

201225006A

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

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24年度 総括・分担研究報告書

平成25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
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24年度 総括・分担研究報告書

平成25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（国立感染症研究所獣医科学部）	
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 宿主域拡大の解析と総括	13
研究分担者：森川茂（国立感染症研究所獣医科学部）	
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	30
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と疫学	36
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	54
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 ウイルスの診断法と分子疫学	69
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	84
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	91
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	
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）	
	99
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	120
研究分担者：遠藤大二（酪農学園大学獣医学部放射線学）	
10. 出血熱ウイルスの治療・予防法の確立に資する細胞侵入機構の解析	142
研究分担者：谷英樹（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	153

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

国立感染症研究所獣医科学部長 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（新種のフレボ、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した。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、その機構を解明した。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した。

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）。ラッサウイルス遺伝子検出RT-LAMPを開発した（安田）。ニパウイルス遺伝子検出RT-Smart-Amp方を開発した（甲斐）。トガリネズミ形目などの小動物から新たにハンタウイルス遺伝子を検出した（新井）。ラット由来牛痘ウイルスの疫学を行った（森川）。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）。新興ウイルス、新型ウイルス遺伝子検出法を開発した（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候補の有効性を証明した（甲斐）。ニパウイルスの3' UTRによる遺伝子発現制御機構の解明を試みた（甲斐）。サルのにヌジステンパーウイルス感染症流行

の原因 CDV のサルへの病原性、各種動物のレセプター指向性を明らかにした（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）。新興アレナウイルスであるルジョウイルスは他のアレナウイルス種と異なり、低 pH による細胞融合活性は認められず、これまでアレナウイルスレセプターとして知られている Tfr1 や DG を利用しない細胞侵入機構を示すことが明らかとなった（谷）。

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）
谷英樹（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）

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に関しては、遺伝子検出法・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（Lloviu 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。ハ

ンタウイルスは、げっ歯類だけでなく、新たにトガリネズミ目の野生動物や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、その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も必要である。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した。

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、ラッサウイルス N 遺伝子検出用 RT-LAMP 法の開発、ヘンドラ、ニパウイルス用 RT-Smart-Amp 法の開発
- 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) 国内の齧歯類での牛痘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. 宿主域拡大や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) ハンタウイルスによる肺水腫発症モデル動物の開発
- 4) 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
- 5) 新興アレナウイルスであるルジョウイルスの細胞侵入機構の解析

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。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 を開発した。

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開発した。また病原診断法としてウイルス抗原検出 ELISA を開発した。

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、新たなハンタウイルスを発見した。

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。

ナイジェリアのヒト及び動物の各種出血熱ウイルスの疫学を実施した。

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

サルに致死性 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。さらにこのウイルスのサルでの病原性、レセプター指向性を解析した。

ニパウイルスの霊長類感染モデル系を開発した。また、リバーシジェネティッ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。

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。

ルジョウイルスの GP を該当した pseudotype VSV を用いてレセプターの解析と細胞侵入機構を解析した。

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、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、pseudotype VSV による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。また、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感染性ウイルス（ルナウイルス）が分離された。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。

チャパレウイルスの血清診断法を開発した結果、IgG-ELISA, IF では他の既知の南米出血熱の原因アレナウイルスと強く交差した。しかし、pseudotype VSV による代替え中和法では交差がなかった。

ルジョウイルスの組換え NP を抗原とする血清診断法を開発した結果、ラッサウイルス抗体とは鑑別できた。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。

ラッサウイルス N 遺伝子検出用 RT-LAMP 法を開発した。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 を開発し高感度で迅速に遺伝子を検出できた。

ニパ、ヘンドラウイルス特異的 RT-Smart-Amp 法を開発した。これぞれのウイルス間で交差はなく、ヘンドラ 6,000 コピー、ニパウイルス 600 コピーの検出感度であった。

(3) 豚のレストンエボラウイルス感染症の血清診断法の開発と評価：

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、代替えウイルス中和試験としては、pseudotype VSV による中和試験法を開発した。フィリピンで流行のあった施設の豚血清と非流行地の豚血清の特異抗体を調べた結果、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の多くに NP 及び GP 抗体が検出され、約 70%の豚がウイルスに感染していたことがわかった。血清診断法で抗原調整の比較的容易な部分 NP 抗原による ELISA 法のフィリピンの研究施設への技術移転も行った。

(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、本州、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、本州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これまで未知の複数のハンタウイルス遺伝子を検出した。フィリピンの翼手目からハンタウイルス遺伝子は検出できなかった。

(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。また、新興動物ウイルスとしてネコモルビリウイルスとトリボルナウイルスの遺伝子検出系を開発し、遺伝子検出に成功した。

一方、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。ハンタウイルスでデザインされたプライマーによりプログラムの有用性を検討した結果 10 コピーの感度で遺伝子が検出できた。

（6）国内の齧歯類での牛痘ウイルス感染状況の疫学的解析：

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。

（7）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：

ナイジェリア北部のヒツジ血清 121 検体中 1 検体が CCHFV 抗体陽性であった。住民血清約 300 検体の LASV、CCHFV、および RVFV に対する抗体陽性率は、それぞれ 7.4%、14.1% および 2.4% であった。このこ

とからナイジェリア北部にはラッサ熱に加えてリフトバレー熱、クリミア・コンゴ出血熱も流行していることがわかった。

一方、2006 年から 2010 年にかけて、ザンビアのげっ歯類動物約 400 頭の血清中の抗体を、アレナウイルスの NP 抗原（Lassa、Lujó および LCM ウイルス）を用いてスクリーニングした結果、多くの動物が抗体陽性であった。ルジョウイルスに強く反応する血清もあった。

2. 宿主城拡大・病原性獲得のメカニズムの解明

（1）サル of 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と分離ウイルスの病原性：

流行初期の発症サルから分離された CDV 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。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、感染初期と流行後期の分離株ではそれぞれに若干の *quasispecies* が認められ、後期のウイルス株では若干遺伝子の多様性が増してはいるがかなり遺伝的に安定であった。流行初期の CDV のレセプター指向性の解析から、ウイルスはイヌとマカク属サルの SLAM を効率よく利用したがヒト SLAM は効率よく利用できなかった。一方、ヒト、マカク属サル及びイヌの上皮系細胞レセプターである nectin4 を効率よく利用して感染した。一方、ヒトの SLAM

発現 Vero 細胞に馴化した CDV は、H 蛋白の 541 位のアミノ酸がプロリンからセリンに変異していた。

(2) ニパウイルスの霊長類モデル系の開発、ワクチンの開発とニパウイルス 3' UTR による遺伝子発現制御機構：

ニパウイルスを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、1 4 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。

一方、ニパウイルス 3' UTR による遺伝子発現制御機構を解析した結果、RNA の不安定化に関わるタンパク質 hnRNP が 3' UTR 配列との相互作用を介してウイルス mRNA を不安定化し、遺伝子発現の抑制効果を持つことを明らかにした。

(3) 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。

(4) 宿主の抗ウイルス活性因子 Tetherin の相互作用の解析：

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。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では、tetherin アンタゴニスト活性はなく IFN- α によるウイルス増殖抑制に tetherin が関与していた。

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 を利用していた。

(5) 新興アレナウイルスであるルジョウイルスの細胞侵入機構の解析：

ルジョウイルスのエンベロープ蛋白質 (GP) を外套したシュードタイプ VSV を作製し、その細胞指向性、細胞侵入機構の解析を行った。様々な哺乳類細胞への感染感受性および pH 依存的な細胞侵入が確認された。ルジョウイルスは他のアレナウイルス種と異なり、低 pH による細胞融合活性は認められず、これまで知られている既存受容体を利用しない細胞侵入機構を示すことも明らかとなった。

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、チャパレウイルス（ボリビア）、ルジョウイルス（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、新種のハンタウイルスも検出できた。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。

本研究班では、「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) 豚のレストンエボラウイルス感染症の診断法と感染の実態、3) 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、4) 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、5) 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成功裏に行われた。さらに国内のラット由来牛痘ウイルスの疫学、ナイジェリアやザンビアでの疫学にも開発された診断法が有効に利用された。

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) ハンタウイルス肺症候群の SCID マウスモデルの開発と好中球の発症への関与、4) 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、5) 新興アレナウイルスであるルジョウウイルスの細胞侵入機構などが明らかにされた。

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。

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病病理に、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。また、ルジョウウイルスは遺伝的にも既知のアレナウイルスと大きく異なるが、その細胞侵入機構やレセプターも既知のアレナウイルスとは異なった。

F. 健康危険情報

2008 年にフィリピンで発生した豚の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。しかし、2011 年に中国の上海近郊の豚施設で死亡した豚から 3 回に渡りレストンエボラウイルス遺伝子が検出され、中国のコウモリから抗体陽性個体が見ついている。このことはレストンエボラウイルスがフィリピンに限局せずアジアに広く分布する可能性を示唆する。

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。2012 年には英国でクリミア・コンゴ出血熱の輸入症例が発生し死亡した。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熱性血小板減少症候群(SFTS)が発生した。患者の致死率は約12%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。2012年に国内でも患者が発生したことが明らかとなり、国内にも SFTS ウイルスが存在することが明らかとなっている。

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

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：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（国立感染症研究所獣医科学部部長）

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、病原診断法を開発した。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。また、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抗原検出 ELISA による病原診断法を開発し、血清診断法と併せてほぼ診断が可能となった。

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た。また、豚のレストンエボラウイルス診断系が確立され、フィリピンの検査担当機関に血清診断法の技術移転をした。

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 の遺伝子配列に最大で 11 塩基の変異が蓄積していた。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る。サルから分離された CDV はサルの SLAM, nectn4 を効率よく利用して感染するがヒト SLAM を効率よく利用するには H 蛋白の変異導入が必要であった。

研究協力者：山本貴恵、伊波興一朗、谷口
怜、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、緒方も
も子、西條政幸（同、ウイルス第一部）、
酒井宏治、竹田誠（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）、水谷哲也（東京

農工大学）、池郁生（理化学研究所 BRC 実
験動物開発室）、Roger Hewson（英国 HPA）、
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、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、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)感染症の原因ウイルスの病原性の解明、サルのレセプター親和性等を実施し、ヒトへのリスクを評価することを目的とした。

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え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) 新種アレナウイルス(ルジョウイルス)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。NP に対する単クローン抗体を 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 Lujo-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。

4) ルジヨウイルス 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 Lujo-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 Lujo-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。ルジヨウイルスの検出感度の評価は、英国 Health Protection Agency (HPA) の Dr. Roger Hewson の研究室との共同研究により、4) で開発した Lujo-NP 検出 ELISA キットを、感染性ルジヨ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ヨ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。

5) 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。

6) 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:

フィリピンの養豚場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、代替え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。

7) サルで流行した 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。

8) サルで流行した CDV の病原性と宿主域拡大の原因究明：

7) の CDV (#7) をカニクイザルに実験感染すると全身感染症を起こした。この CDV をヒト 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) に馴化させた場合の H 蛋白の変異を解析した。

(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。本研究で用いたアルゼンチン出血熱患者のパネル血清は、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。

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からチャパレウイルスやルジョウウイルスの NP を精製した。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 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、ルジョウウイルスに比較的強く交差した (表 2)。ルジョウウイルス 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。このため、ルジョウウイルス抗体の検出は、これまでに作製した、ラッサウイルスや LCM 抗原による ELISA や IF と比較することで可能であると思われた。

一方、チャパレウイルス NP は、他の南米出血熱の病原アレナウイルス (フニン、ガナリト、マチュポ、サビアウイルス) NP を抗原とする ELISA や IF では強く交差するため血清学的に鑑別するためには、2) で作製した VSV シュードタイプによる中和試験が必要と思われた。

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%