VSV によるヘニパウイルス中和試験のプロトコール (Kaku et al., 2012) を参考にして、「無血清対照ウェルの OD_{450} 値の 25%」としたうえで、threshold 値を検討した。その結果、ヒト血清については 1:20、イヌ血清については 1:5 の threshold 値を得た。ヒト / イヌの threshold 値の違いの原因については不明だが、ヒトは長年にわたる種々の病原体の自然感染のほかに、多種類のワクチン接種を受けていることから、イヌに比べて保有抗体のレパートリーが豊富である可能性があり、その中に RABV 中和抗体と一部交差反応を示すものが含まれていると推測された。

本法をイヌ血清 111 検体、ヒト血清 32 検体に応用し、上記のパラメーターを用いて RABV 中和抗体の有無を判定した結果を、従来の中和抗体測定法 (RFFIT 法) の結果と比較したところ、きわめて高い特異性と感度が得られた (図 1, 図 3)。また、シュードタイプ法で得られた中和抗体価と、RFFIT 法で得られた中和抗体価 (IU) を比較すると、きわめて高い相関が得られた (図 2, 図 4) ことから、本法は新たな RABV 中和抗体測定法の候補になりうると考えられた。しかし、検査機関での実用化に向けては、現在の国際標準である RFFIT 法あるいは FAVN 法との間で、より詳細な感度 / 特異性の検討が必要となる。たとえば、RABV 中和抗体測定法がもっとも一般的に使用され、かつ抗体価が重要な意義をもつのは、イヌの輸出入時における検疫であろう。これまで経験的に、感染防御には $IU > 0.5$ の中和抗体価が必要と考えられてきたことから、日本の動物検疫においては $IU = 0.5$ を指標として輸出入の可否を判定してきた。シュードタイプ法を当該目的で使用するためには、現行法との中和抗体価の相関についても入念に調べる必要がある。本課題においては、RFFIT 法で得られた IU 値を比較対照とし、相関

係数を求めた。RFFIT 法の IU 値は、実際の試験において得られた被検血清の「50% end-point を示す血清希釈」と、陽性対照血清の「50% end-point を示す血清希釈」の比を用いて、陽性対照血清を IU=2.0 として IU に換算したものである。これは、同一被検血清の中和抗体価が試験ごとにばらつくのを防ぎ、データの比較を容易にすることを目的としているが、その一方で、保存・管理条件によっても陽性対照血清の実際の中和抗体価が変動してしまうと、そのまま被検血清の IU 値に反映されてしまう側面がある。そのため、RFFIT の結果として、IU 値ではなく実際に得られた (IU 値に換算する前の) 「50% end-point を示す血清希釈」を用いた場合、本法と RFFIT 法の結果にどのような相関が見られるかについて、現在解析を進めている。

かつて我々は SEAP 発現型シュードタイプを用い、NiV 中和抗体測定試験を構築した際に、シュードタイプ法が (感染性 NiV を用いた) 既存の中和試験に比べて検出感度が高いことを示した。すなわち、結果として表示される中和抗体価を比較した場合、既存法よりもシュードタイプ法のほうが数十倍から数百倍高かった (Kaku et al. 2012)。しかし、今回の RABV 中和試験においては、本法で得られた抗体価と、RFFIT 法で得られた「50% end-point を示す血清希釈」との間に大きな違いは認められなかった (data not shown)。これは、NiV 中和試験と RFFIT 法のシステムの違いによるものと考えられる。NiV 中和試験においては、感染の有無は細胞変性効果 (CPE) の有無で判断され、1 ウェル中に CPE が観察されれば、感染の程度とは無関係に (つまり、CPE が 1 か所でも複数個所でも一様に) そのウェルは「感染陽性」と判定される。一方、CPE を起こすほどには感染が進行していない場合、たとえウイルスが細胞内にエンターし、ウイルス蛋白が合成されていたとしても「感染陽性」とは判定されない。このため、中和抗体陽性と判定されるためには、ウェル全体の CPE を防ぐための多量の中和抗体が必要となることから、結果的に中和抗体価が低く表示される傾向にある。これに対し、RABV は一般的に CPE を起こさないため、RFFIT 法では細胞内のウイルス蛋白を蛍光抗体で検出する。ま

た、同法の基本的な考え方はコロニーリダクション法であるため、ウイルス蛋白の合成レベル (コロニーの数) を減少させる抗体量がそのまま中和抗体価に反映されることから、中和抗体価は高く表示される傾向にある。SEAP 発現型シュードタイプを用いた中和試験は、感染によって合成される蛋白質 (SEAP) 量を減少させる抗体の量が、そのまま中和抗体価に反映されるシステムであり、考え方としては RFFIT 法と同様である。このため、本法と RFFIT 法との比較では、NiV 中和試験との比較で見られたような検出感度の大幅な差異が認められなかったと考えられる。

以上を考えると、SEAP 発現型シュードタイプを用いた RABV 中和抗体測定法のメリットは、感染性ウイルスを必要としない「安全性」、と ELISA プレートリーダーを用いて測定できる「定量性」にある。とくに後者については、ELISA プレートリーダーは途上国の地方検査機関でも普及していることから実用性は高く、また簡便・迅速に測定可能であることから多検体処理も可能にする。本法は、安全・簡便かつ多検体処理が可能な中和試験法として期待され、将来的にはイヌや野生動物の抗体サーベイ等に応用可能だと期待できる。

E. 結論

SEAP 発現型シュードタイプ VSV を用いた RABV 中和試験法は、感染性 RABV を用いず、一般的な ELISA プレートリーダーで簡便に感染価を計測できるため、日本のみならず流行地域でも普及しうる安全で迅速な試験法として期待できる。多検体処理も可能であることから、将来的にはイヌや野生動物の抗体サーベイ等に応用可能だと考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1 Saito, M., Oshitani, H., Orbina, J.R.C., Tohma, T., de Guzman A.S., Kamigaki, T., Demetria, C.S., Manalo, D.L., Noguchi,

- A., Inoue, S., Quiambao, B.P. (2013) Genetic Diversity and Geographic Distribution of Genetically Distinct Rabies Viruses in the Philippines. *PLoS Ne.Trop.Dis.*, 7 e2144
- 2 Nguyen, A.T.K., Nguyen, T.T., Noguchi, A., Nguyen, D.V., Ngo, G.C., Thong, V.D., Olowokure, B., Inoue, S. (2014) Bat Lyssaviruses, Northern Vietnam. *EID*, 20:161-163.
- 2 口頭発表
- 1 Petsophonsakul W., Jaisuda S., Yodgomleo A., Srijun M., Phornwisedsirikun S., Munepo M., Atuntee T., Noguchi A., and Inoue S. A Chiang Mai model for the humane management of rabies control at borders between the forest and city. The 4th Rabies in Asia conference: RIACON 2013. 11-13 Sep, 2013. Bangkok, Thailand.
- 2 Nguyen A.T.K., Nguyen T.T., Noguchi A., Nguyen D.V., Ngo G.C., Thong V.D., Olowokure B., and Inoue S. Survey for bat lyssaviruses in northern Vietnam. The 4th Rabies in Asia conference: RIACON 2013. 11-13 Sep, 2013. Bangkok, Thailand.
- 3 Park, C.H., Yamada, K., Kojima, D., Hassadin, B., Kimitsuki, K., Inoue, S., Nishizono, A. Pathological Study on the Central Nerve System of ddY Mice Intramuscularly Infected with Street Rabies Virus (1088 Strain). 24th the Rabies in the Americas (RITA). 27-31 Oct, 2013. Toronto, Ontario, Canada.
- 4 濱本紀子、飛梅実、加来義浩、宇田晶彦、朴天鎬、野口章、森川茂、井上智。狂犬病ウイルス固定毒 (CVS-26 株) で見られる G 蛋白質 204 番目の N 型糖鎖付加は固定毒に特徴的な細胞からの出芽に關与している。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-12 日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県
- 5 飛梅 実、佐藤由子、長谷川秀樹、濱本紀子、井上 智、野口 章。街上毒狂犬病ウイルスの宿主動物内局在の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-12 日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県
- 6 グエン トウイズオン、河原 正浩、加来 義浩、井上 智、長棟 輝行。増殖誘導型キメラ受容体を用いた狂犬病ウイルス核タンパク質に対するイントラボディ選択。第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 18 日-20 日、広島国際会議場、広島県
- 7 小宮拓巳、山田健太郎、君付和範、井上 智、西園 晃、朴 天鎬。狂犬病ウイルス (1088-N4 14) に感染後耐過した ddY マウスの中樞神経系に関する病理学的研究。第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県
- 8 君付和範、小宮拓巳、井上 智、山田健太郎、西園 晃、朴 天鎬。狂犬病ウイルス (1088-N0) を後肢筋肉内に接種したヌードマウスの中樞神経系および末梢組織病変。第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県
- 9 Nguyen Thi Kieu Anh, Nguyen Vinh Dong, Nguyen Tuyet Thu, Satoshi Inoue, Ngo Chau Giang, Nguyen Thi Hong Hanh, Nguyen Tran Hien. Genetic characterization of rabies virus circulated in Vietnam, 2007- 2012. 第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1 イヌ血清 結果

VSV-CVS11-SEAPを使用

		陽性	陰性	計
RFFIT を使用	陽性(IU \geq 0.1)	79	0	79
	陰性(IU $<$ 0.1)	1	31	32
	計	80	31	111

RFFIT	VSV-SEAP
0.09	20.61

sensitivity: 79/79=100% specificity: 31/32=96.9%

図2 イヌ血清 抗体価の相関

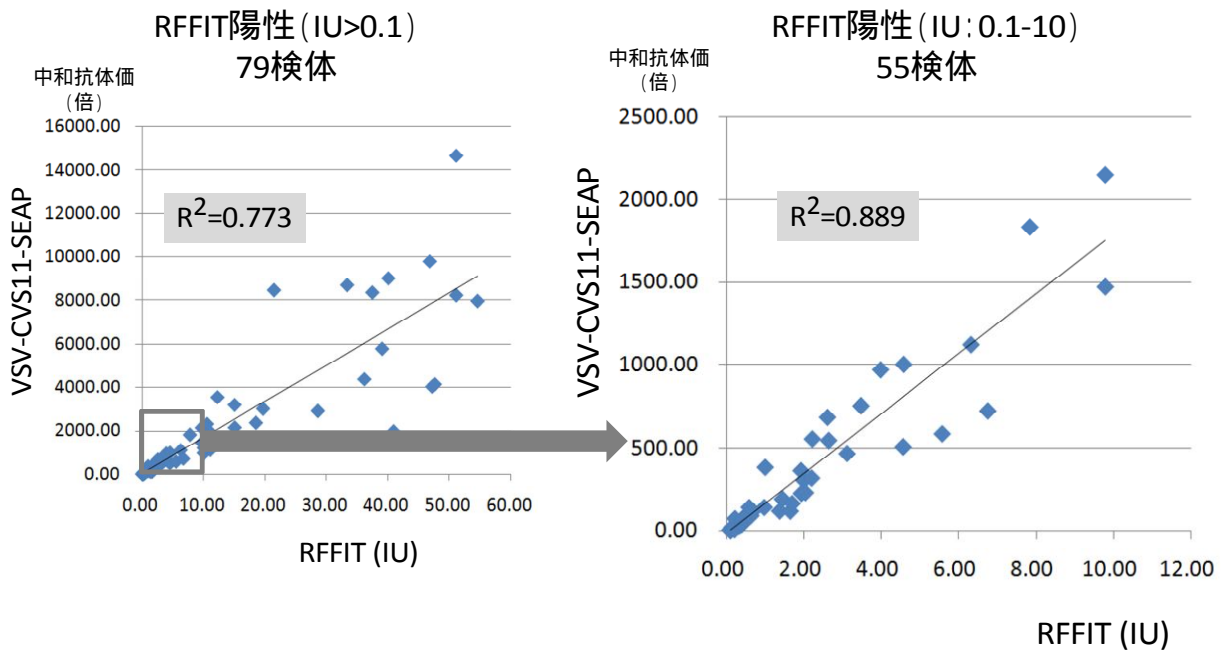


図3 ヒト血清 結果

VSV-CVS11-SEAPを使用

		陽性	陰性	計
RFFIT を使用	陽性(IU \geq 0.1)	21	0	21
	陰性(IU $<$ 0.1)	0	11	11
	計	21	11	32

sensitivity: 21/21=100% specificity: 11/11=100%

図4 ヒト血清 抗体価の相関

