

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究
分担研究報告書

患者血清を用いたフラビウイルス共通迅速診断法の評価

研究代表者 倉根一郎（国立感染症研究所副所長）

協力研究者 林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部第三室長）

高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室長）

西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部長）

研究要旨

フラビウイルスは世界の亜寒帯地域から熱帯地域にかけて広く分布しているエンベロープを有する一本鎖の RNA ウイルスである。これまでに約 70 種類のフラビウイルスが知られており、複数のフラビウイルスが同一地域で流行している可能性が常に存在するためフラビウイルスの迅速な鑑別が求められている。そこで我々はこれまでにフラビウイルス共通迅速診断法を開発し本診断法を用いることによりカ媒介性フラビウイルスのみならずダニ媒介性フラビウイルスを検出できることを示した。しかしながらその感度と患者検体における有用性は不明である。そこで様々なフラビウイルスを用いてその感度を検討した結果 1×10^{-2} から 1×10^1 (PFU/ml) の感度でフラビウイルスを検出できることが示された。また Dengue 患者血清を用いてさらに検討を行ったところ Dengue ウイルス特異的プライマーを用いた TaqMan RT-PCR 法と同等の検出率で急性期患者血清中の Dengue ウイルス遺伝子を検出できることを示した。よって本診断法は急性期患者血清において有用な実験室診断法の 1 つと成り得ることが示唆された。

A. 研究目的

フラビウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に属するエンベロープを有する (+) 一本鎖 RNA ウイルスであり、現在までに 70 種類以上のフラビウイルスが知られている。フラビウイルスの多くは蚊やダニによって媒介されるアルボウイルスであり、世界の亜寒帯地域から熱帯地域にかけて広く分布している。なかでも黄熱ウイルスや Dengue ウイルスはヒトに出血熱を起こす。Dengue ウイルスはアフリカ、南アジア、東南アジア、中南米の熱帯、亜熱帯地域に分布するウイルスであり、1-4 型の 4 つの異なるウイルス型が存在する。我が国では特に流行地からの Dengue 輸入症例が年々増加傾向にあり、日本にも

媒介蚊が存在するため我が国への侵淫の可能性が危惧されている。日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス等はヒトに脳炎を起こすことが知られている。日本脳炎ウイルスは東アジアから南アジアにかけて広く分布するウイルスであり、我が国においても現在も流行していることがブタによる日本脳炎流行予測調査により明らかにされている。複数のフラビウイルスが同一地域で流行している可能性は常にあるため迅速なフラビウイルス診断法の確立が求められている。また黄熱ウイルス等のフラビウイルスはヒトを標的とした兵器への転用の可能性を指摘されており、フラビウイルスの迅速な診断法の開発はこれらに

対処する上でも応用が期待される。

我々はこれまでにフラビウイルス共通プライマーを設計しフラビウイルスの迅速診断法を開発したことを報告した。また本迅速診断法を用いることによりデングウイルス、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、ウエストナイルウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス等の検出が可能であることを報告した。そこで本研究の目的は本迅速診断法の感度の検討と患者血清を用いた迅速診断法の評価を行うことである。

B. 研究方法

ウイルスと培養細胞:迅速診断法の感度の検討にはデングウイルス (DEN)、日本脳炎ウイルス (JE)、ウエストナイルウイルス (WN)、クンジンウイルス (KUN)、セントルイス脳炎ウイルス (SLE)、マレーバレー脳炎ウイルス (MVE)、黄熱ウイルス (YF)、ロシア春夏脳炎ウイルス (RSSE)、ポワッサンウイルス (POW)、ランガットウイルス (LGT)、ネギシウイルス (NEG)、ヨコセウイルス (YOK) を供試した。ウイルスの力価測定にはサル腎由来の Vero 細胞を用いた (American Type Culture Collection)。

ウイルス力価試験:ウイルス力価試験はVero細胞を用いプラーク法にて検討した。ウイルス液を10倍階段希釈し、各ウイルス希釈液を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。

ウイルス RNA の抽出:各フラビウイルスのRNAをHigh Pure Viral RNA Kit (Roche)を用いて抽出した。抽出方法はマーカールの用意

したマニュアルに従った。

デングウイルス特異的プライマーを用いた TaqMan RT-PCR 法:デング熱疑い患者血清からRNAを抽出した。デングウイルス特異的プライマーを用いたリアルタイム RT-PCR 法は伊藤ら (J. Clin. Microbiol. 42(12): 5935-5937, 2004) の方法により実施した。TaqMan RT-PCR 反応によるデングウイルス特異的な遺伝子断片の増幅を観察した。

フラビウイルス共通プライマーを用いた RT-PCR 法:フラビウイルス共通プライマー FVX7f および FVX12r を用いた RT-PCR 法により特異的な遺伝子断片の増幅を観察した。さらに検出された増幅産物について塩基配列解析を行い、検出された遺伝子断片の同定を行った。

C. 研究結果

フラビウイルス特異的迅速診断法の感度の検討:DEN, JE, WN, KUN, SLE, MVE, YF, RSSE, POW, LGT, NEG, YOK ウイルスのそれぞれのウイルス力価を測定し RNA を抽出した。次に各希釈段階におけるフラビウイルス共通プライマーの感度を検討した。その結果 1×10^{-2} から 1×10^1 (PFU/ml) の範囲で供試した力媒介性フラビウイルスおよびダニ媒介性フラビウイルスを含む全てのフラビウイルスの RNA を検出した (表 1)。

患者血清を用いた迅速診断法の評価:国立感染症研究所ウイルス第一部第二室で 2008 年から 2009 年にかけて実験室診断されたデング輸入症例患者血清を用いてフラビウイルス迅速診断法の評価を行った。患者血清を各病日ごとに分類し、フラビウイルス共通プライマーを用いた RT-PCR 法の結果と TaqMan RT-PCR で得られた結果を比較検

討した。その結果第1病日から5病日において、フラビウイルス共通 RT-PCR 法による検出率が高く、この傾向は TaqMan RT-PCR と一致した (図 1)。またフラビウイルス共通プライマーによる RT-PCR 増幅産物の塩基配列を解析したところ、すべてデングウイルスであることが同定された。したがって本プライマーは急性期患者血清において有用な実験室診断法の 1 つと成り得ることが示唆された。

D. 考察

これまでに我々はデングウイルスを含む様々なフラビウイルスを迅速に検出するためにフラビ共通迅速診断法を確立した。デングウイルス感染症流行地域では日本脳炎や黄熱、ウエスト熱等の他のフラビウイルス感染症が流行している。またデングウイルスの流行地域においては鑑別診断としてアルファウイルス属のチクングニアウイルス (CHIKV) によるチクングニア熱が流行している。本迅速診断法により非常に多くの種類のフラビウイルスを高感度に検出することが可能であり、さらに急性期デング患者血清において本迅速診断法の検出率は TaqMan RT-PCR 法と同等であることが示されたため、本法はフラビウイルスの迅速診断および鑑別において有用な手法と成り得ることが示唆された。

E. 結論

フラビウイルス感染症の特異的治療法は確立されていない。特にデング出血熱、日本脳炎、ウエストナイル脳炎、ダニ媒介性脳炎、黄熱等はひとたび発症するとその致死率は高く重篤な疾患である。フラビウイル

スの動向にはヒト、蚊、ダニ、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迅速な診断法の開発は世界の公衆衛生の向上に貢献することが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

M.L. Moi, C.K. Lim, A. Kotaki, T. Takasaki, I. Kurane. Detection of higher levels of dengue viremia using Fc gammaR-expressing BHK-21 cells than Fc gammaR-negative cells in secondary infection but not in primary infection. *Journal of Infectious Diseases*. 203(10), 1405-1414, 2011

M.L. Moi, C.K. Lim, S. Tajima, A. Kotaki, M. Saijo, T. Takasaki, I. Kurane. Dengue virus isolation relying on antibody-dependent enhancement mechanism using Fc γ R-expressing BHK cells and a monoclonal antibody with infection-enhancing capacity. *Journal of Clinical Virology*. 52(3), 225-230, 2011

K. Kitaura, Y. Fujii, D. Hayasaka, T. Matsutani, K. Shirai, N. Nagata, C.K. Lim, S. Suzuki, T. Takasaki, R. Suzuki, I. Kurane. High clonality of virus-specific T lymphocytes defined by TCR usage in the brains of mice infected with West Nile virus. *Journal of Immunology*. 187(8), 3919-3930, 2011

T. Tomohiko, A. Kotaki, S. Tajima, T. Omatsu, F. Harada, C.K. Lim, M.L. Moi, M. Ito, M. Ikeda, I. Kurane. Demographic virological features of imported dengue fever/dengue hemorrhagic fever cases in Japan from 2006 to 2009. *Dengue Bulletin*, in press.

M.L. Moi, C.K. Lim, K.B. Chua, T. Takasaki, I. Kurane. Dengue virus infection-enhancing activity in serum samples with neutralizing activity as determined by using Fc γ R-expressing cells. *PLoS*

Neglected Tropical Diseases, in press.

H. 学会発表

M.L. Moi, C.K. Lim, A. Kotaki, T. Takasaki, I. Kurane. Detection of higher levels of dengue viremia using Fc γ R-expressing BHK-21 cells than Fc γ R negative cells in serum samples from patients with secondary infection but not in those with primary infection. 第15回国際ウイルス学会 2011年9月

C.K. Lim, Y. Ami, Y. Fujii, M.L. Moi, K. Kitaura, A. Kotaki, S. Morikawa, M. Saijo, R. Suzuki, I. Kurane, T. Takasaki.

Pathogenesis of epidemic chikungunya virus in nonhuman primates. 第15回国際ウイルス学会 2011年9月

C.K. Lim, T. Takasaki, M.L. Moi, A. Kotaki, I. Kurane, M. Saijo. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2010. 第60回アメリカ熱帯医学衛生学学会年次総会 2011年12月

I. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

表 1. フラビウイルス共通プライマーの様々なフラビウイルスに対する感度

ウイルス	株名	媒介動物	感度 (PFU/ml)
DEN-1	West Pac 74	Mosquito	1×10^{-1}
DEN-2	S16803	Mosquito	1×10^0
DEN-3	CH53489	Mosquito	1×10^1
DEN-4	TPV360	Mosquito	1×10^1
JE	Mie 40 (gen 1)	Mosquito	1×10^1
JE	JaTH160 (gen 3)	Mosquito	1×10^{-1}
WN	NY99-6922	Mosquito	1×10^{-2}
WN	Eg101	Mosquito	1×10^0
KUN	OR393	Mosquito	1×10^1
SLE	Parton	Mosquito	1×10^0
MVE	1-51	Mosquito	1×10^1
YF	17D	Mosquito	1×10^{-1}
RSSE	Sofin-HO	Tick	1×10^1
POW	LB	Tick	1×10^1
LGT	TP21	Tick	1×10^1
NEG	1666	Tick	1×10^{-1}
YOK	Oita-36	Unknown	1×10^1

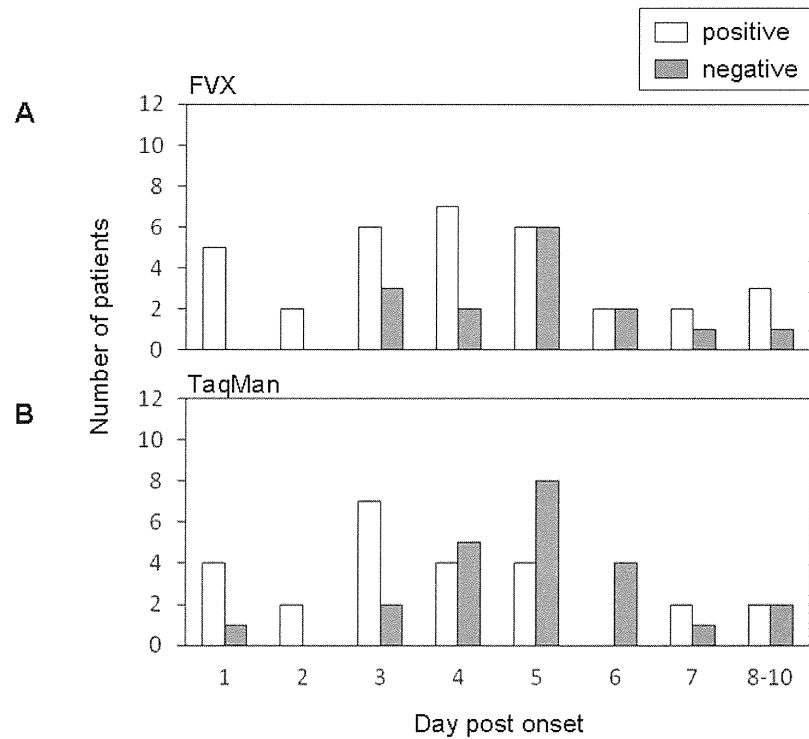


図 1 . 患者血清を用いた迅速診断法の評価 : 国立感染症研究所ウイ
ルス第一部第二室で 2008 年から 2009 年にかけて実験室診断された
デング輸入症例患者血清を用いてフラビウイルス共通迅速診断法
の評価を行った . 患者血清を各病日ごとに分類し , フラビウイル
ス共通 RT-PCR 法 (A) と TaqMan RT-PCR 法 (B) の結果を比較検討
した . その結果 , フラビウイルス共通 RT-PCR 法において急性期で
ある第 1 病日から 5 病日のデングウイルス遺伝子の検出率が高く ,
この傾向は TaqMan RT-PCR 法と一致した .

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)
バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究
分担研究報告書

新興アレナウイルスに対応可能なウイルス抗原検出法の開発に関する研究

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨： 2008年にアフリカ大陸で発生したラッサ熱様の出血熱の原因ウイルスは、新種のアレナウイルス(Lujo ウイルス)であった。本ウイルスの宿主は未同定で、バイオテロ以外にも輸入動物を介して国内にウイルスが侵入する可能性もある。また、これまで同定されているアレナウイルスと遺伝的にも抗原性もかなり異なるウイルスであった。本研究では、このような新興アレナウイルスなども検出可能な血清学的検出法を開発するために、アレナウイルス N 蛋白の cap-binding 領域の高度保存領域の 2 種類のペプチド抗体を作製した。これらは、ELISA やウエスタンブロットでは新世界、旧世界アレナウイルスの N 蛋白に広く交差反応性を示し、これらを用いたアレナウイルス検出法への応用が可能と考えられた。

研究協力者：福士秀悦、山本貴恵、吉河智城、谷英樹、谷口怜、伊波興一朗、西條政幸 (国立感染症研究所ウイルス第一部)

A. 研究目的

近年、種々の新興ウイルスや新種のウイルスによるウイルス性出血熱等の重篤なウイルス感染症が多発している。ウイルス性出血熱のうちウイルス株間の遺伝子変異が極めて多いアレナウイルスでは、しばしば RT-PCRによる検出から漏れるウイルスが見いだされている。このため、RT-PCR法に用いられる primers は、頻繁に修正が必要である。それでも、現在まで新種、新型のアレナウイルスを漏れなく検出可能な

RT-PCR法は開発されていない。しかし、アレナウイルスの遺伝子変異は、同種のウイルス株間では synonymous な変異が多いため免疫学的には広く交差する。しかし、旧世界アレナウイルスと新世界アレナウイルスでは免疫学的にも交差は認められない。また、2008年にアフリカ大陸で新興したラッサ熱様の出血熱の原因ウイルス Lujo ウイルスは、同じ旧世界アレナウイルスであるラッサウイルスとも遺伝的、血清学的にもかなり異なる。このため、新興アレナウイルス発生時には、ウイルスの同定に時間がかかっている。分離同定された新興アレナウイルスに関しては、その都度新規ウイルス検出法や血清診断法が整備されている。

このため、新興アレナウイルス発生時にヒトや宿主動物の疫学的解析ができず、根本的な対応ができていない。バイオテロに新興アレナウイルスが使用されると、原因が特定できない可能性が高い。そこで、本研究では、Lujoウイルスのような新興アレナウイルスも検出可能な血清学的検出法を開発することを目的とする。このため、本年度は立体構造の明らかになったラッサウイルスのN蛋白 (NP) のいくつかの機能ドメインのアミノ酸配列がアレナウイルス間で広く保存されていることに注目し、この領域のペプチド抗体を作製し、各種アレナウイルス間での交差反応性を明らかにした。

B. 研究方法

アレナウイルス NP の構造と mRNA cap-binding 領域の高度保存領域:

ラッサウイルスの NP の結晶構造が 2010 年 12 月に明らかにされた (Nature 468: 779-785, 2010)。構造相同性解析から、ラッサウイルス NP には、宿主細胞の mRNA の cap 構造を認識する領域と 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性領域が同定され、アレナウイルス間で機能領域が高度に保存されていることも明らかとなった。これらの領域の中でエピトープになり得るペプチド領域を推定し、ラッサウイルスの NP 構造ファイル 3MWP.pdb の表層に存在するかを PyMol ソフトにより解析した。

ペプチド合成と抗ペプチド血清の作製:

ラッサウイルス NP のアミノ酸 298-311 位と 311-324 位の 2 種のペプチドを SIGMA Aldrich 社で合成した。同社に、MBS 法 (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) により Cys 残基とキャリア蛋白 KLH の架橋とフロイントコンプリートアジュバントを用いたウサギに免疫(6回)を依頼し、抗ペプチド抗体を作製した。

ペプチド抗体と各種アレナウイルス NP との反応性:

旧世界アレナウイルスのラッサウイルス (LASV)、ルジョウイルス (LUJV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、新世界アレナウイルスの南米出血熱の原因ウイルスであるフニンウイルス (JUNV)、ガナリトウイルス (GTOV)、サビアウイルス (SABV)、マチュポウイルス (MACV)、チャパレウイルス (CHPV) の組換え NP は、組換えバキュロウイルスにより Tn5 昆虫細胞で発現し、精製したものをを用いた。これらの抗原を用いて ELISA とウエスタンブロッティング (WB) により、抗ペプチド抗体との反応性を解析した。また、ほ乳類発現ベクター pKS336 を用いて各種アレナウイルス NP を恒常的に発現する HeLa 細胞を作製し、塗抹アセトン固定標本を用いて間接蛍光抗体法 (IFA) により、抗ペプチド抗体との反応性を解析した。

C. 結果

アレナウイルス NP の mRNA cap-binding

領域の高度保存領域のエピトープの予測と構造上の位置の予測:

新旧アレナウイルスの NP 間で、**cap-binding** 領域の特に高度に保存されている領域のエピトープとなり得るペプチドを親水性、各種予測による二次構造等を勘案して選択した結果、**cap-binding** 領域のアミノ酸 298-311 位及びアミノ酸 311-324 位の 2 箇所がエピトープになり得ると考えられた(図 1)。また、これらの 2 種のペプチドのラッサウイルス NP の立体構造上の位置を PyMol で解析すると、表層に存在すると考えられた(図 2)。

ペプチド抗体と各種アレナウイルス NP との反応性:

上記の 2 ペプチドを化学合成し、KLM をキャリアとしてウサギを 6 回免疫した。得られた血清を用いて、旧世界アレナウイルスの LASV、LUJV、LCMV、新世界アレナウイルスの南米出血熱の原因ウイルスである JUNV、GTOV、SABV、MACV、CHPV の NP との反応性を ELISA, WB, IFA で調べた結果、IFA ではいずれの抗ペプチド抗体も反応しなかった。一方、ELISA, WB では 2 種の抗ペプチド抗体とも反応が認められた(図 3)。ELISA と WB での抗ペプチド抗体の反応性は基本的に同じであったが、若干反応性が異なった。抗 peptide 297-311 抗体は、反応性は弱いですが全ての新世界、旧世界アレナウイルス NP と WB 及び ELISA で反応した。一方、抗 peptide 311-324 抗体は、WB では LCMV-NP とは弱く反応したが、

ELISA では反応しなかった。しかし、他のアレナウイルス NP とは WB、ELISA とともに強く反応した。

D. 考察

アレナウイルスは、同一種のウイルスでも遺伝子配列上、同義置換が極めて多く RT-PCR による遺伝子検出ができないウイルス株がしばしば問題となる。このため、**degenerated primers** を用いた RT-PCR が広く用いられているが、それでも検出漏れの問題は解決できていない。近年、アフリカでは新興アレナウイルス性出血熱が発生し、新種の旧世界アレナウイルス (Lujo ウイルス) が同定され、南米出血熱の原因ウイルスとして新種の Chapare ウイルスが同定されている。新興アレナウイルスに関しては、遺伝子組換え蛋白等を用いて血清診断、病原診断法を開発しているが、現在まで旧世界、新世界アレナウイルスを広く検出可能な抗体は無い。抗原性の交差が最も認められる NP を高度免疫したウサギ血清でも新世界と旧世界アレナウイルスに交差せず、出血熱の回復患者血清でもウイルス種間の交差はあまり認められない。

本研究では、立体構造が明らかになることにより同定された NP の機能ドメインのうち mRNA の **cap-binding** 領域を形成する部位の蛋白表層に存在すると考えられた高度にアレナウイルス間で保存されたペプチド 2 種の抗血清を作製し、各種アレナウイルス NP との反応性を解析した結果、両ペプチド抗体とも種々のアレナウイルス NP

と反応した。抗 peptide 297-311 抗体は、調べた全てのアレナウイルス NP と反応したが、反応性が弱かった。これは、免疫が不十分であったためかもしれない。一方、抗 peptide 311-324 抗体は、LCMV を除く全ての出血熱原因アレナウイルス NP と強く反応した。peptide 311-324 のアミノ酸配列を比較すると ${}_{311}\text{CLSGDGWPYIASRT}_{324}$ の 322 位の S が LCMV だけ C であることから、322 位のアミノ酸が抗 peptide 311-324 抗体との反応に重要であると考えられる。ことことを明らかにするために LCMV のアミノ酸配列であるペプチド ${}_{311}\text{CLSGDGWPYIACRT}_{324}$ を作製し抗体を作製している。これらの抗体は、IFA では反応しなかったため detergent による可溶化により露出するエピトープと考えられる。これらの抗体は、新世界、旧世界アレナウイルスに幅広く反応するため、新種のウイルスが新興した場合に、迅速な病原同定に応用可能であると思われる。今後、免疫組織学的染色に適用可能かを調べて、当該抗体の有用性を明らかにしたい。

E. 結論

(1) アレナウイルスの cap-binding 領域に高度に保存される部位のペプチドを 2 種選択し、抗体を作製した。

(2) 抗ペプチド抗体は、幅広くアレナウイルス NP と反応した。

(3) この抗体を用いた新興アレナウイルス等の検出系の開発が可能であると考えられた。

F. 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

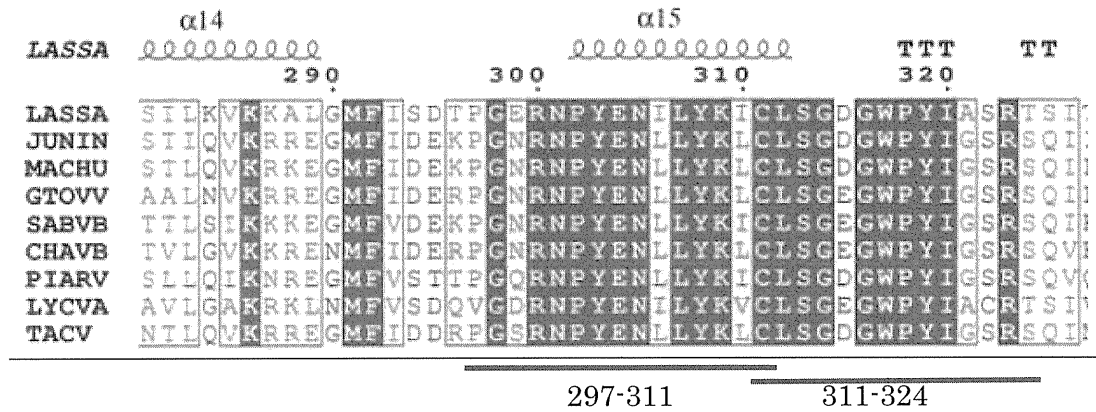
- 1) Shigeru Morikawa, Yusuke Sayama, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Ichiro Kurane, and Masayuki Saijo. Serological survey of Reston ebolavirus infection in the Philippines. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Disease, Stanford USA, 2011 June 20-22
- 2) 岡本宗裕、小野文子、藤本浩二、高野淳一朗、濱野正敬、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 Suzaki, Noriyo Nagata, Naoko Yoshikawa (Iwata), Hideki Hasegawa, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Tetsutaro Sata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa. Immune responses against EEV and IMV in non-human primates infected with monkeypox virus or vaccinated with a highly attenuated smallpox vaccine LC16m8 and protection from lethal monkeypox. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- 6) Chang-Kweng Lim, Yasuo Ami, Yoshiki Fujii, Meng Ling Moi, Kazutaka Kitaura, Akira Kotaki, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Ryuji Suzuki, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki. Pathogenesis of epidemic chikungunya virus in nonhuman primates. International union of

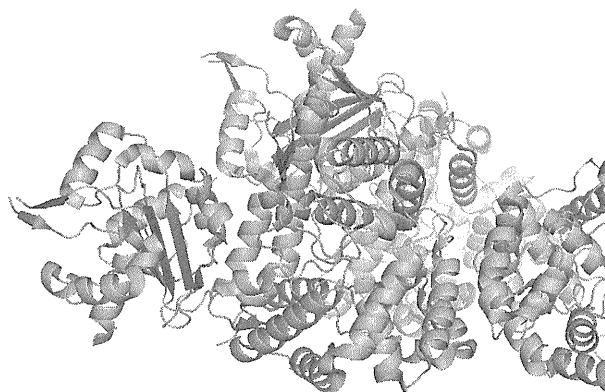
- microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- 7) Koichiro Iha, Mina Nakauchi-Hori, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Momoko Ogata, Shigeru Kyuwa, Masayuki Saijo, Victor Romanowski, Delia A Enria, Shigeru Morikawa. Establishment of serological diagnosis of Argentine hemorrhagic fever using recombinant antigens. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- 8) Kouji Sakai, Yohei Nishio, Noriyo Nagata, Yasushi Ami, Katsuhiko Komase, Masayuki Shimojima, Ken Maeda, Makoto Takeda, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. Characterization of canine distemper virus isolated from cynomolgus monkeys during 2008 epizootic in Japan. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- 9) Yusuke Sayama, Shuetsu Fukushi, Mariko Saito, Satoshi Taniguchi, Itoe Iizuka, Tetsuya Mizutani, Ichiro Kurane, Masayuki Saijo, Hitoshi Oshitani, Shigeru Morikawa. A serological survey of Reston ebolavirus infection in swine during epizootic in 2008 in the Philippines. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- 10) Satoru Arai, Se Hun Gu, Luck Ju Baek, Kenji Tabara, Hong-Shik Oh, Nobuhiro Takada, Hae Ji Kang, Keiko Tanaka-Taya, Shigeru Morikawa, Nobuhiko Okabe, Richard Yanagihara, Jin-Won Song. Expanded evolutionary insights from Jeju virus, a newfound hantavirus harbored by the Asian lesser white-toothed shrew (*Crocidura shantungensis*). International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- 11) Tetsuya Mizutani, Masako Abe, Naoto Ito, Kouji Sakai, Yoshihiro Kaku, Mami Oba, Momoko Ogata, Ichiro Kurane, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Makoto Sugiyama. An isolated virus homologous to porcine sapelovirus from wild boar. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- 12) Satoshi Taniguchi, Shumpei Watanabe, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Shigeru Kyuwa, Hiroomi Akashi, Yasuhiro Yoshikawa, Shigeru Morikawa. The detection of Reston ebolavirus antibodies in wild bats in the Philippines. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- G. 知的財産権の出願・登録状況
現在出願予定はない。

図1 アレナウイルス NP の cap-binding 領域の高度アミノ酸保存領域



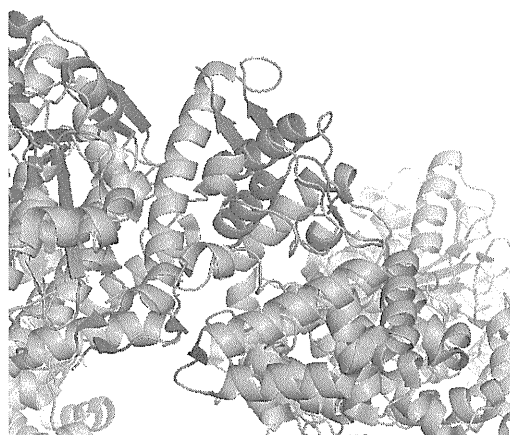
ペプチド部位	親水性	構造	抗原性予測
297-311	○	△	△
311-324	△	○	○

図 2-1 ラッサウイルス NP の $_{297}\text{PGERNPYENILYKIC}_{311}$ ペプチドの位置 (緑色)



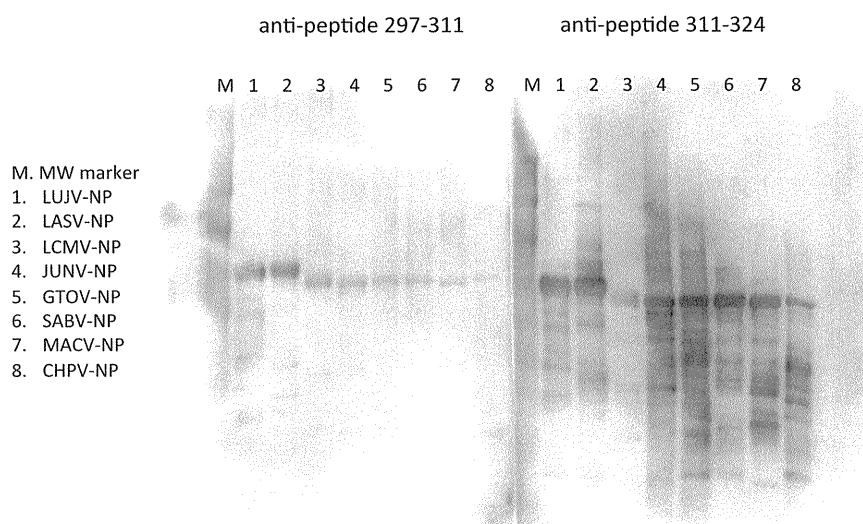
(PyMol View of Lassa NP structure; 3MWP.pdb)

図 2-2 ラッサウイルス NP の $_{311}\text{CLSGDGWPYIASRT}_{324}$ ペプチドの位置 (緑色)



(PyMol View of Lassa NP structure; 3MWP.pdb)

図3 アレナウイルス NP ペプチド抗体の各種アレナウイルス NP 反応性



WBによるペプチド抗体の各種アレナウイルス NP との反応 : anti-peptide 297-311 は、反応性は弱いですが全ての新世界、旧世界アレナウイルス NP と反応した。anti-peptide 311-324 は、LCMV-NP とは弱く反応したが、他のアレナウイルス NP とは強く反応した。

	Ag	pre-immune		post-immune	
		100x	1000x	100x	1000x
anti-peptide 297-311	Lujo-NP	0.2	0.1	0.7	0.1
	Lassa-NP	0.2	0.1	0.8	0.1
	LCM-NP	0.2	0.1	0.5	0.1
	Junin-NP	0.3	0.1	0.7	0.1
anti-peptide 311-324	Lujo-NP	0.1	0.1	3.0	0.8
	Lassa-NP	0.1	0.1	3.0	1.3
	LCM-NP	0.2	0.1	0.3	0.1
	Junin-NP	0.2	0.1	2.8	0.6

ELISAによるペプチド抗体の各種アレナウイルス NP との反応 : anti-peptide 297-311 は、反応性は弱いですが全ての新世界、旧世界アレナウイルス NP と反応した。anti-peptide 311-324 は、LCMV-NP とは反応しなかったが、他のアレナウイルス NP とは強く反応した。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究
分担研究報告書

人獣共通感染症（炭疽、狂犬病等）に対するヒト検体および感染源検体を用いた迅速検査、
消毒、その標準化等に関する研究

研究分担者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長
協力研究者：奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
：黒田 誠 国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター、センター長
：関塚剛史 国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター、主任研究官

研究要旨： わが国の多くの人獣共通感染症は希少感染症であり、ヒト検体や感染源となる動物・環境等についての迅速な検査、消毒、およびその標準化等が十分に整備されておらず、バイオテロに使用される可能性のある炭疽・狂犬病等の病原体について国内外の専門家と連携して共同研究を行う意義は大変に大きい。今年度、炭疽の発生と流行が問題となっているモンゴル National Center for Infectious Disease with Natural Foci (NCIDNF)との共同研究により、アジアで分離される炭疽菌株の遺伝学的タイピングシステムの開発を行った。モンゴルで土壌および感染動物から分離された 29 株の炭疽菌株から DNA を抽出して、MLVA (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis)による系統解析を行って、モンゴルで分離される炭疽菌株が日本や中国等で分離される炭疽菌株と同じクラスター(A3 クラスター)に分類されることを明らかにした。また、分離菌株のフルゲノム解析によってモンゴル株に特異的な SNP (Single Nucleotide Polymorphism)を抽出して系統解析を行うと、A3b クラスター内に分類されたモンゴル分離株を 3つの大きなブランチに系統分類可能なことが分かった。今回、フルゲノム解析で分離菌株に特異的な SNP を特定すると、遺伝的変異が少ない炭疽菌についても、希少発生事例（輸入感染症等）において、その感染源や汚染地域を推定できる迅速な遺伝学的タイピングシステム確立の可能性が示唆された。

A. 研究目的

国内外の専門家と連携してバイオテロに使用される可能性のある人獣共通感染症の患者・感染源動物等について、迅速な検査、消毒および標準化を進めることにより、わが国での公衆衛生行政における危機管理対応を容易にすることが本研究の目的である。

今年度、炭疽の発生と流行が問題となっているモンゴル National Center for Infectious Disease with Natural Foci (NCIDNF)との共同研究により、アジアで分離される炭疽菌株の遺伝学的タイピングシステムの開発を行い、我々の確立した SNP 解析方法を応用して分離株を菌株レベルで識別できる SNP タイピ

ングシステムを確立した。

B. 研究方法

1. MLVA8 解析

モンゴル国内で分離された土壌由来と動物由来の炭疽菌 29 株を使用した。

炭疽菌染色体上の 6 箇所および病原性プラスミド pXO1 および pXO2 上の各 1 箇所の併せて 8 箇所の繰り返し配列領域について特異的プライマーによる PCR を行い、ダイレクトシーケンシング (ABI 3730 xl DNA Analyzer)により塩基配列を解読した。

塩基配列より各繰り返し配列の繰り返し

数を算出し、アジア地域を始めとして欧米やアフリカ由来のデータと併せて、PHYLIP version 3.6 と Tree View version 1.6.6. を用いて、unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) method による系統解析を行った。

2. SNP 解析

2-1.

モンゴル株 29 株を用いて、我々が先に構築した、日本国内分離株を菌株レベルに識別可能な 80 箇所 (80 tag-SNP) による系統解析を行った。

80 箇所の SNP は ABI 3730 xl DNA Analyzer により解読・特定して、モンゴル株に特異的な 80 SNP ライブラリーを作成した後に、MEGA version 5 を用いて Neighbour-Joining Tree method で系統解析を行った。

2-2.

モンゴル株 29 株から、モンゴルでの分離地域と土壌・動物由来株を網羅する 10 株についてフルゲノム解析を行った。

遺伝子バンクに登録されている 21 株の公開フルゲノムデータと今回モンゴル株から得たゲノムデータを比較して、染色体上、病原性プラスミド pXO1 および pXO2 上の全 SNP を検索した。

また、検索した全 SNP から、モンゴル分離株に特異的な SNP パターンを抽出して、代表的な SNP (tag-SNP) を選択した後に、MEGA version 5 を使用して Neighbour-Joining Tree method で系統解析を行った。

C. 研究結果

1. MLVA8 解析

モンゴル分離株 29 株は全て A3 クラスターに分類された。A3 クラスターは日本を始めとしたアジア諸国で分離される炭疽菌が多く分類されるクラスターである。しかしながら、MLVA8

による系統解析ではモンゴル分離株が形成するクラスターは同じブランチからの枝分かれから形成されており、菌株レベルでの識別は不可能であった (図 1)。

2. SNP 解析

2-1.

MLVA8 よりも解析力の高い 80 tag-SNP を用いてモンゴル分離株の系統解析を行った (図 2)。モンゴル分離株は、日本分離株や Ames 株と同じ A3b クラスターに分類された。また、A3b クラスター内で大きく 3 つのブランチを形成した。

80 tag-SNP は、MLVA8 解析より詳細な分類が可能であるが、日本分離株に特異的な 80 tag-SNP ではモンゴル分離株を菌株レベルで識別することは困難であった。

2-2.

モンゴル株 29 株から、モンゴルでの分離地域と土壌・動物由来株を網羅する 10 株のうち、7 株についてフルゲノムデータを得ることができた。

遺伝子バンクに登録されている 21 株の公開フルゲノムデータとゲノムデータを比較して、染色体上で 3741 箇所、病原体プラスミド pXO1 上で 82 箇所、pXO2 上で 76 箇所の SNP が抽出された。

モンゴル分離株に特異的な 148 箇所の SNP を抽出して、各 SNP パターンから代表的な SNP を 12 箇所に絞り込んだ。この 12 箇所の SNP を利用して系統樹を作成したところ、菌株レベルでの識別が可能となった (図 3)。

D. 結論

SNP を用いた遺伝学的タイピングによって、モンゴル分離株を菌株レベルで識別できることを明らかにした。

分離菌株のフルゲノム解析によってモンゴル株に特異的な SNP (Single Nucleotide Poolymorphism) を抽出して系統解析を行うと、A3b クラスター内に分類されたモンゴル分離

株を 3 つの大きなブランチに系統分類可能となった。

フルゲノム解析で分離菌株に特異的な SNP を特定すると、遺伝的変異が少ない炭疽菌についても、希少発生事例（輸入感染症等）において、その感染源や汚染地域を推定できる迅速な遺伝学的タイピングシステム確立の可能性が示唆された。

本研究は、わが国で希少とされるバイオテロに使用される可能性のある人獣共通感染症の具体的な症例分析と病原体解析が可能になることから、公衆衛生行政への貢献度は極めて高いと考えられた。

E. 研究発表

A Okutani, H Tungalag, B Boldbaatar, A Yamada, D Tserenorov, I Otgonchimeg, A Erdenebat, D Otgonbaatar, and S Inoue.

Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) Japanese Journal of Infectious Diseases 2011;4:345-348.

Nguyen A.K.T., Nguyen vinh D., Ngo G.C., Nguyen T.T., Inoue S., Yamada A., K.X.D., Nguyen van D., Phan T.X., Pham B.Q., Nguyen H.T. and Nguyen H.T.H. (2011) Molecular epidemiology of rabies virus in Vietnam (2006-2009). Jpn.J.Infect.Dis. 64:391-396.

F. 知的所有権の取得状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

图 1

