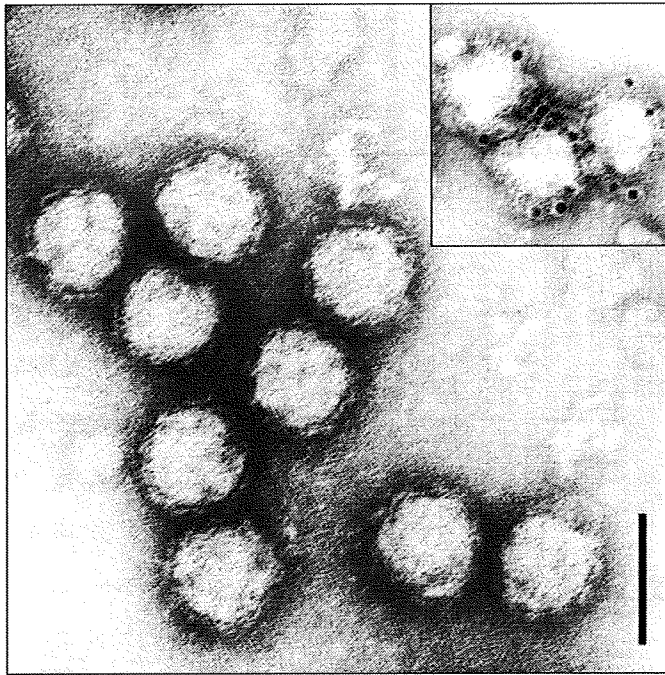


プライマー	塩基配列 (5'-3')
CHIK 10294s	ACGCAATTGAGCGAAGCACAT
CHIK 10573c	AAATTGTCCTGGTCTTCTG
Taq-Chik607F (10849)	GCR CCM TCT KTA ACG GAC AT
Taq-Chik672R (10894)	GCC CCC RAA GTC KGA GGA R
Taq-Chik638P (10880)	FAM-TACCAGCCTGCACYC-MGB-3'

図1. チャクシグニヤウウイルス検出プライマー領域にRT-PCRおよびリアルタイムPCRの設計：チャクシグニヤウウイルスのE1蛋白質領域にRT-PCRの設計：チャクシグニヤウ



MAG 25K
Bar 100nm

図 2 の分、染察
 ．電離陰色さ
 ス子し性（れ
 リ頭た染粋た
 ラ微ウ色内。
 ン鏡イお）
 カ増ルよを
 か：スび行
 らス培抗っ
 のラ養手た。
 輸ン精ンそ
 入カをグの
 症かシニ結
 例らヨヤ果
 りの糖ウ直
 分者密イ径
 離血勾ス約
 したよ遠ウnm
 クク心スの
 ンVer法腹ウ
 グ。を水イ
 ニ細用をル
 ヤ胞い用ス
 ウをてい粒
 イ用精て子
 ルい製免が

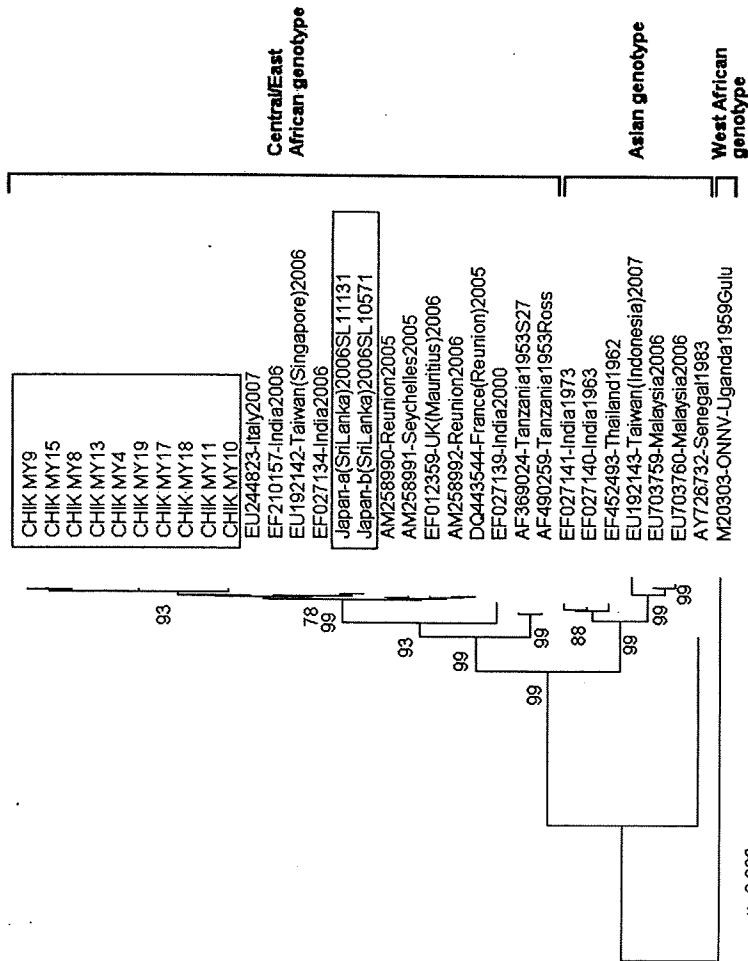


図3 解析領域内チンパンザンラングニヤクリスチスルニヤ配イニヤカ熱患者血入おの輸CHIK MY4, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000.

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：リフトバレーウイルスの診断法と抗ウイルス薬の検討（平成 19～20 年度）

研究分担者：福士秀悦 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨：リフトバレー熱ウイルス(RVFPV)のコア蛋白質(NP)に対する単クローン抗体を作製し、抗原検出 ELISA 法を開発した。この抗原検出系は、1ng 未満の組換え NP を検出し、15 から 125 PFU の感染価の RVFPV が検出できた。作製した単クローン抗体のうち、1 種類 (C10-54) は NP 全長の高次構造を認識した。他の 2 種類 (D5-56 および G2-36) は NP のアミノ酸 195-201 の部位を認識した。この認識部位は、全ての RVFPV 株の NP のアミノ酸配列で保存されていることから、リフトバレー熱疑い患者の急性期の病原診断法としての有用性が示唆された。

A. 研究目的

リフトバレー熱は、リフトバレー熱ウイルス(RVFPV)の感染が原因となって起こる、アフリカに古くから常在する急性の熱性疾患である。日本では感染症法で 4 類感染症に分類されている。また、家畜伝染病予防法で法定伝染病に指定されていて、ウイルスの取り扱いが規制されている。主に蚊によって媒介されるウイルス感染症であるが、ウシ、ヒツジなど感染家畜の血液や体液との接触により人に感染する例も多い。感染患者の 1-2%は出血熱を起こし、高い致死率を示すことから、他の出血熱、例えばエボラ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱などとの鑑別診断が重要である。RVFPV の不活化ワクチンおよび生ワクチンが家畜用に実用化されているが、いまだに東アフリカを中心に流行がみられている。これまで、日本でリフトバレー熱が発生したことはないが、輸入感染症として患者が発生する可能性がある。RVFPV はブニヤウイルス科、フレボウイルス属に属するネガティブ鎖 RNA ウイルス

である。RVFPV 構造蛋白質のうち、コア蛋白質(NP)はウイルス粒子あるいは感染細胞中に最も多く含まれることから、抗原検出法のターゲットとして適している。本研究では、RVFPV 抗原検出 ELISA およびシュードタイプウイルスを用いた血清中の中和抗体検出法の開発と、抗ウイルス薬の検討を行う。平成 19 年度は、RVFPV 抗原検出 ELISA を構築するための RVFPV に対する単クローン抗体を作製し、これらの反応性を検討した。平成 20 年度は、作製した単クローン抗体を用いて、抗原検出 ELISA 法を構築した。また、単クローン抗体の抗原認識部位について解析した。

B. 研究方法

RVFPVヌクレオキャプシド蛋白質に対する単クローン抗体の作製（図 1 にフローチャートを示す）：

- 1) RVFPV(MP12株)のヌクレオキャプシド蛋白質(NP)をコードする遺伝子をバキュロウイルス発現用トランスファーベクター pAcYM1 にクローニングし、組換えバ

キュロウイルス作製用プラスミドpAcRVFV-NPを作製した。

- 2) 昆虫細胞Tn5にpAcRVFV-NPとバキュロウイルスAcNPV由来ゲノムをトランスフェクトし、RVFV-NPを発現する組換えバキュロウイルスAcRVFV-NPを得た。
- 3) AcRVFV-NPを感染させたTn5から組換えRVFV-NP蛋白質を精製した。この組換えRVFV-NP蛋白質を抗原としてマウスに免疫し、単クローン抗体G2-36, D5-59, C10-54を得た。

RVFV感染細胞に対する単クローン抗体の反応性の検討：

RVFV-MP12株の感染細胞をスライドグラス上に固定し、単クローン抗体を反応後、蛍光ラベル二次抗体を加え、蛍光顕微鏡を用いて単クローン抗体の反応特性を調べた (図2)。

抗原検出ELISA：

抗原補足抗体として、本研究で作製した単クローン抗体を用いた。ELISAプレート1wellあたり125 ngの単クローン抗体を4℃で固定した。オーバーナイト後、PBS-0.05% tween 20 (PBS-T)でwashし、5%スキムミルクを含むPBS-T (PBS-T-M)を用いて室温で2時間ブロッキングした。次にPBS-Tでwash後、RVFV抗原 (リコンビナントNPあるいはRVFV培養上清をNP40およびUV処理で不活化したものをPBS-T-M希釈したもの)を加え、37℃で1時間インキュベートした。PBS-Tでwash後、ウサギ抗RVFV-NP血清を検出用抗体として加え37℃で1時間インキュベートした。PBS-Tでwash後、HRPラベルした抗ウサギIgG抗体を加え、37℃で1時間インキュベートした。PBS-Tでwash後、HRP基質溶液を加え、30min後の460 nmの吸光度を測定した (図3)。

単クローン抗体のエピトープの解析：

- 1) 得られた単クローン抗体のエピトープを調べるため、RVFV-NPの全長およびNPの欠失体をコードするcDNAを大腸菌用発現ベクターにクローニングした。
- 2) 大腸菌で発現させたRVFV-NP全長および様々な欠失体に対する、単クローン抗体のエピトープをウエスタンブロットで検討した。

C. 結果

RVFV 感染細胞に対する単クローン抗体の反応性：

作製した単クローン抗体を用いた蛍光抗体法により、RVFV 感染細胞に対する反応性を検討した (図4)。単クローン抗体 G2-36, D5-59, C10-54ともに、RVFV 感染 Vero 細胞に反応し、非感染細胞には反応しなかった。これらのことから、いずれの抗体もRVFVに特異的であると考えられた。

抗原検出 ELISA：

作製した単クローン抗体を補足用抗体、ウサギ抗 RVFV-NP 血清を検出用抗体として用いた (図3)。まず、バキュロウイルス発現系で作製した組換え RVFV-NP 蛋白質を精製し、これを抗原として用いたところ、1ng 以下の RVFV-NP でも検出可能であった。一方、同様に作製した南米出血熱ウイルスの組換え NP (Sabia virus NP) は検出されなかった (図5)。次に RVFV-MP12 株の培養上清を抗原として抗原検出 ELISA に用いた。単クローン抗体 D5-59, C10-54, および G2-36 はそれぞれ、31.3, 15.6 および、125 PFU の RVFV を含む培養上清からウイルス抗原を検出できた (図6)。3 種類の

単クローン抗体を MIX して補足抗体として用いた場合でも、同様の感度であった(結果は示さず)。

単クローン抗体の抗原認識部位：

これらの単クローン抗体のエピトープ領域について検討するために、まず、RVFV-NP 全長および 5 種類の欠失体を大肠菌で発現させた(図7)。これらの蛋白質に対する、単クローン抗体の反応性をウエスタンブロットで調べた。単クローン抗体 C10-54 は NP 全長にのみ反応したことから、この抗体は NP 全長を含む高次構造を認識する可能性が考えられた。一方、単クローン抗体 G2-36 および D5-59 は NP の C 末端側領域を認識した。さらに C 末端側の領域を細分化した欠失体を作製し、これらのエピトープについてウエスタンブロットで詳細に検討したところ、G2-36 および D5-59 は NP の C 末端側の 195-201 番目のアミノ酸(TFTQPMN)を認識することが明らかになった(図8)。

データベース上に登録されている RVFV NP のアミノ酸配列をアライメントしたところ、今回明らかになった、G2-36 および D5-59 エピトープはすべての RVFV 株で保存されていた。一方、近縁のフレボウイルス属ではこの部分の配列は異なっていた(図9)。

D. 考察

出血熱を引き起こすウイルスは多くが RNA ウイルスであり、遺伝子変異により、RT-PCR では検出出来ない場合がある。また、これらのウイルスはマクロファージに感染するため、全血からの抗原検出の感度

は、PCR の感度と同等である場合が多い。したがって、抗原検出 ELISA は出血熱ウイルス感染の実験室診断法として重要である。本研究で作製した RVFV-NP に対する単クローン抗体 G2-36, D5-59, C10-54 は蛍光抗体法で RVFV 感染細胞に特異的に反応した。このことから、これらの抗体は RVFV の抗原検出用に有用であると考えられた。単クローン抗体を補足用抗体として用いた抗原検出 ELISA では 1ng 以下の組換え RVFV NP あるいは、15.6-125 PFU の RVFV を検出することができた。これらの単クローン抗体のうち、G2-36; D5-59 のエピトープはすべての RVFV で保存されていた。また、C10-54 は NP 全長に反応した。本研究で作製した単クローン抗体を用いることにより、感度、特異性ともに優れた抗原検出が可能となった。今後は、感染動物材料などを含めた臨床材料を用いて感度、特異性を検討する必要がある。また、RVFV 検出のための RT-PCT 法を構築し、RVFV 感染の実験室診断法の一つとして確立するとともに、その感度、特異性について抗原検出 ELISA との比較を行う予定である。

E. 結論

1. 本研究で作製した RVFV-NP に対する単クローン抗体は、RVFV 抗原に特異的に反応した。
2. 単クローン抗体を補足抗体として用いた抗原検出 ELISA により RVFV を高感度に検出することができた。
3. エピトープの解析から、これらの抗体は RVFV の抗原検出用に有用であると考えられた。

F. 研究発表

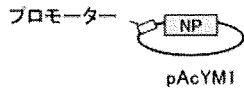
1. 論文発表

1. Kaku Y, Noguchi A, Marsh GA, McEachern JA, Okutani A, Hotta K, Bazartseren B, Fukushi S, Broder CC, Yamada A, Inoue S, Wang LF. A neutralization test for specific detection of Nipah virus antibodies using pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein. *J Virol Methods*. 2009, 160(1-2): 7-13
2. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Ami Y, Fukushi S, Taguchi F, Tsunetsugu-Yokota Y. Neutralizing antibody against severe acute respiratory syndrome (SARS)-coronavirus spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. *Microbiol Immunol*. 2009 Feb;53(2):75-82.
3. 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.
4. Fukushi S, Watanabe R, Taguchi F. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for analysis of virus entry mediated by SARS coronavirus spike proteins. *Methods Mol Biol*. 2008;454:331-8.
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. 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 ,43(1):56-9.
7. 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;172(6):1625-37.
8. 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, 52 (2):118-27.
9. 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, 61(2):140-2.

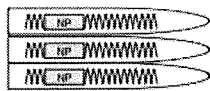
G. 知的財産権の出願・登録状況
現在出願予定はない。

(図1) RVFV-NPに 対するモノクローナル 抗体の作製

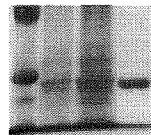
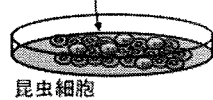
RVFV NP cDNAをバキュロウイルストランスファー
ベクターへクローニング



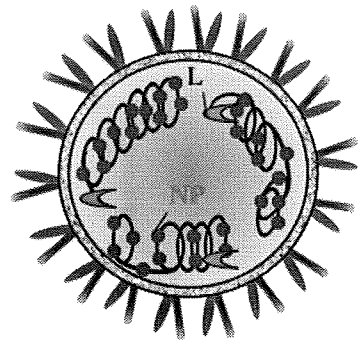
組換えバキュロウイルス作製



昆虫細胞での発現



RVFV-NP
(27kDa)

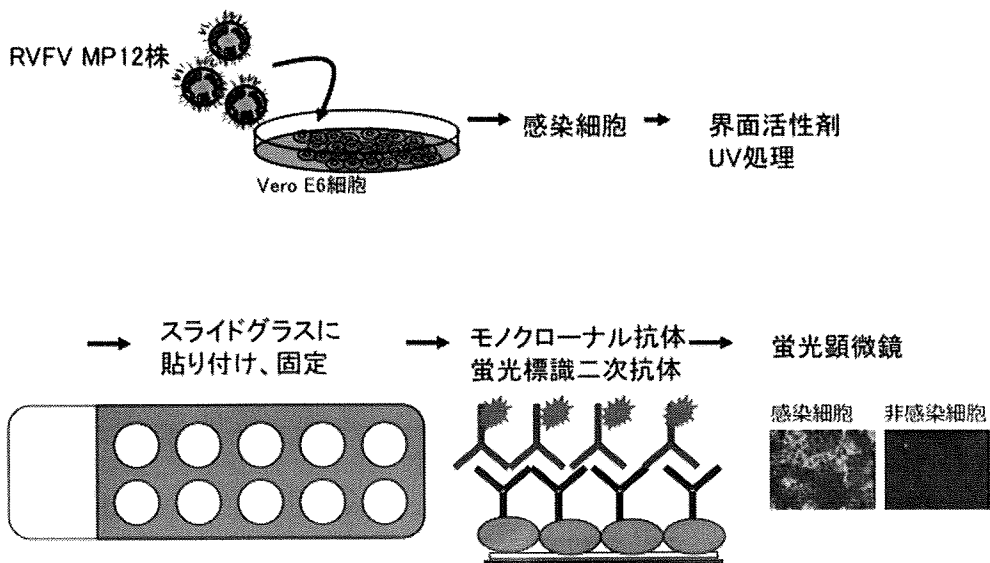


BALB/cマウスへ免疫

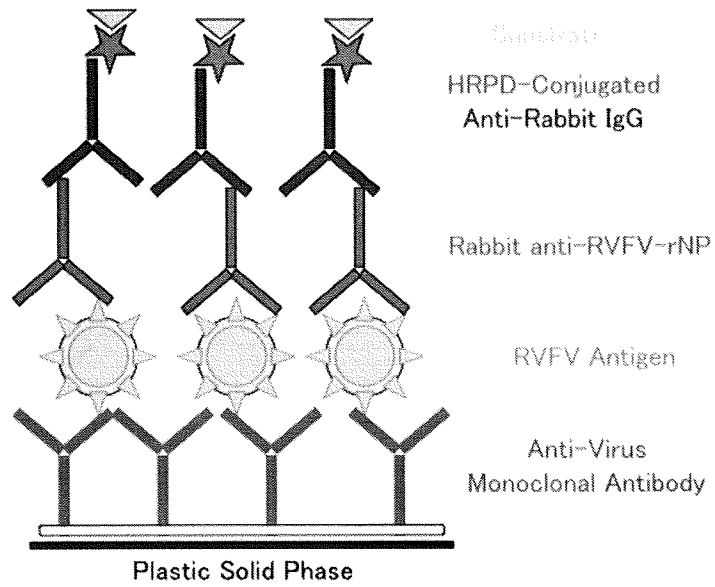
単クローン抗体

G2-36、D5-59、C10-54

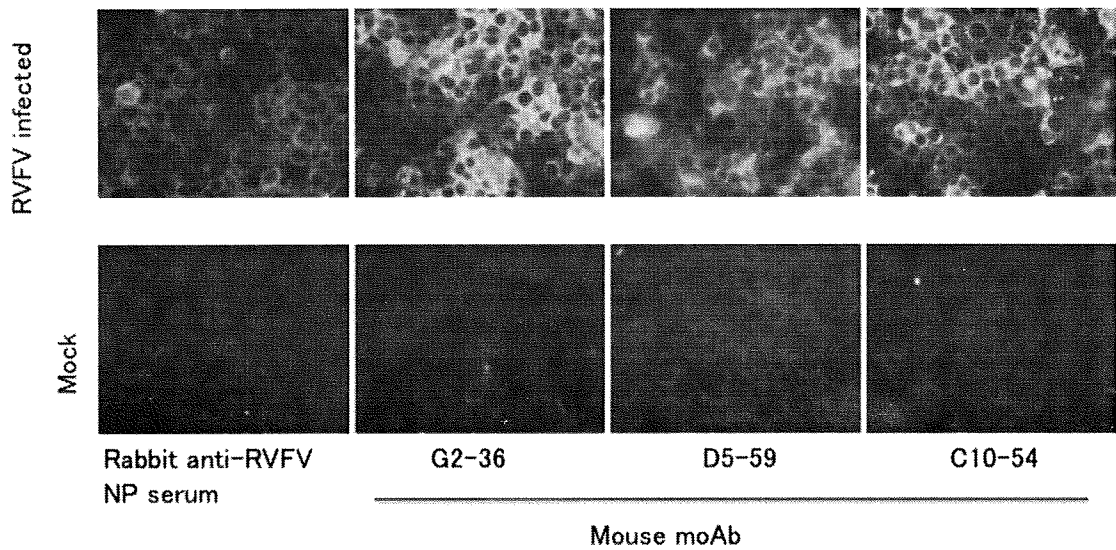
(図2) モノクローナル抗体の反応性(蛍光抗体法)



(図3) Antigen capture-ELISA

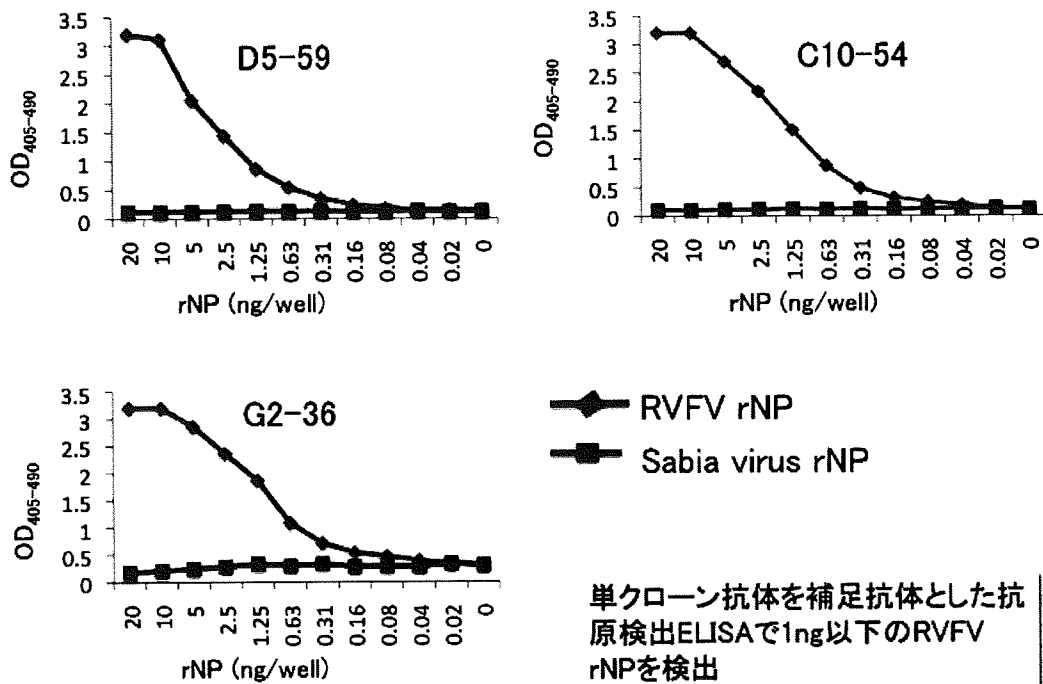


(図4) モノクローナル抗体の反応性-蛍光抗体法-

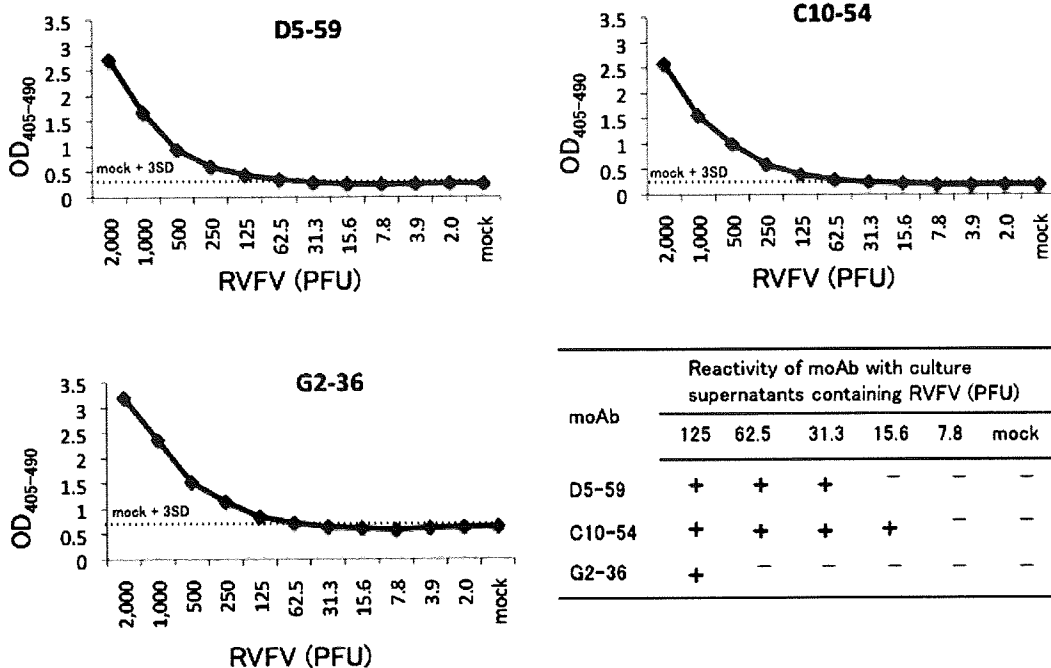


モノクローナル抗体はRVFV感染細胞に特異的に反応した

(図5) 抗原検出ELISA -リコンビナントNP-

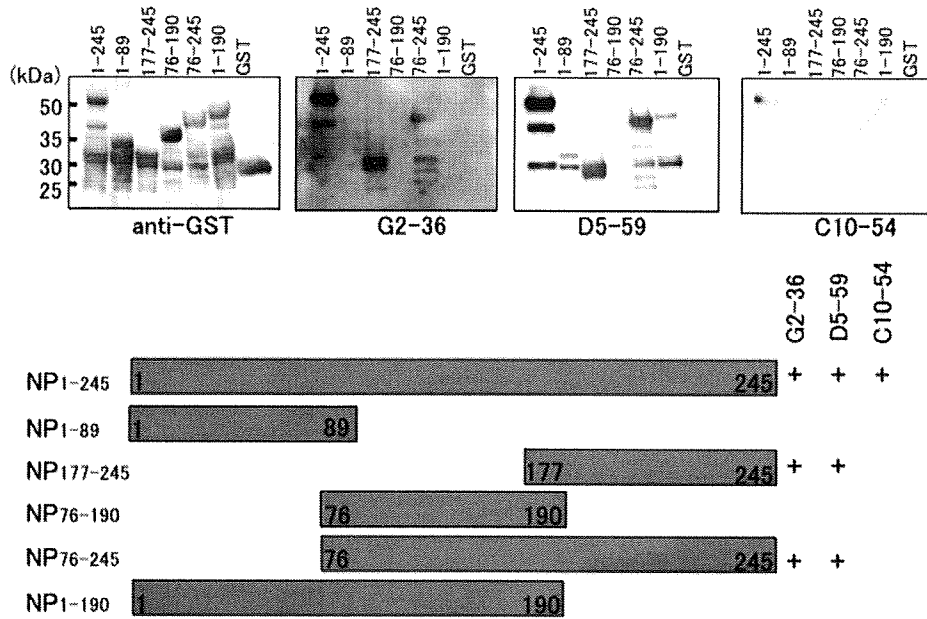


(図6) 抗原検出ELISA -ウイルス培養上清-



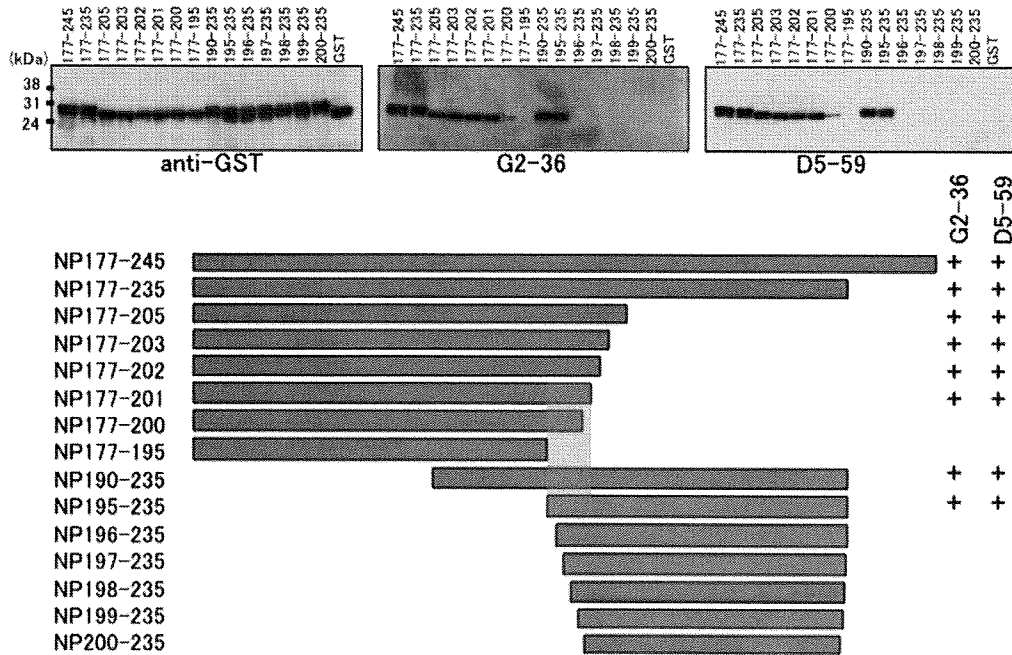
15.6~125 PFUのRVFVを含む培養上清からウイルス抗原を検出

(図7) 単クローン抗体のエピトープ解析 (1)



moAb G2-36およびD5-59はNPのC末端側、C10-54はNP全長に反応した

(図8) 単クローン抗体のエピトープ解析 (2)



moAb G2-36およびD5-59はa.a 195-201(TFTQPMN)を認識

(図9) NPのアミノ酸配列のアライメント

MP12	181	NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	240
ZC3349		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
ZH548		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
ZM657		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
ZS6365		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
HgH824		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
225074		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
T1		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
ZH501		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
ZH1776		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
76370		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
226974		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
HvB375		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
Smitburn		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
AMK6807		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
AMK3837		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
SA51		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
clone13		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
237374		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
CARR1622		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
73Hb1449		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
74Hb59		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
126078		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
Zinga		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
185378		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
Kenya		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
Saudi 2000		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
Kenya83		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
73Hb1230		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
SA75		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
Kenya56		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
OS8		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
OS3		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
OS9		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
OS1		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
ARD38388		NPILRGRTKEEVA	AAVNSHF	ISHEKRRREFLKAFGLVDSI	
Entebbe		NPILRGRTKEEVA	AAVNSSF	ISHEKRRREFLRAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
Kenya57		NPILRGRTKEEVA	AAVNSSF	ISHEKRRREFLRAFGLVDSHGKPSAAVMAAAQA	
		*****		*****	
		MVSLRGAGKRDIEES	LAATMSSFI	DNTQRRAFLTKFGILTSGARATAVYKIIAEV	
		NPSLRITKOPNEIAA	EEKMAAMSGRFF	TREDKDKLLMVGILIHEDLVLTPTAIKCAEK	
		NPSLRITKQAMEVA	EEKMAAMSGRFF	TREDKDKLLIAVGILIDEDLVLASAVVRSAEK	

RVFV

RVFV NPのアミノ酸配列のうち 195TFTQPMN201はすべての株で保存されていた

ほかのフレボウイルス属

SFSV
SFMV
TOSV

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：西アフリカと中央アフリカで流行する致死率の高いウイルス感染症
(ラッサ熱とサル痘ウイルス感染症)に関する研究

研究分担者：西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部第三室・室長）

研究要旨：中央アフリカから西アフリカにかけて流行する比較的致死率の高い感染症で、かつ、輸入感染症対策上重要と考えられるサル痘ウイルス感染症とウイルス性出血熱に関して研究された。霊長類がサル痘ウイルスに感染すると、ヒトにおける天然痘類似感染症（サル痘）を発症する。カニクイザルにおける劇症型サル痘ウイルス感染症の病態を明らかにした。ヒトにおいてもサル痘ウイルス感染症により劇症型ヒトサル痘を発症する可能性が示唆された。サル痘ウイルス感染症のワクチンによる予防に関する基礎研究により、我が国で開発されている高度弱毒化天然痘ワクチン LC16m8 の霊長類におけるサル痘発症予防効果は認められるものの、extracellular enveloped virion (EEV) 関連蛋白のひとつである B5R 膜蛋白が誘導する免疫がサル痘発症には重要であることも示された。ナイジェリア国北部の住民における出血熱ウイルスの中でも、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、リフトバレー熱ウイルスに対する抗体保有状況（血清疫学）を明らかにした。ラッサウイルス抗体、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス抗体、そして、リフトバレー熱ウイルス抗体保有率は、それぞれ 21%、3%、38%であった。同国北部人々の 5 人に一人は、ラッサウイルス感染の既往があることが明らかにされた。また、リフトバレー熱ウイルス感染症も流行している可能性が示唆された。

研究協力者：森川茂、網康至¹、永田典代²、
長谷川秀樹³、倉根一郎
(同 ウイルス第一部、¹実験動物管理室、²
感染病理部、³インフルエンザセンター)

A. 研究目的

サル痘は、霊長類における天然痘様疾患として 1958 年に初めて報告された。サル痘の病原体であるサル痘ウイルスは、天然痘の病

原体である痘瘡ウイルスと同様に、ポックスウイルス科オルソポックスウイルス属に分類される 2 本鎖 DNA ウイルスである。ヒトのサル痘ウイルス感染症（ヒトサル痘）は、1970 年にコンゴ民主共和国（旧ザイール）において天然痘様疾患としてはじめて報告された。中央アフリカおよび西アフリカにおいてヒトサル痘が流行している。サル痘ウイルスはコンゴ盆地型と西アフリカ型に分類

され、前者の病原性は後者のそれよりも高く、コンゴ盆地型サル痘ウイルスによるヒトサル痘では致死的な場合がある。2003年にアメリカ合衆国において、ヒトサル痘がアフリカ大陸以外で初めて流行した。この流行は、サル痘ウイルスの宿主であるげっ歯類がペット用にアフリカからアメリカ合衆国に輸出され、それがサル痘ウイルスに感染していて、そのげっ歯類から、同一個所で飼育されていたプレーリードッグに感染が拡がり、感染プレーリードッグからさらにヒトへ感染が拡大したことによる。このことは、ヒトサル痘は対策の必要な輸入感染症のひとつであることを示している。また、ヒトサル痘の臨床症状は天然痘と類似しているため、天然痘によるバイオテロの脅威に直面している現在、天然痘との鑑別診断の重要性が指摘されている。本研究では、カニクイザルにおける劇症型サル痘の病態を明らかにして、ヒトにおけるサル痘ウイルス感染症に関する診断と治療、予防に関する知見を得た。また、カニクイザルのサル痘ウイルス感染症における intracellular mature virion (IMV) や extracellular enveloped virion (EEV) 関連する蛋白に対する抗体応答について、プロテオミック解析を用いて明らかにした。さらに、天然痘ワクチン 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解析し、EEV 関連蛋白のひとつである B5R のサル痘発症予防における重要性を評価した。

ウイルス性出血熱には、エボラ出血熱、マールブルグ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、

ラッサ熱が含まれ、これらのウイルス感染症の多くはアフリカで流行している。中でもラッサ熱はアフリカ中央部から西アフリカに広く分布するウイルス性出血熱である。本研究では西アフリカにおけるウイルス性出血熱に関する疫学調査を通じて、同地域におけるラッサ熱をはじめとするウイルス性出血熱の流行状況とラッサ熱流行地におけるラッサ熱感染因子を明らかにした。

B. 研究方法

1) 敗血症を伴った劇症型サル痘に関する解析：

ウイルスは、国立感染症研究所に保存されているサル痘ウイルス Liberia 株（西アフリカ型）を用いた。研究対象は、感染 10 日目に急激に衰弱し、安楽殺された Liberia 株感染サル（劇症型個体、ID 番号：#4567）である。サル痘ウイルス皮下接種後、食餌摂取量、体重、体温、糞便性状等、臨床症状を観察した。また、経時的に全身麻酔下で約 5ml の末梢血液が採取され、末梢血液検査、生化学的検査、ウイルスゲノム血症レベル、末梢血液からのウイルス分離、病理学的検査が施行された。ワクチニアウイルスを抗原とした IgG-ELISA により、この個体における IgG 抗体反応の推移も解析された。安楽殺された後に、病理学的解析も実施された。

2) 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と EEV 関連蛋白に関する研究：

8 頭 [非ワクチン群 (コントロール, 3 頭),

LC16m8 免疫群 (3 頭), Lister 免疫群 (2 頭)] のカニクイザルが使用された。Lister は天然痘ワクチン(ワクチニアウイルスのひとつの株)で, LC16m8 は Lister 株をもとに作製された高度弱毒化天然痘ワクチンである。尚, 本感染実験は, 国立感染症研究所村山庁舎の高度安全研究施設内で実施された。各個体におけるサル痘ウイルス感染後の IMV および EEV 蛋白に対する抗体応答は, プロテオミック解析法によった。その詳細は, 以下に説明される。抗原コーティング用スライド [FASTTM slides (Whatman)] に, in-vitro translation システム (RST, Roche Diagnostics) を用いて発現されたワクチニアウイルスの IMV および EEV 関連蛋白(組換え蛋白)を固定し, 抗原(プロテオームチップ)とした。プロテオームチップは, 蛋白ブロッキング液で 30 分間処理し, 次いで被験血清と反応させ, さらに, 結合した抗体をビオチン化ヤギ抗-ヒト IgA + IgG + IgM (H+L) 抗体 (Jackson Immunolabs) で標識した。続いてストレプトアビジン標識-PBXL3 を結合抗体と反応させ, ScanArray Express HT (Perkin Elmer)を用いて蛍光強度を検出した。

3) ナイジェリア北部のラッサウイルス, クリミア・コンゴ出血熱, リフトバレー熱ウイルス感染症の血清疫学:

ラッサウイルス, クリミア・コンゴ出血熱ウイルス, および, リフトバレー熱ウイルスの組換え核蛋白(それぞれ, LASV-rNP, CCHFV-rNP, RVFV-rNP)をそれぞれ抗原とした IgG-ELISA 法を用いて, マイドウーグ

リ大学生命科学学部微生物学教室および同大学付属病院に本研究目的のために, マイドウーグリ市およびラッサ村, ビュー市の住民から採取され保管されていた血清 (240 検体)のこれらのウイルスに対する抗体保有率を明らかにした。

(倫理面からの配慮について)

動物愛護の立場に配慮し, 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, ナイジェリアにおける出血熱ウイルス感染症の血清疫学に関する研究は, マイドウーグリ大学生命科学学部微生物学教室との共同研究として実施された。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ている。

C. 研究結果

1) 敗血症を伴った劇症型サル痘に関する解析:

劇症型サル痘発症個体では第 9 病日まで約 5%の体重が低下した。劇症型個体の皮膚には, 水疱や膿疱の伴わない紅斑性病変が出現した。第 3 病日にはウイルス血症が認められ, その後ウイルス血症レベルが高まり続け, 第 9 病日には約 10^9 コピー/ml にまで達した。第 10 病日には IgG 抗体の上昇は確認されなかった。病理学的解析では, 中枢神経組織, リンパ系臓器, 消化器臓器, 呼吸器臓器, 内分泌組織, 循環器臓器, 泌尿生殖器系臓器全てにおいてウイルス抗原が認められた。炎症性細胞の浸潤は全く認

められなかった。さらに、肺臓、肝臓、心臓、腎臓などの主要な臓器に、グラム陽性球菌からなる菌塊が存在することが確認された。

2) 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とEEV関連蛋白に関する研究：

非ワクチン群のカニクイザルでは、サル痘ウイルス感染症は致死的であり、ウイルス接種部位には直径 10cm 程度のひどい潰瘍性病変が認められた。LC16m8 免疫群の個体のウイルス接種部位には軽い潰瘍性病変が認められ、Lister 免疫群では潰瘍性病変は認められなかった。LC16m8 免疫群における抗体陽性であった EEV 関連蛋白 (F13L, A33R, A34R, A36R, B5R) は、F13L と A33R であり、一方 Lister 免疫群の場合は、F13L, A33R, B5R であった。非ワクチン群においては、全ての EEV 関連蛋白および IMV 関連蛋白 (L1R, H3L, D8L, A13L, A17L, L5R) 全てに対する抗体の誘導が確認された。LC16m8 免疫群と Lister 免疫群両群の個体にサル痘ウイルスを感染させると、EEV 関連蛋白のすべてに強い抗体誘導が認められた。ワクチン接種両群の個体にサル痘ウイルスを感染させると、EEV 関連蛋白のすべてに強い抗体誘導が認められた。LC16m8 免疫群で誘導される EEV 関連蛋白抗体の程度は、Lister 免疫群のそれらよりもより高い値を示した。

3) ナイジェリア北部のラッサウイルス、ク

リミア・コンゴ出血熱、リフトバレー熱ウイルス感染症の血清疫学：

ラッサウイルスに対する抗体保有状況。約 20%の住民から採取された血清がラッサウイルス抗体陽性を呈した (図 1A)。クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対する抗体保有状況。約 3%の住民から採取された血清がクリミア・コンゴ出血熱ウイルス抗体陽性を呈した (図 1B)。リフトバレー熱ウイルスに対する抗体保有状況。約 40%の住民から採取された血清がリフトバレー熱ウイルス抗体陽性を呈した (図 1C)。ラッサ村でのラッサ熱流行に関連すると考えられる住民の生活環境。ラッサ村に生活する住民の居住区には、通常穀物保管倉庫が設置されている (図 2)。通気をよくするために、側壁の下部にいくつもホールが開けられている (天井部にもホールが開けられている)。

D. 考察

劇症型個体においては、病理学的解析によりグラム陽性球菌菌塊が主要な臓器に存在することが明らかにされた。Liberia 株感染自体が劇症型サル痘を発症させた可能性も否定できないが、敗血症を合併したことが劇症型サル痘を発症させたことの原因であると考えられる。ウイルス血症レベルは極めて高く、また、全身臓器にウイルス抗原が確認された。特に中枢神経臓器、心筋細胞や肝細胞、そして、尿細管細胞、等にサル痘ウイルス抗原が認められたことは、極めて特異的で興味深い所見である。天然痘には、致死率の高い全身感染症 (出血型や扁平型) の病型が

知られている。これらの病型では細菌感染症の合併している場合が多い。つまり本症例における解析結果は、天然痘における扁平型や出血型の病態を反映する可能性を示している。

霊長類におけるサル痘ウイルス感染症は、ヒトにおける天然痘のモデルとして最も信頼性のあるものとして考えられている。現在、天然痘関連バイオテロリズムの危険性が指摘されている。また、サル痘ウイルスによるヒト感染症、いわゆるヒトサル痘が天然痘類似疾患としてアフリカにおいて流行している。このような状況では、天然痘ワクチン研究は現在でも重要である。本研究では、1) 霊長類のサル痘ウイルス感染症におけるIMVおよびEEV関連蛋白に対する抗体応答、2) 天然痘ワクチンLC16m8またはLister株接種既往のあるカニクイザルのサル痘ウイルス感染症におけるIMVおよびEEV関連蛋白に対する抗体応答、を明らかにした。LC16m8接種においては、B5R膜蛋白に対する抗体は誘導されないことが確認された。また、感染防御に重要なEEV関連蛋白およびIMV関連蛋白の反応パターンはB5R膜蛋白への反応以外には、差が認められなかった。LC16m8免疫群個体におけるウイルス血症レベルがLister免疫群個体のそれよりも有意に高く、また、サル痘ウイルスチャレンジ部位にLister免疫群個体では潰瘍性病変が認められなかったのに対して、LC16m8免疫群個体では軽い病変が認められた。これらの成績は、LC16m8にはサル痘や天然痘の予防に有効ではあるものの、これらの感染症発症予防

におけるB5Rに対する免疫誘導の重要性が明らかにされた。

ナイジェリア国北部の住民は、比較的高頻度にラッサウイルスに感染している事実が明らかにされた。これらの事実は、ラッサウイルス感染症の多くは、致死的な感染症を呈することなく、無症候性であったり、症状があったとしても比較的軽い症状で治癒すること例が多いことを示唆している。ラッサ村では、10月から翌年1月の乾期にラッサ熱が流行する。住民の生活環境を視察して、ラッサ熱の流行について考察すると、乾期に入るとラッサウイルスの宿主であるネズミ(Mastomys Natalensis)が餌をもとめて居住空間、特に穀物保管庫に侵入するものと考えられた(図2)。保管庫内部はラッサウイルスが含まれる尿などに汚染され、そのことにより生活している人々のラッサウイルス感染リスクが高まるものと考えられた。ただし、ナイジェリア北部(マイドゥーグリ市の住民を含めて)の多くのヒトがラッサウイルスに感染していることから、上記の感染リスクは多くのリスクの中のひとつと考えられる。クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対する抗体保有率は約3%であった。クリミア・コンゴ出血熱ウイルス抗体検出システム自体の精度と感度を勘案すると、今回の成績はクリミア・コンゴ出血熱ウイルスに感染しているヒトはほとんどいないことを示唆している。ナイジェリア国では、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスが過去に分離されていることから、今後、ヒツジなどの哺乳動物におけるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対する抗体保有

状況を明らかにすること、ダニからのウイルス遺伝子検出などの研究が重要になると考えられる。リフトバレー熱ウイルスに対する抗体保有率は約40%であった。この成績は、西アフリカにおいてもリフトバレー熱ウイルス感染症が広くまん延していることを示唆している。ただし、今回の研究で用いられた RVFV-rNP を抗原とした IgG-ELISA の同ウイルス抗体検出における精度と感度が明らかにされていないことから、西アフリカにおけるリフトバレー熱ウイルス感染症の疫学を明らかにするには、さらなる研究が必要である。

E. 結論

本研究では、霊長類のサル痘ウイルス感染症における IMV および EEV 関連蛋白に対する抗体応答、天然痘ワクチン LC16m8 株または Lister 株接種既往のあるカニクイザルのサル痘ウイルス感染症における IMV および EEV 関連蛋白に対する抗体応答、を明らかにした。サル痘や天然痘の予防における B5R に対する免疫誘導の重要性を示した。

一方、ナイジェリア国北部の住民におけるラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、リフトバレー熱ウイルスに対する抗体保有状況（血清疫学）を調査した結果、それぞれ 21%、3%、38%であった。同国北部人々の 5 人に一人は、ラッサウイルス感染の既往があり、リフトバレー熱ウイルス感染症も流行している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iizuka, I., Saijo, M., Shiota, T., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Ogawa, M., Nakauchi, M., Kurane, I., Mizuguchi, M., Morikawa, S.: Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *J. Med. Virol.* 80:1102-1108, 2009
- 2) 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 nonhuman primates. *J. Gen. Virol.* 90:2266-2271, 2009
- 3) Nakauchi, M., Fukushi, S., Saijo, M., Mizutani, T., Ure, A.E., Romonowski, 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.* 16:1132-1138, 2009
- 4) Saijo, M.: Emerging and re-emerging infection threats to society. *J. Disaster Res.* 4:291-297, 2009

- 5) 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
- 6) Morimoto, K., Saijo, M.: Imported rabies cases and preparedness for rabies in Japan. *J. Disaster Res.* 4:346-357, 2009
- 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.* 43:56-59, 2008
- 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) 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
- 10) 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
- 11) Saijo, M., Suzutani, T., Mizuta, K., Kurane, I., Morikawa, S.: Characterization and susceptibility to antiviral agents of herpes simplex virus type 1 that codes a unique thymidine kinase gene with an amber codon between the first and the second initiation codons. *Arch. Virol.* 153:303-314, 2008
- 12) Saijo, M., Ami, Y., Suzuki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Fukushima, 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.* 61:140-142, 2008
- 13) 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 coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Am. J. Pathol.* 172:1625-1637, 2008
- 14) Ami, Y., Nagata, N., Shirato, K., Watanabe, R., Iwata, N., Nakagaki, K., Fukushima, S., Saijo, M., Morikawa, S., Taguchi, F.: Co-infection of respiratory bacterium with SARS coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Infect. Microbiol.* 52:118-127, 2008
- 15) Shirato, K., Nishimura, H., Saijo, M., Okamoto, M., Noda, M., Tashiro, M., Taguchi, F.: Diagnosis of human respiratory syncytial virus infections using reverse transcription loop-mediated isothermal

- amplification (RT-LAMP). *J. Virol. Methods* 139:78-84, 2007
- 16) Ike, F., Bourqade, B., Sato, H., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S., Yamada, Y., Jaubert, J., Berard, M., Nakata, H., Hiraiwa, N., Mekada, K., Takakura, A., Itoh, T., Obata, Y., Yoshiki, A., Montagutelli, X.: LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. *Comp. Med.* 53:272-281, 2007
- 17) Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushima, 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 in F344 rats infected with SARS coronavirus. *J. Virol.* 81:1848-1857, 2007
- 18) 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.* 152:1763-1765, 2007
- 19) 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 Resoton). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis* 30:391-398, 2007
- 20) Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., Romanowski, V., Fukushima, S., Mizutani, T., Georges, A.J., Kurata, K., Kurane, I., Morikawa, S.: Recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever: development of diagnostic assays, which do not require infectious virus for antibody and antigen detection. *Clin. Vac. Immunol.* 14:1182-1189, 2007
- 21) Fukushima, S., Mizutani, T., Sakai, K., Saijo, M., Taguchi, F., Yokoyama, M., Kurane, I., Morikawa, S.: Amino acid substitutions in S2 region enhance SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells. *J. Virol.* 81: 10831-10834, 2007
- 22) Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I.: Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30:375-389, 2007
- 23) 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 virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. *International J. Exp. Pathol.* 88:403-414, 2007
2. 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,