

200829018A

厚生労働科学研究費補助金

平成20年度

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
(H19—新興—一般—003)

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年3月

研究代表者 森川 茂
(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金

平成20年度

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
(H19—新興—一般—003)

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年3月

研究代表者 森川 茂
(国立感染症研究所)

目 次

I. 総括研究報告書	
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	1
研究代表者：森川茂（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
II. 分担研究報告書	
1. 南米出血熱の実験室診断法の開発	11
研究分担者：森川茂（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
2. 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	21
研究分担者：甲斐知恵子（東京大学医科学研究所）	
3. エボラウイルスの診断法と抗ウイルス薬の検討	27
研究分担者：高田礼人（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター）	
4. 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	31
研究分担者：安田二郎（科学警察研究所法科学第一部）	
5. HPS ウイルス（ハンタウイルス）の診断法と分子疫学	39
研究分担者：有川二郎（北海道大学大学院医学研究科）	
6. 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	45
研究分担者：林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
7. リフトバレーウイルスの診断法と抗ウイルス薬の検討	51
研究分担者：福士秀悦（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
8. 霊長類におけるサル痘ウイルス感染症における IMV および EEV 蛋白に対する抗体応答	61
研究分担者：西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
9. 重症急性呼吸器症候群の発症モデル動物系による発症機構と ワクチン、治療法の開発—小動物を用いた感染モデルの開発—	71
研究分担者：田口文広（国立感染症研究所ウイルス第三部）	
10. 新興ウイルスが出現した場合の迅速なウイルス同定法の開発	77
研究分担者：遠藤大二（酪農学園大学獣医学部放射線学）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	89

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

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

国立感染症研究所ウイルス第一部第一室長 森川 茂

研究要旨：近年、エボラ出血熱、マールブルグ出血熱、ラッサ熱、クリミア・コンゴ出血熱、リフトバレー熱、南米出血熱、ニバウイルス脳炎、ハンタウイルス感染症、サル痘、重症急性呼吸器症候群、チクングニア熱等の大流行の頻発や感染地域の拡大が見られ、我国への侵入が危惧される。ウガンダのエボラ出血熱の原因病原は新種の *Bundibugyo ebolavirus* とされ、ザンビア・南アではラッサではない未知の旧世界アレナウイルスによる出血熱患者が発生した。南米出血熱もボリビアでの流行から新種の *Chapare* ウイルスが同定された。フィリピンでは豚の *Reston ebolavirus* 感染が明らかになり、ニバウイルスは、パングラディッシュで患者発生が続いているがアジアだけでなく西アフリカ等のオオコウモリも保有しているらしい。チクングニア熱は大規模な流行が発生していて、これまでに国内への輸入症例が5例となった。これら重篤なウイルス感染症の病原の多くは BSL4 病原体等で日本ではウイルスを取り扱えないが、実験室診断を誤った場合の社会的・公衆衛生学的インパクトが非常に大きいため、限りなく正確な診断が必要である。このため、種々の方法による検査法を整備しておく必要があり、かつ新種・新型のウイルス出現に迅速に対応できる体制を整備しておく必要がある。本研究では、この目的を達成するためにこれまで2年間の研究を行い、今年度は以下の成果を得た。

1) 不活化ウイルス抗原、組換えウイルス蛋白、ウイルス様粒子抗原を用いた抗体、抗原検出法に関する研究：南米出血熱ウイルス NP 抗原検出 ELISA、フニンウイルスと他の南米出血熱ウイルスを鑑別できる抗原検出 ELISA、リフトバレー熱ウイルス NP 検出 ELISA を開発した。ハンタウイルス肺症候群 (HPS) では、原因ウイルスの分子系統学的解析から5グループに分類できた。異なるグループの HPS ウイルスの組換え NP を用いる IgG-ELISA では、交叉反応性が認められた。チクングニアウイルスの不活化抗原を用いた IgM 抗体検出系は、国内で発生した輸入症例患者5検体に適用した。

2) 安全で迅速な代替ウイルス中和抗体測定系に関する研究：VSV-pseudotype による中和試験法の開発は、既にエボラウイルス、SARS-CoV では確立し、代替え中和試験に用いることができる。この系を用い、リフトバレー熱ウイルス、フニンウイルス、サビアウイルス、ラッサウイルスの VSV-pseudotype を作製した。特異血清等を用いて検討した結果、フニンウイルス特異的血清ではフニンウイルスの VSV-pseudotype は中和されるがラッサウイルス特異血清では中和されず、交叉がないことが分かった。また、ニバウイルスでは、リバースジェネティクス系により C 遺伝子欠失ウイルスが弱毒化していたため、中和試験への応用をはかる。HPS では、異なるグループの HPS ウイルスの N 末端が欠失した NP

抗原を用いるとグループ特異的抗体を検出でき、中和抗体測定の代替法としての有用性が判明した。

3) 対象ウイルス遺伝子の検出法に関する研究：マールブルグウイルスの LAMP 法、サル痘ウイルスの PCR 法、LAMP 法、ハンタウイルスの 3 群にわたる RT-PCR 法、ニパウイルスの RT-PCR 法、チクングニアウイルスの RT-PCR 法を、それぞれ開発した。マールブルグウイルスではウイルス材料を、ニパウイルスでは感染動物材料を、チクングニアウイルスでは臨床検体をそれぞれ用いて評価した。ウガンダのエボラ出血熱の原因病原として同定された新型エボラウイルス (Bundibugyo ebolavirus) にも対応可能なように Realtime RT-PCR を改良した。アレナウイルスでは、ザンビア・南ア新種のウイルスによる出血熱が発生した。このような新興ウイルスに対応可能な degenerated primer の設計アルゴリズムを改良して予測した primer sets による RT-PCR が、アレナウイルス及びエボラウイルスで高感度にウイルス遺伝子を検出できることを実証した。

4) 対象ウイルスの予防・治療法の研究：ニパウイルスでは、C 遺伝子欠損ウイルスが弱毒化することが分かり、ワクチン開発の可能性を示唆した。エボラウイルスでは、抗 GP 単クローン抗体による発症予防効果を確認した。マールブルグウイルスでは VP40 によるウイルス様粒子出芽過程に Tsg101 だけでなく Nedd4.1、Vps4B が宿主因子として関与することを明らかにし、粒子出芽過程を阻害する薬剤や si-RNA 等を検討する系を確立した。さらに Tetherin がフィロウイルスやアレナウイルスの粒子産生に阻害活性を持つことを明らかにした。サル痘では、種痘後およびサル痘ウイルスチャレンジ後の約 200 のウイルス蛋白に対する抗体応答をプロテオミクス解析により明らかにした。重症急性呼吸器症候群ではパストレラ菌との共感染によりマウスに純化しないヒト型 SARS-CoV での重症化小動物モデルを確立し、より人に近いサルでの発症モデル開発に近づいた。また、これにより治療法を解析する系が確立された。

研究分担者：

甲斐智恵子 (東京大学医科学研究所教授)
高田礼人 (北海道大学人獣共通感染症共通感染症リサーチセンター教授)
安田二郎 (科学警察研究所科学第一部室長)
有川二郎 (北海道大学大学院医学研究科病原微生物学教授)
林 昌宏 (国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官)
福士秀悦 (国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官)
西條政幸 (国立感染症研究所ウイルス第一部室長)
田口文広 (国立感染症研究所ウイルス第三部室長)
遠藤大二 (酪農学園大学獣医放射線学教授)

A. 目的：

1 類感染症に分類されるエボラ出血熱・マールブルグ出血熱・ラッサ熱・クリミア・コンゴ出血熱・南米出血熱以外にも、重篤な症状と高い致死率を示すリフトバレー

熱・ニパウイルス脳炎・ハンタウイルス肺症候群・重症急性呼吸器症候群・チクングニア熱等は日本には存在しない輸入ウイルス感染症である。近年、欧州ではラッサ熱輸入症例が多発し、米国ではヒトのサル痘の流行があった。2008 年にはラッサ熱の英国輸入症例、マールブルグ病のオランダ及び米国での輸入症例等が報告されている。また、エボラ出血熱・マールブルグ出血熱・ラッサ熱、サル痘、リフトバレー熱の常在地であるアフリカでは大規模な流行が頻発し、エボラウイルスは新種の Bundibugyo ebolavirus が、アレナウイルスではラッサウイルスとは異なる新種のウイルスが新興した。南米ではボリビアの出血熱の病因として新種アレナウイルス (Chapare virus) が同定された。クリミア・コンゴ出血熱はトル

コで大規模な流行が発生している。チクングニヤ熱も大規模な流行が相次いでおり、日本でもこれまでに5例の輸入症例が発生している。チクングニヤ熱は蚊によって媒介され、発熱・関節炎・発疹を3主徴とし、時に出血傾向を呈する感染症で、2007年に日本での初めての輸入症例が同定され、これまでに5例の輸入症例が報告された。ニパウイルス脳炎は、バングラディッシュで患者発生が相次いでいるが、中国のコウモリ等でもウイルス遺伝子が検出されよりひろくウイルスが分布することが明らかになった。これらの防疫上緊急を要するウイルス感染症はレベル4病原体が多く、BSL4施設が稼働していない現状では、ウイルスを用いた診断や治療法、予防法の開発が充分整備されていない。さらに、BSL4施設が稼働しても他国からレベル4病原体の分与を受けるには、多くの規制が存在するため数年必要である。また、レベル3病原体の場合も十分に診断体制が整備されていないものが多い。感染症法の改正により一類感染症としての診断を求められる南米出血熱のように全く未対応の感染症もある。

これらの感染症の実験室診断は、誤った診断をした場合の社会的、公衆衛生上の影響が極めて大きいことから、限りなく正確な診断が求められる。そこで、未整備の感染症の診断体制を確立し、ある程度診断体制が整備された感染症の診断法を改良することを目的とする。特に血清診断では、最も信頼度の高いウイルス中和試験法の確立が急務であるため、VSV-pseudotype等を応用した代替え中和試験法の確立を多くの対象ウイルスで目指す。また、発症初期の診断に重要なウイルス検出法に関しては、特に変異の多いハンタウイルスやアレナウイルスの遺伝子検出法の改良等を行ない、併せて高感度なウイルス蛋白検出系を整備する。さらに、新型や新種のエボラウイルス、ア

レナウイルス等にも対応可能な遺伝子検出・同定を迅速に行なえるような高感度ウイルス遺伝子検出法の確立を目指す。さらにこれらの感染症の予防・治療法の開発に繋がる基礎研究を行うことも本研究の目的とする。また、サル痘、ニパウイルス感染症や重症急性呼吸器症候群では発症動物モデル系を用いた有効な治療法開発につながる基礎研究を進展させる。フィロウイルスやアレナウイルスでは、ウイルス様粒子産生系を用いて粒子産生に促進的に作用する宿主因子と抑制的に作用する因子を明らかにし、ウイルス増殖抑制効果のある薬剤等の測定系の開発を行なう。

B. 研究方法：

1) 南米出血熱の実験室診断法の開発と評価：

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）と新興したチャバレウイルスによる出血熱がある。本年は、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の単特異抗体の他の南米アレナウイルスとの交叉性と認識エピトープの同定、これに基づいた抗原検出系を開発した。また、間接蛍光抗体法用抗原の作製、代替えウイルス中和試験法の開発を併せて行った。

2) エボラウイルス、マールブルグウイルスの実験室診断法の開発と評価：

エボラ出血熱では、ザイール、スーダン、アイボリーコースト、レストンの4種の表面糖蛋白質の細胞外領域を分泌型蛋白質として発現精製する系を確立した。これらを抗原とする型別抗体検出系を開発した。また、共通エピトープを認識する単特異抗体を作製した。昨年度開発した4種のエボラウイルスを高感度に検出

する RT-PCR 法をエボラウイルス感染マウスの臓器に適用して有用性を検討した。

4 種のエボラウイルス検出 qRT-PCR は、新種の Bundibugyo エボラウイルスに対応可能な改変をし、標的遺伝子を化学合成して有用性を検討した。

3) ハンタウイルス肺症候群の実験室診断法の開発：

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は極めて多種のウイルスがあり、その多様性も大きい。そこで、ウイルスの核蛋白(NP)の可変領域から HPS ウイルスの系統解析を行った結果、5 グループに分類されることが分かった。本年度は、グループ 1 とグループ 4 に分類されたシンノンブレウイルス(SNV)と南米由来ラグナネグラウイルス(LNV)の NP 抗原の抗原性を解析し、HPS 交叉抗体検出系と HPS の型別抗体検出系を開発し、評価した。

4) チクングニア熱の実験室診断法の開発と評価：

チクングニヤウイルスは、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。2007 年には北イタリアに侵入し、多くの患者が発生した。これまでに日本人輸入症例からウイルス分離している。これにアフリカ株、アジア株を加えた 3 株を用いて、チクングニヤウイルス遺伝子検出法 (qRT-PCR) を確立した。また、血清学的診断法として IgM 補足 ELISA 及びウイルス中和試験法を確立している。これを日本人患者の継時的な検体を用いて、各種検査法によるウイルス検出、抗体検出に関して検討した。また、分離ウイル

スの分子系統学的解析を行なった。

5) リフトバレー熱の実験室診断法の開発：

リフトバレー熱は、アフリカに常在し、蚊により媒介される。多くの種の蚊がウイルスを媒介するため、いったんウイルスが侵入すると世界中どこでも流行する可能性が高い。近年では、2006 年から 2007 年にかけてタンザニア、ケニア、ソマリア、スーダンでそれぞれ数百人規模の患者が発生し高い致死率 (20-40%) を示している。本研究では、リフトバレー熱ウイルス (RVFV) 構造蛋白質を用いた IgG および IgM 抗体の検出、RVFV 抗原検出 ELISA およびシュドタイプウイルスを用いた血清中の中和抗体検出法を開発する。本年度は、RVFV の NP に対する高アビジニティーな単特異抗体による抗原検出 ELISA を開発し、感度等の評価を行った。また、qRT-PCR に関しては、GHSAG のワークショップでの EQA(external quality assurance)に参加し有用性を評価した。構築するための単クローン抗体を作製し、これらの反応性を検討した。

6) 新型や新興ウイルスが出現した場合の迅速なウイルス遺伝子検出の開発：

PCR 法は、ウイルス感染症の急性期の病原同定に極めて有用な実験室診断法であるが、特に本研究で対象とする重篤なウイルス感染症では、対象の多くが RNA ウイルスであることから遺伝子の多様性が遺伝子検出法の障害となることが多い。すなわち、新種のエボラウイルス新興時、新種のアレナウイルス出血熱発生時、ラッサウイルス、南米アレナウイルスやハンタウイルスのように遺伝子配列の多様性が大きいウイルスでは、既存のプライマーによる遺伝子検出法では検出できな

いウイルス株の出現がしばしば問題になる。そこで、これまで開発したウイルス種あるいは属ごとに共通する degenerated プライマーセットを予測するアルゴリズムをさらに発展させ、それに基づくプライマー設計を行い、合成遺伝子や実際の検体に適用してその有用性を検討した。

7) ニパウイルス感染症の予防治療法の開発に関する研究:

ニパウイルスの P 遺伝子内にコードされるアクセサリー蛋白(V,W,C)は、それぞれが IFN 応答を抑制するが、その抑制能を定量的に比較検討する実験系を開発した。さらに、アクセサリー蛋白欠損ニパウイルスをリバースジェネティックス系を用いて作製し、*in vitro*, *in vivo* での性状解析を行なった。

8) 出血熱ウイルスのウイルス粒子形成過程に関与する細胞因子の解析と阻害法の検討:

マールブルグウイルスの VP40 やラッサウイルスの Z 蛋白質は、ウイルス出芽に必須な蛋白質である。昨年度、マールブルグウイルスの VP40 の L-ドメインモチーフの同定と宿主因子 Tsg101 を同定したが、さらに発展させ宿主因子を同定した。また、その siRNA による粒子形成阻害効果を検討した。さらに、HIV の粒子形成阻害宿主因子として同定された Tetherin の効果をマールブルグウイルスやラッサウイルスで解析した。

9) 霊長類のサル痘ウイルス感における IMV および EEV 蛋白に対する抗体応答の解析:

サル痘は、ポックスウイルス科のオルソポックスウイルス属のサル痘ウイルスによ

る、天然痘様の症状を呈する感染症で、コンゴ民主共和国で毎年流行している。また、近年米国でも輸入細菌類を感染源とする流行が起きている。本年度は、ポックスウイルスの 2 種類の感染性粒子である intracellular mature virion (IMV) や extracellular enveloped virion (EEV) に関連蛋白に対する抗体応答について、プロテオミック解析を行った。痘そうワクチン株である LC16m8 または Lister 免疫個体における、これらの蛋白に対する抗体誘導についても解析した。

10) 重症急性呼吸器症候群の発症モデル動物系の開発:

重症急性呼吸器症候群 (SARS) は野生動物由来の新興感染症であり、原因病原体は新型コロナウイルス (SARS-CoV) である。SARS 病態は重症肺炎であり、致死率は約 10% と極めて高い。SARS-CoV はその受容体を発現している種々の組織で増殖するが、肺での高い増殖と重症肺炎の発症機構についてはよく分かっていない。これまで、小動物へのウイルス馴化は、SARS-CoV の細胞レセプター ACE2 の結合糖タンパク質である S 蛋白質が変異することによるとされていた。本研究では、SARS-CoV 感染がトリプシンやエラストラーゼなどにより著しく亢進し、弱毒細菌感染により肺でのエラストラーゼ産生が誘導され、更に SARS-CoV 感染が増強され、重症化肺炎に至ることを明らかにしてきた。この実験系を用いてマウスに馴化していない SARS-CoV を継代感染することによりヒト型の S 蛋白質を持つ SARS-CoV による生動物発症モデルを開発した。

C. 結果：

1) 南米出血熱の実験室診断法の開発と評価：

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 に対する単クローン抗体を作製し、これらを用いた抗原検出 ELSIA 法を開発した。単クローン抗体の種類により、アルゼンチン出血熱の病原ウイルスである Junin ウイルスのみ検出できる系と南米出血熱の病原ウイルス全てを検出できる系ができた。代替えウイルス中和試験に用いられる Junin ウイルスのエンベロップ蛋白を持つ増殖欠損型シュードタイプを作製した結果、ラッサウイルス抗体とは交叉せず、ウイルス特異抗体を検出できることが分かった。

2) エボラウイルス、マールブルグウイルスの実験室診断法の開発と評価：

昨年度に確立した RT-PCR 法を用いて、エボラザイルウイルス感染マウスの臓器からのウイルスの検出を試みた結果、脾臓、肝臓および血清から高感度でウイルス遺伝子が検出された。また、qRT-PCR 法を改良して、Bundibugyo エボラウイルス遺伝子検出感度を検討した結果、10 コピーと高感度であった。

ザイール、スーダン、アイボリーコースト、レストンの4種の表面糖蛋白質の細胞外領域を発現精製し、それらを抗原とする ELISA を開発した。それぞれのエボラウイルス種特異血清を用いて、特異性を確認した結果、交叉反応性はあるがウイルス種特異的な抗体が検出でき、シュードタイプウイルスを用いた代替え中和法とともに、鑑別診断法としての有用性が明らかとなった。本試験法は、特に野生動物等の疫学調査におけるスクリーニング検査法として有用で

あるため、その目的に適用し始めている。

3) ハンタウイルス肺症候群の実験室診断法の開発：

HPS 関連ウイルス核蛋白の変領域の配列解析から HPS ウイルスが少なくとも5グループあることが分かった。これまで HFRS ウイルス開発した、NP の N 末端の共通抗原性領域を除去した抗原を用いる ELISA 系を応用して HPS ウイルス鑑別 ELISA を開発した。その結果、北米南部の同一地域に存在しヒトに対して病原性をもつ SNV と、弱毒型と考えられる ELMCV の抗体が鑑別できた。一方、全長 NP を用いると両者の抗体を検出できた。

4) チクングニア熱の実験室診断法の開発と評価：

これまでに RT-PCR 法、リアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子検出法、IgM 捕捉 ELISA 法、50%ブランク減少法を用いた中和法による診断法を確立し、合計5例の輸入症例を診断した。その結果、ある患者の急性期では、血清中のウイルス RNA 数は 1.8×10^9 RNA copies/ml であった。抗体応答は、8 病日ころから認められ、それに伴いウイルス血症はなくなる。IgM 抗体は3ヶ月後でも陽性の場合があった。それ以降もウイルス中和抗体は高値であった。

5) リフトバレー熱の実験室診断法の開発：

リフトバレー熱ウイルス(RVFPV)の NP に対する単特異抗体を用いて、抗原検出 ELISA 法を開発した。その結果、1ng 以下の組換え RVFPV NP あるいは、15~125 PFU (感染価) の RVFPV を検出できた。単特異抗体の認識部位は、全ての RVFPV

の NP のアミノ酸配列で保存されているため、この抗原検出系は診断上有効であると考えられた。また、qRT-PCR を GHSAG EQA で評価した結果、極めて高感度にウイルス遺伝子を検出できた。

6) 新型や新興ウイルスが出現した場合の迅速なウイルス遺伝子検出法の開発:

昨年度の PCR プライマー設計アルゴリズムを改良して、アレナウイルスの様に遺伝子全域に亘って変異が多いことから共通プライマーの設定が困難であったウイルスに対しても、プライマー設計が可能であることを、本アルゴリズムにより設計されたプライマーを用いて合成 DNA 鋳型及びウイルス感染細胞 RNA を用いて検証した。同様に新興した Bundibugyo エボラウイルスを含め全てのエボラウイルス遺伝子を検出できるプライマーの設計も可能であることを示した。

このため、本アルゴリズムにより設計されたプライマーを複数用いることにより、近年出現した新種エボラウイルスや新種旧世界アレナウイルスによる出血熱患者の急性期の病原同定技術の向上が期待される。これらの成果は、同様にウイルス種が多く共通プライマーの設計が困難であった HPS の原因となる新大陸のハンタウイルス群、南米出血熱の原因となる新世界アレナウイルスの特に B 群の出血熱ウイルスの共通プライマーの設計に応用可能と考えられる。

7) ニパウイルス感染症の予防治療法の開発に関する研究:

リバーシジェネティックス法を用いて、ニパウイルスのアクセサリー遺伝子である V,W,C 蛋白をそれぞれ欠失したウイルスを作製した結果、全てのウイルスが感

染性を有していたが、C 蛋白欠損ウイルスでは、親株より *in vitro* での増殖性が低下した。P 蛋白発現によるインターフェロン応答抑制能があるため、いずれの欠損ウイルスもインターフェロン応答抑制能は認められた。

感受性小動物のハムスター感染実験では C 蛋白欠損ウイルスが弱毒化していた。これは弱毒化ワクチンの候補の一つとなると考えられる。

8) 出血熱ウイルスのウイルス粒子形成過程に関与する細胞因子の解析と阻害法の検討:

マールブルグウイルスの出芽機構の解析を進展させた結果、さらに宿主因子として Nedd4.1、Vps4B が同定され、ウイルスの出芽には細胞内膜輸送系の一つである Multivesicular body が利用されていることが強く示唆された。

また、Tetherin がマールブルグウイルスおよびラッサウイルスの産生阻害効果をもつことを明らかにした。他の様々なウイルス種に対しても同様の効果をもつことが示唆された。Tetherin は先天性免疫機構 (innate immunity) の一つとしてウイルスに対する宿主防御に重要な役割を果たしていることが示唆され、Tetherin を利用した新規抗ウイルス戦略の可能性が示された。

9) 霊長類のサル痘ウイルス感における IMV および EEV 蛋白に対する抗体応答の解析:

LC16m8 痘そうワクチン接種半年後に抗体陽性が維持されていた EEV 関連蛋白は、F13L と A33R で、Lister 痘そうワクチン接種半年後のサルでは EEV 関連蛋白の抗体は F13L、A33R、B5R が認められた。一方、サル痘ウイルス感染サルでは、

EEV 関連蛋白 (F13L, A33R, A34R, A36R, B5R) と IMV 関連蛋白 (L1R, H3L, D8L, A13L, A17L, L5R) 全てに抗体応答があった。LC16m8 株接種半年後における Lister 株免疫サルトの応答の差は B5R 抗体の有無であった。いずれのワクチンでも免疫半年後でも致死的なサル痘ウイルス感染を防御するが、サル痘ウイルス接種部位での病変の差が認められるのは B5R 抗体の差によると考えられた。

10) 重症急性呼吸器症候群の発症モデル動物系の開発:

パストレラ菌感染による微弱肺炎マウスでの SARS-CoV の継代により、病原性の強いウイルス株 Fr-pp が分離された。分離したウイルスは、重症肺炎に陥った SARS 患者分離株と酷似したウイルスであり、ヒト型の S 蛋白質を持つウイルスが、エラストーゼの存在する肺での増殖能が高いため、選択された可能性が推測された。この仮説が正しいとすると、このウイルスは、マウス以外の実験動物においても、微弱肺炎を引き起こす条件下では高い病原性を示す可能性がある。本研究により得られた分離株 Fr-pp を用いて、ハムスターなどの小動物や最終的な動物モデルとしてサルを用いた研究を行う予定である。

D. 考察:

エボラ出血熱、マールブルグ出血熱、ラッサ熱、クリミア・コンゴ出血熱、リフトバレー熱、南米出血熱、ニバウイルス脳炎、ハンタウイルス感染症、サル痘、重症急性呼吸器症候群、チクングニア熱等は、近年大流行の頻発や感染地域の拡大が見られ、我国への侵入が危惧される。これらの防疫上緊急な感染症の診断体制

を確立し、さらに予防・治療法の開発に繋がる基礎研究を行うことが本研究の目的である。これらの多くは、BSL4 病原体で日本ではウイルスを取り扱えないが、実験室診断を誤った場合の社会的・公衆衛生学的インパクトが非常に大きいため、限りなく正確な診断が必要であるため、組換えウイルス蛋白を用いた診断法を複数整備、改良する研究を行った。これらは、昨年フィリピンで発生したブタのレストンエボラウイルス感染症にも適用され貢献できたと考えている。現状では、まだ全ての対象ウイルスに対する実験室診断系は完全には整備されていないが、最終年度もは、未整備の検査法を完成して診断体制を強化したい。

また、組換え蛋白発現系を用いたウイルス増殖過程の解析、リバースジェネティクスによるウイルス弱毒化の解析、動物モデル系の改良を行い、治療法・予防法につながる基礎研究の成果が得られた。これらの研究を発展させ、有効な治療法・予防法を開発したい。

また、対象とするウイルスでも、アレナウイルス (ラッサ、南米アレナウイルス)、ハンタウイルスの様に遺伝的多様性により遺伝子検出法で検出できない株が問題になるウイルスや、昨年出現した新種のエボラウイルスの様に、新型や新興ウイルス感染症発生時のウイルス検出に極めて有用な PCR 用プライマー設計アルゴリズムが開発された。来年度は HPS ウイル群や南米アレナウイルス群に有用なプライマーを設計し、整備する予定である。

E. 結論

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のため、対象ウイルスの遺伝子検出法、抗原検出

法、抗体検出法の整備を進め、これまで未整備の診断法の整備が進展した。新型ウイルスや新興ウイルスに対応可能な遺伝子検出法に著しい進展が見られた。また、いくつかのウイルスで予防法・治療法につながる成果が得られた。

F. 健康危険情報

2007年にウガンダで流行したエボラ出血熱は新種のBundibugyoエボラウイルスと同定された。ザンビア、南アで新種アレナウイルスによる出血熱が発生した。南米出血熱でも新種ウイルスが新興しChapareウイルスが同定された。

2008年にはラッサ熱の英国輸入症例、マールブルグ病のオランダ及び米国での初めての輸入症例等が報告されているため、これらの監視が極めて重要な状況となった。クリミア・コンゴ出血熱では、これまで非病原性と考えられたAP92型による患者発生が相次いだ。2007年夏にイタリアに侵入し、300人規模の流行が発生したチクングニヤ熱は、日本でも5例の輸入症例が発生した。チクングニヤ熱は、感染症法では指定外の感染症であるが全国規模での検査体制の整備と監視体制の強化が必要であることから、早期の4類感染症等への指定が必要と考えられる。

G. 研究発表

各研究分担者及び「III. 研究成果の刊行に関する一覧表」に記載した。

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

研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部第一室長）

研究協力者：中内美名、福土秀悦、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 に対するモノクローナル抗体を作製し、その認識エピトープを決定した。これらを用いた抗原検出 ELISA では、モノクローナル抗体の種類により、アルゼンチン出血熱の病原ウイルスである Junin ウイルス特異的に検出できる系と、南米出血熱の病原ウイルス全てを検出できる抗原検出系ができた。代替ウイルス中和試験に用いられる Junin ウイルスのエンベロープ蛋白を持つ増殖欠損型シュードタイプを作製した結果、ラッサウイルス抗体とは交差せず、ウイルス特異抗体を検出できることが分かった。

A. 目的と意義：

南米出血熱（アルゼンチン出血熱、ポリビア出血熱、ベネズエラ出血熱、ブラジル出血熱とポリビアで新興した出血熱の総称）の原因ウイルスである Junin, Machupo, Guanarito, Sabia, Chapare ウイルス（以下 JUNV, MACV, GTOV, SABV, CHPV）は新世界アレナウイルスの B クレードに属する。これらは日本を含む多くの国で 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。南米出血熱は新規に一類感染症に指定された疾患であり、これまで実験室診断系が国内では確立していない。昨年度の研究では、JUNV の主要構造蛋白であ

る核蛋白(NP)を用いた IgG-ELISA 系を開発し評価した。今年度は、JUNV, MACV, GTOV, SABV, CHPV を対象とし、(1)抗体検出系として間接蛍光抗体法(IF)、代替中和試験法の確立、(2)ウイルス検出系として抗原検出 ELISA の確立を目的とする。

B. 材料と方法：

- 1) JUNV NP に対するモノクローナル抗体 (MAb) の作製：

JUNV の NP を発現する組換えバキュロウイルスを感染させた Tn5 細胞より JUNV の組換え NP (rNP) を精製した。これをマウスに免疫し、JUNV rNP に反応する抗体を産生する 6 種のハイブリドマ

が得られた。そのうち、特にウレア存在下でも反応性が良いアビディティの高いと考えられる3種のMABを精製した。精製したMABは、それぞれC6-9、C11-12、E4-2とした。

2) JUNV, MACV, GTOV, SABV, CHPVのrNPに対するポリクローナル抗体の作製:

JUNV rNPと同様に、MACV, GTOV, SABV, CHPVのNP遺伝子を化学合成し、そのrNPを発現する組換えバキュロウイルスをそれぞれ作製し、これらの感染Tn5細胞よりrNPを精製した。精製したrNPをそれぞれ2羽づつのウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を得た。

3) MABの反応性の解析:

上記で得られた3種のMABのJUNV, MACV, GTOV, SABV, CHPVのrNPに対する反応性をそれぞれのrNPを抗原とするIgG-ELISAおよび4)で作製した間接蛍光抗体法により比較した。

4) 間接蛍光抗体法(IF):

JUNV, MACV, GTOV, SABVのNP遺伝子をpKS336 vectorに組み込んだ発現プラスミドを作製し、それぞれヒト由来細胞株HeLa細胞にトランスフェクションした。rNPを発現している細胞を、プラストサイジンを用いてセレクションした。トリプシン処理した細胞をPBSに浮遊して、ガラススライド上にスポット後風乾し、アセトン固定してIF抗原スライドを作製した。

5) MABの認識するエピトープの決定:

1)で作製した3種のMABのエピトープを決定した。大腸菌発現系を用い、GST融合完全長JUNV rNP(アミノ酸1-564)を

発現した。また、N末端1/3(アミノ酸1-235)、中央1/3(アミノ酸225-396)、C末端1/3(アミノ酸384-564)のJUNVの部分rNPもGST融合蛋白として発現した。得られた大腸菌発現組換え蛋白を用いてWestern blotting法によりMABとの反応性を検討したところ、C6-9はC末端1/3に、C11-12, E4-2はN末端1/3に反応した。領域を絞り込むため、さらに欠損させたJUNV rNPを発現したり、合成ペプチドを作製してこれらとの反応性をELISAにより検討した。

6) 抗原検出ELISAの確立:

1)で作製したMABを捕捉抗体として、2)で作製したJUNV-NPに対するウサギ抗血清を検出抗体とする、抗原検出ELISAを構築し、JUNV, MACV, GTOV, SABV, CHPVのrNPを用いて検討した。

7) 水疱性口内炎ウイルス(VSV)シュードウイルスの作製: JUNV, MACV, GTOV, SABV, CHPVの外皮タンパク質(GP)遺伝子をpKS336 vectorに組み込んだ発現プラスミドを作成した。293T細胞に上記のpKS336発現プラスミドをトランスフェクションし、糖蛋白質領域を欠損させたゲノムを持つVSVを感染させ、南米出血熱原因ウイルスのGPを持つVSVシュードウイルスの作製を試みた。なお、このシュードタイプは、一回だけ細胞に感染してマーカー遺伝子を発現するが子孫ウイルスは産生されない。

8) 代替中和試験法の確立: VSV-JUNV GPシュードウイルスを用いて、アルゼンチン出血熱患者血清2検体および非患者血清1検体を用いて中和試験を行った。患者血清は、アルゼンチン出血熱患者血清(ラブラタ大学)、ラッサ熱患者血清

(CDC より分与) を用いた。

C. 結果:

1) JUNV の NP に対する MAb の反応性の解析:

3 種の MAb の JUNV, MACV, GTOV, SABV, CHPV の rNP に対する反応性をそれぞれの rNP を抗原とする IgG-ELISA により比較した結果、C6-9 は JUNV rNP 特異的に反応し、C11-12 は JUNV, MACV, GTOV, SABV, CHPV 全ての rNP に反応し、E4-2 は JUNV rNP に強く反応し、MACV, GTOV, SABV の rNP に反応したが CHPV rNP には反応しなかった。一方、IF でこれらとの反応性を比較した結果、C6-9 と C11-12 では、IgG-ELISA と同じ反応性を示したが、E4-2 は JUNV とのみ反応した。いずれの MAb も LASV rNP には IgG-ELISA, IF いずれの方法でも反応しなかった。

2) IF 抗原スライドの作製と反応性:

ウサギポリクローナル抗体及び抗ウサギ IgG(H+L)-FITC 抗体を用いて染色したところ、JUNV, MACV, GTOV, SABV の IF スライド上の NP 抗原は、それぞれの NP に対する抗ウサギ血清により検出できた。今後、同様に CHPV の NP 抗原 IF スライドも作製する予定である。

3) MAb の認識するエピトープ:

MAbs の認識するエピトープを各種 GST 融合部分 JUNV NP との反応性で検討した結果、E4-2 は KEVDRLMS を含む領域に反応した。C6-9 と C11-12 に関しては、1 アミノ酸毎ずらした 10 アミノ酸の合成ペプチドを用いて MAb の JUNV の完全長 rNP に対する反応の阻害実験を ELISA 法により行った結果、C6-9 は

PPSLLFLP を含むペプチドで反応が阻害され、C11-12 は WTQSLR を含むペプチドで反応が阻害された。以上の結果から、C6-9 の認識するエピトープはアミノ酸領域 551-558 の PPSLLFLP、C11-12 のエピトープはアミノ酸領域 12-17 の WTQSLR、E4-2 のエピトープはアミノ酸領域 72-79 の KEVDRLMS と決定された(図 1)。

4) 抗原検出 ELISA の確立:

JUNV 特異的な MAb C6-9 を補足抗体として ELISA プレートにコートした場合、JUNV rNP を特異的に検出した。一方、他の南米アレナウイルスと交叉する MAb C11-12, E4-2 を用いた場合、JUNV, MACV, GTOV, SABV, CHPV の全ての rNP を検出した(図 2)。いずれの MAb を用いた場合も、LASV rNP は検出しなかった。今後、患者血清や、感染動物血清などを用いて精査する予定である。

5) 水疱性口内炎ウイルス(VSV)シュードウイルスの作製と代替え中和試験法の検討:

南米出血熱の原因ウイルスは、感染症法で BSL4 病原体に指定されているため生ウイルスを用いた中和試験ができない。そこで、各種ウイルスの VSV シュードタイプの作製を試みた結果、JUNV と SABV で高力価のシュードタイプができた。他の、MACV, GTOV, CHPV に関しては検討中である。JUNV と既に作製済みの LASV のシュードタイプを用いてそれぞれの回復期患者血清を用いて代替え中和試験を行なった結果、それぞれのシュードタイプは、特異的に中和され、両者に交叉は認められなかった。

D. 考察:

JUNV, MACV, GTOV, SABV, CHPV は、

アレナウイルス科の新世界アレナウイルスグループの B クレードに属する、2 分節からなる一本鎖のアンピセンス鎖 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。ウイルスはそれぞれ固有の野生齧歯類を宿主動物とし、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 (AHF) は、毎年、穀物収穫期に流行し、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、他の南米出血熱と比べて高いと考えられる。

昨年度は、JUNV-NP の組換え蛋白を用いた IgG-ELISA の有用性を AHF 患者血清を用いて評価した。今年度は、組換え NP を発現する HeLa 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したため、今後患者血清等を用いて抗体検出法としての有用性の評価と、それぞれのウイルスでの抗原性の交叉性等を検討したい。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、対象とする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の確立をめざしている。今年度は、JUNV と SABV でシュードタイプが作製され、特に JUNV では患者血清を用いて高感度な代替え中和法であることが確認できた。また、旧世界アレナウイルスである LASV とは交叉中和しないことも確認できた。

一方、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。研究分担者の遠藤大二教授らにより、これらのウイルスにも有用なプライマー予測アルゴリズムがかな

り改善されたことから、来年度は南米出血熱の病原ウイルスを広く検出できる RT-PCR の確立をめざす。一方、ウイルスの変異の影響を受け難い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、その認識するエピトープを決定した。その結果、JUNV, MACV, GTOV, SABV, CHPV 全てに反応する MAb C11-12 の認識エピトープは、NP のアミノ酸 12-17 の 6 残基をエピトープとし、南米出血熱の原因ウイルス全てに完全に保存されていた。一方、MAb E4-2 は、アミノ酸 72-79 の 8 残基をエピトープとし JUNV, MACV, GTOV では完全に保存され、SABV とは 1 残基の相違が、CHPV とは 3 残基の相違が認められた。この結果とそれぞれのウイルスに対する ELISA での反応性は一致した。MAb C6-9 は、JUNV NP ノ C 末端のアミノ酸 551-558 の 8 残基をエピトープとするが、このエピトープ相同部位は MACV, GTOV, SABV, CHPV とは異なるため、JUNV 特異的に反応することが明らかとなった。これらによる抗原検出 ELISA では、高感度に対象ウイルス NP を検出できた。今後、感染価の明らかな対象ウイルスを用いて抗原検出 ELISA の有用性を検討したい。

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 に対する単クローン抗体を作製し、これらを用いた抗原検出 ELSIA 法を開発した。単クローン抗体の種類により、アルゼンチン出血熱の病原ウイルスである Junin ウイルスのみ検出できる系と南米出血熱の病原ウイルス全てを検出できる系ができた。代替えウ

ウイルス中和試験に用いられる Junin ウイルスのエンベロープ蛋白を持つ増殖欠損型シュードタイプを作製した結果、ラッサウイルス抗体とは交叉せず、ウイルス特異抗体を検出できることが分かった。

F. 健康危険情報

ポリビアで、新世界アレナウイルスの新興ウイルスによる出血熱患者が発生し、サビアウイルスに比較的近縁なウイルスであることが明らかとなった。ウイルスは、Chapare ウイルスと命名された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakai K, Ueno Y, Ueda S, Yada K, Fukushima S, Saijo M, Kurane I, Mutoh K, Yoshioka K, Nakamura M, Takehara K, Morikawa S, Mizutani T. : Novel reovirus isolation from an Ostrich (*Struthio camelus*) in Japan. *Vet Microbiol.*, 134: 227-32 2009
2. Yamao T, Eshita Y, Kihara Y, Satho T, Kuroda M, Sekizuka T, Nishimura M, Sakai K, Watanabe S, Akashi H, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Miyata T, Sakata A, Hosokawa M, Nakashima M, Kashige N, Miake F, Fukushima S, Nakauchi M, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. : Novel virus discovery in field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). *Arch Virol.*, 154(1):153-8, 2008.
3. Saijo M, Morikawa S, and Kurane I. : Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics.

Expert Opin. Med. Diagn. 2(10): 1151-1171, 2008

4. Ure AE, Ghiringhelli PD, Possee RD, Morikawa S, Romanowski V.: Argentine hemorrhagic fever diagnostic test based on recombinant Junin virus N protein. *J Med Virol.* 2008 Dec;80(12):2127-33.
5. Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K, Maejima M, Fukushi S, Morikawa S, Taguchi F. : Entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein. *J Virol.* 2008 Dec;82(23):11985-91.
6. Takimoto K, Taharaguchi M, Morikawa S, Ike F, Yamada YK. : Detection of the antibody to lymphocytic choriomeningitis virus in sera of laboratory rodents infected with viruses of laboratory and newly isolated strains by ELISA using purified recombinant nucleoprotein. *Exp Anim.* 2008 Jul;57(4):357-65.
7. Watanabe S, Mizutani T, Sakai K, Kato K, Tohya Y, Fukushima S, Saijo M, Yoshikawa Y, Kurane I, Morikawa S, Akashi H. : Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). *J Clin Virol.* 2008 Sep;43(1):56-9.
8. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushima S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. : Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse

- alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol.* 2008 Jun; 172 (6):1625-37.
9. Ami Y, Nagata N, Shirato K, Watanabe R, Iwata N, Nakagaki K, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S, Taguchi F. : Co-infection of respiratory bacterium with severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Microbiol Immunol.* 2008 Feb; 52 (2):118-27.
10. 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, 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.* 2008 Mar;61(2):140-2.
11. 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.* 2008 Feb;14(2):347-9.
12. 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.* 2008; 153(2):303-14.
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) 中内美名・福士秀悦・酒井宏治・水谷哲也・緒方もも子・倉根一郎・西條政幸・Victor Romanowski・森川茂「南米出血熱の実験室診断法の開発」、第56回日本ウイルス学会学術集会、2P047、岡山、2008年10月