

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06404

研究課題名（和文）シュードタイプによるBウイルス抗体検出の新規アプローチ

研究課題名（英文）A novel approach of herpes B virus-specific antibody assay based on VSV pseudotype

研究代表者

福士 秀悦（Fukushi, Shuetsu）

国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長

研究者番号：80373398

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：サルにおけるヘルペスBウイルス（以下、Bウイルス）感染は、無症候の初感染に引き続き感覚神経節に潜伏感染が成立する。しかし、サルの咬傷などによりBウイルスがヒトに感染すると致死的な疾患（Bウイルス病）となる。本研究ではBウイルスの外殻糖タンパク質を被った水疱性口内炎ウイルス（VSV）シュードタイプ（VSV/BVシュードタイプ）を新規に作製し、ウイルスそのものを用いずにBウイルス感染を検出する系を開発した。サル血清を用いたVSV/BVシュードタイプによるハイスループットな中和試験が可能であった。VSV/BVシュードタイプは、Bウイルスの感染性を解析するためのツールとして有用と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VSVシュードタイプによる疑似ウイルスは、ウイルス外殻糖タンパク質を細胞に発現させ、そこにVSVシュード種ウイルスを感染させることにより作製される。ヘルペスBウイルスなどアルファヘルペスウイルスは外殻糖タンパク質が10種類以上あり、VSVシュードタイプの作製は困難であると考えられていた。本研究では、Bウイルスの外殻糖タンパク質のうちgB、gD、gH、gLを持ったVSVシュードタイプの作製に成功した。VSV/BVシュードタイプはBウイルスの感染性を解析するためのツールとして期待できる。

研究成果の概要（英文）：Herpes B virus (BV) is a zoonotic virus, and its infection is usually asymptomatic in its natural hosts, macaque monkeys. However, in humans, BV infection causes serious neurological diseases and leading to death. In this study, we generated a pseudotyped vesicular stomatitis virus (VSV) bearing BV glycoproteins, designated as VSV/BVpv. Furthermore, we developed a pseudotype-based chemiluminescence reduction neutralization test for BV infection with high specificity and specificity using monkey samples. VSV/BVpv might be useful for analysis of the cellular tropism and entry mechanism of BV.

研究分野：ヘルペスウイルス

キーワード：ヘルペスBウイルス VSVシュードタイプ

1. 研究開始当初の背景

ヘルペス B ウイルス(以下、B ウイルス)は、カニクイザル等マカク属サルを自然宿主とするアルファヘルペスウイルスであり、ヒトの単純ヘルペスウイルス 1 型および 2 型(HSV-1, HSV-2)と近縁である。日本で飼育されているマカク属サルの 30%以上がすでに B ウイルスに感染しているという報告がある。ヒトにおける HSV 感染と同様、サルにおける B ウイルス感染では無症候の初感染に引き続き、感覚神経節に潜伏感染が成立する。しかし、サルの咬傷などにより B ウイルスがヒトに感染すると致死的な疾患(B ウイルス病)となる。ヒトの発症はこれまで約 50 症例と少ないが、サル類は医学・生物学の分野で広く研究に用いられ、また、動物園での飼育や、最近ではペットとして飼われるケースが増えていることから、B ウイルス感染症に備え十分な事前対策が必要である。2019 年日本で初めてヒト B ウイルス病(2 例)が報告された。

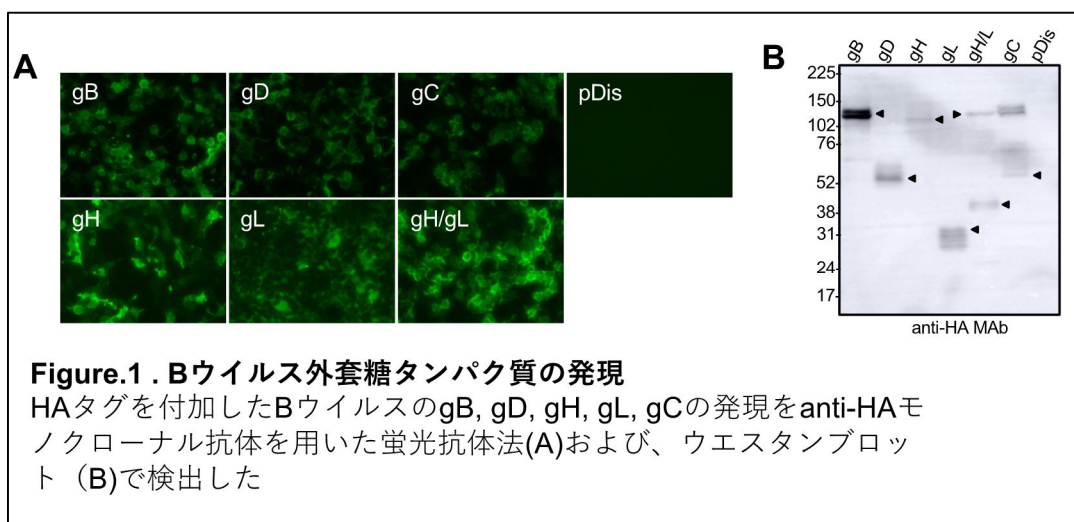
B ウイルスは HSV-1 と抗原性が類似している。ヒトの 80%以上はすでに HSV-1 に対する抗体を有しているため通常の ELISA 等で血清学的にヒトの B ウイルス感染と HSV-1 感染を区別することが困難である。また、B ウイルスは国内の研究所で保管されていない。将来的にウイルスの輸入や、分離培養が可能となった場合でも、その取り扱いはバイオセーフティレベル (BSL) 3 実験室での少量培養に限定される。さらに B ウイルスの研究利用や動物実験などは BSL-4 での取り扱いが要求される。このため B ウイルスそのものを使用して診断法の開発を国内で実施することは不可能に近いのが現状である。このように、ヒトにおける B ウイルス感染を血清学的に検出することが困難であるとともに、B ウイルスそのものを用いた診断法等の研究開発もできない。これらの課題を解決する手法の構築が必要である。

2. 研究の目的

本研究では B ウイルスの外套糖タンパク質を被った水疱性口内炎ウイルス(VSV)シュードタイプ (VSV/BV シュードタイプ) を新規に作製し、ウイルスそのものを用いずに B ウイルス感染を検出する系を開発する。これを用いて B ウイルスに対する抗体を特異的に検出可能かどうか検討する。

3. 研究の方法

B ウイルスの外套糖タンパク質のうち[gB, gD, gH, gL]、 [gB, gH, gL]および[gB, gD, gH, gL, gC]の組み合わせで 293T 細胞にトランスフェクションし、間接蛍光抗体法およびウェスタンブロットングにより、それぞれの外套糖タンパク質の発現を確認した(figure 1)。これらの 293T 細胞に、VSV シュード種ウイルスを感染させ、各種組み合わせによる

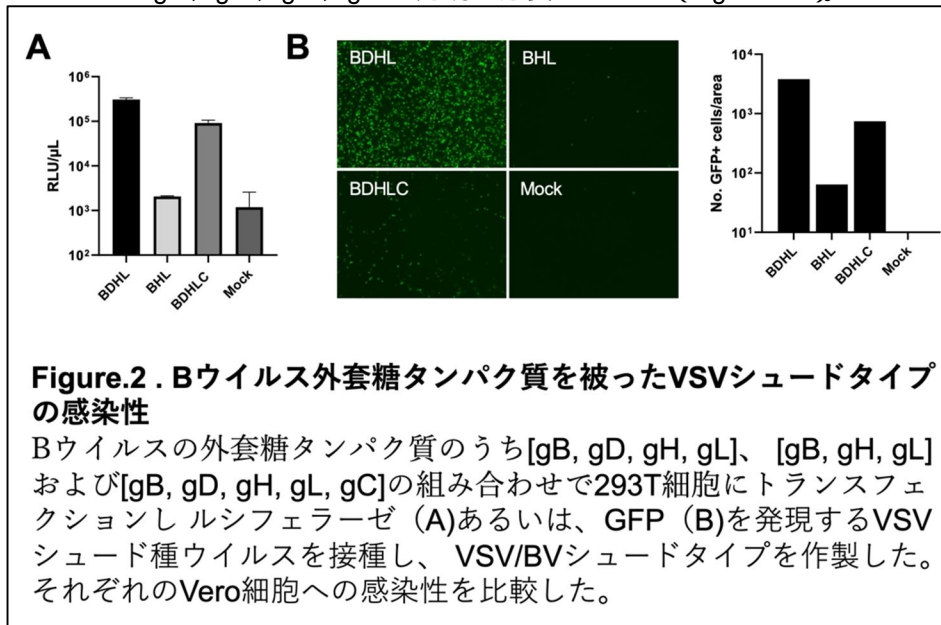


VSV/BV シュードタイプを作製した。

コントロール中和血清として、主な中和ターゲットである gD に対するマウス抗血清、あるいは、中和活性のある抗 gD モノクローナル抗体を作製した。日本の野外で採取されたサル血清を用いて、BV/VSV シュードタイプが特異的中和抗体検出法として有用かどうか検証した。

4. 研究成果

外套糖タンパク質の種々の組み合わせを検討したところ、感染性の高いVSV/BV シュードタイプにはgB、gD、gH、gLの発現が必要であった (figure 2)



VSV/BV シュードタイプの感染は抗 gD 抗体で中和され、受容体の一つある Nectin-1 依存性であった。さらに、BV/VSV シュードタイプのヒト神経芽腫由来 IMR32 細胞への高い感染性も確認された。これらの結果から、BV/VSV シュードタイプを用いることにより、Bウイルスの神経由来細胞への感染性の解析が可能であると考えられた。サル血清を用いたVSV/BV シュードタイプによる中和試験は感度 97.6%、特異度 89.4%であった。一方、ヒト血清を用いた VSV/BV シュードタイプによる中和試験では非特異的な反応が見られたことから、中和交差性のある HSV-1 との鑑別にはさらなる検討が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kinoshita H, Yamada S, Ogawa T, Nguyen PHA, Harada S, Kawahara M, Ishijima K, Maeda K, Ebihara H, Fukushi S.	4. 巻 Jun7
2. 論文標題 Development of a vesicular stomatitis virus pseudotyped with herpes B virus glycoproteins and its application in a neutralizing antibody detection assay.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e0109224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.01092-24	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada S, Katano H, Sato Y, Suzuki T, Uda A, Ishijima K, Suzuki M, Yamada D, Harada S, Kinoshita H, Nguyen PHA, Ebihara H, Maeda K, Saijo M, Fukushi S.	4. 巻 30
2. 論文標題 Macacine alphaherpesvirus 1 (B Virus) Infection in Humans, Japan, 2019.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Emerg Infect Dis	6. 最初と最後の頁 177-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3201/eid3001.230435. Epub 2023 Dec 12.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nguyen PHA, Fukushi S, Yamada S, Harada S, Yoshikawa T, Kinoshita H, Kawahara M, Ogawa T, Ebihara H, Moi ML, Saijo M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis of antiviral drug properties of thymidine kinase of herpes B virus using recombinant herpes simplex virus 1.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiol Spectr.	6. 最初と最後の頁 e0309123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.03091-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Phu Hoang Anh Nguyen, 福士秀悦, 山田壮一, 原田志津子, 吉河智城, 木下一美, 河原円香, 小川卓真, 海老原秀喜, Meng Ling Moi, 西條 政幸
2. 発表標題 Analysis of antiviral drug properties of thymidine kinase of herpes B virus by using recombinant herpes simplex virus 1
3. 学会等名 第31回 日本抗ウイルス療法学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Phu Hoang Anh Nguyen, Souichi Yamada, Shizuko Harada, Tomoki Yoshikawa, Hitomi Kinoshita, Madoka Kawahara, Takuma Ogawa, Hideki Ebihara, Meng Ling Moi, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo
2. 発表標題 Analysis of antiviral drug properties of thymidine kinase of herpes B virus by using recombinant herpes simplex virus 1
3. 学会等名 第 70 回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木下一美、山田壮一、Phu Hoang Anh Nguyen、原田志津子、河原円香、小川卓真、石嶋慧多、前田健、海老原秀喜、福士秀悦
2. 発表標題 VSVシュードタイプを用いたBウイルスの血清中和抗体測定法の開発
3. 学会等名 第 70 回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	木下 一美 (kinoshita Hitomi)		
研究協力者	グエン フー ホアン アン (Nguyen Phu Hoang Anh)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------