

- virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. *Int J Exp Pathol*. 2007 Dec;88(6):403-14.
21. 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, Fukushima S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in the field. *J Virol Methods*. 2007 Dec;146(1-2):372-4.
 22. Morikawa S, Saijo M, Kurane I. Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007 Sep;30(5-6):375-89.
 23. Fukushima S, Mizutani T, Sakai K, Saijo M, Taguchi F, Yokoyama M, Kurane I, Morikawa S. Amino acid substitutions in the s2 region enhance severe acute respiratory syndrome coronavirus infectivity in rat angiotensin-converting enzyme 2-expressing cells. *J Virol*. 2007 Oct;81(19):10831-4.
 24. Saijo M, Georges-Courbot MC, Marianneau P, Romanowski V, Fukushima S, Mizutani T, Georges AJ, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Development of recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 Sep; 14(9):1182-9.
 25. Morikawa S, Saijo M, Kurane I. Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus (in French: Connaissances actuelles sur la moindre virulence du virus Ebola Reston). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007 Sep;30(5-6):391-8.
 26. Ike F, Bourgade F, Ohsawa K, Sato H, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Takimoto K, Yamada YK, Jaubert J, Berard M, Nakata H, Hiraiwa N, Mekada K, Takakura A, Itoh T, Obata Y, Yoshiki A, Montagnetelli X. Lymphocytic choriomeningitis infection undetected by dirty-bedding sentinel monitoring and revealed after embryo transfer of an inbred strain derived from wild mice. *Comp Med*. 2007 Jun;57(3):272-81.
 27. Sakai K, Mizutani T, Fukushima S, Saijo M, Endoh D, Kurane I, Takehara K, Morikawa S. An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences of avian RNA viruses. *Arch Virol*. 2007;152(9):1763-5.
 28. Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushima S, Saijo M, Sakai K, Lim CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, Nishimura H. Rapid genome sequencing of RNA viruses. *Emerg Infect Dis*. 2007 Feb; 13(2):322-4.
 29. Ikejiri M, Saijo M, Morikawa S, Fukushima S, Mizutani T, Kurane I, Maruyama T. Synthesis and biological evaluation of nucleoside analogues having 6- chloropurine as anti-SARS-CoV agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007 May 1; 17(9):2470-3.
 30. Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Morikawa S, Yokosawa H, 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*. 2007 May;81(9):4895-9.
 31. 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 JS, Chen PJ, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M,

- Sakatani M. Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. *Vaccine*. 2007 Apr 20;25(16):3038-40.
32. Mizutani T, Fukushi S, Kenri T, Sasaki Y, Ishii K, Endoh D, Zamoto A, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *Arch Virol*. 2007;152(5):1019-25.
33. Yu F, Le MQ, Inoue S, Hasebe F, Parquet Mdel C, Morikawa S, Morita K. Recombinant 4. truncated nucleocapsid protein as antigen in a novel immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 5. Feb;14(2):146-9.
34. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Yokoyama M, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Morikawa S, Sata T. Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome (SARS) in F344 rats infected with SARS coronavirus. *J Virol*. 6. 2007 Feb;81(4):1848-57.
2. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし
3. 学会発表
1. 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 塩田智之, 飯塚愛恵, 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, 倉根一郎, 佐多徹太郎, 倉田毅, 森川茂. コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルスの臓器親和性と病原性. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
2. 佐山勇輔, 福士秀悦, 斎藤麻理子, 飯塚愛恵, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 鈴木陽, 神垣太郎, 玉記雷太, 倉根一郎, 押谷仁, 森川茂. フィリピンのレストンエボラウイルス感染症のウイルス遺伝子解析と感染状況の実態調査. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
3. 岩田奈織子, 永田典代, 辻隆裕, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 横田恭子, 水谷哲也, 西條政幸, 森川茂, 佐多徹太郎. SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の免疫効果と副作用について. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
4. 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, Austin Ure, Victor Romanowski, 森川茂. 南米出血熱の実験室診断法の開発. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
5. 水谷哲也, 前田健, 渡辺俊平, 久和茂, 吉川泰弘, 明石博臣, 中内美名, 酒井宏治, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. ウイルスの網羅的検出法 (RDV 法 ver 3.1) を用いたコウモリ由来新規 β ヘルペスウイルスの同定 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
6. 飯塚愛恵, 塩田智之, 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 水口雅, 森川茂. 痘そうワクチン LC16m8 株の温度感受性に関する解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
7. 森川茂, 福士秀悦, 酒井宏治, 永田典代, 長谷川秀樹, 松井珠乃, 水谷哲也, 平井理香, 網康至, 緒方もも子, 西條政幸, 山田靖子, 岡部信彦, 佐多徹太郎, 倉根一郎. カニクイザルの致死性イヌジステンパーウイルス感染事例の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
8. 塩田智之, 飯塚愛恵, 森川茂, 倉根一郎, 水口雅, 西條政幸. 293T 細胞を用いた単純ヘルペスウイルスならびに水痘帯状疱疹ウイルス組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用. 第 57 回日本ウ

- イルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
9. 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. SARS-CoV 感染動物における宿主 Th1/Th2 バランスと重症化の関連. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
 10. 酒井宏治, 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 松井珠乃, 網康至, 平井理香, 須崎百合子, 水谷哲也, 福士秀悦, 緒方もも子. 西條政幸, 藤本嗣人, 山田靖子, 岡部信彦, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 森川茂. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
 11. 西條政幸, 網至康, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 新村靖彦. 横手公幸, 飯塚愛恵, 塩田智之, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂. 痘そうワクチン LC16m8 および Lister 株免疫時における IMV および EEV 蛋白に対する抗体応答とサル痘予防効果. 第 13 回日本ワクチン学会学術総会, 札幌 (2009.09)
 12. Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Iizuka, I., Shiota, T., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Pathology of monkeypox in nonhuman primates leading to the difference in virulence between Gongo Basin and West African strains. 43rd Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program and Special Minisymposium on enterovirus 71, Philadelphia, PA (2009.07)
 13. Bukbuk, D.N., Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., George, A., Shuetsu, F., Mizutani, T., Kurata, T., Kurane, I., Morkawa, S.: Recombinant nucleocapsid protein-based diagnosis of and seroepidemiological study on Lassa fever. The 109th ASM General Meeting, Philadelphia, PA (2009.05)
 14. 塩田智之、森川茂、飯塚愛恵、倉根一郎、西條政幸: 293T 細胞を用いた HSV-1 組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性

試験への応用. 第 19 回日本抗ウイルス療法研究会, 東京 (2009.6)

図1. 組換えArenavirus NPを用いた抗原検出ELISA

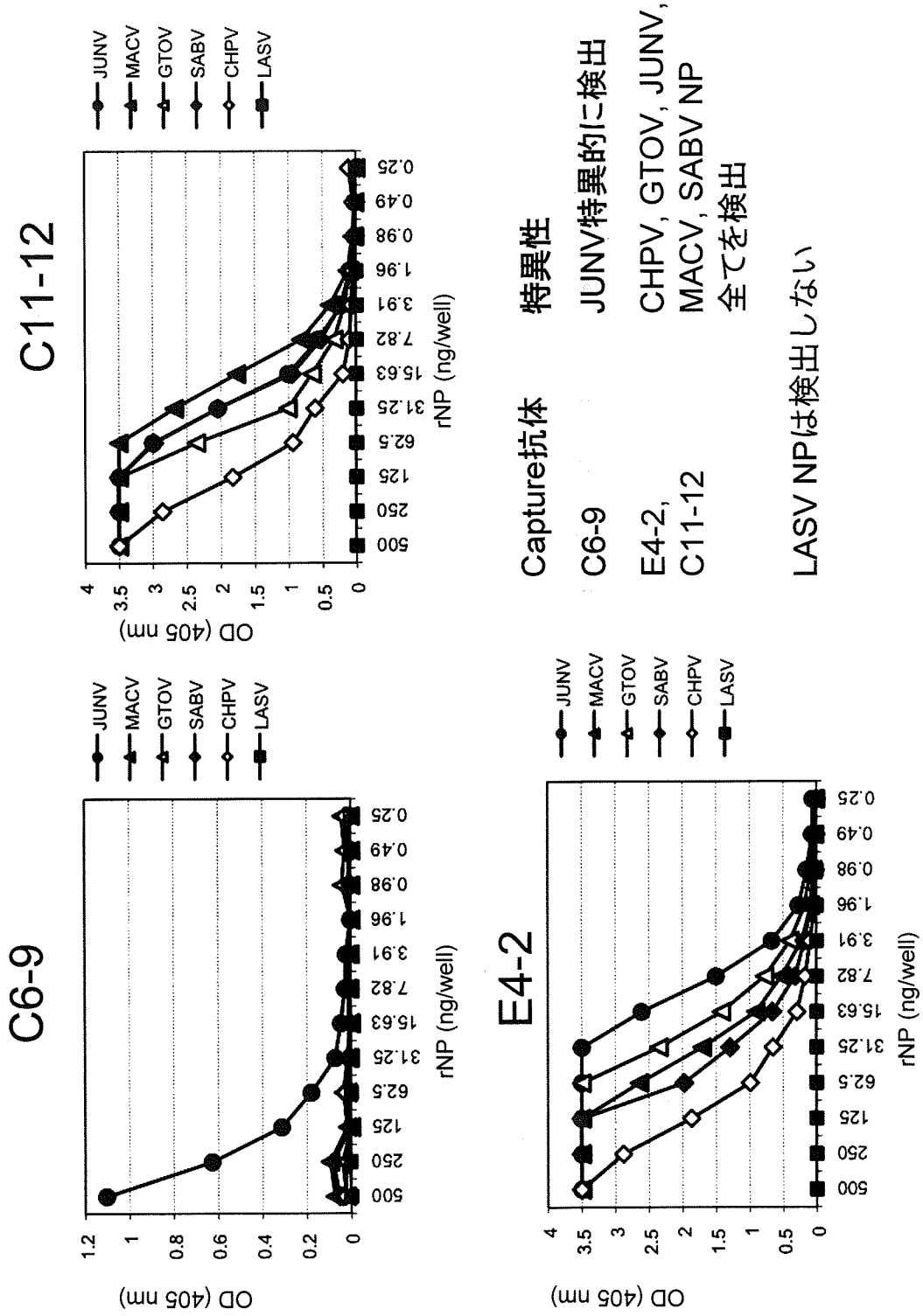
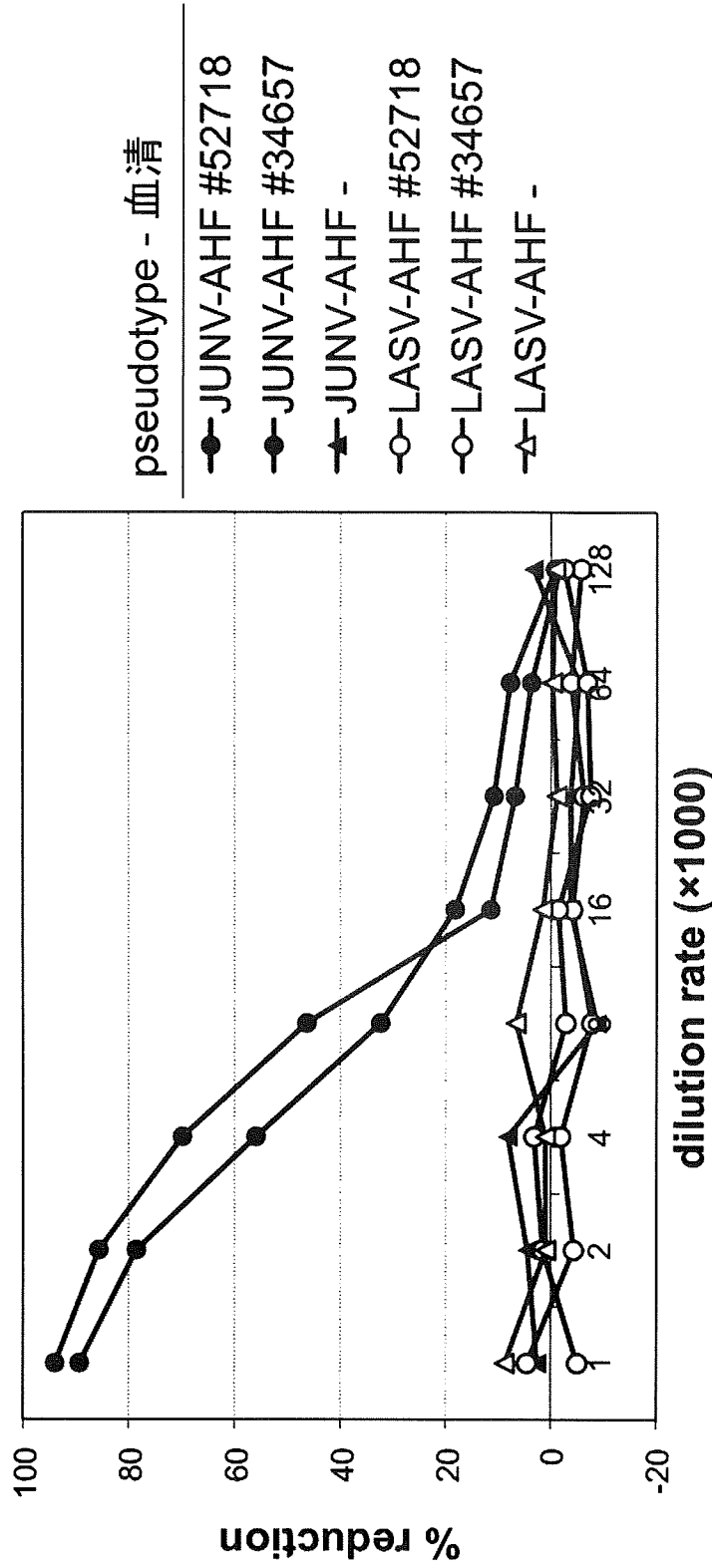


図2. 患者血清を用いた代替え中和試験の結果



- VSV-JUNV pseudotypeはアルゼンチン出血熱(AHF)患者の血清では中和されるが、非患者血清やラッサ熱患者血清では中和されない。
- VSV-LASV pseudotypeはAHF患者血清では中和されない(ラッサ熱患者血清では中和される)。

図3. 南米アレンウイルスGPを標的とするVSVシールドタイプの感染

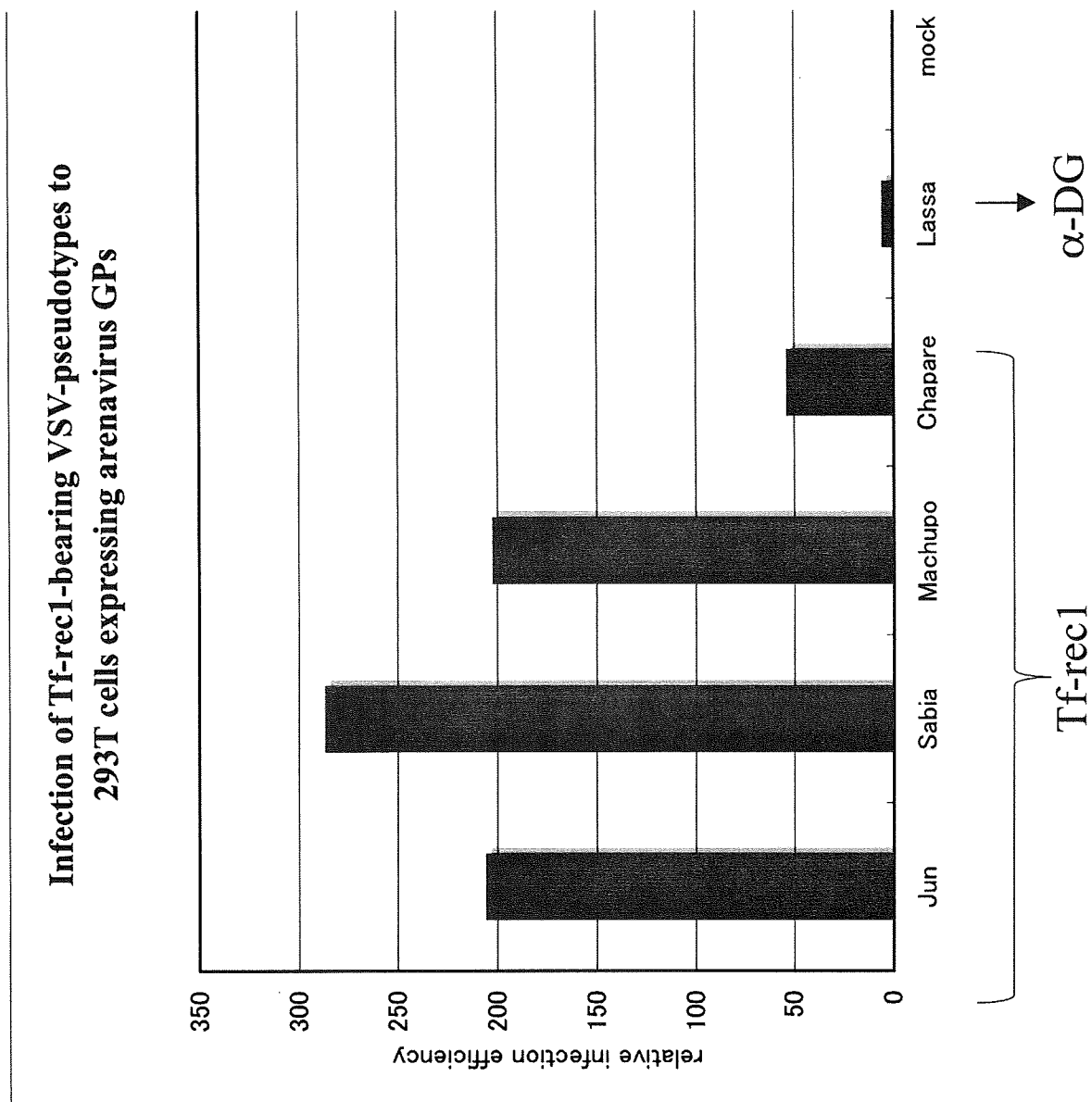


表1. 3頭のCDV感染カニクイザルの臓器からウイルス分離（接種15日後）

臓器	1	2	3
皮膚	-	-	-
気管	+	+	+
肺	-	-	+
肝	-	-	+
腎	-	-	+
尿	-	-	-
胃	+	+	+
空腸	+	-	+
回腸	+	+	+
盲腸	-	+	+
結腸	-	+	+
直腸	-	+	+
浅頸リンパ節	-	+	+
腸根リンパ節	-	+	+
胸腺	NT	+	+
脾	-	+	+
扁桃	-	+	+
大脳	-	-	-
小脳	-	-	-
脊髄	-	-	+
髄液	-	-	+

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

研究分担者：甲斐知恵子（東京大学医科学研究所教授）

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であり、人から人への感染も起こっている。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。本研究により、以下の成果を得た。1) 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検出法として、RT-PCR法が有効であることを示した。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、ELISA法による抗体価測定法も確立した。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欠損組換えウイルスを作出し、*in vitro*でのIFN応答抑制能を検討した。さらに、動物への感染実験によって病原性に関与するウイルス蛋白を同定した。

研究協力者：米田美佐子（東京大学医科学研究所）

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直接伝播しており、さらに人から人への感染も起きている。我が

国では患者の発生は未だなく、抗体陽性のオオコウモリも見つかっていないが、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。具体的には、ニパウイルスの診断法の開発として、

ウイルス蛋白発現系と抗体の作製、感染動物臓器からのウイルスゲノム検出法および抗体価測定法の確立を目的とした。予防・治療法の開発研究としては、近縁のウイルスで病原性に関与すると推測されているアクセサリー蛋白を欠損する組換えウイルスを我々の開発した reverse genetics 法によって作出し、それらが病原性に関与するかを解析した。さらに、ニパウイルスの増殖制御を目的として、N 蛋白と P 蛋白との相互作用領域の探索も行なった。

B. 研究方法

1) ニパウイルス蛋白発現とポリクローナル抗体の作製

ニパウイルスの N、P、M、G 蛋白抗原を、大腸菌発現系、バキュロウイルス発現系、あるいは培養細胞での発現系を用いて発現、精製したのち、ウサギに免疫してポリクローナル抗体を作製した。

2) RT-PCR によるウイルスゲノム検出法の確立

ハムスターにニパウイルスを接種後、経時的に採取した臓器の乳剤から ISOGEN を用いて RNA を抽出した。この RNA を template にして、N 蛋白遺伝子領域において設計したプライマーを用いて RT-PCR を行なった。

3) 抗体測定法の確立

1)で発現させたニパウイルスの N 蛋白を精製して抗原とし、ELISA 法により抗体価の測定を行なった。

4) アクセサリー蛋白欠損ニパウイルスの *in vitro* での性状解析

ニパウイルスの 3 つのアクセサリー蛋白遺伝子をそれぞれ欠損させたウイルスを作

出した。

それら 3 つの組換えウイルスの Vero および 293 細胞での増殖能を、非欠損ウイルスと比較した。それぞれのウイルスを $\text{moi}=0.01$ で細胞に接種した後、1 日後から毎日、細胞と上清を合わせて回収し、遠心後の上清のウイルス力価を測定した。

また、アクセサリー蛋白欠損ウイルス感染細胞における IFN 応答についても解析した。293T 細胞に ISRE(IFN-stimulated response element)に luciferase 遺伝子を接続したプラスミドをトランスフェクションし、24 時間後に組換えウイルスを感染させた。その 6 時間後に type I IFN を培養液中に添加し、さらに 24 時間培養後 luciferase 活性を測定した。

5) アクセサリー蛋白欠損ニパウイルスの *in vivo* での病原性の解析

アクセサリー蛋白欠損ウイルスを $1\sim 100,000$ pfu ずつハムスター腹腔内接種し、接種後 30 日目まで生死を観察した。また、低力価の各ウイルスをハムスターに接種し、8 日目に安楽殺して臓器を採取し病理組織学的解析を行った。

6) ニパウイルス N 蛋白の P 蛋白相互作用領域の解明

非凝集性変異を導入した ECFP と、mRFP を連結した N,P 発現ベクターを構築した。これらの培養細胞に共発現させ N、P 蛋白の相互作用を確認した。さらに、N 蛋白の deletion mutant を作製して同様の実験を行ない、相互作用に重要な領域を特定した。

C. 研究結果

1) ニパウイルス蛋白発現とポリクローナル抗体の作製

ニパウイルスの N、P、M、G 蛋白に対す

るウサギポリクローナル抗体が作製できた。これらの抗体は、感染臓器や細胞に特異的反応性を示し、ウイルス抗原の検出に有用であることが示された。また合成ペプチドを用いて、アクセサリー蛋白 V、C、W に対するポリクローナル抗体も作製できた。

2) RT-PCR によるウイルスゲノム検出法の確立

ニパウイルス感染 6、8 日目のhamster から採取した脳、腎臓から RT-PCR によりウイルスゲノムの検出に成功した(Fig. 1)。

3) 抗体測定法の確立

ニパウイルスの N 蛋白を精製して抗原とし、ELISA 法により抗体価が測定できた。

3) アクセサリー蛋白欠損ニパウイルスの *in vitro* での性状解析

アクセサリー蛋白欠損ウイルスを作出することに成功した。まず、これら組換えウイルスの培養細胞での増殖を、親株と比較した。293 細胞および Vero 細胞において、C 蛋白を欠損させたウイルスは、親株と比較して増殖が抑えられていた。W 蛋白欠損ウイルスは、親株と同様の増殖を示した。V 蛋白欠損ウイルスでは、293 細胞においては親株と同等の増殖を示したが、Vero 細胞ではやや増殖が抑えられた。

培養細胞における IFN 応答抑制能をみると、まず親株では luciferase の活性が強く抑制されており、ニパウイルスの感染により IFN シグナル伝達抑制が起こることが確かめられた。アクセサリー蛋白を感染させた場合、全てのウイルス感染細胞において luciferase の活性がほぼ完全に抑えられており、親株感染の場合と同様の結果となった (Fig. 2)。

4) アクセサリー蛋白欠損ニパウイルスの *in vivo* での病原性の解析

アクセサリー蛋白欠損組換えウイルスを 1~100,000 pfu、各タイター 10 匹ずつのhamster に接種し、致死率を見た結果、W 蛋白欠損ウイルスを接種した場合には、親株と同じ病原性を示した。しかし、C 蛋白欠損ウイルス接種動物では、臨床症状は全く認められず、全例生存した。1,000 pfu のウイルスを接種し、8 日後に採取した臓器を病理組織学的に解析すると、W 蛋白欠損ウイルスを接種したhamster では、親株を接種した場合と同様に、脳、肺、腎、肝などで広範に病変を認めた。しかし、C 蛋白欠損ウイルスを接種したhamster においては、肺でやや炎症が認められたが、その程度はごく軽度であった。

5) ニパウイルス N 蛋白の P 蛋白相互作用領域の解明

蛍光蛋白タグを融合させた N、P 蛋白の発現様式は、タグを付けていない N、P 蛋白の免疫染色で見られるそれと一致した。N、P 蛋白を共発現させると、細胞内でドット状に共局在することが確認された(Fig.3)。そこで 7 種の N 蛋白 deletion mutant を作製し、同様に P 蛋白と共発現させ細胞内での挙動を観察したところ、既に報告されている 467~496 番アミノ酸領域以外に、P 蛋白との結合に関与する N 末に近い新領域を同定することができた。

D. 考察

ニパウイルスの診断法の開発として、ウイルス遺伝子を RT-PCR 法、抗原蛋白を作製した抗体による染色法により検出する方法を確立した。本方法は、感染動物個体でのウイルス遺伝子および抗原の検出で有用性を確認した。また、ウイルスに対する抗体価測定には ELISA 法を確立できた。これらの抗原および抗体検出法は、ニパウイルス

ス感染症の我が国への侵入を防ぐために有用であると期待される。

ニパウイルスの病原性を規定する遺伝子の特定は、弱毒化ワクチン開発に有用な知見を与える。アクセサリ蛋白は、単独発現系において細胞の IFN 応答や誘導能に関与することが報告されており、病原性への関与が推測されているが、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。本研究で個々のアクセサリ蛋白を欠損させたニパウイルスを作出し、*in vitro* および *in vivo* でのそれらウイルスの性状解析を行なうことにより、実際の感染細胞や個体内でのアクセサリ蛋白の機能を明らかにすることを初めて可能とした。本研究により、各蛋白の欠損による感染培養細胞中での IFN 応答抑制への影響を調べた結果では、V、C、W 蛋白いずれを欠損させたウイルスにおいても、親株と同等の IFN 応答抑制が認められた。すなわち、IFN 応答抑制能を持つアクセサリ蛋白を欠損させることによって、その抑制能が減弱するであろうという事前の予想とは反する結果となった。これは、P 蛋白の IFN 応答抑制能が、アクセサリ蛋白の影響に比べて非常に強いためであろうと考えられた。動物への感染実験の結果、W 蛋白欠損ウイルスは、親株と比較して増殖、病原性とも同じであったことから、病原性には関与していないと考えられた。C 蛋白欠損ウイルスは培養細胞中での増殖能は、親株の 1/10 程度に落ちていること、またハムスターでの病原性は著しく減弱していたことから病原性に関わる蛋白であると同定された。

ニパウイルスの増殖に関わる蛋白の基礎的研究から、N 蛋白の P 蛋白相互作用する新たな領域を同定することができた。この成果はウイルスの増殖抑制を目的とした治療法の開発研究につながると期待される。

E. 結論

ニパウイルスの診断法として、ウイルスゲノムを検出する RT-PCR 法、ウイルス抗原を検出する抗体の作製、血清中抗体価を測定する ELISA 法を確立した。予防・治療法の開発研究として、組換えウイルスを作出し、ウイルス性状解析および動物への感染実験を行なうことにより、病原性に関与するウイルス蛋白として C 蛋白を同定した。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。また、ニパウイルスの増殖に関わるウイルス蛋白領域として、蛍光蛋白タグを用いた新しい方法により、増殖に必須の N 蛋白と P 蛋白との新しい相互作用領域を同定した。これらの成果は、ニパウイルスの侵入防御の診断法として有用であるばかりでなく、予防法および治療法開発につながる有益な基礎的知見を与えたと考えられる。

F. 健康危機情報

マレーシアでは、ニパウイルス脳炎患者の発生はない。バングラディッシュでは近年では毎年患者が発生している。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe, A., Yoneda, M., Ikeda, F., Terao-Muto, Y., Sato, H., Kai, C. CD147/EMMPRIN acts as a functional entry receptor for measles virus on epithelial cells. *J. Virol.*, (in press)
2. Imai, C., Fujita, K., Shimizu, F., Sugai, A., Yoneda, M. and Kai, C. Comparative and mutational analyses of promoter regions of rinderpest virus. *Virology*, 396: 169-177, 2010.
3. Sugai, A., Kooriyama, T., Sato, H., Yoneda,

- M. and Kai, C. Epitope mapping of canine distemper virus phosphoprotein by monoclonal antibodies. *Microbiol Immunol.* 53(12):667-74, 2009.
4. Nishimura, T., Kohara, M., Izumi, K., Kasama, Y., Hirata, Y., Huang, Y., Shuda, M., Mukaidani, C., Takano, T., Tokunaga, Y., Nuriya, H., Satoh, M., Saito, M., Kai, C. and Tsukiyama-Kohara, K. Hepatitis C virus impairs P53 via persistent over-expression of 3 β -hydroxysterol δ 24-reductase. *J. Biol. Chem.*, in press 2009
 5. Saitou, K., Mizumoto, K., Nishimura, T., Kai, C. and Tsukiyama-Kohara, K. Hepatitis C virus core protein facilitates the degradation of Ku70 and reduces DNA-PK activity in hepatocytes. *Virus Res.* 144, 266-271, 2009.
 6. Yasui, F., Kai, C., Kitabatake, M., Inoue, S., Yoneda, M., Yokochi, S., Kase, R., Sekiguchi, S., Morita, K., Hishima, T., Suzuki, H., Karamatsu, K., Yasutomi, Y., Shida, H., Kidokoro, M., Mizuno, K., Matsushima, K. and Kohara, M. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunol.*, 18(9):6337-48, 2008
 7. Takayama, I., Kubo, M., Takenaka, A., Fujita, K., Sugiyama, T., Arai, T., Yoneda, M., Sato, H., Yanai, T. and Kai, C. Pathological and phylogenetic features of prevalent canine distemper viruses in wild Masked palm civets in Japan. *Comp. Immunol. Microb.*, in press, 2008 Sep 5
 8. Terao-Muto, Y., Yoneda, M., Seki, T., Watanabe, A., Tsukiyama-Kohara, K., Fujita, K. and Kai, C. Heparin-like glycosaminoglycans prevent the infection of measles virus in SLAM-negative cell lines. *Antiviral Res.*, 80: 370-376, 2008.
 9. Sato, H., Honma, R., Yoneda, M., Miura, R., Tsukiyama-Kohara, K., Ikeda, F., Seki, T., Watanabe, S., Kai, C. Measles virus induced cell-type specific changes in gene expression. *Virology*, 321-330, 2008.
 10. 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*, 8, 1871-1879, 2008.6.
 11. Inoue, Y., Tsukiyama-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.*, 32: 29-41, 2008.
 12. 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. Epub 2007 May 21
 13. 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.
 14. Kodama, A., Yanai, T., Yomemaru, K.,

- Sakai, H., Massegi, T., Yamada, S., Fukushima, H., Kuraishi, T., Hattori, S. and Kai, C. Acute neuropathogenicity with experimental infection of equine herpesvirus 9 in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *J. Med. Primatol.* 36(6), 335-42. Dec. 2007.
15. Fujita, K., Miura, R., Yoneda, M., Shimizu, F., Sato, H., Muto, Y., Endo, Y., Tsukiyama-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.
16. 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、学会発表
1. Huang, M., Sato, H. Hagiwara, K., Watanabe, A., Ikeda, F., Oyama, M., Yoneda, M. and Kai, C. Analysis of phosphorylation residues on Nipah virus nucleoprotein role of the phosphorylation. Florida, USA, March 9-12, 2009.
2. 高山郁代、佐藤宏樹、甲斐知恵子。麻疹ウイルス N タンパク質のインターフェロンシグナル伝達経路への関与。第 56 回日本ウイルス学会、岡山、2009 年 10 月 25-27 日。
3. 黄明珠、佐藤宏樹、萩原恭二、渡邊彰、池田房子、秦裕子、尾山大明、米田美佐子、甲斐知恵子。ニパウイルスヌクレオ蛋白のリン酸化部位の同定及びリン酸化の意義。第 56 回日本ウイルス学会、岡山、2009 年 10 月 25-27 日。
4. 小見—古谷美央、米田美佐子、池田房子、甲斐知恵子。蛍光融合蛋白を用いたニパウイルス N 蛋白の P 蛋白相互作用領域の解明。第 56 回日本ウイルス学会、岡山、2009 年 10 月 25-27 日。
5. 米田美佐子、佐藤宏樹、藤田賢太郎、寺尾由里、池田房子、小見美央、甲斐知恵子。ニパウイルスアクセサリ蛋白の病原性への関与。第 57 回日本ウイルス学会、東京、2009 年 10 月。
6. Huang, M., Sato, H., Hagiwara, K., Watanabe, A., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Yoneda, M. and Kai, C. Analysis of phosphorylation residues on Nipah virus nucleoprotein. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 8-11, 2009.
7. 甲斐知恵子。ニパウイルス感染症（シンポジウム招待講演）。第 56 回日本実験動物学会、大宮、2009 年 5 月 14-16 日。
8. Kai, C. Molecular determinant of Nipah virus pathogenicity. Symposium: "Emerging Infections: A tribute to the One Medicine, One Health Concept". Manhattan KS, U.S.A. November 13-14, 2008. (Invited speaker)
9. Yoneda, M., Gillaume, V., Sato, H., Georges-Courbot, M-C., Takayama, I., Ikeda, F., Wild, F. and Kai, C. The function of Nipah virus accessory protein

as virulence factors in vivo. XIVth Int.
Cong. Virol. Istanbul, Turkey, August
11-15, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

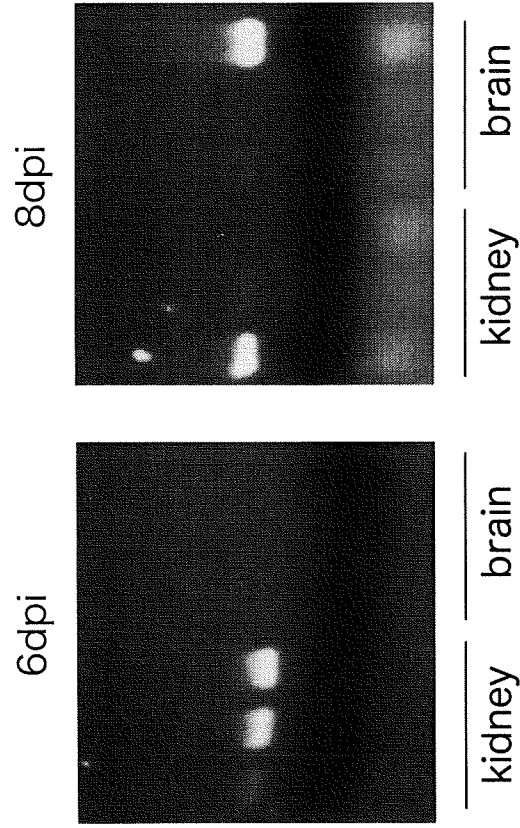


Fig1. ニパウイルス感染ハムスターの腎臓、脳からRNAを抽出し、RT-PCRによりニパウイルス遺伝子を検出することができた。

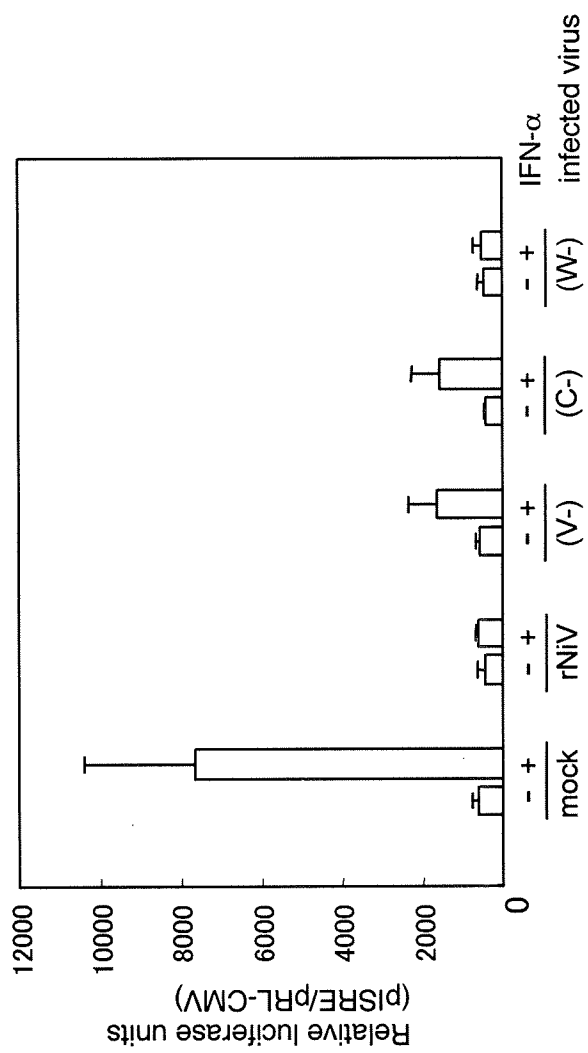
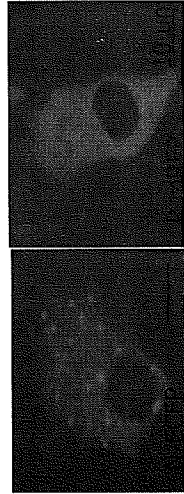


Fig.2 ウイルス非感染細胞では、IFN α に対する応答が見られるが、ニパウイルス感染細胞ではその応答が抑えられている。



single transfection



cotransfection

Fig.3 ニパウイルスのN、P蛋白にECFP、RFPタグを付けてBHK細胞に発現させると、N-ECFPは細胞質内でドットを形成し、P-mRFPは細胞質内に一様に拡散した。N-ECFPとP-mRFPを同時に発現させると、共局在するドットが確認された。

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

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

研究要旨：フィロウイルスによる感染症（エボラおよびマールブルグ出血熱）の診断法開発のために、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、ウイルス抗原検出法開発に資するために、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法の効果を検討した。

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。最近、5 種目のエボラウイルスに分類されるであろう Bundibugyo エボラウイルスがウガンダで発見された（図 1）。

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、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ことが報告されている。さらに近年、霊長類以外の動物の感染が確認され、フィロウイルスの疫学に関する研究は新たな展開をみせている。

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の開発を行った。また、抗ウイルス薬として中和抗体を利用した抗体療法を目指した検討を行った。

B. 研究方法および成果

フィロウイルス遺伝子を検出できる 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

2)。さらに、ザイルウイルスを用いて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(図2)。ザイルエボラ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、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ることを確認した(図3)。本プライマーを用いて、マールブルグウイルス(アンゴラ株)感染患者の血液中のウイルスを効率よく検出できることを確認した(図4)。

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、既知の全てのフィロウイルス種について構築した。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精製し、抗原に用いたELISA法を試みた。それぞれのウイルス種特異抗血清中の抗体を検出したところ、交差反応性が少なく、種特異的抗体を効率的に検出できることが分かった(図5)。さらに、感染サルおよび感染患者血清中のIgG抗体を効率的に検出できることを確認した(図6)。

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。全ての種に共通のエピトープは殆ど発見できなかったが、既知のエボラウイルスそれぞれに特異的なエピトープを発見した(図7)。一方、全ての既知のエボラウイルスの表面糖蛋白質に反応するモノクローナル抗体を得、エボラウイルス種間共通エピトープを発見した(図8)。

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、中和抗

体のみを選別し、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。また、フィロウイルスが細胞侵入に利用する宿主蛋白質の同定を試みた。

C. 考察および結論

これまでは、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。実際に、最近オランダおよびアメリカ合衆国でマールブルグウイルスの輸入感染例が見つかっている。また、新種のエボラウイルスの発見やブタにおけるレストンエボラウイルスの感染は、フィロウイルス感染症対策上、新たな問題を提起した。さらに、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今後も重要な課題である。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Igarashi, M., Ito, K., Yoshida, R., Tomabechi, D., Kida, H., and Takada, A. (2010) Predicting the Antigenic Structure of the Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Virus Hemagglutinin. PLoS ONE 5(1): e8553.
2. Yoshida, R., Igarashi, M., Ozaki, H., Kishida, N., Tomabechi, D., Kida, H., Ito, K., and Takada, A. (2009) Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed

- against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses. *PLoS. Pathog.* 5(3):e1000350.
3. Simulundu, E., Mweene, A., Tomabeche, D., Hang'ombe, B., Ishii, A., Suzuki, Y., Nakamura, I., Sawa, H., Sugimoto, C., Ito, K., Kida, H., Saiwana, L., and Takada, A. (2009) Characterization of H3N6 avian influenza virus isolated from a wild white pelican in Zambia. *Arch. Virol.* 154(9):1517-1522.
 4. Igarashi, M., Ito, K., Kida, H., and Takada, A. (2008) Genetically destined potentials for N-linked glycosylation of influenza virus hemagglutinin. *Virology* 376 (2) : 323-329.
 5. Kishida, N., Sakoda, Y., Shiromoto, M., Bai, G.R., Isoda, N., Takada, A., Laver, G., and Kida, H. (2008). H2N5 influenza virus isolates from terns in Australia: genetic reassortants between those of the Eurasian and American lineages. *Virus Genes* 37(1) : 16-21.
 6. Murakami S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Kiso M, Kida H, Takada A, Nidom CA, Mai le Q, Yamada S, Imai H, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y, Horimoto T. (2008) Cross-clade protective immunity of H5N1 influenza vaccines in a mouse model. *Vaccine* 26(50) : 6398-6404.
 7. Soda, K., Ozaki, H., Sakoda, Y., Isoda, N., Haraguchi, Y., Sakabe, S., Kuboki, N., Kishida, N., Takada, A., and Kida H. (2008) Antigenic and genetic analysis of H5 influenza viruses isolated from water birds for the purpose of vaccine use. *Arch. Virol.* 153 (11) : 2041-2048.
 8. Takada, A., Ebihara, H., Jones, S., Feldmann, H., Kawaoka, Y. (2007) Protective efficacy of neutralizing antibodies against Ebola virus infection. *Vaccine* 25: 993-999.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Matsuno, K. and Takada, A. (2007) Antibody Therapy as a Future Treatment Option for Ebola Virus Infection. *Future Virol.* 2(6):607-614.
- 日本語総説等
1. 高田 礼人 (2009) フィロウィルスの感染機構と宿主因子、蛋白質核酸酵素 54(8) : 913-919.
 2. 高田 礼人 (2008) エボラ出血熱、総合臨床 57(11) : 2673-2679
 3. 高田 礼人 (2007) フィロウィルスの病原性と宿主域、蛋白質核酸酵素 52(10) : 1242-1247