

201028038A

厚生労働科学研究費補助金

平成22年度

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の
診断等の対応方法に関する研究

(H22—新興—一般—006)

平成22年度 総括・分担研究報告書

平成23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22年度

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の
診断等の対応方法に関する研究

(H22—新興—一般—006)

平成22年度 総括・分担研究報告書

平成23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	
現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の診断等の 対応方法に関する研究	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. 新種アレナウイルス性出血熱の診断法、モルビリウイルス、ポックスウイルスの 宿主域拡大の解析	8
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と病原性の分子機構の解明	17
研究分担者：甲斐知恵子（東京大学医科学研究所）	
3. 新種エボラウイルスや新種アレナウイルス等の診断法	21
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. 出血熱ウイルスの治療・予防法の確立に資する粒子形成、出芽機構の解析	28
研究分担者：安田二郎（長崎大学熱帯医学研究所新興感染症学分野）	
5. 南米 HPS ウイルスと齧歯類ポックスウイルスの診断法と分子疫学	37
研究分担者：有川二郎（北海道大学大学院医学研究科）	
6. トガリネズミ目のハンタウイルスの診断系確立と国内の感染状況の把握	45
研究分担者：新井 智（国立感染症研究所 感染症情報センター）	
7. ナイジェリア等でのウイルス性出血熱の血清疫学調査	49
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. 変異や新型のウイルス出現に対応可能なウイルス遺伝子検出法の開発	55
研究分担者：水谷哲也（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
9. 新種、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	64
研究分担者：遠藤大二（酪農学園大学獣医学部放射線学）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	78

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の
診断等の対応方法に関する研究

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：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、南米出血熱の原因ウイルスは特定1種病原体であり、国内では法的にもレベル4病原体であるためBSL4施設以外ではウイルスが取扱えない。新種の出血熱ウイルスのうちブンディブギョエボラウイルス、チャパレウイルスは、感染症法の改正に伴い特定1種病原体に指定されることになった。また、重篤な新興ウイルス感染症でも新種ウイルス（新種のフレボ、ルジョ、ニパ、ハンタ、牛痘、LCMウイルス）の同定や、動物への感染が拡大している。これらの診断体制は、既知のウイルス種に関してはほぼ確立しているが、新種ウイルスの発見に伴い、診断法の改良や新規診断法の開発が必要である。さらに、感染宿主域を拡大しているウイルスに関しては、その疫学や宿主域拡大に係る機構と病原性に関して明らかにし、人への感染拡大のリスク評価を行う必要がある。本研究では、新種の出血熱ウイルス等の実験室診断法を確立する。また、新興するウイルス感染症に対応可能な遺伝子検出法を改良し高感度化する。これらを用いていくつかの地域で疫学的解析を実施して検証する。また宿主域を拡大しているウイルスでは、その機構を解明し、新興ウイルス感染症として顕在化するかをリスク評価する。また、ウイルス粒子形成とその阻害法に関する基礎研究を進展させる。本年度は、3年計画の1年目として以下の研究を行った。

A. 診断法の開発・改良と疫学的解析：チャパレウイルス（ポリビア）、ルジョウイルス（ザンビア・南ア）、ブンディブギョエボラウイルスの診断法の改良と開発を行った（森川、高田、安田）。ラッサウイルスの迅速・簡便な検出法としてRT-LAMP法を開発した（安田）。ニパウイルスおよび近縁のヘンドラウイルスの迅速診断法として、RT-Smart-Amp法を開発した（甲斐）。国内外のトガリネズミ類からハンタウイルスを検出し、分子疫学的解析をした（新井、有川）。国内のドブネズミの牛痘ウイルス抗体調査を行なった結果、陽性個体は検出されなかった（森川、西條、有川）。ウイルス遺伝子検出法の改良、至適化を検討した（水谷、遠藤）。

B. ウイルス学的、分子生物学的解析：サルインフルエンザウイルス感染症から分離されたCDVのサルに対する病原性にSLAM指向性の馴化が不要であることを明らかにした（森川）。細胞性因子テザーリンに対するアンタゴニスト機構をナイロウイルス（ブニヤ）が持つ可能性が示唆された（安田）。

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（長崎大学熱帯医学研究所新興感染症学分野教授）
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）

西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部部長）
水谷哲也（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）
遠藤大二（酪農学園大学獣医放射線学教授）
新井智（国立感染症研究所感染症情報センター主任研究官）

A. 目的：

稼働している BSL4 がない日本では、ウイルス性出血熱等の診断体制は、遺伝子検出、抗原検出法、遺伝子組換えで作製した抗原による血清診断法を逐次整備し、患者発生に備えている。整備した検査系も、ウイルスの変異や新種ウイルスの出現の最新情報を入手し対応手段の向上を図る必要がある。この数年間に新興した出血熱ウイルスには、チャパレ（ボリビア）、ルジヨ（ザンビアと南ア）、ブンディブジョエボラウイルス（ウガンダ）等がある。このような新興ウイルス性出血熱の発生以外にも、ブタのレストンエボラウイルス感染症、サルのモルビリウイルス感染症、欧州でのヒトや動物園動物での新種の牛痘(cowpox)ウイルス感染症の発生と流行等、これまで想定されていない宿主動物での感染が相次いでいる。また、ハンタウイルスでは新たな自然宿主としてトガリネズミ目野生動物が発見された。このように、宿主域を拡大する、あるいはその可能性が指摘されているウイルスが、ヒトへ感染が拡大し致死的な新興ウイルス感染症として顕在化するか否かのリスク評価や、病原性を予測するためには、これらのウイルスの宿主領域を拡大する分子機構を分子生物学的・ウイルス学的に解明することが必要である。さらに、流行地やウイルス分布の想定される地域での分子疫学、血清疫学的解析も、これらのリスク評価をする上で重要である。これらを明らかにするために以下の研究を実施する。

1. 診断法の開発・改良と疫学的解析

- 1) 新種のエボラウイルス（ブンディブジョエボラウイルス）と新種のアレナウイルス（アフリカのルジヨウイルスと南米のチャパレウイルス）の診断法の

開発・改良

- 2) 豚のレストンエボラウイルス感染症の血清診断法の確立
- 3) 南米ハンタウイルス、トガリネズミ目ハンタウイルスの診断法の開発・改良
- 4) 変異ウイルス・新種ウイルスに対応可能な遺伝子検出法の改良
- 5) 国内の齧歯類での cowpox ウイルス感染状況の疫学的解析
- 6) ナイジェリアでのラッサ及びその他のウイルス性出血熱血清疫学
- 7) 国内のトガリネズミ目でのハンタウイルス感染の疫学的解析

2. 宿主域拡大・病原性獲得のメカニズムの解明

- 1) サルのモルビリウイルス (CDV) のサルへの馴化と病原性獲得の分子機構の解明
- 2) ニパウイルスの病原性の分子機構の解明
- 3) クリミア・コンゴ出血熱ウイルス等の粒子形成・出芽機構の解析とその阻害法開発の基礎研究

B. 研究方法：

1) 診断法の開発・改良と疫学的解析：

ブンディブジョを含む全てのエボラウイルスを検出可能な RT-PCR 法を確立した。実験感染動物組織等からの検出等を行い有用性を検証した。また、全てのエボラウイルス種間共通エピトープを認識する標識した単クローナル抗体を用いて競合 ELISA 法による特異性の高い抗体検出法を開発した。さらに、豚のレストンエボラウイルス感染症の血清診断法を確立した。

既知の旧世界アレナウイルスに、新興したルジヨウイルス遺伝子配列情報を加

えて、L 遺伝子を標的とする RT-PCR 法を開発した。これを用いてザンビアで捕獲されたげっ歯類からのアレナウイルス遺伝子検出を試みた。ラッサウイルスでは、RT-LAMP 法を開発した。南米出血熱の原因ウイルスとして新興したチャパレウイルスとアフリカで新興したルジョウウイルスによる出血熱の血清診断法を開発した。ルジョウウイルスでは NP に対する単クローナル抗体を作製し診断法に応用する。アルゼンチン出血熱患者結成を用いて、その原因ウイルスであるフニンウイルスの代替えウイルス中和試験法の評価と他の南米出血熱原因ウイルスとの交差中和能を明らかにした。

ニパ、ヘンドラウイルスでは、迅速診断法として、RT-Smart-Amp 法を開発した。

近年欧州で流行している牛痘ウイルス感染症の国内の齧歯類での感染状況の疫学調査を実施し、そのリスクを考察した。

トガリネズミ目ハンタウイルスの国内での疫学調査を実施した。

新種ウイルス発生時や新興ウイルス感染症発生時の迅速な原因ウイルスの同定のため、これまでに開発された変異ウイルス・新種ウイルスに対応可能な遺伝子検出法の改良を行った。

ナイジェリア北部でのクリミア・コンゴ出血熱のダニ、羊等の疫学調査を行い、当該感染症の発生リスクを考察した。

2. 宿主域拡大・病原性獲得のメカニズムの解明

本年度は、サルに致死性感染症をおこした CDV の病原性と宿主域拡大のウイルス側の変異等の原因究明を目指した。

宿主抵抗性因子の一つであるテザーリンのザイルエボラウイルスとレストンエボラウイルスに対する効果を比較した。さらに、クリミア・コンゴ出血熱ウイル

スに近縁なハザラウイルスに対する抗ウイルス作用を解析した。

C. 結果：

1) 診断法の開発・改良と疫学的解析：

(1) エボラ、マールブルグウイルスの診断法：

ブンディブギョエボラウイルスを含む既知の全てのフィロウイルスの遺伝子塩基配列を比較し、相同性の高い領域を NP 遺伝子から選択し、新たにデザインしたプライマーセットによる RT-PCR を開発した。この RT-PCR 法で全てのエボラおよびマールブルグウイルス遺伝子を高感度で検出できた。また、これまでフィロウイルスの検出に用いられてきたプライマー (Filo AB) では効率的に検出できなかったウイルス種も高感度に検出できた。ザイルエボラウイルス感染マウスの臓器やマールブルグウイルス (アンゴラ株) 感染患者の血液から効率よくウイルス遺伝子が検出された。

これまでに全てのフィロウイルス組換え GP を用いた鑑別 ELISA 法を開発したが、より特異度の高い抗体検査法を開発するため、全てのエボラウイルス種間共通エピトープを認識する単クローナル抗体 (42/3.7) をペルオキシダーゼ標識し、これを用いて競合阻害による血清中の抗体によるを検出する ELISA を作製した。

フィリピンの養豚場でレストンエボラウイルス感染症が確認されたことを受け、豚の当該ウイルス感染症の血清診断法を確立した。これらは、NP 特異的 IF および ELISA 法、GP 特異的 IF および ELISA 法、代替え中和法からなる。レストンエボラウイルス流行のあった養豚施設の豚血清 215 検体分を用いて、各血清診断法

を実施した結果、多くの検体で NP 及び GP 抗体が検出された。

(2) アレナウイルスの診断法：

既知の旧世界アレナウイルスにルジョウイルスの遺伝子塩基配列を比較した結果、L 遺伝子に相同性の高い領域を見だし、プライマーセットをデザインした。これらのプライマーセットを用いて、ザンビアで捕獲したげっ歯類動物からアレナウイルスの検出を試みた結果、新種のアレナウイルスの遺伝子をマストミスから検出できた。

ラッサウイルスは遺伝的多様性が高い。しかし、ラッサウイルスの系統内では比較的遺伝し配列が保存されている。そこで、シエラレオネ系統用、ナイジェリア北東部系統用の RT-LAMP 法を開発できた。種々の出血熱ウイルスを対象に RT-LAMP を実施した結果、いずれも 20 分以内に高感度・高精度にラッサウイルス遺伝子を検出できた。

ルジョウイルスの組換え NP を抗原とする IF と IgG-ELISA 法を開発し、免疫血清を用いて交差反応性を調べた。その結果、ルジョウイルス NP 免疫血清は、ラッサウイルスとはやや交差するが LCM ウイルスとは弱く交差した。逆にラッサウイルス NP 免疫血清や LCM ウイルス NP 免疫血清は、ルジョウイルスに比較的強く交差した。マウス免疫血清では、交差は弱かった。一方、ルジョウイルス NP に対する単クローナル抗体は 8 クローン全てがルジョウイルス特異的でラッサウイルス等とは全く交差しなかった。

南米出血熱の中で最も患者の多いアルゼンチン出血熱患者血清パネルを用いて、これまで開発した南米アレナウイルス抗体検査法を評価した。その結果、IF、IgG-ELISA、代替え中和法の全てが高感

度・精度であった。このパネル血清を用いて、フニンウイルス以外の南米アレナウイルスの VSV シュードタイプとの交差性を調べた結果、全く交差中和せず、ウイルス種特異的であることが分かった。

(3) 齧歯類由来の牛痘ウイルス感染症の国内の齧歯類の血清疫学：

牛痘ウイルス抗原を用いた IgG-ELISA と牛痘ウイルス感染細胞を用いた IFA を作製し、検疫所から分与された 2005 年から 2010 年にかけて国内で捕獲された 739 匹のラット血清（大部分がドブネズミ血清）を調べたが全て陰性であった。英国やドイツの調査では、齧歯類の抗体保有率は 10%以上であることから、本システムの抗体検出感度が低い可能性も否定はできないが、国内での牛痘発生リスクは低いと考えられる。

(4) ニパ、ヘンドラウイルス検出法：

ニパ、ヘンドラウイルスの NP 遺伝子を標的とする RT-Smart-Amp 法を開発した。本法は、原理的には RT-LAMP 法と類似している。その結果、それぞれ 600, 6,000 コピーの感度で遺伝子が検出された。また、他のパラミクソウイルス等とは反応せず特異度は高かった。ニパウイルス実験感染サル口腔スワブ、リンパ節、心臓、肺、脾臓から効率よくウイルス遺伝子が検出された。

(5) 変異や新型のウイルス出現に対応可能なウイルス遺伝子検出法：

新興ウイルス感染症発生時に迅速に病園ウイルスを同定するための遺伝子検出法を確立することを目的に、2つのアプローチで研究を行った。ウイルスの網羅的検出法 (Rapid Determination system of Viral nucleic acid sequences; RDV 法) を改

良し未同定の分離ウイルスを対象に実施した結果、野生のコウモリから新規ヘルペスウイルス、野生のイノシシから新規ラドウイルス等を検出・同定できた。また、ウイルス感染臓器からウイルスを網羅的に検出することを目的として、RDV法とサブトラクション法を組み合わせた方法を開発した。

いっぽう、既知のウイルス遺伝子配列情報から、より広範囲にウイルス遺伝子を検出できるプライマー設計法 CoCoMo を改良した。その結果、データベースを設計用に調整することにより、当該プライマー設計プログラムを任意のウイルス科で実施可能にした。また、ホットスタート耐熱ポリメラーゼの利用とアニーリング温度の調整により、 $10^0 \sim 10^1$ コピーの人工合成されたウイルスゲノム断片を鋳型についてそれぞれ 30 種中 26 種および 18 種のウイルスで PCR 産物が確認された。

(6) ナイジェリア北部でのクリミア・コンゴ出血熱の調査

ナイジェリア国北部の畜殺場に集められるヒツジにおけるクリミア・コンゴ出血熱の血清疫学を行った結果、ヒツジ血清 121 検体中 1 検体がクリミア・コンゴ出血熱ウイルス抗体陽性であった。また、ヒツジから採取したダニの 48 プールの全てが nested RT-PCR で当該ウイルス遺伝子陰性であった。ナイジェリア国北部の住民のクリミア・コンゴ出血熱ウイルス抗体保有率は約 3% と低いことから、ウイルスは存在するが流行リスクは低いと考えられた。

2. 宿主域拡大・病原性獲得のメカニズムの解明

(1) サルに致死感染をおこしたイヌジステンパーウイルス (CDV) の病原

性と宿主域拡大のメカニズム：

発症サルから分離された CDV が、これまでの研究から、ヒトの SLAM ではなくイヌの SLAM 指向性の野生型 CDV であり、実験感染でサルに全身感染症を再現できることが明らかになっている。この CDV をヒト SLAM 発現 Vero 細胞に馴化したウイルスは、H 蛋白の 541 位のプロリンがセリンに置換した。両ウイルスの全遺伝子配列を決定した結果、この変異以外には基本的に一致していた。ヒトの SLAM への馴化には 541 位のアミノ酸置換が関与するが、実験感染では、このウイルスはサルの末梢リンパ球への感染は野生型 CDV と同様であったが、その他の組織、臓器への感染拡大が起らなかった。この CDV は H 蛋白質、F 蛋白質に他の CDV 間で保存されている部位に、それぞれ 4 ヶ所 8 ヶ所アミノ酸置換がある。今後、これらのアミノ酸置換のサルでの病原性獲得に関する意義を解析する必要がある。

(2) 宿主の抗ウイルス活性因子 Tetherin の相互作用の解析：

Tetherin は、感染細胞から HIV-1 粒子が放出されるのを阻害する細胞性因子として 2008 年に同定された。Tetherin の一方の末端がウイルスエンベロップ、他方の末端が細胞膜あるいは別のウイルスのエンベロップに結合することにより細胞とウイルス、あるいはウイルス同士が解離できず、結果として細胞表面にウイルス粒子が蓄積すると考えられている。

ザイールエボラウイルスとレストンエボラウイルスのウイルス様粒子産生に対する Tetherin の活性を解析した結果、いずれもヒト、サル双方の Tetherin によって抑制された。一方、ザイールエボラウイルスの GP は、ヒト、アフリカミドリザル、カニクイ

ザル全ての Tetherin に対してアンタゴニストとして作用し、その活性には種特異性はないことが分かった。一方、REBOV の GP は Tetherin アンタゴニストとしての活性をほとんどもたないことが明らかになった。

クリミア・コンゴ出血熱ウイルスでは、組換え蛋白によるウイルス様粒子形成系が開発されていない。そこで、近縁で非病原性なハザラウイルスを用いて Tetherin 効果を解析した結果、弱い抗ウイルス活性しか示さなかった。このことから、ハザラウイルスも何らかの Tetherin アンタゴニストをもつ可能性が示唆された。

D. 考察：

稼働している BSL4 が無い日本では、ウイルス性出血熱等の診断体制は、遺伝子検出、抗原検出法、遺伝子組換えで作製した抗原による血清診断法を逐次整備し、患者発生に備えている。整備した検査系も、ウイルスの変異や新種ウイルスの出現の最新情報を入手し対応手段の向上を図る必要がある。この数年間に新興した出血熱ウイルスには、チャパレ（ボリビア）、ルジョ（ザンビアと南ア）、ブンディブギョエボラウイルス（ウガンダ）等がある。このような新興ウイルス性出血熱の発生以外にも、ブタのレストンエボラウイルス感染症、サルのモルビリウイルス感染症、欧州でのヒトや動物園動物での新種の牛痘ウイルス感染症の発生と流行等、これまで想定されていない宿主動物での感染が相次いでいる。また、ハンタウイルスでは新たな自然宿主としてトガリネズミ類が発見された。このように、宿主域を拡大する、あるいはその可能性が指摘されているウイルスが、ヒトへ感染が拡大し致死的な新興ウイルス感染症として顕在化するか否かのリス

ク評価や、病原性を予測するためには、これらのウイルスの宿主領域を拡大する分子機構を分子生物学的・ウイルス学的に解明することが必要である。さらに、流行地やウイルス分布の想定される地域での分子疫学、血清疫学的解析も、これらのリスク評価をする上で重要である。

本年度は、3年計画の1年目として以下の研究を実施した。

1) 診断法の開発・改良と疫学的解析：チャパレウイルス（ボリビア）、ルジョウイルス（ザンビア・南ア）、ブンディブギョエボラウイルスの診断法の改良と開発（森川、高田、安田）。ニパウイルス検出法の開発（甲斐）。国内のトガリネズミ類からのハンタウイルスの検出とHPS関連ハンタウイルスの遺伝子検出法の開発（新井、有川）。国内のドブネズミの牛痘ウイルス抗体調査（全て陰性）（森川、西條、有川）。ウイルス遺伝子検出法の改良、至適化の検討（水谷、遠藤）。

2) ウイルス学的、分子生物学的解析：サルの致死性感染症から分離されたCDVのサルに対する病原性にSLAM指向性の馴化が不要であった（森川）。エボラウイルスGPやナイロウイルスの細胞性ウイルス産生抵抗因子テザーリンに対する抑制効果を明らかにした（安田）。このように当初計画に照らしてほぼ順調に進捗している。来年度以降も継続して研究を進展させたい。

E. 結論

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の診断等の対応方法に関する研究を実施し、今年度は、対象ウイルスの遺伝子検出法、抗原検出法、抗体検出法の整備を進め、これまで未整備の診断法の整備が進展した。新型ウイルス

や新興ウイルスに対応可能な遺伝子検出法に著しい進展が見られた。一方、いくつかのウイルスで、感染宿主域拡大、分布の拡大にかかる機構を解析し、リスクを評価した。ウイルス抵抗性宿主因子 Tetherin に関する新たな地検も得られた。

F. 健康危険情報

2008年にフィリピンで発生したレストンエボラウイルス感染症は、全頭処分後終息し、それ以降発生していない。日本へはフィリピンから豚およびその組織等の輸入が行われていないため、輸入のリスクは低い。

チャパレ、ルジョウイルスによる出血熱は、その後発生していない。

2008年にはラッサ熱の英国輸入症例、マールブルグ病のオランダ及び米国での初めての輸入症例等が報告され、2011年にはスウェーデン人が西アフリカでカッラ熱を発症し、特別機で本国へ輸送され治療を受けている。これらウイルス性出血熱の監視が重要な状況であることには変わりはない。

2010年には、中国で新種のブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される新種のウイルスによる急性熱性血小板減少症候群が発生した。患者の致死率は約10%と高い。ウイルスはダニにより媒介される。

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

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の
診断等の対応方法に関する研究

分担研究課題：新種アレナウイルス性出血熱の診断法、モルビリウイルス、
ポックスウイルスの宿主域拡大の解析と総括

分担研究者：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、病原診断法が確立された。南米出血熱の病原ウイルスの鑑別には代替え中和試験が有用であった。これら代替え中和試験法は、南米出血熱ウイルス、ラッサウイルスで作製された。一方、欧州で流行した牛痘ウイルス感染症の国内での発生リスクは現状では低いと考えられるが、今後も調査を継続する必要がある。また、豚のレストンエボラウイルス診断系が確立され、今後のフィリピンでの疫学調査等に有用と考えられる。サルに流行したCDV感染症では、霊長類SLAMへのウイルスの馴化は必要ないことが分かり、原因解明に進展がみられた。

研究協力者：伊波興一朗、谷口怜、佐山 勇輔、福士秀悦、水谷哲也、緒方もも子、西條政幸（同、ウイルス第一部）、酒井宏治（同、ウイルス第三部）、網康至、新倉綾（同、実験動物管理室）、永田典代、岩田奈織子（同、感染病理部）、倉根一郎（同、副所長）、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）、有川二郎（北海道大学）、鎌倉和政、滝本浩司、山崎勝彦（横浜検疫所）、飯塚信二、内田幸憲（神戸検疫所）、Prof. Victor Romanowski（ラプラタ大学）、Dr. Delia A. Enria（アルゼンチン国立ウイルス病研究所）

A. 目的と意義：

一類感染症に指定されるウイルス性出血熱は、全て輸入ウイルス感染症であり防疫、診断体制の整備は重要である。近年、これ

らの病原として新種・新型のウイルスが同定されたり、新種のウイルスによるウイルス性出血熱が新興したりしている。さらに、宿主域を拡大するウイルス感染症や、これまで想定されていなかったウイルス感染症が世界中で発生している（表1）。本研究では、これらのうち、1）南米出血熱の病原ウイルスとして新たに同定されたチャパレウイルス、アフリカでラッサ熱様感染症の病原ウイルスとして新たに同定されたルジョウイルスの血清診断法を確立すること、2）アルゼンチン出血熱（フニンウイルス）の診断法の患者パネル血清を用いた評価とチャパレウイルス等との交差性の確認、3）欧州で問題となった齧歯類由来牛痘ウイルス感染症の、国内の齧歯類の血清疫学、4）フィリピンの豚のレストンエボラウイルス感染症の診断法の確立と流行時の疫学調査、5）サルに流行したイヌジステンパーウイルス(CDV)の宿主域拡大の原因究明とこのウイルスの病原性を解明することなどを目的とした。

B. 材料と方法：

1) 新種アレナウイルス性出血熱の診断法：

組換えバキュロウイルスによりチャパレウイルス及びルジョウイルスのコア蛋白質(NP)を発現・精製し、抗原とした。また、これらのNPを発現するHeLa細胞の塗抹・固定標本を間接蛍光抗体法(IFA)用抗原とした。精製NPをBalb/cマウスに免疫して単クローン抗体を作製した。また、ウサギに免疫して抗NPポリクローナル抗体を作製した。

2) 南米出血熱の診断法の患者パネル血清による評価とチャパレウイルス等との交差性：

1) で作製したウサギ免疫血清やマウス単クローン抗体を用いて、既知の南米アレナウイルス抗原との交差反応性を検討した。また、アルゼンチン出血熱パネル血清(Prof. Victor Romanowski (ラプラタ大学) 及び Dr. Delia A. Enria (アルゼンチン国立ウイルス病研究所) から提供された)を用いて、VSV シュードタイプによる代替法による中和抗体価を測定し、アルゼンチン国立ウイルス病研究所で実施されたフニンウイルスを用いた中和抗体価と比較検討した。さらに、これらパネル血清のチャパレウイルスに対する交差を調べた。

3) 齧歯類由来の牛痘ウイルス感染症の国内の齧歯類の血清疫学調査：

牛痘ウイルス Brighton Red 株を Vero 細胞に感染させ細胞溶解液から ELISA 抗原を調整した。非感染細胞溶解液から調整した陰性抗原も用いて、IgG-ELISA 法を開発した。国内の検疫所で捕獲収集されたドブネズミ、クマネズミ血清(鎌倉和政、滝本浩司、山崎勝彦(横浜検疫所)、飯塚信二、内田幸憲(神戸検疫所)から提供された)を非働化して開発した牛痘ウイルス抗体検出 IgG-ELISA により測定した。

4) 豚のレストンエボラウイルス感染症の血清診断法の確立と疫学調査：

フィリピンで発生したレストンエボラウイルス感染症流行時の検体を用いて、豚の血清診断法の評価と疫学調査を実施した。血清診断法としては、IgG-ELISA として i) 部分 NP 抗原、ii) 全 NP 抗原、iii) 全 GP 抗原を用いた 3 種類を、間接蛍光抗体法用抗原としては、全 NP、全 GP を発現した HeLa 細胞塗抹標本を用いた 2 種類を、代替ウイルス中和試験としては、VSV シュードタイプによる中和試験法を用いた。

5) サルに流行した CDV の病原性と宿主域拡大の原因究明：

これまで、当該 CDV をカニクイザルに実験感染すると全身感染症を再現できた。この CDV を human SLAM 発現 Vero 細胞(九州大学医学部柳雄介教授より分与された)に馴化させた CDV_hSLAM をカニクイザルに実験感染させた。また、両ウイルスの全塩基配列を決定した。

(倫理面からの配慮について)

ヒト血清は、アルゼンチン国立ウイルス病研究所のバイオバンクが保管する、ヒト検体に関する国際基準を満たすパネル血清で、国立感染症研究所のヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会により当該血清の使用に際して申請承認の必要なしと判定された。また、動物実験にあたっては国立感染症研究所動物実験委員会に申請し承認されている(承認番号 110075)。

C. 結果：

1) 新種アレナウイルス性出血熱の診断法の開発：

組換えバキュロウイルス感染細胞内にアレナウイルス NP は結晶化して蓄積される。チャパレウイルスやルジョウイルスの NP も同様であったため、段階的にウレア濃度をあげることにより精製できた。これらをウサギに免疫してポリクローナル抗体を作製し、精製組換え NP を抗原とする IgG-ELISA と NP 発現細胞抗原による IFA で各種アレナウイルス NP との交差反応性を検討した。その結果、ルジョウイルス NP

免疫血清は、ラッサウイルスとはやや交差するが LCM ウイルスとは弱く交差した。逆にラッサウイルス NP 免疫血清や LCM ウイルス NP 免疫血清は、ルジョウイルスに比較的強く交差した（表 2）。ルジョウイルス NP 免疫マウス血清では他の旧世界アレナウイルスとの交差反応性はより弱かった。ルジョウイルス NP に対する単クローナル抗体を 8 クローン作製し、反応性を解析した結果、5 クローンは IFA でも反応した。また 8 クローン全てがルジョウイルス特異的で、他の旧世界アレナウイルスとは交差しなかった。予備的なエピトープマッピングでは、3 クローンは N 末端側 100 アミノ酸を、1 クローンは立体的エピトープを認識していた。

2) 南米出血熱の診断法の患者パネル血清による評価とチャパレウイルス等との交差性：

アルゼンチン出血熱パネル血清を用い、フニンウイルスを用いたウイルス中和試験、フニンウイルス抗原による IgG-ELISA の成績と、組換え抗原による IgG-ELISA, IFA, VSV シュードタイプによる代替え中和試験の成績と比較した。フニンウイルスによる中和試験で 50% 中和が 80 倍以上の検体を陽性として比較すると、代替え中和試験の感度は 86%、IFA が 79%、IgG-ELISA が 86% であった。フニンウイルス抗原を用いた IgG-ELISA と比較すると、組換え抗原による IgG-ELISA と IFA の感度は 100%、91% であった（表 3）。一方、これらの血清を他の南米アレナウイルスの VSV シュードタイプを用いて中和抗体の交差性を調べた結果、全く交差中和しなかった。このため、本中和試験はウイルス種特異的であることが分かった。

3) 齧歯類由来の牛痘ウイルス感染症の国内の齧歯類の血清疫学：

牛痘ウイルス抗原を用いた IgG-ELISA と牛痘ウイルス感染細胞を用いた IFA を作製し、検疫所から分与された 2005 年から 2010 年にかけて国内で捕獲された 739 匹のラット血清（大部分がドブネズミ血清）の抗体

保有状況を調べた結果、全てが陰性であった。一部の検体では IFA も実施したが全て陰性であった。英国やドイツの調査では、齧歯類の抗体保有率は 10% 以上であることから、国内のラットがウイルスフリーなのか抗体検出感度が低いためかを今後検討する必要がある。

4) 豚のレストンエボラウイルス感染症の血清診断法の確立と疫学調査：

サルにレストンエボラウイルス検査用に関連された血清診断法を豚検体用に改良した NP 特異的抗体検出 IgG-ELISA, IFA に加え、GP 特異的抗体検出 IgG-ELISA, IFA 及び VSV シュードタイプによる代替え中和試験を豚検体用に作製した。国内の豚血清を用いて、各診断法の閾値を決定した。2008 年のレストンエボラウイルス流行のあった養豚施設の豚血清 215 検体分を用いて、各血清診断法を実施した結果、多くの検体で NP 及び GP 抗体が検出された（図 1）。NP 抗体測定系間での抗体価は良く相関したが、NP 抗体価、GP 抗体価の相関は低かった。また抗体陽性の大部分の血清は中和抗体も陽性であった。また流行時の豚の 70% 程度が感染していたことが分かった。このことは、豚から豚への感染が効率良く起こったことを示している。

5) サルに流行した CDV の病原性と宿主域拡大の原因究明：

これまでに、発症サルから分離された CDV が、ヒトの SLAM ではなくイヌの SLAM 指向性の野生型 CDV であり、実験感染でサルに全身感染症を再現できることが明らかになっている。この CDV をヒト SLAM 発現 Vero 細胞に馴化したウイルスは、H 蛋白の 541 位のプロリンがセリンに置換した。両ウイルスの全遺伝子配列を決定した結果、この変異以外に 2 塩基異なっていたが 1 箇所は N/P 遺伝子間の non-coding 領域、1 箇所は H 遺伝子の silent mutation であった（図 2）。ヒトの SLAM への馴化には 541 位のアミノ酸置換が関与するが、このウイルスをサルに実験感染すると末梢リンパ球への感染はイヌ SLAM 指向性 CDV と

同様であったが、その他の組織、臓器への感染拡大が起こらなかった。この結果は、サルでの CDV 感染症流行後期でも霊長類 SLAM への馴化ウイルスが生じていないことを説明する。この CDV は H 蛋白質、F 蛋白質に他の CDV 間で保存されている部位に、それぞれ 4 ヶ所 8 ヶ所アミノ酸置換がある。今後、これらのアミノ酸置換の意義を解析する必要がある。

D. 考察：

一類感染症に指定されるウイルス性出血熱は、全て輸入ウイルス感染症であり防疫、診断体制の整備は重要である。近年、エボラ出血熱や南米出血熱の原因ウイルスとして新種・新型のウイルスが同定されたり、新種のウイルスによるウイルス性出血熱が新興したりしている。さらに、宿主域を拡大するウイルス感染症や、これまで想定されていなかったウイルス感染症が世界中で発生している。

本研究では、南米出血熱の病原ウイルスとして新たに同定されたチャパレウイルス、アフリカでラッサ熱様感染症の病原ウイルスとして新たに同定されたルジョウウイルスの血清診断法を開発した。チャパレウイルスは、抗体検出用 IgG-ELISA, IFA が開発されたが、この血清診断法では他の南米アレナウイルスと血清学的に強く交差した。しかし、アルゼンチン出血熱患者血清を用いて中和試験での交差反応性を調べたが全く交差しなかった。このことから、血清診断で南米アレナウイルスを鑑別するには中和試験を行なう必要があることが分かった。ルジョウウイルスは既知のラッサウイルスや LCM ウイルスと遺伝的にかなり異なる。ウサギ免疫血清で交差反応性を調べた結果、若干交差するもののルジョウウイルス感染症の診断にはルジョウウイルス抗原を用いる必要があることが分かった。一方、アルゼンチン出血熱の血清診断は確立できた。

欧州で問題となった齧歯類由来牛痘ウイルス感染症の原因ウイルスである牛痘ウイルスは齧歯類を宿主とするポックスウイルスで、ラットからの感染が欧州での流行の

原因であった。そこで、国内のラットの血清疫学を実施したが抗体陽性個体は検出できなかった。国内での牛痘ウイルス感染症のリスクを明らかにするために今後も調査を継続したい。

フィリピンの豚のレストンエボラウイルス感染症の診断法が確立され、流行時の疫学調査を実施した結果、流行時には豚間で感染が拡大したことが分かった。この診断システムはフィリピンの RITM,BAI に技術移転され、今後の疫学調査に有用と考えられる。

サルに流行した CDV と霊長類 SLAM に馴化された CDV の比較から、霊長類 SLAM に馴化されるとレウウイルス第一部鳥類への病原性が低下すること、本 CDV 特有のアミノ酸置換が多数エンベロープ蛋白質に認められることから、これらの変異が宿主域拡大に関与する可能性が示唆される。

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、病原診断法が確立された。南米出血熱の 5 種類の病原ウイルスの鑑別には代替え中和試験が有用であった。これら代替え中和試験法は、南米出血熱ウイルス、ラッサウイルスで作製された。欧州で流行した牛痘ウイルス感染症のリスクはこれまでの調査では低いと考えられるが、より詳細に調査を継続する必要がある。また、豚のレストンエボラウイルス診断系が確立された。サルに流行した CDV 感染症の原因解明に進展がみられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo M, Morikawa S, Kurane I. Recent progress in the treatment for Crimean-Congo hemorrhagic fever and future perspectives. *Future Virology* (in press)

- 2) Mizutani T, Sayama Y, Nakanishi A, Ochiai H, Sakai K, Wakabayashi K, Tanaka N, Miura E, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Ono SI. Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Virology*. in press
- 3) Ogawa H, Miyamoto H, Ebihara H, Ito K, Morikawa S, Feldmann H, Takada A. Detection of all known filovirus species by reverse transcription- polymerase chain reaction using a primer set specific for the viral nucleoprotein gene. *J Virol Methods*. 2011 Jan;171(1):310-3.
- 4) Watanabe S, Masangkay JS, Nagata N, Morikawa S, Mizutani T, Fukushi S, Alviola P, Omatsu T, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Fujii H, Tsuda S, Endoh M, Kato K, Tohya Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H. Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis*. 2010 Aug; 16(8):1217-23.
- 5) Watanabe S, Maeda K, Suzuki K, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Shimoda H, Kato K, Yoshikawa Y, Morikawa S, Kurane I, Akashi H, Mizutani T. Novel beta-herpesvirus in bats. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jun; 16(6):986-8.
2. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし
3. 学会発表
国内学会
1) 新倉 綾、池上 徹郎、森川 茂、山田 靖子、C. J. Peters、牧野 伸治. リフトバレー熱ウイルス L 蛋白のポリメラーゼ機能におけるロイシンジッパー様モチーフの重要性. 第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年 11 月
- 2) 新井 智、永野 昌博、浅川 満彦、木村 敏之、近 真理奈、多屋 馨子、森川 茂、岡部 信彦、Richard Yanagihara. Evolutionary insights from the genetic diversity of Asama virus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). 第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年 11 月
- 3) 西條 政幸、福士 秀悦、水谷 哲也、緒方 もも子、倉根 一郎、森川 茂. 3 分節 RNA の塩基配列に基づく中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの分子疫学と進化. 第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年 11 月
- 4) 永田 典代、岩田 奈織子、長谷川 秀樹、佐藤 由子、森川 茂、佐多 徹太郎. SARS 発症マウスモデルにおける IFN- γ の投与効果. 第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年 11 月
- 5) 渡辺 俊平、Masangkay Joseph S、永田 典代、森川 茂、水谷 哲也、福士 秀悦、大松 勉、上田 直也、伊波 興一朗、谷口 怜、藤井 ひかる、津田 峻平、加藤 健太郎、遠矢 幸伸、久和 茂、吉川 泰弘、明石 博臣. フィリピンにおけるコウモリコロナウイルスの検出および飼育食果コウモリを用いたウイルス感染実験. 第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年 11 月
- 6) 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、宇田 晶彦、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 の副反応について. 第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年 11 月
- 7) 酒井 宏治、田丸 精治、前田 健、永田 典代、網 康至、岩田 奈織子、鈴木 忠樹、水谷 哲也、福士 秀悦、須崎 百合子、緒方 もも子、長谷川 秀樹、西條 政幸、山田 靖子、倉根 一郎、森川 茂. カニクイザルで致死感染症を起こしたイヌジステンパーウイルスのサル及びイヌでの病原性の解析. 第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年 11 月
- 8) 伊波 興一朗、中内 美奈、谷口 怜、福士 秀悦、水谷 哲也、緒方 もも子、西條 政幸、久和 茂、倉根 一郎、森川 茂. アルゼンチン出血熱の実験室診断法の患者血清を用いた評価. 第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年 11 月
- 9) 木下 一美、酒井 宏治、永田 典代、王 麗欣、伊藤(高山) 睦代、中道 一生、森川 茂、倉根 一郎、西條 政幸. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス核蛋白の単クローン抗体を用いた診断法の開発. 第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年 11 月
- 10) 水谷 哲也、酒井 宏治、本道 栄一、福士 秀悦、緒方 もも子、西條 政幸、倉根 一郎、森川 茂、前田 健. コウモリから分離された新規アデノウイルスのゲノム配列の決定および系統学的解析. 第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年 11 月
- 11) 酒井宏治、永田典代、網 康至、岩田 奈織子、鈴木忠樹、水谷哲也、福士 秀悦、須崎百合子、緒方もも子、西條政幸、長谷川秀樹、山田靖子、倉根一郎、森川 茂. カニクイザルで致死感染症を起こしたイヌジステンパーウイルスの性状と実験感染サルでの病原性の解析. 第 150 回日本獣医学会 帯広 2010 年 9 月
- 12) 谷口 怜、佐山勇輔、渡辺俊平、飯塚 愛恵、福士秀悦、水谷哲也、石井寿幸、久和 茂、明石博臣、吉川泰弘、森川 茂、倉根一郎. レストンエボラウイルス膜糖蛋白を標的とした抗体検出系の確立. 第 150 回日本獣医学会 帯広 2010 年 9 月
- 13) 水谷哲也、酒井宏治、本道栄一、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、倉根一郎、森川 茂、前田 健. コウモリから分離された新規アデノウイルスの分子学的性状決定. 第 150 回日本獣医学会 帯広 2010 年 9 月

表 1. 最近発生したり宿主域を拡大しているウイルス感染症

ウイルス感染症	病原ウイルス	年	国
チャパレウイルス出血熱	チャパレウイルス	2007	ボリビア
ルジョウイルス出血熱	ルジョウイルス	2008	ザンビア、南ア
ブンディブギョエボラウイルスによるエボラ出血熱	ブンディブギョエボラウイルス	2008	ウガンダ
豚のレストンエボラウイルス感染症	レストンエボラウイルス	2008	フィリピン
ヒトの牛痘ウイルス感染症	牛痘ウイルス	2008-2009	ドイツ、フランス等
ニパウイルス感染症	ニパウイルス	2001以降	バングラディッシュ
マカク属のサルスのイヌジステンパーウイルス感染症	ジステンパーウイルス	2008	日本、中国
ニホンザル血小板減少症	サルレトロウイルス-4	2010	日本
重症熱性血小板減少症候群	新種のプロボウイルス	2010	中国

(* ウイルス感染症名は、正式に命名されていないものを含む)

表 2. ルジョウイルス NP と他のアレナウイルスとの IgG-ELISA での交差反応性

serum	antigen	4.0E+02	8.0E+02	1.6E+03	3.2E+03	6.4E+03	1.3E+04	2.6E+04	5.1E+04	1.0E+05	2.0E+05	4.1E+05	8.2E+05
		400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	204800	409600	819200
a-Lujo #1	Lujo-NP	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	2.7	1.7	1.0	0.6	0.4	0.2
	Lassa-NP	3.2	2.0	1.1	0.6	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	LCM-NP	0.9	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Junin-NP	0.5	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
a-Lujo #2	Lujo-NP	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	2.0	1.2	0.8	0.5
	Lassa-NP	3.5	3.5	3.5	3.5	2.3	1.5	0.8	0.5	0.3	0.2	0.1	0.1
	LCM-NP	2.2	1.6	1.2	0.8	0.5	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
	Junin-NP	2.3	1.3	0.9	0.6	0.5	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
a-Lassa #1	Lujo-NP	3.5	3.5	3.5	3.0	2.1	1.3	0.7	0.5	0.2	0.2	0.1	0.1
	Lassa-NP	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	2.9	1.9	1.1	0.6	0.4	0.2
	LCM-NP	2.0	1.7	1.2	1.0	0.8	0.5	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
	Junin-NP	0.5	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
a-Lassa #2	Lujo-NP	2.5	1.6	0.9	0.5	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Lassa-NP	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	2.6	1.5	0.8	0.5	0.3	0.2
	LCM-NP	0.6	0.4	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Junin-NP	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
a-LCM #1	Lujo-NP	3.5	3.5	3.5	2.8	1.9	1.0	0.7	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1
	Lassa-NP	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.1	1.9	1.1	0.6	0.4	0.2	0.2
	LCM-NP	3.5	3.1	2.9	2.7	2.3	2.0	1.7	1.1	0.7	0.5	0.3	0.2
	Junin-NP	0.8	0.5	0.3	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
a-LCM #2	Lujo-NP	3.3	2.4	1.5	0.9	0.6	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
	Lassa-NP	3.5	3.5	3.5	3.2	2.0	1.3	0.7	0.4	0.3	0.2	0.1	0.1
	LCM-NP	2.9	2.6	2.4	1.9	1.7	1.2	0.8	0.6	0.3	0.2	0.2	0.1
	Junin-NP	0.5	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

表 3. フニンウイルスによる血清診断と組換え法による血清診断の比較

Identification#	authentic		recombinant		
	Junin IgG ELISA titer	PRNT Titer	Junin-NP ELISA	Junin-NP IFA	Junin-GP VSV
negative	Negative	20	< 100	< 20	< 80
77342-1	Negative	5	< 100	< 20	100
77342-2	400	160	200	160	200
77342-3	400	640	400	320	400
77342-4	1,600	1280	12,800	1,280	1,500
77216-1	1,600	320	400	1,280	< 80
77216-2	400	160	3,200	5,120	300
78401-1	6,400	160	12,800	2,560	1,500
78401-2	6,400	2560	51,200	20,480	10,000
51172	400	80	800	20	< 80
23139	Negative	160	< 100	< 20	200
76482	6,400	1280	6,400	640	1,600
34600	1,600	1280	200	< 20	1,800
76916	1,600	320	6,400	320	1,000
34657		10,000	400	40	20,000
52718		40,000	1,600	20	40,000
AHF(-)-control		Negative	< 100	< 20	< 80

図 1. レストンエボラウイルス感染豚の NP 抗体と GP 抗体応答の相関

