

オネ系統 Josiah 株とナイジェリア北東部系統 Pinneo 株のウイルス RNA、あるいは in vitro 転写反応により調製した疑似ウイルス RNA を用いて検討した。増幅反応は Loopamp RNA 増幅試薬キット (栄研化学) を用いて 63°C で行った。増幅反応の特異性の確認は反応産物を制限酵素処理し、アガロースゲル電気泳動を行うことにより確認した。また、増幅のリアルタイムモニタリングはリアルタイム濁度測定装置を用いて行った。

### C. 研究結果

#### 1) EBOV と抗ウイルス活性因子 Tetherin の相互作用の解析:

ZEBOV および REBOV の VP40 発現によって形成される VLP の産生系にヒト(Hu)、アフリカミドリザル (Agm)、カニクイザル(Mac)由来の Tetherin を発現させると VLP 産生は何れの Tetherin によっても有意に抑制された (図 3)。また、ヒト Tetherin の糖鎖修飾変異体を用いた解析から、VLP 産生抑制活性には糖鎖修飾は関与しないことも明らかになった (図 4)。

次に、ZEBOV あるいは REBOV の GP を発現させることにより、Tetherin の VLP 産生抑制作用が阻害されるかどうかを調べた (図 5)。その結果、ZEBOV、REBOV の GP は共に Hu、Agm、Mac 何れの Tetherin に対してもその抗ウイルス活性を減弱させる効果を持つことが明らかになった。

共焦点顕微鏡による解析は、Tetherin が VP40 の細胞膜局在を減少させることを示

した。更に、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) へ変化させることも明らかにした。

#### 2) CCHFV モデル系としてのハザラウイルスの解析

HazV の構造タンパク質である N と Gc を認識する抗体をそれぞれ作製することに成功した。

SW13 細胞にヒト Tetherin 発現プラスミドを導入した後、HazV を感染させてウイルス産生量を調べたところ、Tetherin の抗ウイルス活性が確認された (図 6)。HazV の増殖は IFN- $\alpha$  により阻害されるが、Tetherin 特異的 siRNA により Tetherin 発現を抑制すると IFN- $\alpha$  の抗ウイルス効果は抑制された (図 7)。一方、Tetherin 発現は HazV 感染により影響を受けなかった (図 8)。

#### 3) LASV モデル系としての LCMV の解析

ヒトあるいはマウス Tetherin を発現すると 293T 細胞における LCMV 増殖はそれぞれ 1/3、1/2 に減少した (図 9)。HeLa-TKD 細胞における LCMV 増殖は HeLa-pLKO 細胞での増殖に比べ約 100 倍増加した (図 10)。また、HeLa 細胞における Tetherin 発現は LCMV 感染により影響を受けなかった (図 11)。

#### 4) 南米出血熱ウイルスの出芽機構の解析

フニンウイルス、マチュポウイルスの Z に存在する PT/SAP 配列を AAAA に置換した

変異体では VLP 産生量の顕著な減少が見られた (図 1 2)。また、siRNA による Tsg101 のノックダウンはフニン、マチュポ VLP の産生を顕著に阻害した (図 1 3)。

#### 5) LASV 検出用 RT-LAMP 法の開発

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 プライマーセットの特異性をシエラレオネ系統 Josiah 株、ナイジェリア北東部系統 Pinneo 株、エボラウイルス 5 株 (Mayinga, Zaire95, Reston, Sudan, Cote d'Ivoire)、マールブルグウイルス 4 株 (Musoke, Ozoline, Angola, Ravn) のウイルス RNA を用いて調べた結果、何れの系統に対する RT-LAMP も同一系統の LASV のみを特異的に検出することができた (表 1)。

1 ng のウイルス RNA の検出に要した時間はシエラレオネ系統用が 13 分、ナイジェリア北東部系統用が 23.9 分であった。検出限界はシエラレオネ系統用が 10pg、ナイジェリア北東部系統用が 1ng であった。

#### D. 考察

##### 1) EBOV と抗ウイルス活性因子 Tetherin の相互作用の解析

ZEBOV、REBOV の VLP 産生はウイルスの宿主特異性とは関係なくヒト、サル双方の Tetherin によって抑制された。Tetherin による VLP 産生阻害は、Tetherin による VP40 の細胞内局在の変化すなわち VP40 の細胞膜移行阻害に起因する可能性が示唆された。ZEBOV、REBOV の GP は共に種を問わずヒト、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することが明らかになり、双方の GP の Tetherin アンタゴニストとしての活性には HIV-1 Vpu のような種特異性はないことが分かった。

GP は Tetherin の細胞表面発現にほとんど影響を与えなかったことから Vpu とは異なるメカニズムで Tetherin の抗ウイルス活性を阻害すると考えられる。GP が Tetherin の細胞内局在を LE から TGN に変えることが観察されたことから、この局在の変化が Tetherin の抗ウイルス活性発現において障害となっている可能性が示唆された。

##### 2) CCHFV モデル系としてのハザラウイルスの解析

Tetherin は HazV に対して抗ウイルス活性をもつことがわかった。siRNA で Tetherin 発現を抑制すると IFN- $\alpha$  による抗ウイルス作用が阻害されたことから、IFN- $\alpha$  の抗 HazV 効果に Tetherin が関与していることが示唆された。また、Tetherin 発現は HazV 感染により影響を受けなかったため、HazV には Tetherin アンタゴニストがないことが示唆された。

##### 3) LASV モデル系としての LCMV の解析

Tetherin は LCMV に対して抗ウイルス活性をもつことがわかった。実際に HeLa 細胞における LCMV 増殖の制限因子として Tetherin が働いていることも明らかになった。また、CMV には Tetherin アンタゴニストがないことも示唆された。

#### 4) 南米出血熱ウイルスの出芽機構の解析

フニンウイルス、マチュポウイルスの出芽には Z に存在する PT/SAP 配列が L ドメインとして主要な役割を果たしていることが分かった。また、PT/SAP 配列は宿主因子 Tsg101 との相互作用を通じて MVB 形成系を利用する形でウイルス出芽していることが強く示唆された。

#### 5) LASV 検出用 RT-LAMP 法の開発

シエラレオネ系統株、ナイジェリア北東部系統株の LASV の検出に対して、特異性が高く、迅速、簡便、かつ高感度の RT-LAMP 法を開発することができた。既存の Real-time RT-PCR 法よりも若干検出感度は低かったが(表 1)、LAMP 法は PCR 法のように厳密な温度制御を必要とせず、簡便な恒温槽があれば検査を行うことができる点、検出にかかる時間が短い点、濁度や蛍光で結果判定が可能でゲル電気泳動などが不要である点などいくつかの利点がある為、アウトブレイクの発生地である発展途上国で有用な検出法であると思われる。

#### E. 結論

1-1、ZEBOV、REBOV 共にヒト及びサルは Tetherin により VLP 産生が抑制された。

1-2、ZEBOV および REBOV の GP は、共にヒト及びサルは Tetherin の抗ウイルス作用に対してアンタゴニストとして機能する。

1-3、ZEBOV の GP がもつ Tetherin アンタゴニスト活性には種特異性はない。

1-4、Tetherin の糖鎖修飾はエボラ VLP に対する Tetherin の抗ウイルス活性には影響しない。

1-5、ZEBOV の GP は、HIV-1 の Vpu とは異なるメカニズムで Tetherin の抗ウイルス活性を阻害する。

1-6、Tetherin は、VP40 の細胞膜移行を抑制する。

1-7、GP は、Tetherin と相互作用して Tetherin を TGN に滞留させる。

2-1、HazV は Tetherin により増殖が阻害される。

2-2、HazV は Tetherin アンタゴニストをもたないことが示唆された。

3-1、Tetherin は LCMV の増殖を部分的に阻害する。

3-2、LCMV は Tetherin アンタゴニストをもたないことが示唆された。

4-1、フニンウイルス、マチュポウイルスの Z タンパク質の P/SAP 配列は、L ドメインとしてウイルス出芽に重要である。

4-2、フニンウイルス、マチュポウイルスの出芽には、宿主因子として Tsg101 が関与している。

5-1、シエラレオネ系統株、ナイジェリア北東部系統株の LASV に対して、迅速、簡便、高感度、かつ特異性の高い RT-LAMP 法を開発した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表

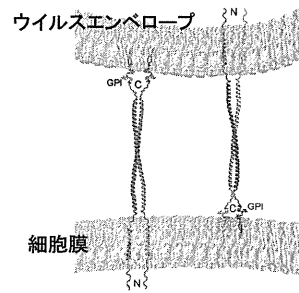
1. Yasuda, J.: Marburg virus budding: ESCRT of progeny virion to the outside of the cell. *Future Virology*, **5**, 627-637, 2010.
2. Kurosaki, Y., Grolla, A., Fukuma, A., Feldmann, H., and \*Yasuda, J.: Development and evaluation of the simple diagnostic assay for Marburgvirus using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**, 2330-2336, 2010.
3. Fukuma, A., Kurosaki, Y., Morikawa, Y., Grolla, A., Feldmann, H., and \*Yasuda, J.: Rapid detection of Lassa virus by reverse transcription – loop-mediated isothermal amplification. *Microbiology and Immunology*, **55**, 44-50, 2011.
4. \*Yasuda, J.: Ebolavirus replication and Tetherin/BST-2. *Frontiers in Microbiology*, **3**, 111 (1-5), 2012.
5. Urata, S., and \*Yasuda, J.: Molecular mechanism of arenavirus assembly and budding. *Viruses*, **4**(10), 2049-2079, 2012.

2. 学会発表

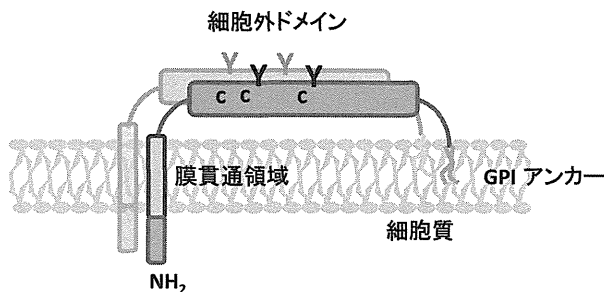
1. Yasuda, J., Sakurai, A., Noda, T., Urata, S., Kawaoka, Y., and Sakuma, T.: ANTIVIRAL ACTIVITY OF TETHERIN/BST-2 AGAINST NEGATIVE STRAND RNA VIRUSES. In "The XIVth International Conference on Negative Strand Viruses", Brugge, Belgium, June 21-25, 2010.
2. Yasuda, J.: Update on Viral Hemorrhagic Fever (VHF) research in NRIPS. The 4th U.S.-Japan Medical Biodefense Symposium: 招待講演, Bethesda, USA, Oct 25-27, 2010.
3. 黒崎陽平、安田二朗: エボラウイルス表面糖タンパク質 GP による BST-2/Tetherin の活性阻害、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11 月 7 日－9 日。
4. 加藤昌彦、安田二朗、小見(古谷)美央、米田美佐子、甲斐知恵子: Tetherin によるニパウイルス virus-like particle 産生阻害、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11 月 7 日－9 日。
5. 黒崎陽平、安田二朗: エボラウイルス表面糖タンパク質 GP による抗ウイルス因子 BST-2/Tetherin の活性阻害、第 33 回日本分子生物学会年会 BMB2010、神戸、2010 年 12 月 7 日－10 日。
6. 西村聡子、安田二朗: Bst-2/Tetherin によるハザラウイルス放出抑制機構の解析、第 33 回日本分子生物学会年会 BMB2010、神戸、2010 年 12 月 7 日－10 日。
7. Kurosaki, Y., Takada, A., Yasuda, J.: Anti-Tetherin activities of Zaire and Reston ebolavirus glycoprotein. In "The XVth International Congress of Virology, Sapporo, September 11-16, 2011.

8. Yasuda, J.: Infectious Disease Research at Nagasaki University. 2011 U.S.-Japan Medical Biodefense Research Symposium: 講演, Bethesda, Nov 1-3, 2011.
  9. 浦田秀造、檜原知里、Juan Carlos de la Torre、安田二郎: 新規抗ラッサウイルス薬の探索、First Negative Strand Virus-Japan (NSV-J)、佐世保、2012年1月20日-22日。
  10. 黒崎陽平、高田礼人、安田二郎: BST-2/Tetherin によるエボラウイルス粒子の産生抑制、First Negative Strand Virus-Japan (NSV-J)、佐世保、2012年1月20日-22日。
  11. 安田二郎: 「ウイルス性出血熱患者の診断」、バイオセキュリティーワークショップ「日本のバイオディフェンスの現状と今後の課題」、東京コンファレンスセンター、2012年3月17日。
  12. 安田二郎: 「感染症研究とバイオセーフティー」、第30回九州実験動物研究会総会シンポジウム、長崎大学良順会館、2012年11月10日。
  13. 黒崎陽平、西村聡子、浦田秀造、安田二郎: インターフェロン誘導性抗ウイルス因子、Tetherin/BST-2 によるハザラウイルスの増殖抑制、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11-14日。
  14. 黒崎陽平、西村聡子、浦田秀造、安田二郎: ハザラウイルス増殖抑制に関わ
- る細胞性因子、2nd Negative Strand Virus-Japan、沖縄、2013年1月14-16日。
15. Yasuda, J.: Diagnostic studies of Lassa fever in Nigeria. 6th US-J Medical Biodefense Research Symposium, “New Frontiers in Medical Biodefense Research Between the United States and Japan”, Nagasaki, Feb 4, 2013.
- H 知的財産権の出願・登録状況  
現在出願予定はない。

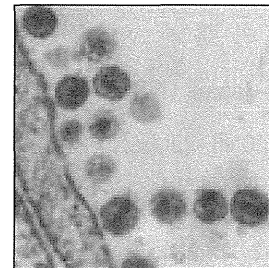
- IFN誘導性 II 型膜タンパク質
- HIV-1を始め、広範なエンベロープウイルスに対し、抗ウイルス作用を示す宿主因子
- 二量体(もしくは多量体)を形成し、細胞膜とウイルス粒子を架橋することで、細胞からの子孫ウイルスの産生を抑制



Yang, H. et al. PNAS, 2010



C; システイン残基  
Y; N-結合型糖鎖修飾



Neil, S. et al. Nature, 2008, 451, 425-30

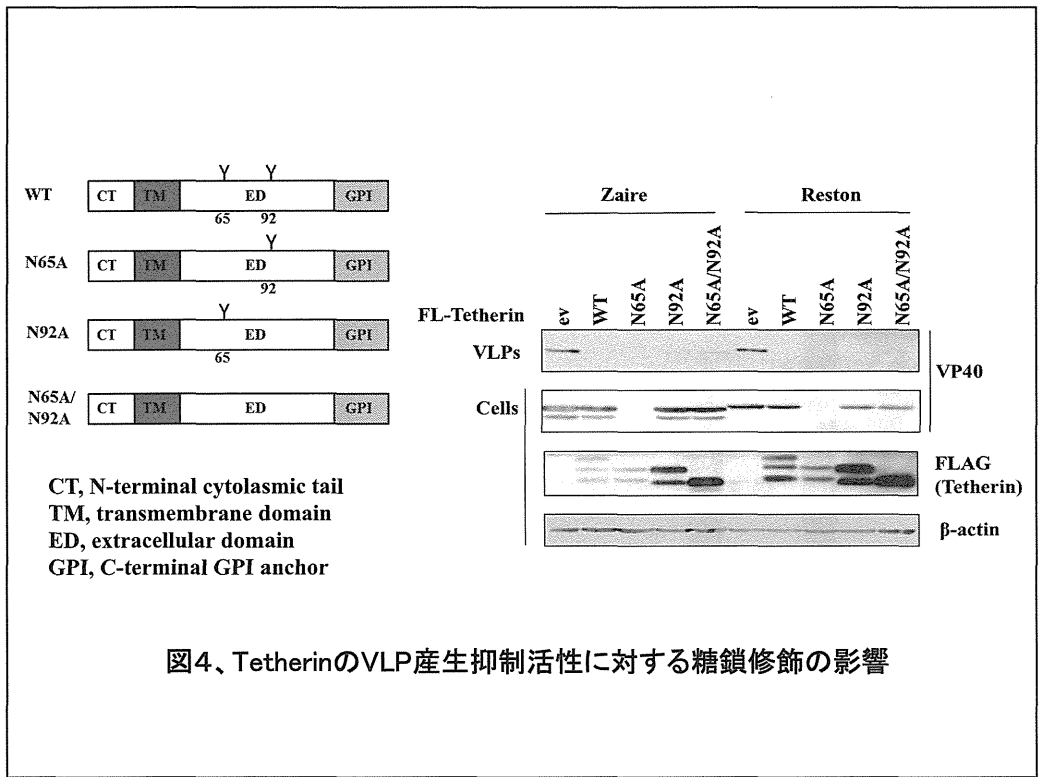
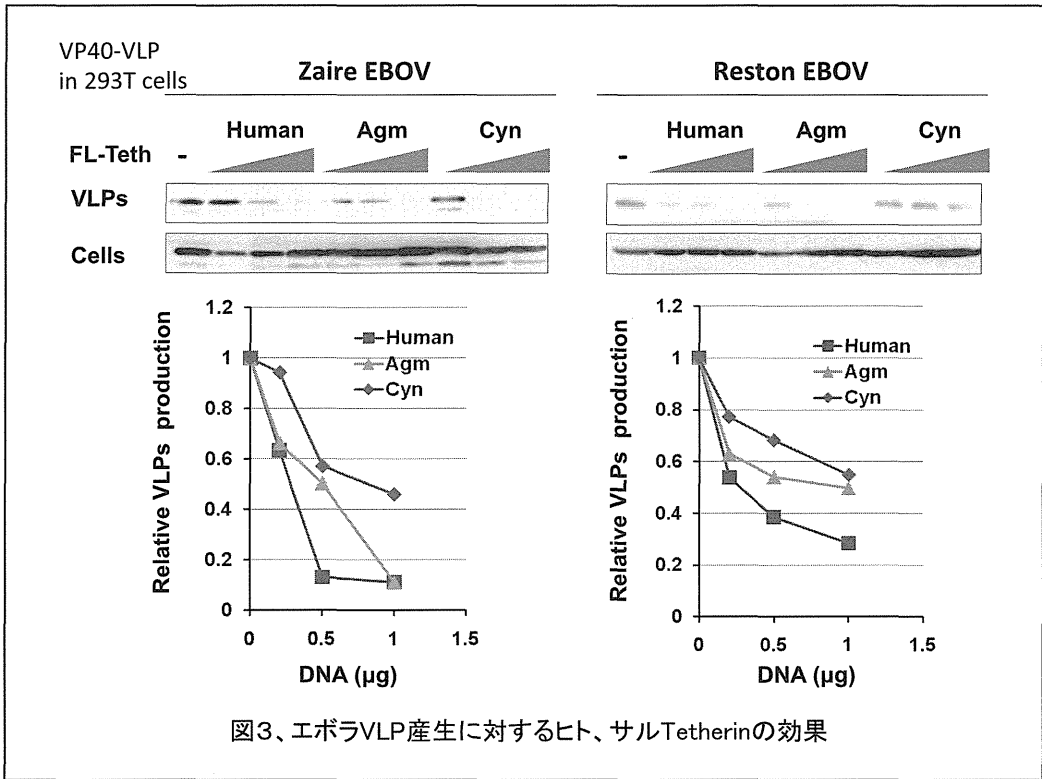
図1、Tetherin(BST-2/CD317/HM1.24)

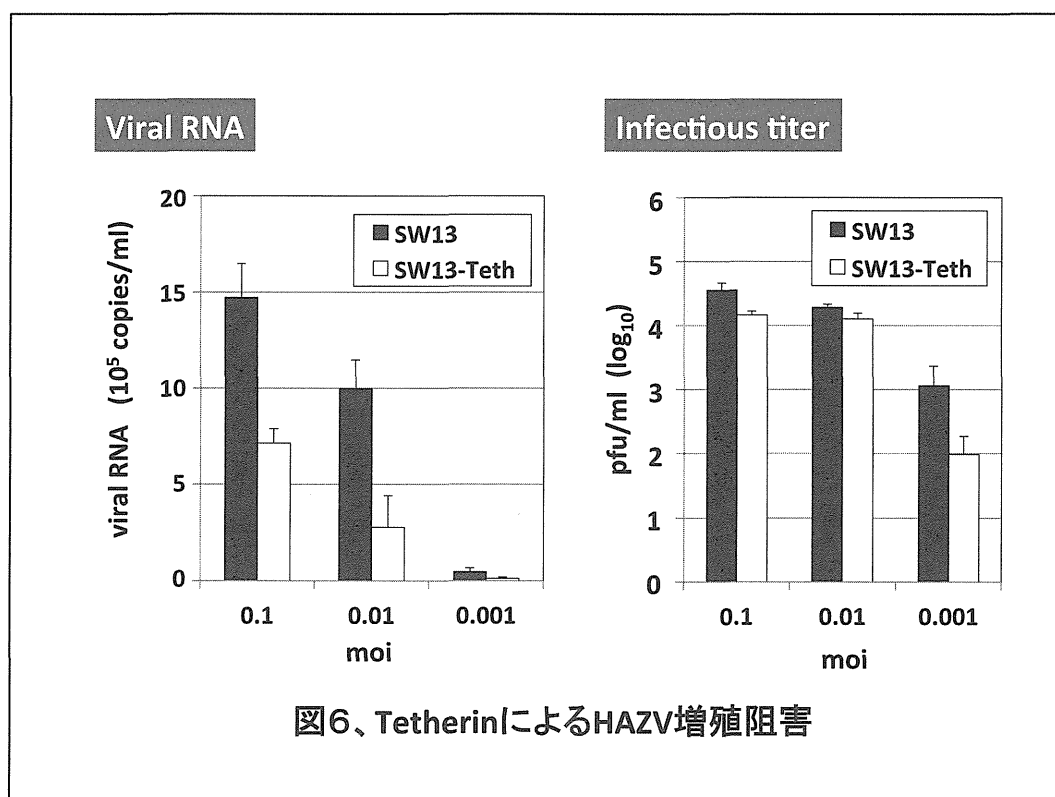
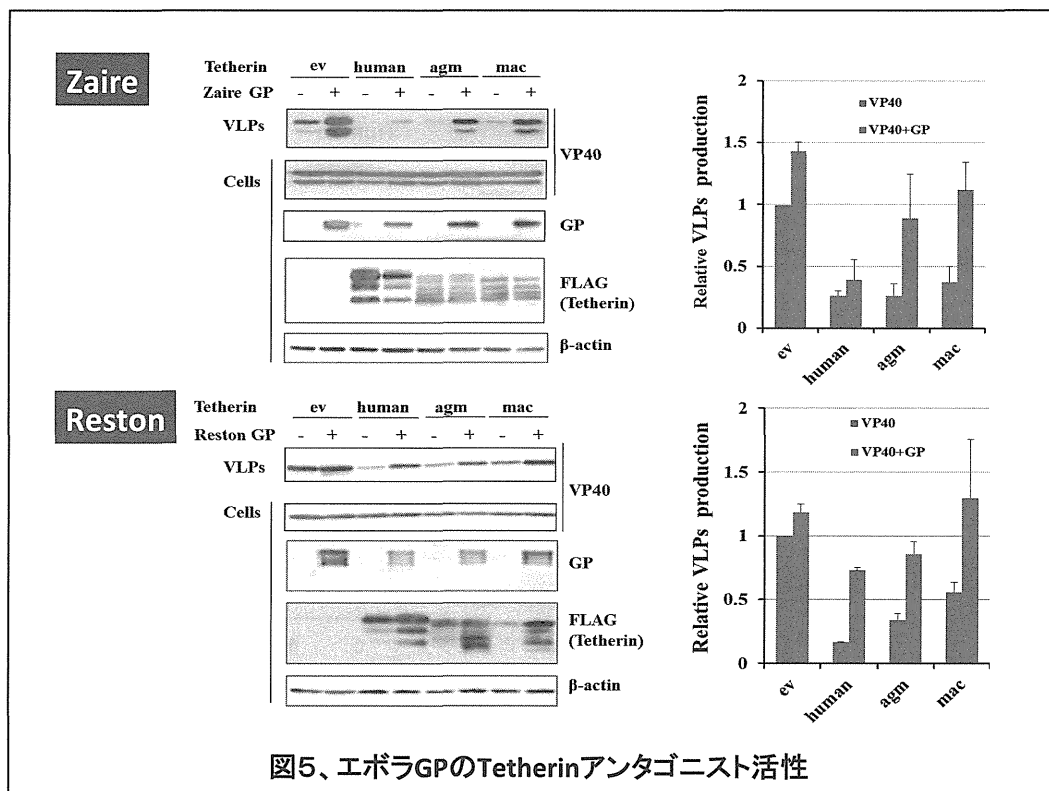
ラッサウイルス	N-	1	48	51	81	84	94	97	99	-C
			YLCL		PTAP		PPPY			
フニンウイルス	N-	1	56	59			89	92	94	-C
			YLCL				PTAP			
マチュボウイルス	N-	1	56	59			89	92	94	-C
			YLCL				PSAP			

Lドメイン配列

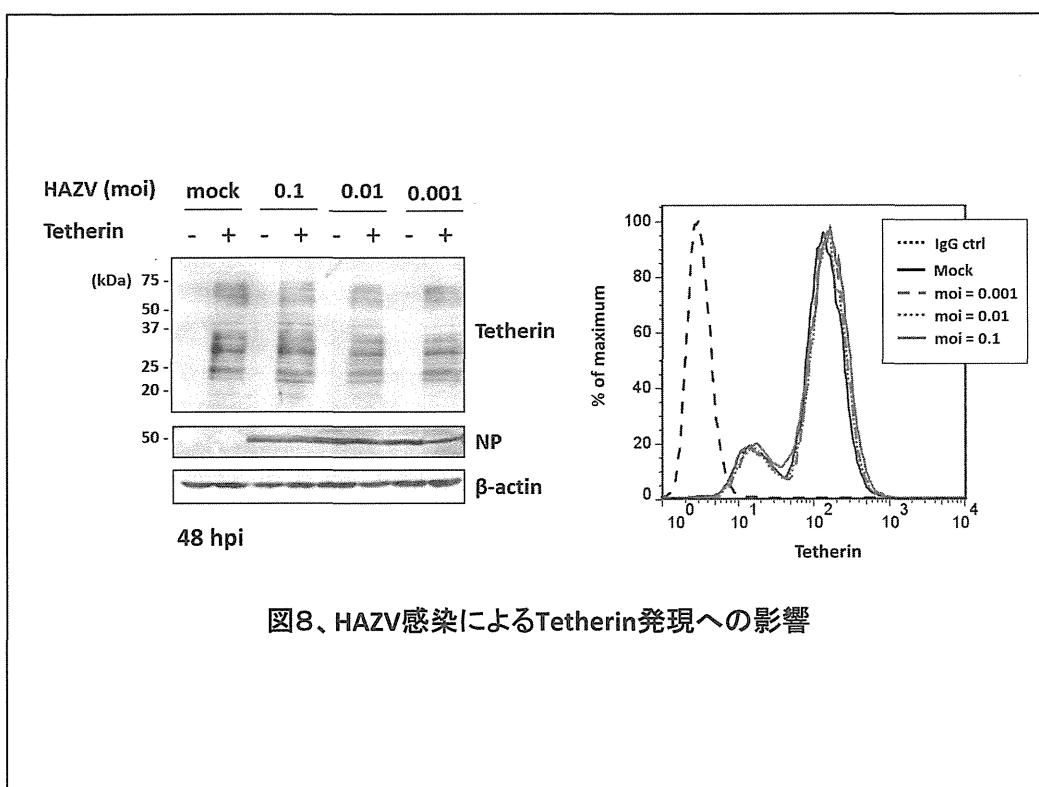
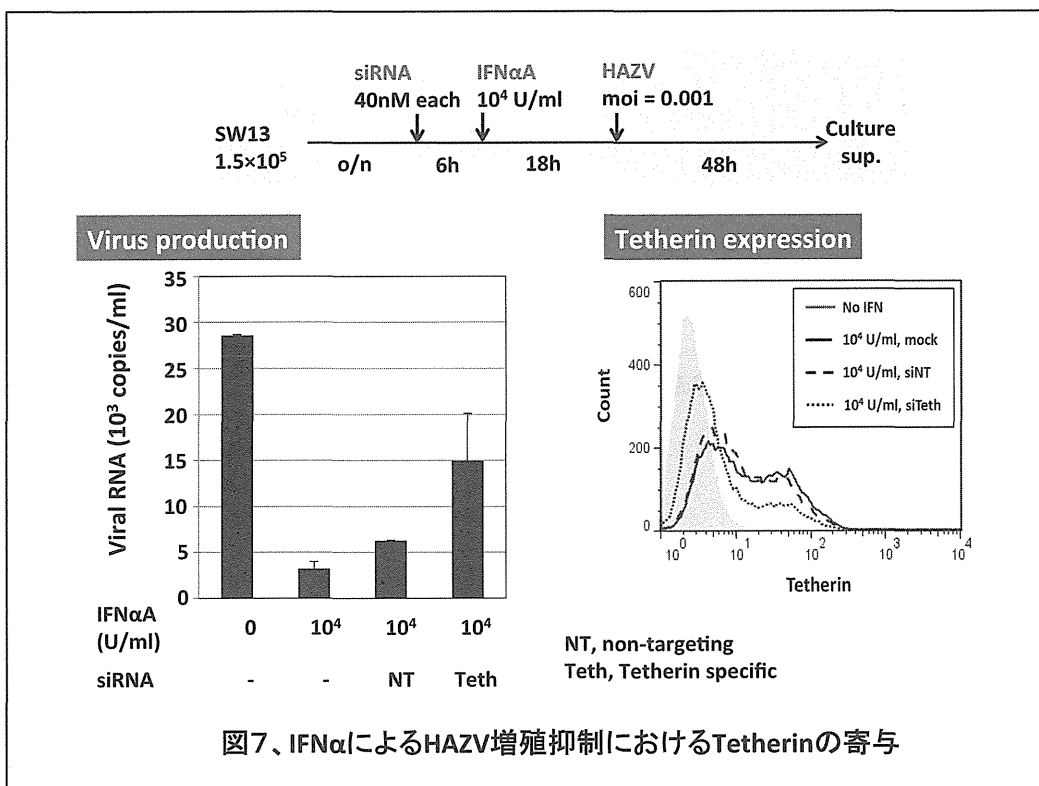
PT/SAP  
PPXY  
YXXL  
FPIV

図2、アレナウイルス zタンパク質のLドメイン配列









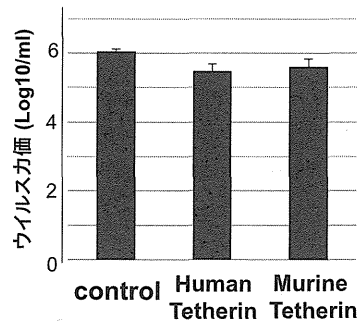
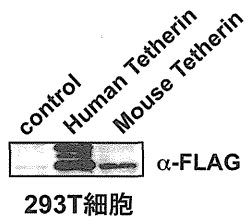


図9、ヒト及びマウスTetherin/BST-2の過剰発現によるLCMV増殖への影響

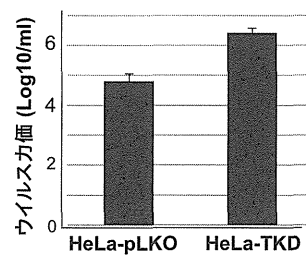
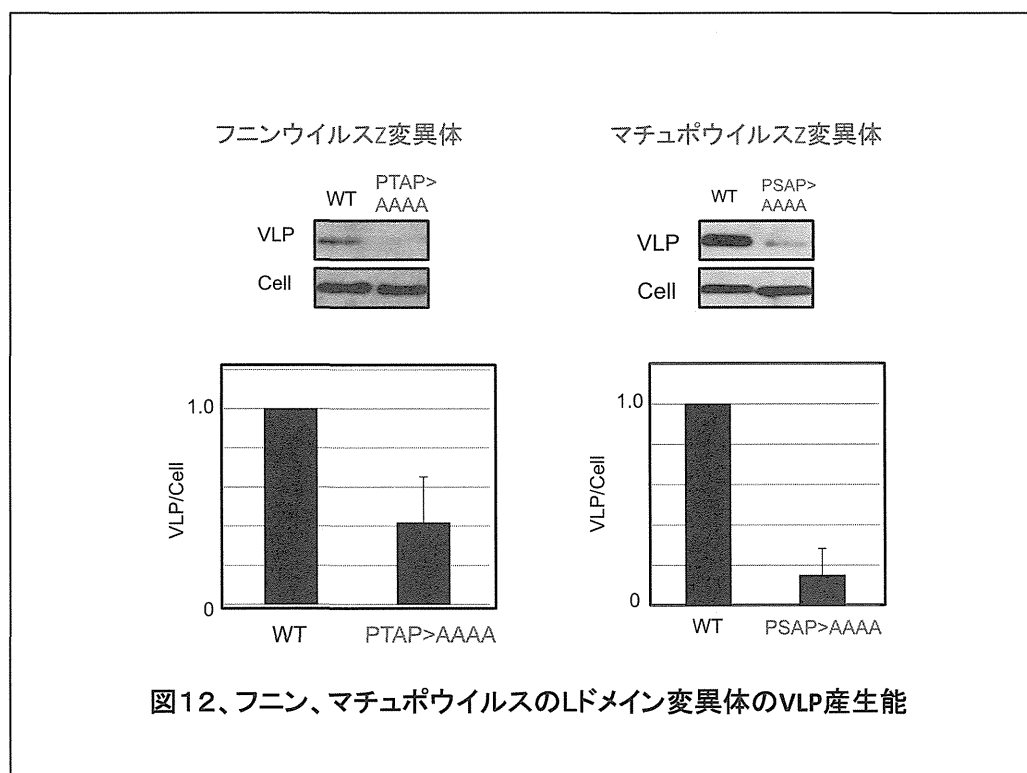
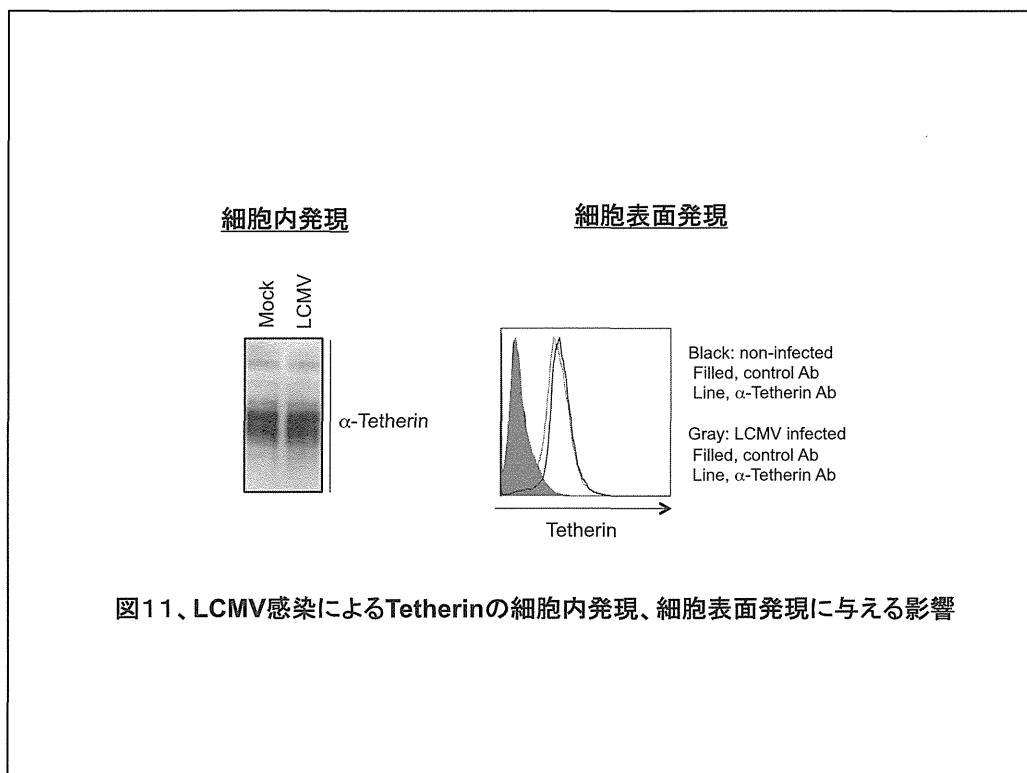


図10、Human Tetherin/BST-2発現抑制によるLCMV増殖への影響



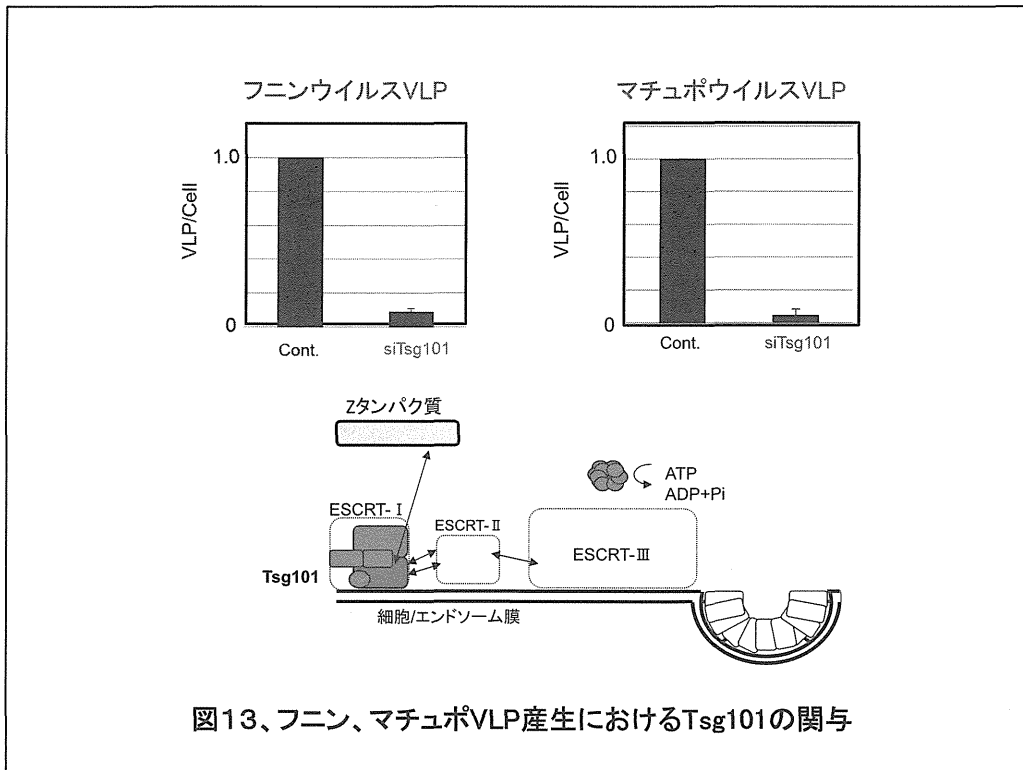


図13、フニン、マチュポVLP産生におけるTsg101の関与

Genus	Species	Strain	Quantity	Real-time RT-PCR	RT-LAMP Tt (min) <sup>a</sup>	
					Northeastern Nigeria	Sierra Leone
Lassa virus	Pinneo	10 ng	10 ng	+	18.2	-
		1 ng	1 ng	+	23.9	-
		100 pg	100 pg	+	-	ND
		10 pg	10 pg	-	-	ND
		100 fg	100 fg	-	-	ND
	Josiah	10 ng	10 ng	+	-	11.6
		1 ng	1 ng	+	-	13.0
		100 pg	100 pg	+	ND	14.7
		10 pg	10 pg	+	ND	18.2
		1 pg	1 pg	+	ND	-
Ebola virus	Zaire ebolavirus	Mayinga	600 pg	-	-	-
		Zaire95	600 pg	-	-	-
	Reston ebolavirus	Pennsylvania	600 pg	-	-	-
			600 pg	-	-	-
	Sudan ebolavirus	600 pg	-	-	-	
	Cote d'Ivoire ebolavirus	600 pg	-	-	-	
Marburg virus	Musoke	Ozolin	600 pg	-	-	-
		Ravn	600 pg	-	-	-
		Angola	600 pg	-	-	-
		600 pg	-	-	-	

表1、ラッサウイルス検出用RT-LAMPの特異性と検出限界

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：南米 HPS ウイルスの診断法と分子疫学

研究分担者： 有川二郎（北海道大学大学院医学研究科教授）

研究要旨：腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)は、ブニヤウイルス科に分類されるハンタウイルスを原因とする重症熱性疾患である。HPS は呼吸困難を伴い、重篤で高い致死率を呈する感染症である。これまで日本では HPS の発生報告はない。また、HPS 原因ウイルスの流行国からの入手は極めて困難であり、ウイルスを用いた診断や治療法、予防法の開発に支障をきたしている。このため、ウイルス遺伝子検出、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等を整備し、国内での患者等の発生に備える必要がある。これまでに、血清診断では一般的な ELISA 法や蛍光抗体法に加え、共通抗原部位を削除した組換え核タンパクを用いた血清型鑑別診断 ELISA 法、シュードタイプウイルスを利用した代替中和試験法を確立してきた。また、簡易診断法としてのイムノクロマトグラフィーの開発を試み、血清学的ウイルス診断法を改良しつつある。本研究で、これら診断法の改良や評価をさらに継続し、また、HPS の病態モデルマウスを開発し、このマウスにおける肺水腫の解析から、病態発現への好中球の関与を確認した。

研究協力者：吉松組子（北海道大学大学院  
医学研究科）

A. 研究目的

ハンタウイルスのうち、Hantaan (HTNV)、Seoul (SEOV)、Dobrava (DOBV) および Puumala (PUUV) の 4 つの血清型およびおそらく Thailand 型ウイルス (THAIV) が HFRS の原因となる。一方 Sin Nombre virus (SNV)、Andes virus (ANDV)、Laguna Negra virus

(LANV) を始めとする南北アメリカ大陸産のげっ歯類によって媒介されるハンタウイルスは HPS の原因ウイルスである。南北アメリカ大陸からは他にも多様なウイルスが報告されており、病原性との関連が明らかではないウイルスも多く、分類についても共通の基準が確立されているとは言い難い。また、HTNV、SEOV および DOBV はネズミ亜科のげっ歯類、そして PUUV はハタネズミ亜科のげっ歯類によって媒介される。

このようにウイルス型と媒介げっ歯類の対応が明確であることから、ハンタウイルスは宿主動物とともに共進化したと考えられている。この3つのグループのウイルスは互いに抗原性が大きく相違し交差反応性が低いことから、ハンタウイルス感染症の血清診断を行うためには少なくとも3種類の抗原が必要であると考えられる。

現在、以下の3種類の組換え抗原を、既存の全ての血清型に対するハンタウイルス抗体の網羅的な検出に使用されている。すなわち、核タンパクのうち、N末端の103アミノ酸領域は、HTNVとSEOVに共通であるため、この部位を発現させた組換え抗原を、HS103と命名した。プーマラウイルスおよびアンデスウイルスの相当の部位を発現させた抗原をそれぞれ、PUU103およびAND103とした。これまで、これらの抗原はELISA法の抗原として使用し、これら3種類の抗原を用いることにより、既存の血清型のハンタウイルス全てに対して網羅的に抗体を検出できることを確認している。

本研究では輸入感染症対策も視野にいれ、全世界由来ハンタウイルスの簡便で迅速な血清診断の確立を目的とし、これらの抗原をイムノクロマト法(ICG法)に応用することを試みる。また、それぞれの抗原で陽性反応を得た場合、グループのウイルスの中で罹患ウイルスを迅速に鑑別することは、媒介げっ歯類を特定し、対策を取る上で重要である。一般に罹患ウイルスのタイプを特定するためには中和試験が必要とされるが、生きたウイルスを入手する必要がある

こと(HPS原因ウイルスの多くは遺伝子配列のみが知られており、ウイルスが分離されていない)、BSL3以上の施設が必要で、これを行う事は非常に困難である。そこで、本研究では南北アメリカ大陸由来ハンタウイルスの血清診断および鑑別診断のため、中和試験代替法として、組換え核蛋白抗原を用いたELISAおよびシュードタイプウイルスを用いた診断システムの確立を目的とする。

南北アメリカ大陸由来ハンタウイルスの病原性は肺に急激な水腫を起こすことにより、呼吸不全から高い死亡率へとつながる点である。。本研究では診断法に加え、一般的な実験動物を用いたHPS動物モデルの開発を試み、特に一過性に増加する好中球と肺水腫について解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 血清型鑑別ELISA:

南北アメリカ大陸由来ハンタウイルスでHPSの原因となっているウイルスおよび病原性の知られていないウイルスについてN末端トランケート核蛋白抗原を用いた鑑別診断システムを構築し、患者および病原巣動物であるげっ歯類の鑑別診断システムの検討を行った。核蛋白N末端約100アミノ酸には共通抗原部位があるため、これを削除することにより、C末端側の型特異的抗原部位をのみが保存された鑑別診断抗原を作製する。

### 2. 代替中和試験:

一般に中和試験の抗原性を担うのは外被

タンパクであるエンベロープ蛋白である。そこで HPS 関連ウイルス、SNV, ANDV, LNV のエンベロープ糖タンパク(GP)の組換えエンベロープ蛋白を外套した水泡性口炎ウイルス(VSV)粒子による代替中和試験を構築することを試みた。このシュードタイプウイルスによる中和試験はすでに旧世界ハンタウイルスの代替中和法として報告している方法で行った(Ogino et al 2003)。

### 3. ICG ストリップの作製：

ハンタウイルス核蛋白の、N 末端の 103 アミノ酸を pET43.1 ベクターを用いて発現させ、付加されたヒスチジンタグを用いて精製した。ハンター抗原は、HS103、プーマラウイルスおよびアンデスウイルスについてはそれぞれ、PUU103, AND103 抗原とした。これらの組換え抗原をストリップに添付し、金コロイド標識 Protein A を用いた抗体検出用イムノクロマトストリップを作成した。75 倍希釈の患者血清 150 uL を吸着部に添加、展開の後、抗原塗布部でのバンドの形成を確認した。

### 4. 血清：

PCR により罹患ウイルス型がすでに確定している患者由来の血清を、アルゼンチン国立ウイルス研究所の Deria Enria 博士から分与された。また、メキシコで捕獲されたげっ歯類の血清とハンタウイルス遺伝子は北海道大学大学院獣医学研究科の荻和宏明博士より分与された。PUUV 感染の軽症型 HFRS (nephropathia epidemica; NE) 患者血清、はスウェーデンウメア大学病院臨床微生物学教室 Clas Ahlm 教授から分与された。

中国由来 HFRS 患者血清および北米由来 HPS 患者血清は研究分担者がこれまでの保存しているものを使用した。

### 4. HPS 発症モデル系の開発と解析：

HPS 関連ウイルスは移動の制限から日本で使用することは困難である。また、その宿主動物であるげっ歯類も輸入が困難なものが多い。また、HPS 関連ウイルスのマウスへの感染性が低いとの報告もあり、動物モデルの研究は進んでいない。これまでの研究で、プロトタイプハンタウイルスであるハンターウイルス (HTNV)がマウスへの高い感染性を持ち、その感染ターゲット臓器が腎臓よりもむしろ肺であることが明らかとなっている。そこで本研究では、獲得免疫を欠く SCID マウスへ HTNV を感染させ、肺への病原性を確認したところ、肺水腫が出現することが明らかとなった。そこで、この肺水腫の原因を明らかにするために、肺への滲出細胞を解析したところ、マクロファージ、好中球、NK 細胞の肺での増加が確認された。次に、Gr-1 抗体および NK1.1 抗体による好中球、NK 細胞の枯渇、クロドロネートリポソームによるマクロファージの枯渇を行い、肺水腫出現への影響を検討した。さらにエバンスブルーを用いた肺水腫の解析を行った。

(倫理面からの配慮について)

各種免疫血清の採血は、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものであり、動物福祉の観点からも問題はないと判断さ

れた。患者血清は各国研究機関にて診断済みのものであり、番号のみにて提供され、倫理的に問題ないと判断された。動物実験は北海道大学の実験動物委員会より倫理面および科学面において審査を受け承認されたものである。

## C. 研究結果

### 1. HPS 原因ウイルスの血清診断法の応用：

南北アメリカ大陸で発生する HPS 関連ウイルスの原因ウイルスはそのほとんどが、ANDV, SNV, LANV によるものと考えられている。また、病原性が不明な多くのウイルスが報告されている。それらのウイルスに対する抗体を広く検出するスクリーニング抗原としては大腸菌ベクターで発現させた組換え N 蛋白を抗原とする、通常の ELISA が十分な感度を持つことが分かっている。しかしながら、この抗原ではウイルスの鑑別をすることはできない。今回の解析では SNV, ANDV, LNV, BCCV, CARV を選び、N 末端を削除した組換え N 抗原を作成した。これらの抗血清を用いて、作成した組換え抗原の鑑別抗原としての有用性を ELISA で確認した。その結果 HPS の原因となっていることが明らかとなっている、ANDV, SVN, LAGNV 感染を本方法によって鑑別できることが、患者血清を用いて明らかとなった。また、病原性不明ウイルスである、CARV, BCCV ではこれらのウイルスに感染したことが明らかな患者は報告がないため試験に供試することは困難であった。しかしながら少なくとも、HPS 患者血

清はこれらの抗原へはヘテロとみられる反応しか示さなかった。また、CARV については分離されたげっ歯類の血清は鑑別可能であったため、これらの抗原が鑑別抗原として有効であると考えられた。

### 2. イムノクロマト法：

ICG 法においては、HS103, PUU103, AND103 の3つのスクリーニング抗原を用いて3種類のストリップを作製した。①一枚のストリップに1種類の抗原ラインをひいたもの、②3つの抗原を混合して一本の抗原ラインとしたもの (mixed antigen strip)、③1枚のストリップに3種類の抗原ラインをひいたもの (Three lines strip) の3種類である。これらのストリップに種々の標準血清を添加したところ、それぞれホモの組み合わせの抗原にラインをみる事ができた。しかしながら健常人由来血清ではコントロールラインのみを呈した。NE および HPS の一部の血清では交差反応が認められた。しかしながらその反応は明らかにホモに強い反応がみられ、判定は可能であった。③のストリップは抗原ラインの位置で鑑別診断を行うことを目的に試作したが、交差反応を検出することも可能であった。

### 3. HPS 代替中和法開発：

エンベロープ糖タンパクの抗原性に基づく代替中和法を確立するため、HPS 原因ウイルスのエンベロープ糖タンパクの発現をこころみた。ANDV については、シュードタイプウイルスの作製に成功した。このシ



ュードタイプウイルスは ANDV 患者血清中の中和抗体の検出に有効であった。現在、SNV, CARV, ウイルスについても組換えエンベロープ糖タンパクを外套した VSV の作製を進めている。

#### 4. ハンタウイルス肺症候群 (HPS) モデルマウスの作成：

SCID マウスへのプロトタイプウイルスの接種により、接種後約 28 日後をピークに肺水腫が起こることが分かった。肺の湿重量が上がり、肺胞への滲出液の貯留が起こり、エバンスブルー法によっても滲出が確認された。機能的な T および B リンパ球を欠く SCID マウスでの現象であることから、これらの細胞の肺水腫への関与を排除できる。そこで、気管支洗浄液(BAL)に滲出している細胞を特定したところ、明らかに好中球が増加していることが明らかとなった。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減じる処置を行ったところ、肺水腫を起こす肺胞の率が低下し、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。一方、NK 細胞およびマクロファージを減じる処置ではこのような効果はみられなかった。病的にこの肺水腫は炎症像を欠く点等が HPS 患者と共通しており、この実験系が HPS の動物モデルとなりうる可能性が示された。

#### D. 考察

本研究では血清診断システムおよび病態

モデルの構築を目的としている。本研究の研究成果から、N 末端トランケート核蛋白抗原は、新世界ハンタウイルス血清型鑑別抗原として有用であることが示された。また、代替中和試験法として、新世界ハンタウイルスでは初めて ANDV のシステムを確立した。さらに、SNV, LANV などの HPS 関連ウイルスについて開発してゆく事が必要である。また、これらの鑑別診断のひとつ前のステップであるスクリーニングについて、今年度の研究で ICG 法による簡便な検査法の提供が可能であることが明らかとなった。以上のことから、本研究では急務を要する HPS 関連ウイルスの診断システムについて、ヒトの血清学的方法についてはほぼ手順を示すことができたと考えられる。しかしながらこの ICG 法の評価については今後検体数を増やして、信頼度について評価を進める事が必要である。

さらに今年度はプロトタイプハンタウイルスが SCID マウスに肺水腫を起こすことを示し、この肺水腫が HPS の患者と共通点があることから、HPS の動物モデルとなりうる可能性を示した。また、この肺水腫に好中球が、おそらく間接的に関与していることが明らかとなった。このモデルの有用性を明らかにすることは、HPS の発症予防／治療法の開発につながると考えられる。

#### E. 結論

ハンタウイルスはその病原巣動物によって、ネズミ亜科由来、ハタネズミ亜科由来、アメリカネズミ亜科由来、および食虫類由

来ウイルスの4つのグループに分けられ、病原性の不明なウイルスも含めて続々と発見されている。病原性・多様性および抗原性に関する情報を整理して診断・鑑別法を準備することが防疫上重要であると考えられる。また、ハンタウイルス感染症の持つ根本的な病原性発現機構を明らかにする事は、発症予防および治療法の開発に重要である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tegshduuren E, Yoshimatsu K, Taruishi M, Endo R, Shimizu K, Koma T, Yasuda SP, Kariwa H, Arikawa J, Ishihara C : Different cross-reactivity of human and rodent sera to Tula virus and Puumala virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 33(6), e67-73, 2010
2. Koma T, Yoshimatsu K, Pini N, Safronetz D, Taruishi M, Levis S, Endo R, Shimizu K, Yasuda SP, Ebihara H, Feldmann H, Enria D, Arikawa J : Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Sin Nombre, Andes, and Laguna Negra hantavirus infections in humans and rodents. *J Clin Microbiol.* 48(5), 1635-42, 2010
3. Gamage CD, Yasuda SP, Nishio S, Kularatne SA, Weerakoon K, Rajapakse J,

Nwafor-Okoli C, Lee RB, Obayashi Y, Yoshimatsu K, Arikawa J, Tamashiro H : Serological evidence of Thailand virus-related hantavirus infection among suspected leptospirosis patients in Kandy, Sri Lanka. *Jpn J Infect Dis.* 64(1), 72-5, 2011

4. Seto T, Tkachenko EA, Morozov VG, Tanikawa Y, Kolominov SI, Belov SN, Nakamura I, Hashimoto N, Kon Y, Balakiev AE, Dzagurnova TK, Medvedkina OA, Nakauchi M, Ishizuka M, Yoshii K, Yoshimatsu K, Ivanov LV, Arikawa J, Takashima I, Kariwa H : An efficient in vivo method for the isolation of Puumala virus in Syrian hamsters and the characterization of the isolates from Russia. *J Virol Methods.* 173(1), 17-23, 2011
5. Li TC, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Arikawa J, Koma T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Mai le TQ, Hoa NT, Yamashiro T, Hasebe F, Takeda N, Wakita T : Characterization of self-assembled virus-like particles of rat hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *J Gen Virol.* 92(Pt 12), 2830-7, 2011
6. Sanada T, Kariwa H, Nagata N, Tanikawa Y, Seto T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I : Puumala virus infection in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) resembling

- hantavirus infection in natural rodent hosts. *Virus Res.* 160(1-2), 108-19, 2011
7. Yasuda SP, Yoshimatsu K, Koma T, Shimizu K, Endo R, Isozumi R, Arikawa J : Application of Truncated Nucleocapsid Protein (N) for Serotyping ELISA of Murinae-Associated Hantavirus Infection in Rats. *J Vet Med Sci* 74(2), 215-9, 2012
  8. Kariwa H, Yoshida H, Sánchez-Hernández C, Romero-Almaraz Mde L, Almazán-Catalán JA, Ramos C, Miyashita D, Seto T, Takano A, Totani M, Murata R, Saasa N, Ishizuka M, Sanada T, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I : Genetic diversity of hantaviruses in Mexico: identification of three novel hantaviruses from Neotominae rodents. *Virus Res* 163(2), 486-94, 2012
  9. Saasa N, Yoshida H, Shimizu K, Sánchez-Hernández C, Romero-Almaraz Mde L, Koma T, Sanada T, Seto T, Yoshii K, Ramos C, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Kariwa H : The N-terminus of the Montano virus nucleocapsid protein possesses broadly cross-reactive conformation-dependent epitopes conserved in rodent-borne hantaviruses. *Virology* 20;428(1), 48-57, 2012
  10. Luan VD, Yoshimatsu K, Endo R, Taruishi M, Huong VT, Dat DT, Tien PC, Shimizu K, Koma T, Yasuda SP, Nhi L, Huong VT, Arikawa J : Studies on Hantavirus Infection in Small Mammals Captured in Southern and Central Highland Area of Vietnam. *J Vet Med Sci* 74(9), 1155-62, 2012
  11. Koma T, Yoshimatsu K, Taruishi M, Miyashita D, Endo R, Shimizu K, Yasuda SP, Amada T, Seto T, Murata R, Yoshida H, Kariwa H, Takashima I, Arikawa J : Development of a serotyping enzyme-linked immunosorbent assay system based on recombinant truncated hantavirus nucleocapsid proteins for New World hantavirus infection. *J Virol Methods.* 185(1), 74-81, 2012
  12. Yoshimatsu K, Arikawa J, 2012. Bunyavirus and its ecology. *Uirusu* 62: 239-250.
  13. Schlegel M, Tegshduuren E, Yoshimatsu K, Petraityte R, Sasnauskas K, Hammerschmidt B, Friedrich R, Mertens M, Groschup MH, Arai S, Endo R, Shimizu K, Koma T, Yasuda S, Ishihara C, Ulrich RG, Arikawa J, Köllner B : Novel serological tools for detection of Thottapalayam virus, a Soricomorpha-borne hantavirus. *Arch Virol* 157(11), 2179-87, 2012
  14. Nakamura I, Hang'ombe BM, Sawa H, S. K, Orba Y, Ishii A, Thomas Y, Isozumi R, Yoshimatsu K, Mweene AS, Takada A, Sugimoto C, Arikawa J, 2013.

- Cross-reactivity of secondary antibodies against African rodents and application for sero-surveillance. *J Vet Med Sci* in press.
2. 学会発表
1. Arikawa J : Hantavirus infection as a rodent-borne zoonoses How we learn from nature. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece, May 20-22, 2010
  2. Kariwa H, Yoshikawa K, Tanikawa Y, Seto T, Sanada T, Ngonda S, Ivanov LI, Slonova R, Zakharycheva TZ, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I : Isolation of amur and Hantaan viruses from wild rodents and the epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in far east Russia. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece, May 20-22, 2010
  3. Yoshimatsu K, Shimizu K, Yasuda S, Endo R, Koma T, Ibrahim IN, Perwitasari D, Yuniyanto A, Pattamadilok S, Kumperasart S, Luan VD, Huong VTQ, Chandy S, Sridharan G, Ninh T, Kularante S, Rajapakse J, Gamage C, Tamashiro H and Arikawa J : Prevalence of Hantaviruses in Humans and Rodents in Southeast and South Asia. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece, May 20-22, 2010
  4. Koma T, Yoshimatsu K, Pini N, Safronetz D, Taruishi M, Levis S, Endo R, Shimizu K, Yasuda SP, Ebihara H, Feldmann H, Enria D and Arikawa J : Development of serotyping ELISAs for new world hantavirus infection. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece, May 20-22, 2010
  5. Endo R, Yoshimatsu K, Koma T, Taruishi M, Shimizu K, Yasuda S, Tegshduuren E, Safronetz D, Ebihara H, Feldmann H and Arikawa J : Establishment and evaluation of universal consensus primers for the detection of hantaviruses from all known genetic lineages. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES. Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece, May 20-22, 2010
  6. Ibrahim IN, Yoshimatsu K, Perwitasari D, Ariati Y, Shimizu K, Yuniyanto A, Yasuda S, Arikawa J : Bio-Ecological study on hantaviruses infection among rodents, insectivores and human in thousand islands district and serang district of Indonesia. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace