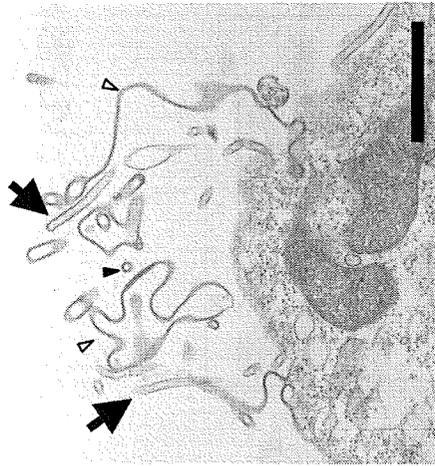


A

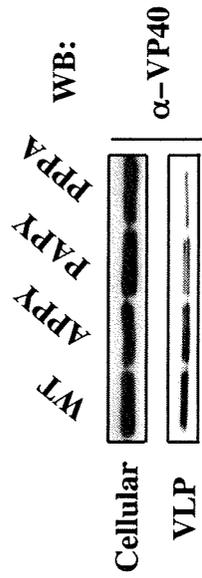


B

Marburg VP40 mutants

	16	19
WT	Y L N P P P Y A D H	
APPY	- - - A - - - - -	
PAPY	- - - A - - - - -	
PPPA	- - - - - A - - -	

C



D

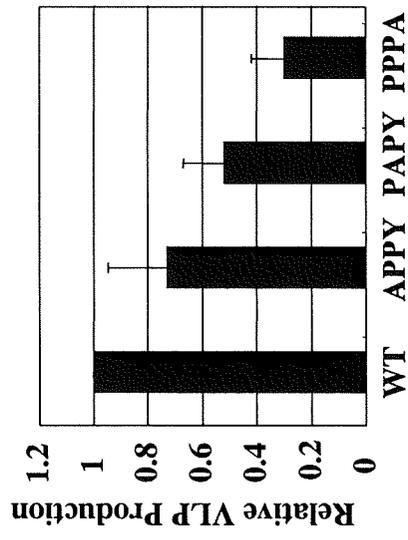


図6、VP40発現細胞からのVLP出芽とL-ドメイン変異体

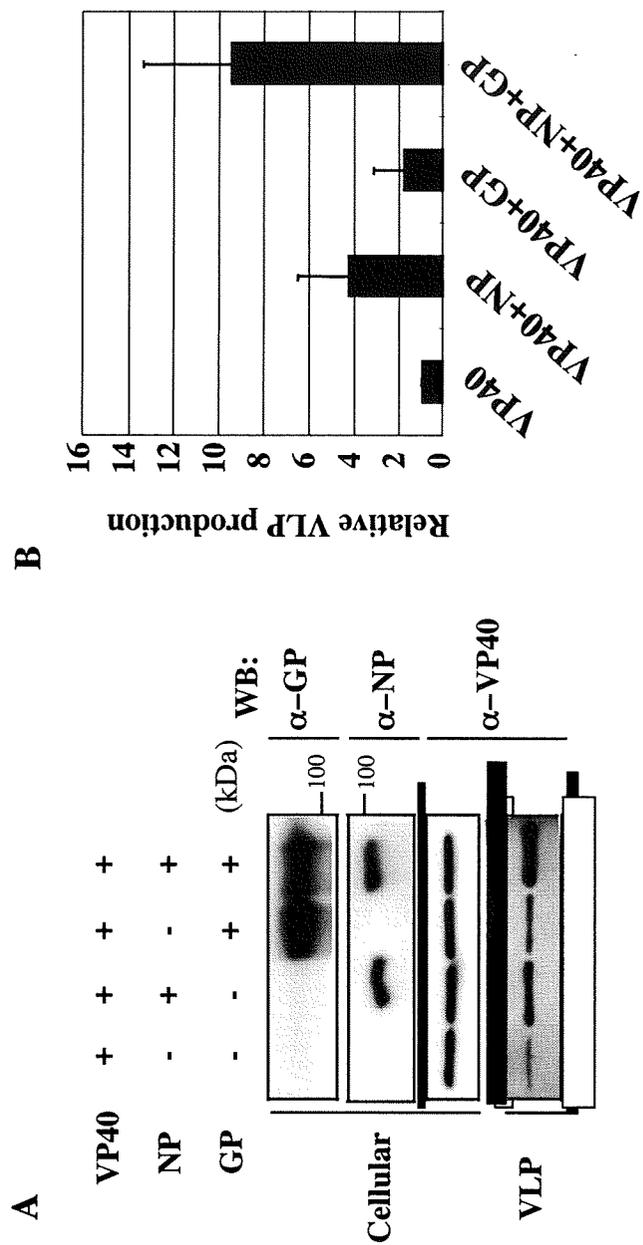
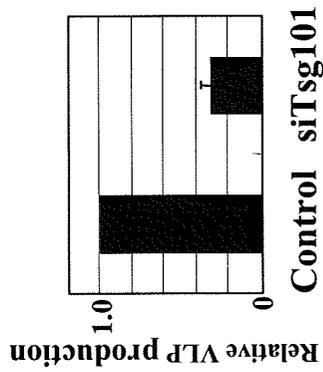
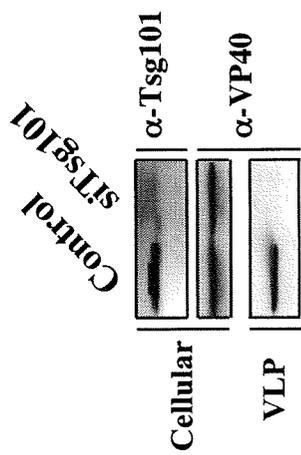
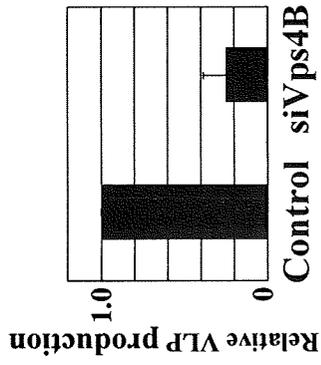
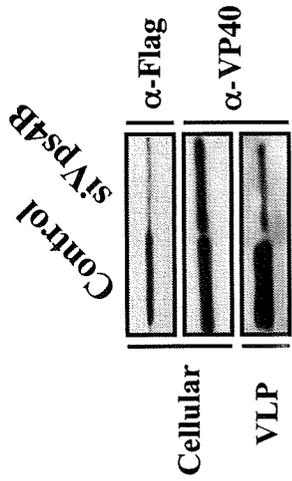


図7、VLP形成へのGPとNPの関与

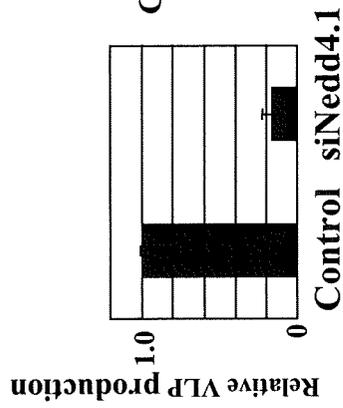
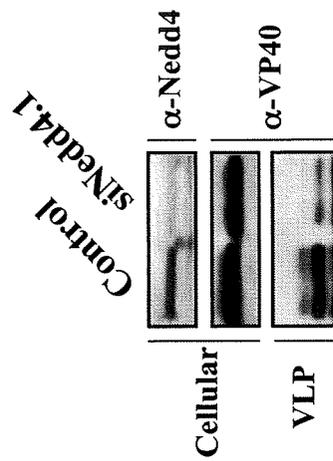
Tsg101



Vps4B



Nedd4.1



AP3 δ

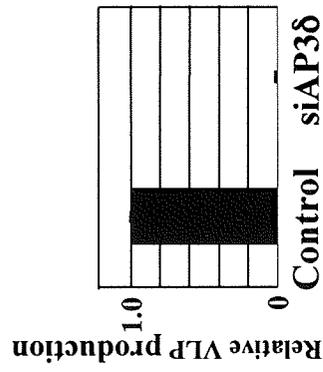
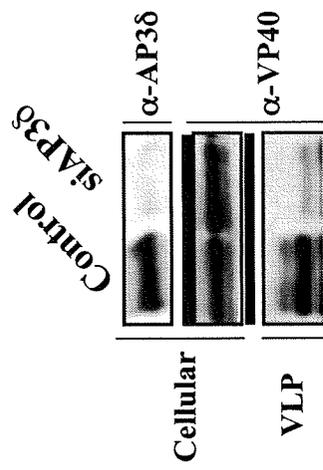


図8、マールブルグVLP出芽に必須な細胞因子

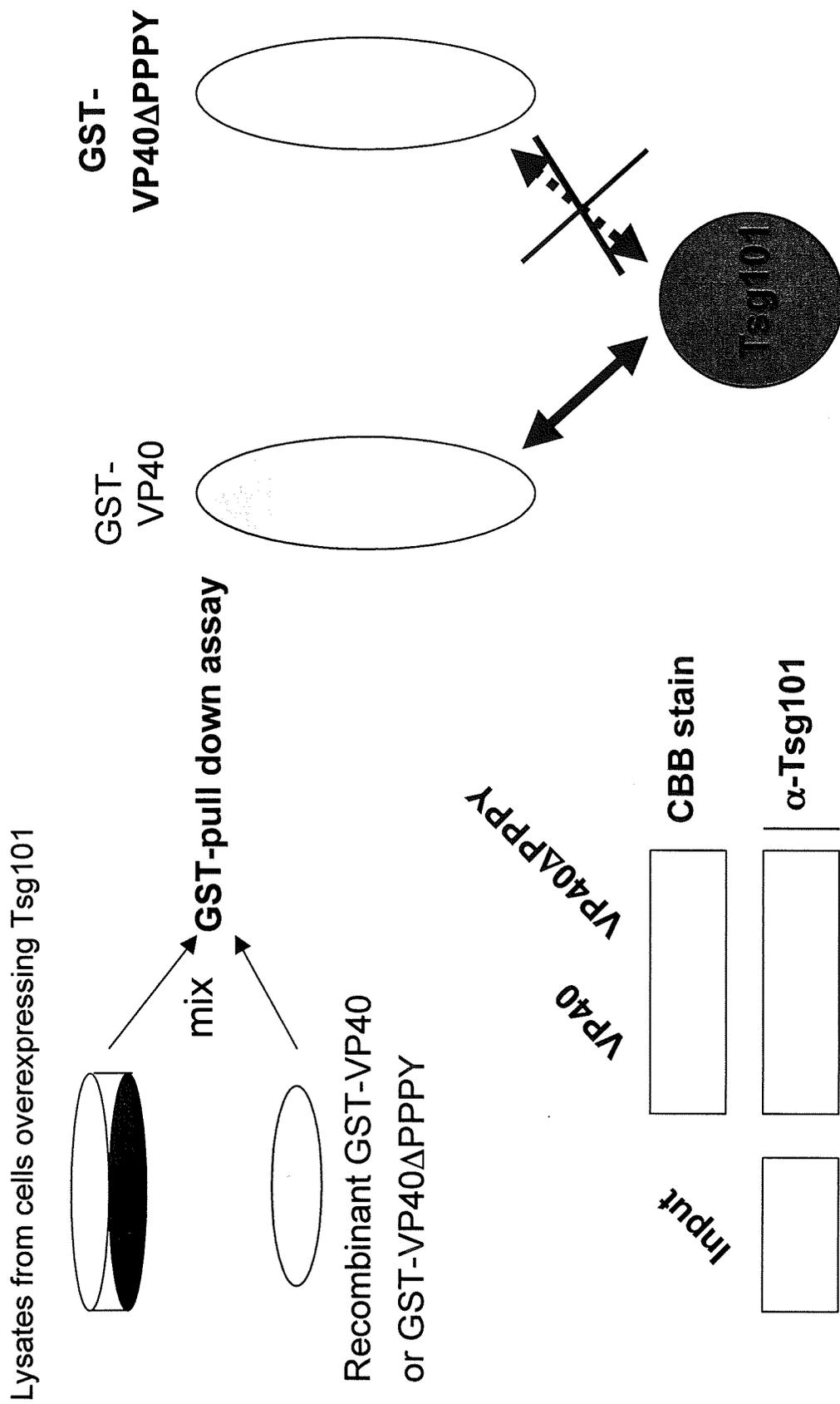


図9、マールブルグウイルスVP40とTsg101の相互作用

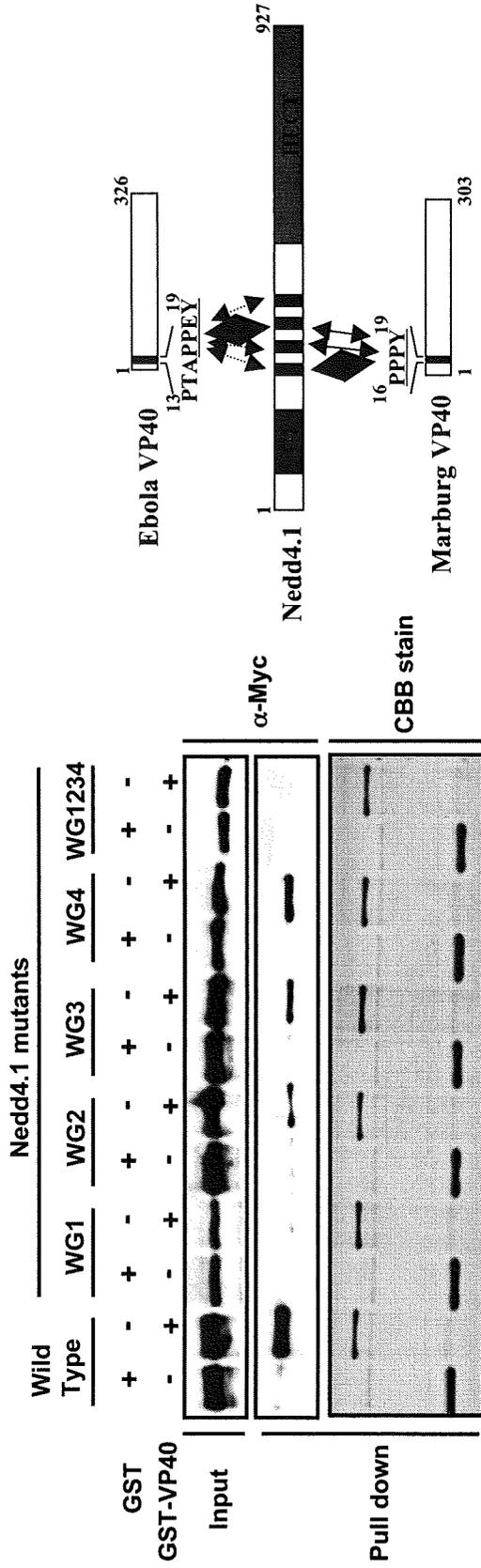
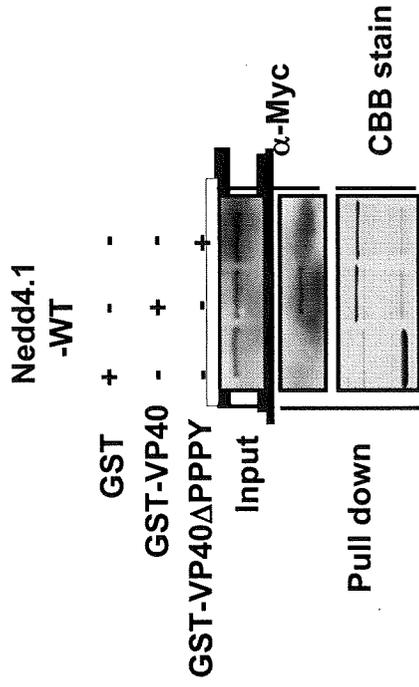
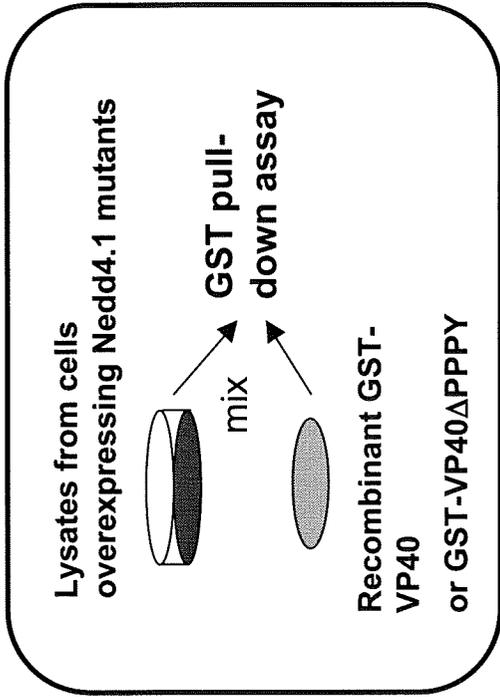


図10、マールブルグウイルスVP40とNedd4.1の相互作用

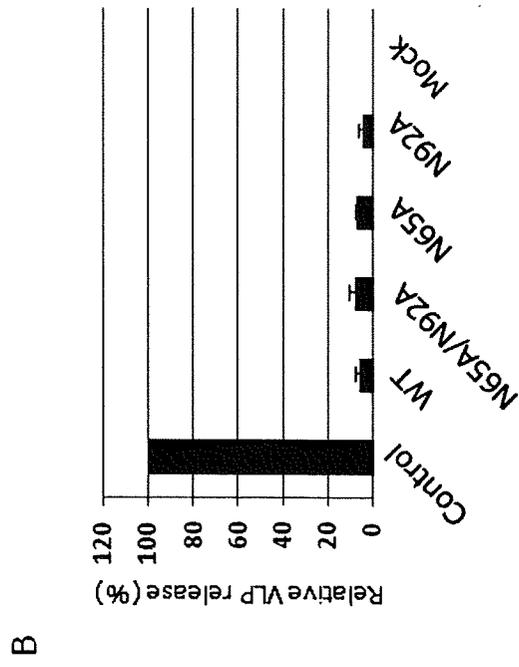
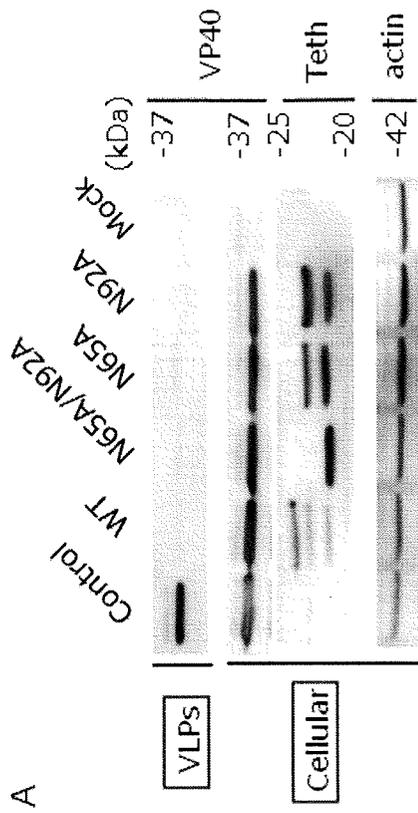


図11、TetherinによるマールブルグウイルスVLP産生阻害 (COS-7細胞)

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

研究分担者：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 の流行は米国・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。また、近年続々と食虫類由来ハンタウイルスが発見・報告されている。これらの新規ウイルスの診断法を準備し、新たな感染症の蔓延に備える必要がある。

研究協力者：遠藤 理香、吉松組子（北海道大学大学院医学研究科）新井智（国立感染症研究所感染症情報センター）

A. 研究目的

ハンタウイルスのうち、Hantaan (HTNV)、Seoul (SEOV)、Dobrava (DOBV) および Puumala (PUUV) の 4 つの血清型およびおそらく Thailand 型ウイルス (THAIV) が HFRS の原因となる。また Sin Nombre virus (SNV)、Andes virus (ANDV)、Laguna Negra virus (LANV) を始めとするアメリカネズミ亜科のげっ歯類によって媒介されるハンタウイルスは HPS の原因ウイルスである。南北アメリカ大陸からは他にも多様なウイルスが報告されており、病原性との関連が明らかではないウイルスも多い。また、HTNV および、SEOV および DOBV はネズミ亜科のげっ歯類、そして PUUV はハタネズミ亜科のげっ歯類によって媒介される。3つのグループ

のウイルスは互いに抗原性が大きく相違し交差反応性が低いことから、ハンタウイルス感染症の血清診断を行うためには少なくとも3種類の抗原が必要であると考えられる。また、これに加えて食虫目動物由来ハンタウイルスが近年続々と報告されてきている。抗原性に多様性があると考えられるが、現在までに準備されている Thottapalayam ウイルス抗原 (TPMV) 抗原を加え、4種類の抗原が網羅的な抗体検出に必要である。また、それぞれの4つのグループのウイルスの中で罹患ウイルスを迅速に鑑別することは、媒介げっ歯類を特定し、対策を取る上で重要である。一般に中和試験が鑑別に用いられるがコストも時間もかかる鑑別方法で、BSL3 以上の施設が必要となる。我々は迅速な鑑別診断のため、中和試験代替法として、組換え核蛋白抗原を用いた ELISA をアジア地区で流行するハンタウイルス感染症を対象に開発してきた。

本研究ではヨーロッパでの HFRS 原因ウイルス (PUUV 関連ウイルス) および HPS 原因ウイルス (SNV 関連ウイルス) においても代替中和法の確立を試みた。また、血清診断のみではなくそれぞれのグループ内で有効なプライマーセットを設定し、遺伝子診断系の確立も試みた。さらに近年注目を集め始めた食虫類由来ハンタウイルスについて、ウイルス抗原を効率よく検出する単クローン抗体の作成を試みた。

本研究では上記の試みを通じてネズミ亜科・ハタネズミ亜科由来・アメリカネズミ亜科由来ウイルスおよび食虫類由来ウイルスの診断および鑑別診断系の確立を目的とする。

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、各グループに 6 種類前後のプライマーを選定した。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 の同定済みのプラスミド 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。その結果候補となったプライマーを細胞由来あるいは感染動物由来の cDNA を鋳型として、検定を行った。鋳型中の cDNA のコピー数はリアルタイム PCR を用いて定量した。

2. 食虫類由来ハンタウイルスに対するモノクローナル抗体の作製：

食虫類由来ハンタウイルスの代表株であるトッ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ミエローマと融合し、単クローン抗体作製を試みた。

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 Tula virus (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 を接種したホンダハタネズミの抗血清を用いて評価した。さらに、自然感染げっ歯類および PUUV 感染患者血清も用いた。

4. 北米・南米由来ウイルスの診断法の確立：

N 末端トランケート核蛋白抗原を用いた鑑別診断システムを構築するために、データベース場の HPS 関連ウイルスの核蛋白のアミノ酸配列を比較した。型特異的領域の配列からいくつかの核蛋白型が存在し、何種類の鑑別抗原を用意すべきか検討した。さらに、カナダ国立微生物病研究所および北海道大学大学院獣医学研究科荻和宏明博士より北米・南米由来ウイルスの遺伝子の分与を受けた。この中から同所的に存在する SNV, El Moro Canyon virus (ELMCV) 様ウイルス, カリザールウイルス (CARV) を選び、組換え抗原を発現させ、自然宿主血清および

SNV 患者血清を用いて代替中和試験としての、鑑別システムの検討を行った。

5. HPS 原因ウイルスの血清診断法の開発:

南北アメリカ大陸で主に HPS の原因となっている 3 種類のウイルス、ANDV, SNV, LANV の 3 種類について N 末端トランケート核蛋白抗原を用いた鑑別診断システムを構築し、患者および病原巣動物であるげっ歯類の鑑別診断システムの検討を行った。血清は PCR により罹患ウイルス型がすでに確定している検体をアルゼンチン国立ウイルス研究所の Deria Enria 博士から分与された。

(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。患者血清は各国研究機関にて診断済みのものであり、番号のみにて提供され(匿名化)、倫理的に問題ないと判断された。

C. 研究結果:

1. 診断用プライマーセットの開発:

ネズミ亜科げっ歯類由来ハンタウイルスのグループについて有望なプライマーセットを絞り検定を行った。すべてプラスミド cDNA を鋳型にした場合には良好な増幅が見られた。次に、細胞および組織から抽出した RNA から逆転写した cDNA を用いたところ、HTNV, SEOV などでは良好な増幅が得られたが、THAIV, Gou3 では非特異増幅が多くなり、Dabishan virus では増幅が見られないなどの感度の低下が認められた。プラスミド cDNA の検定で 10^2 /reaction の鋳型量で増幅ができる場合、細胞由来の RT-PCR の

システムでも良好な結果が得られる傾向が認められた。HPS 関連、アメリカネズミ亜科げっ歯類由来のグループについても検定を行った。プラスミド cDNA を鋳型にした場合には 10^1 /reaction から 10^2 /reaction まで増幅する高感度のプライマーセットが設定できた。これらのウイルスについては RT-PCR に使用する RNA が不十分であるため、これ以上の検定は進めることができなかったが、ネズミ亜科げっ歯類由来ハンタウイルスについての結果から、有望なセットであると考えられた。ハタネズミ由来ウイルスについてもプライマーセットを設定した。北欧由来 PUUV, 日本由来 PUUV, ヨーロッパロシア由来 TULAV の 3 種類しか使用できないため、汎用性についてはさらなる検討が必要である。食虫類由来ハンタウイルスのグループについては遠藤大二研究分担者と共同でプライマーセットを設定し、代表株である TPMV の増幅を検証した。TPMV 以外のウイルスの多くは分離されておらず、部分的なシーケンスしか発表されていないものも多い。そこで、さらに多様なウイルスについて検討をすすめるため、11 種類の食虫類由来ウイルスの S セグメント約 500bp の人工的な鋳型を準備した。これにより、今後検定を行うことが可能となった。

2. 単クローン抗体の作製:

これまでに TPMV の核蛋白に対して 4 クローンが確立された。IFA パターン、Western blot での反応性は様々であることから、独立したクローンと考えられたが、トランケート抗原への反応性によるエピトープマッピングの結果、N 末端の 103 アミノ酸の内部にエピトープを持つクローンであることが明らかとなった。また、競合阻害試験の結果、部分的にこ

これらの抗体のエピトープが重複していることが示された(J Vet Med Sci 投稿準備中)。

3. ハタネズミ由来ハンタウイルスの鑑別診断法の開発:

従来、このグループのハンタウイルスに属する PUUV と TULAV は交差反応性が高いとされてきた。組換え抗原を作成し、PUUV 感染患者血清について検討した結果、強い交差反応性が確認された。しかしながら実験感染ハタネズミ血清およびマウス血清ではほとんど交差反応を示さなかった。また、野外自然感染のハタネズミ血清の交差反応も患者血清に比べて低かった。以上の結果から、PUUV と TULAV の交差反応は罹患動物種によって多様であることが明らかとなった。ハタネズミ由来ハンタウイルスの血清診断のためには PUUV および TULAV 抗原の両方でスクリーニングすることが必要であると考えられた (CIMID 印刷中)。

4. 北米由来ハンタウイルスの血清診断法の開発:

HPS 関連ウイルス核蛋白の可変領域のタイプが少なくとも 5 種類見つかри、代替中和法で鑑別できる可能性が示された。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ている ELMCV 様ウイルス (カリザールウイルス; CARV) の鑑別診断システムの構築を試みた。SNV 感染ヒト血清およびシカネズミ血清、CARV 感染カヤマウス血清を用いたところそれぞれ特異的な反応パターンを示し、本鑑別システムが有効である可能性が示された (CIMID 投稿準備中)。

5. HPS 原因ウイルスの血清診断法の開

発:

南北アメリカ大陸で発生する HPS 関連ウイルスの原因ウイルスは、そのほとんどが ANDV, SNV, LANV のいずれかによるものと考えられている。これらの感染を上記と同様の代替中和法で鑑別するシステムの構築を行った。北米由来 HPS 患者血清 (SNV 感染) 南米由来患者血清 (ANDV, LANV 感染) および自然宿主血清を用いたところ、患者血清およびげっ歯類血清の両方で、それぞれ特異的な反応パターンを示し、本鑑別システムが有効であることが示された (J Clin Microbiol 投稿中)。

D. 考察

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 3 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。さらに新規にグループを形成しつつある、食虫類由来ウイルスについても診断法を確立することも必要である。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・遺伝子診断法のそれぞれで標準的診断法を示すことができている。HPS 関連ウイルスについては幸いなことに、今回必要とするほぼすべての株の cDNA および抗血清について分与を受けることができ、代替中和法について検討することが可能となった。北米由来ウイルスはげっ歯類中心のシステム構築となったが、南米由来ウイルスのシステムはげっ歯類および患者の双方で有用性を示すことができた。しかしながら未だその検体数充分とはいえず、診断法を十分に評価するためには継続して検体の収集をすすめてゆく必要がある。また今後は RNA 分画を入手し、今回設定したプライ

マーの検討を行う必要があると考えられる。

食虫類由来ウイルスについては、有望なモノクローナル抗体を作出することができた。今後はこの抗体を使用して抗原・IgG抗体・IgM抗体検出ELISAシステムの構築が可能となる。また、この抗体はWestern blotでの活性も強いいため、抗原検出への応用も可能である。今後も情報収集を続け、血清診断法および遺伝子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. Tegshduuren E, Yoshimatsu K, Taruishi M, Endo R, Shimizu K, Koma T, Yasuda PS, Kariwa H, Arikawa J, and Ishihara C. Studies on the susceptibility of the Japanese grass vole, *Microtus montebelli*, to Tula virus and Puumala virus of the hantaviruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010. in press.
2. Schmidt-Chanasit J, Essbauer SS, Petraityte R, Yoshimatsu K, Tackman K, Contraths FJ, Sasnauskas K, Arikawa J, Thomas A, Pfeffer M, Scharninghausen JJ, Spletstoesser W, Wenk M, Heckel G, and Ulrich RG. Extensive host sharing of Central European Tula virus. *J Virol* 2010. in press.
3. Huong VT, Yoshimatsu K, Luan VT, Tuan LV, Nhi L, Arikawa J, and Nguyen TMN. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in Vietnam: Description of Disease and Implication of Virus and Potential Rodent Hosts. *Emerg Infect Dis* 2010. in press
4. Truong T-T, Yoshimatsu K, Araki K, Lee B-H, Nakamura I, Endo R, Shimizu K, Yasuda PS, Koma T, Taruishi M, Okumura M, Truong U-N, and Arikawa J. Molecular epidemiological and serological studies of hantavirus infection in Northern Vietnam. *J Vet Med Sci* 2009. 71:1357-1363.
5. Mertens M, Wolfel R, Ullrich K, Yoshimatsu K, Blumhardt J, Romer I, Esser J, Schmidt-Chanasit J, Groschup MH, Dobler G, Essbauer SS, and Ulrich RG. Seroepidemiological study in a Puumala virus outbreak area in South-East Germany. *Med Microbiol Immunol* 2009. 198:83-91.
6. Kariwa H, Tkachenko EA, Morozov VG, Seto T, Tanikawa Y, Kolominov SI, Belov SN, Nakamura I, Hashimoto N, Balakiev AE, Dzagurnova TK, Daud NH, Miyashita D, Medvedkina OA, Nakauchi M, Ishizuka M, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, and Takashima I. Epidemiological study of hantavirus infection in the Samara Region of

- European Russia. *J Vet Med Sci* 2009. 71:1569-1578.
7. Chandy S, Yoshimatsu K, Boorugu HK, Chrispal A, Thomas K, Peedicyil A, Abraham P, Arikawa J, and Sridharan G. Acute febrile illness caused by hantavirus: serological and molecular evidence from India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009. 103:407-412.
 8. Chandy S, Okumura M, Yoshimatsu K, Ulrich RG, John GT, Abraham P, Arikawa J, and Sridharan G. Hantavirus species in India: A retrospective study. *Indian J Med Res* 2009. 27:348-350.
 9. Taruishi M, Yoshimatsu K, Hatsuse R, Okumura M, Nakamura I, and Arikawa J. Lack of vertical transmission of Hantaan virus from persistently infected dam to progeny in laboratory mice. *Arch Virol* 2008. 153:1605-1609.
 10. Nakamura I, Yoshimatsu K, Lee BH, Okumura M, Taruishi M, Araki K, Kariwa H, Takashima I, and Arikawa J. Development of a serotyping ELISA system for Thailand virus infection. *Arch Virol* 2008. 153:1537-1542.
 11. Chandy S, Yoshimatsu K, Ulrich RG, Mertens M, Okumura M, Rajendran P, John GT, Balraj V, Muliyl J, Mammen J, Abraham P, Arikawa J, and Sridharan G. Seroepidemiological study on hantavirus infections in India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008. 102:70-74.
 12. Arai S, Ohdachi SD, Asakawa M, Kang HJ, Mocz G, Arikawa J, Okabe N, and Yanagihara R. Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008. 105: 16296-16301.
 13. Yamamoto H, Li TC, Koshimoto C, Ito K, Kita M, Miyashita N, Arikawa J, Yagami K, Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa T, Shibahara T, Furuya M, Mohri S, Sato H, Ohsawa K, Ibuki K, and Takeda N. Serological evidence for hepatitis e virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp Anim* 2008. 57:367-376.
 14. Taruishi M, Yoshimatsu K, Araki K, Okumura M, Nakamura I, Kajino K, and Arikawa J. Analysis of the immune response of Hantaan virus nucleocapsid protein-specific CD8+ T cells in mice. *Virology* 2007. 365:292-301.
 15. Okumura M, Yoshimatsu K, Kumperasart S, Nakamura I, Ogino M, Taruishi M, Sungdee A, Pattamadilok S, Ibrahim IN, Erlina S, Agui T, Yanagihara R, and Arikawa J. Development of serological assays for Thottapalayam virus, an insectivore-borne Hantavirus. *Clin Vaccine Immunol* 2007. 14:173-181.
 16. 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 TC. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 2007. 152:1375-1381.
 17. Kariwa H, Yoshimatsu K, and Arikawa J. Hantavirus infection in East Asia. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2007. 30:341-356.
 18. Kariwa H, Lokugamage K, Lokugamage N, Miyamoto H, Yoshii K, Nakauchi M,

- Yoshimatsu K, Arikawa J, Ivanov LI, Iwasaki T, and Takashima I. A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia. *Jpn J Vet Res* 2007. 54:145-161.
19. Daud NH, 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* 2007. 51:1081-1090.
 20. 有川二郎：「ハンタウイルス肺症候群」新臨床内科学（第9版）（2008.3）
 21. 有川二郎：「ハンタウイルス」ウイルスハンドブックNo. 10 2.呼吸器系ウイルス（2008.4）（P25～27）
 22. 有川二郎：「ハンタウイルス肺症候群（HP S）」特集 輸入感染の可能性のある希少感染症 Vol.24, No.11, (2008.10) 化学療法の領域 『医科ウイルス学』南江堂
 23. 有川二郎；「10ハンタウイルス」バイオセーフティの事典 病原微生物とハザード対策の実際，バイオメディカルサイエンス研究会] 編集（P285～P287）2008.12.10
 24. 有川二郎：「腎症候性出血熱」小児疾患診療のための病理生理 小児内科 40 増刊号 第4版（P1222～P1225）
- 2.学会発表
1. Arikawa, J. : Epidemiology and Epizootiology of hantavirus infection in East Asia. JSPS Core University Program on Tropical Medicine Seminar, Pompe Hall, Nagasaki University, November 26, 27 2009
 2. 新井 智、田原研司、Oh Hong-Shik、高田伸弘、Song Jin-Won, Kang hae Ji, N. Bennett Shannon, 多屋馨子、有川二郎、岡部信彦、Yanagihara Richard: Genetically distinct hantavirus in the Asian lesser white-toothed shrew on Jeju island, Korea. 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル 2009.10.25～10.27
 3. 吉川佳佑、苅和宏明、瀬戸隆弘、真田崇弘、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫、極東ロシアの野鼠からのハンタウイルスの分離と人におけるウイルス感染状況の調査 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル 2009.10.25～10.27
 4. 吉田喜香、苅和宏明、Ramos Celso, Hernandez Cornelio S. Almaraz Maria L.R. 高野絢子、戸谷理詩、宮下大輔、Ngonda Saasa、瀬戸隆弘、真田崇弘、吉川佳佑、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が保有するハンタウイルスの遺伝子解析 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル 2009.10.25～10.27
 5. エルテネサイハンテグシドーレン、清水健太、吉松組子、遠藤理香、駒 貴明、安田俊平、有川二郎、石原智明：トガリネズミ目（旧食虫目）由来ハンタウイルス Thottapalayam ウイルス (TPMV) 核蛋白の単クローン抗体を用いた抗原領域の解析 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル 2009.10.25～10.27
 6. 安田俊平、吉松組子、遠藤理香、清水健太、駒 貴明、Erdenesaikhan

- Tegshduuren, 垂石みどり、有川二郎：ハンタウイルス自然感染ラットと実験感染ラットにおける病態の比較 第 57 回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル 2009.10.25～10.27
7. 駒 貴明、吉松組子、垂石みどり、遠藤理香、清水健太、安田俊平、エルテネサイハンテグシドーレン、海老原秀、Cornelio S.Hernandez, Maria L.R. Almaraz, Celso Ramos、宮下大輔、瀬戸隆弘、苅和、宏明、高島郁夫、Delia Enria、有川二郎：新世界ハンタウイルス感染の血清型鑑別 ELISA 法の確立 第 57 回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル 2009.10.25～10.27
 8. 遠藤理香、吉松組子、駒 貴明、清水健太、安田俊平、Erdenesaihan Tegshduuren, 垂石みどり、海老原秀喜、宮下大輔、瀬戸隆弘、Cornelio S.Hernandez, Maria L.R. Almaz, Celso Ramos, 苅和宏明、高島郁夫、有川二郎：汎用 PCR プライマーを用いたハンタウイルス遺伝子検出スクリーニング法の確立 第 57 回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル 2009.10.25～10.27
 9. 清水健太、イブラハムイマヌリサ、吉松組子、遠藤理香、安田俊平、駒 貴明、エルテネサイハンテグシドーレン、有川二郎：インドネシアのげっ歯類におけるハンタウイルス感染症の疫学 第 57 回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル 2009.10.25～10.27
 10. Yasuda Shumpei P., Endo Rika, Shimizu Kenta, Koma Takaaki, Tegshduuren Erdenesaikhan, Luan Vu Dinh, Yoshimatsu Kumiko, Huong Vu Thi Que and Arikawa Jiro : Hantavirus genome quantification in experimentally infected laboratory rats and naturally infected wild rats (*Rattus norvegicus*) 10th International Mammalogical Congress (IMC 10) Mendoza, Argentina, August, 2009
 11. Yoshimatsu, K., Taruishi, M., Arikawa, J., Analysis of the hantavirus-specific CD8+ T cell response in mice. The 7th Japan-China International Conference of Virology, University of Tokyo, School of Medicine, 2008
 12. 土佐紀子、吉松組子、有川二郎 マウスの異常行動における環境エンリッチメントの効果 第 55 回日本実験動物学会総会 (2008.5)
 13. 吉松組子、垂石みどり、有川二郎 マウスのハンタウイルスに対する細胞性免疫応答の解析：第 55 回日本実験動物学会総会 (2008.5)
 14. Okumura, M., Yoshimatsu, K., Kumperasart, S. Nakamura, I., Taruishi, M., Sungdee, A. Pattamadilok, S., Yanagihara, R., Arikawa, J.: Antigenic profile of thottapalayam virus and development of a serodiagnostic assay. XII International Congress of Virology Istanbul, Turkey (2008.8)
 15. Kariwa, H., Miyashita, D., Hernandez, C., Romero-Almaraz, M., Ramos, C., Seto, T. Murata, R., Bin Abu Daud, N., Ishizuka, M. Nakauchi, M., Yoshii, K., Yoshimatsu, K. Arikawa, J., Takashima, I.: Epidemiological Investigation of Hantavirus Infection in Mexico. XII International Congress of Virology, Istanbul, Turkey (2008.8)
 16. Endo, R., Ishiguro, N., Shirkoohi, R., Teramoto, S., Ariga, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J.: Seroepidemiology of human bocavirus infection in Japan.

XII International Congress of Virology,
Istanbul, Turkey (2008.8)

17. 新井智、大館智志、浅川満彦、有川二、Mocz Gabor、岡部信彦、Yanagihara Richard: Newfound Hantavirus Sequences in the Japanese Shrew Mole(Urotrichus talpoides) 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008.10)
18. Nur hardy Abu Daud、荻和宏明、石塚万里子、瀬戸隆弘、宮下大輔、真田崇弘、中内美名、好井健太郎、前田秋彦、吉松組子、有川二郎、Evgeniy Tkachenko、高島郁夫 : Genetic and antigenic characterization of Puumala virus strain DTJ-Ufa-97 Isolated from a patient of hemorrhagic fever with renal syndrome. 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008.10)
19. 駒貴明、吉松組子、垂石みどり、遠藤理香、海老原秀喜、有川二郎 : 新世界ハンタウイルス感染の血清型鑑別診断法の確立 : 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008.10)

他

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

研究分担者 林 昌宏（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（CHIKV）感染症はアフリカ、インド洋諸島、インド、東南アジアの熱帯・亜熱帯地域を中心として流行地域が拡大しており、再興感染症の一つとして重要な感染症である。CHIKV はネッタイシマ蚊、日本にも生息するヒトスジシマ蚊等によって媒介されるトガウイルス科アルファウイルス属の一本鎖(+)RNA ウイルスである。CHIK 熱は発熱・関節炎・発疹の3主徴を呈し、時に出血傾向が認められるためデングウイルス感染症の鑑別疾患としても重要である。日本では2007年に初めてスリランカからの輸入症例が2例確認され、2010年1月までに計15例の輸入症例が確認されている。本研究ではCHIKVに対する適切な検査体制を整えると共に、CHIK患者よりCHIKVを分離し、分離ウイルスの性状及び遺伝学的特徴を解析した。

協力研究者 高崎智彦、小滝徹、倉根一郎
（国立感染症研究所ウイルス第一部）

A. 研究目的

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、その主たる媒介蚊はネッタイシマカや日本にも分布するヒトスジシマカである。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・出血熱、ウエストナイル熱が挙げられる。2005年初頭にインド洋諸島で流行が発生し、その流行はインド、スリランカ、イタリア、マレーシア、タイ、シンガポールに拡大するとともに欧州、米国、アジア、オセアニア諸国において多くの輸入症例が報告されている。アジア諸国

では1954年以来フィリピン、タイ、カンボジア、ベトナム、ラオス、マレーシア、インドネシア、ミャンマー、スリランカ、インド等でCHIK熱が散発していたが、近年再び大流行している。インドでは2005-2009年に少なくとも160万人の症例が報告されている。流行はスリランカに拡大し2006年から2009年にかけてCHIKV感染症例が推計57,000人報告された。さらにCHIKVの流行は東南アジアに拡散し、シンガポール、マレーシア、タイでの流行が確認されている。シンガポールでは2007年12月まで主にインドからの輸入症例が散発していたが、2008年1月に国内症例が初めて報告され、2009年までに900例以上のCHIK症例が報告されている。またマレーシアでも2008年に4,271人、2009年には5430人の患者が報告された。日本においては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例が確認されて以来、2010年1月までにインド、タイ、インドネシア、マレーシア、ミャンマーから15例の輸入症例が報告されたため、本ウイルスの日本への侵入の可能性が現在も存在することが示唆された。チクングニヤ熱は、現在のところ我が国では感染症法や検疫法に定められていない疾患であるため、検査可能な機関が少ない。そこで本研究の目的はチクングニヤウイルスに対する検査体制を早急に整え、さらに確立した検体制を用いてチクングニヤ熱の流行状況、現在流行しているチクングニヤウイルスの性状解析を行うことである。検査体制を整え性状解析を行うことにより現在の輸入症例数の把握、今後の予防・治療法等の検討が可能となる。

B. 研究方法

実験室内診断：

血清診断法として In house IgM 捕捉 ELISA 法を用いて特異的 IgM 抗体の検出を行った。さらに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(図1)。

合成 CHIKV RNA を用いた患者血清中の RNA コピー数の検討：

CHIKV の E1 蛋白質領域をプラスミドベクターにクローニングし、目的 RNA を得た。得られた合成 RNA の吸光度と分子量からコピー数を算出しリアルタイム PCR 法において検量線を作製した。得られた検量線から血清中のウイルス RNA コピー数をリアルタイム PCR 法の結果より算出した。

ウイルスと培養細胞：

CHIKV 中和試験においては CHIKV S27

株を用いた。ウイルス分離およびウイルス中和試験にはサル腎由来の Vero 細胞を用いた (American Type Culture Collection)。

ウイルス精製：

30%(w/v)-60%(w/v)ショ糖密度勾配遠心法にて 25,000rpm で 3 時間遠心しウイルスを精製した。精製したウイルスは電子顕微鏡にて観察した。

ウイルス中和試験：

ウイルス中和試験は Vero 細胞を用いた 50%フォーカス減少法にて検討した。得られた患者血清を非動化し、10 倍希釈後 2 倍階段希釈を行った。希釈した患者血清とウイルスを等量混合後し 37°C 1 時間中和反応を行った。各血清-ウイルス反応液を Vero 細胞に接種し、37°C で 90 分吸着後 1%メチルセルロースを重層し 37°C にて培養した。10%ホルマリンにて固定後メチレンブルーにて感染細胞を染色しウイルス中和抗体価を算出した。

マレーシアのチクングニヤ患者血清：

マレーシア National Public Health Laboratory の Kaw Bing Chua 博士より 2008 年 9 月-10 月にペラ (Perak) 州において採取されたチクングニヤ熱疑い患者血清 80 サンプルを分与され、これらサンプルの解析を行った。

C. 研究結果

実験室内検査体制の確立：

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 補足 ELISA 法、50%プラーク減少法を用いた中和法による診断法を確立した。またチクングニヤウイルスの遺伝子をクローニングし、ウイルス遺伝子検出検査の陽性対照 RNA

を作成、関係機関に配布した。作成 RNA のコピー数は既知のため、サンプル中のウイルス RNA 濃度を算出することが可能となった。さらに「ヨーロッパ輸入ウイルス感染症診断ネットワーク」による External quality assurance に参加し我々の確立した実験室診断法の感度を検討した結果これら診断法は他の諸国と比較して同等以上のものであった。

輸入症例より分離したチクングニヤウイルスの性状解析：

2006 年 12 月に発生したスリランカからの輸入症例の血液サンプルよりチクングニヤウイルスを分離したところ現在流行中のインド分離株の遺伝子配列と 99%一致した。また、分離株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 種類のサブストレイン SL-11131 株および SL-10571 株を得た。さらに分離ウイルスの培養上清をショ糖密度勾配法により精製・濃縮し電子顕微鏡により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。また免疫電子顕微鏡法を用いて観察されたウイルス粒子がチクングニヤウイルスであることを確認した (図 2)。

マレーシアにおけるチクングニヤ熱患者血清の解析：

チクングニヤ熱疑いマレーシア患者血清 80 例においてこれまでに確立した病原体解析法および血清学的診断法を用いたチクングニヤ熱に対する実験室内診断を行った。また鑑別診断としてデング熱に対する解析も同時に行った。その結果 Real Time RT-PCR 法の結果により 16%の患者が CHIKV、19%の患者が DENV 陽性であった。また 10 症例から CHIKV が 9 症例から DENV が分離された。しかしながらウイル

ス分離及び遺伝子診断において同一の患者から同時に CHIKV と DENV は検出されなかった。分離ウイルスを解析した結果現在アフリカからインドにおいて流行中の東・中央アフリカ型の遺伝子型ウイルスであることが示唆された (図 3)。

D. 考察

これまでに我々は 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%プラーク減少法を用いた中和法による診断法を確立した。輸入症例および流行地の患者血清より分離したウイルスを解析した結果、現在アフリカおよびアジア地域で流行地域を急速に拡大している東・中央アフリカ型の遺伝子型のウイルスであることが示唆された。日本においても媒介蚊であるヒジシマカが生息することから本ウイルスの日本への侵淫の可能性は否定できず今後も本ウイルスに対する対策の必要性が示唆された。したがって関係検査機関にこれまでの成果を提供するとともに、今後も輸入症例対策としてチクングニヤ疑いの患者に対する実験室内検査を実施する。

E. 結論

急速な輸送手段の発達とネッタイシマ蚊、ヒトスジシマ蚊の分布拡大、熱帯雨林地域への人口拡張により世界の熱帯・亜熱帯地域、特に東南アジアにおいてチクングニヤ熱は今後も流行が続くことが予想される。さらに 2010 年 1 月までに日本において 15 例の輸入症例が確認されている。チクングニヤ熱の治療法は確立されておらず、CHIKV の動向にはヒト、蚊、気候、環境等の要因が複雑に関わり、その状況の予測は困難であるため CHIKV の我が国への侵入は予断を許さない。ワクチンが実用化されていない現在、旅行先におけるチクングニ

ヤ熱の流行状況を把握し、蚊対策に十分考慮すると共に、医療機関、地域住民、行政、研究機関の一層の協力体制を確立することが重要である。

F. 健康危険情報

2007年初頭に2例のスリランカからの輸入症例が日本で初めて確認された。2010年1月までに日本において15例の輸入症例が確認されている。現在もインドおよび東南アジア地域を中心にチクングニヤ熱は流行が拡大しており、本邦にも媒介蚊であるヒトスジシマ蚊が生息するため早期の防疫体制の確立が求められる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Lim, C.K., Nishibori, T., Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Tanaka, K., Kurane, I., Takasaki, T. Chikungunya virus isolated from a returnee to Japan from Sri Lanka: Isolation of two sub-strains with different characteristics. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2009. 81(5):865-868.
2. Lim, C.K., Kurane, I., and Takasaki, T. (2010) Re-emergence of chikungunya virus, pp. 1-22. In Maeda, A. (ed), *Animal Viruses*. Transworld Research Network., Kerala, India.
3. Aoyama, I., Uno, K., Yumisashi, T., Takasaki, T., Lim, C.K., Kurane, I., Kase, T., Takahashi, K. A Case of Chikungunya Fever Imported from India to Japan, Follow-Up of Specific IgM and IgG Antibodies over a 6-Month Period. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2010. 63(1):65-66.
4. 林 昌宏. チクングニヤウイルス。臨床と微生物、36(3): 211-216, 2009
5. 林 昌宏. チクングニヤ熱。化学療法の領域、24 (11):1606-1613, 2008
6. 青山幾子、弓指孝博、加瀬哲男、高橋和郎、宇野健司、後藤哲志、片山智香子、中村匡宏、塩見正司、仁科展子、齋藤武志、森登志子、穴瀬文也、吉田英樹、高崎智彦、林 昌宏、倉根一郎。チクングニヤ熱と確定診断されたインドからの輸入感染症症例。病原体微生物検出情報 29(12): 345-346, 2008.

2. 学会発表

1. C. Lim, T. Nishibori, K. Watanabe, M. Ito, A. Kotaki, I. Kurane., T. Takasaki. Chikungunya Virus Isolated from a Patient Who Came Back to Japan from Sri Lanka: Isolation of two strains with different characteristics. The West Nile virus 2009 National Conference (Savannah, GA, USA) 2009/2/19-20.
2. C. Lim, T. Takasaki, T. Nishibori, K. Watanabe, M. Ito, A. Kotaki, I. Kurane. Two Chikungunya Virus Strains with Different Characteristics isolated from One Patient Who Returned to Japan from Sri Lanka. 42nd Joint Working Conference on Viral Diseases, Japan-US Cooperative Medical Science Program (Nagasaki, Japan) 2008/5/27-28.
3. C. Lim, T. Takasaki, T. Nishibori, K. Watanabe, M. Ito, A. Kotaki, I. Kurane. Two Chikungunya Virus Strains with Different Characteristics isolated from One Patient Who Returned to Japan from Sri Lanka. XIV. International Congress of Virology (Istanbul, Turkey) 2008/8/10-15.
4. 林 昌宏. チクングニヤ感染症の診断法。平成 21 年度希少感染症診断技術研修会 (東京都) 2010 年 2 月 25-26 日
5. 高崎智彦, 林 昌宏. 拡大するチクングニヤ熱の現状と臨床。平成 21 年度希少

感染症診断技術研修会（東京都）2010年2月25-26日

6. 林 昌宏, 高崎智彦, モイ メンリン, 大松 勉, 小滝 徹, 倉根一郎, 東南アジアにおけるチクングニヤ熱疑い患者血清の病原体および血清学的解析. 第56回日本ウイルス学会（東京都）2009年10月25-27日
7. 水野泰孝, 氏家無限, 竹下望, 加藤康幸, 金川修造, 工藤宏一郎, 高崎智彦, 林 昌宏, 倉根一郎: 遅延する関節痛を主訴に来院したチクングニヤ熱の3症例. 第58回日本感染症学会東日本地方会学術集会（東京都）2009年10月30-31日
8. 林 昌宏, 小滝 徹, 高崎智彦, 倉根一郎. フラビウイルス感染症迅速診断のための共通プライマーの開発. 第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会（北海道）2009年6月19-20日
9. 林 昌宏. チクングニヤ熱検査法. 平成20年度希少感染症診断技術研修会（東京都）2009年2月24-25日
10. 林 昌宏, 西堀武明, 渡辺香奈子, 小滝 徹, 伊藤美佳子, 倉根一郎, 高崎智彦. チクングニヤ熱輸入症例患者血清より分離された CHIKV の性状解析. 第56回日本ウイルス学会（岡山県）2008年10月26-28日
11. 林 昌宏. チクングニヤ熱の疫学と実験室診断法. 衛生微生物技術協議会第29回研究会（東京都）2008年6月24-25.
12. 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.
13. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし