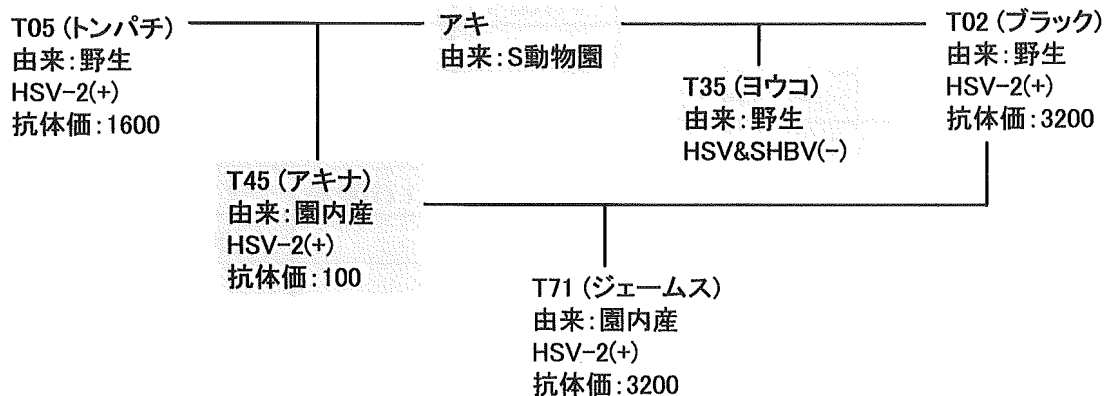


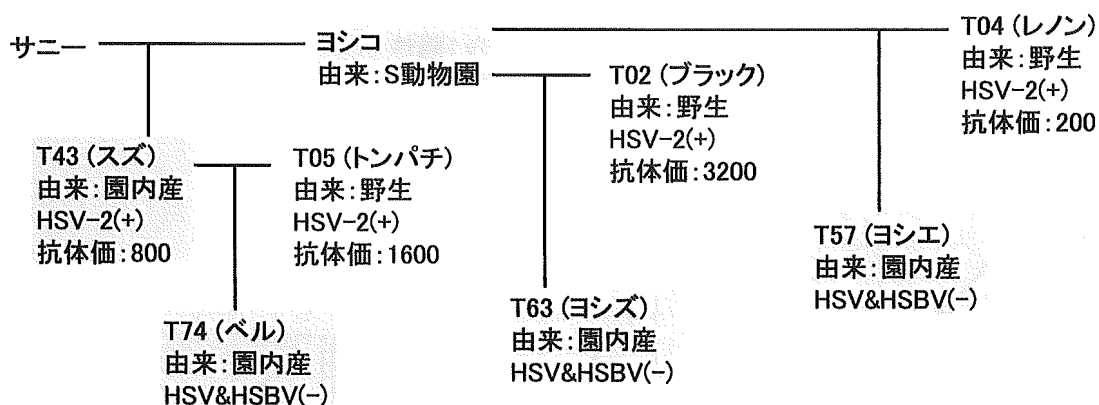
## 図7. チンパンジーの家系図

雄 雌

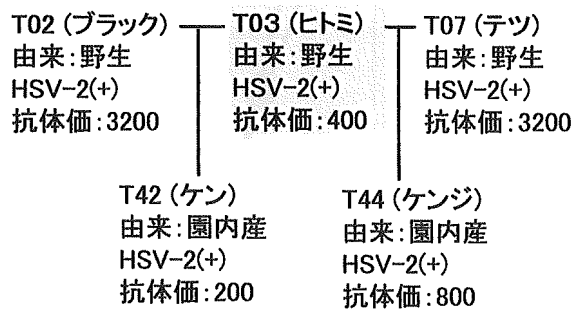
家系図1



家系図2



家系図3



家系図4

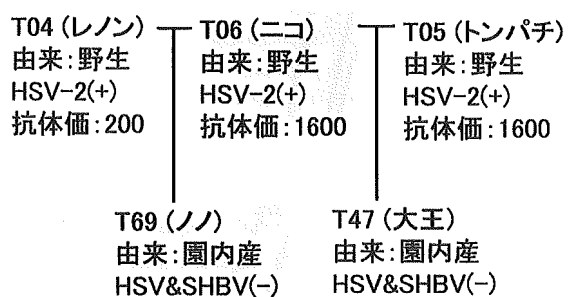
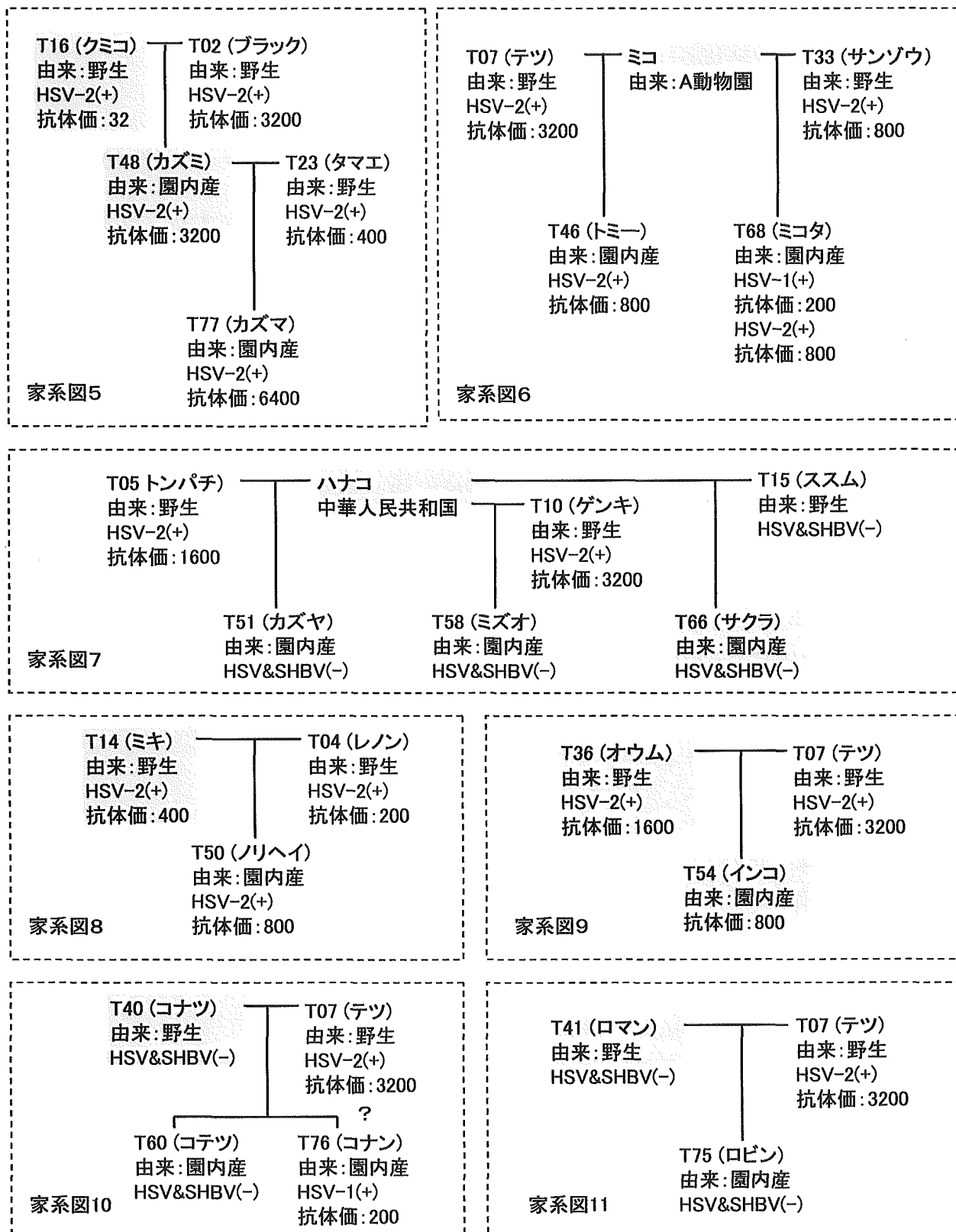


図8. チンパンジーの家系図

雄 雌



## ラッサウイルスの抗原検出法の開発と評価

分担研究者:森川 茂(国立感染症研究所ウイルス第1部第1室室長)

協力研究者:西條政幸(国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官)

倉根一郎(国立感染症研究所ウイルス第1部部長)

Dr. Alain Georges (P4 Laboratory, INSERM)

Dr. MC Georges Courbot, Dr. Marianneau Philippe (Pasteur Institute, Lyon)

研究要旨: アレナウイルスによる出血熱には、アフリカに広く分布するラッサウイルスによるラッサ熱と南米に分布する新世界アレナウイルスによる南米アレナウイルス出血熱(アルゼンチン出血熱、ボリビア出血熱、ベネズエラ出血熱、ブラジル出血熱)がある。これらは、本研究班で対象とする感染症の中で最も重要な感染症の一つである。特にラッサ熱は感染症法で一類感染症に指定される重要な感染症であり、1987年には輸入症例が報告されている。ラッサウイルスはレベル4に分類されるため、BSL4 実験室が稼働していない日本ではウイルス培養ができず、これまで診断体制が十分整備されていない。本研究では、ラッサウイルスの核蛋白(NP)に対する単特異抗体を作製し、これを用いた抗原検出 ELISA を開発し、その有効性を評価した。その結果、ラッサ熱患者の発症初期の診断に有効であることが明らかとなった。

### A. 研究目的.

アレナウイルスによる出血熱には、アフリカに広く分布するラッサウイルスによるラッサ熱と南米に分布する新世界アレナウイルス(フニン(Junin)ウイルス、マチュポ(Machupo)ウイルス、ガナリト(Guanarito)ウイルス、サビア(Sabia)ウイルス)による南米アレナウイルス出血熱(アルゼンチン出血熱、ボリビア出血熱、ベネズエラ出血熱、ブラジル出血熱)がある。これらは、本研究班で対象とする感染症の中で最も重要な感染症の一つである。特にラッサ熱は感染症法で一類感染症に指定される重要な感染症である。ラッサウイルスはレベル4に分類されるため、BSL4 実験室が稼働していない日本ではウイルス培養が出来ず、これまで診断体制が十分整備されていない。本研究では、ラッサ熱の原因ウイルスであるラッサウイルスの核蛋白

(NP)に対する単特異抗体を作製しこれを用いた抗原検出 ELISA を開発し、その有効性を評価することを目的とする。

### B. 方法.

- 1) ラッサウイルスの NP : N 末端に his-tag を付加したラッサウイルス NP を組換えバキュロウイルスに昆虫細胞で発現させ Ni<sup>2+</sup>-カラムにより精製した。
- 2) ポリクローナル抗体: 組換えラッサウイルス NP をウサギに免疫して作製した。
- 3) 単特異抗体の作製: 組換えラッサウイルス NP を Balb/c マウスに免疫し、脾臓を採取した。採取された脾臓から細胞を採取してマウスミエローマ細胞 (P3/Ag568) と融合させてラッサウイルス NP に対する単特異抗体を分泌す

- るハイブリドーマ株を樹立した。
- 4) 単特異抗体のエピトープの決定：作製された単特異抗体の認識するエピトープ領域は、GST 融合部分ラッサウイルス NP に対する反応性により決定した。
  - 5) 抗原検出 ELISA：作製された単特異抗体を捕捉抗体として、また、捕捉されたラッサウイルス NP の検出抗体としてウサギポリクローナル抗体を用いて、抗原補足 ELISA を開発した。
  - 6) 抗原補足 ELISA の感度：組換えラッサウイルス NP を希釈して抗原検出限界を決定した。
  - 7) ラッサウイルス感染動物からの抗原検出と RT-PCR との比較：RT-PCR は、既に報告されているプライマー（36E2: 5'-acc ggg gat cct agg cat t-3'及び80F2: 5'-ata taa tga tga ctg ttg ttc ttt gtg ca-3'）を用いた。1 x 10<sup>4</sup> focus forming unit (ffu)のラッサウイルス(AV 株)をハムスターに皮下接種して、継時的に血液を採取した。採取した血液から抗原補足 ELISA により抗原検出を、抽出した RNA から RT-PCR によりゲノム検出を行なった。さらに、P4 Laboratory, INSERM で開発された quantitative one step RT-PCR によりウイルス血症レベルを測定した。本実験は、フランス、リヨン市の INSERM の P4 Laboratory で行なった。
  - 8) 抗原検出 ELISA の交叉性：ラッサウイルスに最も近縁な Mopeia ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCM ウイルス)、Junin ウイルス (アルゼンチン出血熱の原因ウイルス) との交叉性を検討した。

### C. 結果

- 1) 単特異抗体の作製：8 クロウンの単特異抗体を作製した。これらの単特異抗体の

認識するエピトープは、表 1 に示すように、クローン 2-26 がラッサウイルス NP の 421-440 アミノ酸 (Pepscan 解析からは 437-443 アミノ酸の DLFATQP 配列)、4A5 が 21-370 アミノ酸領域からなる conformational epitope、6C11 が 41-60 アミノ酸 (Pepscan 解析からは 41-47 アミノ酸の GLDFSEV 配列) であった。他の 5 クロウンは認識する領域が特定できなかった。6C11 は、LCM ウイルスとも交叉した。

- 2) 抗原補足 ELISA の開発：これらの単特異抗体を捕捉抗体として抗原検出 ELISA の感度を検討した結果、クローン 4A5 を用いた場合が最も高感度であり、組換えラッサウイルス NP に対する検出感度は 80pg であった (図 1)。
- 3) ラッサウイルス感染動物からの抗原検出と RT-PCR との比較：ラッサウイルス感染ハムスターから継時的に採取した血液からの抗原検出を、抗原検出 ELISA で行なった結果、感染後 4 日で 5 検体中 1 検体から検出でき、感染 11 日では 5 検体全てから抗原が検出できた。一方、RT-PCR でも、感染後 4 日で 5 検体中 1 検体から検出でき、感染 11 日では 5 検体全てから抗原が検出できた。Quantitative one step RT-PCR によりウイルス血症レベルを解析した結果、感染 4 日で 100-1,000 ffu/mL、感染 11 日で 10,000-100,000 ffu/mL であった (図 2)。
- 4) 抗原検出 ELISA の交叉性：ラッサウイルスに最も近縁な Mopeia ウイルスは、開発した抗原検出 ELISA で検出できた。RT-PCR でも同様に Mopeia ウイルスが検出できた。LCM ウイルス、Junin ウイルスとは交叉しなかった。

### D. 考察

アレナウイルスによる出血熱には、アフリカに広く分布するラッサウイルスによるラッサ熱と南米に分布する新世界アレナウイルス（フニン (Junin) ウイルス、マチュポ(Machupo) ウイルス、ガナリト(Guanarito) ウイルス、サビア(Sabia) ウイルス) による南米アレナウイルス出血熱（アルゼンチン出血熱、ボリビア出血熱、ベネズエラ出血熱、ブラジル出血熱）がある。これらは、本研究班で対象とする感染症の中で最も重要な感染症の一つである。特にラッサ熱は感染症法で一類感染症に指定される重要な感染症である。ラッサウイルスは野生齧歯類（マストミス）を宿主動物とし、持続感染動物の血液、体液、尿中にウイルスが排泄され、ヒトへの感染源となる。ラッサ熱は、ナイジェリア、リベリア、シエラレオネ、セネガル、ギニア等のサハラ以南西アフリカで毎年流行している。雨期に比べて乾期に流行することが多い。これらの地域でのラッサ熱による年間死亡数は、5,000人程度と考えられている。ラッサ熱流行地からの海外渡航者、帰国者が潜伏期間中に移動して流行地以外で発症する事例がたびたび報告されている。日本でも1987年シエラレオネからの輸入症例が報告されている。このため、ウイルス性出血熱のなかでは、日本で今後ラッサ熱患者が発生する可能性が最も高いと考えられる。

しかし、ラッサウイルスはレベル4に分類されるため、BSL4 実験室が稼働していない日本ではウイルス培養ができず、これまで診断体制が十分整備されていなかった。本研究では、ラッサ熱の原因ウイルスであるラッサウイルスの核蛋白(NP)に対する単特異抗体を作製しこれを用いた抗原検出 ELISA を開発し、その有効性を評価した。ラッサウイルスの構造蛋白には、GP (G1, G2), NP, L 蛋白があり、最も多量に含まれるのが核蛋白である NP である。我々は、

既にラッサウイルスと LCM ウイルスの NP を組換え蛋白として種々の系で発現し、抗体検出系を開発している。しかし、ラッサ熱患者の発症初期の診断には、抗体が検出できない場合も多いため、抗原検出や RT-PCR によるゲノム検出は不可欠である。

ラッサ熱患者では、発症時の血中ウイルス力価が  $4 \log_{10}/\text{mL}$  以上で、かつ GOT が 150 以上の場合死亡率は高く、血中ウイルス力価が  $1.3 \log_{10}/\text{mL}$  以下の場合予後は良好と言われている。本研究から、抗原検出 ELISA の感度は  $3 \log_{10}/\text{mL}$  程度と考えられるため、本法で抗原が検出された場合には、直ちにリバビリン投与を開始することが必要である。

## E. 結語

ラッサウイルス NP に対する単特異抗体を作製し、ラッサウイルスを高感度に検出する抗原検出 ELISA を開発できた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Mizutani T, Fukushi S, Iizuka D, Inanami O, Kuwabara M, Takashima H, Yanagawa H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Inhibition of cell proliferation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006 Mar 1;46(2):236-43.
2. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEBS Lett.* 2006 Feb 20;580(5):1417-24. Epub 2006.
3. Tang Q, Zhao XQ, Wang HY, Simayi B, Zhang YZ, Saijo M, Morikawa S, Liang GD, Kurane I. [Molecular epidemiology

- of Xinjiang hemorrhagic fever viruses] *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2005 Dec;19(4):312-8. Chinese.
4. Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda A, Kurane I, Maeno G, Kimura J, Hirama C, Yoshida T, Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, Kojima A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J Virol*. 2005 Sep;79(18):11873-91.
  5. Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 30;102(35):12543-7.
  6. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Miyajima N, Taguchi F, Itamura S, Kurane I, Morikawa S. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Gen Virol*. 2005;86(Pt 8):2269-74.
  7. Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of crimean-congo hemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody. *J Med Virol*. 2005;77(1):83-8.
  8. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. JNK and PI3k/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1741(1-2):4-10.
  9. Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane I. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus. *Antiviral Res*. 2005 ;66(2-3):159-63.
  10. Ohnishi K, Sakaguchi M, Kaji T, Akagawa K, Taniyama T, Kasai M, Tsunetsugu-Yokota Y, Oshima M, Yamamoto K, Takasuka N, Hashimoto S, Ato M, Fujii H, Takahashi Y, Morikawa S, Ishii K, Sata T, Takagi H, Itamura S, Odagiri T, Miyamura T, Kurane I, Tashiro M, Kurata T, Yoshikura H, Takemori T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Jpn J Infect Dis*. 2005;58(2):88-94.
  11. Hatakeyama S, Moriya K, Saijo M, Morisawa Y, Kurane I, Koike K, Kimura S, Morikawa S. Persisting humoral antiviral immunity within the Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(4):520-4.
  12. Endoh D, Mizutani T, Kirisawa R, Maki Y, Saito H, Kon Y, Morikawa S, Hayashi M. Species-independent detection of RNA virus by representational difference analysis using non-ribosomal hexanucleotides for reverse transcription. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(6):e65.
  13. Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NT, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological

- diagnosis of SARS. *J Virol Methods*. 2005;125(2):181-6.
14. Saijo M, Niikura M, Maeda A, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Med Virol*. 2005;76(1):111-8.
  15. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello DE, Peiris JS, Chen PJ, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine*. 2005; 23 (17-18):2269-72.
  16. Saijo M, Suzutani T, Morikawa S, Kurane I. Genotypic characterization of the DNA polymerase and sensitivity to antiviral compounds of foscarnet-resistant herpes simplex virus type 1 (HSV-1) derived from a foscarnet-sensitive HSV-1 strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(2):606-11.
  17. Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *J Med Virol*. 2005 ;75(2):295-9.
2. 知的財産権の出願・登録（予定を含む）特許取得：該当なし
3. 学会発表
    - 1) Mizutani T, Fusushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Importance of JNK and PI3K/Akt signaling pathways for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
    - 2) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of SARS-CoV infections in experimental animals. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
    - 3) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
    - 4) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, protects monkeys from monkeypox. XIIIth International Congress of Virology. 2005年7月, San Francisco, CA, USA
    - 5) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Protection of non-human primates from monkeypox by highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, that lacks expression of B5R membrane protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program 39th Virology Panel Meeting. 2005年7月, San Francisco, CA, USA
    - 6) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 緒方も

- も子, 福士秀悦, 水谷哲也, 長谷川秀樹, 岩田奈織子, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 倉田毅, 森川茂. LC16m8痘そうワクチンによるカニクイザルにおけるサル痘発症予防効果 (続報). 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
- 7) 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. SARSコロナウイルス感染細胞におけるAktリン酸化の重要性. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
- 8) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. VSVシェードタイプを用いたSARS-CoV感染の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
- 9) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. マウス, ラットを用いた経代によるSARS-CoVの病原性の変化. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
- 10) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoVスパイクタンパク質とACE2の相互作用のVSVシェードタイプを用いた解析. 第28回日本分子生物学会年会. 2005年12月, 博多



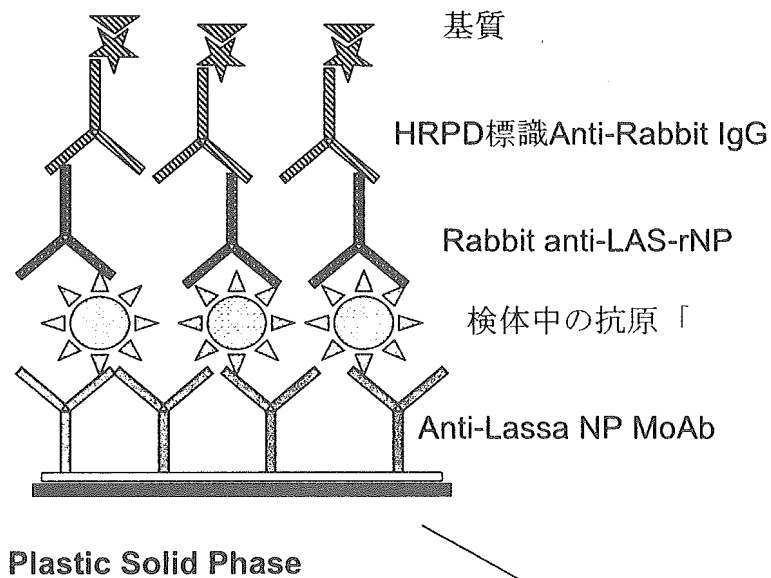
表1 ラッサウイルス NP に対する単特異抗体

clone	subclass	IF	ELISA	epitope on NP	LCM-NP
2-26	G1/k	+	+	421-440aa	-
4A5	G1/k	+	+	21-370aa	-
6C11	G1/k	-	+	41-60aa	+

表2. 抗原検出 ELISA と RT-PCR の交叉性

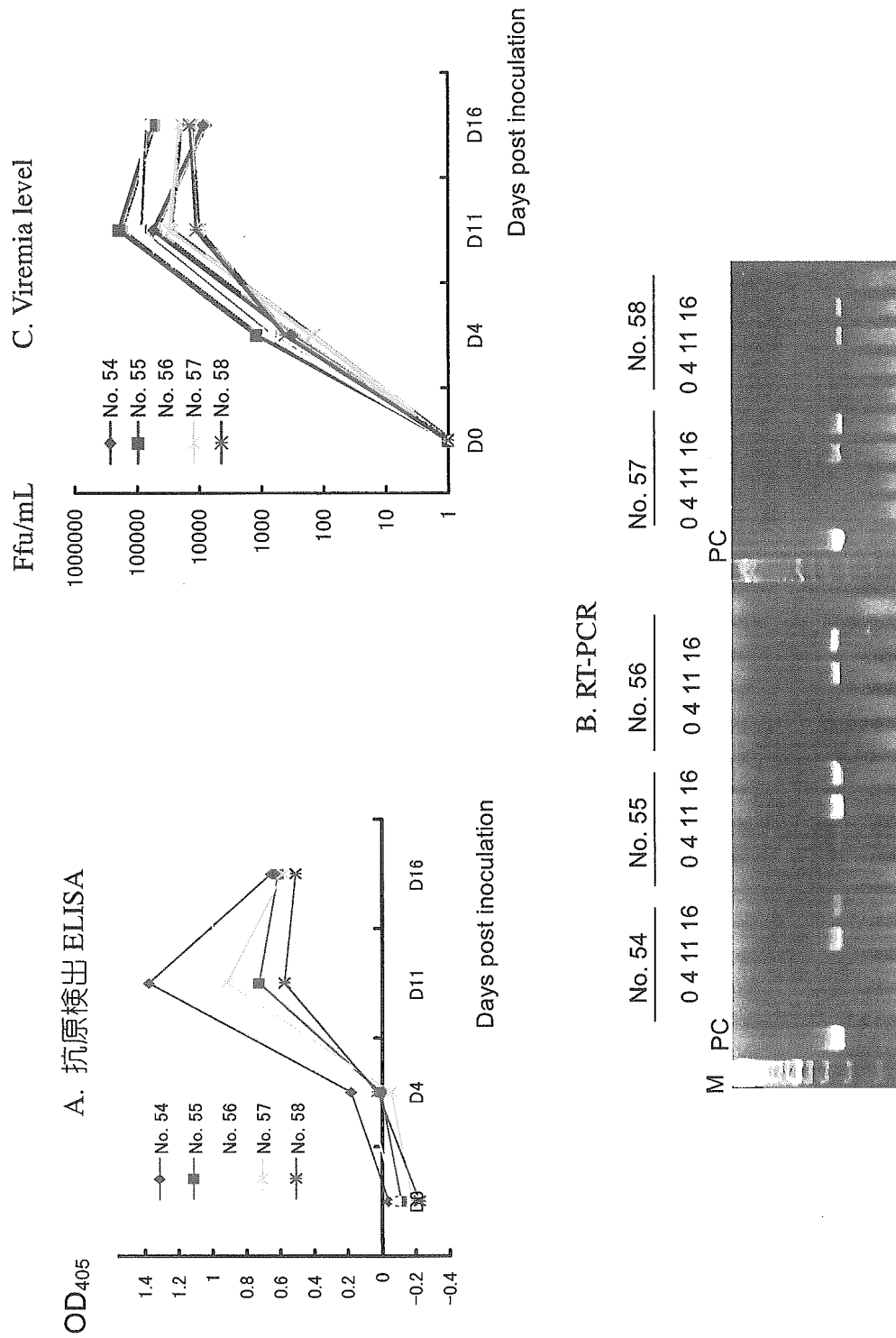
Virus	Ag-ELISA	RT-PCR
Lassa	+	+
Mopeia	+	+
LCMV	-	-
Junin	-	-

図1. 抗原検出 ELISA



感度 4A5 >> 2-26, 5-10, 6C11, 3-23, 3G10  
(Sensitivity is app. 80pg when 4A5 is used)

図2. ラッサウイルス感染ハムスターからのウイルス抗原、遺伝子検出



## 翼手目由来のウイルス感染症の疫学的解明

分担研究者 吉川 泰弘 (東大院農学生命科学研究科)

協力研究者 大松 勉 (東大院農学生命科学研究科)

### 研究要旨

これまで、コウモリからヘンドラウイルス、ニパウイルスなど人に対して重篤な症状を示す病原体が次々に分離されている。しかし、コウモリに関する研究はほとんど進んでいない。そこで、本研究においてはコウモリに関する基礎研究を行いその特性を検索した。その結果、1) 遺伝学的にコウモリは偶蹄目・奇蹄目・食肉目などと近縁、2) コウモリ CD4 Ig-like C type2 domain においてジスルフィド結合を持たない、3) 抗オオコウモリ IgG 抗体はコウモリ全般に対して特異性を持つ、4) 免疫器官における細胞質の豊富な IgG 抗体陽性 B 細胞の集簇、5) コウモリ体内温度における特異的な日内変動、が確認された。病原体媒介動物として注目されているコウモリであるが、その基礎情報に関してはまだ不明な部分が多い。今後、さらに研究を進めていく事でコウモリのウイルス媒介動物としての評価を行っていく予定である。

### A. 研究目的

ヘンドラウイルス、ニパウイルスやコウモリリッサウイルスなど、これまでに翼手目(以下、コウモリ)は人に対して重篤な症状を示す感染症の宿主であることが明らかになっている。さらに、bat-SARS-CoV やエボラ出血熱ウイルスなども分離されており、コウモリを由来とする感染症の報告が近年増加している。しかし、コウモリのカテゴリ、生態、免疫機能を始めとする生体機能などに関しては不明な点が多く、今後感染症研究を行っていく上でコウモリに関する基礎研究は必須である。そこで本研究においてはコウモリの基礎情報として、その遺伝学的背景、免疫因子の特徴および生理的機能を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. ミトコンドリア DNA を用いた系統解析

コウモリは、分布や定位、食性、解剖学的特徴などから大きくオオコウモリと小型コウモリに分類される。今回、研究対象として用いたルーセットオオコウモリは小型コウモリの特徴であるエコーロケーション能を有している唯一のオオコウモリである。ルーセットオオコウモリの遺伝学的背景を明らかにするために、エジプトルーセットオオコウモリ肝臓より抽出した DNA サンプルを用いてミトコンドリア DNA 全塩基配列を決定した。

#### 2. 免疫関連因子の遺伝子解析

コウモリ由来感染症についての研究を行っていく上でコウモリの免疫関連分子の特徴は重要な基礎情報である。しかし、これまでコウモリの免疫関連因子に関する報告はほとんどない。そこでデマレルーセットオオコウモリ脾臓由来 mRNA から cDNA を作成し、免疫機能に関与する CD4、IFN- $\alpha$ 、 $\beta$  について蛋白

コード領域の全長塩基配列を決定し系統的検索を行った。また、IFN- $\alpha$ 、 $\beta$ についてはデマレルーセットオオコウモリ腎臓由来初代培養細胞とコウモリ肺由来株化細胞 (Tb-1 Lu) に対して DEAE-Dextran 存在下で Poly(I:C) 処理 6 時間後の mRNA の発現を比較した。

### 3. IgG 抗原エпитープの類似性の検索

感染媒体としてコウモリを評価していく上で、コウモリ血清を対象とした ELISA system の開発は必須である。そこで、ELISA system に必要となる抗コウモリ IgG 抗体を作成し、その特異性について検索した。

### 4. 免疫器官の病理学的・免疫組織化学的検索

これまでコウモリの免疫器官に関する病理学的検索を行った報告はほとんどなく、その正常状態における免疫系の活性については不明である。そこで免疫担当臓器である脾臓およびリンパ節について病理学的検索を行った。さらに抗大コウモリ IgG 抗体を用いて免疫組織化学的検索を行った。

### 5. テレメーターを用いた腹腔内温度変化の解析

体温は病原体に対する生体防御機構としても重要な作用を示す生理的因子である。しかし、コウモリの体温に関する報告はほとんどない。そこで、デマレルーセットオオコウモリ腹腔内にテレメーターを挿入し体温変化について検索を行った。

## C・D. 研究結果・考察

### 1. ミトコンドリア DNA を用いた系統解析

系統解析の結果、ルーセットオオコウモリはオオコウモリの中で最も早く小型コウモリより分岐し、特にキクガシラコウモリ上科群から分岐した可能性が示唆された。また、コウモリは食肉目・偶蹄目・奇蹄目からなる群と近縁であるという説を支持する結果であった (Fig. 1)。

### 2. 免疫関連因子の遺伝子解析

各因子はヒトやマウスではなくネコやイヌ、ブタなどと相同性が高く、系統解析の結果はミトコンドリア DNA のものと同様であった。

CD4 の Ig-like C2 domain アミノ酸配列を比較した場合、コウモリ CD4 ではネコやブタ、イヌ CD4 と同様ジスルフィド結合を形成しないことが示唆され、ヒトやマウスなどとは異なる三次元構造を有し、感染病原体や MHC classII との結合や T 細胞の活性に影響を及ぼす可能性が示唆された (Fig. 2)。

また、コウモリ肺由来株化細胞 (Tb-1 Lu) とルーセットオオコウモリ腎臓由来初代培養細胞において、Poly(I:C) 処理 6 時間後の mRNA の発現を検索した結果、初代培養細胞のみで発現が見られた (Fig. 3)。これまでの報告で、コウモリ由来細胞として用いられていた株である Tb-1 Lu において抗ウイルス因子である IFN の発現が見られないことは、*in vitro* での感染実験における両細胞のウイルス増殖の差に影響を及ぼしているものと考えられた。

### 3. IgG 抗原エピトープの類似性の検索

エジプトルーセットオオコウモリ血清より Protein G column を用いてコウモリ IgG を精製し、それをウサギに 3 回免疫することで抗オオコウモリ IgG ウサギポリクローナル抗体を得た。それを Western Blotting 法を用いて

150kd 付近の 1 本のバンドに反応する事を確認した。本抗体を用いて、霊長目、げっ歯目および食虫目の IgG 抗原エピトープの類似性について検索を行った結果、本抗体は小型コウモリを含めたコウモリ全般にのみ高い特異性を示し、本抗体が抗汎コウモリ抗体として使用できることが明らかとなった (Fig. 4)。

#### 4. 免疫器官の病理学的・免疫組織化学的検索

検索した 6 個体全てにおいて胚中心の明瞭化が見られた。マッソン・トリクローム染色および抗オオコウモリ IgG 抗体を用いた免疫染色を行った結果、明瞭化が細胞質の豊富な IgG 抗体陽性 B 細胞の集簇であることが明らかになった (Fig. 5)。この結果から、コウモリは正常状態においても免疫機能が活性化している可能性が示唆された。

#### 5. テレメーターを用いた腹腔内温度変化の解析

オオコウモリはラットに比べ日内変動の幅が大きく暗期では平均 39°C 近くあり、時に 40°C を超える事もあった (Fig. 6)。この事からコウモリ体内におけるウイルス増殖は体温変化により影響を受ける可能性が示唆された。

#### E. 結論

これまでの解析により、遺伝学的に霊長目・げっ歯目などではなく偶蹄目・奇蹄目・食肉目などとの近縁性が示唆されたが、タンパク分子構造や体内温度などコウモリ特有の特性を持つことが明らかになった。今後、さらにコウモリ特有の性質を明らかにしていくことにより、コウモリ由来感染症の疫学的解明を進めていく。

#### F. 研究危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

1) 大松勉・吉川欣亮・石井寿幸・久和茂・宇根有美・吉川泰弘

ミトコンドリア DNA 塩基配列を用いたルーセットオオコウモリの系統分類

日本獣医学会、岩手大学、2001 年 10 月

2) 大松勉・吉川欣亮・石井寿幸・久和茂・宇根有美・吉川泰弘

ミトコンドリア DNA 全塩基配列を用いた翼手目の系統分類

日本進化学会、中央大学、2002 年 8 月

3) 大松勉・西村順裕・石井寿幸・寺尾恵治・久和茂・吉川泰弘

翼手目免疫分子の特性解析について

日本獣医学会、北海道大学、2004 年 9 月

4) 大松勉・渡辺俊平・西村順裕・石井寿幸・寺尾恵治・遠矢幸伸・久和茂・明石博臣・吉川泰弘

翼手目の特性について 一系統学的・免疫学的・分子生物学的検索一

人と動物の共通感染症研究会、JA ホール、2005 年 11 月

##### 2. 論文発表

1) Tsutomu Omatsu, Yoshiyuki Ishii, Shigeru Kyuwa, Elizabeth G Milanda, Keiji Terao, and Yasuhiro Yoshikawa  
Molecular Evolution Inferred from Immunological Cross-reactivity of Immunoglobulin G among Chiroptera and Closely Related Species

Experimental Animals 52(5), 425-8,  
2003

2) Omatsu, T., Nishimura, Y., Bak, E.J.,  
Ishii, Y., Tohya, Y., Kyuuwa, S., Akashi, H.,  
Yoshikawa, Y. (2006) Molecular cloning and  
sequencing of the cDNA encoding the bat  
CD4. Vet. Immunol. Immunopathol. 2006  
(In press.)

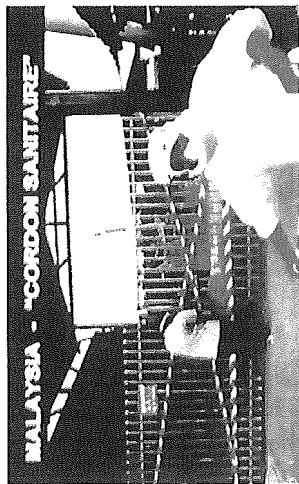
H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

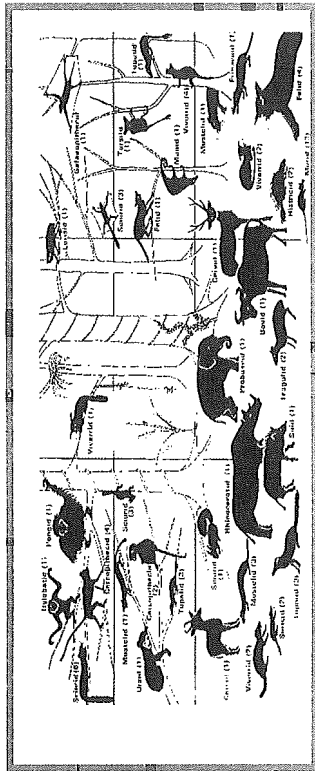
背景: 世界を震撼させる感染症の多くは動物由来感染症である。こうした感染症は容易にグローバル化し、繰り返し流行を起こし、真の原因が不明で制御困難という特徴を有している。

これまでの対応はエンドポイントである人、家畜を対象とした研究に重点を置いてなされてきた。しかし、このボトムアップ方式は既に限界に来ており、新規の発想が必要である。

感染の源である環境、宿主、病原体の生態系の解析という、トップダウン方式が必要。国外に強い拠点を持つフィールド科学と疫学、生態学、リスク科学といった異分野の統合的研究体制を確立し、汎アジアの情報ネットワークの確立により、エマージング感染症の制御を図る必要がある。



ニパウイルス  
流行時の豚  
の淘汰

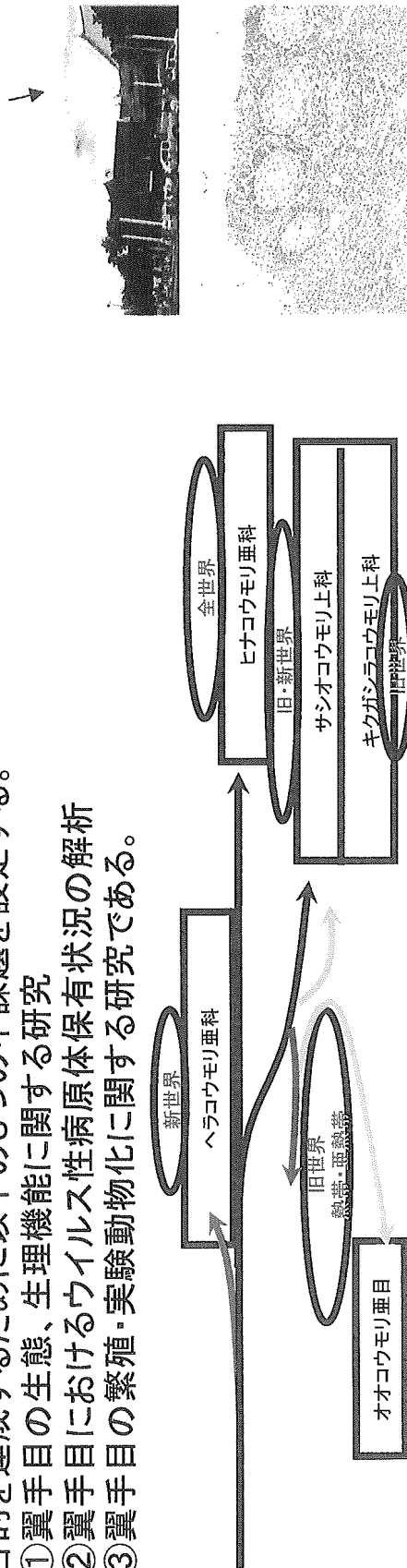


熱帯における  
動物と病原体  
の多様性

目的と方法: これまで断片的に行われていた翼手目の系統発生、エコケーション機能、生態学研究などをベースに、これまで行われてこなかった翼手目の分子生物学、生理学、生化学、感染疫学、実験動物化等を通して、翼手目由来感染症のリスク評価と有効な制御法を開発し、人および家畜の安全性を確保することが目的である。

目的を達成するために以下の3つの中課題を設定する。

- ① 翼手目の生態、生理機能に関する研究
- ② 翼手目におけるウイルス性病原体保有状況の解析
- ③ 翼手目の繁殖・実験動物化に関する研究である。

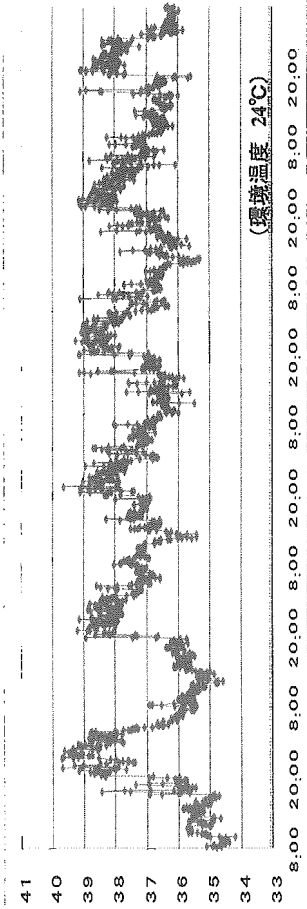


# 研究内容と研究体制

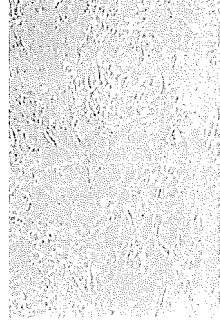
獣医微生物教室：ウイルス、疫学、遺伝子解析

獣医実験動物教室：生態、生理、免疫機能研究

抗血清



初代培養  
細胞作成



血清、臓器

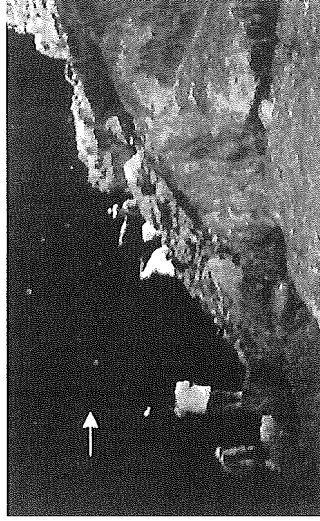
テレメトリー  
血液検査など  
生理値測定

DB化

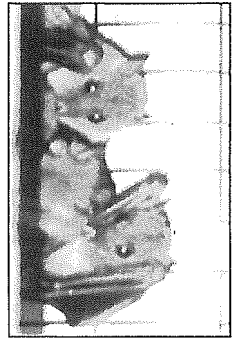
供給

繁殖個体の  
薬物代謝酵素  
の比較

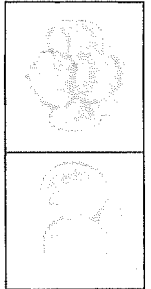
捕獲、生態、疫学調査  
(タイ、フィリピン)



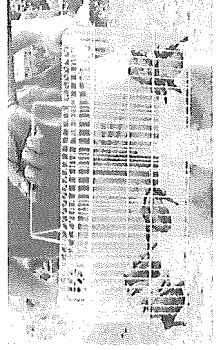
東大付属牧場：繁殖、飼育、生殖科学、実験動物化



体外受精と  
胚の保存



タイカセタート大学に技術移転





# 輸入動物に由来する新興感染症侵入防止対策に対する研究

## 研究の目的

\* 輸入動物由来感染症の侵入を防止するための研究を推進する。

その成果を①リスク管理機関に提言として報告する

②リスク機関が管理措置をとるための科学的エビデンスを収集、

③情報を公開することでリスクコミュニケーションを果たす。

本研究班で輸入動物由来感染症の  
侵入を防止するための研究を行う

リスク管理機関への提言  
管理措置の有効性評価

科学的エビデンスの収集  
リスクコミュニケーション

## 研究成果と還元

リスク管理機関への提言

関東、関西地区港湾労働者などハイリスク者のHFRS等の汚染状況を明らかにした  
国内輸入動物トレーサビリティのためのインターネットシステムの作成  
輸入業実績と添付された衛生証書の分析  
危機管理対応(エボラ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、マールブルグ病診断法開発)

科学的エビデンスの収集とリスクコミュニケーション

輸入野生輸入齧歯類の病原体汚染状況を把握し、

レプトスピラの動物取扱者への感染例と病原体同定の報告

BウイルスとHSV1, 2の抗体の弁別測定、チンパンジーの抗体保有状況調査

抗コウモリ抗体作成・ELISAによるタイ、フィリピンコウモリの抗体測定

### Ⅲ. 次年度の課題

リスク管理機関への提言  
管理措置の有効性評価

- ・関西地区の港湾労働者などハイリスク者のHFERS汚染状況が明らかにしたので、H17年度は関東の港湾労働者、動物輸入業者、獣医師などの調査を進める
- ・国内輸入動物トレーサビリティのためのインターネットシステムの作成したので、流通経路及び政府証明書の内容について輸入届出前と届出後の比較を行う
- ・危機管理対応(エボラ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、マールブルグ病診断法開発)として南米のウイルス性出血熱に関して診断系の開発を試みる

科学的エビデンスの収集  
リスクコミュニケーション

- ・輸入ハムスター、野生輸入齧歯類の病原体汚染状況を把握したが、H17年度は輸入届出制の有効性を評価するため、引き続き輸入齧歯類の病原体汚染状況を把握し比較する
- ・BウイルスとHSVの抗体の弁別測定を可能にしたので、H17年度は国内のマカカ属サル類、チンパンジー、サル類の飼育者などについて血清疫学を行う
- ・抗コウモリ抗体作成した。H17年度は海外拠点(マレーシア、台湾)の開拓、コウモリが媒介すると考えられる感染症の診断法の開発を行う

## IV. 研究組織

主任研究者：氏名・所属・連絡先（TELもしくはE-mail）  
吉川泰弘・東京大学大学院農学生命科学研究科

TEL 03-5841-5038 E-mail [ayoshi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp](mailto:ayoshi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

分担研究者：氏名・所属

内田幸憲・厚労省神戸検疫所

本藤 良・日本獣医畜産大学獣医公衆衛生

大田周司・東京検疫所川崎支所

森川 茂・厚労省国立感染症研究所外来ウイルス室

宇根有美・麻布大学獣医学部

協力研究者：氏名・所属

大松 勉・東京大学大学院農学生命科学研究科

鈴木莊介・厚労省神戸検疫所

中島健介・厚労省国立感染症研究所

今成敏夫・厚生省成田検疫所