

MERS-CoVレセプター (DPP4)の系統樹

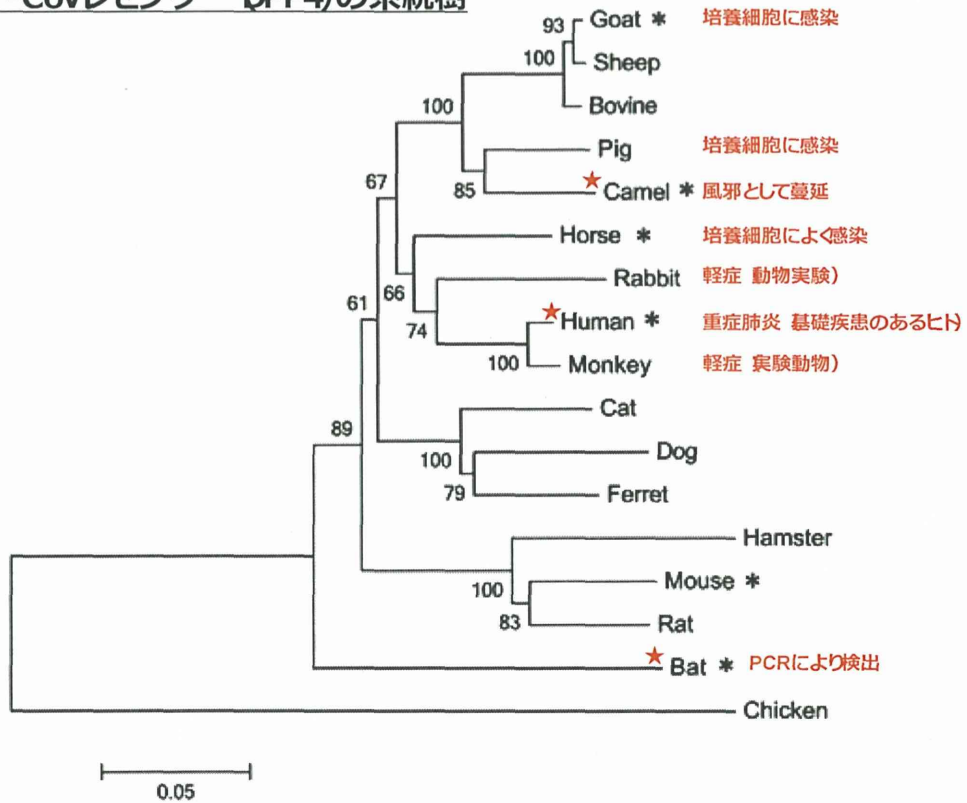


図1 様々な動物の MERS-CoV レセプター (DPP4) 系統樹と MERS-CoV の感染可能性
 上の系統樹の中で、星印をつけた動物は実際に MERS-CoV の感染が確認され、文字で注釈を入れた動物は感染する可能性がある。

上気道細胞の気相液相界面培養

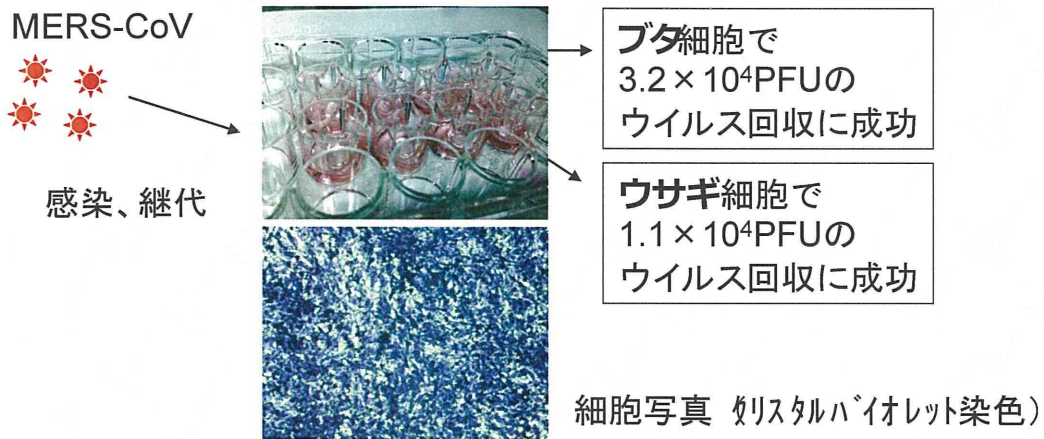


図2. ブタ及びウサギ由来細胞への MERS-CoV 感染実験

100PFU の MERS-CoV を感染させたウサギとブタの上気道細胞(気相液相界面培養)から培地を回収し、ウイルス価を測定したところ、100 倍程度のウイルス価の上昇が見られたが細胞変性は見られなかった。

表 1. 様々な動物由来細胞での MERS-CoV の継代によるウイルスの変化

動物種	細胞名	由来組織	ウイルス価 bg10 PFU/mL ±SD	継代回数	遺伝子変異	検査系への影響 (PCR, LAMP)
ヒト	Calu-3	気道	6.2±0.7	5	ND	無
ヒト	HeLa	子宮	ND	0	-	-
ヒト	HBTE (初代上気道)	上気道	5.7±0.8	5	ND	無
サル	Vero	腎臓	6.6±0.8	5	24499C → A	無
サル	LLC-MK2	腎臓	6.2±0.1	5	ND	無
ブタ	初代上気道	気道	4.5±0.4	1	ND	無
ブタ	PK-15	腎臓	5.3±0.8	5	ND	無
ウサギ	初代上気道	気道	4.0±0.2	2	ND	無
ウサギ	RK-13	腎臓	4.5±0.6	2	ND	無
イヌ	MDCK	腎臓	ND	0	-	-
ハムスター	BHK	腎臓	ND	0	-	-
マウス	DBT	脳	ND	0	-	-
マウス	NH-3T3	皮膚	ND	0	-	-

ND: 未検出, -: データ無し

ニパウイルス感染症の血清診断法

担当責任者： 加来 義浩 国立感染症研究所獣医科学部

研究協力者： 朴ウンシル、木村昌伸 国立感染症研究所獣医科学部

研究要旨：ニパウイルス（NiV）感染症は、1998-99年のマレーシアで新興感染症として発生した後、バングラデシュ、インドで発生している。2014年にはフィリピンでも流行が確認された。国内での患者発生はないが、アジア・アフリカ各地で、自然宿主のオオコウモリから NiV 抗体が確認されていることから NiV は広範囲に分布すると考えられる。NiV 感染症の感染拡大の阻止には発症初期の迅速診断がきわめて重要となるが、NiV は国際的には BSL4 病原体に指定されているため、患者発生国では実験室診断が行えない状況である。国立感染症研究所では、シュードタイプによる代替中和試験、不活化した NiV 抗原による IgG-ELISA は確立しているが、IgM 検出系は確立していない。そこで本課題では、組換え NiV-N 蛋白質をカニクイザルに免疫して IgM 陽性対照血清、IgG 陽性対照血清を作製した。また、組換え NiV-N 蛋白質を用いて IgM 抗体検出系、IgG 抗体検出系を開発し、作製した IgM、IgG 陽性対照血清を用いて評価した。これまで、IgG-ELISA は、豪州の研究機関から分与された不活化 NiV 抗原を用いていたが、今課題により、組換え抗原を用いた IgM-ELISA、IgG-ELISA が開発された。また、NiV-N 蛋白質を恒常的に発現する HeLa 細胞を樹立し、これを用いた蛍光抗体法による IgM、IgG 抗体検出法も開発した。

A. 研究目的：

ニパウイルス（NiV）感染症は、1990年代後半にマレーシアで発生した新興ウイルス感染症で、神経症状、呼吸器症状を主徴とし致死率が高い。ワクチンや治療法がないことから、国際的には BSL4 病原体として分類されている。2014年4月にフィリピン・ミンダナオ島で原因不明の脳炎の流行があり、これまでに7名が死亡している。国立感染症研究所は、豪州家畜衛生研究所とともに、フィリピン熱帯医学研究所の要請を受けて病原体の探索を行った結果、血清検査および遺伝子検査により、本流行の原因が NiV であることを明

らかにし、マレーシア、バングラデシュ、インドに加えてフィリピンも NiV 感染症発生リスクがあることを初めて明らかにした。これまで血清検査の確定診断としては、BSL4 施設において感染性ウイルスを用いた中和試験が実施されてきたが、現在ではシュードタイプ VSV を用いた中和試験も BSL2 施設で実施可能である。しかし、発症後に中和抗体価が上昇するまでに 2-3 週間程度かかることから、発症初期の血清診断では中和抗体を検出できないことがある。また無症候感染や潜伏感染する例もあることから、中和抗体の存在は必ずしも直近の NiV 感染を示唆するものではな

い。このため、発症初期の血清診断には、IgM 抗体の検出が不可欠となる。IgM 検出系としては、これまでに IgM capture ELISA が海外では開発されている。感染研でも同法の導入を検討したが、結果の評価に必要な IgM 陽性対照ヒト患者血清が確保できていないため、現在までに IgM 検出系は整備されていない。一方、感染症法の改正により、4 類感染症であるニパウイルス感染症は地方衛生研究所（地方衛研）でも検査対応をすることが求められることから、地方衛研でも実施可能な迅速診断法を整備する必要が生じた。そこで本研究では、ヒトと血清学的に強い交差性が確認されているマカク属のサルに対して、NiV 蛋白質を免疫し、NiV 特異的 IgM 抗体ならびに IgG 抗体を作製した。さらに、得られた血清を、ヒト患者血清の代替となる陽性対照として利用し、組換え NiV-N 蛋白質を用いた高感度・高特異性の IgM および IgG 検出系を確立することを目指した。将来的には、確立した診断法を、国内での診断基盤の強化のみならず、フィリピンを含むニパウイルス感染症の発生日リスクがある国々に供与し、国際的な本症の診断能力の向上に貢献することが期待される。

B. 研究方法：

1) NiV-N 蛋白質の発現・精製：

NiV-N 遺伝子を挿入したバキュロウイルス発現用トランスファーベクター NiV-N/pFastBac HTc を出発材料として、以下の手順で NiV-N 蛋白質の大量発現および精製を行った。NiV-N/pFastBac HTc は、豪州家畜衛生研究所 (Australian Animal Health Laboratory; AAHL) の Linfa Wang 博士より分与されたものであり、NiV-N 遺伝子の N 末端に His タグが付加されるように設計されている。このベクターより、Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen) を用いてバキュロウイルスを作製し、これを昆虫細胞に接種して、感染細胞から NiV-N 蛋白質を抽出・精製した。一連の流

れを以下に示す。

- ① NiV-N/pFastBac HTc を Bacmid 保有大腸菌株 DH10Bac に導入し、アンピシリン 100 μ g/ml を含む LB プレートで一晩培養する。
- ② 得られたコロニーから組換え Bacmid DNA を抽出する。
- ③ PCR により、Bacmid DNA に NiV-N 遺伝子が挿入されていることを確認する。
- ④ 得られた組換え Bacmid DNA を昆虫細胞 Sf9 に導入し、CPE が生じたら上清を回収し、これを P1 ウイルス (AcMNPV-NiV-N/P1) とする。
- ⑤ P1 ウイルスを Sf9 細胞に接種し、CPE が生じたら上清を回収し、これを P2 ウイルス (AcMNPV-NiV-N/P2) とする。
- ⑥ P2 ウイルスを、T25 フラスコの昆虫細胞 Tn5 に接種し、55 時間後に細胞を回収し、遠心する。
- ⑦ 得られたペレットを 10ml の 1% NP40/PBS で溶解し、氷中で 10 分間静置する。
- ⑧ 6,000rpm で 10 分間遠心し、得られたペレットを 1ml の 2M urea, 1% NP40/PBS で溶解する。
- ⑨ 超音波処理を 20 秒間行う。
- ⑩ 遠心し、上清を回収する。
- ⑪ His-Bind Kit (Novagen) のプロトコールに沿って、上清に Ni-NTA ビーズ (Qiagen) を加える。4 $^{\circ}$ C で 4 時間転倒混和する。
- ⑫ 4 $^{\circ}$ C で 4 時間転倒混和後、His-Bind Kit を用い、Ni-NTA ビーズから NiV-N を回収する。また、バキュロウイルス発現 NiV-N を抗原に用いた ELISA において、陰性対照の固相化抗原として用いている delta-P 蛋白質も、delta-P 発現バキュロウイルスを用いて、上記の⑥～⑩の手順で作製した。

2) サルへの NiV-N 免疫：

カニクイザル雄 2 頭に対し、以下の手順で NiV-N 蛋白質を免疫した。Day 0 に、プレ採血

を行った後、初回免疫として、NiV-N 蛋白質 2mg を含む抗原液とアジュバント (TiterMax Gold) を混合し、背側の 5 か所に皮下投与した。初回投与後、Day5、7、9、11、13、15 に各頭の機側皮静脈または大腿静脈より採血を行った。このうち、Day5、7、9、11、13、15 については抗体価の推移を調べることを目的として 0.5ml ずつ採血し、Day 15 については 30ml ずつを採血した。

(倫理面への配慮)

カニクイザルの免疫作業は、ハムリー株式会社 筑波研究センター 試験研究所にて実施された。試験計画書については、同社の倫理委員会により承認を受けている。

3) 抗体価の測定 :

継時的に得られたサル血清に対して、IgG および IgM を以下の手順で測定した。

i) NiV 感染 Vero 細胞 / 非感染 Vero 細胞 lysate を抗原に用いた IgG 検出 ELISA :

被検血清としてサル No.1、No.2 の Day 0、5、7、9、11、13、15 血清 (1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400 希釈)、陽性対照血清として抗 NiV-N ウサギ血清 (1:1000 希釈) を用いた。血清の希釈には、20% Blocking-one [ナカライ] / 0.05% Tween 20 添加 PBS(-) (PBS-T) を使用した。

- ① ELISA 用プレート (Nunc, Maxisorp) に、PBS(-) で 1:1000 に希釈した NiV 感染 Vero 細胞 lysate (NP40 で可溶性化後、ガンマ線照射により不活化) と、NiV 非感染 Vero 細胞 lysate (同様に作製) を 50 μ l/ウェル添加する。
- ② 4 $^{\circ}$ C で一晩静置し、固相化する。
- ③ PBS-T で 1 回洗浄する。
- ④ ブロッキング液 (20% Blocking-one/DW) を 100 μ l/ウェルずつ添加する。
- ⑤ 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、PBS-T で 3 回洗浄する。
- ⑥ 被検サル血清および陽性対照ウサギ血清を 100 μ l/ウェルずつ添加する。

- ⑦ 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、PBS-T で 4 回洗浄する。
- ⑧ 2 次抗体として、サル被検血清反応ウェルには HRP 標識抗ヒト IgM 抗体を、ウサギ陽性対照血清反応ウェルには HRP 標識抗ヒト IgM 抗体を重層する。
- ⑨ 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、PBS-T で 4 回洗浄する。
- ⑩ 基質液 (ABTS) を 100 μ l/ウェルずつ添加する。
- ⑪ 室温で 60 分間反応させる。その間、定期的に ELISA プレートリーダーで OD₄₀₅ を測定する。

ii) バキュロウイルス発現 NiV-N を抗原に用いた ELISA :

被検血清としてサル No.1、No.2 の Day 0、5、7、9、11、13、15 血清 (1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400 希釈)、陽性対照血清として抗 NiV-N ウサギ血清 (1:1000 希釈) を用いた。血清の希釈には、20% Blocking-one [ナカライ] / 0.05% Tween 20 添加 PBS(-) (PBS-T) を使用した。

ii-a) IgG 検出 ELISA :

- ① ELISA 用プレート (Nunc, Maxisorp) に、PBS(-) で 1:250 に希釈したバキュロウイルス発現 NiV-N を 100 μ l/ウェルを添加する。陰性対照ウェルにバキュロウイルス発現 delta-P を 100 μ l/ウェル添加する。
- ② 4 $^{\circ}$ C で一晩静置し、固相化する。
- ③ PBS-T で 1 回洗浄する。
- ④ ブロッキング液 (20% Blocking-one/DW) を 100 μ l/ウェルずつ添加する。
- ⑤ 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、PBS-T で 3 回洗浄する。
- ⑥ 被検サル血清および陽性対照ウサギ血清を 100 μ l/ウェルずつ添加する。
- ⑦ 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、PBS-T で 4 回洗浄する。
- ⑧ 2 次抗体として、サル被検血清反応ウェル

には HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を、ウサギ陽性対照血清反応ウェルには HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を重層する。

- ⑨ 37°Cで1時間反応後、PBS-Tで4回洗浄する。
- ⑩ 基質液 (ABTS) を 100 μ l/ウェルずつ添加する。
- ⑪ 室温で30分間反応させる。その間、定期的にELISAプレートリーダーでOD₄₀₅を測定する。

ii-b) IgM 検出 ELISA

上記 IgG ELISA と同様に行う。ただし、2次抗体として、サル被検血清反応ウェルには HRP 標識抗ヒト IgM 抗体を、ウサギ陽性対照血清反応ウェルには HRP 標識抗ヒト IgM 抗体を重層する。

iii) 間接蛍光抗体法 (IFA) :

NiV-N 蛋白質発現プラスミド NiV-N/pKS336 を、transfection 試薬 XtremeGENE (ロシュ) を用いて、HeLa-W229 細胞に導入した。導入5日後の細胞をトリピンで消化後、洗浄し、適当数の細胞を14穴ガラススライドに固着させ、アセトン固定を行った。これを抗原スライドとして用い、以下のプロトコールで IFA を実施した。被検血清としてサル No.1、No.2 の Day 0 および Day 15 血清、陽性対照血清として抗 NiV-N ウサギ血清を用いた。

- ① 被検サル血清 (1:10, 1:50 希釈)、陽性対照ウサギ血清 (1:50, 1:200 希釈) を NiV-N 発現スライドに重層する。
- ② 37°Cで1時間反応後、PBSで洗浄する。
- ③ 2次抗体として、サル被検血清反応ウェルには FITC 標識抗ヒト IgM 抗体を、ウサギ陽性対照血清反応ウェルには FITC 標識抗ヒト IgM 抗体を重層する。2次抗体液には、0.002% Evans blue を加え、カウンターステインを行った。

- ④ 37°Cで1時間反応後、PBSで洗浄する。
- ⑤ 蛍光顕微鏡で観察する。

C. 研究結果 :

1) NiV-N 蛋白質の大量発現および精製 :

上述の方法で得られた精製 NiV-N について、精製過程で得られた蛋白質液を SDS-PAGE に供し、クマシー染色を行ったところ、約 60kDa のバンドが確認された (図 1)。ウサギ抗 NiV-N 血清を用いて Western blotting を行ったところ、同様の分子量のバンドが検出されたことから (data not shown)、この蛋白質が NiV-N と推測された。

2) NiV-N 抗体の確認

i) NiV 感染 Vero 細胞 / 非感染 Vero 細胞 lysate を抗原に用いた IgG 検出 ELISA :

NiV 感染 Vero 細胞抗原ウェルの OD₄₀₅ から、非感染 Vero 細胞抗原ウェルの OD₄₀₅ を差し引いて得られた値を、グラフにプロットした (図 2)。サル No.1, No.2 とともに、Day 9 以降の血清において、Day 0 血清と比較して OD₄₀₅ の著しい上昇が認められた。サル No.1 のほうが、No.2 に比べて OD₄₀₅ の上昇幅は大きかった。

ii) バキュロウイルス発現 NiV-N を抗原に用いた ELISA :

ii-a) IgG 検出 ELISA :

各経過血清について、NiV-N 抗原(+)ウェルの OD₄₀₅ から、NiV-N 抗原(-)ウェルの OD₄₀₅ を差し引いた値を算出した。全経過血清が ELISA プレートリーダーの測定上限値 (OD<3.5) 以下に収まっている最低血清希釈 (サル No.1 では 1:6,400、No.2 では 1:1,600) について、得られた結果をグラフにプロットした (図 3)。サル No.1, No.2 とともに、Day 11 以降の血清において、Day 0 血清と比較して OD₄₀₅ の著しい上昇が認められた。サル No.1 のほうが、No.2 に比べて OD₄₀₅ は高かった。

ii-b) IgM ELISA :

1:100 希釈血清について、NiV-N 抗原(+)ウエルの OD₄₀₅ から、NiV-N 抗原(-)ウエルの OD₄₀₅ を差し引いて得られた値を、グラフにプロットした (図 4)。サル No.1 血清だが、Day 11 以降の血清において、Day 0 血清と比較して OD₄₀₅ の上昇が認められた。一方、サル No.2 では OD₄₀₅ の上昇は認められなかった。また、サル No.1 においても、1:200, 1:800, 1:3200 希釈においては、OD₄₀₅ の上昇は確認できなかった。

iii) 間接蛍光抗体法 (IFA) :

サル血清 No.1, No.2 (Day 15) および、陽性対照ウサギ血清反応ウエルにおいて、複数の細胞の細胞質内に蛍光性の顆粒が認められた (図 5)。一方、サル血清 No.1, No.2 (Day 0) では、同様の顆粒は観察されなかった。サル血清 (Day 15) では 1:10, 1:50 希釈の双方で顆粒が観察されたが、1:50 のほうがバックグラウンドの蛍光が低く、Day 0 血清とのちがいは明瞭であった。また Day 15 血清においては、サル No.1 のほうがサル No.2 と比べて、蛍光顆粒を有する細胞数が多かった。

D. 考察 :

本症のように、致死率が高く、治療法も確立していない感染症の疑い例が発生した場合、迅速診断がきわめて重要になる。このため、血清学的には、IgG や中和抗体よりも発症初期の段階で惹起される IgM 検出系の意義はきわめて高い。一部の諸外国では、NiV の IgM capture ELISA 系を開発し、診断に応用しており、上述の 2014 年におけるフィリピンでの流行の際も、AAHL では IgM capture ELISA を実施して、患者 1 名より IgM 抗体を検出した。国立感染症研究所でも、かねてより同検査系の導入を検討してきたが、結果の評価に必要な IgM 陽性対照血清が確保できなかったことから、これまでに IgM 検出系は整備されてい

ない。本症において、特異性の高い IgM 陽性対照血清の確保がきわめて困難であるのは、主に以下の 2 つの理由による。1) 患者血清は、発症中期～後期に採血されることが多いことから、保存されている患者血清中には IgM よりも多くの IgG が含まれている。2) これまでの本症の患者数は、全世界の累計で約 500-600 人程度のみであるうえ、発症初期に採血された患者はきわめて少ない。このような状況から、IgM 陽性対照ヒト血清が大量に確保できる可能性は今後も非常に低いと考え、本課題ではヒト抗体と抗原性が強く交差するマカク属のカニクイザルより IgM 陽性対照血清を得ることを目的に、NiV-N 蛋白質を大量に精製して免疫抗原とし、サル抗血清を作製した。

NiV-N 蛋白質の作製には、バキュロウイルスベクターを利用した。大腸菌由来と異なり、糖鎖付加の点でウイルス由来と近い抗原性状が得られること、哺乳細胞由来に比べて大量の蛋白質が得られることがその理由である。本課題では AAHL より分与された NiV-N 遺伝子を挿入したバキュロウイルス発現用トランスファーベクター NiV-N/pFastBac HTc から、バキュロウイルス AcMNPV-NiV-N を作出し、NiV-N 蛋白質の大量発現を行った。これらをカニクイザル 2 頭に 2mg ずつ接種し、Day 5, 7, 9, 11, 13, 15 に採血を行った。

経時的に得られたサル血清における抗 NiV-N 抗体 (IgM, IgG) の推移は、既存あるいは新規の複数の方法で検出した。まず 1:100 に希釈した各血清に対して、既存の方法である NiV 感染 Vero 細胞/非感染 Vero 細胞 lysate を抗原に用いた IgG 検出 ELISA を行ったところ、経時的な OD 値の上昇が認められ、サル No.1 のほうが No.2 よりも若干 OD 値は高かった。これらの抗原を用いた IgG 検出 ELISA は国際獣疫事務局の病原体検出マニュアルにも記載されていることから、得られた結果には一定の信頼性がある。しかし従来から、数%の偽陽

性反応を伴うこと、NiV 感染細胞 lysate/非感染細胞 lysate 中の蛋白質量に差があると結果を正しく判定できないことなどが指摘されていた。また上記の抗原は AAHL の BSL4 施設で培養・不活化されたものであることから、BSL4 施設が稼働していない国々では生産できないという課題があった。このため、BSL2 以下で生産が可能な組換え蛋白質を抗原とした抗体検出系の構築が待たれていた。

そこで、今回得られたバキュロウイルス発現 NiV-N を用いて、新たに IgG および IgM 検出 ELISA を構築し、サル経過血清からの NiV-N 特異抗体の検出に利用した。陰性対照抗原には Delta-P 発現バキュロウイルス感染 Tn5 細胞を、NiV-N 発現細胞 lysate と同様に処理して得られた蛋白質液を用いた。IgG 検出時と IgM 検出時で 2 次抗体を使い分けた (HRP 標識ヤギ抗ヒト IgG または抗ヒト IgM 抗体) ほかは、基本的なプロトコールは同様にした。IgG 検出 ELISA では、サル No.1 では 1:100~1:6,400 希釈で、サル No.2 では 1:100~1:1,600 希釈で、Day15 までに抗体の上昇が確認された。サル No.1 のほうが No.2 に比べて抗体価が高いという結果は、上述の NiV 感染 Vero 細胞/非感染 Vero 細胞 lysate を抗原に用いた IgG 検出 ELISA と同様であったが、感度は NiV-N 抗原を用いた本法のほうがはるかに高かったことから、今後、迅速な IgG 検出系として有望であると期待できる。

IgM 検出 ELISA では、サル No.1 血清の 1:100 希釈で Day11, 15 において OD 値が上昇していたが、No.2 では OD 値の上昇が確認できなかった。上記の IgG 検出 ELISA の結果から、サル No.1 のほうが NiV-N 特異抗体価が高いことが予想されていたことから、本 IgM ELISA の結果も整合性がとれているとはいえる。しかし一般的に、抗原を直接プレートにコートするよりは、抗ヒト IgM 抗体を用いた capture ELISA 形式のほうが感度・特異性が上がると考えられていることから、将来的には IgM

capture ELISA 形式を採用することにより、サル No.2 においても IgM が検出できる可能性は十分にあると考えられた。

さらに、サル経過血清中の IgM については、IFA でも検出を試みた。IFA は NiV-N を transient で発現させた HeLa W229 細胞をアセトンで固定したものを、抗原として利用した。今回は、transfection の 5 日後の細胞を用いた。一般的にパラミクソウイルスの N 蛋白質を哺乳細胞で発現させた場合、細胞質に蛍光性の顆粒として出現することが知られており、本 NiV-N 導入細胞にサル No.1/No.2 の Day 15 血清を反応させた場合も、同様の蛍光性顆粒が認められた。これらは非特異蛍光とは区別がしやすく、容易に診断できることから、地方研等でも利用価値が高いと考えられる。今回は、transfection 5 日後の細胞を IFA に用いた。通常、transient 発現系において蛋白質の発現が最大となるのは、transfection の 2-3 日後であることから、必ずしも最善の条件ではなかったが、Day 15 血清染色ウェルでは比較的容易に蛍光性顆粒を観察することができた。今回用いている発現ベクター pKS336 は、プラストサイジン抵抗性遺伝子を有することから、プラストサイジン存在下で 1 週間以上培養することで、NiV-N 発現を選択的に得ることが可能である。将来的には NiV-N 発現細胞を選択的に増殖させたあとで、IFA 用抗原として調製することで、より質の高い IgM または IgG 検出資材となることが期待できる。

本課題では、バキュロウイルス発現 NiV-N 蛋白質をカニクイザルに免疫して得られた経過血清から、既存・新規の複数の検出系で NiV-N 特異的 IgG, IgM を検出した。新規の検査系として NiV-N 抗原固相化プレートを用いた IgG 検出および IgM 検出 ELISA と、NiV-N 発現 HeLa W229 細胞を利用した IFA を構築した。IgM 検出系については、今回複数の方法で IgM 抗体が検出できたことから、当初の目的通り、得られた血清(とくにサル No.1, Day 15 血清)

は陽性対照血清として利用できることが確認された。今後はこれらを活用し、IgM capture ELISA を含めた、より高感度・高特異性の抗体検出系の構築を進める。

E. 結論

バキュロウイルスベクターを用いて発現させた NiV-N 蛋白質を精製し、これを免疫原として利用し、サル免疫を行った。Day 0, 5, 7, 9, 11, 13, 15 に得られた経過血清から、既存・新規の複数の検出系で NiV-N 特異的 IgG, IgM の上昇を確認した。新規の検査系として NiV-N 抗原固相化プレートを用いた IgG 検出および IgM 検出 ELISA と、NiV-N 発現 HeLa W229 細胞を利用した IFA を構築した。得られた IgM 陽性サル血清は、現況では確保がきわめて困難な NiV-IgM 陽性ヒト血清のかわりに、各種 IgM 検出系の陽性対照となることから、より高感度・高特異性の抗体検出系の構築に活用できる。

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

図 1

バキュロウイルスによるNiV-Nの発現 およびNi-NTAビーズを用いた精製

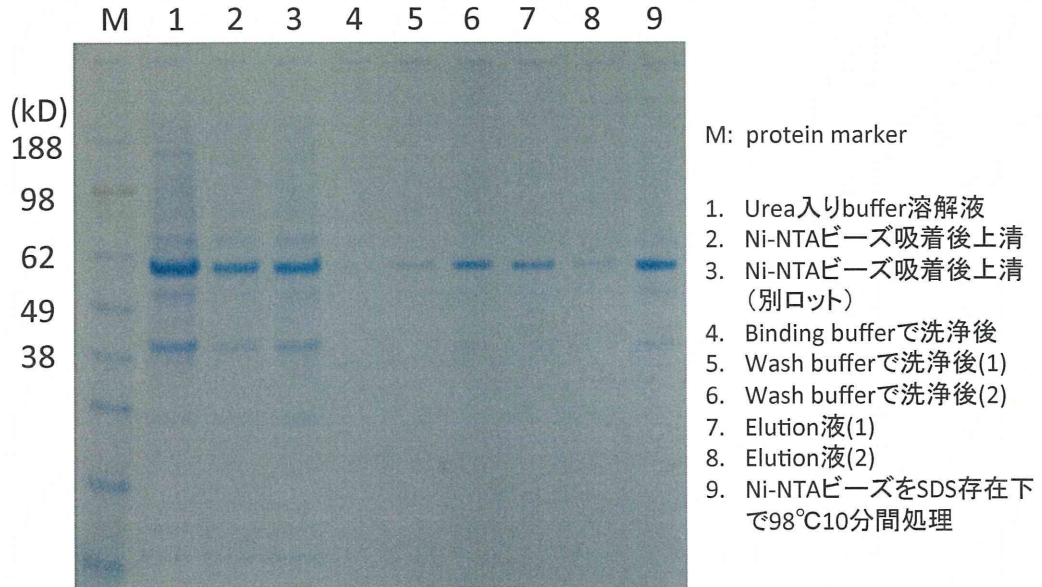


図 2

NiV感染Vero細胞／非感染Vero細胞lysateを 抗原に用いたIgG検出ELISA

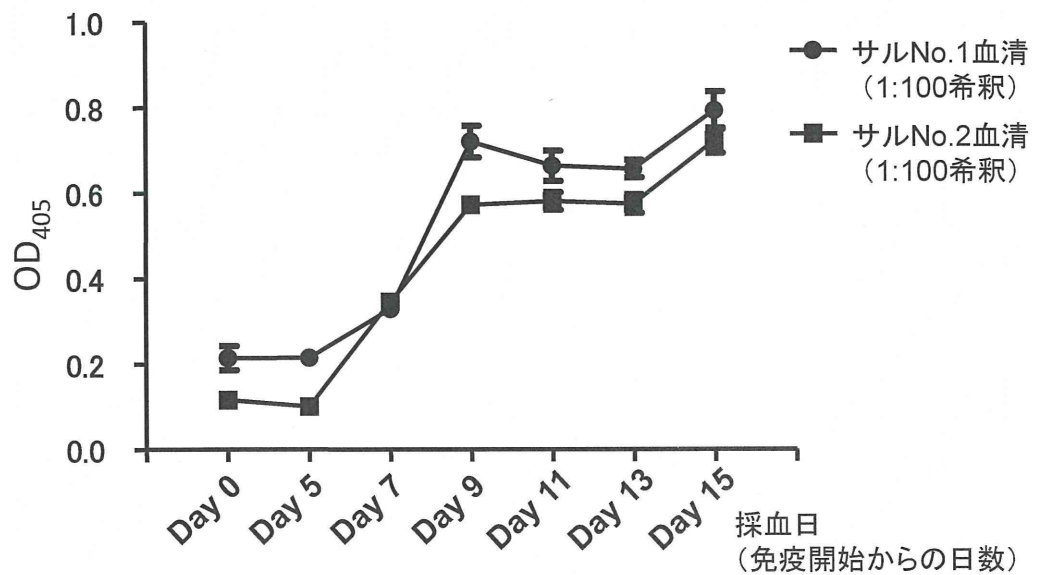


図3 バキュロウイルス発現NiV-Nを抗原に用いたIgG検出ELISA

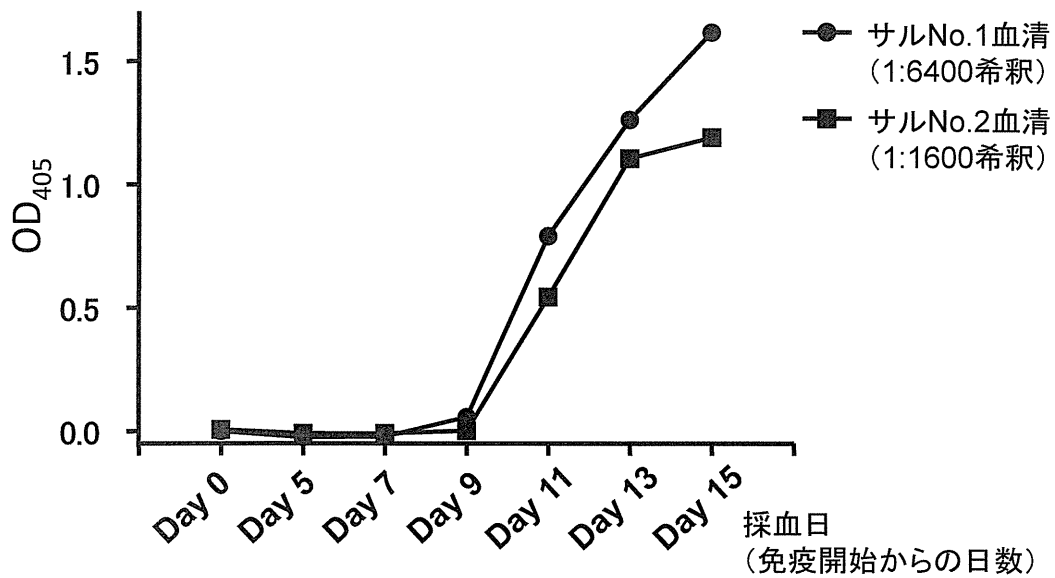


図4 バキュロウイルス発現NiV-Nを抗原に用いたIgM検出ELISA

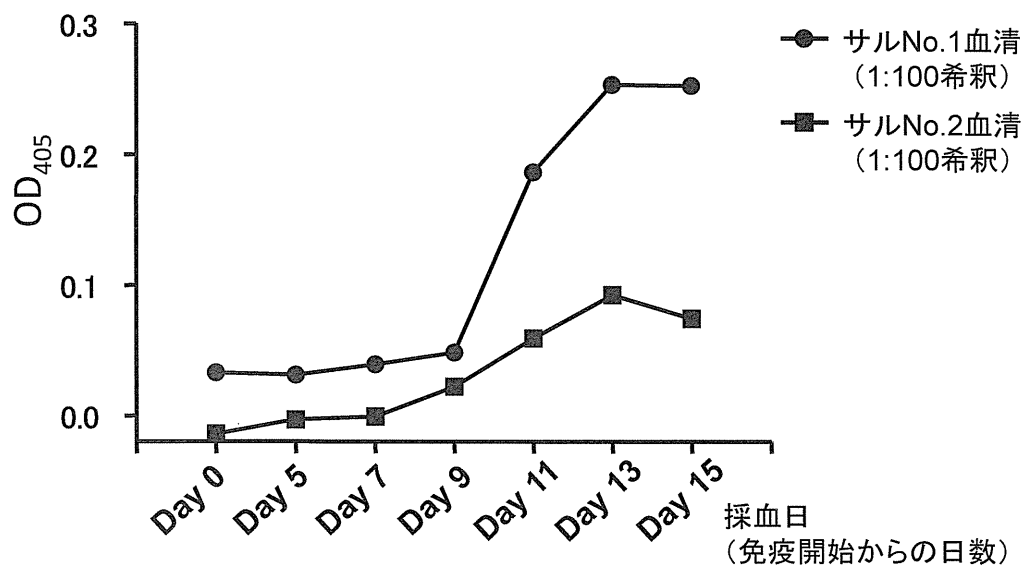
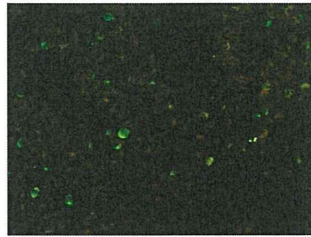
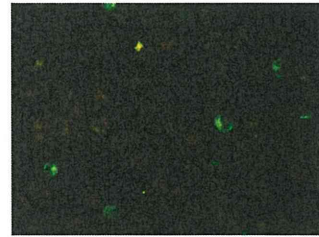


図 5

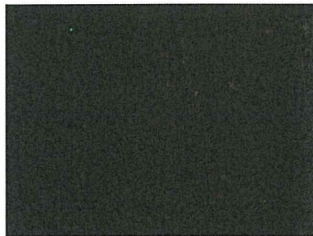
NiV-N発現HeLa W229細胞
を用いた間接蛍光抗体法
(IFA)



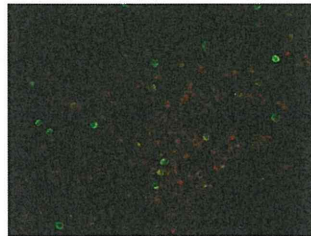
ウサギ抗NiV-N血清



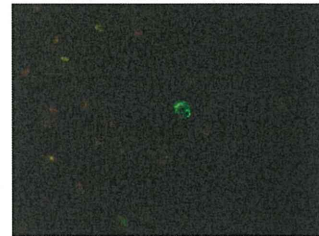
ウサギ抗NiV-N血清



サルNo.1 プレ血清



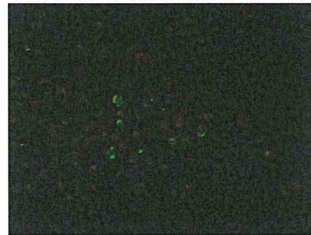
サルNo.1 Day15血清



サルNo.1 Day15血清



サルNo.2 プレ血清



サルNo.2 Day15血清



サルNo.2 Day15血清

倍率200倍

倍率400倍

コウモリレオウイルスのゲノム情報と診断

担当責任者： 下島昌幸 国立感染症研究所 ウイルス第一部第一室長

研究要旨：近年、コウモリが持つレオウイルス Pteropine orthoreovirus (PRV) によるヒトの呼吸器疾患 (PRV 感染症) がマレーシアおよびインドネシアにおいて少数ながら認められ、うち 1 例は日本国内への輸入例となっている。ヒトからヒトへの感染事例も知られており、国内で流行を起こすことも懸念される。PRV 感染症の診断法はなく、本研究では PRV の遺伝子検査法と抗体検査法を確立することを目的とした。遺伝子検査法では輸入例由来のウイルスも含め遺伝子情報を比較し、保存性の高い S2 segment 内にプライマーを設計した。抗体検査法では、複数ある PRV 株の配列を比較し、保存性が高いことが判明した major outer capsid (MOC) 蛋白質を抗原に用いることとした。組換え MOC 蛋白質をバキュロウイルス発現系で大量発現させた。発現 MOC 蛋白質を抗原とした ELISA 系の構築を行なったところ、日本への輸入例の回復期血清が良好な反応性を示す抗体検出系を構築できた。これら遺伝子検出系・抗体検出系は PRV の診断と疫学的知見の蓄積に役立ち、流行地の適切な対処を可能とすると考えられる。

A. 研究目的：

コウモリ由来レオウイルス Pteropine Orthoreovirus (PRV) は 1960 年代にオーストラリアの食果コウモリから初めて分離された。培養細胞において巨細胞を形成するなど哺乳類レオウイルス Mammalian Orthoreovirus (主に小児に風邪や下痢を起こす) とは異なる性状を持ち、中和の交差反応も示さなかった。マレーシアや中国の食果コウモリからも PRV は見出されている。

今世紀に入り、PRV による成人の呼吸器疾患が相次いで報告された。いずれもマレーシア在住もしくはインドネシアのバリ

島への訪問歴があり、多くでコウモリとの接点があるため、マレーシアやインドネシアのコウモリを宿主とする本ウイルスがヒトに感染し呼吸器疾患を引き起こしたと考えられる。家族が遅れて類似の症状を示していることから、ヒトからヒトへ伝播しうるウイルスである。2007 年にはバリ島を訪問した日本人成人男性が発熱・咳・咽頭痛を示し帰国後入院し、PRV の感染であることが判明した。このような例は他にインドネシアを訪問し香港で発症した 3 例があり、PRV は輸入感染症をも起こすウイルスと言える。マレーシアでは患者発生地域で抗体調査が行われ、住民の約 13%

が抗体陽性であり、認識はされていないものの PRV が蔓延しているものと考えられる。

今のところ発生病数・患者数ともに多くはないが、ヒト-ヒト感染を起こす呼吸器疾患であることから、PRV による大きな流行が将来発生することが懸念される。現在 PRV (感染症) の診断法はないため、PRV の遺伝子検出法と抗体検出法の構築を行ない、PRV 感染症の発生時に迅速かつ適切に対処できる体制をとれるようにすることを目的とした。

B. 研究方法：

遺伝子検出法：

PRV の S2 segment 全長として Genbank に登録されている AF059718 (Nelson Bay virus)、AY357731 (Pulau reovirus)、EU448335 (Kampar orthoreovirus) 及び AB521794 (Miyazaki-Bali/2007) の配列情報を比較した。

抗体検出法：

Major outer capsid protein (MOC) は PRV の株間で保存性が高く、ヒト由来株間で 96%以上の一致を示す (図 1)。MOC にポリ His タグを付加した cDNA をバキュロウイルス発現系のトランスファーベクターに組み込み、組換えバキュロウイルスを作製した。組換えバキュロウイルス感染 Tn5 細胞を 1% NP40 バッファーで溶解し、不溶画分を 4M Urea バッファーでの洗浄の後、8M Urea バッファーでの洗浄の際の上清を精製 MOC とした。精製 MOC を Titer Max Gold をアジュバントとしてウサギに皮下接種し、ウサギ抗 MOC 血清を得た。

精製 MOC を PBS で希釈し、ELISA 用プレートを一晚 4℃でコーティングした。あるいは Tn5 細胞の溶解液を PBS で希釈

し、ELISA 用プレートのコーティングに用いた。洗浄後 5%スキムミルクでブロッキングし、ヒト血清あるいはウサギ血清 (100 倍、400 倍、1600 倍、6400 倍希釈したもの) もしくはマウス抗 His タグ抗体 1µg/ml を反応させた。洗浄後各種抗 IgG-HRP 二次抗体を反応させた。洗浄後、ABTS で発色させ、吸光度 OD を測定した。ヒト血清には PRV 感染症の日本輸入例の急性期および回復期の血清、健康人の血清を非働化したものを用いた。ウサギ血清には上述の MOC 血清あるいは免疫前の血清を非働化して用いた。

C. 研究結果：

遺伝子検出法：

PRV の S2 segment 全長として Genbank に登録されている AF059718 (Nelson Bay virus)、AY357731 (Pulau reovirus)、EU448335 (Kampar orthoreovirus) 及び AB521794 (Miyazaki-Bali/2007) の配列情報をもとに保存性の高い領域から検出プライマー Nelson Bay Reo-S2-35-Fw (5-CCA CGA TGG CGC GTG CCG TGT TCG A-3) Nelson Bay Reo-S2-339-Rv (5-ACG TAG GGA GGC GCA CGA GGT GGA-3) を作製した。

抗体検出法：

バキュロウイルス発現系において MOC 蛋白質は不溶性を示し、His タグを標的とした精製法は不適切であった。Urea を用いたところ 8M Urea バッファーには溶解性を示したため、4M Urea バッファーで不溶画分を洗浄し、8M Urea バッファーでの液体部分を回収した。SDS ゲル電気泳動ののち Coomassie 染色したところ単一のバンドが検出され、このバンドは WB で His タグ配列を有することが確認された (図 2)。つまり高濃度の Urea

を用いての精製が可能であることが分かった。

精製 MOC 蛋白質を PBS で階段希釈し、MaxiSorp plate のコーティングを行った。ブロッキングには 5% スキムミルクを用いた。一次抗体としてマウス抗 His タグ抗体を用いたところ、コーティングに用いる MOC 蛋白質の量は 100ng/ml で十分であることが判明した。このコーティング量のもと、次に一次抗体としてウサギ抗 MOC 血清を用いたところ、良好な反応性（高い OD 値）が認められた。一方で免疫前の血清では OD 値は低いものであり、MOC 蛋白質の検出を反映しているものと考えられた。Tn5 細胞の溶解液でも同様の実験を行ったところ良好な反応性が見られ、一方コントロールのバキュロウイルス感染 Tn5 細胞溶解液の場合の反応性は明らかに低いものであった（図 3）。

Tn5 細胞溶解液を抗原とした ELISA で、一次抗体として PRV 感染症の日本輸入例の急性期および回復期の血清を用いたところ、急性期での反応性はほとんど認められなかったが、回復期血清では良好な反応性を示した。健常人血清の中では反応性を示すものは認められなかった（図 4）。

D. 考察：

遺伝子検出系では、高度に保存され遺伝子検出に適したプライマー領域を見つけ出すことが出来た。培養したウイルスや患者検体からの検出の可否や非特異の有無、感度の如何等の検討が必要である。抗体検出系では当初精製抗原で ELISA 系の構築を始めたが、精製前の細胞溶解液でも低いバックグラウンドと十分高い反応性が認められた。準備の簡素化を考え

ると細胞溶解液で抗体検出は十分行えると言える。

E. 結論

コウモリレオウイルス PRV の遺伝子検出用のプライマー設計を行った。また PRV に対する抗体検出系を確立した。

F. 健康危機情報

コウモリレオウイルスによる急性呼吸器感染症は、2006 年 2 回（マレーシア、いずれも家族内感染あり）、2007 年 2 回（バリ島からの帰国者、香港と日本）、2009 年 1 回（バリ島からの帰国者、香港）、2010 年 2 回（バリ島からの帰国者、香港とマレーシア、家族内感染あり）と東南アジアでの感染が毎年発生している。

G. 研究発表

無し

H. 知的所有権の取得状況

無し

図1: PRVヒト由来株のMOCおよびCAPのアミノ酸配列比較

ヒト由来 Pteropine Orthoreovirus		右上: Major outer capsidの株間の一致(アミノ酸%)						
		Miyazaki	HK46886	HK50842	Kampar	Sikamat	Melaka	HK23629
左下: Cell attachment proteinの 株間の一致 (アミノ酸%)	Miyazaki	-	99.4	99.2	96.7	98.3	98.1	99.2
	HK46886	100.0	-	99.2	96.9	98.3	98.0	99.2
	HK50842	99.4	99.4	-	97.2	98.6	98.3	98.9
	Kampar	93.7	93.5	92.9	-	96.7	97.5	96.6
	Sikamat	57.1	56.2	56.5	55.6	-	98.6	98.0
	Melaka	57.3	56.4	56.7	56.1	96.3	-	97.8
	HK23629	56.2	56.2	55.6	56.5	67.3	66.4	-

図2: PRV MOC蛋白質の発現と精製

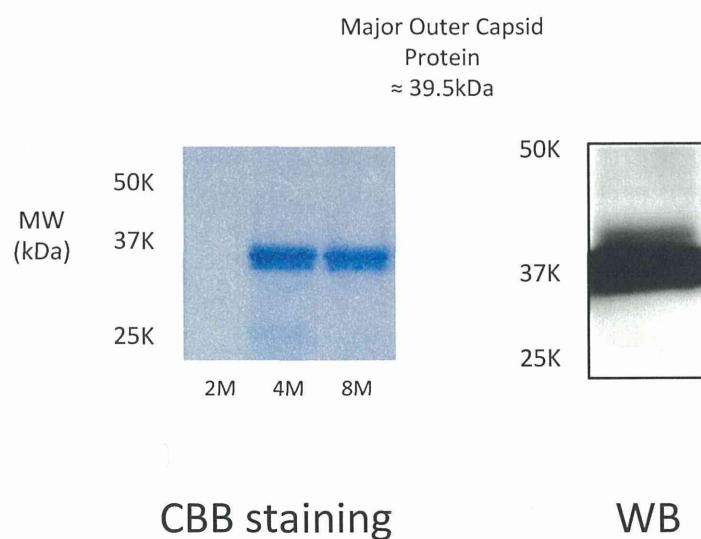


図3: バキュロウイルス感染細胞への免疫ウサギ血清の反応性

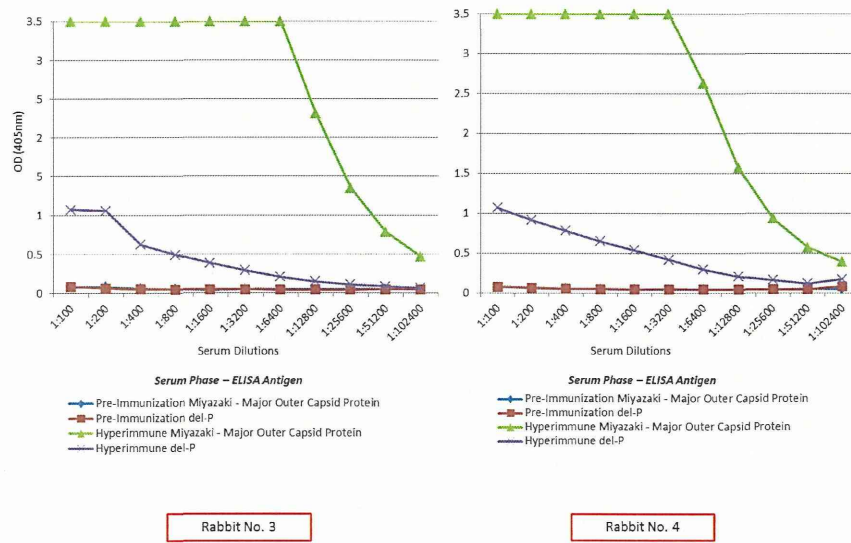
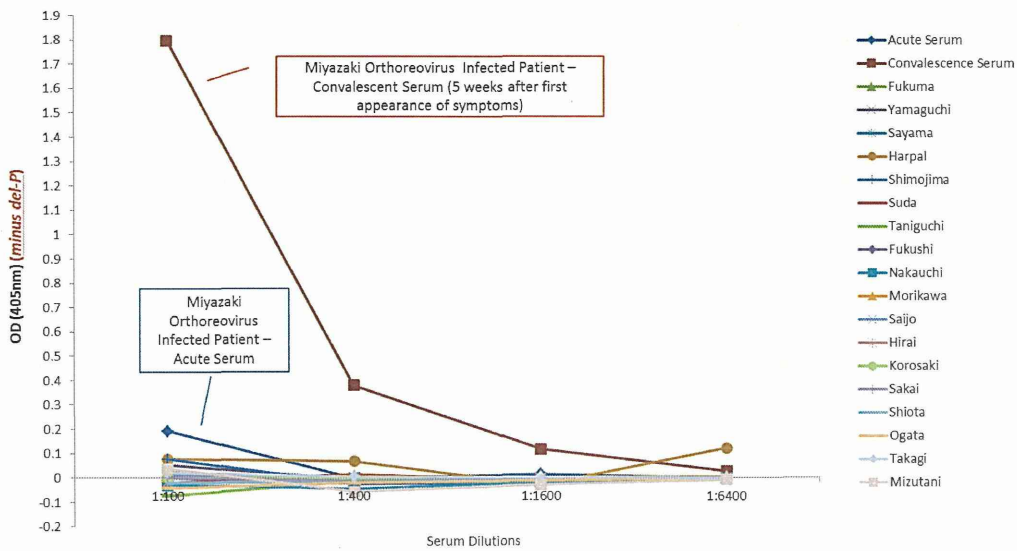


図4: バキュロウイルス感染細胞へのヒト血清の反応性



別紙3

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究

(H26-新興実用化-一般-019)

イシククル（Issyk-kul）熱の診断法と疫学

担当責任者： 福士秀悦 国立感染症研究所 ウイルス第一部主任研究官

研究協力者： 須田遊人、下島昌幸 国立感染症研究所 ウイルス第一部

研究要旨：イシククル熱は高熱、頭痛、筋肉痛を主徴とする、ダニあるいは蚊媒介性のイシククルウイルスによる感染症で、中央アジア（タジキスタンなど）で患者が報告されている。2011年、国内で採取されたコウモリマルヒメダニからイシククルウイルスと近縁なウイルスがダニから分離され、国内にも類似のウイルスが常在する可能性が示唆された。本研究では、国内で分離されたイシククル様ウイルスの増殖性と遺伝的特徴を明らかにした。また、国内のダニおよびイシククル様ウイルスの分子疫学を行う手法を確立するため、リアルタイムPCRによる遺伝子検出法を確立した。

A. 研究目的：

イシククル熱はダニあるいは蚊媒介性のイシククルウイルスによる感染症で、中央アジア（タジキスタンなど）で患者が報告されている。1982年から1985年にかけてコウモリの捕獲などの野外活動で34人がイシククル熱を発症している。主な症状は、熱（39-41℃, 3-8日間）、頭痛（80%）、めまい（50%）、せき・筋肉痛（30%）、吐き気・嘔吐（25%）、その他、発疹、腹痛、眼痛などである。死亡例は確認されていない。1970年以降、イシククルウイルス及び近縁のウイルスがキルギスタン、タジキスタン、マレーシアなどでコウモリ、野鳥、ダニ、蚊から分離されている。また、ヒトの血清学調査からイラン、アフガニスタン、インド、パキスタンなどにもウイルスが存在すると考えられている。我が国でも2011年にコウモリマルヒメダニからイシククルウ

イルスに近縁なウイルス（イシククル様ウイルス）が分離された。イシククルウイルスはクリミア・コンゴ出血熱ウイルスと同じブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される。このため、イシククルウイルスおよび近縁なウイルスがヒトに重篤な感染症を起こす可能性も否定できない。今回分離されたウイルスがヒトに感染性を示すのか、また、我が国にどの程度分布しているのか明らかにする必要がある。本研究では、国内で分離されたイシククル様ウイルスの増殖性と遺伝的特徴を明らかにした。また、国内のダニおよびイシククル様ウイルスの分子疫学を行う手法を確立するため、リアルタイムPCRによる遺伝子検出法を確立した。

B. 研究方法：

1) 我が国で分離されたイシククル様ウ

ウイルスを各種培養細胞に接種し、それぞれの細胞における増殖性を比較した。

- 2) ウイルス培養上清からイシククル様ウイルスを精製し、次世代シーケンサーによりウイルス遺伝子を解析した。
- 3) イシククル様ウイルスの遺伝子配列をもとに検出用プライマー、プローブを作製し、リアルタイム PCR 法を構築した。

C. 研究結果：

- 1) イシククル様ウイルスを各種培養細胞に接種し、24, 48, 72 時間後の培養上清中のウイルス量を算出し、それぞれの培養細胞における増殖性を比較した（図 1）。Vero、Huh7, SW13 細胞等で効率のよいウイルス増殖がみられた。
- 2) ウイルス培養上清からイシククル様ウイルスを精製し、次世代シーケンサーにより M セグメントの一部を除くほぼ全領域の塩基配列を決定した。イシククル様ウイルスはナイロウイルス属のなかでもイシククルウイルスに近縁であることが明らかになった（図 2）。
- 3) イシククル様ウイルスの遺伝子配列をもとに S,M および L 遺伝子検出用プライマー、プローブを作製し(図 3)、リアルタイム PCR 法を構築した。また、それぞれのターゲット領域を含む部分を PCR で増幅し、スタンダード DNA とした。One-step RT-PCR および、Two step PCR で各スタンダード DNA を 1-10 コピー以上の感度で検出可能であった。本方法により、イシククル様ウイルス培養上清から抽出した RNA およびこれを用いて逆転写反応で作

製した cDNA を検出可能であった（図 4 および 5）。

D. 考察：

2011 年に我が国で、コウモリマルヒメダニからイシククル様ウイルスが分離された。イシククルウイルスはこれまで、ヒトに熱性の疾患を引き起こすことが知られている。イシククル様ウイルスあるいは、これらに近縁なウイルスが日本に常在することが示唆されるため、これらのウイルスの性状解析および、分子疫学、血清疫学的手法を確立することが必要である。本研究では、我が国で分離されたイシククル様ウイルスの増殖性を、各種培養細胞を用いて明らかにした。ヒトおよびサル由来培養細胞でウイルスが増殖可能であったことから、このウイルスはヒトに感染性をもつことが示唆される。

イシククル様ウイルスが分離されたコウモリマルヒメダニは国内では、北海道から九州、沖縄まで分布することが知られており、人家付近に生息するコウモリ類に寄生する。マルヒメダニによるヒト刺症例も報告されていることから、このダニによりイシククル様ウイルス（あるいはその他の病原体）が媒介される可能性もある。本研究で開発したリアルタイム PCR による遺伝子検出法により、イシククル様ウイルスがどの程度、広範囲に存在するのか明らかにする予定である。また、今後、血清疫学を進めていくため、イシククル様ウイルスの抗原を用いた ELISA を構築する予定である。

E. 結論

- 1) 本研究で、イシククル様ウイルスの各種培養細胞での増殖性と遺伝的特徴を明らかにした。

- 2) イシククル様ウイルスの遺伝子配列をもとに検出用プライマー、プローブを作製し、リアルタイム PCR 法を構築した。
- 3) 今後、イシククル様ウイルスの分子疫学、血清疫学を進めていく必要がある。

F. 健康危機情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. Analysis of Lujo Virus Cell Entry using Pseudotype Vesicular Stomatitis Virus. *J Virol.* 88 (13): 7317-7330, 2014.
- 2) Bukbuk DN, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Iha K, Fukuma A, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M, Kasolo F, Baba SS. Development and validation of serological assays for viral hemorrhagic fevers and determination of the prevalence of Rift Valley fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 108 (12):768-773, 2014.
- 3) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J Clin Microbiol.* 52(9): 3325-3333, 2014.

2. 学会発表

- 1) 福士秀悦、永田典代、岩田奈織子、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、下島昌幸、西條政幸. 高齢マウスにおける重症熱性血小板減少症候群ウイルスの感染感受性の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 2) 福間藍子、福士秀悦、吉河智城、鈴木忠樹、谷英樹、谷口怜、下島昌幸、西條政幸. SFTSウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出ELISAへの応用. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 3) 西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 4) 下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、谷口怜、西條政幸. プラークを形成するSFTSウイルスによる中和抗体価測定. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 5) 谷英樹、谷口怜、福間藍子、福士秀悦、森川茂、下島昌幸、西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスGPの細胞融合能と25-hydroxycholesterolによる細胞阻害効果. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 6) 谷口怜、堀本泰介、Joseph Masangkay、Puentepina Roberto Jr.、大松勉、永田典代、江川和孝、福間藍子、Harpal Singh、