

であった。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) 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：

ルジョウイルス NP に対する単クローン抗体 8 種は全て Lujo 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 クローンはウェスタンブロットティング(WB)あるいは IFA で、または WB, IFA 両方で反応した。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 Lujo-NP との WB での反応性により解析した結果、クローン 3B2 は Lujo 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 位の領域を認識した(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)。

4) ルジョウイルス 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 Lujo NP ウサギ抗体を検出用抗体とした。単クローン抗体を 100ng/100 μ L PBS で ELISA platen に固

相化し、Lujo NP を希釈して検出感度を調べた結果、Lujo NP の検出感度は、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)。本抗原検出 ELISA は、英国 Health Protection Agency (HPA) の Dr. Roger Hewson と共同研究により、感染性ルジョウイルスを用いて特異性・感度を評価した。感染性のルジョウイルス（感染力価が 5.6×10^5 TCID₅₀/mL）を 2% NP40 と等量混合して可溶化、不活化した。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る。このため、可溶化ルジョウイルス液を 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 は可溶化ルジョ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ョウイルス抗原と反応し、6A3, 6E1, 3G10 が 3×10^2 TCID₅₀/well の感度で検出できた。3A4 と 3F1 では 5×10^2 TCID₅₀/well の感度であった(図 4)。

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、国内のラットへの牛痘ウイルスの感染率はかなり低いと考えられた。

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：

サルのレストンエボラウイルス検査用に開発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（表 3）。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。

7) サルに流行した CDV 感染症の原因 CDV の遺伝子解析：

流行初期と後期の分離ウイルスの遺伝子配列を決定し、そ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 箇所の塩基に quasispecies が、#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 箇所の塩基に 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(図 5)。なお、中国でサルの CDV 感染症の原因ウイルスの遺伝子配列とは、非常によく一致したことから同一起源を持つと考えられた。

8) サルで流行した CDV の病原性と宿主域拡大の原因究明：

流行初期の発症サルから分離された CDV#7 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。In vitro で CDV#7 の各種動物 SLAM あるいは nectin4 発現 Vero 細胞への感染性を解析した結果、CDV#7 はイヌとマカク属サルの SLAM を効率よく利用し、ヒト、マカク属サル及びイヌの nectin4 を効率よく利用して感染した（図 6）。一方、ヒトの SLAM 発現 Vero 細胞に馴化した CDV#7 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。この変異によりウイルスは、イヌとマカク属サル

及びヒトの SLAM を効率よく利用できるようになった。

流行後期の発症サルから分離された CDV#11, 12 とも SLAM の指向性は CDV#7 と同様でありヒト SLAM 指向性にはなっていないかった。

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。チャパレウイルスに対しては、抗体検出用 IgG-ELISA, IFA が開発されたが、これら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ると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。アレナウイルスは変異が多いためルジョウウイルスの病原診断には RT-PCR だけでなく抗原検出系が必要である。そこで、ルジョウウイルスの NP に対する単クローン抗体を作製し、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、感染性ルジョウ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。ルジョウ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。

欧州で近年問題となった齧歯類由来の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、国内のドブネズミを中心に牛痘ウイルス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。現時点では、国内での牛痘ウイルス感染症のリスクは低いと考えられた。

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、約7割の豚が感染していたことが分かった。この診断システムはフィリピンのRITMとBAIに技術移転され、今後の疫学調査に有用と考えられる。

サルで流行したCDV感染症は、CDVが宿主域を霊長類まで広げたことからヒトへの感染リスクが危惧された。これまでの解析から、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。このウイルスはイヌへの病原性も非常に高いことが実験感染から証明されている。モルビリウイルスのリンパ球へ感染するときのレセプター分子SLAMのアミノ酸配列は、イヌ・サル間で67%、イヌ・ヒト間で64%、サル・ヒト間で97%一致する。興味深いことにCDV#7等はイヌ、サルのSLAMを効率よく

レセプターとして利用するのにヒトSLAMは効率よく利用できない。しかし、H蛋白の1アミノ酸変異でヒトSLAMを利用できるようになる。CDV#10, #11, #12で同様にヒトSLAM馴化を試みると541位の近傍のアミノ酸変異が導入された。このことはこの近辺のアミノ酸置換が馴化に重要であることを示唆する。これらの変異が導入されたウイルスに病原性を保ったものが出現すれば、将来ヒトへの感染リスクが高まると考えられる。

E. 結論

1種病原体に指定されたチャパレウイルスの診断法、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ョウイルスの診断法を開発した。

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、継続してドブネズミ等の調査をする必要がある。

豚のレストンエボラウイルス感染の血清診断系が確立され、一部の診断法をフィリピンの2機関に技術移転した。

サルのCDV感染症の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。サルとヒトのSLAMは97%アミノ酸配列が一致するが、流行中はヒトSLAMを利用できるウイルスの出現はなかった。しかし、*in vitro*では容易に馴化できることがわかった。

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、Lloviu 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がウイルス保有の有無は明らかでない。

中国では 2006 年からアカゲザルに致死性的 CDV 感染症が発生したことが明らかにされ大規模な流行では 10,000 頭あまりが感染し 4,200 頭ほどが死亡している。

中国の上海近辺の養豚施設で死亡豚から 3 回にわたってレストンエボラウイルス遺伝子が検出された。さらに、中国南部でデマレルーセットオオコウモリなどからレストンエボラウイルス抗体が検出された。フィリピンので稀ルーセットオオコウモリからの抗体も継続して検出されている。

G. 研究発表

1 論文発表

1. Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 2013, 87(2): 1105-1114
2. Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie

Yamamoto, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Shigeru Morikawa, Akio Yamadaa, Kiyoshi Tanabayashia . Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia using a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2013 20(1): 9-16

3. Satoshi Taniguchi, Yusuke Sayama, Noriyo Nagata, Tetsuro Ikegami, Mary E Miranda, Shumpei Watanabe, Itoe Iizuka, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Yoshiyuki Ishii, Masayuki Saijo, Hiroomi Akashi, Yasuhiro Yoshikawa, Shigeru Kyuwa and Shigeru Morikawa. Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. *BMC Veterinary Research*, 2012 Oct 11;8(1):189.
4. Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Viruses*, 2012 Oct 12;4(10):2097-114. (special issue: Arenaviruses).
5. Harutaka Katano, Seiichi Sato, Tsuyoshi Sekizuka, Akiko Kinumaki, Hitomi Fukumoto, Yuko Sato, Hideki

- Hasegawa, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Tetsuya Mizutani, Makoto Kuroda. Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2012;5(8):814-823
6. Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S. A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. *BMC Vet Res.* 2012 Jun 18;8:82.
 7. Lihoradova O, Kalveram B, Indran SV, Lokugamage N, Juelich TL, Hill TE, Tseng CT, Gong B, Fukushi S, Morikawa S, Freiberg AN, Ikegami T. The dominant-negative inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR increases the efficacy of Rift Valley fever virus MP-12 vaccine. *J Virol.* 2012 Jul;86(14):7650-61.
 8. Tani H, Morikawa S, Matsuura Y. Development and Applications of VSV Vectors Based on Cell Tropism. *Front Microbiol.* 2011;2:272.
 9. 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.* 2012 Mar;180(1-2):68-74.
 10. 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 Mar 15;424(2):99-105.
 11. Yusuke Sayama, Yuki Eshita, Takuya Yamao, Miho Nishimura, Tomomitsu Satho, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Kouji Sakai, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Hitoshi Oshitani, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa and Tetsuya Mizutani*. Prevalence of Phasi Charoen Virus in Female Mosquitoes. *J. Parasitology and Vector Biology.* 2011. 3, 19-21.
 12. 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, Perloth M, and Greenberg RN. Safety and Immunogenicity of LC16m8, an Attenuated Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive Adults. *J Inf Dis* 2011, 204(9):1395-402
 13. 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 Feb;44(1):40-4.
14. 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
 15. 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.
 16. Saijo M, Morikawa S, Kurane I. Recent progress in the treatment for Crimean-Congo hemorrhagic fever and future perspectives. *Future Virology*, 2010, 5(6): 801-809.
 17. Shiota T, Lixin W, Takayama-Ito M, Iizuka I, Ogata M, Tsuji M, Nishimura H, Taniguchi S, Morikawa S, Kurane I, Mizuguchi M, Saijo M. Expression of herpes simplex virus type 1 recombinant thymidine kinase and its application to a rapid antiviral sensitivity assay. *Antiviral Res*. 2011 Jun 2;91(2):142-149.
 18. Shiota T, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. Long-term observation of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection in a child with Wiskott-Aldrich syndrome and a possible reactivation mechanism for thymidine kinase-negative HSV-1 in humans. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64(2):121-6.
 19. 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* 2011;412(1):179-87.
 20. Sunohara M, Morikawa S, Murata H, Fuse A, and Sato I. PKC plays a crucial roles in c-mpl gene expression in megakaryoblastic cells. *Okajimas Folia Anat Jpn* 87(3):151-4 (2010)
 21. 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.
 22. 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.
23. 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 betaherpesvirus in bats. *Emerg Infect Dis.* 2010 Jun;16(6):986-8.
24. Shumpei Watanabe, Tetsuya Mizutani, Kouji Sakai, Itoe Iizuka, Tomoyuki Shiota, Yusuke Sayama, Shumpei Tsuda, Kentaro Kato, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa, and Hiroomi Akashi. Development of a method to detect viral RNA sequences from cultured cells by combining size fraction and a rapid determination system for viral RNA sequences (RDV). *J. Vet. Sci. Tech.* 2010. 1. 1000103 (open access)

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
チャバレウイルス出血熱	チャバレウイルス	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	新種のフレボウイルス	2010	中国

表 2. Lujo virusと他のアレナウイルスとのIFAでの交差反応

Ab	Ag	Lujo NP	Lassa NP	LCM NP	Junin NP
a-Lujo rabbit serum	#1	2560	80	<40	<40
	#2	2560	160	40	80
a-Lassa rabbit serum	#1	640	2560	1280	80
	#2	160	1280	40	<40
a-LCM rabbit serum	#1	1280	1280	2560	160
	#2	320	640	2560	<40
a-Junin rabbit serum	#1	<40	<40	<40	2560
	#2	<40	<40	<40	1280

→ LUJV-NPは、旧世界アレナウイルスであるLASV, LCMVと交叉する

図1. Lujo-NP に対する単クローン抗体3クローンのエピトープ

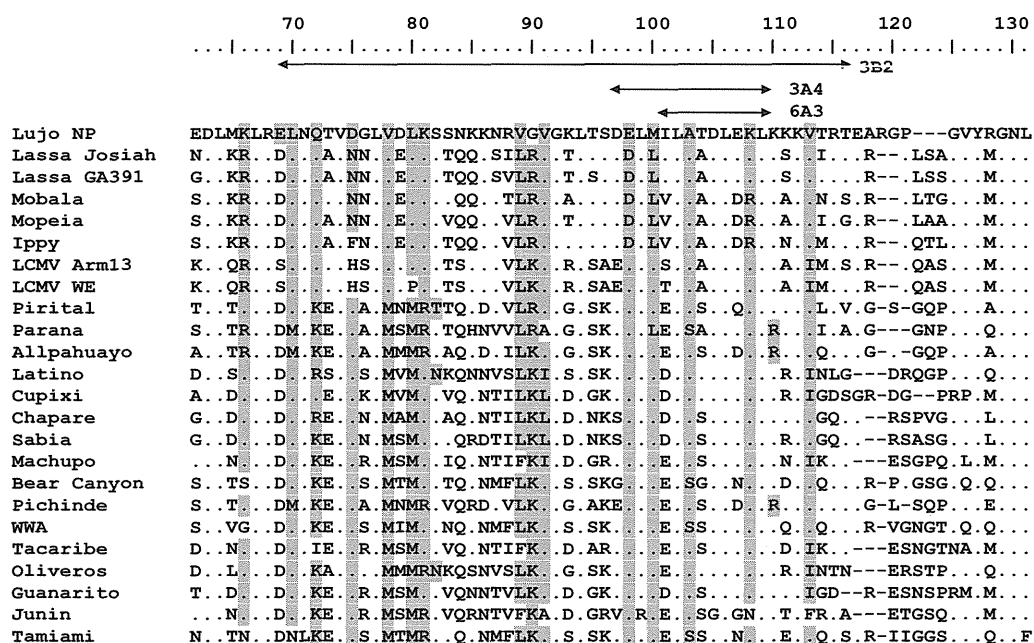
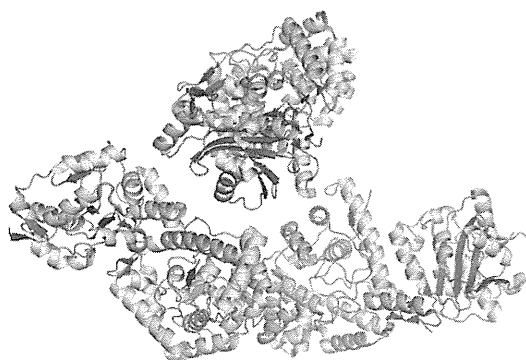
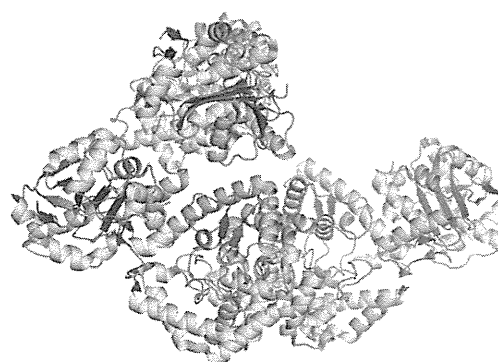


図2. Lujo-NP に対する単クローン抗体3クローンのエピトープの立体構造上の位置

Surface localization of epitope of mAb 3B2(69-116 aa)

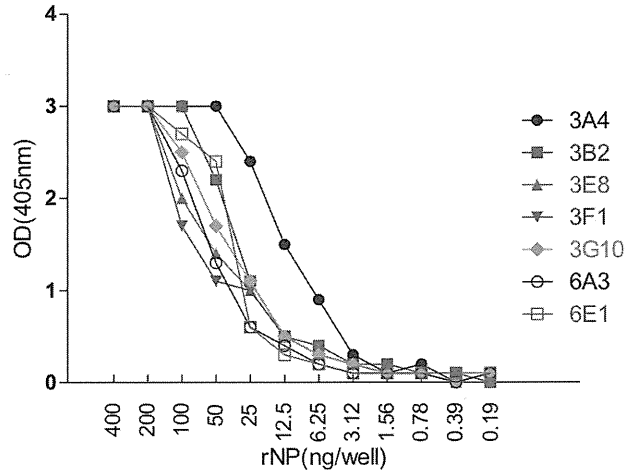


Surface localization of epitope of mAb 3A4(98-109 aa) and 6A3(101-109 aa)



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

図 3. Lujo-NP 抗原検出 ELISA の組換え Lujo-NP 検出感度



mAb	検出限界 (ng/reaction)
3A4	0.78
3F1, 3G10, 6A3	1.56
3B2, 3E8	3.12

図 4. Lujo-NP 抗原検出 ELISA の感染性 Lujo ウイルスの検出感度

Graphical results for detection of Lujo virus and negative control preparation at the highest concentration tested:

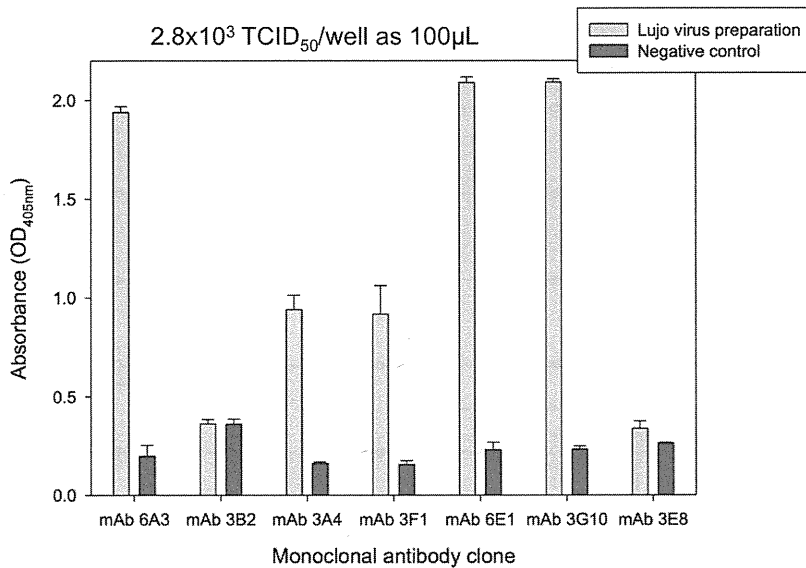


表 3. フィリピンの豚施設でレストンエボラウイルス感染症が流行した時の豚の抗体陽性率

	NP		GP		NT
	IgG-ELISA	IFA	IgG-ELISA	IFA	
Bulacan	115/146 (78.8%)	104/146 (71.2%)	119/146 (81.5%)	115/146 (78.8%)	108/146 (74.0%)
Pangasinan	62/69 (89.9%)	54/69 (78.3%)	46/69 (66.7%)	54/69 (78.3%)	46/69 (66.7%)
Tarlac	0/98 (0%)	0/98 (0%)	1/98 (1.0%)	0/98 (0%)	0/98 (0%)
Japan	1/49 (2.0%)	0/49 (0%)	1/49 (2.0%)	0/49 (0%)	0/49 (0%)

図 5. サルの CDV 感染症流行初期と後期の分離ウイルスの遺伝子配列と quasispesis

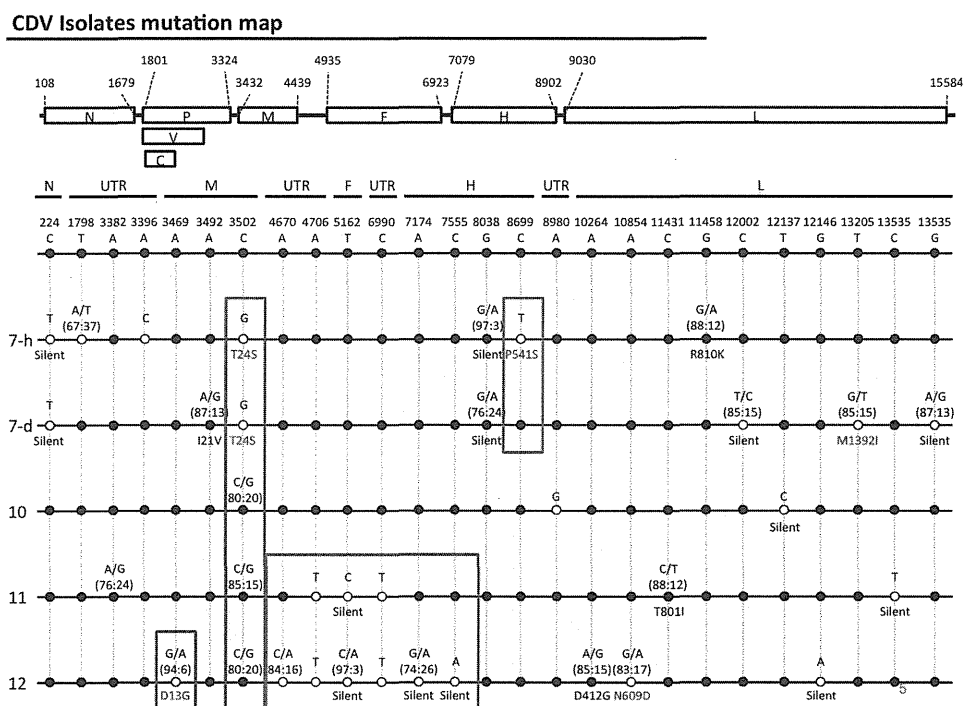
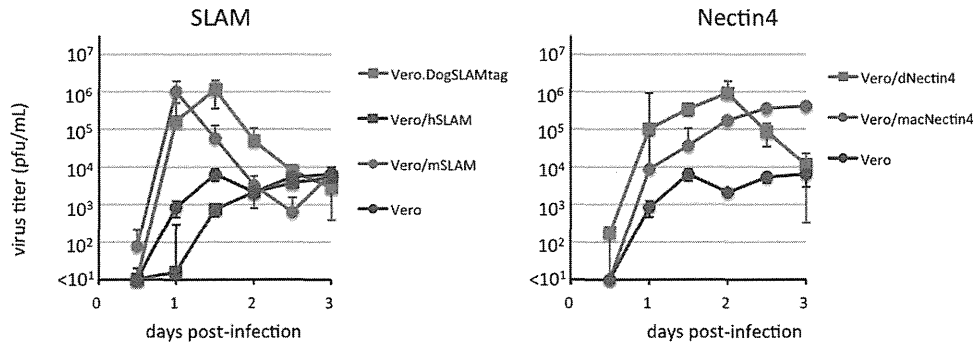


図6. サルから分離された CDV の各種動物のレセプター指向性

Replication kinetics of the CDV CYN07-dV



CDV CYN07-dV efficiently utilizes monkey SLAM and monkey and human Nectin4, while does not utilize human SLAM

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

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。具体的には、以下の研究を行った。（1）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。（2）ニパウイルスの霊長類感染モデル系の確立と新たに開発したワクチンの検討を行なった。（3）ニパウイルス3' UTRによる遺伝子発現制御機構の解明を試みた。

研究協力者：米田美佐子（東京大学医科学研究所）

この感染モデル系を用いて、新たに作出したニパウイルス膜蛋白を発現する組換え麻疹ウイルスのワクチン効果を調べた。

A. 研究目的

ヒトにおけるニパウイルス感染の予防法・治療法の開発には、優れた霊長類感染モデル系が不可欠である。そこで、アフリカミドリザルを用いた感染実験を行ない感染モデルとしての有用性を検討した。また、

B. 研究方法

（1）ニパウイルスおよびヘンドラウイルスのRT-Smart-Amp法の開発
a) 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

アを使用して 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て、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て、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。

b) 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。

c) 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。

(2) ニパウイルスの霊長類感染モデル系の確立と組換え麻疹ウイルスを用いたワク

チンの検討

a) ニパウイルスを、体重 4.4 kg - 5.1 kg のアフリカミドリザル（♂）に、106、108TCID₅₀ ずつ接種した。接種経路は、経口・経鼻（IN+PO）と腹腔内投与（IP）の二通りで行なった。接種後、体重、体温の測定と、口腔、鼻腔スワブの採取を行ない、瀕死個体については解剖して、主な臓器を採取した。スワブ、臓器から RNA を抽出し、real-time PCR でウイルス量を測定した。また病理組織学的解析も行なった。

b) ニパウイルス用ワクチンとして、麻疹ウイルス Edmonston 株（MV-Ed）および HL 株（MV-HL）のリバースジェネティックス系を用いて、ニパウイルスの G タンパクを発現する組換え麻疹ウイルスを作出した（rMV-Ed-G、rMV-HL-G）。これらを 10 週齢のハムスターに接種し、経時的採血を行ない血清中の抗 G 抗体の上昇を確認後、ニパウイルスによる攻撃試験を行った。

c) b) で作出した rMV-Ed-G をアフリカミドリザルに接種し、経時採血を行ない血清中の抗 G 抗体の上昇を確認後、ニパウイルスによる攻撃試験を行った。

(3) ニパウイルス 3' UTR による遺伝子発現制御機構の解明

ニパウイルスが効率良く感染・増殖可能な HeLa 細胞を用いて、3' UTR による遺伝子発現への影響を reporter assay を用いて観察した。また、RNA pull down 法を用いて 3' UTR へ結合する宿主因子の同定を行った。

C. 研究結果

(1) ニパウイルスおよびヘンドラウイルスの RT-Smart-Amp 法の開発

a) 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。

b) *in vitro* transcription により合成したテンプレートを用いて RT-Smart-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 6000 コピーであった。

c) 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。

(2) ニパウイルスの霊長類感染モデル系の確立と組換え麻疹ウイルスを用いたワクチンの検討

a) IP でウイルスを接種したサルでは、ウイ

ルス量に関わらず接種 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。IN+PO でウイルス接種したサルでは、7 日目から発熱が始まり同時に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。Real-time PCR により、IP 接種したサルのスワブからはほとんどウイルス RNA は検出されなかったが、IN+PO 接種したサルからは接種後 2 日目から 11 日目までウイルス RNA が検出された。臓器サンプルにおいては、IP 接種のサルでのみ肺、脾臓、腎臓、心臓、扁桃、腸間膜リンパ節などからウイルス RNA を検出した。また病理組織学的解析においては、IN+PO 接種のサルでは著変は認められなかったが、IP 接種のサルにおいては多くの臓器で病変を認めた。

b) rMV-Ed-G または rMV-HL-G を 2×10^4 TCID₅₀ ずつ 2 回免疫したハムスターでは、2 回目免疫後の血清中抗 G 抗体価は全ての個体において 1600 倍以上 (ELISA) となった。これらの個体に、 10^3 TCID₅₀ のニパウイルスで攻撃試験を行ったところ、非免疫群のハムスターは 90% が死亡したのに対し、rMV-Ed-G または rMV-HL-G で免疫したハムスターは全て生存した。

c) アフリカミドリザルに、 1×10^5 TCID₅₀ の rMV-Ed-G を 2 回免疫し、2 回目免疫 2 週間後に 1×10^5 TCID₅₀ のニパウイルスを IP 接種することにより攻撃試験を行ったところ、免疫したサル 2 頭は症状を示さず生存した。攻撃 2 週間後に採材した臓器からはウイルスは検出されず、また病理組織学的

解析においても著変は見られなかった。

(3) ニパウイルス 3' UTR による遺伝子発現制御機構の解明

UTR reporter を用いた解析により、ニパウイルスの特定の遺伝子の UTR 配列には遺伝子発現を負に制御する領域があることを見出した。そこで、この RNA 領域に宿主細胞由来の RNA 結合タンパク質が結合し、ウイルス遺伝子の発現を調節しているのではないかと考え、RNA pull down 法による結合タンパク質の探索を行った。その結果同定された宿主タンパク質は、RNA の不安定化に関わるタンパク質 hnRNP の一つであり、このタンパク質が 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、遺伝子発現の抑制を引き起こしていると考えられた。そこで、hnRNP を siRNA によりノックダウンし、ニパウイルス UTR reporter の発現に与える影響を検討したところ、UTR reporter の発現が大幅に回復することを確認した。以上から、我々が同定した不安定化タンパク質がニパウイルスの 3' UTR と相互作用し、遺伝子発現を負に制御していると考えられる。

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℃ 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℃ 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た。

アフリカミドリザルがニパウイルスの霊長類感染実験動物モデルとして非常に有用であることが明らかとなった。さらに、組換え麻疹ウイルスを用いた、ニパウイルスに対するワクチンの効果を検討したところ、ハムスターモデルにおいては致死率の劇的な低下を認め、またサルモデルにおいても発症を抑えた。このことから、本ワクチンはニパウイルス感染の有効な予防法の 1 つとなると考えられた。

ニパウイルスゲノムが持つ長いノンコーディング RNA 領域には宿主細胞の転写後発現制御機構を利用し、自身の発現を制御する機能があると考えられた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

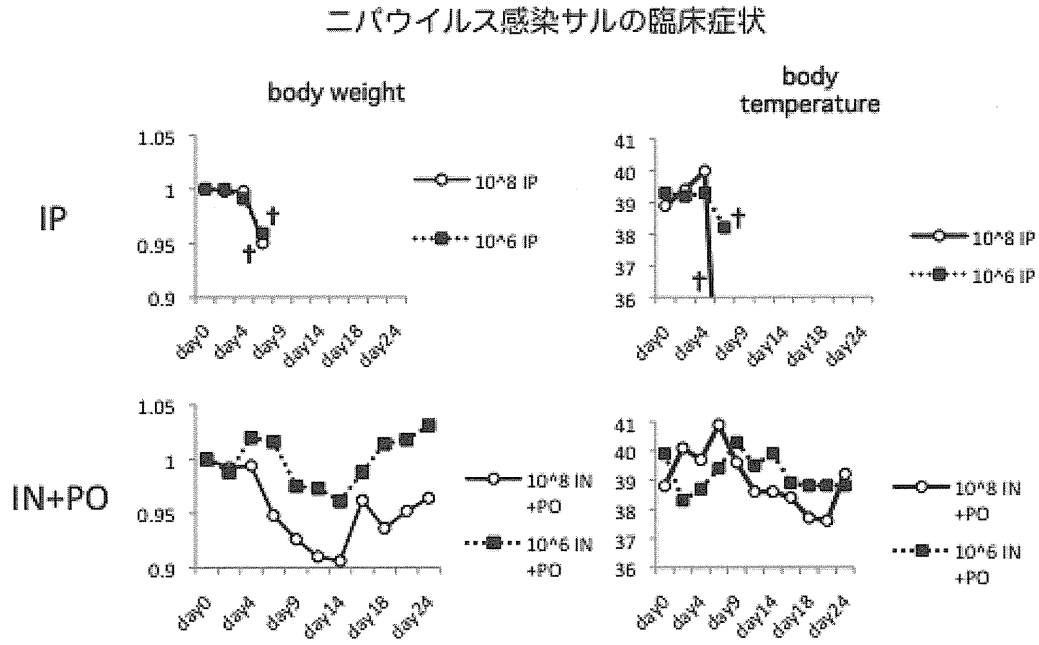
1. Kimihiro Hino, Hiroki Sato, Akihiro Sugai, Masahiko Kato, Misako Yoneda, and Chieko Kai. Down-regulation of Nipah virus N mRNA occurs through interaction between its 3'UTR and hnRNP D. *J. Virol.*, in press.
2. Yoneda, M., Georges-Courbot, M-C., Ikeda, F., Ishii, M., Jacquot, F., Raoul, H., Sato, H. and Kai, C. Recombinant measles virus vaccine expressing the Nipah virus glycoprotein protects against lethal Nipah virus challenge. *PLoS ONE*, in press
3. Huang M., Sato H., Hagiwara K., Watanabe A., Sugai A., Ikeda F.,

- Kozuka-Hata H., Oyama M., Yoneda, M. and Kai, C. Determination of phosphorylation site in Nipah virus nucleoprotein and its involvement in viral transcription. *J. Gen. Virol.*, 92(Pt9);2133-2141, Epub 2011 May 25.
4. Sato, H., Yoneda, M., Honda, T. and Kai, C. Recombinant vaccines against the Mononegaviruses -What we learned from animal disease controls. *Virus Research*, 162, 63-71, 2011.
 5. Kai, C. and Yoneda, M. Henipavirus infections – An expanding zoonosis from fruit bats. *Journal of Disaster Research*, 6, 390-397, 2011.
 6. Omi-Furutani, M., Yoneda, M., Fujita, K., Ikeda, F. and Kai, C. Novel phosphoprotein-interacting region in Nipah virus nucleocapsid protein and its involvement in viral replication. *J. Virol.*, 9793-9799. 2010.
 7. Yoneda, M., Guillaume, V., Sato, H., Fujita, K., Georges-Courbot, M-C., Ikeda, F., Omi, M., Muto-Terao, Y., Wild, F. and Kai, C. The nonstructural proteins of Nipah virus play a key role in pathogenicity in vivo. *PLoS ONE*, 5(9), e12709(1-8), 2010.
 8. Watanabe, A., Yoneda, M., Ikeda, F., Terao-Muto, Y., Sato, H., Kai, C. CD147/EMMPRIN acts as a functional entry receptor for measles virus on epithelial cells. *J. Virol.*, 84 (9), 4183-4193, 2010.
 9. 米田美佐子、甲斐知恵子 ニパウイルス、ヘンドラウイルス（特集：種の壁を越える感染症 -Epidemiology と Epizootiology- ）、臨床と微生物、近代出版 37(2):133-138, 2010.

現在出願予定はない。

G 知的財産権の出願・登録状況

図 1. ニパウイルスを実験感染させたアフリカミドリザルの臨床症状



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

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と疫学

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、血清中のフィロウイルスおよびアレナ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行った。

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、Tai Forest、Bundibugyo および Reston) に分けられている。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、エボラウイルスにもマールブルグウイルスにも属さない新しいフィロウイルスがヨーロッパのコウモリから見つかった。ウイルス表面糖蛋白質(GP)の進化系統樹(アミノ酸)を図 1 に示す。さらに、近年、霊長類以外の動物(コウモリ、ブタ、イヌ、ダイカー)の感染が確認され、フィロウイ

ルスの宿主域・生態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。2008 年に、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。アフリカには未知のアレナウイルスが多数存在しているものと推測される。

フィロウイルスおよびアレナウイルスは