

バイオテロ対策のための備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの備蓄等、バイオテロ病原体への検査対応、
公衆衛生との関連のあり方に関する研究
分担報告書

分担研究課題名:ウイルス性出血熱の診断法の充実化

所 属 国立感染症研究所ウイルス第一部
研究分担者 下島 昌幸

研究要旨:

バイオテロ発生時に、用いられた病原体を特定することはその後の対応をより適切にする。しかし病状回復後に病原体の遺伝子に基づき用いられた病原体を特定することは困難である。一方、回復後でも病原体に対する抗体を調べることにより用いられた病原体を特定することは可能で、特異性の高い中和抗体測定が方法として適している。バイオテロ材料として用いられうるエボラウイルス等の病原体を国立感染症研究所では所持したため、昨年度はこれを用いた中和抗体測定法の確立を行なった。今年度はクリミア・コンゴ出血熱ウイルスについて、7つに分類される遺伝子型が中和抗体の測定により判別が可能か検討した。陽性コントロールとして作製済みのマウス抗血清を用いた。各抗血清の中和抗体価をウイルス4株で調べたところ、抗血清作製時に用いたウイルス株で測定した中和抗体価が必ずしも最も中和抗体価が高いわけではなく、どの抗血清も UK 株での中和抗体価が最も高かった。このことは中和抗体価の測定には UK 株を用いると感度良く測定できることと、異なる遺伝子型を抗血清で区別することはできないことを意味する。UK 株は細胞変性効果が強いことから、中和抗体価測定が簡素化(迅速化)できる可能性がある。バイオテロ対応に用いられる実験室検査法の1つ(クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの中和抗体測定法)の位置づけ・精度が高まったと言える。

研究協力者

氏名・所属研究機関名・職名

黒須 剛・国立感染症研究所・主任研究官

吉河智城・国立感染症研究所・主任研究官

A. 研究目的

バイオテロ発生時に、用いられた病原体を特定することはその後の対応をより適切にする。病原体に合わせた患者の治療や被害拡大の抑制等をよりよくできることが期待されるからである。病原体の由来に関する情報にもつながり得る。しかし病状回復後に病原体の遺伝子に基づき用いられた病原体を特定することは困難である。混乱下では必ずしも適切な採材がタイミング良く行われるとは限らないからである。一方、回復後でも病原体に対する抗体を調べることにより用いられた病原体を特定することは可能で、特異性の高い抗体測定法としては中和抗体測定法が知られている。

バイオテロの材料として用いられうるエボラウイルス、マールブルグウイルス、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス等の病原体を国立感染症研究所は2019年に所持した。2020年度はこれら病原体がない場合には実施できなかった中和抗体の測定方法を感染性ウイルスを用いて国立感染症研究所 BSL4 実験室にて確立した。クリミア・コンゴ出血熱はアフリカからアジア西部にかけ広く

発生が認められる感染症であり、その病原体は遺伝子型で7つ(アフリカ1型—3型、ヨーロッパ1型・2型、アジア1型・2型)に分類される(図1)。これらウイルスの7つの遺伝子型が特異性の高い中和抗体測定法で区別できれば、バイオテロ対策としては病原体の由来に関する情報に繋がる可能性が高まる。2021年度は、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスについて、7つに分類される遺伝子型が中和抗体の測定により判別が可能か検討した。

B. 研究方法

ウイルス・クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの Bagdad 株(アジア1型)、Kosova Hoti 株(ヨーロッパ1型)、IbAr10200 株(アフリカ3型)、UK 株(アジア1型)を VeroE6 細胞で増殖させ、ウイルスカ価はウサギ抗 NP 抗体を用い FFU/mL で算出した。マウス抗血清・各ウイルス株を ICR マウス(3匹以上/株)に約3週間間隔で3回腹腔内投与して作製した。

中和抗体測定・マウス抗血清を希釈し、約100FFUのウイルスと混合し1時間37度下に置いた。その後 VeroE6 細胞に接種し1時間37度下に置いた。ウイルス液・抗血清の混合液を除き、0.5%メチルセルロースを含む培地で2-3日培養した。細胞をホルマリンで処理し、ウサギ抗 NP 抗体を用いてフォーカス数をカウントした。中和抗体価は抗

血清がない場合のフォーカス数をもとに、50%以下に減少させる抗血清の最も高い希釈倍率 (FRNT50)として用いた。

【倫理面への配慮】

該当なし

C. 研究結果

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス4株に対して作製したマウス抗血清(1株あたり3匹分)それぞれについて、ウイルス4株に対する中和抗体価を算出した(図2)。抗血清作製時に用いたウイルス株で測定した中和抗体価が必ずしも最も中和抗体価が高いわけではなく、どの抗血清もUK株での中和抗体価が最も高かった。

D. 考察

クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対する抗血清がどの株に対するものであってもUK株に対する中和抗体価が最も高くなる(図2)ということは、中和抗体価の測定にはUK株を用いると感度良く測定できることを意味する。また同時に、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの異なる遺伝子型を抗血清で区別することはできないことを意味する。UK株は細胞変性効果が強いことから、中和抗体価測定が簡

素化(迅速化)できる可能性がある。

E. 結論

クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの異なる遺伝子型を抗血清で区別することはできないことが判明した。クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対する中和抗体価の測定にはUK株を用いると感度良く測定できることが判明した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

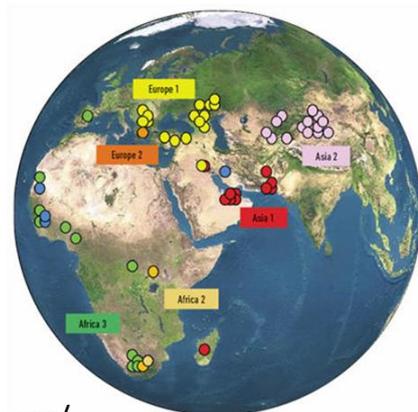
1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

図表

• 中和抗体測定法の発展

– クリミア・コンゴ出血熱ウイルス

- アフリカ、中東、ヨーロッパ、アジアに広く分布
- 7遺伝子型に分類
 - Africa 1, 2, 3
 - Europe 1, 2
 - Asia 1, 2
- “遺伝子型”と中和抗体価



<https://microbiologysociety.org/>

図1: クリミア・コンゴ出血熱の発生地域とウイルスの遺伝子型

- 中和抗体測定法の発展

- CCHFウイルス4株へのマウス抗血清の交叉中和

		CCHFV strains for NT			
		Bagdad	Kosovo	UK	10200
		Asia1	Europe1	Asia1	Africa3
Bagdad-immunized	Mouse 1	40	10	160	160
	Mouse 2	160	40	640	40
	Mouse 3	40	40	160	40
Kosovo-immunized	Mouse 2	10	160	160	40
	Mouse 3	40	40	160	160
	Mouse 4	40	40	640	160
UK-immunized	Mouse 1	160	40	640	640
	Mouse 2	160	40	640	160
	Mouse 3	640	40	640	160
10200-immunized	Mouse 1	40	40	640	160
	Mouse 2	10	40	640	160
	Mouse 3	40	40	640	160

- 交叉中和から元のウイルス株を推測することは困難か
 - UK株は中和抗体を感度良く検出可能

図2: マウス抗血清のクリミア・コンゴ出血熱ウイルス 4 株に対する(交叉)中和抗体価