

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2011

課題番号：19300148

研究課題名（和文） 動物実験用サル類のヘルペスウイルス群高感度検出法の確立と病原性の進化生態学的研究

研究課題名（英文） Establishment of Sensitivity Detection of Herpesviruses of Laboratory Monkeys and Study of Pathogenic Evolutionary Ecology.

研究代表者

大沢一貴（OHSAWA KAZUTAKA）

長崎大学・先導生命科学研究支援センター・教授

研究者番号：90244756

研究成果の概要（和文）：国内飼育マカクの B ウイルス抗体陽性率を把握する目的で、分与されたマカク血清の抗体検査を継続的に行っている。国内外の大学、研究機関等で飼育されている医学研究用マカクの B ウイルス抗体自家検査用キットを頒布し、一部の検体について長崎大学における結果と比較検証した。マカクを自然宿主とするヘルペス B ウイルスの抗体検査をより安全に行うため、代替抗原ウイルスとして用いている HVP2 のウイルス株の変更について検討、実施した。

研究成果の概要（英文）：To investigate B virus (BV) prevalence of the Macaque rearing in research facilities in Japan, we examined antibody test intermittently. The ELISA kits for detection of anti-BV antibody prepared in our laboratory were distributed for the universities and the research facilities. Baboon herpesvirus (HVP2) has been used as an alternative antigen for detection of anti-BV antibody in macaque sera. The change of HVP2 strains were considered and performed for more safety of the antibody test.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：実験動物学（人獣共通感染症学）

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：感染症

## 1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルスは、数多くの動物種から宿主固有のウイルスが分離され、初感染後は宿主に潜伏感染し、ほとんどの場合宿主を死に至らしめることなく終生感染し続けるという特徴を持っている。アカゲサル、カニクイザル、ニホンザルなどのマカカ属サル（以下、マカク）を宿主とするサルヘルペスウイルス B ウイルス（以下、B ウイルス）もその一つであり、感染により本来の宿主を死亡させる

ことはないが、ヒトに感染すると重篤な脳炎を招き、死亡した症例もあることから、ウイルス性人獣共通感染症を引き起こすウイルスとして日本国内では安全度がレベル 3（少量・診断）～4（動物感染実験）に分類されている。

これまでの我々の研究・調査等から、全国の国立大学で飼育されている実験動物マカクは、約 40% の B ウイルス抗体陽性率で、医学領域で多用されているニホンザルにおい

ても34%の抗体保有率が認められた。さらにBウイルスのゲノム解析結果からウイルス亜系の存在を明らかにし、その亜系がマカク種ごとに存在することを示唆してきた。滋賀県産の野生ニホンザルの三叉神経節からBウイルスのゲノム片検出に成功し、ニホンザルにも固有のBウイルスが潜伏感染していることを遺伝子レベルで証明している。

Bウイルスは、国内では実質的にウイルスそのものを取り扱うことができず、実用的な量の診断用抗原作製が困難である。そのため、ヒトの $\alpha$ ヘルペスウイルス(HVP2)を代替抗原に用いたIgG-ELISA診断法を開発した。さらに、この方法に改良を加えたHVP2-ELISA乾燥抗原プレートキットを作製し、国内外の大学等に頒布し、概ね良好な結果が得られている。

研究代表者は、米国で分離されたチンパンジー固有の $\alpha$ ヘルペスウイルス(ChHV)のゲノム解析を行い、ChHVがヒトの単純ヘルペスウイルス2型(HSV2)にきわめて近縁のウイルスであることを明らかにした。さらにリスザルのヘルペスウイルス(HVS1)についても同様の解析を行っている。

## 2. 研究の目的

(1) 1999年以降、HVP2を代替抗原として用いたBウイルス抗体検査キットを作製し、国内外の大学等の研究機関へ配布を行ってきた。さらにより信頼性の高い検査キットの作製を目指すため、引き続き検査キットを配布し、乾燥抗原プレートの評価を行う。それと同時に、国内の大学、研究機関等より分与されるマカク血清の抗体検査を行い、国内医学実験用マカクのBウイルス抗体保有率の把握に努める。

(2) ヒトのHVP2は、マウスに脳炎を発症させる株(HVP2nv)と無症候性の株(HVP2ap)に大別されることが提唱されている。これまでHVP2nvのひとつであるOU1-76株を代替ウイルス抗原として用いてきたが、マウスでの感染事故が生ずる可能性が無いとは言えない。これを回避するため、抗原株を病原性の低いHVP2apのいずれかの株に変更可能かどうかを検討する。

(3) ChHVゲノムは未だ塩基配列が不明な領域が残されている。進化系統学アプローチを図るために、さらなるChHVのゲノム解析を進める。

## 3. 研究の方法

(1) 代替抗原を用いたBウイルス抗体検査キット用の乾燥抗原プレートを作製し、国内外の大学等の研究機関へ配布する。また、分与されたマカク血清のBウイルス抗体検査を行う。

(2) 抗原株についての検討を行うため、こ

れまで代替抗原株として使用してきたOU1-76株とHVP2apのA951株、OU4-8株、OU2-5株を用いる。これらのウイルス株を各々Vero細胞に感染させ不活化した後、ELISA用抗原とする。検査に供するマカク血清は、当研究室で保管している6000検体以上の中から抽出して使用し、抗原株の比較検討を行う。

(3) ChHVのゲノムDNAを制限酵素BstzI7I、PvuII、SspI、XmnI等で切断し、各々の産物をpCR4Bluntベクターに組み込む。得られたプラスミドDNAをEcoRIで切断してインサートの確認を行った後、精製する。ベクターの塩基配列を基に作製したprimerを用いてシーケンス反応を行い、インサート末端の塩基配列を決定する。明らかになったインサートDNAの塩基配列を基にprimerを作製し、シーケンス反応を行うことによりChHVのゲノム解析を進める。

## 4. 研究成果

(1) 抗原株の変更を目指して、これまで使用してきたHVP2nvのOU1-76株とHVP2apのA951、OU4-8、OU2-5株の感度、特異性についてマカク血清を用いて比較したところ、HVP2apの3株すべてでOU1-76株と遜色ない結果が得られた(図1)。また、検査キット用乾燥抗原プレートについても同様に比較検討を行い、抗原ウイルス株をHVP2apに変更可能であるという結論に至った。この結果に基づき、抗原株をOU1-76株からOU2-5株に変更し、その後も問題は生じていない。

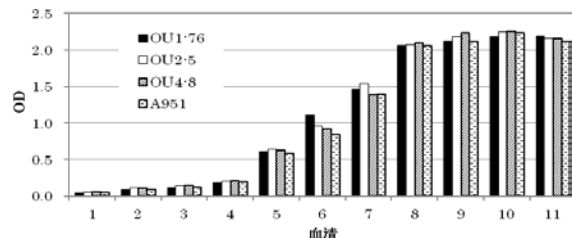


図1 抗原ウイルス株の比較

(2) 期間中(2007~2010年)のデータを抽出すると、延べ43機関に抗体検査キットを頒布し、各年度の内訳は表1の通りである。キットの使用結果について、良好な評価を得ている。

表1 Bウイルス抗体検査キット配布

	延べ配布機関数	キット数
2007年度	11	92
2008年度	12	90
2009年度	8	69
2010年度	12	88
計	43	339

マカク血清は国内延べ 29 機関から供与され、血清数は 2,022 検体だった。各年度の内訳を表 2 に示している。また、総検体のうち 521 検体が B ウイルス抗体陽性であり、陽性率は 25.8% だった (表 3)。

表 2 B ウイルス抗体検査検体数

	血清由来機関数	検体数
2007 年度	12	748
2008 年度	6	555
2009 年度	7	426
2010 年度	4	293
計	29	2,022

表 3 抗体検査結果

判定	検体数
+ (抗体陽性)	521 (25.8%)
- (抗体陰性)	1,444 (71.4%)
± (判定不能)	57 (2.8%)
計	2,022 (100%)

数年にわたり抗体検査キットを使用してきた大学から、インハウス検査と長崎大での確認検査の結果の齟齬について検討したいとの申し入れがあり、見学者として受け入れ、キットの使用法についての研修を行った。その結果、キットに含まれている溶液の使用量のミスなどが原因と判明した。また、反応停止のタイミングについても細かな指導を行い、後日、安定した検査結果を得ることができるようになったとの報告を得ている。

(3) ChHV のゲノム解析を行った結果、UL7、UL42、UL43、UL45、UL49.5、UL50、UL51 の 7ORF の塩基配列が明らかになった。他の霊長類ヘルペスウイルスとのアミノ酸相同性を表 4 に示している。ChHV は HSV2 と最もアミノ酸相同性が高いという結果になった。これまで、すでに報告されている塩基配列を含めてゲノム全長の約 40% の解析を終えている。

表 4 各 ORF のアミノ酸相同性(%)

	HSV2	HSV1	BVrh	HVP2	SA8
UL7	95	79	65	64	64
UL42	94	73	49	48	48
UL43	89	66	45	45	43
UL45	92	78	62	49	59
UL49.5	86	53	38	42	40
UL50	90	77	53	54	55
UL51	93	75	68	66	65

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. K Eguchi, K Ohsawa, M Fuse (Kiyono), J Suzuki, K Kurokawa, T Yamamoto, Epidemiological Evidence that Simian T-lymphotropic Virus Type 1 in Macacafuscata has an Alternative Transmission Route to Maternal Infection, AIDS Res. Hum. Retrov., 27, 113-114, 2011, 査読有
2. 大沢牧子, R, Eberle, 佐藤浩, 大沢一貴, ウイルス株変更を目指した B ウイルス診断用代替抗原の再評価、九州実験動物雑誌、26、29-33、2010、査読有
3. H. Yamamoto, TC. Li, C. Koshimoto, K. Ito, M. Kita, N. Miyashita, J. Arikawa, K. Yagami, M. Asano, H. Tezuka, N. Suzuki, T. Kurosawa, T. Shibahara, M. Furuya, S. Mohri, H. Sato, K. Ohsawa, K. Ibuki, N. Takeda: Serological Evidence for Hepatitis E Virus Infection in Laboratory Monkeys and Pigs in Animal Facilities in Japan. Experimental Animals 57(4), 367-376 (2008), 査読有
3. 大沢牧子, 大沢一貴, 佐藤浩, マカクの B ウイルス抗体保有率調査 - 1999~2006 年 -、九州実験動物雑誌、23、63-68、2007、査読有
4. F. Ike, F. Bourgade, K. Ohsawa, H. Sato, S. Morikawa, K. Takimoto, J. Jaubert, M. Berard, H. Nakata, N. Hiraiwa, A. Takakura, T. Itoh, Y. Obata, A. Yoshiki, X. Montagutelli: LCMV infection in a wild-derived inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. Comp. Med. 57(3), 272-281 (2007), 査読有

[学会発表] (計 35 件)

1. 高木利一、大沢牧子、池郁生、山中仁木、佐藤浩、大沢一貴: LCMV 感染マウスにおける臓器中のウイルス量の経時変化、第 58 回日本実験動物学会会、2011 年 5/26、東京
2. 高木利一、大沢牧子、佐藤浩、大沢一貴: リアルタイム RT-PCR 法を用いた LCMV 感染マウスにおけるウイルス定量、第 28 回九州実験動物研究会総会、2010 年 10/23、福岡
3. 大沢牧子、水島めぐみ、久保憲昭、大沢一貴: マウス導入時検疫におけるマウスノロウイルスの検出、第 28 回九州実験動物研究会総会、2010 年 10/23、福岡
4. 高木利一、大沢牧子、池郁生、森田千春、佐藤浩、大沢一貴: 国内分離リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス株で観察されたマウス

病原性の特徴、第 57 回日本実験動物学会  
総会、2010 年 5/13、京都

5. 高木利一、大沢牧子、池郁生、佐藤浩、大沢一貴: 国内分離リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス 2 株の致死性及び体内分布の差異について、第 148 回日本獣医学会総会、2009 年 9/27、鳥取
6. 高木利一、大沢一貴、大沢牧子、池郁生、森田千春、佐藤浩: リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)の日本国内分離株の病原性状解析、第 146 回日本獣医学会、2008 年 9/24、宮崎
7. 大沢一貴、田崎雄一、山内沙央里、佐藤浩: ヒヒ $\alpha$ 1 ヘルペスウイルス 3 株の US 領域について、第 25 回九州実験動物研究会総会、2007 年 11/10、熊本

[図書] (計 1 件)

1. 伊藤豊志雄ほか、アドスリー、実験動物としてのマウス・ラットの感染症対策と予防、2011、p52-63, 131-134

[その他]

1. ホームページ  
<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/lac/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大沢 一貴 (OHSAWA KAZUTAKA)  
長崎大学・先導生命科学研究支援センター・教授  
研究者番号 : 90244756

### (2) 研究分担者

鳥居 隆三 (TORII RYUUZOU)  
滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授  
研究者番号 : 50106647

景山 節 (KAGEYAMA TUTOMU)  
京都大学・霊長類研究所・教授  
研究者番号 : 2002750

山本 博 (YAMAMOTO HIROSHI)  
富山大学・生命科学先端研究センター・准教授  
研究者番号 : 00108797

伊吹 謙太郎 (IBUKI KENTAROU)  
京都大学・医学研究科人間健康科学科・准教授  
研究者番号 : 002473524

佐藤 浩 (SATO HIROSHI)  
自然科学研究機構・生理学研究所・教授

研究者番号 : 50072947

大沢 牧子 (OHSAWA MAKIKO)  
長崎大学・先導生命科学研究支援センター・研究支援推進員  
研究者番号 : 30467964