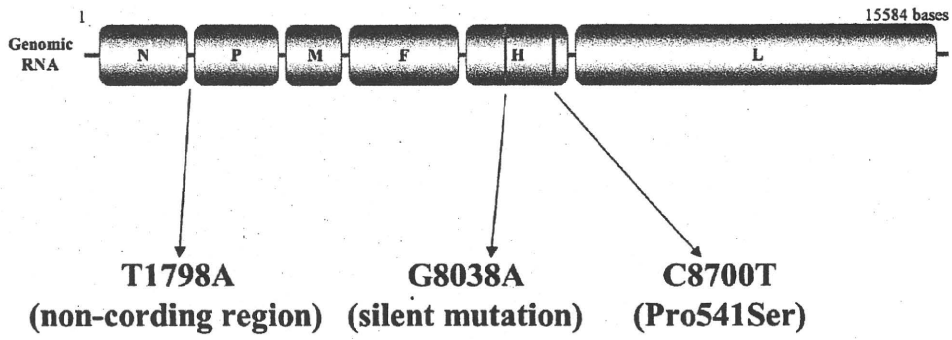


図2. ヒト SLAM 馴化に伴う CDV 遺伝子の変異



humanSLAM-Veroへの馴化に伴い3塩基 (H遺伝子に1アミノ酸) 置換

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：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

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と考えられている。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。本年度は、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。

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

ニパウイルスおよびヘンドラウイルスの診断法としては現在、ELISA法やRT-PCR、中和試験、ウイルス分離試験などの方法が用いられているが、いずれも高額な装置や技術、時間が必要である。そこで、実際に流行が発生している発展途上国での診断や疫学調査に役立てるような、より簡便で迅速な方法確立することを目的として、RT-Smart-Amp法(図1)の開発を行なった。

B. 研究方法

1) RT-Smart-Amp法に用いるプライマーの設計：

ニパウイルスについて、N遺伝子内の保存性の高い領域において、専用ソフトウ

エを使用して Turnback primer の配列候補を検索した。得られた候補プライマーに合わせ、他の folding primer、boost primer、outer primer を設計した。Boost primer には励光子修飾し、UV 照射により反応を検出できるようにした。これらの候補プライマーを組み合わせ、ニパウイルスの N 遺伝子をテンプレートとして実際に反応を行ない、反応性、特異性が高く、反応速度の早いものを選択した。ヘンドラウイルスについては、ニパウイルスとの交差性を避けるため、異なる配列を持つようなプライマーを作製し、同様に反応性を検証した。

2) 標的 RNA：

ニパウイルスおよびヘンドラウイルスの

N 遺伝子を組み込んだプラスミドを用いて *in vitro* transcription により RNA を合成し、これをテンプレートとして RT-Smart-Amp 反応を行ない、検出感度の検討を行なった。

3) RT-Smart-Amp 法の特異度の解析：

上記で作製した反応系での、交差反応性について検討した。ニパウイルス、ヘンドラウイルスのそれぞれのプライマーセットを用いて、互いのテンプレートを交換して反応させた。また、ヘニパウイルス以外のパラミクソウイルス（犬ジステンパーウイルス、麻疹ウイルス）、豚感染性ウイルス（PRRS、オーエスキー病ウイルス、豚ロタウイルス、豚インフルエンザウイルス）を感染させた細胞および、オオコウモリ初代培養腎細胞から抽出した RNA をテンプレートにして同様に反応を行なった。

4) RT-Smart-Amp 法のウイルス感染動物材料を用いた検証：

ニパウイルスを実験感染させたアフリカミドリザルのスワブおよび臓器サンプルについても、RT-Smart-Amp 法によるウイルス遺伝子の検出を試みた。

C. 研究結果

1) RT-Smart-Amp 法に用いる Turnback primer：

ニパ、ヘンドラウイルスとも N 遺伝子、781 番から 980 番までの領域でプライマーを設計した。Turnback primer の検索では、1 万程度の候補配列の中から、スコアの高いもの 50 個を選択して、反応性の検討に用いた。

2) 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

in vitro transcription により合成したテンプレートを用いて RT-Smrtt-Amp 法を行な

った場合、ニパウイルスでは 10^4 から 10^{10} コピーまで、ヘンドラウイルスでは 10^5 から 10^{10} コピーまで定量的に検出できた。また、検出限界値を求めたところ、ニパウイルスでは 600 コピー、ヘンドラウイルスでは 6,000 コピーであった。

3) RT-Smart-Amp 法の特異性：

ニパウイルスのプライマーペアを用いてヘンドラウイルスの N をテンプレートとした場合、あるいは逆にヘンドラウイルスのプライマーペアを用いてニパウイルスの N をテンプレートとした場合は、どちらも反応は起こらなかった。またヘニパウイルス以外のパラミクソウイルスや豚感染性ウイルス、自然宿主であるオオコウモリの細胞をテンプレートにした場合も、反応は見られなかった。

4) RT-Smart-Amp 法のウイルス感染動物材料の検出：

ニパウイルスを実験感染させたサルの上顎口腔スワブ、リンパ節、心臓、肺、脾臓から抽出した RNA をテンプレートにした場合、ニパウイルス遺伝子を検出することができた。

D. 考察と結論

ニパウイルスおよびヘンドラウイルスの特異的検出系 (RT-Smart-Amp) を確立した。本法により、 60°C 30 分の反応で標的ウイルスの検出が可能となった。また、 60°C の恒温槽と UV 照射装置があれば目視での検出確認が可能であり、機材の乏しい発展途上国などの流行発生地でも利用可能な方法であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoneda M, Guillaume V, Sato H, Fujita K,

Georges-Courbot MC, Ikeda F, Omi M, Muto-Terao Y, Wild TF, Kai C. The nonstructural proteins of Nipah virus play a key role in pathogenicity in experimentally infected animals. PLoS One. 2010 Sep 15;5(9):e12709.

- 2) Omi-Furutani M, Yoneda M, Fujita K, Ikeda F, Kai C. Novel phosphoprotein-interacting region in Nipah virus nucleocapsid protein and its involvement in viral replication. J Virol. 2010 Oct; 84 (19): 9793-9.

2. 学会発表

- 1) 加藤昌彦、安田二郎、小見(古谷)美央、米田美佐子、甲斐知恵子. Tetherin によるニパウイルス virus-like particle 産生阻害. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010.11)
- 2) 甲斐知恵子、寺尾由里、鈴木郁郎、小見未央、相良洋、寺園英之、安田 賢二、米田美佐子. 麻疹ウイルスの神経細胞間の伝播機序. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010.11)

F. 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

図 1. RT-SmartAmp 法の原理

RT-Smart Amplification Process (RT-SmartAmp)

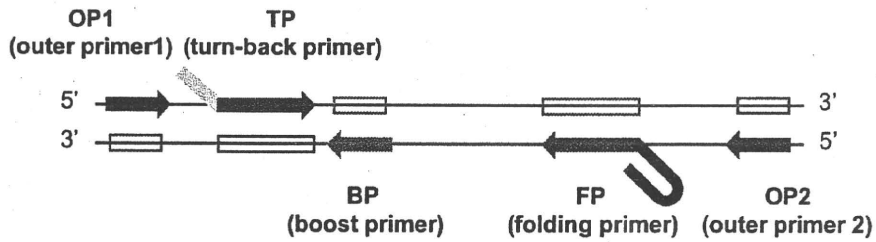
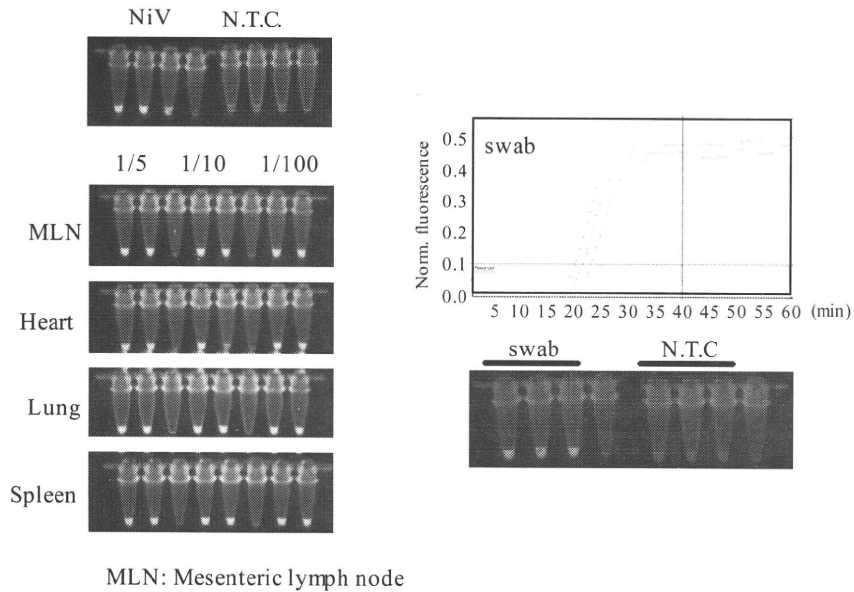


図 2. ニパウイルス感染サル臨床検体からの RT-SmartAmp 法による遺伝子検

NiV感染サル組織およびスワブからのNiV検出



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：新種エボラウイルスや新種アレナウイルス等の診断法

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教授

研究要旨：フィロウイルス（エボラおよびマールブルグウイルス）およびアレナウイルスによる感染症の診断法開発のために、既知のウイルスの RNA 遺伝子配列をもとにプライマーを設計し、フィロウイルス科およびアレナウイルス科のウイルス種をそれぞれ広く検出する RT-PCR 法の確立を試みた。また、感染動物あるいはヒト血清中のフィロウイルス特異抗体を高感度で検出する ELISA 法を確立し、感染患者および野生動物からの特異抗体の検出を試みた。

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型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。

アレナウイルス科アレナウイルス属のウイルスは進化系統学的に、アフリカで分離される旧世界アレナウイルスおよび中南米で分離される新世界アレナウイルスに分類される。大部分のウイルスは、げっ歯類動物を自然宿主とし、これらの動物に不顕性の持続感染をおこす。一昨年、原因不明の出血熱がザンビア国内で発生し数名が死亡した事例は、新種のアレナウイルス (Lujo

ウイルス) による感染症であったが、このウイルスの自然宿主は特定できていない。

フィロウイルスおよびアレナウイルスはヒトを含む霊長類に重篤な出血熱を引きおこす病原体として知られている。病原性が高いこと、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、全てのフィロウイルスおよび一部のアレナウイルスは 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、これらの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 遺伝子の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の検討を行った。

B. 研究方法および成果

1) フィロウイルス遺伝子を検出する 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 NP 遺伝子から選択した。その配列をもとにプライマーセットをデザインした (図 2A)。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から抽出した 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高感度で検出できることを確認した(図3)。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)(図2B)では効率的に検出できなかったウイルス種も検出できることを確認した。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4A)。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4B)。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4C)。

2) アレナウイルス遺伝子を検出する RT-PCR 法の確立:

既知の旧世界アレナウイルスおよび Lujo 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 L 遺伝子から選択した。その配列をもとにプライマーセットをデザインした(図5)。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。その結果、Lujo ウイルスは見つからなかったが、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(図6)。しかし、このプライマーセットによる、非特異バンドの増幅も確認されたため、改良を要する。

3) フィロウイルス特異抗体の検出法の確立:

(1) 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 法を確立した。本法を用いて、ザンビアのコウモリおよびサル血清中の IgG 抗体検出を試みたと

ころ、陽性個体が確認された。

(2) 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の中から、既知の全てのエボラウイルス種間共通エピトープを認識する抗体(42/3.7)を選出した。これをペルオキシダーゼ標識し、血清中の抗体による競合阻害を検出する方法の確立を試みた(図7)。しかし、非標識の 42/3.7 を阻害抗体に用いた場合には、ほぼ完全な阻害が認められたが、フィロウイルス GP に対するマウス抗血清存在下では、わずかに阻害活性を認めたのみであった。

C. 考察および結論

これまでは、フィロウイルスやアレナウイルスなどによる病原性の高い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。また、新種のエボラウイルスの出現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。また、ザンビアにおける新種のアレナウイルスの発見は、今後も未知の病原体による致死率の高い感染症発生の可能性を示唆している。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、抗ウイルス薬やワクチンの開発とともに、感度および特異性の高い診断法の確立は重要な課題である。

D. 研究発表

論文発表

1. Ogawa, H., Miyamoto, H., Ebihara, H., Ito, K., Morikawa, S., Feldmann, H., and Takada, A. (2011) 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* 171(1): 310-313.
2. Nakayama E, Yokoyama A, Miyamoto H, Igarashi M, Kishida N, Matsuno K, Marzi A, Feldmann H, Ito K, Saijo M, Takada A. (2010) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of filovirus species-specific antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* 17(11): 1723-1728.
 3. Matsuno, K., Nakayama, E., Noyori, O., Marzi, A., Ebihara, H., Irimura, T., Feldmann, H., and Takada, A. (2010) C-type lectins do not act as functional receptors for filovirus entry into cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
 4. Matsuno, K., Kishida, N., Usami, K., Igarashi, M., Yoshida, R., Nakayama, E., Shimojima, M., Feldmann, H., Irimura, T., Kawaoka, Y., and Takada, A. (2010) Different potential of C-type lectin-mediated entry between Marburg virus strains. *J. Virol.* 84(10): 5140-5147
 5. Sakoda, Y., Sugar, S., Batchluun, D., Erdene-Ochir, T.O., Okamoto, M., Isoda, N., Soda, K., Takakuwa, H., Tsuda, Y., Yamamoto, N., Kishida, N., Matsuno, K., Nakayama, E., Kajihara, M., Yokoyama, A., Takada, A., Sodnomdarjaa, R., and Kida, H. (2010) Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains isolated from migratory waterfowl in Mongolia on the way back from the southern Asia to their northern territory. *Virology* 406(1): 88-94.
 6. Okamoto, M., Tanaka, T., Yamamoto, N., Sakoda, Y., Sasaki, T., Tsuda, Y., Isoda, N., Kokumai, N., Takada, A., Umemura, T., and Kida, H. (2010) Antigenic, genetic, and pathogenic characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from dead whooper swans (*Cygnus cygnus*) found in northern Japan in 2008. *Virus Genes* 41(3): 351-357.
 7. Yang, J., Yoshida, R., Kariya, Y., Zhang, X., Hashiguchi, S., Nakashima, T., Suda, Y., Takada, A., Ito, Y., and Sugimura, K. (2010) Characterization of human single-chain antibodies against highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: Mimotope and Neutralizing Activity. *J. Biochem.* 148(4): 507-515.
 8. Iwai, A., Shiozaki, T., Kawai, T., Akira, S., Kawaoka, Y., Takada, A., Kida, H., and Miyazaki, T. (2010) Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon {beta} promoter stimulator 1. *J. Biol. Chem.* 285(42): 32064-32074.
 9. Uchida, Y., Kanehira, K., Mase, M., Takemae, N., Watanabe, C., Usui, T., Fujimoto, Y., Ito, T., Igarashi, M., Ito, K., Takada, A., Sakoda, Y., Okamoto, M., Yamamoto, Y., Nakamura, K., Kida, H., Hiromoto, Y., Tsuda, T., and Saito, T. (2011) Genetic characterization and susceptibility on poultry and mammal of H7N6 subtype avian influenza virus isolated in Japan in 2009. *Vet. Microbiol.* 147(1-2): 1-10.

日本語総説等

1. 高田礼人 (2010) 種の壁を越えるウイルス感染症 -Epidemiology と Epizootiology 「フィロウイルス」、臨床と微生物 37(2) : 125-131
2. 高田礼人 (2010) 特集 パンデミックインフルエンザ、インフルエンザウイルスに対する免疫応答・感染防御機構、日本臨床 68(9) : 1625-1630
3. 高田礼人 (2010) フィロウイルスの宿主域、感染症 236 : 220-225

図3. 新規 RT-PCR によるフィロウイルス遺伝子の検出

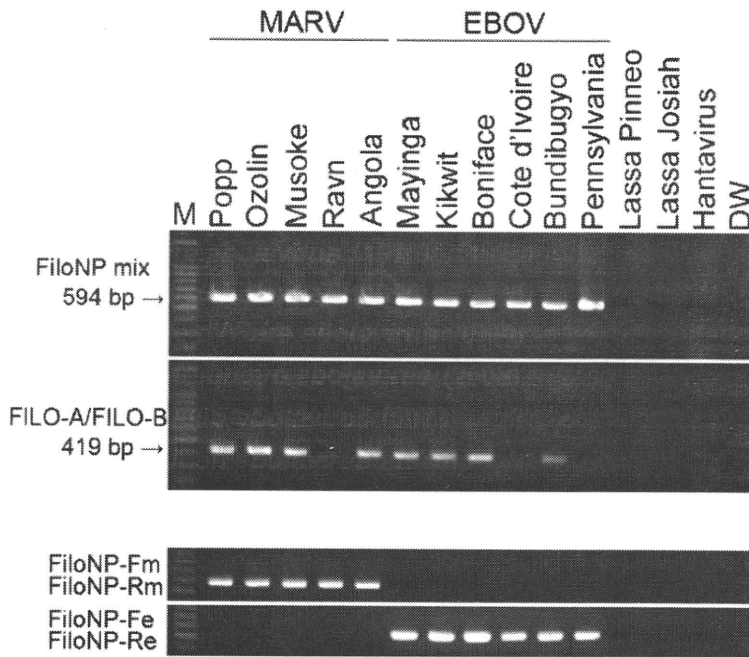


図4. 新規 RT-PCR のフィロウイルス遺伝子検出感度

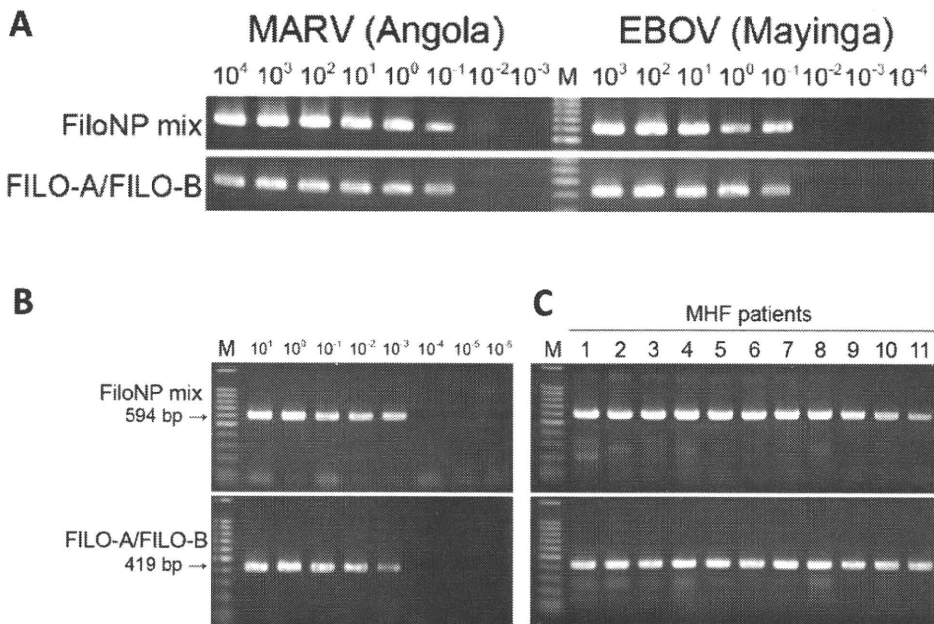
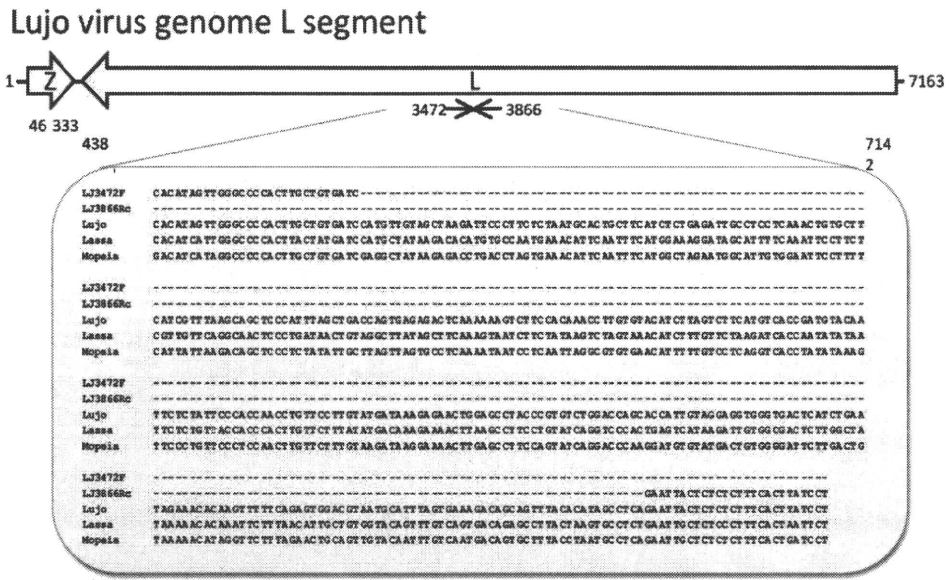


図5. アレナウイルス遺伝子検出用 RT-PCR 用のプライマー



Primer design for detection of Old World Arenavirus including Lujo virus

図6. ザンビアの齧歯類からのアレナウイルス遺伝子検出と分子系統樹

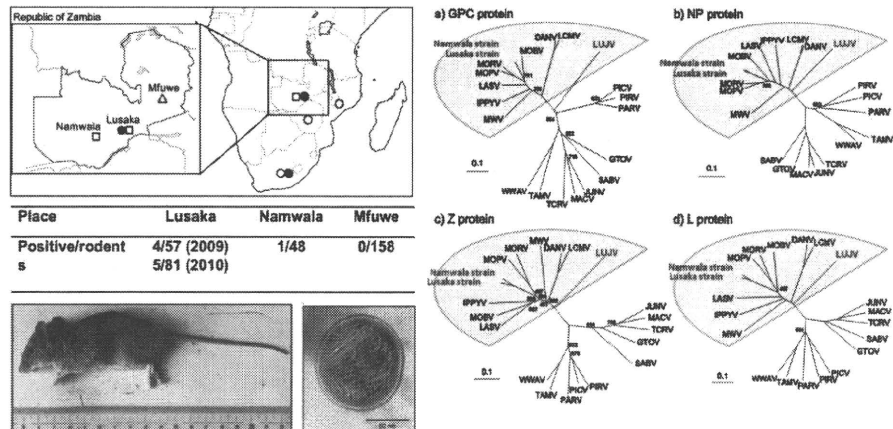
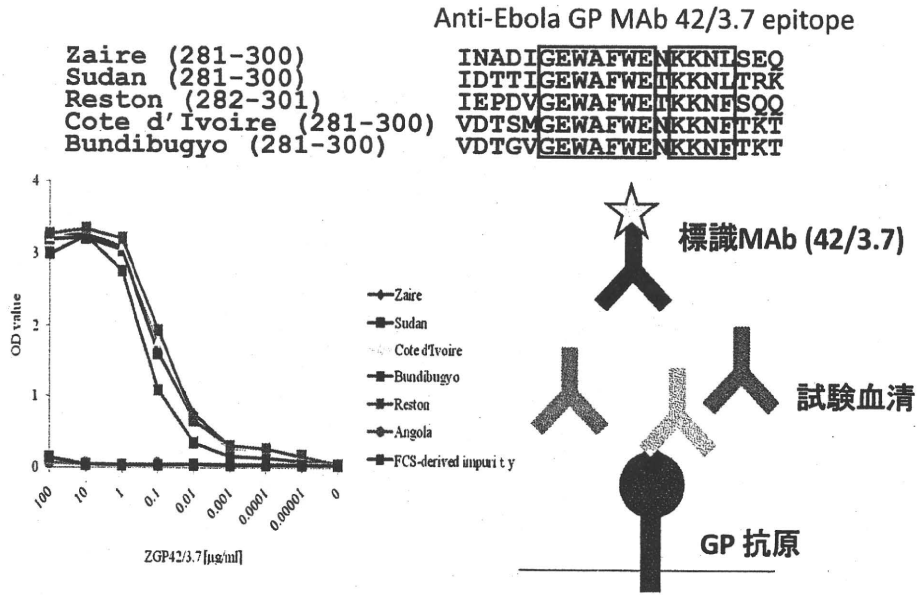


図7. 競合 ELISA によるエボラウイルス GP 特異抗体の検出法



厚生労働科学研究費 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

分担研究課題：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

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教授

研究要旨：Tetherin は様々なエンベロープウイルスに対して抗ウイルス活性をもつ細胞性因子であるが、HIV-1 の Vpu やザイールエボラウイルスの GP はアンタゴニストとして Tetherin の抗ウイルス活性を阻害することが報告されている。我々は、本研究でレストンエボラウイルスの GP は Tetherin アンタゴニストとしてほとんど機能しないこと、及び、ザイール GP は Vpu とは異なる機構で Tetherin の抗ウイルス活性を阻害することを示唆する成績を得た。また、クリミア-コンゴ出血熱ウイルスのモデル系としてハザラウイルスの解析を進める中で、Tetherin はこのウイルスに対して弱い抗ウイルス活性しか示さないことが明らかになり、ハザラウイルスが Tetherin アンタゴニストをもつ可能性が示唆された。更に、ラッサウイルスの迅速・簡便な検出法として RT-LAMP 法の開発も行った。

研究協力者：黒崎陽平（長崎大学）

A. 研究目的

マールブルグウイルス（MARV）、エボラウイルス（EBOV）、ラッサウイルス（LASV）、クリミア-コンゴ出血熱ウイルス（CCHFV）は極めて高い病原性をもつ出血熱ウイルスであるが、これらが引き起こす感染症に対する有効な予防・治療法は未だに確立されておらず、大きな脅威となっている。本研究では、これらのウイルスの増殖過程、特に粒子形成・出芽機構を詳細に解析することにより、ウイルス増殖阻害法の開発を目指す。また、上記出血熱ウイルスの迅速検出・診断法の開発も行う。

B. 研究方法

1) EBOV と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。この因子は別名 BST-2、HM1.24、CD317 とも呼ばれ、インターフェロン(IFN)- α によって誘導され、N 末端、C 末端双方で細胞膜と結合する奇異な構造をもつ糖タンパク質である（図 1）。Tetherin の一方の末端がウイルスエンベロープ、他方の末端が細胞膜あるいは別のウイルスのエンベロー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。Tetherin の抗ウイルス活性は HIV-1 の Vpu やザイール EBOV (ZEBOV) の GP によ

て拮抗されることも報告されている。Vpu は Tetherin の細胞表面発現を抑制することにより、Tetherin の抗ウイルス活性を阻害することが報告されているが、Vpu は HIV-1 の本来の宿主であるヒトの Tetherin に対してのみこの活性を有し、サルの Tetherin に対してはアンタゴニストとしての活性を示さない。すなわち、Vpu の Tetherin アンタゴニスト活性には種特異性が存在する。一方、EBOV GP の Tetherin 活性阻害機構の詳細についてはほとんど明らかになっていない。

そこで、我々はまず、ウイルス様粒子 (VLP) 産生系を用いて、ZEBOV とレストン EBOV(REBOV)の VLP 産生が、ヒト、アフリカミドリザル、カニクイザル由来の Tetherin によって阻害されるかを調べた。解析は、培養上清中に放出された VLP を超遠心により回収し、ウェスタンブロット法で比較定量することにより行った。

次に、ZEBOV、REBOV の GP が各種 Tetherin によるエボラ VLP 産生抑制を阻害するかどうかを解析した。

更に、GP の Tetherin アンタゴニストとしての作用機構を明らかにする目的で、GP が Vpu と同様に Tetherin の細胞表面発現を抑制するかどうかを Tetherin 恒常発現細胞である HeLa 細胞を用いて調べた。

2) CCHFV モデル系としてのハザラウイルスの解析：

CCHFV は BSL-4 の病原体である為、感染性ウイルスの解析には BSL-4 施設が必要であり、このことが CCHFV 研究の障害の一つとなっている。ハザラウイルス (HazV) は、CCHFV と同じブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類され、CCHFV と血清学的にきわめて近縁なウイルスであるが、ヒトに対する病原性はなく P2 実験室で取り扱うことができる (図 2)。そこで、

HazV を CCHFV のモデル系として、ウイルス増殖機構の解析に用いることにした。

解析に必要な抗体は市販されていないので、次のように準備した。N のリコンビナントタンパク質を大腸菌で発現させ、精製した後、ウサギに免疫して抗 N 抗体を作製した。Gc に対する抗体はペプチドをウサギに免疫することにより得た。

まず初めに、Tetherin の HazV 産生阻害活性を調べるために、SW13 細胞にヒト Tetherin を発現させ、HazV 感染に対する影響を解析した。ウイルスの定量はリアルタイム RT-PCR 法で行った。

3) LASV 検出用 RT-LAMP 法の開発：

LASV のゲノムは遺伝的多様性に富み、分離株は遺伝学的にいくつかの系統に分類される。このことは、LASV のすべての株に対する遺伝子検出法の開発を困難にしている。LASV の遺伝子は各系統内では比較的保存されている為、本研究では特にラッサ熱の流行が深刻なナイジェリア北東部およびシエラレオネで蔓延している系統の LASV を検出するための迅速簡便法として RT-LAMP 法の開発を試みた。

それぞれの系統を特異的に検出することができる LAMP プライマーセットをプライマーデザイン支援ソフト PrimerExplorer ver.3 を用いてデザインした。遺伝子の保存性の比較的高い NP 領域を増幅の標的領域とした。各 LAMP プライマーセットの特異性と検出感度を Heinz Feldmann 博士 (米国立衛生研究所) より御分与いただいたシエラレオネ系統 Josiah 株とナイジェリア北東部系統 Pinneo 株のウイルス RNA、あるいは *in vitro* 転写反応により調製した疑似ウイルス RNA を用いて検討した。増幅反応は Loopamp RNA 増幅試薬キット (栄研化学) を用いて 63°C で行った。増幅反応の特異性の確認は反応産物を制限酵素処理し、アガ

ロースゲル電気泳動を行うことにより確認した。また、増幅のリアルタイムモニタリングはリアルタイム濁度測定装置を用いて行った。

C. 研究結果

1) EBOV と抗ウイルス活性因子 Tetherin の相互作用の解析：

ZEBOV の VP40 発現によって形成される VLP の産生系にヒト、アフリカミドリザル (Agm)、カニクイザル(Cyn)由来の Tetherin を発現させると VLP 産生は何れの Tetherin によっても有意に抑制された (図 3)。REBOV の VLP 産生も 3 種の Tetherin 全てで抑制されたが、その抑制効果は ZEBOV に対するものよりも弱かった (図 3)。

次に、ZEBOV の GP を発現させることにより、Tetherin の VLP 産生抑制作用が阻害されるかどうかを調べた (図 4)。その結果、ZEBOV の GP はヒト、Agm、Cyn 何れの Tetherin に対してもその抗ウイルス活性を減弱させる効果を持つことが明らかになった。

REBOV の GP についても同様の解析を行ったところ、REBOV の GP は何れの種の Tetherin に対してもその抗ウイルス活性を阻害しなかった (図 5)。

ZEBOV の GP が Tetherin の細胞表面発現を制御するかどうかを解析したところ、Vpu は顕著に Tetherin の細胞表面発現を抑制したのに対し、GP 発現は Tetherin の細胞表面発現にほとんど影響を与えなかった (図 6)。

2) CCHFV モデル系としてのハザラウイルスの解析：

HazV の構造タンパク質である N と Gc を認識する抗体をそれぞれ作製することに成功した。

SW13 細胞にヒト Tetherin 発現プラスミドを導入した後、HazV を感染させてウイルス

産生量を調べたところ、非常に低い感染価で Tetherin の弱い抗ウイルス活性が確認された (図 7)。moi=0.1 以上では抗ウイルス活性は確認できなかった。

3) LASV 検出用 RT-LAMP 法の開発：

シエラレオネ系統用、ナイジェリア北東部系統用の各 RT-LAMP プライマーセットの特異性をシエラレオネ系統 Josiah 株、ナイジェリア北東部系統 Pinneo 株、エボラウイルス 5 株(Mayinga、Zaire95、Reston、Sudan、Cote d'ivoire)、マールブルグウイルス 4 株 (Musoke、Ozoline、Angola、Ravn) のウイルス RNA を用いて調べた結果、何れの系統に対する RT-LAMP も同一系統の LASV のみを特異的に検出することができた (図 8)。1 ng のウイルス RNA の検出に要した時間はシエラレオネ系統用が 13 分、ナイジェリア北東部系統用が 23.9 分であった。検出限界はシエラレオネ系統用が 10pg、ナイジェリア北東部系統用が 1ng であった。

D. 考察

1) EBOV と抗ウイルス活性因子 Tetherin の相互作用の解析：

ZEBOV、REBOV の VLP 産生はウイルスの宿主特異性とは関係なくヒト、サル双方の Tetherin によって抑制された。

ZEBOV の GP は、種を問わずヒト、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することが明らかになり、ザイール GP の Tetherin アンタゴニストとしての活性には HIV-1 Vpu のような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。

HIV-1 の Vpu は 2 つの異なるメカニズムで Tetherin の細胞表面発現を抑制することにより、Tetherin のウイルス産生抑制作用を阻害すると考えられているが、ザイール GP

は Tetherin の細胞表面発現にほとんど影響を与えなかったことから Vpu とは異なるメカニズムで Tetherin の抗ウイルス活性を阻害することが示唆された。

2) CCHFV モデル系としてのハザラウイルスの解析

Tetherin は HazV に対して弱い抗ウイルス活性しか示さなかったことから、HazV は HIV-1 や ZEBOV と同様に Tetherin アンタゴニストをもつ可能性が示唆された。

3) LASV 検出用 RT-LAMP 法の開発

シエラレオネ系統株、ナイジェリア北東部系統株の LASV の検出に対して、特異性が高く、迅速、簡便、かつ高感度の RT-LAMP 法を開発することができた。既存の Real-time RT-PCR 法よりも若干検出感度は低かったが（図 8）、LAMP 法は PCR 法のように厳密な温度制御を必要とせず、簡便な恒温槽があれば検査を行うことができる点、検出にかかる時間が短い点、濁度や蛍光で結果判定が可能でゲル電気泳動などが不要である点などいくつかの利点がある為、アウトブレイクの発生地である発展途上国で有用な検出法であると思われる。

E. 結論

1-1、ZEBOV、REBOV 共にヒト及びサル

Tetherin により VLP 産生が抑制された。

1-2、ZEBOV の GP は Tetherin アンタゴニストとしての活性があるが、REBOV の GP にはない。

1-3、ZEBOV の GP がもつ Tetherin アンタゴニスト活性には種特異性はない。

1-4、ZEBOV の GP は、HIV-1 の Vpu とは異なるメカニズムで Tetherin の抗ウイルス活性を阻害する。

2-1、HazV は、HIV-1 や ZEBOV と同様に Tetherin アンタゴニストをもつ可能性が

示唆された。

3-1、シエラレオネ系統株、ナイジェリア北東部系統株の LASV に対して、迅速、簡便、高感度、かつ特異性の高い RT-LAMP 法を開発した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukuma, A., Kurosaki, Y., Morikawa, Y., Grolla, A., Feldmann, H., and Yasuda, J.: Rapid detection of Lassa virus by reverse transcription – loop-mediated isothermal amplification. *Microbiology and Immunology*, **55**, 44-50, 2011.

2) Yasuda, J.: Marburg virus budding: ESCRT of progeny virion to the outside of the cell. *Future Virology*, **5**, 627-637, 2010.

3) Kurosaki, Y., Grolla, A., Fukuma, A., Feldmann, H., and Yasuda, J.: Development and evaluation of the simple diagnostic assay for Marburgvirus using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**, 2330-2336, 2010.

2. 学会発表

1) Yasuda, J., Sakurai, A., Noda, T., Urata, S., Kawaoka, Y., and Sakuma, T.: ANTIVIRAL ACTIVITY OF TETHERIN/BST-2 AGAINST NEGATIVE STRAND RNA VIRUSES. In "The XIVth International Conference on Negative Strand Viruses", Brugge, Belgium, June 21-25, 2010.

2) Yasuda, J.: Update on Viral Hemorrhagic Fever (VHF) research in NRIPS. The 4th

U.S.-Japan Medical Biodefense
Symposium: 招待講演, Bethesda, USA, Oct
25-27, 2010.

- 3) 黒崎陽平、安田二郎：エボラウイルス表面糖タンパク質 GP による BST-2/Tetherin の活性阻害、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11 月 7 日－9 日。
- 4) 加藤昌彦、安田二郎、小見(古谷)美央、米田美佐子、甲斐知恵子：Tetherin によるニパウイルス virus-like particle 産生阻害、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11 月 7 日－9 日。
- 5) 黒崎陽平、安田二郎：エボラウイルス表面糖タンパク質 GP による抗ウイルス因子 BST-2/Tetherin の活性阻害、第 33 回日本分子生物学会年会 BMB2010、神戸、2010 年 12 月 7 日－10 日。
- 6) 西村聡子、安田二郎：Bst-2/Tetherin によるハザラウイルス放出抑制機構の解析、第 33 回日本分子生物学会年会 BMB2010、神戸、2010 年 12 月 7 日－10 日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

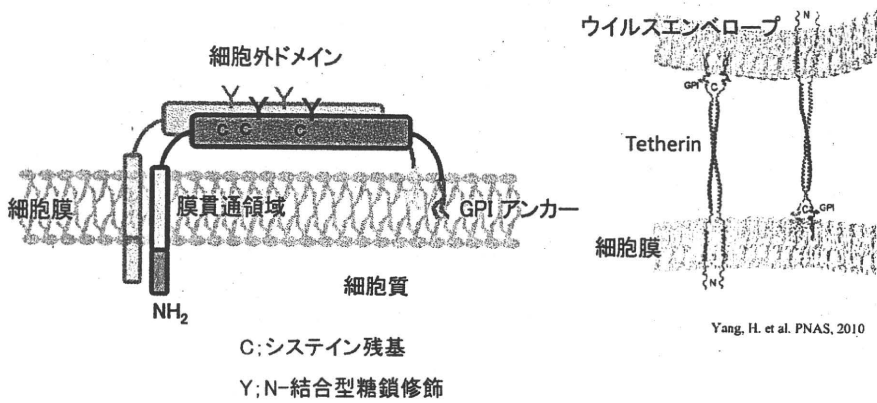


図1、Tetherinの構造

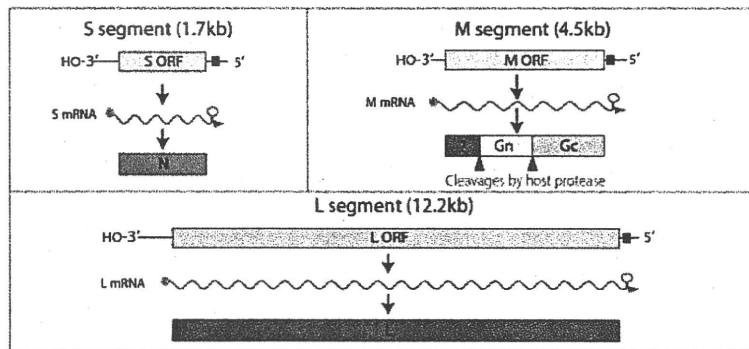


図2、ハザラウイルスのゲノム

ゲノムは3分節(S, M, L)のマイナス鎖RNAから成る。S: 1,677bp (nucleoprotein(N), 485aa, 54.2kDa)、
M: 4,576bp (エンベロープ蛋白GPs(Gn及びGc)、L: 11,980bp (L 蛋白, 3,923aa, 445kDa)

VP40-VLP
in 293T cells

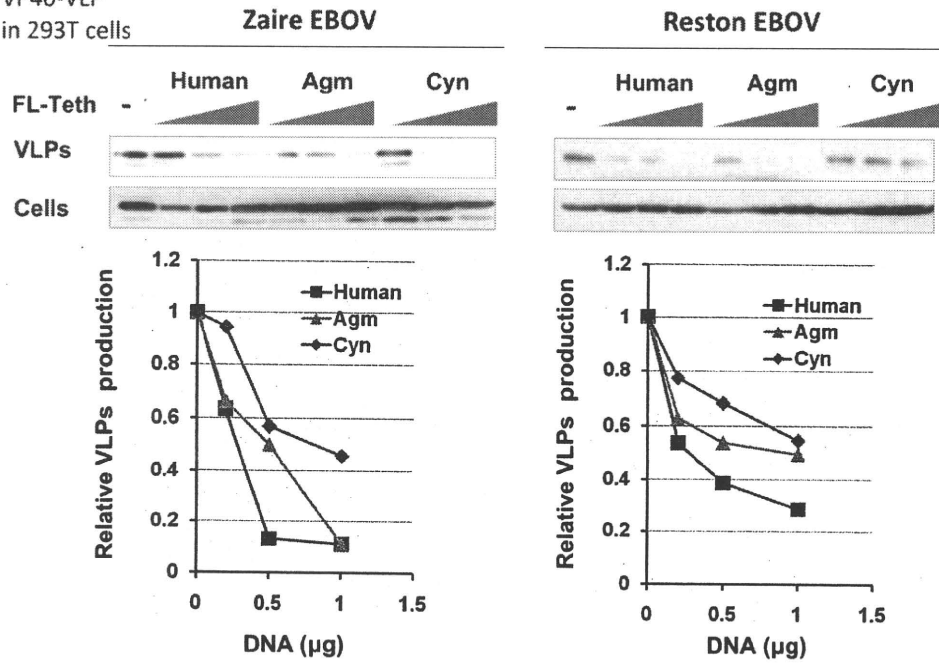


図3、エボラVLP産生に対するヒト、サルTetherinの効果

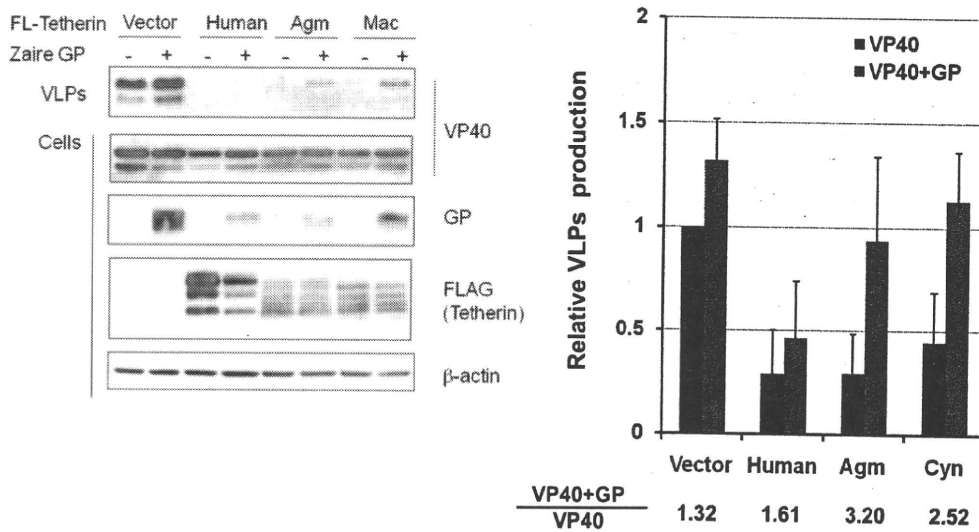


図4、ザイルエボラウイルスGPIによるTetherin活性阻害

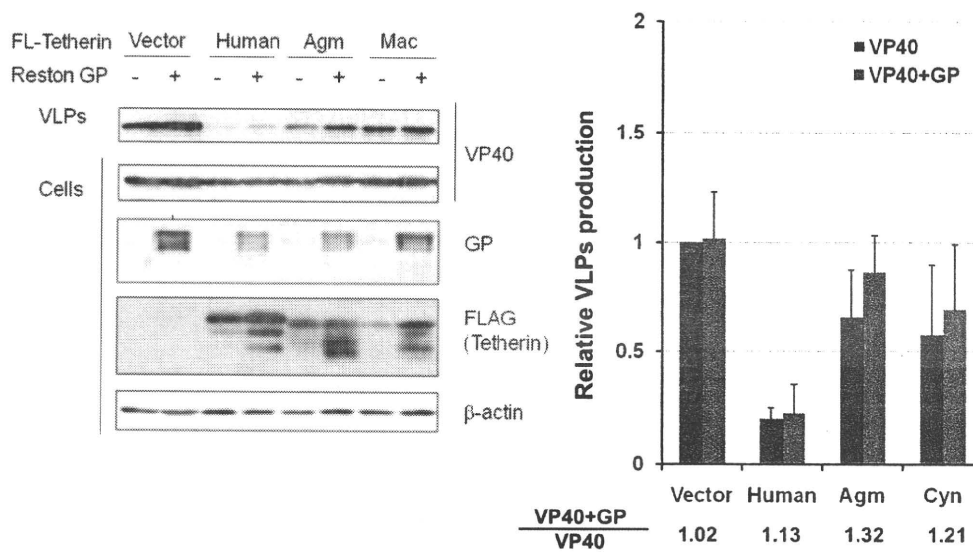


図5、レストンエボラウイルスGPによるTetherin活性阻害

HeLa cells

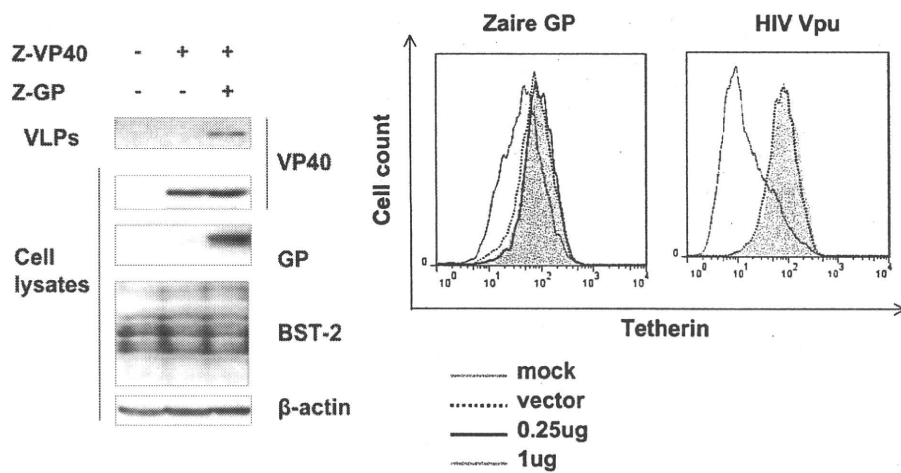


図6、Tetherin細胞表面発現に対するザイルエボラウイルスGPの効果