

200931003A

厚生労働科学研究費補助金

平成21年度

新型インフルエンザ等新興・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21年度 総括・分担研究報告書

平成22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21年度

新型インフルエンザ等新興・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21年度 総括・分担研究報告書

平成22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と新興ウイルス感染症対策	9
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	23
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	33
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	45
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	63
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	73
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	81
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	91
研究分担者：西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
8. 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—	105
研究分担者：田口文広（国立感染症研究所ウイルス第三部）	
9. 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	113
研究分担者：遠藤大二（酪農学園大学獣医学部放射線学）	
10. 新興・再興ウイルスに感染した臓器を対象としたウイルスの網羅的解析法の開発	143
研究分担者：水谷哲也（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	157

## 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、ニパウイルス脳炎、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、ニパウイルスは、バ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国内への輸入症例が報告されている。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く非常に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、新種・新型のウイルス出現にも迅速に対応可能な体制の整備が望まれる。本研究では、この目的を達成するための研究を平成 19 年度から 21 年度の 3 年間行い以下の成果を得た。これらの成果により、防疫上緊急を要する多くのウイルス性出血熱等に対する診断法の確立や予防・治療法の開発に繋がる研究成果が得られた。

1) ウイルス性出血熱等の病原体診断法の開発・確立：南米出血熱、ニパウイルス感染症、エボラ出血熱、マールブルグ病、ハンタウイルス肺症候群、リフトバレー熱、チクングニア熱、サル痘等の血清診断法や病原診断法（遺伝子増幅法や抗原検出法）を開発した。エボラ出血熱、南米出血熱、ハンタウイルス肺症候群では病原ウイルス種の鑑別が可能な診断法も開発した。

2) 新興・再興ウイルス感染症発生時の迅速なウイルス同定法：新種や新型のウイルス性出血熱に対応可能な degenerated プライマーをデザインできるプログラム CoCoMo を開発した。また、未同定のウイルスが分離された場合に病原ウイルスの遺伝子を特異的プライマーを用いずに増幅して遺伝子配列情報を得ることができる非特異的ウイルス遺伝子増幅法(RDV)の組織・臓器検体への適用を図った。

3) 開発した診断系の応用：ラッサ熱、リフトバレー熱、クリミア・コンゴ出血熱の開発された診断系を用いてナイジェリアでの出血熱ウイルス抗体保有率の調査を実施した。フィリピンのレストンエボラウイルス宿主動物の調査を実施した。

4) 予防・治療に繋がる基礎的研究：ニパウイルスでは、アクセサリ遺伝子欠損ウイル

スをリバーシジェネティックスで作製した結果、弱毒化し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受動免疫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。南米アレナウイルス感染細胞を標的とする VSV シュードタイプを作製した。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。サルの致死性モルビリウイルス感染症の病原ウイルスの同定とサルでの病原性の解析を行った。重症急性呼吸器症候群(SARS)ではパストツレラ菌との共感染等による発症モデル動物系を開発し発症機構の解析等を行った。

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；平成 19- 20 年度）  
水谷哲也（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官；平成 21 年度）  
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／現：日本獣医生命科学大学教授）  
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・チクングニヤ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 eboravirus 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 年以降、日本でも輸入症例が報告されている。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、広範囲に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のには、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

症法の改正により新たに一類感染症に指定された南米出血熱等、これまで診断体制が未整備の感染症もある。

これらのうち診断体制が未整備の感染症の診断法を確立し、ある程度診断体制が整備された感染症においては必要に応じた診断法の改良を目的とする。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。

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。近年、死亡したサルから分離されたモルビリウイルスの病原性・感染性等も明らかにする。

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開発に繋がる基礎研究を行なう。

## B. 研究方法：

### 1) ウイルス性出血熱等の病原体診断法の開発・確立：

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）の病原ウイルス全ての組換え NP 発現バキュロウイルスを作製し、精製 NP 抗原による IgG-ELISA、NP 発現細胞を用いた間接蛍光抗体法を開発した。また代替え中和試験法を開発するために膜蛋白 GP をもつ VSV シュードタイプを作製した。アルゼンチン出血熱では患者血清を用いて、これらの血清診断法を評価した。アルゼンチン出血熱の病原であるフニンウイルスの単特異抗体を作製し、フニンウイルス特異的抗原検出法と南米アレナウイルス共通な抗原検出系を開発した。

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、レストンエボラウイルスの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。レストンエボラウイルスでは、NP 及び GP 特異的抗体検出 ELISA、間接蛍光抗体法を開発した。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。また、マールブルグウイルスを高感度に検出可能な RT-LAMP 法を開発した。

4種のエボラウイルス検出 qRT-PCR は、新種 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。

ハンタウイルス肺症候群では、新世界ネズミ（アメリカネズミ亜科）由来ウイルスに極めて多種のウイルスがあり、その多様性も大きい。一方、腎症候性出血熱の原因ウイルスや病原性不明のハンタウイルスも多く分離同定されている。そこで、そこで、各種ハンタウイルス群別に遺伝子検出可能な RT-PCR 法を開発を

行った。また、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。そこで、北米由来のハンタウイルスの強毒型と弱毒型を鑑別可能な IgG-ELISA 法、新世界ハンタウイルスで HPS の原因ウイルスの大部分を占める Sin Nombre virus (SNV)、Andes virus (ANDV)、Laguna Negra virus (LANV)感染を鑑別可能な IgG-ELISA を開発し、患者血清等を用いて評価した。

ニパウイルス感染症では、組換えウイルス蛋白を用いた IgG-ELISA 法や RT-PCR 法を開発し、実験感染動物検体を用いて評価した。

チクングニア熱では、日本人輸入症例から分離したウイルスにアフリカ株、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 qRT-PCR を確立した。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た。

リフトバレー熱では、組換えウイルス抗原を用いた IgG-ELISA 法、間接蛍光抗体法、VSV シュードタイプウイルスを用いた代替えウイルス中和試験法を開発した。また、抗原検出 ELISA 法も開発した。

## 2) 新興・再興ウイルス感染症発生時の迅速なウイルス同定法：

RT-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はあるが、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 ウイルスであり遺伝子の多様性が大きく遺伝子検出法の障害となることが多い。さらに新種のエボラウイルスや新種のアレナウイルス出血熱等の発生が相次いでいることから、今回開発した遺伝子検出法等でも検出できないウイルス株の

出現が否定できない。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開発、発展させ、それに基づくプライマー設計プログラム (CoCoMo) を作成した。このプログラムによりデザインしたプライマーの有用性を *in silico* で検討し、さらに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。

また、全く未知の新興ウイルス感染症発生時等にウイルスが分離された場合に、特異的プライマーを用いずにウイルス遺伝子を増幅可能な RDV 法を、臨床検体にも適用できるような改良を図った。

## 3) 開発した診断系の応用：

ラッサ熱、リフトバレー熱、クリミア・コンゴ出血熱の開発された診断系等を用いてナイジェリアでの出血熱ウイルス抗体保有率の調査を実施した。また、フィリピンのレストンエボラウイルス宿主動物の調査を実施した。

## 4) 予防・治療に繋がる基礎的研究：

ニパウイルスでは、アクセサリー蛋白欠損ニパウイルスをリバーシジェネティックス系により作製し *in vitro*, *in vivo* の性状解析を行なった。また、N 蛋白と P 蛋白の相互作用の解析を実施した。

マールブルグウイルスのウイルス様粒子出芽過程に関与する細胞因子の解明と Tetherin によるウイルス粒子産生阻害機構の解析を行った。

エボラウイルスの中和活性を持つ単クローン抗体を用いた受動免疫による感染防御効果を、マウス及びモルモット感染実験系で解析した。

南米アレナウイルスでは、ウイルス感染細胞を標的とする VSV-レセプター-シ



ュードタイプの作製を試みた。

サル痘では、感染サル検体を用いて2種類の感染性粒子である intracellular mature virion (IMV) や extracellular enveloped virion (EEV) 関連蛋白に対する個別の抗体応答をプロテオミックにより解析した。痘そうワクチン免疫個体についても解析した。

サルの致死性モルビリウイルス感染症の病原ウイルスの同定とサルでの感染性・病原性を解析した。

重症急性呼吸器症候群では、マウスに馴化していないヒト型の SARS-CoV による小動物発症モデルを開発し発症機構を解析した。

### C. 結果：

#### 1) ウイルス性出血熱等の病原体診断法の開発・確立：

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）と新興ウイルス（チャパレウイルス）による出血熱の病原ウイルス全ての組換え精製 NP 抗原による IgG-ELISA、NP 発現細胞を用いた間接蛍光抗体法を開発した。また膜蛋白 GP をもつ VSV シュードタイプを作製して代替え中和試験法を開発した。アルゼンチン出血熱では患者血清を用いて、これらの血清診断法を評価した結果、診断法として有用であることが確認された。急性期の診断法として有用な診断法であるウイルス抗原検出法を開発した。フニンウイルスと他の南米アレナウイルスとの鑑別も可能となった。

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、レ斯顿エボラウイルスの分泌型 GP を用いた型別抗体検出系を開発し、アフリカ等での宿主動物検索に応用している。レ斯顿エボ

ラウイルスでは、NP 及び GP 特異的抗体検出 ELISA、間接蛍光抗体法を開発し、レ斯顿エボラウイルス感染サル血清を用いて有用性が評価された。4種のエボラウイルスを高感度に検出する RT-PCR 法は、広く用いられている filoA/B プライマーによる遺伝子検出系と同等の感度でさらに広くエボラウイルス種を検出可能であった。マールブルグウイルス検出可能な RT-LAMP 法は、Musoke 系統及び Ravn 系統のいずれのウイルスも高感度で検出可能であった。

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、5種全ての遺伝子を高感度に検出できた。

ハンタウイルスでは、各種ハンタウイルス群別に遺伝子検出可能な RT-PCR 法が開発できた。ハンタウイルス肺症候群 (HPS) では、北米由来のハンタウイルスの強毒型と弱毒型を鑑別可能な IgG-ELISA 法、HPS の原因ウイルスの大部分を占める SNV, ANDV, LANV の感染を鑑別可能な IgG-ELISA 法が確立された。

ニパウイルス感染症では、組換えウイルス蛋白を用いた IgG-ELISA 法や RT-PCR 法による診断法の有用性が明らかとなった。

チクングニア熱では、遺伝子検出 qRT-PCR、IgM 補足 ELISA 及びウイルス中和試験法を確立し、国内の診断体制を整備した。この診断法により、これまで 15 例の輸入症例が確認された。

リフトバレー熱では、組換えウイルス抗原を用いた IgG-ELISA 法、間接蛍光抗体法、VSV シュードタイプウイルスを用いた代替えウイルス中和試験法を開発し血清診断法が確立された。また、抗原検出 ELISA 法は高感度であり急性期の診断に有用であると考えられた。

## 2) 新興・再興ウイルス感染症発生時の迅速なウイルス同定法：

ウイルス種あるいは属ごとに共通する degenerated プライマー設計プログラム (CoCoMo) の開発に成功した。このプログラムによりデザインしたプライマーの有用性を *in silico* で検討し、さらに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結果、新種の Bundibugyo エボラウイルスにも対応可能なプライマーがデザインできた。アレナウイルスでは旧世界アレナ、新世界アレナを広く検出できることが明らかとなった。ハンタウイルスの遺伝子検出プライマーもデザインできた。

また、全く未知の新興ウイルス感染症発生時等にウイルス特異的プライマーを用いずにウイルス遺伝子を増幅可能な RDV 法を、臨床検体にも適用可能な改良を図った。多くの RNA ウイルスゲノムが宿主細胞由来 RNA より大きいことから、感染細胞から抽出した RNA (cDNA) をサイズ分画する方法や、臨床検体等を 0.45  $\mu\text{m}$  フィルター処理後、超遠心や核酸分解酵素の処理によりウイルス核酸を純化させる方法を確立した。これらの方法と RDV 法を組み合わせることによりウイルス感染臓器等からのウイルス遺伝子が検出された。

## 3) 開発した診断系の応用：

ラッサ熱、リフトバレー熱、クリミア・コンゴ出血熱の開発された診断系等を用いてナイジェリアでの出血熱ウイルス抗体保有率の調査を実施した結果、ナイジェリアではラッサウイルスに加えてリフトバレー熱ウイルス抗体保有者が多いことが明らかとなった。また、フィリピンのレストンエボラウイルス宿主動物の

調査を実施した結果、ルーセットオオコウモリ系にのみ抗体陽性個体が見出された。

## 4) 予防・治療に繋がる基礎的研究：

ニパウイルスでは、N 蛋白の P 蛋白との結合に関与する領域として、467~496 番アミノ酸領域以外に、N 末に近い新領域を同定した。リバーシジェネティクス系により作製したアクセサリー蛋白欠損ニパウイルスでは、W 蛋白欠損ウイルスは野生型ウイルスと同等の病原性を示したが、C 蛋白欠損ウイルスでは病原性が消失した。感染ハムスターでの病理組織学的解析から、野生型と W 蛋白欠損ウイルスでは、脳、肺、腎、肝等で広範に病変を認めたのに対し、C 蛋白欠損ウイルスでは、ごく軽度な肺での炎症のみが認められ、ワクチン開発につながる成果が得られた。

マールブルグウイルスの出芽には、宿主因子として Nedd4.1、Tsg101、AP3  $\delta$ 、Vps4B が重要で、MVB 選別系が利用されていることが強く示唆された。Nedd4.1 はエボラウイルスの出芽にも関わる宿主因子であるが、両ウイルスでは Nedd4.1 内の異なる WW ドメインにウイルスマトリックス蛋白が結合した。Tetherin には、マールブルグウイルス粒子産生阻害効果があった。

エボラウイルスの中和活性を持つ単クローン抗体を精製し受動免疫による感染防御効果を、マウス及びモルモット感染実験系で解析した結果、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。

南米アレナウイルスのレセプター蛋白を持つ VSV シュードタイプは、フニン、マチュポ、サビアウイルスの GP 発現細胞に特異的に感染した。

サル痘では、感染サル検体を用いて2種類の感染性粒子である intracellular mature virion (IMV) や extracellular enveloped virion (EEV) 関連蛋白に対する個別の抗体応答をプロテオミックにより解析した結果、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。

サルの致死性モルビリウイルス感染症の病原ウイルスは野生型 CDV であった。分離ウイルスを実験感染したサルでは、最大で末梢血単核球の4%がウイルス感染し、全身の臓器・組織に感染が認められた。

重症急性呼吸器症候群では、マウスに馴化していないヒト型の SARS-CoV による小動物発症モデルを開発し発症機構を解析した。

ヒト型のS蛋白質を持つSARS-CoVが、パスツレラ菌感染マウスで SARS 発症モデルとなることを明らかにした。また、エステラーゼやトリプシン以外に、肺の細胞膜上で発現されているプロテアーゼ TMPRSS2 が SARS-CoV のレセプター結合後の感染過程に関与することも明らかになった。

#### 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、ニパウイルス脳炎、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。その結果、研究対象とした多くのウイルスで血清診断・病原診断の多くが確立できた。

さらに、アレナウイルス（ラッサ、南米出血熱ウイルス等）、ハンタウイルスの様に遺伝的多様性により RT-PCR 等の遺伝子検出法で全てのウイルス株が検出できない可能性のあるウイルスや、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 用プライマー設計プログラム CoCoMo が開発された。このプログラムによりデザインした degenerated primers を整備することにより、通常の RT-PCR や RT-LAMP で検出されないウイルス株も検出できる可能性が示唆された。一方、未知の新興ウイルス感染症発生時には、非特異的遺伝子増幅法によるウイルス遺伝子配列決定法である RDV 法の有用性をさらに発展させるため、臨床検体や臓器・組織からの RDV 法の適用を可能とする基礎的な成果が得られた。これらを総合することにより、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がかなり整備できた。これらの診断法を用いて、ナイジェリアでの疫学調査を実施した結果、当地にはラッサ熱以外にリフトバレー熱感染既往者が高頻度で見出された。フィリピンでのレストンエボラウイルス抗体保有動物の調査では、ルーセットオオコウモリ属のみが抗体陽性であったことから宿主動物であることが示唆された。

ニパウイルスでは、アクセサリ遺伝

子欠損ウイルスが、生ワクチン候補となる可能性が示唆された。エボラウイルスでは、中和抗体による受動免疫効果が確認された。マールブルグウイルスではウイルス粒子出芽過程に関与する細胞因子と阻害効果のある細胞因子が同定され、今後の抗ウイルス薬の標的としての可能性が示唆された。南米アレナウイルス感染細胞を標的とするVSVシュードタイプが作製され、治療法への応用が期待される。サル痘では、感染後のウイルス蛋白への免疫応答が詳細に解析された。野生型CDVがカニクイザルに全身感染することが明らかとなったが、病原性発現機構の解析が期待される。重症急性呼吸器症候群(SARS)では、小動物によるヒト型SARS-CoVによる発症モデル系が開発され、肺でのプロテアーゼの重要性が判明した。これらの成果は、各感染症の予防・治療法開発へと繋がる基礎的知見であると考えられる。

#### 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、抗体検出法がかなり整備された。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も著しい進展が見られた。また、対象とする多くの出血熱ウイルス等で予防法・治療法につながる基礎的な成果が得られた。

#### 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(Lujo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。

2008-2009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型のウイルス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、日本でも輸入症例が発生し、本研究で開発された診断法により15名の輸入症例を診断・同定した。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と新興ウイルス感染症対策

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）

研究要旨：一類感染症に分類される南米出血熱の診断法として、アルゼンチン出血熱の血清診断法と病原診断法を開発した。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、BSL4 病原体に分類されるため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 法、NP 発現細胞株を用いた間接蛍光抗体法を開発し、さらに VSV シュードタイプを用いた代替えウイルス中和試験法を開発し高感度・精度な血清診断法を確立した。また、フニンウイルス特異的な抗原検出 ELISA 法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 ELISA 法を開発した。また、南米出血熱の原因ウイルス GP 発現細胞を標的とする VSV シュードタイプを作製した。一方、CDV 感染により死亡したサルから分離した野生型の H 蛋白をもつウイルス株が、カニクイザルに全身感染症を起こすことが感染実験から明らかとなった。

研究協力者：中内美名、福士秀悦、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）酒井宏治、網康至（同、実験動物管理室）、永田典代、岩田奈織子（同、感染病理部）、池郁生（理化学研究所 BRC 実験動物開発室）、前田健（山口大学獣医微生物学）

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した。組換え蛋白を用いた IgG-ELISA 等の抗体検出法の開発、モノクローナル抗体を用いたウイルス抗原検出法の開発、増殖欠損型シュードタイプを用いる代替えウイルス中和試験法の実験を行った。

一方、近年死亡サルから分離されたイヌディステンパーウイルス (CDV) が、遺伝子解析からアジア 1 型の CDV であること、H 蛋白の SLAM 指向性がイヌ SLAM 指向性であったことから、本 CDV のサルへの感染性・病原性を明らかにすることを目的とした。

B. 材料と方法：

南米出血熱の診断法の開発：

1) 組換え南米アレナウイルス NP：

フニン(JUNV)、マチュポ (MACV)、ガナリト(GTOV)、サビア(SABV)、チャパレ(CHPV) ウイルス NP 組換えバキュロウイルスを作製し、それぞれの感染昆虫細胞からの組換え 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 NP、LCM ウイルス NP、南米アレナウイルス 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 抗原コートウエルの 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) 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 HeLa 細胞に導入し、rNP を発現している細胞を、ブ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。

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、6 種の単クローン抗体を作製した。そのうち、特に高濃度ウレア存在下でも反応性があるアビディティの高いと考えられる 3 種の MAb (C6-9、C11-12、E4-2) を精製した。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。

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（ラプラタ大学）、ラッサ熱患者血清（CDC より分与）を用いた。

9) トランスフェリンレセプター 1 (Tf-rec1) を膜蛋白に持つ VSV シュードタイプの作製：

JUNV のレセプターとして同定された Tf-rec1 を膜蛋白に持つ VSV シュードタイプを上記 6) と同様に作製した。このシュードタイプ(VSV-Tf-rec1)を種々のアレナウイルス GP を発現した 293T 細胞に感染するか否かを指標に、そのレセプター機能を解析した。

CDV のサルへの感染性・病原性：

1) カニクイザルへの CDV 感染実験：

死亡サルから Vero-dogSLAM 細胞（九州大学医学部柳雄介教授より分与された）を用いて分離された CDV(#7 株)を  $1 \times 10^6$  pfu 経鼻感染させた。感染後 15 日間観察し、経時的に体重測定、採血（血液検査及び生化学検査、PBMC からウイルス分離、CD4/CD8、CDV 抗体）、咽頭スワブ&直腸スワブ採取とウイルス分離を行った。感染 15 日目に安楽殺し、各臓器等からのウイルス分離と病理組織学的解析を実施した。

（倫理面からの配慮について）

実験動物を用いる実験に際しては、国立感染症研究所実験動物委員会の承認を得た上で実験を実施した。また、アルゼンチン出血熱患者血清を用いる評価は、アルゼンチン ラプラタ大学 Romanowski 教授との共同研究として実施され、用いられた血清の利用に関するインフォームドコンセントは同大学においてなされ、匿名化されている。

C. 結果：

南米出血熱の診断法の開発：

1) 南米アレナウイルス 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南米アレナウイルス NP の精製は、ラッサウイルスの組換え NP の精製と同様に行い、高度精製抗原を得た。これらを抗原とする IgG-ELISA を開発した。使用抗原量は、それぞれの NP 免疫ウサギ血清を用いて決定した。

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。

各種南米アレナウイルス NP 免疫ウサギ血清では、それぞれのウイルスに全て強い交叉反応性を示した。

3) IF 抗原スライドの作製と反応性：



ウサギ免疫血清び抗ウサギ 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。また、それぞれが交叉反応性を示した。

#### 4) フニンウイルス NP に対する単クローン抗体の認識領域の解析：

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。

#### 5) 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。いずれの MAb を用いた場合も、LASV rNP とは反応しなかった (図 1)。

#### 6) VSV シュードウイルスの作製と代替え中和試験法：

各種南米アレナウイルスの GP を持つ VSV シュードタイプの作製を試みた結果、全てのシュードタイプができた。JUNV と

既に作製済みの LASV のシュードタイプを用いて、アルゼンチン出血熱とラッサ熱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。特にアルゼンチン出血熱回復期患者血清では、非常に高力価の中和抗体が検出された。

#### 7) トランスフェリンレセプター 1 (Tf-rec1) を膜蛋白に持つ VSV シュードタイプの作製：

南米アレナウイルスを含む clade B 新世界アレナウイルスは、Tf-rec1 をレセプターとする。このうち南米出血熱の原因ウイルスである JUNV, MACV, GTOV, SABV は、ヒトの Tf-rec1 (hTf-rec1) にも親和性を持つ。そこで、これらの南米アレナウイルスの GP を持つ細胞に、hTf-rec1 を膜蛋白に持つ VSV シュードタイプ (VSV-Tf-rec1) が感染可能か検討した。その結果、VSV-Tf-rec1 は、293T 細胞に殆ど感染できないが、JUNV, MACV, SABV の GP 発現 293T 細胞へは、非発現 293T 細胞と比べて 200 倍以上の効率で感染した。LASV の GP 発現細胞へは殆ど感染しなかった。

#### CDV のカニクイザルへの感染性・病原性：

カニクイザル 3 頭に CDV (#7 株) を  $1 \times 10^6$  pfu 経鼻感染させた結果、感染 7 日後から咽頭ぬぐいや直腸拭いからウイルスが分離された。感染 11-14 日後に一過性の下痢が認められた。末梢血中のウイルス感染細胞は感染 3 日目から検出され、感染 7 日から 10 日後には末梢血単核球の 0.5-4% がウイルス感染していた。感染 15 日後には感染細胞率は低下した。血中抗体は感染 10 日後から検出された。感染 15 日後に安楽殺し解析した結果、3 頭とも末梢血単核球からウイルスが検出された。血中抗体価が高かった 1

頭は、気管・胃・空回腸にのみウイルスが検出されたが、抗体応答の低かった2頭では、気管・リンパ節・胸腺・脾臓・扁桃・消化器系全域からウイルスが検出され、うち1頭からは肺・肝臓・腎臓・脊髄・髄液からもウイルスが検出された。これら2頭では、細気管支上皮・胃の粘膜上皮にウイルス抗原陽性の巨細胞が認められ、体表リンパ節・肺・腸管のリンパ装置のリンパ球、樹状細胞様細胞がウイルス抗原陽性であった。リンパ装置においてはリンパ球の脱落が見られた。

#### D. 考察：

感染症法で南米出血熱の原因ウイルスとして特定1種病原体等に指定されているのは、フニン、マチュポ、ガナリト、サビアウイルスの4種であるが、これに加えて近年新種のチャパレウイルスが分離された。いずれも新世界アレナウイルス科のB cladeに分類されるウイルスで、構造蛋白質には、GPC(発現後G1, G2に開裂), NP, L, Z蛋白質があり、最も多量に含まれるのが核蛋白質NPである。ウイルスは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。南米出血熱の1つであるアルゼンチン出血熱は、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、他の南米出血熱のボリビア出血熱、ベネズエラ出血熱、ブラジル出血熱等と比べて高い。

本研究では、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。また、組換えNPを発現するHeLa細胞株を樹立して、感染蛍光抗体法用の抗原を作製した。最も信頼度の高い血清診断法はウイルス中和試験による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ウイルス中和試験を開発した。アルゼンチン出血熱回復期血清では、極めて高い中和抗体が検出され、さらにラッサウイルスなどとは交叉しないことから、有用な血清診断法である。

アレナウイルスは、遺伝子変異が非常に多くRT-PCR法で検出できないウイルス株が容易に出現することから、研究分担者の遠藤大二教授が開発したプライマー作製支援プログラムにより有用なプライマーがデザインされると考えられる。一方、変異の無いエピトープを認識する抗原検出法は病原診断上必須である。そこで、フニンウイルスNPを認識するアビディティーの高い単クローン抗体を作製し、抗原検出ELISA法を開発した。用いる抗体種により、フニンウイルス特異的なものと南米アレナウイルス共通な抗原検出系が開発された。一方、南米出血熱の原因ウイルスはTf-rec1をレセプターとする。そこでウイルス感染細胞を標的とするVSVシュードタイプを開発した。hTf-rec1を膜蛋白に持つVSVシュードタイプは、通常の細胞には殆ど感染しないが、JUNV, MACV, SABVのGP発現293T細胞へは、非発現293T細胞と比べて200倍以上の効率で感染した。これらの知見は患者のウイルス感染細胞を標的とする抗ウイルス治療法の開発に有用と考えられる。

一方、CDV感染により死亡したカニクイザルから分離されたウイルスは、アジア2型であり、ヒト型SLAMに馴化していない野生型H蛋白を持っていた。そこで、この分離ウイルスのカニクイザルでの感染性・病原性を実験感染により解析した結果、死亡しなかったものの全身感染することが明らかとなった。本分離ウイルスはイヌへの病原性が高いことから野生型CDVによる多種動物への感染に留意する必要がある。今後、弱毒株やワクチン株などのキメラ

ウイルスなどをリバーシジェネティックスにより作製してより詳細に病原性やヒトへの感染リスクに関して解析する必要がある。

#### E. 結論

一類感染症に分類される南米出血熱の1つであるアルゼンチン出血熱の血清診断法、病原診断法を開発した。また、治療法開発につながるウイルス感染細胞を標的とするVSVシュードタイプを作製した。一方、CDV感染により死亡したサルから分離した野生型のH蛋白をもつウイルス株が、カニクイザルに全身感染症を起こすことが感染実験から明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

ボリビアで発生した新興ウイルス性出血熱の原因ウイルス (Chapare ウイルス) が同定された (2008)。アフリカで新興ウイルス性出血熱が発生し原因ウイルス (Lujo ウイルス) が同定された (2009)。米国で初めてのマールブルグ熱患者発生 (2009)。英国でラッサ熱患者発生 (2009)。新型エボラウイルス (Bundibugyo) によるエボラ出血熱発生 (2007-8)。フィリピンでレストンエボラウイルスの豚への大規模な感染の確認 (2008-9)。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I. :Diagnostic systems for viral hemorrhagic fevers and emerging viral infections prepared in the National Institute of Infectious Diseases. *J. Disaster Res.* 4:315-321, 2009
2. Nakauchi M, Fukushi S, Saijo M, Mizutani T, Ure AE, Romanowski V, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. *Clin Vaccine Immunol.* 2009 Aug; 16 (8) : 1132-8
3. Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in non-human primates. *J Gen Virol.* 2009 Sep;90(Pt 9):2266-71.
4. Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Ogata M, Nakauchi M, Kurane I, Mizuguchi M, Morikawa S. Loop-mediated isothermal amplification- based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *J Med Virol.* 2009 Jun;81(6):1102-8. 7.
5. Saito T, Fujii T, Kanatani Y, Saijo M, Morikawa S, Yokote H, Takeuchi T, Kuwabara N. Clinical and immunological response to attenuated tissue-cultured smallpox vaccine LC16m8. *JAMA.* 2009 Mar 11;301(10):1025-33.
6. 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, Fukushi 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.* 2009; 154(1):153-8.
7. 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.* 14. 2008 Dec;80(12):2127-33.
8. Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I.: Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics. *Exp. Opin. Med. Diagnost.* 2:1155-1171, 2008
  9. Sakai K, Ueno Y, Ueda S, Yada K, Fukushi 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.* 2009 Mar 2;134(3-4):227-32.
  10. 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.
  11. 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.
  12. Watanabe S, Mizutani T, Sakai K, Kato K, Tohya Y, Fukushi 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.
  13. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi 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.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 福士秀悦, 平井明香, 新倉綾, 山田靖子, 前田健, 吉川泰弘, 横山勝, 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 発現細胞を用いた SARS コロナウイルスの感染性の解析. *獣医畜産新報* 61:199-201, 2008
  19. 北本憲利, 森川茂, 西條政幸, 加藤陽二, 田中智之: 抗ワクシニアウイルス単クローン抗体のサル痘ウイルスに対する反応性と その有用性. *感染症学雑誌* 82:224-225, 2008
  20. 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