

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：マールブルグウイルスの診断法とウイルス粒子形成後期過程  
阻害法の検討に関する研究

分担研究者：安田 二郎 科学警察研究所法科学第一部生物第五研究室長

研究要旨：マールブルグウイルスの迅速・簡便な検出法として RT-LAMP 法を開発した。  
1 ng のウイルス RNA を 20 分以内に特異的に検出することができ、検出限界はウイルス  
RNA100 コピー相等であった。LAMP 法の簡便性は、アウトブレイクの発生地である発展  
途上国での使用にも適していると考えられる。更に、本研究ではウイルス出芽機構の解析  
も行い、ウイルスマトリクス蛋白質である VP40 に存在する PPPY 配列が L-ドメインとして  
ウイルス出芽に必須であること、並びに宿主因子として Tsg101 が出芽に関与することを明  
らかにした。

A. 研究目的

極めて高い病原性をもつマールブルグウイルス (MARV) は新興感染症として警戒が必要だけでなく、バイオテロへの利用も危惧されている。1967 年西ドイツ、ユーゴスラビアで 7 名の死者を出して以来、度々アフリカでアウトブレイクを繰り返しており、最近では 2004 年から 2005 年にかけてアンゴラで 277 名もの死者を出している。わが国における発症報告はないが、防疫上緊急を要する新興感染症である。そこで、本研究では MARV の迅速診断法と治療法の開発を目的として研究を行う。

本年度は、迅速診断法として RT-LAMP 法の開発と新規抗ウイルス戦略の標的として有効と考えられるウイルス出芽過程の解析を行った。

B. 研究方法

1) RT-LAMP 法の開発

MARV 分離株は Musoke 系統と Ravn 系統

の 2 つに分けられるので、それぞれの系統を特異的に検出することができる LAMP プライマーセットをプライマーデザイン支援ソフト PrimerExplorer ver.3 を用いてデザインした。遺伝子の保存性の比較的高い NP 領域を増幅の標的領域とした。各 LAMP プライマーセットの特異性と検出感度を Heinz Feldmann 博士 (カナダ国立微生物学研究所) より御分与いただいた Musoke 系統 3 株 (Musoke、Ozoline、Angola 株) と Ravn 系統 1 株 (Ravn 株) のウイルス RNA、あるいは *in vitro* 転写反応により調製した疑似ウイルス RNA を用いて検討した。増幅反応は Loopamp RNA 増幅試薬キット (栄研化学) を用いて 63°C で行った。増幅反応の特異性の確認は反応産物を制限酵素処理し、アガロースゲル電気泳動を行うことにより確認した。また、増幅のリアルタイムモニタリングはリアルタイム濁度測定装置を用いて行った。

更に、2004-5 年のアンゴラでのアウトブ

レイクの際に採取された生体試料（血液、血清、乳汁、口腔拭い液）を対象とした RT-LAMP 法の評価もカナダ国立微生物学研究所にて行った。

## 2) MARV 出芽機構の解析

MARV のマトリクス蛋白質である VP40 にはウイルス出芽に重要と考えられる L-ドメインモチーフの一つである PPxY 配列が存在する。実際にこの配列が L-ドメインとして機能することを確認するために、この配列に変異を導入した VP40 変異体発現プラスミドを作製した。野生型あるいは変異型 VP40 発現プラスミドを細胞に導入し、培養上清中にウイルス様粒子 (VLP) が産生されるかどうかをウエスタンブロット (WB) 法および電子顕微鏡観察により確認した。更に WB 法で VLP 産生量の比較解析も行った。

次に MARV の主要構造蛋白質である GP、NP 蛋白質を発現するプラスミドも作製し、様々な組み合わせで細胞に VP40 発現プラスミドと共導入することにより、VLP 形成への GP、NP の関与を調べた。

HIV の出芽に関わる宿主因子 Tsg101 が MARV の出芽にも関わるかどうかを明らかにするために、siRNA を用いて Tsg101 発現を抑制した細胞に VP40 発現プラスミドを導入して VLP 産生能を WB 法により調べた。更に、VP40 と Tsg101 の相互作用についても GST-pulldown アッセイにより解析した。

## C. 研究結果

### 1) RT-LAMP 法の開発

Musoke 系統用、Ravn 系統用の各 RT-LAMP プライマーセットの特異性を Musoke 系統 3 株 (Musoke、Ozoline、Angola)、Ravn 系統 1 株 (Ravn)、エボラウイルス 5 株 (Zaire76、Zaire95、Sudan、

Reston、Ivory Coast)、ラッサウイルス 2 株 (Josiah、Pinneo) のウイルス RNA を用いて調べた結果、何れの系統に対する RT-LAMP も同一系統の MARV のみの特異的に検出することができた (図 1)。1 ng ( $3.3 \times 10^4$  ウイルス RNA コピー相等) のウイルス RNA の検出に要した時間は両系統とも 20 分以内であった。検出限界は Musoke 用、Ravn 用共にウイルス RNA 100 コピーであった (表 1)。更に、両系統用のプライマーを混合して使用 (Multiplex) することにより、全 MARV 分離株を検出することも可能であった。

更に、臨床検体についても 104TCID50/ml 以上の MARV が存在していれば、80-100% 検出可能であることが確認された (図 2)。

### 2) MARV 出芽機構の解析

VP40 発現プラスミドを導入した 293T 細胞からひも状のウイルス様粒子 (VLP) の出芽が電子顕微鏡下で確認された (図 3A)。また、VP40 発現細胞の培養上清中に VLP が産生されていることも WB 法で確認できた。

PPxY 配列に点変異をもつ VP40 変異体は何れも野生型に比べ VLP 産生能が低下していた (図 3B、C、D)。

VP40 と共に GP、NP を細胞で発現させると VLP 産生量は VP40 単独時に比べ、NP 共発現で 4.2 倍、GP 共発現で 2 倍、NP/GP 双方の共発現で 9.3 倍増加した (図 4A、B)。293T 細胞を Tsg101 に特異的な siRNA で処理することにより Tsg101 発現を抑制した後、VP40 あるいは VP40/GP/NP 発現プラスミドを導入し、産生される VLP 量を解析した。その結果、何れの VLP 産生も Tsg101 発現抑制により著しく阻害されることがわかった (図 5A、B)。

また、GST-pulldown アッセイにより Tsg101 が VP40 に結合することも明らかに

した (図 5C)。更に、VP40 の PPxY 配列欠失変異体を用いて同様に pulldown アッセイを行ったところ、Tsg101 との結合は見られなかった。Tsg101 の VP40 への結合は PPxY 配列依存性であることが示された。

#### D. 考察

##### 1) RT-LAMP 法の開発

特異性が高く、迅速、簡便、かつ高感度の RT-LAMP 法を開発することができた。

TaqManRT-PCR 法よりも若干検出感度は低かったが (表 1)、LAMP 法は PCR 法のように厳密な温度制御を必要とせず、簡便な恒温槽があれば検査を行うことができる点、検出にかかる時間が短い点、濁度や蛍光で結果判定が可能でゲル電気泳動などが不要である点などいくつかの利点がある為、アウトブレイクの発生地である発展途上国で有用な検出法であると思われる。

##### 2) MARV 出芽機構の解析

VP40 の単独発現で VLP が形成され、出芽することが確認できた。また、VP40 に存在する PPPY 配列が L ドメインとして出芽に重要な役割を果たすことも明らかにした。

VLP 形成には VP40 だけでなく、GP 及び NP も補助的に関わり、効率の良い VLP 産生に必須であることがわかった。

Tsg101 は細胞内膜輸送系の一つである MVB 選別系において重要な機能を担っていることが知られている。MVB 選別系は、ある種のユビキチン化タンパク質を積み荷として認識し、エンドソーム膜に輸送した後、エンドソーム膜の内腔側への陥入によって形成される小胞 (MVB: Multivesicular body) に積み荷を封入するという細胞内膜輸送系 (メンブレントラフィック) の一つであるが、エンドソーム膜上における MVB 形成と細胞膜上でのウイルス出芽は

位相学的に同一と見ることができる。

したがって、本研究で MARV 出芽への Tsg101 の関与が示されたことで、MARV は MVB 形成機構を利用して出芽することが示唆された。

更に、Tsg101 の siRNA が MARV 出芽を顕著に阻害するという結果が得られ、これらの研究成果に基づいた出芽阻害法の可能性も示唆された。

#### E. 結論

1-1、迅速、簡便、高感度、かつ特異性の高い RT-LAMP 法を開発した。

1-2、開発した RT-LAMP は臨床サンプルの検査にも有用であった。

2-1、MARV の出芽には VP40 が中心的な役割を果たしており、GP、NP も粒子形成・出芽に影響する。また、VP40 内に存在する PPxY 配列が L-ドメインとして出芽に重要な機能を担っている。

2-2、MARV 出芽には宿主因子として Tsg101 が関わっており、その出芽機構には MVB 選別系機構が利用されていることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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. *Journal of Virology*, 81, 4895-4899, 2007

2. 学会発表

Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Morikawa, S., Yokosawa, H., and Yasuda, J.: The interaction between Tsg101 and VP40 depending on PPPY is important for Marburg virus-like particle production. In " The 26th Annual Meeting of American Society for Virology", Oregon, USA, pp271, July 14-18, 2007

安田二郎、浦田秀造：ウイルス出芽に関わるウイルス側エレメントと宿主因子、第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月

浦田秀造、横沢英良、安田二郎：マールブルグウイルス粒子形成の解析、第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月

黒崎陽平、安田二郎：マールブルグウイルスの迅速遺伝子検出法の開発、第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月

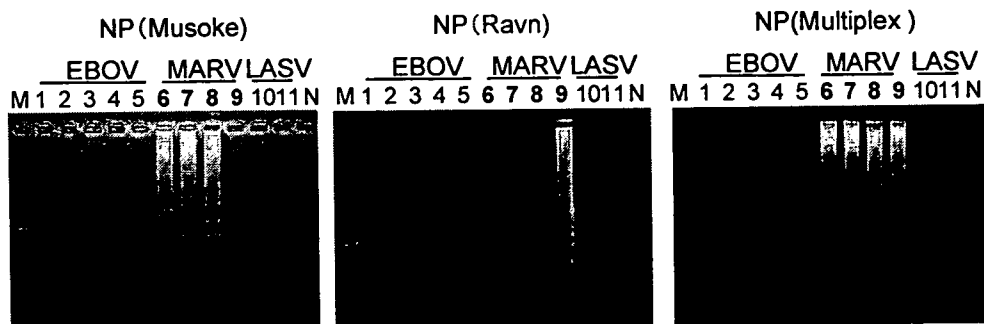
安田二郎、浦田秀造：ウイルス出芽と細胞内膜輸送系、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会（BMB2007）ワークショップ「膜輸送をめぐるユビキチン機能の新展開」、横浜、2007年12月

浦田秀造、横沢英良、安田二郎：ユビキチンリガーゼによるマールブルグウイルス粒子形成の制御、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会（BMB2007）、横浜、2007年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1、RT-LAMP法の特異性



- 1. Zaire76
- 2. Zaire 95
- 3. Sudan
- 4. Reston
- 5. Ivory Coast
- 6. Musoke
- 7. Ozoline
- 8. Angola
- 9. Ravn
- 10. Josiah
- 11. Pinneo
- N. negative control

反応条件: 63°C、60min

表1、RT-LAMP法の検出感度

artificial RNA	copies/test	RT-LAMP									TaqMan RT-PCR	
		NP(Musoke)			NP(Ravn)			NP(Multiplex)			Cr	detection time (min)
strain		EP	FL	real-time (min)	EP	FL	real-time (min)	EP	FL	real-time (min)		
Musoke	1.E+06	+	+	17.8	-	-	-	+	+	16.6	20.3	32.8
	1.E+05	+	+	19.4	-	-	-	+	+	17.6	22.1	34.3
	1.E+04	+	+	21.6	-	-	-	+	+	19.5	26.0	36.5
	1.E+03	+	+	26.9	-	-	-	+	+	22.0	29.0	38.8
	1.E+02	+	+	30.7	-	-	-	+	+	25.6	32.7	41.8
	1.E+01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36.6	44.8
	1.E+00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.E-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ravn	1.E+06	-	-	-	+	+	18.6	+	+	19.1	-	-
	1.E+05	-	-	-	+	+	20.5	+	+	19.6	-	-
	1.E+04	-	-	-	+	+	22.9	+	+	22.4	-	-
	1.E+03	-	-	-	+	+	27.4	+	+	25.6	-	-
	1.E+02	-	-	-	+	+	32.9	-	-	-	-	-
	1.E+01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.E+00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.E-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

図2、臨床検体からのMARV遺伝子の検出

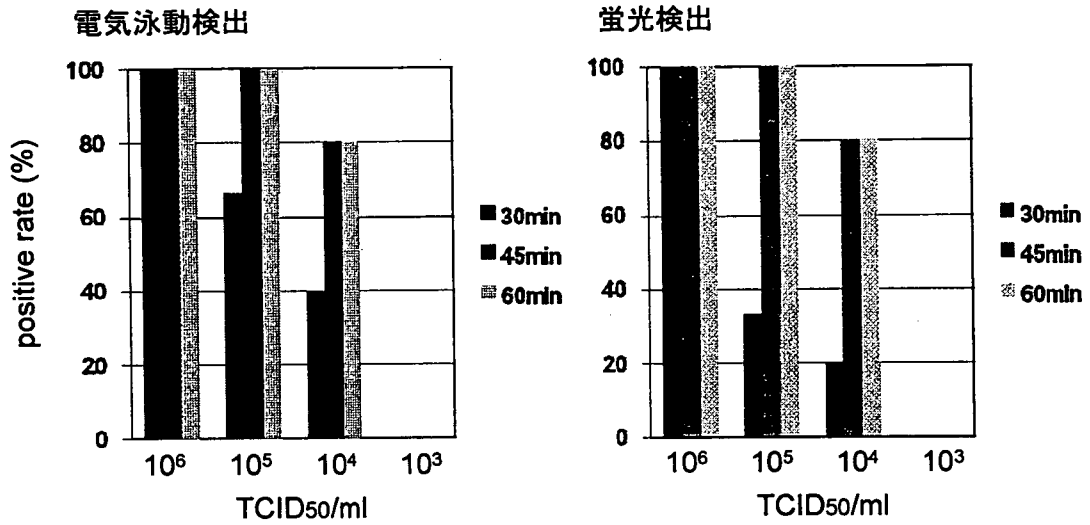


図3、VP40発現細胞からのVLP出芽とL-ドメイン変異体

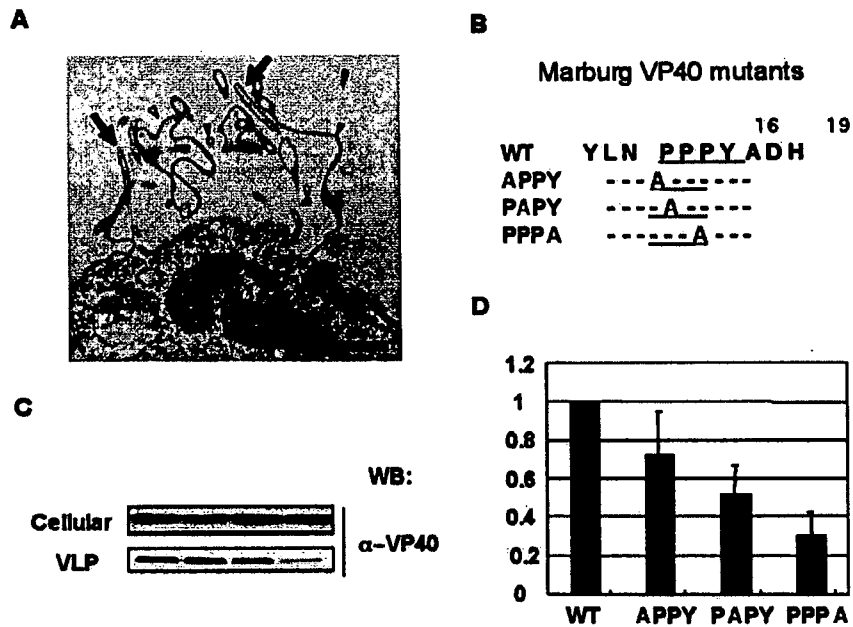


図4、VLP形成へのGPとNPの関与

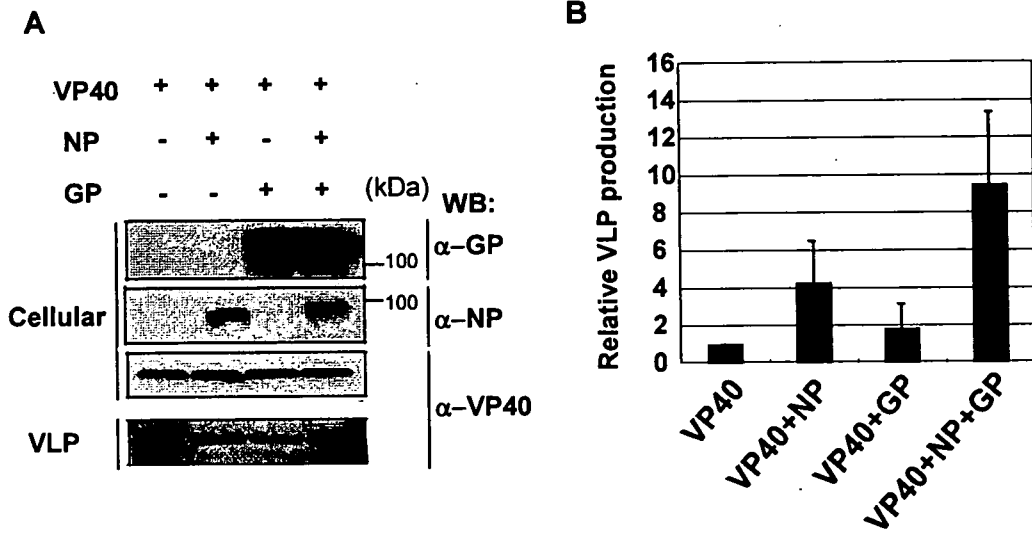
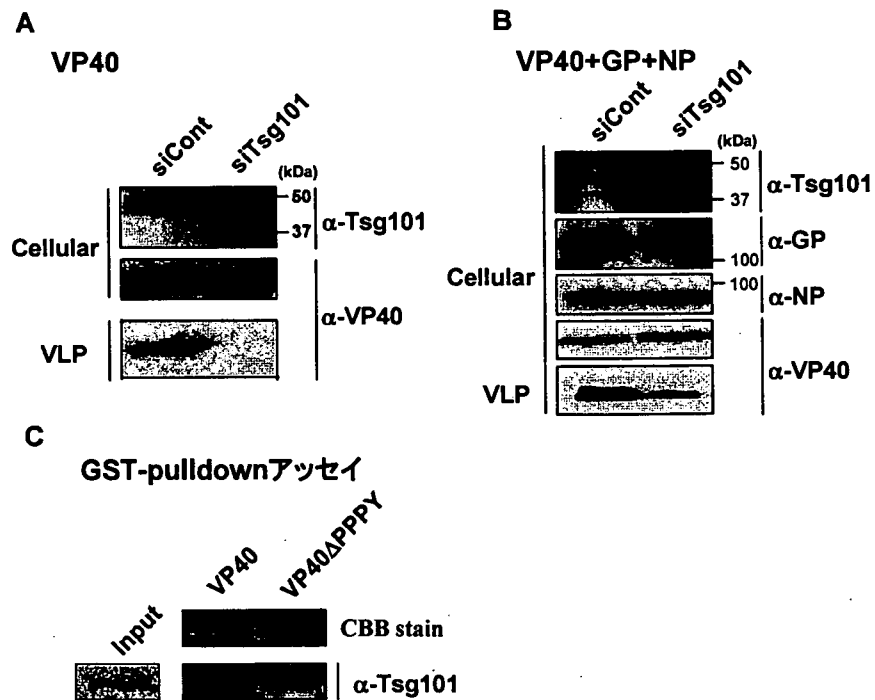


図5、VLP出芽へのTsg101の関与



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：HPS ウイルス（ハンタウイルス）の診断法と分子疫学

分担研究者：有川二郎（北海道大学大学院医学研究科）

研究要旨：ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類され、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因ウイルスである。両疾患ともに持続感染したげっ歯類を感染源とする人獣共通感染症である。HPS の流行はアメリカ・アルゼンチン等を中心に広く南北アメリカ大陸全域で報告され、公衆衛生上の大きな問題となっている。本研究では、迅速にハンタウイルス感染を検出し、さらに鑑別するための血清診断法の開発、広い範囲のハンタウイルスをカバーする PCR 法の開発について検討を行う。

A. 研究目的

げっ歯類由来ハンタウイルスはその宿主によって以下の3群に分けられる。

1) ラットやマウスに近縁なげっ歯類を宿主として腎症候性出血熱(HFRS)を起こすネズミ亜科由来ウイルス、2) HFRS の原因となるハタネズミ亜科由来ウイルス、3) 新世界ネズミを宿主としてハンタウイルス肺症候群(HPS)を起こすアメリカネズミ亜科由来ウイルス。これらのウイルスの多様性は大きく、すべてのウイルスに有効なプライマーを設定することは困難である。そこで、我々は各グループ毎にユニバーサルなプライマーを設定することを試みた。

ハンタウイルスの中で最も異なるグループとして、近年再発見および発見された食虫類由来ウイルスが注目を集めている。現在までのところ、ユニバーサルプライマーを設定できるほどの遺伝情報は収集されていない。幾つかのハンタウイルスに対する抗体が(Gc

領域に対する一部のクローン) が交差反応することから、検出試薬として抗体が有用であると考えられる。しかしながら、核蛋白や Gn 領域に対して反応するクローンは得られていない。我々は効率よく食虫類由来ハンタウイルスを検出する単クローン抗体の作成を試みた。

ハタネズミ由来ハンタウイルスは大きな多様性を持って新大陸・旧大陸に分布する重要なグループである。ヨーロッパヤチネズミを reservoir とし、HFRS の原因となる Puumala ウイルス(PUUV)が知られている。近縁のウイルスは北極圏のレミングスから、全世界のハタネズミまで数多く報告されているが、その病原性については明らかではない。また、ヨーロッパでは同じ地域に PUUV をもつヤチネズミと Tula ウイルス(TULV)を持つハタネズミが棲息している。こういった地域では HFRS 患者血清はどちらの抗原にも強く反応する。しかしながら、中和のパ



ターンは PUUV を示すことから、TULV はヒトに対する病原性を欠くとされている。私たちは極東にも数種類見いだされるハタネズミ由来ウイルスの病原性を明らかにするために、PUUV 感染と TULV 感染を迅速に鑑別するための鑑別診断法を構築することを試みた。

HPS に関連したウイルスは数多く報告されているが、未だその多様性の全貌は明らかになっていない。また、HPS ウイルスの取扱には BSL3 以上の高度安全実験施設が必要なことから、ハンタウイルスの分類の重要な指標である交差中和試験の結果が少なく、ウイルス型と病原性の関連には不明な点が多い。少なくとも南米・アルゼンチン由来アンデスウイルス(ANDV)が北米由来ウイルスのシンノンブレウイルス(SNV)より病原性が高く、ヒトからヒトへの感染例も多く報告されている。一方、南米由来ラグナネグラウイルス(LNV)の病原性は低く分布の重なるアンデスウイルスとはその病原性が大きく異なっている。本研究では南米・北米由来ウイルスの cDNA を収集し、その遺伝子配列の確認と抗原性のバリエーションについて解析することを試みた。

## B. 研究方法

1. ネズミ亜科由来ハンタウイルスの遺伝子検出用プライマーセットの開発：ウイルス遺伝子を検出する RT-PCR のプライマーセットを開発するために公表されている多くの株の S ゲノム遺伝子の遺伝子配列を調べ、各グループ毎に 6 種類前後のプライマーを選定した。本年度はネズミ亜科由来ハンタウイルスについて、新規設定の

6 種類とこれまで用いていた汎用プライマー 1 組を加えて 8 個のプライマーを用いて増幅効率を比較した。Hantaan, Seoul, Dobrava, Thailand virus の同定済みの cDNA を鋳型とし、検出効率の良いプライマーを選定することを試みた。

2. 食虫類由来ハンタウイルスに対するのモノクローナル抗体の作成：食虫類由来ハンタウイルスの代表株であるトツタパラヤンウイルス(TPMV)をマウスに感染させ、その脾臓細胞を用いて常法に従って見えローマと融合し、単クローン抗体作成を試みた。

3. ハタネズミ由来ハンタウイルスの鑑別診断法の開発：PUUV 感染と TULV 感染を迅速に鑑別するための鑑別診断法を構築することを試みた。核蛋白の変領域とその立体構造を支える部位を発現し、これを抗原とした ELISA を中和試験の代替法とするシステムを応用した。さらに、PUUV, TULV 核蛋白の全長抗原や各種トランケート抗原を大腸菌ベクターおよびバキュロウイルスベクターを用いて発現させ、診断・鑑別抗原を準備する。これらの抗原の有効性を評価するために、PUUV および TULV を接種したホンドリハタネズミの抗血清を準備した。

4. 北米・南米由来ウイルスの診断法の確立：上記で応用を試みている鑑別診断システムを構築するために、カナダ国立微生物病研究所より北米・南米由来ウイルスの遺伝子の分与を受けた。ANDV, SNV, LNV, Black Creek Canal ウイルス、マポーラル、ボリビアなどの S および M ゲノム遺伝子の分与を受

け、シーケンスの確認、診断抗原の発現を進めている。北米・南米由来ウイルスの塩基配列から核蛋白の 200-280 アミノ酸の超可変領域のバリエーションの数を整理し、核蛋白について血清型を推測する。

(倫理面からの配慮について)

各種免疫血清の採血は、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものであり、動物福祉の観点からも問題はないと判断された。

### C. 研究結果

1：ネズミ亜科由来ハンタウイルスの遺伝子検出用プライマーセットの開発：最終的に従来の汎用プライマーよりも良い検出効率を持つプライマー 3 種類を選定した。この 3 種類でヘミネステイド PCR を行うことで、高感度かつ網羅的診断が可能となると考えられる。この PCR 産物から得られる遺伝子情報もおよそ 800 塩基（従来は 250 塩基）と長く、その後のシーケンス解析で十分な情報量を得ることができると考えられた。次に感染細胞由来 RNA からの RT-PCR によって、感度および非特異増幅の有無を検討する必要がある。

2：単クローン抗体の作成：これまでにおよそ 10 クローンが得られ、その IFA パターンは様々であることから、種々の構成蛋白に対するものが得られたと考えられる。現在、クローニングと解析の作業を進めている。

3. ハタネズミ亜科げっ歯類由来ハンタウイルスの血清診断法の開発：日本産ハタネズミは PUUV および TULAV に感受性を持ち、有意な抗体の上昇が

確認された。これを用いて診断法の評価を行ったところ、大腸菌で大量発現した核蛋白の N 末端は TULAV も PUUV もそれぞれ高い抗原性を示し、ELISA 抗原として有用であることが明らかとなった。バキュロウイルス発現系で調製した抗原も同様に良い抗原性を示した。さらに中和試験代替法となると考えられる、N 末端を削除した核蛋白抗原は現在発現を進めている。

4. 北米・南米由来ハンタウイルスの血清診断法の開発：従来持っていた北米型のハンタウイルス遺伝子に加え数株の南米アンデス型の遺伝子を分与された。データベース解析の結果から、核蛋白抗原の抗原性が共通する部位（N 末端）があることが予想され、この部位が診断抗原として有用であると考えられた。さらに、可変領域のタイプが少なくとも 4 種類見付き、代替中和法で鑑別できる可能性が示された。

### D. 考察

一般に、血清診断法の開発には、抗原および陽性血清が必要である。また、遺伝子診断法の開発にはより多くの多様なウイルスの遺伝子情報が必要である。本研究では急務を要する HPS 関連ウイルスの診断法を筆頭に最終的に 4 グループのハンタウイルスについてそれぞれ血清診断法および遺伝子診断法を開発することを目的としている。ネズミ亜科由来のグループについては、これまでの研究で血清診断法・鑑別法によりシステムがほぼ完成しており、今回の遺伝子診断法のプライマー設定で抗体・ゲノム検出のそれぞれの標準的診断法を示すことができた。まだ、

組織からの検出効率および非特異増幅の有無など検討すべきことは残っているものの、現在このプライマーをげっ歯類の疫学的検討にも試用しており、現在のところ良い結果を得ている。一方ハタネズミ亜科のウイルスについては遺伝子情報は多く得られるものの、限られた株のウイルスしか日本国内に存在しない上、確実なハタネズミ陽性血清も無かった。今回陽性血清を、ハタネズミに対する実験接種で得られたことは、血清診断法開発を推し進める上で有用であると考えられる。このグループについてもプライマー設定を行い、PUUVのカザン株のcDNAで感度の良いプライマーについて基礎データを得ている。しかしながら、ウイルスおよび遺伝子がないため、より多くの株を用いたPCR検出のスペクトルの評価が困難である。これを打開するためにはヨーロッパの研究施設との連携を深め、cDNAの分与を受けられるよう努力することが必要である。同様の材料の不足は南米・北米由来ウイルスでも顕著であった。幸いなことに、今回数株のcDNAについて分与を受けることができたので、プライマー設定およびその評価は来年度の課題であると考えられる。

食虫類由来ウイルスは、ここ数ヶ月急速に遺伝子情報が公開され、アフリカ・北米・アジアに新たなグループのウイルスが存在することが明らかになってきた。このため、あらたなプライマー設定の可能性が開かれてきた。今後も情報収集を続け、血清診断法を含めた診断法開発のための材料の入手に努力する必要があると考えられる。

#### E. 結論

ハンタウイルスはその病原相動物によって、ネズミ亜科由来、ハタネズミ亜科由来、アメリカネズミ亜科由来、および食虫類由来ウイルスの4つのグループに分けられ、その多様性から血清診断法および遺伝子診断法はそれぞれについて必要である。特にHPS関連ウイルスについては病原性・多様性および抗原性に関する情報が混乱しており、これを整理して診断・鑑別法を準備することが防疫上重要であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kariwa, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L.I., Iwasaki, T. and Takashima, I.: A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia. *Jpn. J. Vet. Res.* 54(4): 145-161, 2007
2. Matsuura, Y., Suzuki, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., Yokoyama, M., Igota, H., Yamauchi, K., Ishida, S., Fukui, D., Bando, G., Kosuge, M., Tsunemitsu, H., Koshimoto, C., Sakae, K., Chikahira, M., Ogawa, S., Miyamura, T., Takeda, N. and Li, T. C.: Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus Nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152:1375-1381, 2007
3. 3) Taruishi, M., Yoshimatsu, K.,

- Araki, K., Okumura, M., Nakamura, I., Kajino, K., Arikawa, J.: Analysis of the immune response of Hantaan virus nucleocapsid protein-specific CD8<sup>+</sup> T cells in mice. *Virology* sep1: 365(2) 292-301, 2007
4. Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Truong, U.T., Truong, U.N.: Hantavirus Infection-typical rodent-borne viral zoonosis. *Tropical Medicine and health* 35(2) 55-59, 2007
  5. Chandy, S., Yoshimatsu, K., Ulrich, R.G., Mertens, M., Okumura, M., George, R.P., John, T., Balraj, V., Muliyl, J., Mammen, J., Abraham, P., Arikawa, J., Sridharan, G.: Seroepidemiological study on hantavirus infections in India: *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102(1):70-4, 2008
  6. Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Arikawa J.: hantavirus infection in East Asia. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 30, 341-356, 2007
  7. Bin Abu Daud, N.H., Kariwa, H., Tanikawa, Y., Nakamura, I., Seto, T., Miyashita, D., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I.: Mode of Infection of Hokkaido Virus (Genus Hantavirus) among Grey Red-Backed Voles, *Myodes rufocanus*, in Hokkaido, Japan. *Microbiol. Immunol.* 51(11): 1081-1090, 2007
  8. 有川二郎：ハンタウイルス肺症候群, 日本臨床, 65 巻, 増刊号 3: 126-130, 2007
  9. 有川二郎：腎症候性出血熱, 日本臨床, 65 巻, 増刊号 3: 112-116, 2007
- 2.学会発表
1. 有川二郎：腎症候性出血熱 (HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)-げっ歯類媒介性の人獣共通感染症：第 54 回日本実験動物学会総会(2007.5)
  2. 山本博、李天成、伊藤薫、越本知大、宮下信和泉、有川二郎、八神健一、他：国動協および公私動協傘下の動物実験施設において動物実験に用いられたサルおよびブタの HEV 感染調査：第 54 回日本実験動物学会総会 (2007.5)
  3. Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Kariwa H.: Epidemiology and Epizootiology of Hantavirus Infection in East Asian Countries. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
  4. Yoshimatsu, K., Taruishi, M., Kariwa, H., Arikawa, J.: Studies on Structure and Function of N and GP of □Hantaan Virus. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
  5. 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 Puumala Virus Infection Using Several Rodent Species of

- Laboratory Animal. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
6. 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)
  7. 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)
  8. 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. Baltimore, MD (2007. July 24-25)
  9. 吉松組子、垂石みどり、有川二郎：ハンタウイルスエンベロープ糖タンパク G2 の細胞外ドメインに関する研究、第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10)
  10. 垂石みどり、吉松組子、エルデネサイハン テグシドーレン、有川二郎：ハンタウイルス持続感染モデルマウスにおけるウイルス特異的 T 細胞の解析、第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10)
  11. エルデネサイハン テグシドーレン、吉松組子、垂石みどり、有川二郎、石原智明：ホンドネズミ (*Microtus montebelli*) の Puumala 型ハンタウイルスおよび Tula 型ハンタウイルスに対する感受性に関する研究、第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10)
  12. 瀬戸隆弘、荻和宏明、谷川洋一、吉松組子、中村一郎、宮下大輔、中内美名、好井健太郎、有川二郎、高島郁夫：ロシアのボルガ川流域におけるハンタウイルス感染症の疫学的研究、第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10)
  13. 宮下大輔、荻和宏明、瀬戸隆弘、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：メキシコの野生げっ歯類におけるハンタウイルス感染症の疫学調査、第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

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：チクングニヤ熱実験室診断法の確立と本邦輸入症例から  
分離されたウイルスの性状解析

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

協力研究者 林 昌宏、小滝徹、倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：チクングニヤウイルスはトガウイルス科アルファウイルス属に分類される RNA ウイルスで、蚊によって媒介され、ヒト→蚊→ヒトの感染環をもつ。その主たる媒介蚊はヤブカ属の蚊で、ヒトスジシマカやネッタイシマカである。

チクングニヤ熱は、発熱・関節炎・発疹の3主徴が特徴であり、時に出血傾向を呈するため、鑑別疾患としてデング熱あげられる。発熱と関節痛は必発であり、発疹は8割程度に認められる。関節痛は四肢（遠位）に強く、関節の腫脹を伴う場合もある。その他主要な症状としては、全身倦怠・頭痛・筋肉痛・リンパ節腫脹である。また出血傾向（鼻出血・歯肉出血）や悪心・嘔吐をきたすこともある。現在の流行株は病原性が高く、出血熱、脳症、劇症肝炎などで死亡する症例がある。2005年初頭にコモロ（Comoro）諸島で流行が発生した今回の流行は、ウイルスはインド洋に位置する他の島国に拡大し流行した。2006年にはインド西部、スリランカでも流行し、2007年7月には北イタリアに侵入した。2006年12月にいずれもスリランカで感染した日本人輸入症例2例を確認した。この1例からチクングニヤウイルスが分離された。分離ウイルスの性状を解析し現在世界各地で流行している CHIKV 株と比較・検討した。検出されたウイルスの E1 蛋白質領域の遺伝子を解析した結果、現在流行中のレユニオン島分離株の遺伝子配列と 99%一致した。分離ウイルスの培養上清を精製・濃縮し形態的観察を行ったところ直径約 70nm のウイルス粒子が観察された。CHIKV よりプラーク形成能の異なるウイルス株をサブクローニングしたところ増殖能の異なる2種のウイルス株を得た。チクングニヤウイルス感染症は、わが国では現在のところ感染症法あるいは検疫法において定められていない感染症であるが、この流行の主媒介蚊は本邦においても沖縄県から東北地方まで広く分布しているヒトスジシマカである。ヨーロッパ・アメリカ・カナダ・東南アジア諸国では非常に警戒されているウイルス感染症である。そこで Robert Koch Institute を中心とした「ヨーロッパ輸入ウイルス感染症診断ネットワーク」の呼びかけに応じて、External quality assurance に参加し実験室診断感度を検討した。

## A. 研究目的

2005年初頭にコモロ (Comoro)諸島で流行が発生した。その後、ウイルスはインド洋に位置する他の島国 (モーリシャス: Mauritius, レユニオン: Reunion, セーシェル: Seychelles, マヨット: Mayotte)などに拡大し流行した。人口77万人のレユニオン島では26万4千人が感染したと推計され、237人が死亡した。2006年にはインド西部、スリランカでも流行し、2007年7月には北イタリアに侵入した。香港、スイス、台湾、米国などからも輸入症例が報告された。本邦でも2例の輸入症例が確認され、1例からウイルスが分離された。わが国へのチクングニヤウイルスの侵入に備えるため本分離ウイルスおよび以前に分離されたアフリカ株、アジア株の3株を用いて、チクングニヤウイルス遺伝子検出法を確立した。また、血清学的診断法も確立し、これらのin house診断法を「ヨーロッパ輸入ウイルス感染症診断ネットワーク」の呼びかけに応じて、External Quality Assurance (EQA)に参加し実験室診断感度を評価した。また、輸入症例から分離された性状解析し、その病原性、ワクチン開発の可能性を検討した。

## B. 研究方法

### 病原体検出法

国立感染症研究所では、従来よりP3施設内にチクングニヤウイルス (Af株およびBaH306株)の2株を保有しており、今回の分離株を含めてこれらのウイルスにより、下記の遺伝子検出法を評価した。

#### ●逆転写PCR用プライマーセット

・Chik3512s : (10273bp)

ACG CAA TTG AGC GAA GCA CAT

・Chik3991s : (10552bp)

AAA TTG TCC TGG TCT TCC TG

●リアルタイムPCR (TaqMan法)用プライマー&プローブセット TaqMan用プローブ、プライマー

・Probe: Taq-Chik638P

FAM-TACCAGCTGCACYC-MGB-3'

・Primer(F) : Taq-Chik607F (10849)

GCR CCM TCT KTA ACG GAC AT

・Primer(R) : Taq-Chik672R (10894)

GCC CCC RAA GTC KGA GGA R

### 日本人輸入症例からのチクングニヤウイルス分離とその性状解析

病原体診断法としてRT-PCR法及びリアルタイムPCR法によるウイルス遺伝子検出を行い、遺伝子解析を行った。またVero細胞によるウイルス分離を試み、ウイルス培養上清をショ糖密度勾配遠心法により濃縮・精製し、透過型電子顕微鏡による観察を行った。

### 血清学的検査法

#### (1)IgM抗体検査法 (IgM捕捉ELISA)

抗体検査に必須である患者血清はフランスパスツール研究所、National Reference Center for Arbovirus and Viral Hemorrhagic Fevers)のDr. HERVE ZELLERから無償で供与いただいた。二次抗体として使用する抗チクングニヤウイルス抗体は、Anti-CHIKV polyclonal Antibody Mouse immune ascitic fluid ATCC VR-1241を米国ATCCから輸入し、使用した。抗原は、Af株をVero細胞で増殖させ使用した。

#### (2)中和試験

チクングニヤウイルス (Af株)およびVero細胞を用いて、プラーク減少法により測定した。

### 国際多施設実験室診断精度試験 (EQA)

コッホ研究所が中心になり、2007年5月

に The European Network for Diagnostics of Imported Viral Diseases (ENIVD)の事業として、「1<sup>st</sup> External Quality Assurance (EQA) for the PCR & serology diagnostic of Chikungunya virus (CHKI)」を実施することになり、日本（国立感染症研究所）も参加した。血清診断用に 12 サンプル、ウイルス遺伝子検出用に 12 サンプルを、いずれもガンマ線による不活化後凍結乾燥し、コッホ研究所から送られてきた。これらのサンプルをそれぞれ滅菌蒸留水で再溶解し、リアルタイム RT-PCR および、IgM 捕捉 ELISA および中和抗体を測定した。

### C. 研究結果

#### 本邦で初めてウイルスが分離されたチクングニヤ熱輸入症例と分離ウイルスについて (2 例目)

患者は、50代、女性。日本在住の日本人女性。平成18年11月27日から12月3日まで、スリランカに渡航。スリランカでは、渡航後まもなく、数ヶ所を蚊に刺された。帰国後の12月4日より全身倦怠感が増悪し、12月5日に40度の発熱、関節痛を認め、日本国内の医療機関に受診し、入院した。入院中に鼻出血、皮疹の症状も出現した。対症療法を行い、症状は改善して退院した。国立感染症研究所における抗体検査の結果、デングウイルス感染は否定された。チクングニヤウイルス遺伝子の検出同定、ウイルス分離及び同ウイルスに対する特異的 IgM 抗体陽性、中和抗体陽性であり、チクングニヤ熱と確定診断した。患者は、退院後は軽度の全身倦怠感が残存していたが、後遺症なく回復している。

本症例の急性期血清からの分離ウイルス（図1）の遺伝子解析結果から、インド洋の島国レユニオン島の流行で分離されたウイルス株と99%一致した。本分離チクング

ニヤウイルスをさらに詳細に検討したところプラーク形成能の異なるウイルス株をサブクロニングしたところ増殖能の異なる2種のウイルス株を得た。これらのウイルス株の Vero 細胞における増殖性は異なっていた。

また、本症例では、約1年後の血清も入手し抗体検査を実施したその結果は以下の如くである。

#### (1)抗チクングニヤウイルス IgM 抗体

1)急性期血清：陰性

Positive/Negative Ratio=1.14

2)回復期血清：陽性

Positive/Negative Ratio=3.44

3)1年後の血清：陰性

Positive/Negative Ratio=1.88

(P/N Ratio 2.0 以上を陽性とする)

#### (2)抗チクングニヤウイルス中和抗体価

1)急性期血清：陰性 10 倍以下

2)回復期血清：陽性 20 倍

3)1年後の血清：陽性 5120 倍

(10 倍以上を陽性とする)

1年後の血清中の中和抗体価は5120倍と極めて高い抗体価を示し、IgM 抗体は陰性となっていた。

#### 国際多施設実験室診断精度試験

ウイルス遺伝子検出の感度は、リアルタイム PCR (TaqMan 法)に関して、上記分離株では、0.2 pfu/tubeであった。しかし、EQA では、他施設と比べて必ずしも高くはなかった(表1)。しかし、血清診断に関しては、上位にランクされ(表2)、総合的には十分な実験室診断能力があることが確認された。

### D. 考 察

2005年初頭にコモロ(Comoro)諸島で端を発したチクングニヤ熱は、インド洋に位



置する他の島国（モーリシャス：Mauritius, レユニオン：Reunion, セーシェル：Seychelles, マヨット：Mayotte)などに拡大し流行した。この流行はかなり大きな規模の流行であり、人口77万人のレユニオン島では26万4千人が感染したと推計され、237人が死亡した。そして2006年にはインド西部、スリランカでも流行をみており、香港、スイス、台湾、米国などからも輸入症例が報告され、2007年の夏には北イタリアに侵入し、約300人の患者の発生をみた。北イタリアは気候として温帯地域に属し、2007年の侵入事例は同じ温帯地域に属し、ヒトスジシマカの活動の活発な日本において大いに参考にする必要がある。

2例目の輸入患者血清からチクングニヤウイルスが分離された。本血清は、新潟県保健環境科学研究所で2ヶ月近く保存されていたものであるが、比較的容易に分離されたことから、血清中のウイルス力価はかなり高いものであったと推測された。分離ウイルスの遺伝子解析結果から、インド洋の島国レユニオン島の流行で分離されたウイルス株と99%一致した。このことから、スリランカで流行しているチクングニヤウイルスはインド洋の流行から持ち込まれたウイルスである可能性が示唆された。分離したCHIKVよりプラーク形成能の異なる2種のウイルス株が分離されたことから本患者の体内においては少なくとも2種のウイルス株が増殖していたことが示唆された。この2種類のウイルスの性状を比較解析することでワクチン開発にも多くの基盤的情報を得ることが可能であると考えられる。本症例の1年後の血清中の中和抗体価は5120倍と極めて高い抗体価を示した。このことから、チクングニヤウイルスに一度感染したヒトは、極めて高い防御抗体を獲得することが確認された。

また、世界的に話題となった今回のチク

ングニヤ熱流行のような大規模の流行で、海外でも輸入症例に関する報告がされ、ヨーロッパ・米国・東南アジア諸国では非常に警戒されている状況で、2007年にイタリアに侵入した事例からもわが国も決して例外ではなく、輸入症例からの国内侵入に備えて診断体制を整えておくことが重要であることが示唆された。我々の確立した実験室診断法は、1<sup>st</sup> External Quality Assurance (EQA) for the PCR & serology diagnostic of Chikungunya virus (CHKI)の結果から、ウイルス遺伝子検出感度はそれ程鋭敏ではなかったが、これはドイツからの検体輸送の問題もあるかも知れず現在、EQA研究グループとして検討中である。血清診断と合わせて評価すると十分な感度と特異性を備えていると考えられるが、今後、実際に流行したイタリア、多くの輸入症例を経験しているドイツ、フランスの研究機関とも緊密に連絡をとり、より効率の良い実験室診断法を開発していく予定である。一方、チクングニヤ熱は感染症法や検疫法に規定されていないことが現状であり、今後の南アジア、東南アジアでの流行状況に応じて法的整備も考える必要があると思われる。

## E. 結論

2005年から、インド洋の島国で大きな流行をきたしたチクングニヤ熱は、2006年にはそのウイルスが、インドおよびスリランカに侵入し流行をきたした。わが国でもスリランカからの輸入チクングニヤ熱症例2例を確認した。また、2例目の患者血清からチクングニヤウイルスを分離した。Robert Koch Instituteを中心とした「ヨーロッパ輸入ウイルス感染症診断ネットワーク」の呼びかけに応じて、External quality assuranceに参加し実験室診断感度を検討した結果、病原体診断および血清診断を合わせて評価すると十分な感度と特異性を備え

ていることが確認された。

#### F. 健康危険情報

インド洋諸国、インドおよびスリランカで流行しているチクングニヤ熱は、2007年夏に北部イタリアに侵入し、300人規模の流行が発生した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

水野泰孝、加藤康幸、工藤宏一郎、高崎智彦、倉根一郎. 遷延する関節痛より確定診断に至ったチクングニヤ熱の本邦初症例. 感染症学雑誌 81(5)600-601 (2007).

##### 2. 学会発表

高崎智彦、林 昌宏、小滝 徹、水野泰孝、加藤康幸、工藤宏一郎、渡邊 香奈子、倉根一郎. チクングニヤ熱輸入2症例と実験室診断法. 第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (石川県白山市) 2007年5月.

林 昌宏、高崎智彦、小滝 徹、モイメンリン、伊藤美佳子、倉根一郎. チクングニヤ熱輸入症例患者血清より日本で初めて分離されたチクングニヤウイルスの性状解析. 第55回日本ウイルス学会 (札幌市) 2007年10月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 External quality assurance (EQA) on Chikungunyavirus PCR diagnostic

	sample N°												Score
	#2	#9	#4	#12	#5	#6	#10	#1	#11	#8	#3	#7	
	CHIK Reunion	CHIK Reunion	CHIK Reunion	CHIK Reunion	CHIK Reunion	CHIK India	CHIK Seychell en	CHIK Mauritiu s	CHIK Africa	DEN-2	neg.	neg.	
dilution	1:100	1:1000	1:10000	1:100000	1:1000000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:100	1:10	1:10	
32	6.0E+07	2.4E+06	3.2E+05	2.9E+04	5.2E+03	2.7E+06	1.9E+06	1.6E+06	4.2E+06	-	-	-	12
20a	8.2E+06	1.4E+07	1.6E+06	2.0E+07	1.5E+04	9.9E+06	9.0E+06	6.3E+06	1.2E+05	-	-	-	12
11	3.0E+06	3.0E+05	3.0E+04	3.0E+03	3.0E+02	3.0E+05	3.0E+05	2.0E+05	6.0E+05	-	-	-	12
4	21.0	24.8	28.2	31.8	38.2	24.7	25.2	25.5	23.6	-	-	-	12
25	23.1	25.5	29.0	32.4	35.8	25.5	26.0	26.7	25.1	-	-	-	12
30	27.5	30.9	35.3	39.2	>40(+/-)	32.4	32.7	33.2	30.9	-	-	-	12
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	12
15	5.0E+06	1.0E+05	1.0E+04	5.0E+02	-	1.0E+05	1.0E+05	1.0E+05	1.0E+05	-	-	-	11
21b	26	30	33	36	-	30	30	31	29	-	-	-	11
1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	11
13	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	11
6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	11
5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	11
19	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	11
18	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	9
17	32.9	-	-	-	-	37.3	36.7	36.5	37.5	-	-	-	8
26	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	8
28	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	7
14a	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	7
31	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	5
27	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
8a	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	5
9	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	4
22	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	4

研究施設番号

研究施設番号18が国立感染症研究所(日本)である。

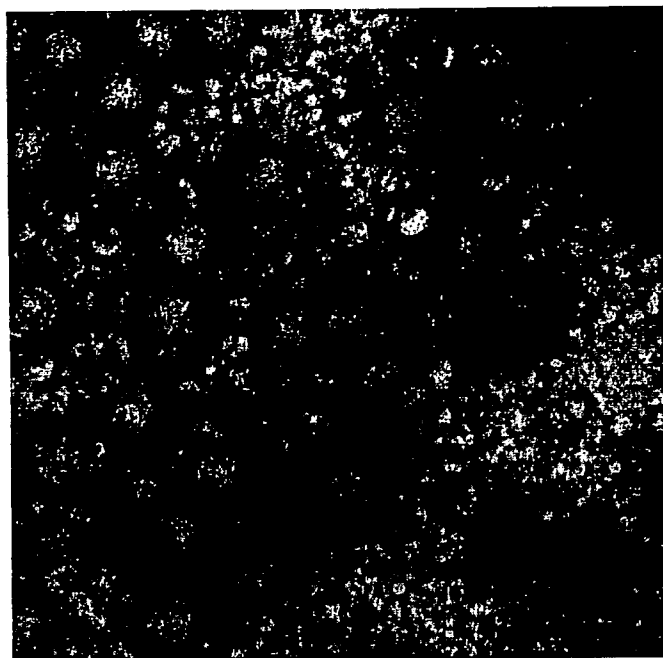
表2 External quality assurance (EQA) on Chikungunyavirus sero diagnostic

dilution	sample N											
	#2	#1	#2	#4	#7	#6	#10	#5	#9	#8	#3	#1
	CHKsro	CHKsro	CHKsro	CHKsro	CHKsro	CHKsro	CHKsro	CHKsro	VN	DEN2	reg	reg
	15	1:10	1:20	1:40	1:80	1:100	1:20	1:20	1:10	1:100	15	15
20	100/300	32/100	10/320	-/100	-/-	-/-	100/320	100/320	-/-	-/-	-/-	-/-
16	10/320	-/320	-/100	-/32	+/32	-/10	10/100	10/100	-/-	-/-	-/-	-/-
13	20/160	10/80	+/20	-/20	-/10	-/-	10/40	20/40	-/-	-/-	-/-	-/-
18	+/160	+/40	+/40	+/10	-/10	-/10	+/40	+/40	-/-	-/-	-/-	-/-
32	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
26	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
12	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
25	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
29	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
30	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
28	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-

↑ 研究施設番号18が国立感染症研究所(日本)である。

図1

シヨ精密度勾配遠心法により粗精製した分離ウイルス(CHIK-SL株)の電子顕微鏡像



MAG 25K  
Bar 100nm