

- Aires, Argentina (2007.6)
- Baltimore, MD (2007. July 24-25)
14. Kariwa, H., Tanikawa, Y., Abu Daud, N.H., Lokugamage, N., Lokugamage, K., Seto, T., Miyashita, D., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., Nakauchi, M., Takashima, I.: Animals Models for Puumaka Virus Infection Using Several Rodent Species of Laboratory Animal. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
  15. Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Araki, K., Okumura, M., Nakamura, I., Kajino, K., Arikawa, J.: Pathological and immunological analysis of the experimental model mice of the Hantaan virus infection. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
  16. Okumura, M., Yoshimatsu, K., Kumperasart, S., Nakamura, I., Ogino, M., Taruishi, M., Sungdee, A., Pattamadilok, S., Ibrahim, I.N., Erlina, S., Agui, T., Yanagihara, R., Arikawa, J.: Studies of Thottapalayam Virus: a Hantavirus Isolated from Shrew. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
  17. Kariwa, H., Seto, T., Tanikawa, Y., Nakamura, I., Hashimoto, N., Abu Daud, N.H., Nakauchi, M., Miyashita, D., Evgeniy A. Tkachenko, Leonid I. Ivanov, Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.: Epidemiological Study of Hantavirus Infections in Volga-Side Federal Region, Russia. 41st Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program: Virology Panel Meeting.

## II. 分担研究報告書

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立  
及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：南米出血熱の実験室診断法の開発

分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部第一室長）

協力研究者：福士秀悦、酒井宏治、水谷哲也、緒方もも子、西條政幸、倉根一郎（同、ウイルス第一部）、Victor Romanowski（アルゼンチンラプラタ国立大学）

研究要旨：一類感染症に分類される南米出血熱の中で最も患者の多いアルゼンチン出血熱の血清診断法の開発・評価を行なった。アルゼンチン出血熱の原因ウイルスであるフニンウイルスは、アレナウイルス科の新大陸アレナウイルスのB clade に属し、多くの国でBSL4病原体に分類されるため、現状では日本でウイルスの取扱ができない。本研究では、組換えバキュロウイルスにより発現・精製されたフニンウイルス NP を抗原としたIgG-ELISA を患者血清を用いて評価した結果、高感度・精度でウイルス抗体が検出できた。また、ウイルスを用いない代替えウイルス中和試験に用いられる増殖欠損型水疱性口内炎ウイルスによるシュードタイプを作製した。さらに、高感度なウイルス抗原検出ELISAを開発するために、組換えNPに対する高アビディティー単クローン抗体を作製し、その認識領域を決定した。

A. 目的と意義：

南米出血熱（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）は、新たに1類感染症に加えられたラッサ熱と類似したウイルス性出血熱で、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。原因ウイルスは、それぞれ、アレナウイルス科の新世界アレナウイルスのB clade に分類されるフニン (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) ウイルスで、いずれも BSL4 に分類される。このため、BSL4 実験室が稼働していない日本ではウイルスが培養できない。本研究では、南米出血熱で最も患者の多いアルゼンチン出血熱の実験室診断法の

開発を目的とする。

B. 材料と方法：

1) 組換えフニンウイルス NP：

フニンウイルス NP 組換えバキュロウイルス感染昆虫細胞からの組換えフニンウイルス NP を精製した。

2) 血清：

ウサギ免疫血清は、それぞれ精製組換えラッサウイルス、LCM ウイルス NP、フニンウイルス NP を Inject Alum をアジュバントに用いて4回免疫して作製した。患者血清は、ラッサ熱患者血清（CDC および東大医科研より分与）、アルゼンチン出血熱患者血清（ラプラタ大学）を用いた。

3) フニンウイルス特異的抗体検出

#### IgG-ELISA :

精製組換えフニンウイルス NP を抗原に用いて IgG-ELISA を行った。ポリヘドリン遺伝子をノックアウトしたバキュロウイルス感染細胞から、同様に調整した抗原を陰性抗原として用い、NP 抗原コートウェルの OD<sub>405</sub> から陰性抗原の OD<sub>405</sub> を引いた値を算出し、Net OD<sub>405</sub> とした。

4) アルゼンチン出血熱患者血清を用いたフニンウイルス NP 特異抗体検出 IgG-LISA の評価 :

フニンウイルス特異的抗体検出 IgG-ELISA を用いて、アルゼンチン出血熱患者血清中の特異 IgG 抗体の検出をフニンウイルス感染細胞ライセートを用いた IgG-ELISA 及びフニンウイルス中和試験と比較した。本試験は、アルゼンチン、ラプラタ国立大学の Victor Romanowski 教授のもとで行われた。

5) 増殖欠損型水疱性口内炎ウイルスによるシュードタイプの作製 :

フニンウイルス外被糖蛋白質 (GPC) 遺伝子を発現するプラスミド pKS336-Junin GPC を作製した。このプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクトし、外被糖蛋白質遺伝子を緑色蛍光蛋白質 (GFP) 遺伝子と入れ換えた VSV シュードタイプの種ウイルスである VSVΔG\*-G を接種し、24 時間後に培養上清を回収して、フニンウイルス外被糖蛋白質を被った VSV シュードタイプを得た。

6) フニンウイルス NP に対する単クローン抗体の作製と認識領域の解析 :

精製組換えフニンウイルス NP でマウスを免疫し、単クローン抗体を作製した。これらの単クローン抗体の認識する領域を、大腸菌で発現したフニンウイルス NP の種々の部分蛋白との反応性により解析した。

#### C. 結果 :

1) フニンウイルス NP の精製 :

組換えバキュロウイルス感染細胞からの組換えフニンウイルス NP の精製は、感染細胞の 1% NP40 非可溶化分画を 2M Urea/1%NP40 で超音波処理した遠心沈査を 6M Urea 処理により可溶化して 95%純度の組換えフニンウイルス NP を得た (図 1)。

2) フニンウイルス特異的抗体検出 IgG-ELISA :

精製した組換えフニンウイルス NP と同様に調整したラッサウイルスと LCM ウイルス NP を抗原とする IgG-ELISA を行った結果、高度免疫ウサギ抗体では、旧世界アレナウイルスであるラッサウイルスと LCM ウイルスの NP の間には抗原性に強い交叉が認められたが、旧世界アレナウイルスとフニンウイルス NP とは、殆ど抗原性に交叉が認められなかった。一方、ラッサ熱患者血清 4 検体を用いて、同様に IgG-ELISA を行なうと、LCM ウイルスとは弱く交叉したが、フニンウイルス NP とは全く交叉しなかった。アルゼンチン出血熱患者血清は旧世界アレナウイルスとは全く交叉しなかった。アルゼンチンの非流行地の健常人血清を用いて本 IgG-ELISA の cut off 値を平均値+3SD に設定した。アルゼンチン出血熱患者血清 26 検体を用いて、本 IgG-ELISA とフニンウイルス感染細胞抗原を用いた IgG-ELISA を比較するとほぼ一致する結果が得られた。一方、フニンウイルス中和試験と比較すると中和力価が低い 5 検体は、本 IgG-ELISA、ウイルス抗原を用いた IgG-ELISA で陰性であった (図 2)。

3) 増殖欠損型水疱性口内炎ウイルスによるシュードタイプ :

pKS336-Junin GPC を 293T 細胞にトラ

ンスフェクトして一過性にフニンウイルス GPC (G1,G2 蛋白質)を発現させ、VSVΔG\*-G を接種し、24 時間後に培養上清に含まれるシュードタイプ VSVΔG\*-Junin GPC を回収した。VSV シュードタイプの感染は GFP の発光で判別できる。段階希釈した VSVΔG\*-Junin GPC をフニンウイルス感受性細胞である Vero E6 細胞に接種しシュードタイプの感染価を算出したところ、 $6 \times 10^6$  infectious unit (IU)/mL と高力価であった (図 3)。

4) フニンウイルス NP に対する単クローン抗体の作製と認識領域の解析：

組換え精製フニンウイルス NP に対する単クローン抗体を3クローン作製した。いずれも、通常の ELISA 及び 2M urea 存在下での ELISA で同等の反応性を示すことから、アビディティーの高い抗体である。これらの認識領域を、GST タグを付加した部分 NP との反応性を WB 解析した結果、クローン E4-2、C11-12 は NP の N 末端側 235 アミノ酸の領域を、クローン C6-9 は C 末端側 181 アミノ酸の領域を認識した (図 4)。

#### D. 考察：

フニンウイルスは、マチュポ、ガナリト、サビアウイルスと共に、アレナウイルス科の新世界グループの B clade に属し、2 分節からなる一本鎖の(-)鎖 RNA をゲノムとするエンベロープウイルスである。ウイルス構造蛋白質には、GPC (発現後 G1, G2 に開裂)、NP, L 蛋白質があり、最も多量に含まれるのが核蛋白質である NP である。ウイルスは野生齧歯類 (corn mouse, *Calomys musculus*) を宿主動物とし、その血液、体液、尿中に排泄され、ヒトへの感染源となる。アルゼンチン出血熱は、毎年、穀物の収穫期に流行し、

流行地が首都ブエノスアイレス近郊であるため、輸入感染症としての危険性は、他の南米出血熱のボリビア出血熱、ベネズエラ出血熱、ブラジル出血熱と比べて高い。

我々は、これまでラッサウイルスと LCM ウイルスの NP を組換え蛋白として種々の系で発現し、血清診断法を開発している。本研究から、組換えフニンウイルス NP を用いる IgG-ELISA は、高感度・精度で特異抗体を検出できることが明らかとなった。今後、組換え NP を発現する細胞株を樹立して、感染蛍光抗体法に用いられる抗原スライドを作製する必要がある。血清診断の gold standard はウイルス感染症の場合中和試験によるウイルス中和抗体の検出であるが、ウイルスを国内で取り扱うことができないため、VSV シュードタイプを用いた代替えウイルス中和試験が必要になる。今年度は、VSV シュードタイプの作製を検討した結果、非常に高力価のシュードタイプが得られた。同様の手法で得られたラッサウイルスのシュードタイプと併せて次年度以降これらを用いた代替え中和試験法の評価を行う予定である。

アレナウイルスは、遺伝子変異が非常に多く RT-PCR で検出できない株が容易に出現することから、抗原検出法は病原診断上必須である。このため、抗原検出 ELISA に用いられるアビディティーの高い単クローン抗体を作製した。得られた 3 クローンは、NP の N 末端側を認識するものと C 末端側を認識するものがあったため、これらを用いた抗原検出 ELISA 法の確立を次年度に行なう。また、より詳細に認識するエピトープを決定し、ウイルス株間で保存されている領域を認識するか否かを明らかにする必要がある。

## E. 結論

一類感染症に分類される南米出血熱の中で最も患者の多いアルゼンチン出血熱の組換えウイルス NP を用いた IgG-ELISA 法の開発・評価を行なった。ウイルスを用いない代替えウイルス中和試験に用いられる増殖欠損型水疱性口内炎ウイルスによるシュードタイプを作製した。高感度なウイルス抗原検出 ELISA を開発するために、組換え NP に対する高アビディティー単クローン抗体を作製し、その認識領域を決定した。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushima, S., Yokoyama, M., Harashima, A., Sato, Y., Saijo, M., Morikawa, S., and Sata, T. : Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus, *J. Virol.*, 81(4):1848-57, 2007
2. Yu, F., Le, M.Q., Inoue, S., Hasebe, F., Parquet, M.D., Morikawa, S., and Morita K. : Development of immunoglobulin m capture enzyme-linked immunosorbent assay ststem for severe acute respiratory syndrom coronavirus by using recombinant truncated nucleocapsid proteion as antigen. *Clin. Vaccine Immunol.* 14(2):146-149, 2007.
3. Mizutani, T., Endoh, D., Okamoto, M., Shirato, K., Shimizu, H., Arita, M., Fukushima, S., Saijo, M., Sakai, K., Limn, C.K., Ito, M., Nerome, R., Takasaki, T., Ishii, K., Suzuki, T., Kurane, I., Morikawa, S., and Nishimura, H. : Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 13(2): 322-4, 2007.
4. Okada, M., Okuno, Y., Hashimoto, S., Kita, Y., Kanamaru, N., Nishida, Y., Tsunai, Y., Inoue, R., Nakatani, H., Fukamizu, R., Namie, Y., Yamada, J., Takao, K., Asai, R., Asaki, R., Kase, T., Takemoto, Y., Yoshida, S., Peiris, J.S., Chen, P.J., Yamamoto, N., Nomura, T., Ishida, I., Morikawa, S., Tashiro, M., and Sakatani, M. : Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. *Vaccine*, 25(16): 3038-3040, 2007
5. Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Morikawa, S., Yokosawa, H., and Yasuda, J. : Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *J. Virol.* 81(9):4895-9, 2007.
6. Mizutani, T., Fukushima, S., Kenri, T., Sasaki, Y., Ishii, K., Endoh, D., Zamoto, A., Saijo, M., Kurane, I., and Morikawa, S. : Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by Mycoplasma fermentans. *Arch. Virol.* 152:1019-1025, 2007
7. Sakai, K., Mizutani, T., Fukushima, S., Saijo, M., Endoh, D., Kurane, I., Takehara, K., and Morikawa, S. : An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences of

- avian RNA viruses. *Arch. Virol.* 152(9):1763-5, 2007
8. Saijo, M., George-Corbot, M., Philippe, M., Victor, R., Fukushi, S., Mizutani, T., George, A., Kurata, T., Kurane, I. and Morikawa, S. : Development of recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever. *Clin Vaccine Immunol.* 14(9):1182-9, 2007
  9. Ike, F., Bourgade, F., Ohsawa, K., Sato, H., Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I., Takimoto, K., Yamada, Y.K., Jaubert, J., Berard, M., Nakata, H., Hiraiwa, N., Mekada, K., Takakura, A., Itoh, T., Obata, Y., Yoshiki, A., and Montagnetelli, X. : LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. *Comp. Med.*, 57(3): 272-281, 2007.
  10. Ikejiri, M., Saijo, M., Morikawa, S., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., and Maruyama, T. : Synthesis and biological evaluation of nucleoside analogues having 6-chloropurine as anti-SARS-CoV agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17(9): 2470-3, 2007.
  11. Morikawa, S., Saijo, M. and Kurane, I. : Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30(5-6):391-8, 2007
  12. Morikawa, S., Saijo, M. and Kurane, I. : Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30(5-6):375-89, 2007
  13. Fukushi, S., Mizutani, T., Sakai, K., Saijo, M., Taguchi, F., Yokoyama, M., Kurane, I., and Morikawa, S. : Amino acid substitutions in S2 region enhance SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells. *J. Virol.* 81(19):10831-4, 2007
  14. Kihara Y, Satho T, Eshita Y, Sakai K, Kotaki A, Takasaki T, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Lapcharoen P, Sumroiphon S, Iwanaga S, Ushijima H, Endoh D, Miyata T, Sakata A, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. : Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in the field. *J Virol Methods.* 146(1-2):372-4, 2007
  15. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Sato Y, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Ami Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T. : Pathology and virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. *Int J Exp Pathol.* 88(6):403-14, 2007.
  16. Saijo M, Suzutani T, Mizuta K, Kurane I, Morikawa S. : Characterization and susceptibility to antiviral agents of herpes simplex virus type 1 containing a unique thymidine kinase gene with an amber codon between the first and the second initiation codons. *Arch Virol.* 153(2): 303-14, 2008
  17. Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Iizuka I, Sakai K, Sata, T, Kurata T, Kurane I, and Morikawa S. : Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African

- MPXV strains. *Jpn J Infect Dis*, in press.
18. Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi N, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani T. Isolation of Novel Adenovirus from Fruit Bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). *Emerg Infect Dis*. 14(2):347-9, 2008.
2. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし
3. 学会発表  
国内学会
1. 水谷哲也、木原悠希、佐藤朝光、江下優樹、酒井宏治、高崎智彦、小滝徹、遠藤大二、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、倉根一郎、森川茂「新興、再興ウイルスの網羅的検出方法、蚊媒介ウイルスへの応用」第144回日本獣医学会学術集会、江別、2007年9月
  2. 酒井宏治、水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、遠藤大二、岡村雅史、中村政幸、竹原一明、倉根一郎、森川茂「改良網羅的ウイルスゲノム検出方法を用いた鳥由来ウイルスの同定」第144回日本獣医学会学術集会、江別、2007年9月
  3. 佐藤朝光、江下優樹、酒井宏治、見明史雄、牛島廣治、高崎智彦、小滝徹、遠藤大二、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂、水谷哲也「タイで採集されたネッタイシマカからのRDV法によるRNAウイルスの検出」、第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月
  4. 水谷哲也、西村秀一、酒井宏治、前田健、清水博之、遠藤大二、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂「新興ウイルス感染症の網羅的検出方法の確立と応用」、第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月
  5. 西條政幸、網康至、須崎百合子、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、飯塚愛恵、酒井宏治、佐多徹太郎、倉根一郎、森川茂「高病原性コンゴ盆地型サル痘ウイルス(MPXV)と低病原性西アフリカ型MPXVの鑑別可能な定量的PCR法によるMPXV感染症の診断」、第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月
  6. 前田健、本道栄一、安本茂、遠藤大二、森川茂、水谷哲也「コウモリ由来ウイルスの分離・増殖のための新規培養細胞の樹立とその応用」、第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月
  7. 酒井宏治、水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、遠藤大二、倉根一郎、森川茂「網羅的ウイルスゲノム検出方法を用いたリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)の同定」、第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月
  8. 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代真人、田口文広「高度弱毒化ワクチニアウイルスDIsの組換えSARSワクチンとしての検討」、第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月
  9. 福士秀悦、前田健、平井明香、新倉綾、山田靖子、横山勝、吉川泰弘、水谷哲也、酒井宏治、西條政幸、倉根一郎、森川茂「コウモリ由来

- ACE2 を用いた SARS コロナウイルスの感染性の解析」、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月
10. 永田典代、岩田奈緒子、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「SARS-CoV 感染動物モデルにおける加齢による免疫応答の相違」、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月
  11. 西條政幸、網康至、永田典代、長谷川秀樹、福士秀悦、水谷哲也、飯塚愛恵、佐多徹太郎、倉田毅、倉根一郎、森川茂「高度弱毒化天然痘ワクチン LC16m8 の暴露後使用時の天然痘予防効果：霊長類におけるサル痘モデルによる検討」第 11 回日本ワクチン学会学術集会、横浜、平成 19 年 12 月
  12. 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代真人、田口文広「高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討」第 11 回日本ワクチン学会学術集会、横浜、平成 19 年 12 月
  13. 松本武久、上條加寿恵、山本典生、高谷大輔、佐藤万仁、大貫裕之、倉根一郎、西條政幸、竹田一志鷹真由子、廣田洋、梅山秀明、森川茂、山本直樹、横山茂之 SARS コロナウイルス (SARS-CoV) 3CL-Pro タンパク質の立体構造に基づく抗ウイルス感染症薬候補化合物の探索. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会の合同大会、横浜、平成 19 年 12 月
- Satou A, Nagai C, Terano T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, and Hashizume S : Explicit Comparison of Smallpox Vaccines by PRNT Titer Requires Standardization of PRNT Methods. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance, Vienna 2007
2. Yokote H, Shinmura Y, Nagai C, Satou A, Kanehara T, Sasaki T, Matsui H, Terano T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Kurata T, and Hashizume S: Efficacy and Safety Evaluation of Attenuated Smallpox Vaccine LC16m8. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance, Vienna 2007
  3. Lee SL, Di Caro A, Favier AL, Grolla AR, Lacote S, Morikawa S, Nitsche A, Olivera H, Zimmermann P, and Damon I : Smallpox Diagnostics: Global Preparedness. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance, Vienna 2007
  4. Urata S, Noda T, Morikawa S, Kawaoka Y, and Yasuda J : Cellular and Viral Requirements for Marburg Virus Budding. 5th ASM biodefense and emerging diseases research meeting, Washington DC, 2007
  5. Shinmura Y, Sasaki T, Matsui H, Kuranaga M, Yokote H, Terano T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, and Hashizume S : Investigation into the Protection Mechanisms of Attenuated Smallpox Vaccine LC16m8. 5th ASM biodefense and emerging diseases research meeting, Washington DC, 2007
  6. Yokote H, Kanehara T, Satou A, Nagai

国際学会

1. Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T,

- C, Terano T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, and Hashizume S : Establishment of PRNT Method for Smallpox Vaccines. 5th ASM biodefense and emerging diseases research meeting, Washington DC, 2007
7. Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Iwata N, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Kurane I, Kurata T, and Morikawa S : Therapeutic vaccination with a highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, for protection of nonhuman primates from monkeypox: 41st annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science, Baltimore (2007. 7)

図1. 組換えバキュロウイルス感染昆虫細胞からの組換えフニンウイルス NP の精製

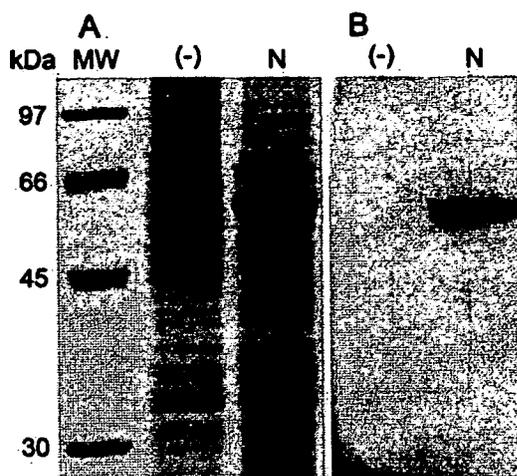


図2. IgG-ELISA によるフニンウイルス NP 特異的抗体の検出

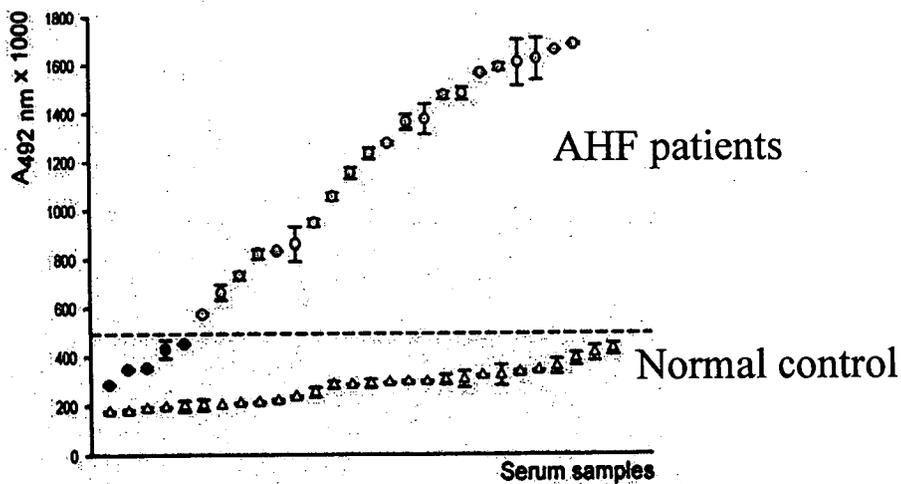


図 3. 代替え中和試験のための VSV シュードタイプ作製

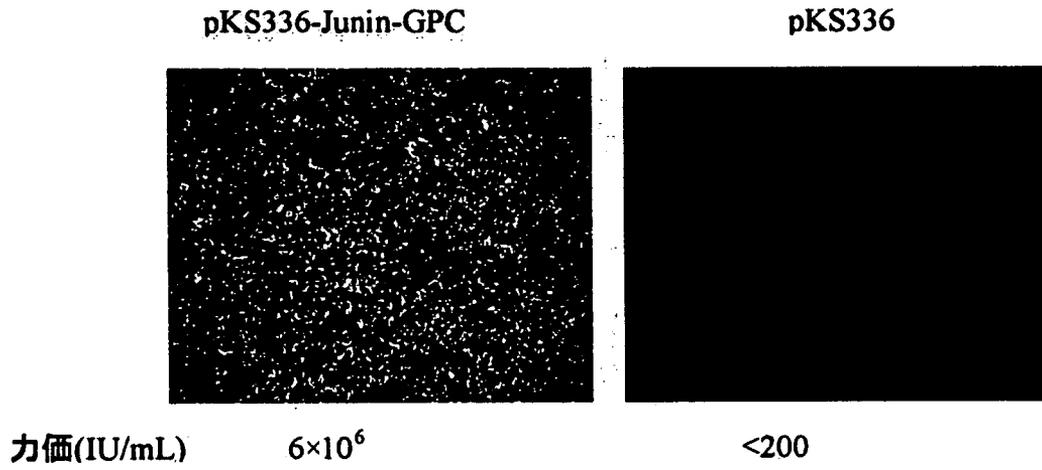
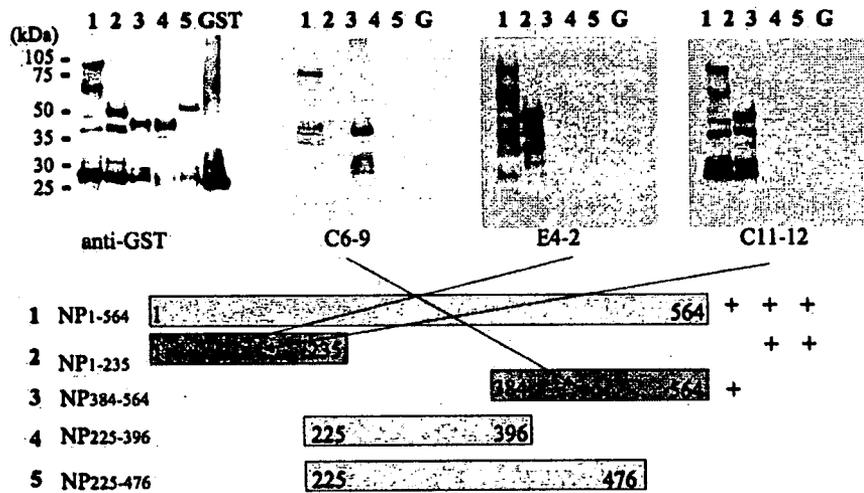


図 4. フニンウイルス NP 特異的単クローン抗体の認識領域



## 厚生労働科学研究費 新興・再興感染症研究事業

### 防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立 及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：ニパウイルスの診断法の確立及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究者：甲斐知恵子（東京大学医科学研究所教授）

協力研究者：米田美佐子（東京大学医科学研究所）

研究要旨：ニパウイルス感染症は 1998 年にマレーシアで出現し、100 名以上（致死率 40%）の人が死亡した新興感染症である。自然宿主はオオコウモリと同定され、マレーシアではブタを介して人に伝播した。現在でもバングラディッシュ等でさらに高い致死率を示して散発的に発生しており、感染経路も人への直接伝播と考えられている。我が国では抗体陽性のオオコウモリや患者の発生は未だないが、比較的近いアジア地域で発生している感染症であり、今後の侵入に備えて迅速診断体制を整備し防御法を開発することが必要である。先進諸外国においては感染性のニパウイルスを扱う際には BSL4 施設内で行なうことが推奨されている。このため、本研究は、感染性ウイルスを用いることなくウイルス抗原や抗体を検出できる系を確立することと、予防・治療法の開発のための基礎的知見を得ることを目的とした。本年度は、以下の成果を得た。

1) ウイルス遺伝子検出法としての RT-PCR 法の有効性を検討する目的で、BSL4 施設にてモデル動物への感染実験を行い、臓器中のウイルス遺伝子を RT-PCR 法によって検出できることを確認した。また、抗原検出用にウイルスの各蛋白に対するポリクローナル抗体を作製した。2) 病原性に関与するウイルス蛋白質の同定を目的として、アクセサリ蛋白遺伝子を欠損する組換えウイルス 4 種類を reverse genetics 法によって作出することに成功した。

#### A. 研究目的

ニパウイルス感染症は 1998 年にマレーシアで出現し、100 名以上（致死率 40%）を死亡させた新興感染症である。自然宿主はオオコウモリと同定され、マレーシアではブタを介して人に伝播した。現在でもバングラディッシュ等でさらに高い致死率を示して散発的に発生しており、感染経路もオオコウモリから人への直接伝播と考えられている。我が国では抗体陽性のオオコウモリや患者の発生は未だないが、比較的近いアジア地域で発生している感染症であり、今

後の侵入に備えて、迅速診断体制を整備し防御法を開発することが必要である。ニパウイルスの感染性ウイルスを扱う実験は、先進諸外国では BSL4 施設内で行なうことが推奨されている。このため本研究では、感染性ウイルスを用いることなくウイルス抗原や抗体を検出できる系を確立することと、予防・治療法の開発のための基礎的知見を得ることを目的とした。

本年度は、診断法の確立研究としては RT-PCR の有効性を検証することと、各種ウイルス蛋白に対する抗体の作製を目的

とした。予防・治療法の開発研究としては、病原性に関与するウイルス蛋白を同定する目的で、アクセサリ蛋白に着目し、その機能を解析する手段として各蛋白欠損組換えウイルスを作出することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) RT-PCR 法によるウイルス検出

フランスの BSL4 施設において、ハムスターにニパウイルス 103TCID50 を実験的に接種後、経時的に臓器を採集した。各臓器の乳剤から ISOGEN を用いて total RNA を抽出し、N 蛋白遺伝子領域において設計したプライマーペアを用いて RT-PCR を行なった。

### 2) ニパウイルス組換え蛋白の発現系確立と抗体の作出

ニパウイルス P, M 蛋白遺伝子をそれぞれ大腸菌発現プラスミドに組み込み、大腸菌で発現させ、グルタチオンカラムを用いて組換え蛋白を精製した。G 蛋白遺伝子は組換えバキュロウイルスベクターに挿入し、G 蛋白発現組換えバキュロウイルスを作出した。これを接種した Sf9 細胞からグルタチオンカラムで精製した。N 蛋白遺伝子は、哺乳類細胞発現ベクターに挿入し、Cos-7 細胞へ導入して超遠心法により精製 N 蛋白を回収した。得られた精製ニパウイルス蛋白を常法に従ってウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作出した。抗体価の上昇は、ELISA 法により確認した。

### 3) 組換えニパウイルスの作出

ニパウイルス感染症の予防用弱毒ワクチン開発のための基礎研究として、病原性への関与が示唆されているアクセサリ蛋白欠損ウイルスの作出を行なった。まず、ニパウイルス P 遺伝子内にコードされるアクセサリ蛋白 V, W, C の発現をそれぞれ欠失するニパウイルスゲノム cDNA を作出した。V, W, C 全てを欠損したウイルス cDNA

は、C 欠損ウイルスを基に V, W 蛋白が発現しないよう改変した。昨年我々が確立したリバースジェネティクス法に従い、BSL4 施設内においてこれら変異導入ニパウイルスゲノム cDNA をコードするプラスミドを、N, P, L サポートングプラスミドと共に T7 ポリメラーゼ発現ワクチニアウイルス感染 CV-1 細胞へ導入し、組換えウイルスを作出した。

## C. 研究結果

### 1) ニパウイルス診断法としての RT-PCR 法の有効性

ニパウイルスの迅速な検出として RT-PCR の有効性を検索した。ニパウイルスをハムスターに接種し、6 日後および 8 日後に安楽殺して臓器を採取した。腎臓と脳の臓器乳剤から抽出した RNA を N 遺伝子のプライマーを用いて RT-PCR を行なった結果、腎臓では 6 日目から脳では 8 日目に予想される塩基長のバンドが検出された。よって、RT-PCR 法によりニパウイルスの感染を比較的簡便に高感度で検出できることが確認された。

### 2) ニパウイルス組換え蛋白の発現系確立と抗体の作出

ニパウイルス N, P, M, G 蛋白の組換え蛋白発現系をそれぞれ確立し、精製蛋白を得た。これら発現蛋白をウサギに免疫してポリクローナル抗体を作出した。これらの抗体は ELISA 法により特異性および高い力価であることを確認した。また、それぞれの蛋白遺伝子を transfection した細胞において発現した当該蛋白を蛍光抗体法によって検出できた。

### 3) 組換えニパウイルスの作出

ニパウイルスの病原性発現に関与するウイルス蛋白を明らかにするために、ニパウイルスアクセサリ蛋白に着目した。アクセサリ蛋白である V, W, C 蛋白は、単独

発現系においてウイルスのインターフェロン応答や誘導能に関与することが報告されているが、ウイルス感染細胞や個体内における役割は未だ明らかにされていない。そこで、アクセサリ蛋白の病原性発現への関与を検索するために、アクセサリ蛋白の発現を1つずつ、または3種全て欠損した計4種の組換えウイルスを構築した。すなわち、それぞれの目的蛋白を産生できないようにニパウイルスゲノム cDNA 上の P 遺伝子に変異を加えた infectious clones を作製し、それらを用いて昨年我々が確立したニパウイルスリバーシジェネティクス系によりウイルスの作出を行なった。その結果、全ての感染性組換えウイルスを回収することに成功した。

#### D. 考察

RT-PCR 法を用いて、臓器乳剤からニパウイルスが効率良く検出できたことから、本ウイルスには RT-PCR 法が有効であることが確認できた。また、ニパウイルス蛋白特異的抗体が作製できたことから、ニパウイルス感染細胞や感染個体の病理組織からウイルス抗原を検出する事が可能になった。また今後の sandwich ELISA の開発にも有用な tool を提供できた。さらに、これらの抗体は診断だけでなく、今後のニパウイルスに関する様々な基礎研究などにも幅広く応用可能である。

弱毒化ワクチン開発に有用な知見を得るために、アクセサリ蛋白の発現を欠損した組換えニパウイルスの作出に成功した。現在これら組換えウイルスの性状の解析を行なっている。今後はこれら組換えウイルスを用いた感染実験を行ない、アクセサリ蛋白が弱毒化に関わるかどうかを検索する予定である。

#### E. 結論

RT-PCR 法によるニパウイルス検出法を確立した。

ニパウイルス N, P, M, G 蛋白のウサギポリクローナル抗体を作製した。

アクセサリ蛋白欠損組換えニパウイルスの作出に成功した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kobune, F., Ami, Y., Katayama, M., Takahashi, M., Tuul, R., Korukluoglu, G., Kiyohara, T., Miura, R., Sato, H., Yoneda, M. and Kai, C. A novel monolayer cell line derived from human umbilical cord blood cells shows high sensitivity to measles virus. *J. Gen. Virol.*, 88, 1565-1567, 2007
2. Sato, H., Kobune, F., Ami, Y., Yoneda, M. and Kai, C. Immune responses against measles virus in cynomolgus monkeys. *Comp. Immunol. Microb.*, 31(1), 25-35, 2008.
3. Fujita, K., Miura, R., Yoneda, M., Shimizu, F., Sato, H., Muto, Y., Endo, Y., Tukiyaama-Kohara, K. and Kai, C. Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: involvement heparin-like molecule in CDV infection. *Virology*, 359, 324-335, 2007.
4. Sato, H., Masuda, M., Kanai, M., Tsukiyama-Kohara, K., Yoneda, M. and Kai, C. Measles virus N protein inhibits host translation by binding to eIF3-p40. *J. Virol.*, 81(21), 11569-11576, 2007.
5. Inoue, Y., Tshukiyama-Kohara, K., Yoneda, M., Sato, H. and Kai, C. Inhibition of host protein synthesis in B95a cells infected with HL strain of measles virus. *Comp. Immunol. Microb.*,

2008, in press

6. Hagiwara, K., Sato, H., Inoue, Y., Watanabe, A., Yoneda, M., Ikeda, F., Fujita, K., Fukuda, H., Takamura, C., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Sugano, S., Ohmi, S. and Kai, C. Phosphorylation of measles virus nucleoprotein upregulates the transcriptional activity of minigenomic RNA. *Proteomics*, 2008 in press.
7. Yoneda, M., Fujita, K., Sato, H. and Kai, C. Reverse genetics of Nipah virus to probe viral pathogenicity. In “Viral Applications of the Green Fluorescent Protein”. *Methods in Molecular Biology*, 2008 in press.

2. 学会発表

1. Kai, C. Nipah virus reverse genetics. 5th Int. Conf. on Emerging zoonoses, Nov. 15-18, 2007, Limassol, Cyprus.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
現在出願予定はない。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：エボラウイルスの診断法と抗ウイルス薬の検討

分担研究者 高田礼人 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

研究要旨：フィロウイルス感染症（エボラおよびマールブルグ出血熱）の診断法の開発を行う。既知のフィロウイルスの RNA 遺伝子を特異的かつ迅速に増幅する RT-PCR 法および感染動物あるいはヒト血清中のウイルス特異抗体を高感度で検出する ELISA 法を検討した。さらに、ウイルス抗原検出に用いるために、エボラウイルスの核蛋白質 NP に対する抗血清を作成した。また、中和抗体による受動免疫の効果を検討した。

A. 研究目的

フィロウイルス科はマールブルグウイルス属およびエボラウイルス属からなる。現在のところマールブルグウイルスは一属一種なのに対し、エボラウイルス属は抗原的および系統学的に 4 種 (Zaire, Sudan, Ivory Coast および Reston) に分けられている。フィロウイルスによる感染症の発生頻度は近年非常に高くなっている。また近年、エボラウイルスの感染によって中央アフリカの大規模野生霊長類が多数死亡している。

フィロウイルスはヒトを含む霊長類に重篤な出血熱を引き起し、その致死率は極めて高い。病原性が強いこと、そして効果的な予防・治療法が実用化されていないことから、フィロウイルスは Biosafety Level 4 施設で取り扱わなければならない病原体である。本研究では、フィロウイルスによる感染症の診断法の開発のために、ウイルス RNA 遺伝子を特異的かつ迅速に増幅する方法、感染動物あるいはヒト血清中のウイルス特異抗体を高感度で検出する方法およびウイルス蛋白質抗原を簡便に検出する方

法を確立を目指す。また、抗ウイルス薬の検討も行う。

B. 研究方法および成果

既知の全てのフィロウイルス遺伝子検出のための RT-PCR 法の確立

既知の全てのフィロウイルスの RNA 遺伝子塩基配列を比較し、相同性の高い領域を数箇所選択した。その配列をもとに数種類のプライマーセットをデザインした。カナダの BSL-4 施設で、これらのプライマーセットを用いて、実際のフィロウイルス RNA 遺伝子を鋳型に RT-PCR を行い、調べた全てのエボラおよびマールブルグウイルス遺伝子を検出できることを確認した (図 1)。さらに、感度を検査した結果、1 FFU 以下のウイルスでも検出可能であることが判った。

フィロウイルス特異抗体の検出法の確立

エボラウイルスおよびマールブルグウイルスの表面糖蛋白質に対する抗体を検出する ELISA 法の確立のために、ウイルス表面

糖蛋白質の膜貫通領域と細胞質内領域を欠失させた分泌型の糖蛋白質を発現するプラスミドを構築した。これを導入した培養細胞の上清中に分泌される組換え蛋白質を抗原に用いたELISA法の確立に着手した。このELISA法で感染サル血清中のIgG抗体を効率的に検出できることが確認された(図2)。

#### フィロウイルス抗原の検出法の確立

エボラウイルスの3つの種(Zaire、Sudan、Reston)の核蛋白質NPに対する抗血清作出のために、合成ペプチドエピトープによる免疫を試みた結果、それぞれの種に特異的な抗血清を得ることが出来た。しかし、全ての種に共通のエピトープは殆ど発見できなかった(表1)。

#### 抗ウイルス薬の検討

エボラウイルスの表面糖蛋白質GPに対するモノクローナル抗体を作出し、精製後マウスおよびモルモットに投与し、その感染防御効果を検討した結果、暴露後投与でもある程度の効果が認められることが判明した。

#### C. 考察および結論

これまで、エボラウイルスなどの新興感染症は世界の限られた地域でしか認められていないが、昨今の急激な国際化による人の移動および動植物の輸出入に伴い、それらの疾病の原因病原体が他国に拡散する可能性が高まっている。西ナイルウイルス感染、SARS、高病原性鳥インフルエンザはその例である。さらに近年、エボラウイルスのような致死率の高い出血熱ウイルスがバイオテロリズムの手段として使用される危険性が高まっている。このような危険度の高い伝染性病原体が日本に持ち込まれた場合に備えて国家レベルで対策を講じる

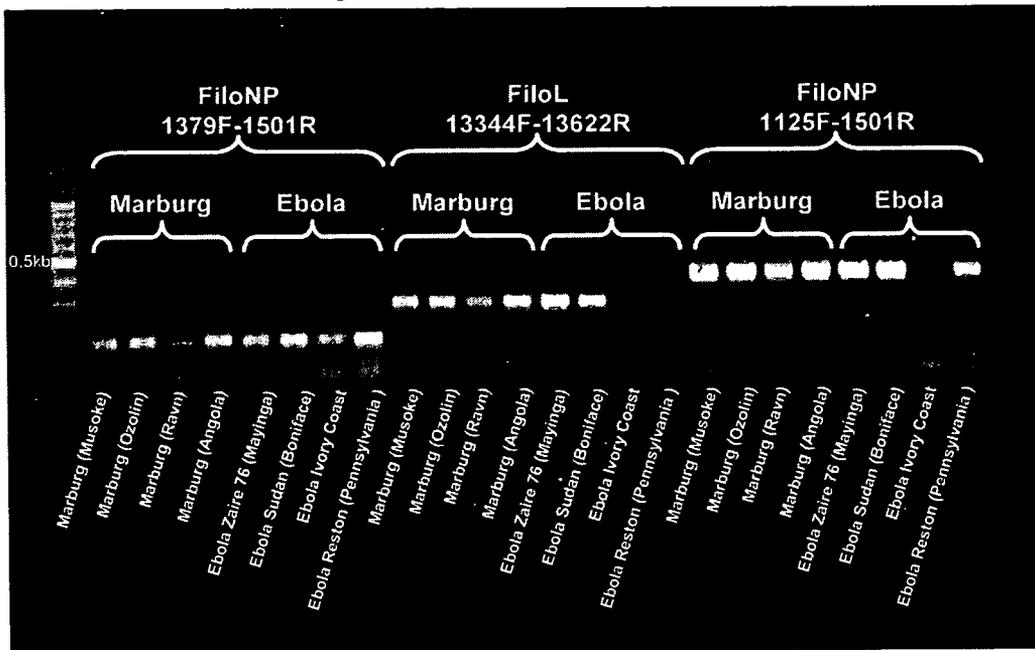
事が急務となってきた。これらの病原体の日本国内への侵入の有無を迅速に判断し、適切な対応措置を執るために、抗ウイルス薬の開発とともに、感度および特異性の高い診断法の確立は重要な課題である。

#### D. 研究発表

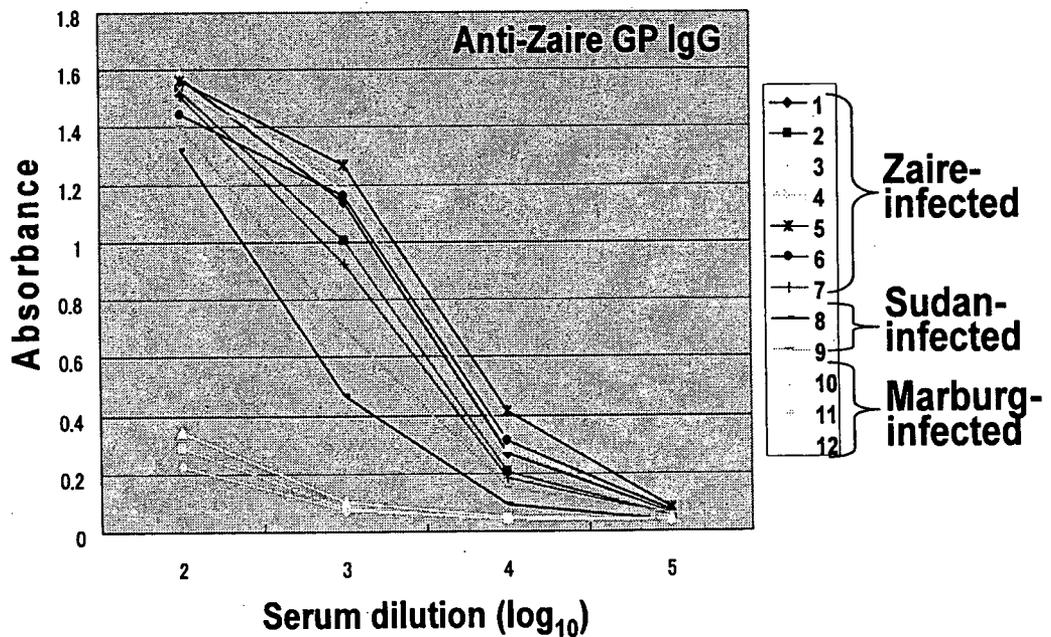
##### 1.論文発表

1. Takada, A., Ebihara, H., Jones, S., Feldmann, H., Kawaoka, Y. (2007) Protective efficacy of neutralizing antibodies against Ebola virus infection. *Vaccine* 25: 993-999.
2. Kurosaki, Y., Takada, A., Ebihara, H., Grolla, A., Kamo, N., Feldmann, H., Kawaoka, Y., and Yasuda, J. (2007) Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription- loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* 141(1):78-83.
3. Takada, A., Ebihara, H., Feldmann, H., Geisbert, T.W., Kawaoka, Y. (2007) Epitopes required for antibody- dependent enhancement of Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* 196 Suppl 2:S347-356.
4. Matsuno, K. and Takada, A. (2007) Antibody Therapy as a Future Treatment Option for Ebola Virus Infection. *Future Virol.* 2(6):607-614.

**Fig 1 RT-PCR by universal primers for filoviruses**



**Fig 2 Ebola virus-specific IgG antibodies in infected monkey sera**



**表1** Reactivity of antisera to recombinant NP antigens

Peptide	Animal	Species		
		Zaire	Sudan	Reston
ZaireNP#542-555	Mouse	+++	-	-
	Rabbit	+++	-	-
ZaireNP#628-638	Mouse	+++	-	-
	Rabbit	++	-	-
SudanNP#631-644	Mouse	-	+++	-
RestonNP#630-643	Mouse	-	-	+++
	Rabbit	-	-	+++
FiloNP#344-356	Mouse	++	+	++