

ヒトを含む霊長類に重篤な出血熱を引き起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 遺伝子を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確立とその野外応用を行った。

## B 研究方法および成果

### フィロウイルス遺伝子を検出する RT-PCR 法の確立

既知のフィロウイルス（霊長類から分離されたもの全て）の RNA 遺伝子塩基配列を比較し、NP 遺伝子から選択した相同性の高い領域の配列をもとにプライマーセットをデザインした（図 2 A）。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粒子から抽出した 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 2 B）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。ザイー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 4 A）。ザイールエボラウイル

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 4 B）。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 4 C）。さらに、これらのプライマーセットを用いて、スペインで新しくコウモリから見つかったフィロウイルス（LLOV）の検出を試みた。プライマーの配列と、その領域に相当する LLOV の遺伝子配列を図 5 A に示す（赤字はミスマッチ）。実際のウイルスから抽出した RNA が入手できないため、LLOV の NP 蛋白質をコードするプラスミドを合成し、それを鋳型に RT-PCR を行った。その結果、このプライマーで LLOV が検出可能であることならびに forward primer はエボラウイルスの配列（FiloNP Fe）、reverse primer はマールブルグウイルスの配列（FiloNP Fm）の組み合わせの方が、効率的であることが分かった（図 5 B）。しかし、検出感度は全てのプライマーを同時に使用した場合に高く、プラスミドとして 1000 コピー程度であった（図 5 C）。また、L 遺伝子の配列を基に、既知の全てのフィロウイルスを検出できる可能性のある新たなプライマーセット（FiloL-1768F、FiloL-2218R）をデザインしたが、検出感度の点で改良を要すると思われた（図 6）。

### 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 7)。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 8)。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。

#### フィロウイルス特異抗体の検出法の確立と 野外応用

(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、フィロウイルス GP 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、それぞれのフィロウイルス種に対するマウス抗血清を用いて特異性を確認した (図 9)。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。また、インドネシアのサル血清中の IgG 抗体検出を試みたところ、陽性個体が確認された (図 10)。面白いことに、アジア (フィリピンおよび中国) で存在が確認されている Reston 種以

外のウイルス (アフリカのみで見つかったウイルス) に特異的に結合する抗体を保有している個体が多数認められた (表 1)。

(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 11)。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。さらに、マールブルグウイルスの表面糖蛋白質に結合するモノクローナル抗体の中から、既知の全てのフィロウイルスの GP を認識する抗体 (MGP78) 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。フィロウイルス GP に対するマウス抗血清および感染サル血清存在下で、競合阻害活性が認められた (図 12)。

#### エボラウイルス核蛋白質 (NP) に対するモノクローナル抗体の作出

エボラウイルス抗原検出法開発のため、*Zaire ebolavirus* の NP に対するモノクローナル抗体を多数作出し、複数のエピトープを同定した。作出した抗体は、*Zaire ebolavirus* のみに反応するもの、複数のエボラウイルス種 (全てではない) に反応するもの、および既知の全てのエボラウイルス

に反応するものに分けられた（表2）。いずれの抗体もエボラウイルス以外のフィロウイルスの NP には反応しなかった。これらの抗体は、イムノクロマト法を原理とした抗原検出キットに有用であると考えられた。

#### アレナウイルス NP 抗原を用いた ELISA の野外応用

2006 年から 2010 年にかけて、ザンビアで捕獲したげっ歯類動物約 400 頭の血清中の抗体を、アレナウイルスの NP 抗原 (Lassa, Lujo および LCM ウイルス) を用いてスクリーニングした結果、多数のサンプルが陽性と判定された。特に Lassa ウイルスに対する反応性が高い個体が多かったが、近縁の Luna ウイルスの感染率が高い地域であるので、Lassa ウイルスと Luna ウイルスの抗体を区別して検出する方法が必要であると考えられた。一方、Lujo ウイルスに最も強く反応した個体が 2 頭認められた。

#### C 考察と結論

エボラおよびマールブルグ出血熱の発生は主に中央アフリカに集中しているが、上に述べたように、フィリピンおよび中国で Reston エボラウイルスの存在が確認されている。しかし、Reston エボラウイルスのヒトあるいは家畜に対する病原性は明らかでない（これまでの報告では、ヒトおよびブタに感染しても不顕性感染であることが示唆されている）。さらに本研究では、インドネシア、カリマンタン島に生息するボル

ネオオラウータンの血清中にフィロウイルスに対する特異的抗体が検出された。検出された殆どの抗体は、アジアで確認されている唯一のフィロウイルスである Reston エボラウイルスに対してではなく、現在までにアフリカでしか見つかっていないエボラウイルスに対して特異性を示した。一方、前述のように、アフリカ、フィリピンおよび中国以外にも、フィロウイルスの存在が近年示唆されている。2002 年、フランス、スペインおよびポルトガルの洞窟で、ヒナコウモリ科に属するコウモリの大量死が起きた。死んだコウモリからフィロウイルス科に属すると予想されるウイルスの遺伝子が検出された（既知のマールブルグウイルスやエボラウイルス属には分類されない新種のフィロウイルス、Cuevavirus 属 Lloviu cuevavirus 種として ICTV Taxonomy 委員会で審議中）。しかし、このウイルスがヒトを含む霊長類に病原性を示すか否かは不明である。これらの報告は、アジア・ヨーロッパを含め広範囲に、未知のものも含めて複数種のフィロウイルスが分布していることを示唆している。

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、流行地域以外での新種のエボラウイルスの発見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。本研究の結果も、アジアにおけるフィロウィルスのサーベイランスの必要性を強調するものである。また、ザンビアにおける新種のアレナウイルスの発見およびげっ歯類動物における高い血清抗体陽性率は、今後も未知のアレナウイルスによる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. 健康危険情報

#### E. 研究発表

##### 論文発表

1. Kajihara, M., Marzi, A., Nakayama, E., Noda, T., Kuroda, M., Manzoor, R., Matsuno, K., Feldmann, H., Yoshida, R., Kawaoka, Y., and Takada, A. (2012) Inhibition of Marburg virus budding by nonneutralizing antibodies to the envelope glycoprotein. *J. Virol.* 86(24):13467-13474.
2. Wong, G., Richardson, J.S., Pillet, S., Patel, A., Qiu, X., Alimonti, J., Hogan, J., Zhang, Y., Takada, A., Feldmann, H., and Kobinger, G.P. (2012) Immune parameters correlating with protection against Ebola virus infection in rodents and nonhuman primates. *Sci. Transl. Med.* 4(158):158ra146.
3. Ishii, A., Thomas, Y., Moonga, L., Nakamura, I., Ohnuma, A., Hang Ombe, B.M., Takada, A., Mweene, A.S., and Sawa, H. (2012) Molecular surveillance and phylogenetic analysis of Old World Arenaviruses in Zambia. *J. Gen. Virol.* 93(Pt 10):2247-2251.
4. Lee, P.S., Yoshida, Y., Ekiert, D.C., Sakai, N., Suzuki, Y., Takada, A., and Wilson, I.A. (2012) Heterosubtypic antibody recognition of the influenza virus hemagglutinin receptor binding site enhanced by avidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(42):17040-17045.
5. Marzi, A., Yoshida, R., Miyamoto, H., Ishijima, M., Suzuki, Y., Higuchi, M., Matsuyama, Y., Igarashi, M., Nakayama, E., Kuroda, M., Saijo, M., Feldmann, F., Brining, D., Feldmann, H., and Takada, A. (2012) Protective efficacy of neutralizing monoclonal antibodies in a nonhuman primate model of ebola hemorrhagic fever. *PLoS ONE* 7(4):e36192.
6. Nidom, C.A., Nakayama, E., Nidom, R.V., Alamudi, M.Y., Daulay, S., Dharmayanti, I.N., Dachlan, Y.P., Amin, M., Igarashi, M.,

- Miyamoto, H., Yoshida, R., and Takada, A. (2012) Serological evidence of ebola virus infection in Indonesian orangutans. *PLoS ONE* 7(7):e40740.
7. Ishii, A., Thomas, Y., Moonga, L., Nakamura, I., Ohnuma, A., Hang Ombe, B.M., Takada, A., Mweene, A.S., and Sawa, H. (2012) Molecular surveillance and phylogenetic analysis of Old World Arenaviruses in Zambia. *J. Gen. Virol.* 93(Pt 10):2247-2251.
  8. Takada, A. (2012) Filovirus tropism: cellular molecules for viral entry. *Front Microbiol.* 2012;3:34.
  9. Arikata, M., Itoh, Y., Okamoto, M., Maeda, T., Shiina, T., Tanaka, K., Suzuki, S., Nakayama, M., Sakoda, Y., Ishigaki, H., Takada, A., Ishida, H., Soda, K., Pham, V.L., Tsuchiya, H., Nakamura, S., Torii, R., Shimizu, T., Inoko, H., Ohkubo, I., Kida, H., and Ogasawara, K. (2012) Memory immune responses against pandemic (H1N1) 2009 influenza virus induced by a whole particle vaccine in cynomolgus monkeys carrying Mafa-A1\*052:02. *PLoS ONE* 7(5):e37220.
  10. Yamada, S., Shinya, K., Takada, A., Ito, T., Suzuki, T., Suzuki, Y., Le, Q. M., Ebina, M., Kasai, N., Kida, H., Horimoto, T., Rivaller, P., Chen, L. M., Donis, R. O., and Kawaoka, Y. (2012) Adaptation of a duck influenza A virus in quail. *J. Virol.* 86(3):1411-1420.
  11. 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. (2012) 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.
  12. Usami, K., Matsuno, K., Igarashi, M., Denda-Nagai, K., Takada, A., and Irimura, T. (2011) Involvement of viral envelope GP2 in Ebola virus entry into cells expressing the macrophage galactose-type C-type lectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407(1):74-78.
  13. Nakayama, E., Tomabechi, D., Matsuno, K., Kishida, N., Yoshida, R., Feldmann, H., and Takada, A. (2011) Antibody-dependent enhancement of Marburg virus infection. *J. Infect. Dis. Suppl* 3:S978-985.
  14. Falzarano, D., Feldmann, F., Grolla, A., Leung, A., Ebihara, H., Strong, J.E., Marzi, A., Takada, A., Jones, S., Gren, J., Geisbert, J., Jones, S.M., Geisbert, T.W., and Feldmann, H. (2011) Single Immunization With a Monovalent Vesicular Stomatitis Virus-Based Vaccine Protects Nonhuman Primates Against Heterologous Challenge With Bundibugyo ebolavirus. *J. Infect. Dis. Suppl* 3:S1082-1089.

15. Ishii, A., Thomas, Y., Moonga, L., Nakamura, I., Ohnuma, A., Hang'ombe, B., Takada, A., Mweene, A., and Sawa, H. (2011) Novel arenavirus, Zambia. *Emerg. Infect. Dis.* 17(10):1921-1924.
16. Nakayama, E. and Takada, A. (2011) Ebola and Marburg viruses. *J. Disaster Res.* 6(4):381-389.
17. 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.
18. 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.
19. 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.*
20. 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
21. Sakoda, Y., Sugar, S., Batchluun, D., Erdene-Ochir, T.O., Okamatsu, 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.
22. Okamatsu, 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.
23. 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.
24. 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.

#### 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
4. 高田 礼人 (2011) エボラ・マールブルグ出血熱、最新医学 66(12):2668-2675
5. 伊藤公人, 高田礼人 (2012) いきもの不思議 ウイルスはどのように生きていつているのか? インフルエンザウイルスの存続様式と進化、生物の科学 遺伝 66(4):358-364

#### 学会発表 (国内)

1. 高田礼人. エボラおよびマールブルグウイルス. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
2. 石井秋宏、トーマス由佳、高田礼人、中村一郎、澤洋文. ザンビア共和国におけるアレナウイルスの疫学調査と新

規LCMV様ウイルスの系統解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月

3. 梶原将大、Marzi Andrea、中山絵里、野田岳志、黒田誠、Manzoor Rashid、Feldmann Heinz、吉田玲子、河岡義裕、高田礼人. 抗体によるマールブルグウイルスの出芽阻害. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
4. 吉田玲子、Marzi Andrea、宮本洋子、石島麻里、鈴木定彦、五十嵐学、中山絵里、黒田誠、Feldmann Heinz、高田礼人. アカゲザルモデルを用いたエボラ出血熱に対する中和モノクローナル抗体の防御効果. 抗体によるマールブルグウイルスの出芽阻害. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
5. 野依修、松野啓太、梶原将大、中山絵里、五十嵐学、磯田典和、吉田玲子、高田礼人. フィロウイルス糖蛋白質による宿主細胞表面分子の立体的遮蔽現象の解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
6. 米澤弘毅、五十嵐学、高田礼人、伊藤公人. 近隣剪定法によるウイルス遺伝子配列のリサンプリング. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
7. 五十嵐学、中尾亮、喜田宏、高田礼人、伊藤公人. H3N2インフルエンザウイルスHAへの糖鎖付加と周辺アミノ酸残基にかかる選択圧の経時的変化. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、

- 2012年11月
8. 村松美笑子、吉田玲子、宮本洋子、高田礼人. インフルエンザウイルスヘマグルチニン特異抗体の亜型間交差反応性. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
  9. Manzoor Rashid、黒田和道、吉田玲子、津田祥美、藤倉大輔、宮本洋子、喜田宏、高田礼人. Modulatory effect of heat shock protein 70(Hsp70) on influenza virus replication. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
  10. 梶原将大、Andrea Marzi、中山絵里、野田岳志、黒田誠、Rashid Manzoor、松野啓太、Heinz Feldmann、吉田玲子、河岡義裕、高田礼人. 抗体によるマールブルグウイルスの出芽阻害. 第154回日本獣医学会学術集会、盛岡、2012年9月
  11. 村松美笑子、吉田玲子、宮本洋子、高田礼人. 不活化インフルエンザウイルス接種によって誘導されるヘマグルチニン特異抗体の亜型間交差反応性. 第154回日本獣医学会学術集会、盛岡、2012年9月
  12. 高田 礼人. エボラおよびマールブルグウイルス. 第7回霊長類医科学フォーラム、つくば、2011年11月
  13. 高田 礼人. ウイルス感染と粘膜免疫. 日本薬学会第132年会、札幌、2012年3月
  14. 石井 秋宏、トーマス 由佳、中村 一郎、高田 礼人、澤 洋文. ザンビア共和国におけるアレナウイルスの調査. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月
  15. 五十嵐学、高田礼人、喜田宏、伊藤 公人. H3N2インフルエンザウイルスHAに付加された糖鎖は周辺エピトープを覆い隠していたか? ~糖鎖付加部位周辺アミノ酸残基の多様性変化の解析~. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月
  16. 中山絵里、横山文香、宮本洋子、五十嵐学、岸田典子、松野啓太、Andrea Marzi、Heinz Feldmann、伊藤公人、西條政幸、高田礼人. フィロウイルス種特異抗体検出ELISA法の開発. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月
  17. 吉田玲子、苔米地大輔、五十嵐学、宮本洋子、加瀬哲男、喜田宏、高田礼人. パンデミックインフルエンザAウイルス(H1N1)ヘマグルチニンに対するモノクローナル抗体の性状解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月
  18. 高田 礼人. フィロウイルスの細胞侵入機構. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月
  19. 高田 礼人. インフルエンザウイルスヘマグルチニン亜型間交差反応性抗体の解析. 第10回日本蛋白質科学会年会、札幌、2010年6月
  20. 高田 礼人. 人獣共通感染症としてのインフルエンザ. 第84回日本数理生物学会大会、札幌、2010年9月



学会発表（国際）

1. Ayato Takada. Serological evidence of filovirus infection in Indonesian orangutans. 46th Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative, Medical Science Program, Beppu, Japan, June 2012
2. Ayato Takada. Ebola and Marburg viruses. 4th International Symposium of Animal Global Health. Obihiro, May 2012
3. Osamu Noyori, Keita Matsuno, Masahiro Kajihara, Ayato Takada. Analysis of filovirus glycoprotein-induced steric shielding effect against host proteins. The 9th Japan-China International Conference of Virology, Sapporo, Japan, June 2012
4. Mieko Muramatsu, Reiko Yoshida, Ayato Takada. Heterosubtypic binding activity of hemagglutinin-specific antibodies induced by inoculation of inactivated influenza virus in mice. The 9th Japan-China International Conference of Virology, Sapporo, Japan, June 2012
5. Edgar Simulundu, Akihiro Ishii, Manabu Igarashi, Aaron S. Mweene, Yuka Suzuki, Hirohito Ogawa, Emiko Nakagawa, Bernard M. Hang'ombe, Boniface Namangala, Ladslav Moonga, Rashid Manzoor, Kimihito Ito, Ichiro Nakamura, Hirofumi Sawa, Chihiro Sugimoto, Hiroshi Kida, Chuma Simukonda, Wilbroad Chansa, Jack Chulu, and Ayato Takada. Characterization of influenza A viruses isolated from wild waterfowl in Zambia. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections, Kobe, Japan, November 2012
6. Eri Nakayama, Ayaka Yokoyama, Hiroko Miyamoto, Manabu Igarashi, Noriko Kishida, Keita Matsuno, Andrea Marzi, Heinz Feldmann, Kimihito Ito, Masayuki Saijo, Ayato Takada. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of filovirus species-specific antibodies. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 2011
7. Yohei Kurosaki, Ayato Takada, Jiro Yasuda. Anti-Tetherin activities of Zaire and Reston ebolavirus glycoprotein. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 2011
8. Rashid Manzoor, Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida, Ayato Takada. Heat shock protein 70 (HSP70) modulates the influenza virus replication. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 2011
9. Aaron S. Mweene, Ayato Takada, Chihiro Sugimoto, Hirofumi Sawa, Edgar Simulundu, Yuka Suzuki-Thomas, Bernard Hang'ombe, Boniface Namangala, Emiko Nakagawa, Akihiko Ishii, Hirohito Ogawa. Preparedness for the control of zoonoses in Zambia: the case of avian influenza. XV International

- Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 2011
10. Reiko Yoshida, Daisuke Tomabechi, Manabu Igarashi, Hiroko Miyamoto, Ayaka Yokoyama, Tetsuo Kase, Hiroshi Kida, Ayato Takada. Characterization of monoclonal antibodies against the 2009 pandemic H1N1 Influenza virus hemagglutinin. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 2011
  11. Ichiro Nakamura, Bernard M Hang'ombe, Hirofumi Sawa, Ayato Takada, Kumiko Yoshimatsu, Jiro Arikawa, Chihiro Sugimoto. Sero-surveillance of hantavirus in rodents captured in Zambia, in 2010. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 2011
  12. Masahiro Kajihara, Keita Matsuno, Edgar Simulundu, Mieko Muramatsu, Osamu Noyori, Rashid Manzoor, Manabu Igarashi, Masatoshi Okamatsu, Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida, Ayato Takada. A highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) that invaded Japan through waterfowl migration. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 2011
  13. Ayato Takada. Antibody-dependent enhancement of Marburg virus infection. 45th Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative, Medical Science Program. Stanford, USA, June 2011
  14. Igarashi M, Ito K, Kida H, Takada A. Prediction of antigenic structure of hemagglutinin of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. International Conference on Negative Strand Viruses, Bruges, Belgium, June 2010
  15. Matsuno K, Feldmann H, Irimura T, Takada A. Different potential of C-type lectin-mediated entry among filoviruses. International Conference on Negative Strand Viruses, Bruges, Belgium, June 2010
  16. Matsuno K, Takada A. Different potential of C-type lectin-mediated entry between Marburg viruses. International Conference on Negative Strand Viruses, Bruges, Belgium, June 2010
  17. Ayato Takada. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of filovirus species-specific antibodies. 44th Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative, Medical Science Program. Sapporo, Japan, June 2010
- F. 知的財産権の出願・登録状況  
現在出願予定はない。

図1. フィロウイルスの分類と宿主域

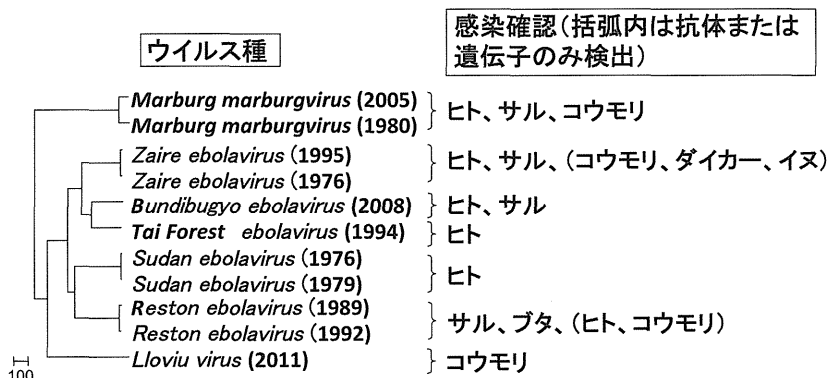


図2. エボラおよびマールブルグウイルス検出のためのユニバーサルプライマー

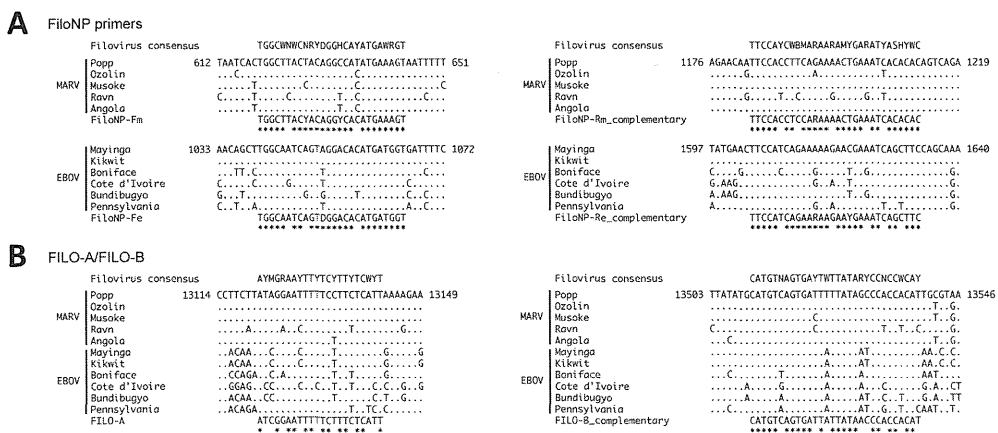


図3. 新規NPプライマーを用いたRT-PCRによるフィロウイルス遺伝子の検出

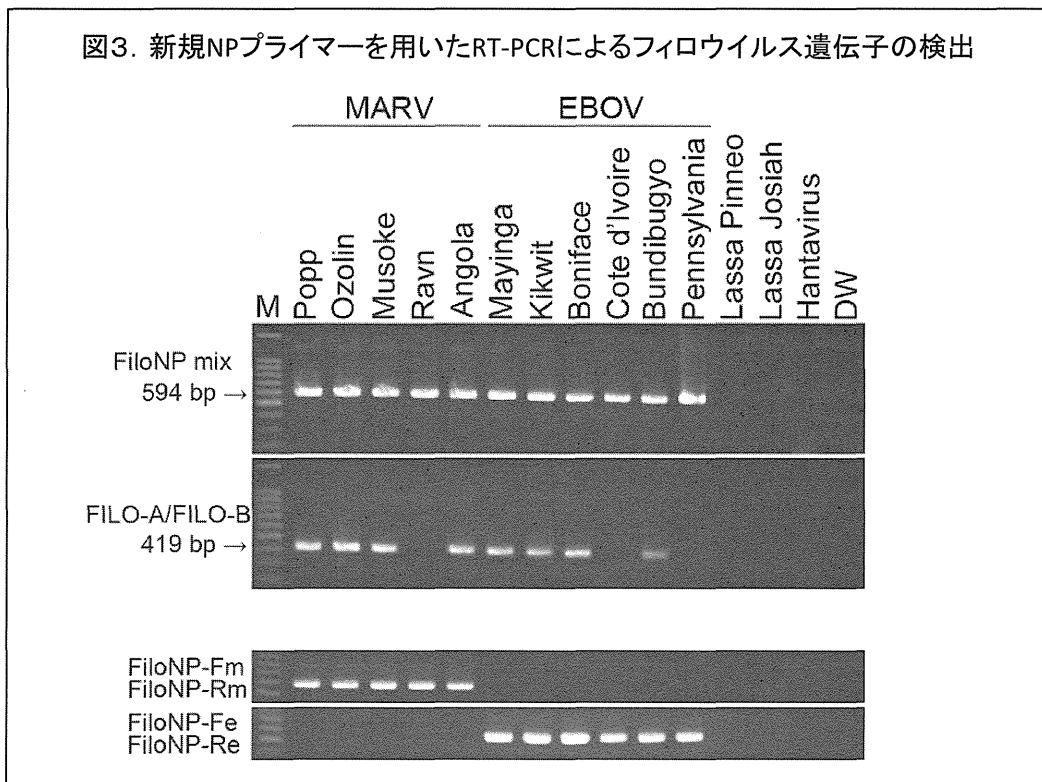


図4. 新規RT-PCRによるフィロウイルス遺伝子検出感度と診断への応用

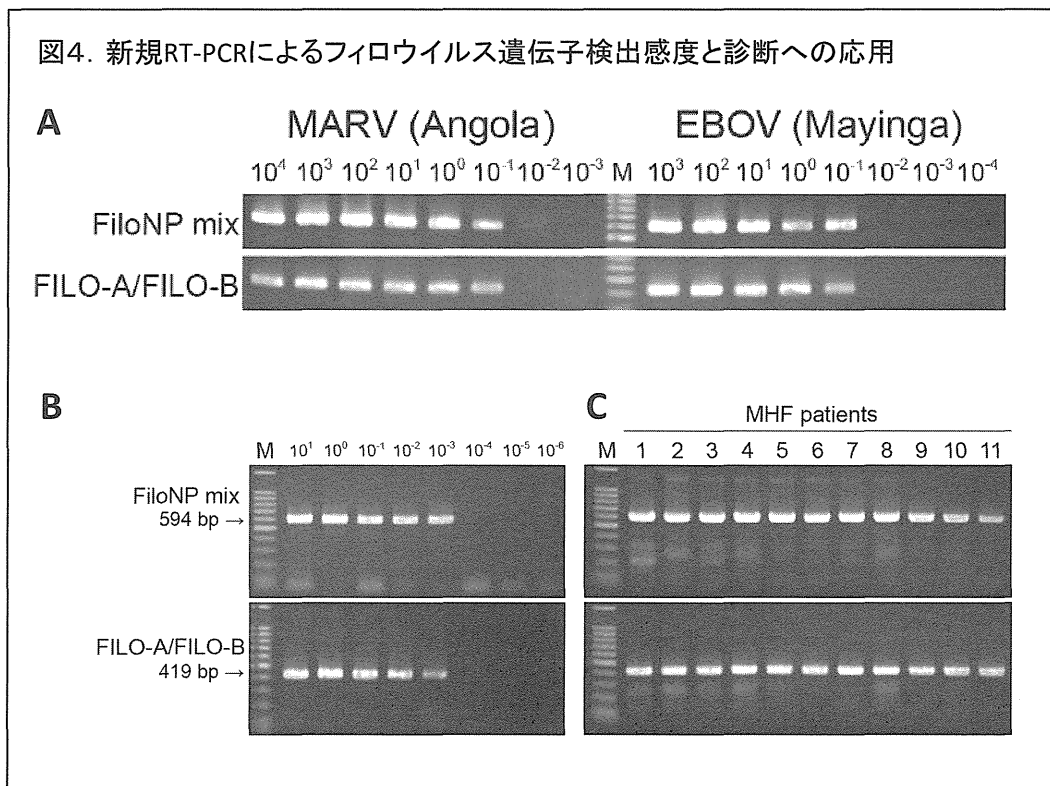


図5. 新規NPプライマーを用いたRT-PCRによるLLOV遺伝子の検出

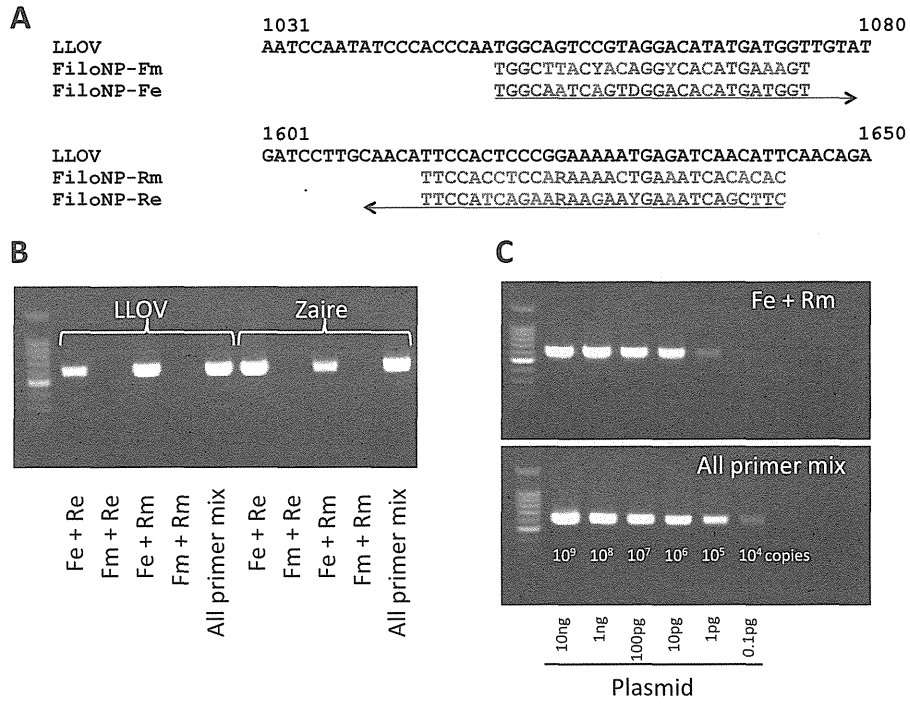


図6. 新規Lプライマーを用いたRT-PCRによるLLOV遺伝子の検出

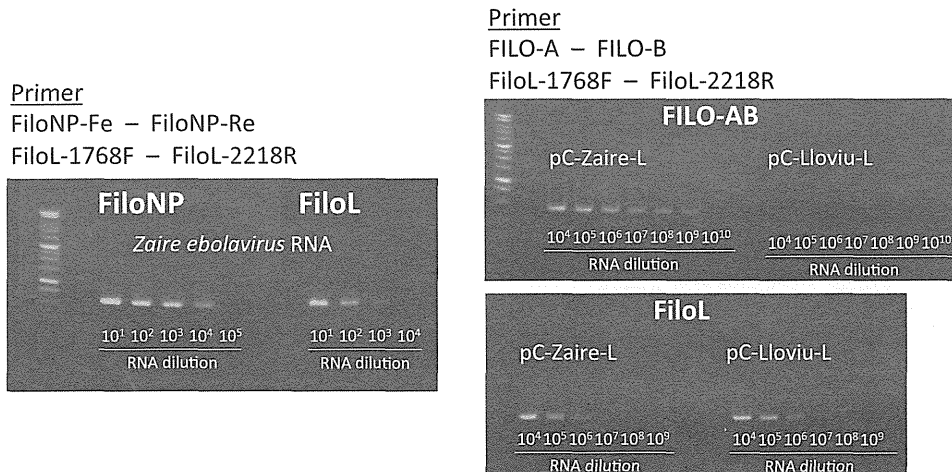
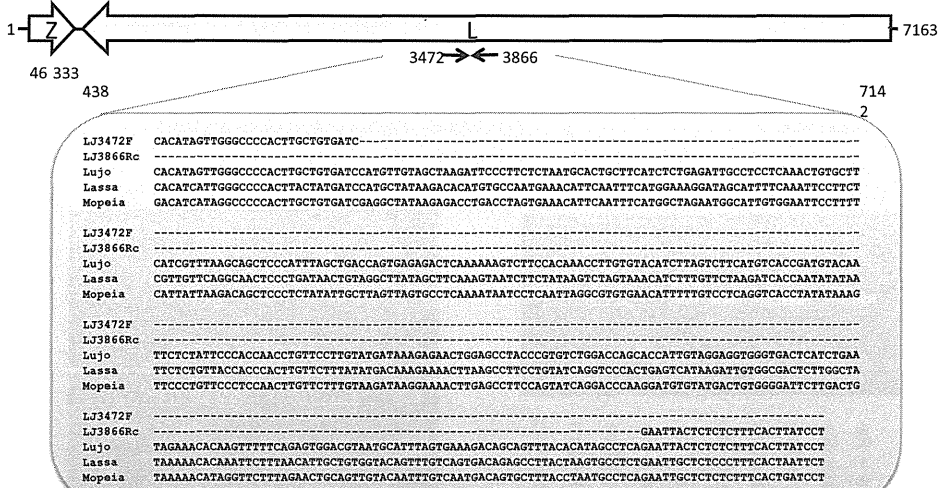


図7. アレナウイルス遺伝子を検出するRT-PCR用のプライマー

Lujo virus genome L segment



Primer design for detection of Old World Arenavirus including Lujo virus

図8. ザンビアのマストミスからの新規アレナウイルス遺伝子検出と進化系統樹

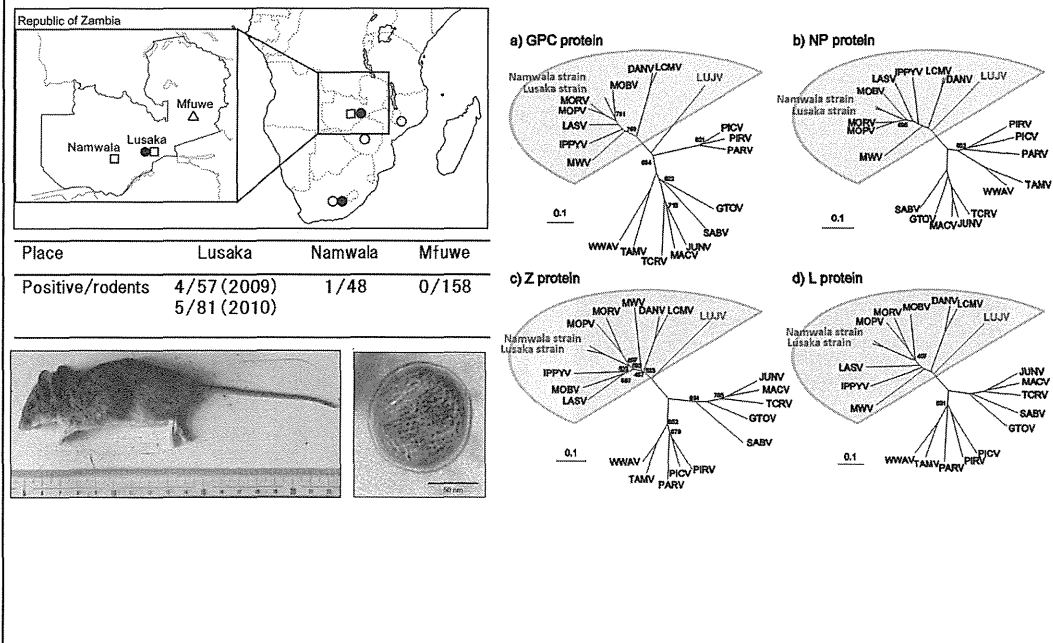


図9. GPを抗原としたELISAのフィロウイルス種特異性

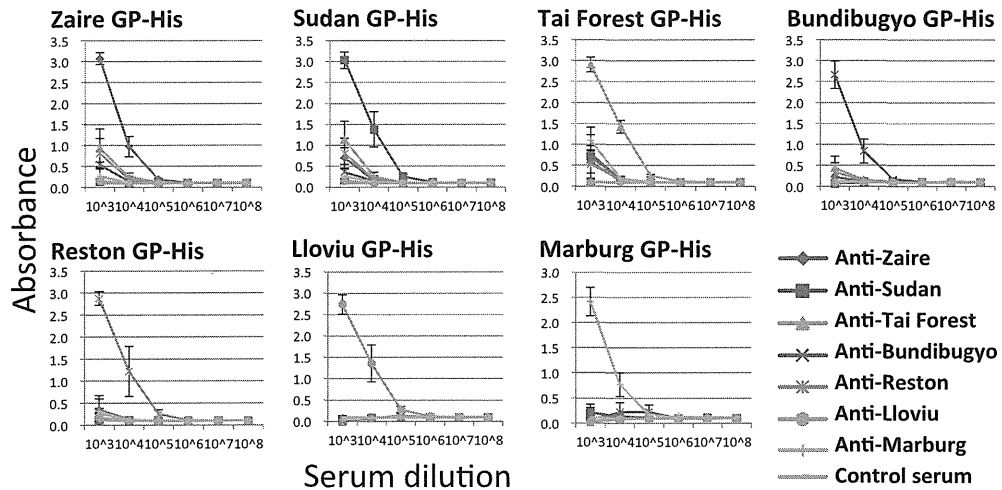


図10. インドネシアのサル血清中のフィロウイルスIgG抗体検出

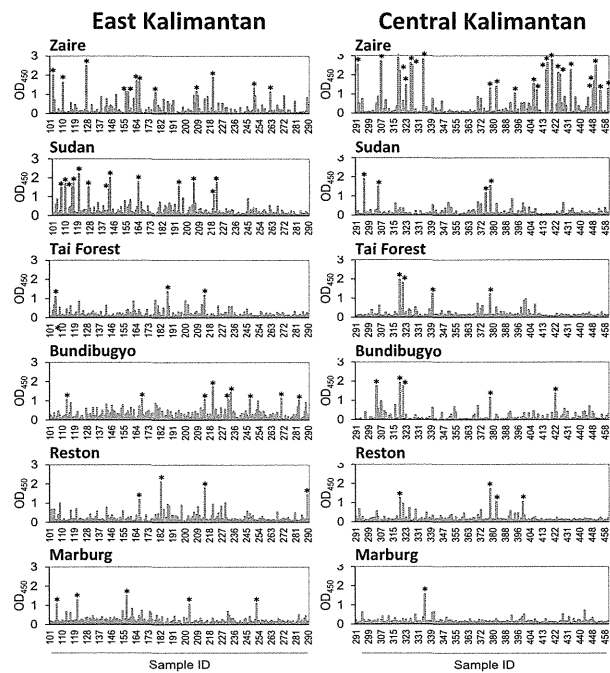


表1. インドネシアのサル血清中に検出された抗体のフィロウイルス種特異性

Area	Positive rates					
	Zaire	Sudan	Thai Forest	Bundibugyo	Reston	Marburg
East Kalimantan	5.3%	5.8%	1.1%	3.7%	1.6%	2.6%
Central Kalimantan	14.1%	1.8%	1.2%	1.2%	1.2%	0.6%
Total	9.3%	4.0%	1.1%	2.6%	1.4%	1.7%

図11. エボラウイルス特異抗体を用いた競合ELISA

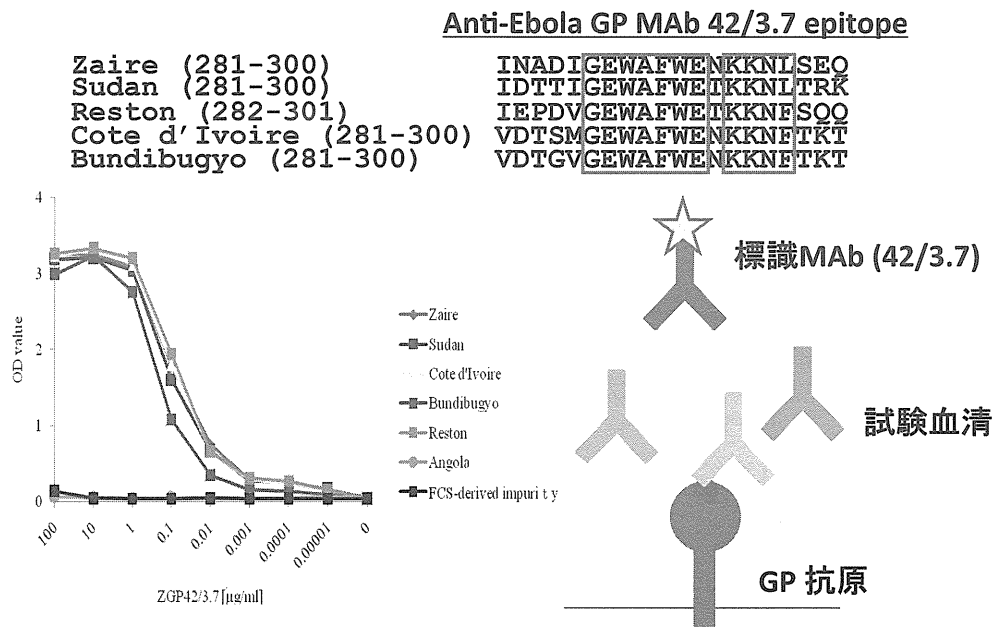




図12. ユニバーサルフィロウイルス抗体を用いた競合ELISA

Anti-filo GP MAb MGP78 epitope

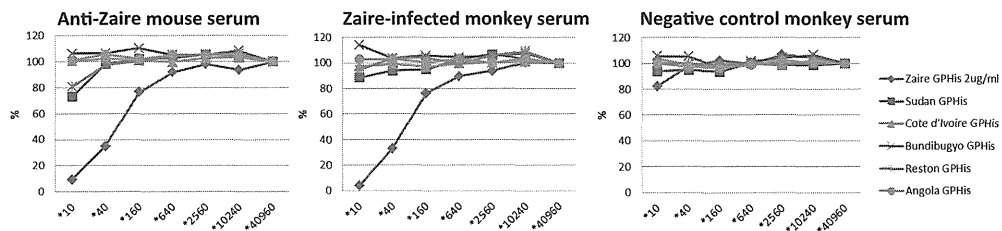
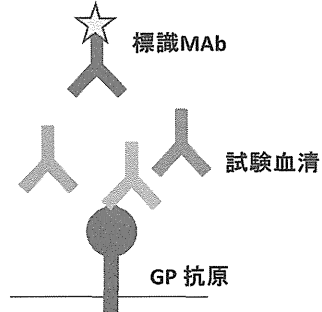
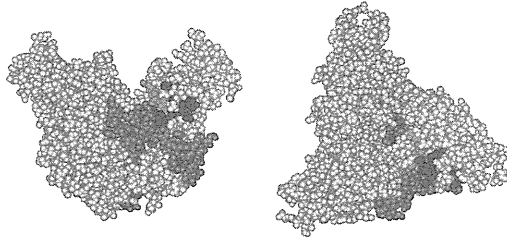


表2. エボラウイルスNPに対するモノクローナル抗体の反応性

MAb	Isotype	EBOV	SUDV	TAFV	BDBV	RESTV	MARV	LLOV
ZNP41-2-4	IgG <sub>1</sub>	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
ZNP31-1-8	IgG <sub>1</sub>	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
ZNP74-7	IgG <sub>1</sub>	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
ZNP24-4-2	IgG <sub>1</sub> > IgG <sub>2b</sub>	+++	+	+++	+++	+++	-	-
ZNP106-9	IgG <sub>1</sub>	+++	+	+++	+++	-	-	-
ZNP98-7	IgG <sub>2a</sub>	+++	-	-	+++	-	-	-
ZNP105-7	IgG <sub>1</sub>	+++	-	-	+++	+++	-	-
ZNP108-2-5	IgG <sub>1</sub>	+++	-	+++	+++	-	-	-
ZNP35-16-3	IgG <sub>1</sub>	+++	-	-	-	-	-	-
ZNP62-7	IgG <sub>2b</sub>	+++	-	-	-	-	-	-

Zaire ebolavirus (EBOV)、Sudan ebolavirus (SUDV)、Tai Forest ebolavirus (TAFV)、Bundibugyo ebolavirus (BDBV)、Reston ebolavirus (RESTV)、Marburg virus (MARV)およびLloviu virus (LLOV) の組換えNPを抗原として用いた。

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

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。そして、HIV-1 の Vpu やザイールエボラウイルス (ZEBOV) の GP はアンタゴニストとしてヒト 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 (REBOV) の GP もヒト Tetherin アンタゴニストとして機能すること、及び、ZEBOV、REBOV の GP はともに霊長類由来の Tetherin に対してもアンタゴニストとして機能することを明らかにした。Tetherin は EBOV の VP40 タンパク質の単独発現によって形成されるウイルス様粒子 (VLP) の産生を抑制するが、その作用機構として Tetherin が VP40 の細胞膜への移行を阻害している可能性が示唆された。GP はトランスゴルジ・ネットワーク (TGN) で Tetherin と共局在を示したことから、GP は Tetherin を TGN に滞留させることにより Tetherin の抗ウイルス作用を阻害している可能性が示唆された。また、ラッサウイルス及びクリミア - コンゴ出血熱ウイルスのモデル系として、それぞれリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) とハザラウイルスを用いた解析を行い、Tetherin がこれらのウイルスに対しても抗ウイルス活性をもつことを明らかにした。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) の出芽機構についても解析し、これらのウイルスの Z タンパク質内の P/SAP 配列が L ドメインとしてウイルス出芽に重要であること、及び、宿主因子として Tsg101 を利用することを明らかにした。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、浦田秀造

グウイルス (MARV)、ラッサウイルス (LASV)、クリミア - コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV)、南米出血熱ウイルス (フニン、マチュポ、グアナリト、サビアウイ

A. 研究目的

エボラウイルス (EBOV)、マールブル

ン、マチュポ、グアナリト、サビアウイ

ス)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知・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)- $\alpha$  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 によっ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と考えられているが、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、ヒトに病原性を持つ ZEBOV とサルに病原性をもつレストン 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、ウエ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 Tetherin の細胞内局在を変化させるかどうかを共焦点顕微鏡による観察で調べた。エボラ VLP に対する Tetherin の抗ウイルス作用は HIV に対するように細胞表面でのウイルス粒子係留ではないことが示唆されているので、Tetherin による VP40 の細胞内局在の変化についても同様に解析した。

### 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。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。

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 法及びブラクアッセイで行った。

### 3) LASV モデル系としての LCMV の解析

293T 細胞にヒトあるいはマウス Tetherin を発現させ、LCMV 感染に対する影響を解析した。また、siRNA を恒常発現することによりヒト Tetherin の発現を抑制した HeLa 細胞 (HeLaTKO) とコントロールベクターを導入した HeLa 細胞 (HeLa-pLKO) を作製し、LCMV 増殖を比較した。ウイルスの定量はブラクアッセイにより行った。

### 4) 南米出血熱ウイルスの出芽機構の解析

アルゼンチン出血熱、ボリビア出血熱の原因ウイルスであるフニンウイルス、マチュ

ポウイルスの出芽機構を明らかにするためにウイルスマトリクスタンパク質 Z に存在する L ドメインモチーフの解析を行った。両ウイルスの Z には L ドメインモチーフの 1 つである PT/SAP 配列が存在するのでこの配列をアラニン (AAAA) に置換した変異体を作製してウイルス様粒子産生を比較した (図 2)。PT/SAP 配列を L ドメインとしてもつものは宿主因子 Tsg101 との相互作用を介して細胞の多胞エンドソーム (MVB) 形成系をウイルス出芽に利用していると考えられているので、siRNA を用いて Tsg101 の関与についても解析した。

### 5) 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