

201123021A

厚生労働科学研究費補助金

平成23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23年度 総括・分担研究報告書

平成24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23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23年度 総括・分担研究報告書

平成24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 .....	10
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 .....	21
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 .....	25
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 .....	32
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 .....	40
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 .....	50
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 .....	56
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 .....	68
研究分担者：水谷哲也（東京農工大学国際家畜感染症防疫研究教育センター）	
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 .....	77
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 .....	85

## 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、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（新種フレボ、ルジヨ、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する。宿主域を拡大しているウイルスでは、その機構を解明につながる研究を実施する。また、ウイルス粒子形成とその阻害法に関する基礎研究が進展させる。本年度は、3年計画の2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：ルジヨウイルス、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、西條）。北海道およびモンゴルのトガリネズミ形目と中国の齧歯目小動物からハンタウイルス遺伝子を検出した（新井）。ハンタウイルス血清型鑑別ELISA法、イムノクロマト法を開発した（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：ニパウイルスの霊長類感染モデル系を確立し、新たに開発したワクチンの検討を行なった（甲斐）。サルのイヌジステンパーウイルス感染症流行の初期と後期に分離されたCDVの遺伝子配列の変化とquasispeciesに関して明らかにした（森川）。SICDマウスでハンタウイルス肺症候群のモデル系を開発し好中球の関与

を明らかにした（有川）。エボラウイルス GP が、ヒトおよび霊長類の Tetherin アンタゴニストとして機能すること、GP が Tetherin をトランスゴルジ・ネットワークに滞留させる事を明らかにした。また、南米アレナウイルスの Z 蛋白の P/SAP 配列（L ドメイン）が細胞の Tsg101 を利用して出芽することを明らかにした（安田）。

研究分担者：

甲斐知恵子（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（東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター教授）  
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、エボラ出血熱、マールブルグ病、ラッサ熱、クリミア・コンゴ出血熱、南米出血熱などの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、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）感染症等が新興ウイルス性出血熱として新興した。また、スペインでユビナガコウモリから新種のフィロウイルス（Llovio ウイルス）が発見された。このような新興ウイルス性出血熱の発生以外にも、ニパウイルスのバングラディッシュやインドでのヒト・ヒト感染、ブタのレストンエボラウイルス感染症、サル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コウモリからも検出された。このように、宿主域を拡大する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命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（ブンディブギョエボラウイルス）と新種のアレナウイルス（アフリカのルジョ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疫学的解析と診断法の開発・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) ナイジェリアやザンビア等でのウイルス性出血熱の血清疫学

#### 2. 宿主域拡大・病原性獲得のメカニズムの解明と対応法の研究

- 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
- 2) ニパウイルスの病原性の分子機構の解明、動物モデルの開発とワクチン開発
- 3) 出血熱ウイルスの粒子形成・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：

ブンディブギ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。血清診断法も改良して、これまでにコウモリとブタのレストンエボラウイルス抗体検出を確立した。今年度は GHSAG ラボネットのフィロウイルスワークショップがイタリアで開催されたので、これまでに開発した方法と改良型の評価をした。また、新興フィロウイルス Lloviu にも対応可能なフィロウイルス共通 RT-PCR の開発を試みた。

アフリカで新興したルジョウイルスによる出血熱の血清診断法を昨年度開発した。本年度はルジョウイルス NP に対する単クローナル抗体を作製し、病原診断法としてウイルス抗原検出 ELISA を開発し、評価した。

ハンタウイルスでは、血清型鑑別 ELISA を開発してきたが、さらにより簡便なイムノクロマト法を開発し評価した。

トガリネズミ目ハンタウイルスの国内、国外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を改良した。

ザンビア、アジアで動物のアレナウイルスとフィロウイルスの血清疫学調査を実

施した。

## 2. 宿主域拡大・病原性獲得のメカニズムの 解明と対応法の研究

サルの致死性 CDV 感染症の流行初期と後期の分離ウイルスの遺伝子配列の変化の方向と quasispecies に関して次世代シーケンサーを用いて解析した。

エボラウイルス GP が、ヒトおよび霊長類の Tetherin アンタゴニストとしての機能解析と、そのメカニズムを解析した。また、南米アレナウイルスの Z 蛋白の P/SAP 配列の L ドメインとしての機能と対応する細胞因子を解析した。

ニパウイルスの霊長類感染モデル系の開発を行った。また、リバーシジェネティクス系によりニパウイルス G 蛋白を発現する組換え麻疹ウイルスを作製しワクチン効果を検証した。

ハンタウイルスによる肺水腫発症モデル動物を、SCID マウスを用いて開発し発症のメカニズムを解析した。

### C. 結果：

#### 1) 実験室診断法の開発・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と適用：

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 を昨年度の研究で開発した。この RT-PCR 法では、全てのエボラおよびマールブルグウイルス遺伝子を検出できた。新興したフィロウイルス Lioviu ウイルス遺伝子も本 RT-PCR は検出できた。遺伝子検出をより高感度にするために、nested PCR 用プライマーを設定した。これらを GHSAG ラボネットのフィロウイルスワークショップで評価した結果、後述する TaqMan PCR よりも高感度にフィロウイルス遺伝子を検出し、ウイルスの鑑別も可能であった。一方、TaqMan PCR もブンディブギョエボラウイルスに対応するために改良した結果、ブンディブギョエボラウイルス遺伝子も高感度に検出できた。

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、既知の全てのフィロウイルスの GP を認識する抗体(MGP78)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を開発した。

これまでに、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、NP 特異的 IF および ELISA 法、GP 特異的 IF および ELISA 法、代替え中和法等を用いてレストンエボラウイルス流行のあった養豚施設の豚の検体で NP 及び GP 抗体が検出された。今年度は、GP 抗原を用いた ELISA により、インドネシアのサ



ル血清中の IgG 抗体調査を実施した結果、陽性個体が確認された。フィリピンに存在する Reston 種以外のフィロウイルス特異的抗体を保有している個体も多数認められた。

(2) アレナウイルスの診断法と適用：

ルジョウイルスを含む旧世界アレナウイルス共通 RT-PCR により、ザンビアで捕獲したマストミスから新種のアレナウイルスが検出されウイルス(ルナウイルス)も分離された。今年度は、ラッサ、ルジョ、LCM ウイルスの NP 抗原を用いた ELISA を用いて、ザンビアのげっ歯類の血清疫学調査を実施した結果、ラッサウイルス抗体陽性個体が多く認められたが、ルジョウイルス抗体陽性個体も 2 個体認められた。来年度は、ルナウイルス抗原を用いた調査も実施する。

ルジョウイルスの組換え NP を抗原とする血清診断法を昨年度開発し、ラッサウイルス抗体とは鑑別できることを示した。今年度は、ルジョウイルス NP に対する単クローナル抗体を用いた抗原検出 ELISA を開発した。英国の HPA との共同研究で、このうち 2 種の単クローン抗体は authentic なルジョウイルス抗原を認識しなかったが、残り 5 クローンは効率よくルジョウイルスを検出できた。

(3) ハンタウイルスの齧歯目、トガリネズミ目小動物とコウモリからの遺伝子検

出：

北海道、九州、沖縄地域のトガリネズミ形目小動物、中国、韓国の齧歯目、モンゴルの齧歯目、トガリネズミ形目及び翼手目、フィリピンの翼手目を対象にハンタウイルス遺伝子検出を試みた結果、北海道およびモンゴルのトガリネズミ形目と中国の齧歯目小動物にハンタウイルス遺伝子を検出した。

(4) ハンタウイルス鑑別診断法：

組換え一部欠損 NP 抗原のハンタウイルス種鑑別抗原としての有用性を ELISA で確認した。自然宿主血清および患者血清を用いて、HPS の原因ウイルスであるアンデス、シンノンブレ、ラグナネグラウイルス感染を当該 ELISA で鑑別できた。さらに、ハンタウイルス感染症では急性期に IgM, IgG が検出されることから、より簡便な血清診断法としてイムノクロマト法を開発した。このイムノクロマト法は、ELISA 同様にウイルス種を鑑別でき、さらに ELISA と同等の感度を示した。

(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)に加え、網羅的遺伝子検出法の対象を細菌にまで広げて原因不明疾患の診断をより確実にするために、Rapid Determination system of Bacterial DNA sequences (RDB 法)を確立し、極めて高感度であることを示した。

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。これまでのプライマー設計アルゴリズムを基礎として、縮重塩基数を4個以下に限定したプライマー設計方法を確立し、シミュレーション実験で有用性を確認した。さらにイノシシから RDV 法により検出し分離した新興ラブドウイルス (ニシムロウイルス) 検出プライマーを設計し有用性が確認された。

## 2. 宿主域拡大・病原性獲得のメカニズムの解明

(1) サルの致死性 CDV 感染症の流行初期と後期の分離ウイルスの遺伝子配列の変化の方向と quasispecies :

昨年度は、流行初期の発症サルから分離された CDV#7dSLAM が、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を明らかにした。今年度は流行初期のウイルス2株と流行後期の分離株2株の遺伝子配列を比較した結果、感染初期の分離株 CDV#7では5箇所の塩基に、#10では1箇所の塩基に quasispecies が認められた。#7と#10では major population の遺伝

子配列は3箇所の塩基に違い(アミノ酸の相違はM蛋白の1アミノ酸)があった。流行後期の分離株#11、#12では、それぞれ3箇所、7箇所の塩基に quasispecies が認められ、初期の分離株#7と比較して、それぞれ7、11箇所の塩基に違いがあった。アミノ酸置換は#12に3箇所あった。全ての分離株は野生型のH蛋白であった。このことから、この流行では若干ウイルス遺伝子の多様性が増してはいるが極めて安定であった。

(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。

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。エボラウイルスの GP は、ヒト、アフリカミドリザル、カンクイザル全ての 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かったが、エボラ GP は Tetherin の細胞内局在を後期エンドソーム (LE) からトランスゴルジネットワーク (TGN) へ変化させることがわかった。

一方、南米出血熱の原因ウイルスであるフニンウイルス (アルゼンチン出血熱)、マチュポウイルス (ボリビア出血熱) のウ

ウイルス粒子出芽には、Z タンパク質内の P/SAP 配列が L ドメインとして機能し、宿主因子として Tsg101 を利用することがわかった。

(3) ニパウイルスの霊長類モデル系の開発とワクチンの開発：

ニパウイルスを  $10^6$ 、 $10^8$ TCID<sub>50</sub> 腹腔内接種したアフリカミドリザルは、いずれも接種2日後から発熱が認められ4日後からは体重減少し、7日目に2頭とも死亡した。経口・経鼻接種したサルは、7日目から発熱、体重減少が認められ、14日後に瀕死となったがその後回復した。腹腔内接種したサルの肺、脾臓、腎臓、心臓、扁桃、腸間膜リンパ節などからウイルス RNA が検出され、病理組織学的にも多くの臓器で病変を認めた。

ワクチン候補として作製したニパウイルスの G タンパク発現組換え麻疹ウイルスを、2回免疫したサルおよびハムスターにニパウイルスを感染させると、いずれもワクチン効果が顕著に認められた。

(4) ハンタウイルスによる肺水腫発症モデルの開発と発症機序：

SCID マウスへハンタウイルスを感染させると、2週で肺水腫が惹起された。SCID マウスは機能的な T および B リンパ球を欠損するが、気管支洗浄液に好中球が増加していた。そこで、好中球の表面マーカーである GR-1 抗体を SCID マウスへ投与して好

中球を除去すると、肺水腫発症率が低下し、好中球の肺水腫に関する病原性発現への関与が示された。病的にこの肺水腫は炎症像を欠く点等 HPS 患者と共通しており、HPS の動物モデルとして有用である。

D. 考察：

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ってきた。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、スペインの死亡したユビナガコウモリからの新種フィロウイルスの発見、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2年目として上記の研究成果を得た。2年間で「診断法の開発・改良と疫学的解析」では、1) 新種のエボラウイルスと新種のアレナウイルスの診断法の整備、2) 南米ハンタウイルス、食虫目ハンタウイルスの診断法の整備、3) 新興ポックスウイルス、食虫目ハンタウイルスの国内の動物の感染の実態解明、4) 変異ウイルス・新種ウイルス・新興ウイルスに対応可能な遺伝子検出法の改良等が行われた。また、「宿主域拡大・病原性獲得のメカニズムの解明と対応法の研究」では、1) サルの致死性 CDV 感染症の宿主域拡大の分子機構の解明と流行時のウイルスの遺伝子変異の解明、2) ニパウイルスの病原性の分子機構の解明と霊長類発症モデルの開発とワクチン開発、3) 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、4) ハンタウイルス肺炎候群の SCID マウスモデルの開発と好中球の発症への関与などが明らかにされた。このように当初計画に照らして順調に進捗し成果が出ている。

#### 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」を実施した。今年度は、対象ウイルスの遺伝子検出法、抗原検出法、抗体検出法の整備した。各種診断法等に関しては、GHSAG のワークショップや海外の BSL4 実験施設を持つ研究所等との共同研究を積極的に進めることにより可能となった。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。今年度に発見された新種のフィロウイルス、中国で新興した重症発熱性血小板減少症候群(SFTS)の原因病原体として同定された SFTS ウイルス等に対しても逐次検査、検出体制を整備する必要がある。

一方、サルの CDV 感染症の流行時のウイルス変異の方向性等を明らかにした。ニパウイルス感染症では霊長類モデル開発とワクチン開発に、ハンタウイルスでは肺水腫発症モデルと発症病理に、重要な知見が得られた。

ウイルスの出芽と宿主細胞抵抗性因子との関係では、エボラウイルスの GP による Tetherin の細胞内局在の変化、南米アレナウイルス Z 蛋白の粒子出芽に重要な L ドメインの同定と関与する宿主因子 Tsg101 の同定等、今後の抗ウイルス薬開発において重要な知見が得られた。

#### 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。

2011年にはスペインで死亡したユビナガコウモリから新種のフィロウイルスが発見された。ユビナガコウモリは日本にも生息する食虫コウモリである。

2011年にはスウェーデン人が西アフリカでラッサ熱を発症し、特別機で本国へ輸送され治療された。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重症発熱性血小板減少症候群(SFTS)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が、特にフタトゲチマダニにより媒介される。国内のダニがウイルスを保有しているかは明らかでない。

#### 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

研究分担者：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：一類感染症に相当する新興アレナウイルス性出血熱の原因ウイルスであるルジョウイルスの単クローン抗体等を用いた抗原検出による病原診断法を確立した。昨年度に開発した血清診断法と併せてほぼ診断が可能となった。

サルでの致死性 CDV 感染症流行時の初期と後期のウイルスの遺伝子配列を、quasispecies まで解析可能な次世代シーケンサーで解析した結果、流行後期には CDV の遺伝子配列に変異が蓄積するものの、最大で 11 塩基の変異しか蓄積しなかった。また、共通して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た。これらの結果から、サルでの CDV 感染症流行の原因ウイルスは、初期からサルに病原性があつたか流行中に免疫圧力がほとんど無かつたと考えられる。

研究協力者：山本貴恵、伊波興一郎、谷口 怜、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）、Roger Hewson（英国 HPA）

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、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）。本研究は、昨年度は 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の抗原性の解析、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の開発、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)  
感染症の宿主域拡大の原因究明とこの  
CDV の病原性の解明等を実施した。

本年度は、1）新興アレナウイルス性出血  
熱の原因ウイルスであるルジョウウイルスの  
NP に対するモノクローナル抗体の認識す  
るエピトープの解析と抗原検出 ELISA の確  
立、2）サルに流行した CDV 感染症の流行  
初期から流行後期の分離 CDV の遺伝子配  
列の変異等の解析を行った。

#### B. 材料と方法：

1) 新種アレナウイルス（ルジョウウイル  
ス）の単クローン抗体のエピトープ解析：

組換えバキュロウイルスによりルジョ  
ウ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 8 クロ  
ーン作製した。この単クローン抗体と、大  
腸菌で発現した GST タグを付加した各種部  
分 Lujō-NP のウエスタンブロッティング  
(WB)での反応性により認識するエピトー  
プをマッピングした。

2) ルジョウウイルス NP 抗原検出 ELISA:

作製した 7 クローンの単クローン抗体を  
ELISA プレートに固相化して、抗 Lujō-NP  
ウサギ抗体で検出する抗原検出 ELISA を開  
発した。組換え精製 Lujō-NP を用いてそれ  
ぞれの単クローン抗体を用いた場合の検出  
感度を求めた。

3) ルジョウウイルスの検出感度の評価：

英国 Health Protection Agency (HPA)の Dr.  
Roger Hewson の研究室との共同研究により、  
2) で開発した Lujō-NP 検出 ELISA キット  
を、感染性ルジョウウイルスを用いて検出感  
度、反応性などを評価した。評価は HPA の  
CL4 (BSL4)実験室で、感染力価の既知のル  
ジョウウイルス培養上清を 1%NP40 で不活  
化・可溶化したサンプルを用いて実施した。

4) サルコロニーで流行した CDV 感染症の  
原因 CDV の遺伝子解析：

カニクイザルの CDV 感染症の流行の初  
期に分離された CDV 株 (#7, #10) と後期に  
分離された CDV 株(#11, #12) の全塩基配列  
を次世代シーケンサーである Roche 社の  
454GS-Junior を用いて決定した。それぞ  
れのウイルス株は分離後プラーククローニ  
ングしていないものを感染させ、感染細胞  
RNA から RT-PCR により 1.8kbp から 3.6kbp  
の重複する 7 産物を増幅して、シーケン  
スの基質とした。



(倫理面からの配慮について)

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。本研究ではヒト検体は用いていない。

### C. 結果 :

#### 1) ルジヨウイルスによる新興ウイルス性出血熱の病原診断法の開発 :

昨年度の本研究で作製したルジヨウイルス組換え NP に対する単クローン抗体 8 種は全て Lujjo NP 特異的に反応した。このうち 1 クローンは ELISA 以外では反応しなかった。これ以外の 7 クローンはウエスタンブロッティング(WB)あるいは間接蛍光抗体法(IFA)で、または WB, IFA 両方で反応した(表 1)。WB で反応した 4 クローンに関しては、認識するエピトープを大腸菌で発現した各種 GST-部分 Lujjo-NP との WB での反応性により解析した。なお、いずれも 10 アミノ酸からなるペプチドを用いた Pepsan では反応しなかった。その結果、クローン 3B2 は Lujjo-NP のアミノ酸 69-116 位の領域を、クローン 3A4 はアミノ酸 98-109 位の領域を、クローン 6A3 はアミノ酸 101-109 位の領域を認識することがわかった(図 1)。これらのエピトープは、立体構造の明らかになったラッサウイルス NP の相同領域の構造上の配置を見ると蛋白表層に存在すると推定された(図 2)。

#### 2) ルジヨウイルス NP 抗原検出 ELISA:

抗原検出 ELISA では、単クローン抗体を

抗原補足抗体として用い、抗 Lujjo-NP ウサギ抗体を検出用抗体として用いた。単クローン抗体を 100ng/100 $\mu$ L PBS で ELISA plate の well を固相化し、BCA 法で定量した既知量の組換え精製 Lujjo-NP を希釈して検出感度を調べた。その結果、Lujjo-NP 検出感度は、クローン 3A4 を用いた場合が最も高く 0.8ng/well、次いで 3F1, 3G10, 6A3 を用いた場合が 1.6ng/well、3B2, 3E8 を用いた場合が 3.1ng/well であった(図 3)。

#### 3) ルジヨウイルスの検出感度の評価 :

2) で開発した Lujjo-NP 抗原検出 ELISA キットを共同研究者の英国 Health Protection Agency (HPA)の Dr. Roger Hewson の研究室に送付し、感染性ルジヨウイルスを用いて特異性、感度を評価した。用いたウイルスは力価が  $5.6 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL で 2% NP40 と等量混合して可溶化した。抗原検出 ELISA では固相化した単クローン抗体が高濃度の NP40 存在下では遊離するため、反応液中の濃度を 0.1%以下にする必要があった。このため、可溶化ルジヨウイルス液を 20 倍希釈したものから 5 倍段階希釈した。その結果、クローン 3B2 と 3E8 は可溶化ルジヨウイルス抗原を検出できなかった。一方、他の 5 クローンは可溶化ルジヨウイルス抗原と反応し、6A3, 6E1, 3G10 が  $3 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/well の感度で検出できた。3A4 と 3F1 では  $5 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/well の感度であった (図 4)。

#### 4) サルコロニーで流行した CDV 感染症の

原因 CDV の遺伝子解析：

昨年度は、流行初期の発症サルから分離された CDV#7dSLAM 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を明らかにした。CDV#7dSLAM をヒト SLAM 発現 Vero 細胞に馴化した CDV#7hSLAM は、H 蛋白の 541 位のプロリンがセリンに置換したが、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、臓器へは感染が拡大しなかった。流行後期の分離ウイルスで遺伝子配列の変化が見られるかを解析した。感染初期の分離株 CDV#7 では 5 箇所塩基に quasispecies が、#10 では 1 箇所塩基に quasispecies が認められた。#7 と #10 では major population の遺伝子配列は 3 箇所塩基に違いがあり、アミノ酸の相違は M 蛋白の 1 アミノ酸のみであった。流行後期の分離株 #11, #12 では、それぞれ 3 箇所、7 箇所塩基に quasispecies が認められた。初期の分離株 #7 と比較して、それぞれ 7、11 箇所塩基に違いがあった。アミノ酸置換は #12 に 3 箇所あった。全ての分離株は野生型の H 蛋白であった(図 5)。

#### 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、昨年度に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開発した。ルジョ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イルス感染症の診断にはルジョウイルス抗原を用いる必要があることが分かった。今年度は、ルジョウイルスの病原診断としてウイルス抗原検出 ELISA を開発した。7 クローンの単クローン抗体が、組換え Lujo-NP 検出には有用であったが、ルジョウイルスの検出には 2 クローンは使えなかった。Authentic なルジョウイルスに反応しない単クローン抗体は、クローン 3B2 と 3E8 であった。クローン 3B2 は IFA では反応せず、WB ではアミノ酸 69-116 位を認識した。クローン 3E8 は IFA, WB とともに組換え NP とは反応したがエピトープマッピングができなかったことから conformational なエピトープを認識すると考えられる。これらが authentic なルジョウイルス抗原と反応しなかったのは、組換え抗原と立体構造が若干異なることによ

ると考えられる。しかし、5 クローンの単クローン抗体では、高感度にウイルス抗原を検出できた。ルジヨウイルス感染症の急性期の患者血中のウイルス量は不明だが、ラッサ熱と同様と考えると、充分診断に適用可能である。

昨年度は、サルでの流行初期の CDV 分離株とこれをヒト SLAM に馴化された CDV の比較から、ヒト SLAM に馴化されるとカニクイザル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を明らかにした。サルでの流行の初期と後期のウイルスの遺伝子配列を quasispecies まで解析可能な次世代シーケンサーで解析した結果、流行後期には CDV の遺伝子配列に変異が蓄積するものの、最大で 11 塩基の変異しか蓄積しなかったことから、サルでの CDV 感染症流行時のウイルスは、初期からサルに病原性があったか、流行中に免疫圧力がほとんど無かったと考えられた。

#### E. 結論

一類感染症に相当すると考えられる新興アレナウイルス性出血熱の原因ウイルスであるルジヨウイルスの単クローン抗体等を用いた抗原検出による病原診断法を確立した。昨年度に開発した血清診断法と併せてほぼ診断が可能な状況になった。

一方、サルで CDV が致死感染の流行があったが、流行の初期と後期の分離ウイルス株での遺伝子配列の変化は比較的少な

い事がわかった。

#### F. 健康危険情報

ヒトへの感染は確認されていないが、スペインで死亡したユビナガコウモリから新種のフィロウイルスが同定され、Llovriu ウイルスと命名された。当該コウモリは日本にも生息する。

中国でアカゲザルに致死感染 CDV 感染症が発生したことが論文発表された。

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

1. Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *J Virol Methods*. 180:68-74, 2012
2. Arai S, Gu SH, Baek LJ, Tabara K, Bennett SN, Oh HS, Takada N, Kang HJ, Tanaka-Taya K, Morikawa S, Okabe N, Yanagihara R, Song JW. Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea. *Virology*, 2012, in press
3. Tani H., Morikawa S, and Matsuura Y. Development and applications of VSV vectors based on cell tropism. *Frontiers in Microbiol.*, 2012, 2(272): 1-7.

4. Kennedy JS, Gurwith M, Dekker CL, Frey SE, Edwards KM, Kenner J, Lock M, Empig C, Morikawa S, Saijo M, Yokote H, Karem K, Damon I, Perlroth M, and Greenberg RN. Safety and Immunogenicity of LC16m8, an Attenuated Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive Adults. *J Infect Dis* 2011, 204(9):1395-402
5. Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes*. 2012, ;44(1):40-4.
6. Taniguchi S, Watanabe S, Masangkay JS, Omatsu T, Ikegami T, Alviola P, Ueda N, Iha K, Fujii H, Ishii Y, Fukushi, S Saijo M, Kurane, I Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y, Shigeru Morikawa, S. Reston Ebola Virus Antibodies in Bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis*, 2011 17(8):1559-60
7. Abe M, Ito N, Sakai K, Kaku Y, Oba M, Nishimura M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Sugiyama M, Mizutani T. A novel sapelovirus-like virus isolation from wild boar. *Virus Genes*. 2011, 43(2):243-8.
- 2 学会発表
2. 学会発表
  1. Shigeru Morikawa, Yusuke Sayama, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Ichiro Kurane, and Masayuki Saijo. Serological survey of Reston ebolavirus infection in the Philippines. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Disease, Stanford USA, 2011 June 20-22
  2. 岡本宗裕、小野文子、藤本浩二、高野淳一朗、濱野正敬、森川茂、永田典代、水谷哲也、酒井宏治、堀井俊宏、中屋隆明、中村昇太、宮沢孝幸、松井淳 ニホンザル血小板減少症の原因ウイルスの同定 第152回日本獣医学会学術集会、2011年9月19日から21日、大阪
  3. 酒井宏治、永田典代、水谷哲也、網康至、吉河(岩田)奈織子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、竹田誠、森川茂 カニクイザルから分離した新しいサルアデノウイルスの性状解析 第152回日本獣医学会学術集会、2011年9月19日から21日、大阪
  4. Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Hideki Hasegawa, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata Interferon gamma protects adult balb/c mice from lethal respiratory illness after mouse-adapted SARS-CoV infection. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
  5. Masayuki Saijo, Yasushi Ami, Yuriko