

表8 各試料に関するウイルス科の増幅結果(2011年度)

	試料1	試料2	試料3
アデノウイルス科	○	○	
アレナウイルス科	○		
ブニヤウイルス科			○
コロナウイルス科			
フィロウイルス科			
フラビウイルス科	○	○	○
オルソミクソウイルス科			
パラミクソウイルス科	○	○	○
パルボウイルス科		○	
ピコルナウイルス科		○	
ボックスウイルス科		○	
レオウイルス科	○	○	○
ラブドウイルス科		○	○
トガウイルス科		○	

単一のPCRバンドが既知のウイルス遺伝子から予想されるサイズに検出された結果のみを記載する。

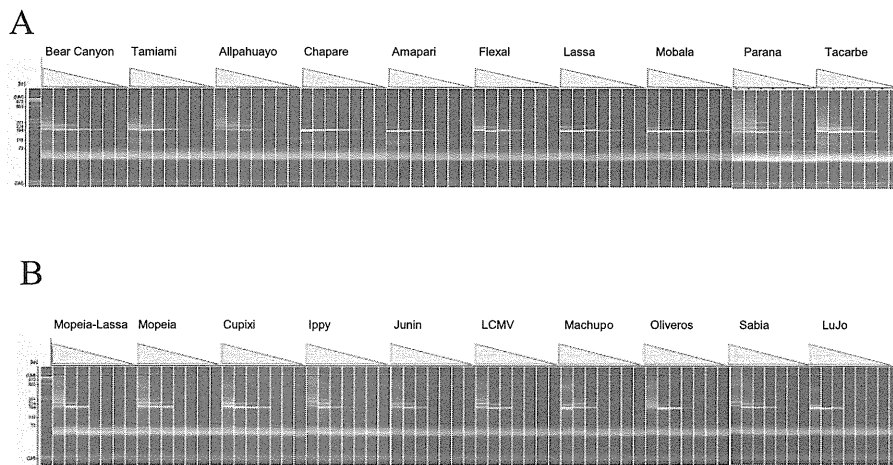
表9 旧世界ハンタウイルス用プライマー(2012年度)

プライマー名	配列	プライマー名	配列	プライマー名	配列	プライマー名	配列	プライマー名	配列
hanta_s_f20	CGRTTCAAGGATGACAGYCT	hanta_sng_f51	KGAYATTGAKGARCCAACAGG	hanta_nss_r6	GRATYCCATTCACTCYTCAAA	hanta_htns_r33	GAWGCCATRATGTGRTTTCCTCA	hanta_sas_f3	GCAGARAAGCARATARGAAGGA
hanta_s_r3	TCWGGGTCCATATCATCWCCA	hanta_sng_f52	CTKGAYATTGAKGARCCAACAG	hanta_nss_r10	ATCWACWGCYCTTTTCCCCT	hanta_htns_r37	WGCCATRATTGTRTTCCCTCATG	hanta_sas_f30	CARTCRAGCATGAAAGCWGAAG
hanta_s_f64	CTTGAYATTGAKGARCCAACAG	hanta_sng_f54	TKGAYATTGAKGARCCAACAGG	hanta_nss_r25	GYTTTGGYTTTCKAATYCCATT	hanta_htns_r38	GCCATRATTGTRTTCCCTCATG	hanta_sas_f59	CTTGAYATTGAKGARCCAACAG
hanta_s_f69	KGAYATTGAKGARCCAACAGG	hanta_sng_r3	CCAAATTGATGATGGWGAGTCA	hanta_nss_r32	AGCAAARACCCAWATTGATGATG	hanta_htns_r39	AWGCCATRATTGTRTTCCCTCATG	hanta_sas_f64	KGAYATTGAKGARCCAACAGG
hanta_s_f70	CTKGAYATTGAKGARCCAACAG	hanta_sng_r5	CATTACATCYTCAAAYGAGCT	hanta_nss_r41	AAARACCCARATTTGAWGATGGA	hanta_htns_r58	TCCTTSACYTTTGTGRTCAATCA	hanta_sas_f65	CTKGAYATTGAKGARCCAACAG
hanta_s_f72	TKGAYATTGAKGARCCAACAGG	hanta_sng_r35	AGCAAARACCCAWATTGATGATG	hanta_nss_r42	ARACCCARATTGAWGATGAGAGA	hanta_slvs_f1	RGTSAAAGATGCAGAGAARCAA	hanta_sas_f67	TKGAYATTGAKGARCCAACAGG
hanta_s_r5	CATTACATCYTCAAAYGAGCT	hanta_sng_r39	AAARACCCARATTGAWGATGGA	hanta_nss_r43	AAARACCCARATTGAWGATGGA	hanta_slvs_f18	CRAGCATGAAAGCWGAAGAGAT	hanta_sas_r5	CATTACATCYTCAAAYGAGCT
hanta_s_r6	GRATYCCATTCACTCYTCAAA	hanta_sng_r43	GCAAARACCCARATTGAWGATG	hanta_nss_r44	CAAARACCCARATTGAWGATG	hanta_slvs_f20	CARTCRAGCATGAAAGCWGAAG	hanta_sas_r6	GRATYCCATTCACTCYTCAAA
hanta_s_f3	TGAYAGTCRTTARGATGTGA	hanta_nss_f24	TTTTGARGATGTGAATGGRATTC	hanta_nss_r47	GCAAARACCCARATTGAWGATG	hanta_slvs_f21	WCCATCATCRATWTGGGKTTT	hanta_sas_r42	CTGTTGGCTCMTCAARTTCAAG
hanta_s_f35	GCARTWTGTGGRYTATATCCTGC	hanta_nss_f36	WCCATCATCRATWTGGGKTTT	hanta_htns_f5	ATGCCTAATGCYCAGTCMAGTA	hanta_slvs_f44	TCCATCWTCATYTGGGYTTT	hanta_sas_r44	AAARACCCARATTGAWGATGGA
hanta_s_f46	GCARTTTGTGGRCATATCCTGC	hanta_nss_f47	CTTGAYATTGAKGARCCAACAG	hanta_htns_f9	ACCTKGACATTGATGAACCAAC	hanta_slvs_f45	GAYTCTCCATCWTCATYTGGG	hanta_sas_r47	GCAAARACCCARATTGAWGATG
hanta_s_r3	AAARACCCAWATGTGATGATGGT	hanta_nss_f49	TCCATCWTCATYTGGGYTTT	hanta_htns_f37	WCCATCATCRATWTGGGKTTT	hanta_slvs_f47	CCATCWTCATYTGGGYTTT		
hanta_s_r44	AAAMACCCAWATYGATGATGGT	hanta_nss_f50	GAYTCTCCATCWTCATYTGGG	hanta_htns_f38	CTKGACATTGARGCCAACAG	hanta_slvs_r11	CTGTTGGYTCMTCAARTTCAAG		
hanta_s_f24	TTTTGARGATGTGAATGGRATTC	hanta_nss_f53	CCATCWTCATYTGGGYTTT	hanta_htns_f64	CTTGAYATTGAKGARCCAACAG	hanta_slvs_r16	AGCAAARACCCAWATTGATGATG		
hanta_s_f37	CARTCRAGCATGAAAGCWGAAG	hanta_nss_f54	CATCWTCATYTGGGYTTTGC	hanta_htns_f65	WCCATCRTCATWTGGGKTTT	hanta_slvs_r20	CTGRTCCAGTTGWATTCCCATT		
hanta_s_f38	WCCATCATCRATWTGGGKTTT	hanta_nss_f55	KGAYATTGAKGARCCAACAGG	hanta_htns_f71	KGAYATTGAKGARCCAACAGG	hanta_slvs_r30	GRTCCAGTTGWATTCCCATTGA		
hanta_s_r12	ATCWACWGCYCTTTTCCCCT	hanta_nss_f56	CTKGAYATTGAKGARCCAACAG	hanta_htns_f72	CTKGAYATTGAKGARCCAACAG	hanta_slvs_r41	CTGTTGGCTCMTCAARTTCAAG		
hanta_s_r33	AGCAAARACCCAWATTGATGATG	hanta_nss_f58	TKGAYATTGAKGARCCAACAGG	hanta_htns_f74	TKGAYATTGAKGARCCAACAGG	hanta_slvs_r43	AAARACCCARATTGAWGATGGA		
hanta_sng_f46	CARTCRAGCATGAAAGCWGAAG	hanta_nss_r5	CATTACATCYTCAAAYGAGCT	hanta_htns_r4	TACTKGACTGRGCATTAGGCAT	hanta_slvs_r46	GCAAARACCCARATTGAWGATG		

表10 旧世界ハンタウイルス遺伝子の増幅結果

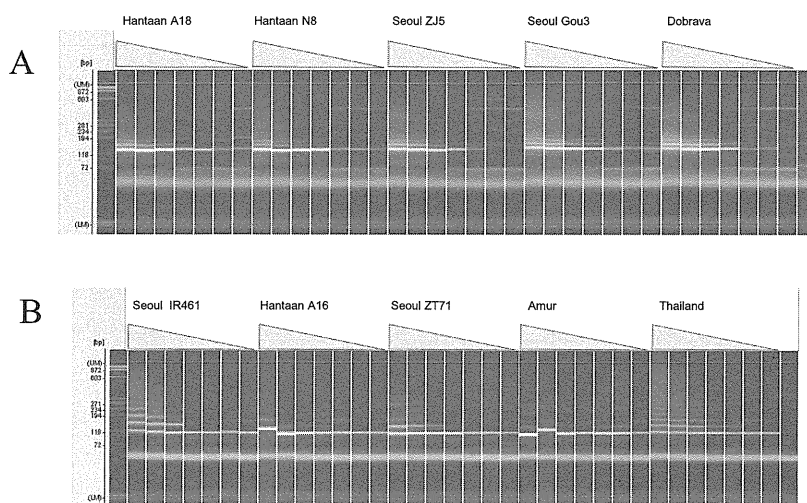
Design Primers without	primer_F	primer_R	size	DOSA	DOSI	SS	SG	HC	TA	DB	Design Primers without	primer_F	primer_R	size	DOSA	DOSI	SS	SG	HC	TA	DB			
No (All strain for design)	f20	r3	167	++	++	++	++	++	+	++	HC	htnf65	htnr37	129		+	++	+						
	f69	r6	193	++	++							htnf65	htnr39	130		+	++	+						
	f72	r6	194	++	++							htnf65	htnr33	131			++	+						
	f84	r6	195	++	++							htnf37	htnr38	128			++	++						
	f70	r6	195	++	++							htnf37	htnr33	131			++	++						
DB	f35	r44	323			++	++	++				htnf65	htnr38	128			++	+						
	f35	r3	323		+	+	++	++	++			htnf65	htnr58	356			+							
	f46	r44	323					++	++	++		htnf37	htnr58	356			+	++						
	f46	r3	323					++	++			htnf5	htnr37	491	++			+						
	f3	r3	441	+	++							htnf5	htnr39	492	++									
TA	f24	r33	435		++	++						htnf5	htnr38	490	++			+						
	f37	r33	374	+		+		+	+	+		htnf5	htnr33	493	++								+	
SG	ngf52	ngr3	599	++			+					slvf45	slvr20	236		+	+						++	
	ngf54	ngr3	598	++		+						slvf21	slvr20	231			++	++	+					
	ngf51	ngr3	597	++		+						slvf44	slvr20	231		+							++	
	ngf46	ngr36	374	+		+	+	+	++		slvf47	slvr20	230									++		
	ngf46	ngr39	371						++	++	slvf45	slvr30	234		+	+						++		
	ngf46	ngr3	365	++		+		+		+	slvf44	slvr30	229		++							++	+	
SS	ngf46	ngr43	373	++				++	++	++	slvf21	slvr30	229	+	+	++	++	+						
	nsf47	nsr6	195	++							slvf1	slvr11	268	++										
	nsf56	nsr25	207	++	++					++	slvf47	slvr30	228	+	++	+					++	+		
	nsf56	nsr6	195								slvf1	slvr41	268											
	nsf55	nsr25	205	++	+		+		++		slvf20	slvr20	581				++	+	+					
	nsf55	nsr6	193	++	+					++	slvf20	slvr16	374					+						
	nsf47	nsr25	207	++	+		+		++		slvf20	slvr43	371									+	+	
	nsf58	nsr6	194	++	+						slvf20	slvr30	579			+	++					++		
	nsf58	nsr25	206	++	++		+		++		slvf18	slvr20	577			++	++	+	+			+		
	nsf24	nsr32	435	+							slvf20	slvr46	373									+		
	nsf24	nsr42	430		+						slvf18	slvr43	367									++		
	nsf50	nsr10	284							++	++	slvf18	slvr16	370	++		++	++	+	++	+	++	+	
	nsf49	nsr10	279							++	++	slvf18	slvr30	575	++		++	++				++	+	
	nsf36	nsr10	279	+			++				++	slvf18	slvr46	369	++							++	+	
	nsf24	nsr44	433									saaf67	saar6	194	++	++								
nsf24	nsr47	434									saaf65	saar6	195	++	++									
nsf54	nsr10	277	++						++	++	saaf64	saar6	193	++	++									
nsf53	nsr10	278							++	+	saaf59	saar6	195	++	+									
HC	htnf9	htnr4	245	++			+				saaf64	saar5	187		+									
	htnf71	htnr4	241	++					+		saaf67	saar5	188		+									
	htnf72	htnr4	243	++			+		++		saaf3	saar42	258	++	++	++	++							
	htnf38	htnr4	243	++			++				saaf3	saar6	432	+	++									
	htnf64	htnr4	243	++			++		+		saaf3	saar5	426		++									
	htnf37	htnr37	129		+	++	++				saaf30	saar44	371									++	++	
	htnf37	htnr39	130		+	++	++				saaf30	saar47	373						+	++		++	+	

図5 アレナウイルスdegenerateプライマーによる増幅試験



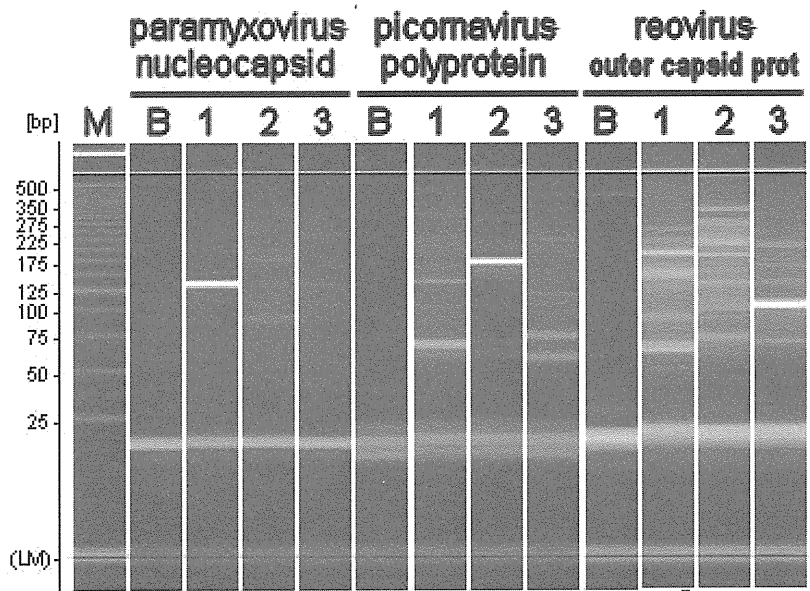
アレナウイルスL-segment, polymerase遺伝子中央部の保存領域で設計されたdegenerateプライマーによるPCR産物のマイクロチップ電気泳動像。鑄型としては、各レーンの上にウイルス種名を示し、鑄型としては人工合成された各ウイルスの該当領域のDNA断片を用いた。三角形の底辺から $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  および  $10^0$ コピーの鑄型が反応に用いられていることを示す。PCR反応にはHotStartGoTaqGreen Mixtureを用いた。プライマー濃度および温度条件は本文に示す。左端のレーンにマイクロチップ電気泳動装置が算出したマーカーの位置を示す。

図6 ハンタウイルスdegenerateプライマーによる増幅試験



ハンタウイルスM-segment, glycoprotein遺伝子中央部の保存領域で設計されたdegenerateプライマーによるPCR産物のマイクロチップ電気泳動像。鑄型としては、各レーンの上にウイルス種名を示し、鑄型としては人工合成された各ウイルスの該当領域のDNA断片を用いた。三角形の底辺から $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  および  $10^0$ コピーの鑄型が反応に用いられていることを示す。PCR反応にはHotStartGoTaqGreen Mixtureを用いた。プライマー濃度および温度条件は本文に示す。左端のレーンにマイクロチップ電気泳動装置が算出したマーカーの位置を示す。

図7 未知試料から単一バンドが得られたPCR結果(2011年度)



左端のレーンにマーカー(M)を、上部に対象ウイルスおよび遺伝子を、各レーンの上に試料番号を示す。B:水を鑄型としたバックグラウンド。

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細胞侵入機構の解析

研究分担者：谷 英樹(国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官)

研究要旨：出血熱ウイルス感染症は致死率が高く重篤な疾患を引き起こすため、ワクチン及び有効な治療法の開発が急務である。本研究では、特にアレナウイルス感染症の治療・予防法の確立のために、ラッサウイルスをはじめ各種南米アレナウイルスおよび新興アレナ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、GP の性状解析および細胞指向性、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るとともに、シュードタイプウイルス上に外套されている GP はハイマンノース型の糖鎖修飾を受けていることが明らかとなった。また、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が明らかとなった。

研究協力者：米田美佐子（東京大学医科学研究所）

A. 研究目的

ラッサ熱や各種南米出血熱は、アレナウイルス科のウイルスを起因とし、発熱、出血、多臓器不全などを誘発し、致死率の高い重篤な疾患として知られている。ラッサウイルス感染症は、主にマストミスの生息地域でもある西アフリカで主に流行し、毎年 10-30 万人が感染し、およそ 5,000 人が死亡していると推定されている。流行地以外

での輸入感染例もこれまでに全世界で 20 例を超えており、本邦においても過去に 1 例の報告があり、検査診断体制と感染患者への適切な対処法が求められる。しかしながらわが国では、ラッサ熱をはじめ各種南米出血熱は感染症法による一類感染症と定められており、これらのウイルスは一種病原体としてバイオセーフティーレベル (BSL) 4 として取り扱う必要があり、基礎研究はもとより治療薬やワクチンの開発も困難を極めている。アレナウイルス種の感染機構に関しては、取り扱いの制限される

BSL4 のウイルスであることもあり、現在までに、複製や集合・出芽などを評価できる系は確立されていない。そのため、これまで近縁のウイルスであるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、もしくは水疱性口内炎ウイルス(VSV)やレトロウイルスを利用したシュードタイプウイルスなどの代替ウイルスを用いて、主に細胞侵入機構の研究が行われている。旧世界アレナウイルスであるラッサウイルスの細胞への結合必須分子としては、これまでに細胞骨格形成に関わる  $\alpha$ ジストログリカン (DG) の関与が報告されており、同じ旧世界アレナウイルスの LCMV も同様の関与が認められている。一方、南米出血熱の原因ウイルスである新世界アレナウイルス種は、トランスフェリン受容体 1 (TfR1) を侵入受容体として用いることが報告されているが、詳細についてはまだ不明な点も多い。また、最近、新興アレナウイルスとして同定されたルジョウイルスについては受容体も含めてほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では各種アレナウイルスの GP を VSV に外套させたシュードタイプウイルスを用いて、細胞侵入機構の解析を行う。併せて、ルジョウイルスに関して GP の性状解析を行うと共に、既存受容体への関与についても検証する。

## B. 研究方法

ラッサウイルス、ルジョウイルス、フニンウイルス、チャパレウイルスのエンベロップ遺伝子をクローニングした発現プラス

ミドを作製する。併せて、Flag タグと Strep タグの 2 つを持つ FOS タグが付加したベクターにもエンベロップ遺伝子をクローニングして発現プラスミドを得る。これらを用いてシュードタイプウイルスを作製し、ウイルス粒子中の GP の取り込み量および発現細胞での糖鎖修飾に関してエンドグリコシダーゼ H を用いて検討する。また、シュードタイプウイルスを用いて各種哺乳動物細胞への感染感受性を評価する。更に pH 依存的な細胞侵入機構を解析するため、各種  $H^+$ -ATPase 阻害剤を用いてウイルス感染における pH 依存性を確認する。その他、エンドサイトーシスの詳細な機構についても各種阻害剤を用いて解析をおこなう。既存受容体の関与として、TfR1 は感染を阻害できる抗体および TfR1 を強制発現させた CHO 細胞を作製し、感染感受性を評価する。DG に関しては、DG が内在的に発現していない変異 ES 細胞に DG を強制発現させて、感染感受性を評価する。また、DG の糖鎖修飾に関わる LARGE 分子を発現させた Jurkat 細胞および Raji 細胞への感染感受性についても解析する。

GP の細胞融合能に関しては、細胞融合を T7 ポリメラーゼを発現するプラスミドと T7 プロモーター下流にルシフェラーゼを組み込んだプラスミドを用いて、リポーター活性を指標とした cell-cell fusion assay により評価する。併せて細胞融合により形成される巨細胞の有無についても顕微鏡下で観察をおこなう。さらに、細胞融合活性に関与する細胞内宿主因子についても解析す

る。

### C. 研究結果及び考察

ラッサウイルス、ルジョウイルス、フニンウイルス、チャパレウイルスのエンベロープ遺伝子をそれぞれ 293T 細胞に発現させて、既報の方法にてシュードタイプ VSV を作製し、超遠心法によりウイルスを濃縮、精製した。精製ウイルスおよび GP 発現細胞をエンドグリコシダーゼ H および PNGaseF で処理し、ウエスタンブロット法により Flag タグに対する抗体で検出した結果、今回対象とした全てのウイルス種において細胞内発現 GP および精製粒子内 GP はエンドグリコシダーゼ H に感受性を示したことからハイマンノース型の糖鎖修飾を受けているものと考えられた (図 1)。また、各種哺乳動物細胞への感染感受性を調べた結果、どのウイルス種も多くの細胞に感染出来るものの、ラッサウイルス GP のシュードタイプウイルス (LASpv) では既報通り、Jurkat 細胞には感受性を示さなかった (図 2)。また、ルジョウイルス GP のシュードタイプウイルス (LUJpv) は他種のウイルスと異なり、マウスの細胞に対してほぼ感受性を示さないことが明らかとなった。次に pH 依存的な細胞侵入を検討するため  $H^+$ -ATPase 阻害剤として知られるバフィロマイシン、塩化アンモニウム、クロロキンを用いてシュードタイプウイルスの感染性を調べたところ、コントロールとして用いたマウス白血病ウイルスエンベロープ蛋白

質を外套したシュードタイプウイルス (MLVpv) は感染性が減少しないのに対し、アレナウイルスのシュードタイプウイルスは全て濃度依存的に感染性が阻害された (図 3)。このことから、ルジョウイルスを含めアレナウイルスは pH 依存的に細胞侵入していることが明らかとなった。既存受容体の関与について、TfR1 抗体を用いて感染阻害が見られるか検討したところ、TfR1 依存的な感染が既に報告されている新世界アレナウイルス種のフニンウイルス (JUNpv) やチャパレウイルス (CHPpv) のシュードタイプウイルスでは感染阻害が認められるのに対し、LASpv や LUJpv およびコントロールの VSVpv では感染阻害が認められなかった (図 4)。また TfR1 を CHO 細胞に強制発現させた細胞株への感染感受性においても同様に JUNpv や CHPpv の感染増強が認められるのに対し、LASpv や LUJpv では感染増強が認められなかった (図 5)。このことから、ラッサウイルス同様、ルジョウイルスは TfR1 非依存的に感染することが明らかとなった。次に、DG との関与について検討するために、DG を O-マンノシル化する LARGE 分子を Jurkat 細胞および Raji 細胞に強制発現させ、感染感受性を調べたところ、O-マンノシル化した DG と結合出来る LASpv は感染性が増強するのに対し、ルジョウイルスをはじめ他のアレナウイルスシュードタイプウイルスの感染増強は認められなかった (図 6)。また、DG が内在的に発現していない変異 ES 細胞に DG を強制発現させて、感染感受性



を検討したところ同様に LASpv のみ感染増強が認められた (図 7)。このことから、他の新世界アレナウイルスと同様にルジョウイルスは DG 非依存的に感染していることが明らかとなった。

次に、GP の細胞融合能に関して cell-cell fusion assay および巨細胞の形成を検討したところ、ラッサウイルス GP は pH4 以下から、フニンウイルス、チャパレウイルス GP は pH5 以下から細胞融合能が認められるのに対し、ルジョウイルス GP では pH4 以下でも細胞融合能が認められないことが明らかとなった (図 8、9)。このことから、ルジョウイルスは他のアレナウイルスと異なり、細胞表面にはない何からの分子を介して細胞融合が誘導されていることが推測された (図 10)。

#### D. 結論

本研究により、旧世界および新世界アレナウイルス各種の細胞侵入機構を解析することができた。特に、新興アレナウイルスであるルジョウイルスの既存受容体との関わりについて、また細胞融合能についてこれまで報告されている他のアレナウイルスとは異なる新事実を明らかにすることができた。今後、ルジョウイルスのより詳細な細胞侵入機構についての解析を行い、治療・予防法の確立に繋げていくことが必要であると考えられる。

#### E. 健康危険情報

該当なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hideki Tani, Shigeru Morikawa and Yoshiharu Matsuura. Development and applications of VSV vectors based on cell tropism. *Frontiers in Virology*. (2011). 2: 272.
2. Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Viruses*. (2012). 4: 2097-2114.
3. 谷 英樹、福士秀悦、吉河智城、西條政幸、森川茂：アレナウイルス感染症 ウイルス(2013). 62: 229-238.

##### 学会発表

1. Hideki Tani, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Characterization of pseudotype VSV possessing New and Old World arenavirus envelope proteins. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Japan, 2012.
2. Hideki Tani, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Analysis of cell entry of New and Old World arenaviruses using pseudotyped viruses

bearing their envelope proteins. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012.

3. Kie Yamamoto, Koichiro Iha, Christine Bruce, Stuart D. Dowall, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Yoshiyuki Ishii, Shigeru Kyuwa, Roger Hewson, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of viral hemorrhagic fevers caused by arenaviruses. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012.
4. 谷 英樹、伊波興一朗、谷口 怜、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、森川 茂 : シュードタイプ VSV を用いたルジョウイルスの細胞侵入機構の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

5.

#### G 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

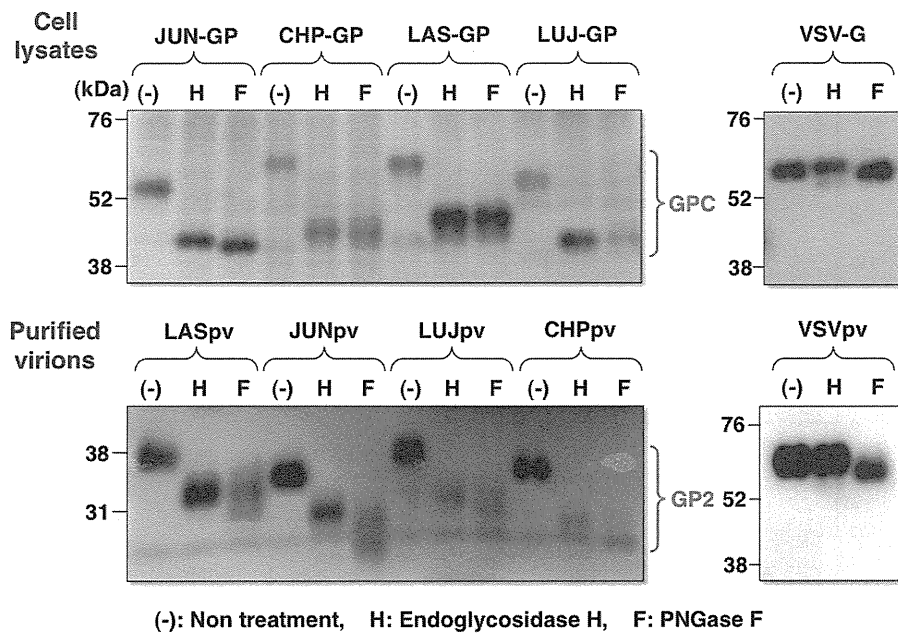


図1 アレナウイルスGPの糖鎖修飾

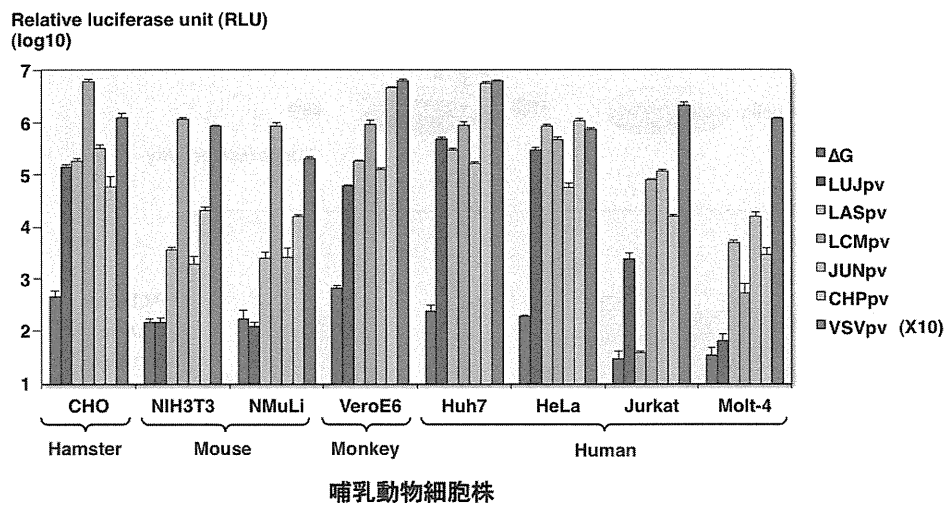


図2 シュードタイプウイルスの各種哺乳動物細胞への感染感受性

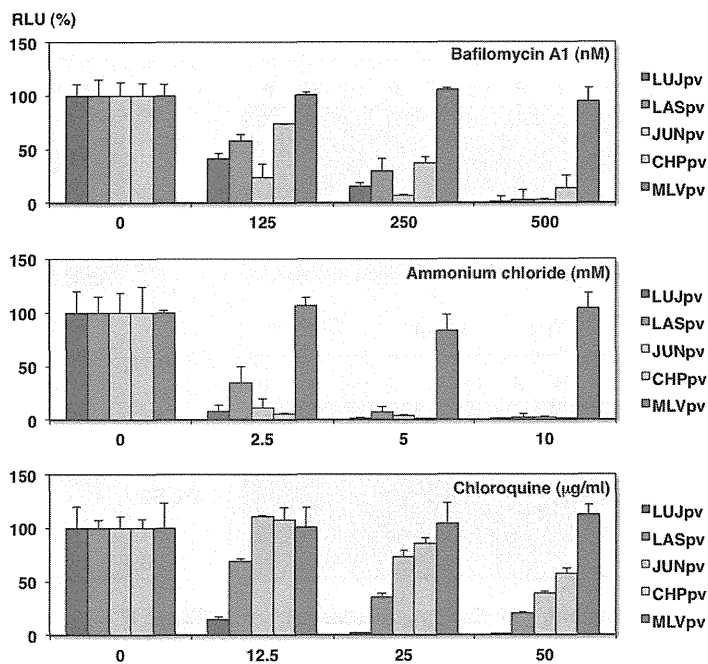


図3 エンドソーム酸性化阻害剤によるAREpvの感染阻害

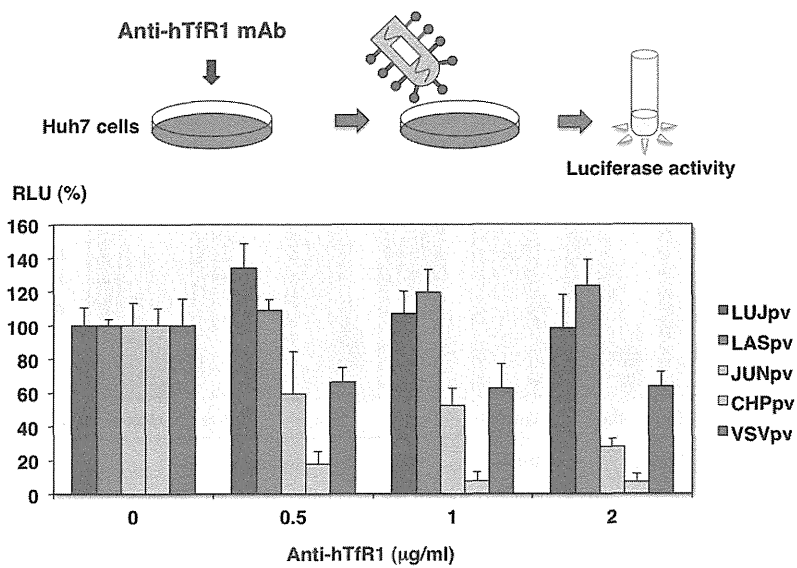


図4 トランスフェリン受容体1抗体によるAREpvの感染阻害

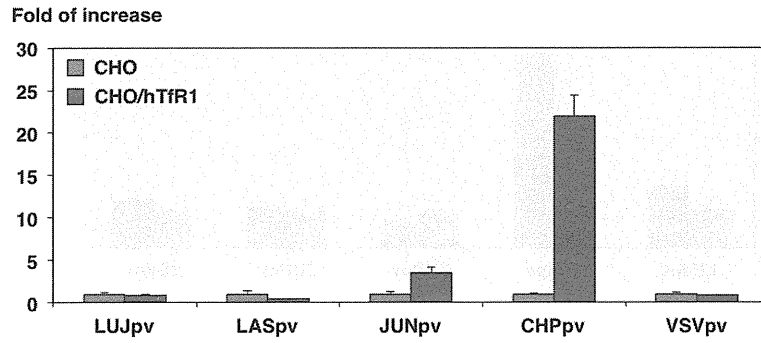
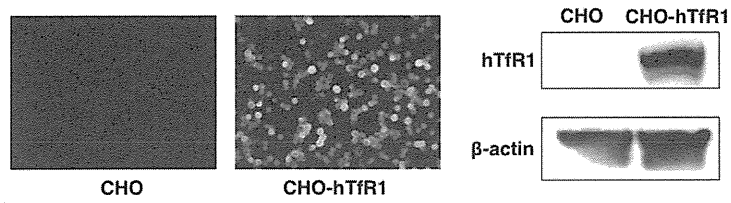


図5 hTfR1発現細胞におけるAREpvの感染感受性

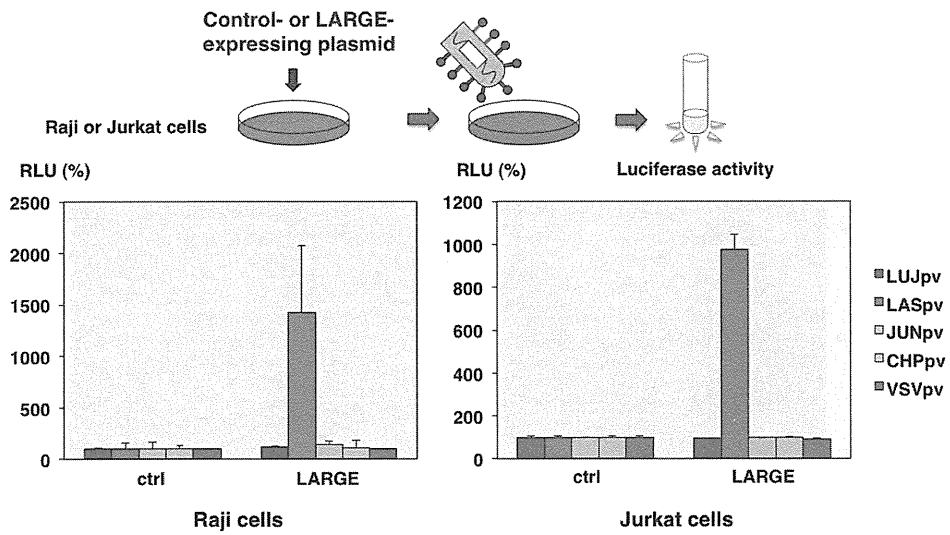


図6 LARGE強制発現細胞におけるAREpv感染感受性

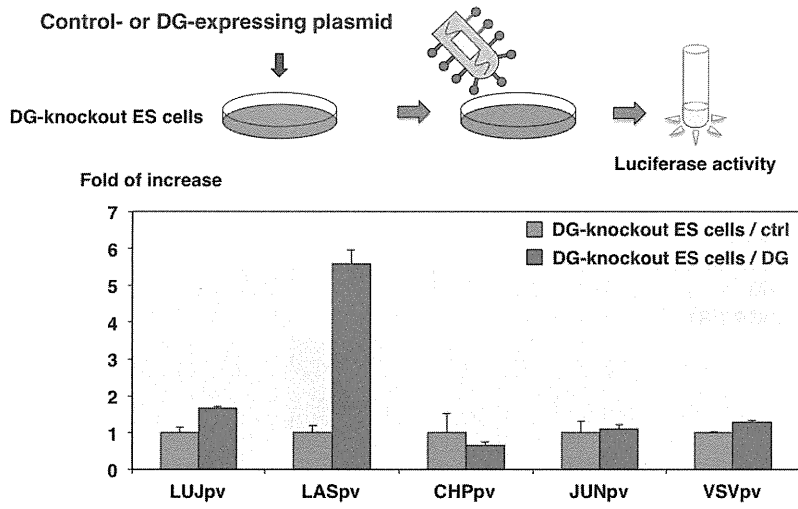


図7 DG強制発現ES細胞におけるAREpv感染感受性

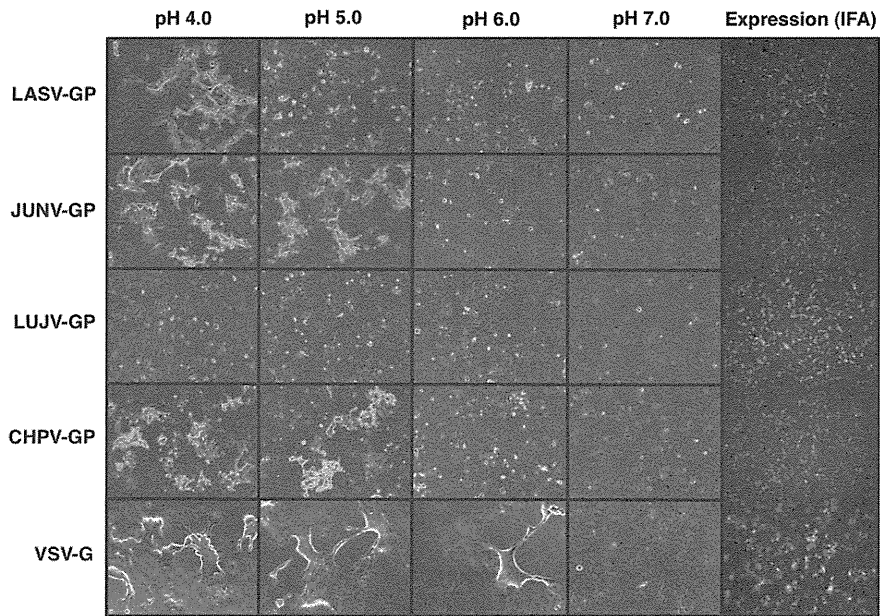


図8 アレナウイルスGPによるpH依存的な細胞融合

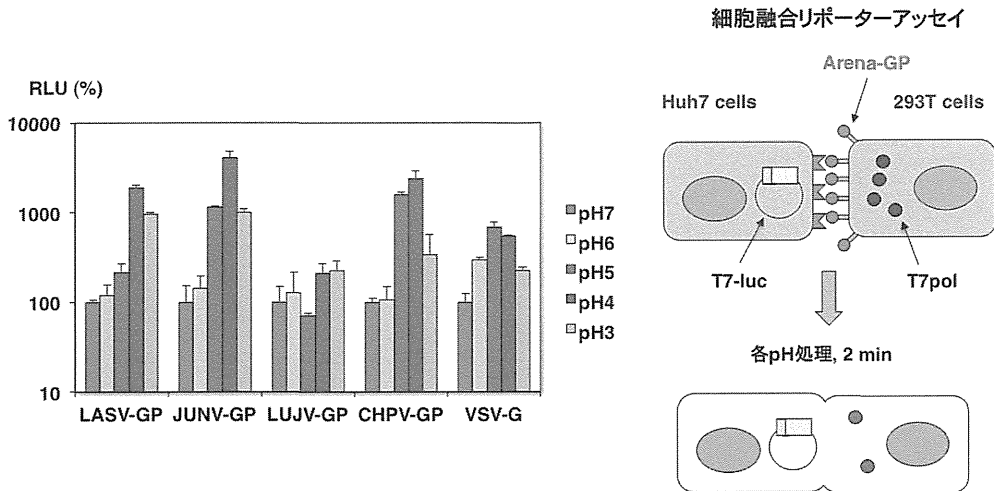


図9 アレナウイルスGPによるpH依存的な細胞融合(リポーターアッセイ)

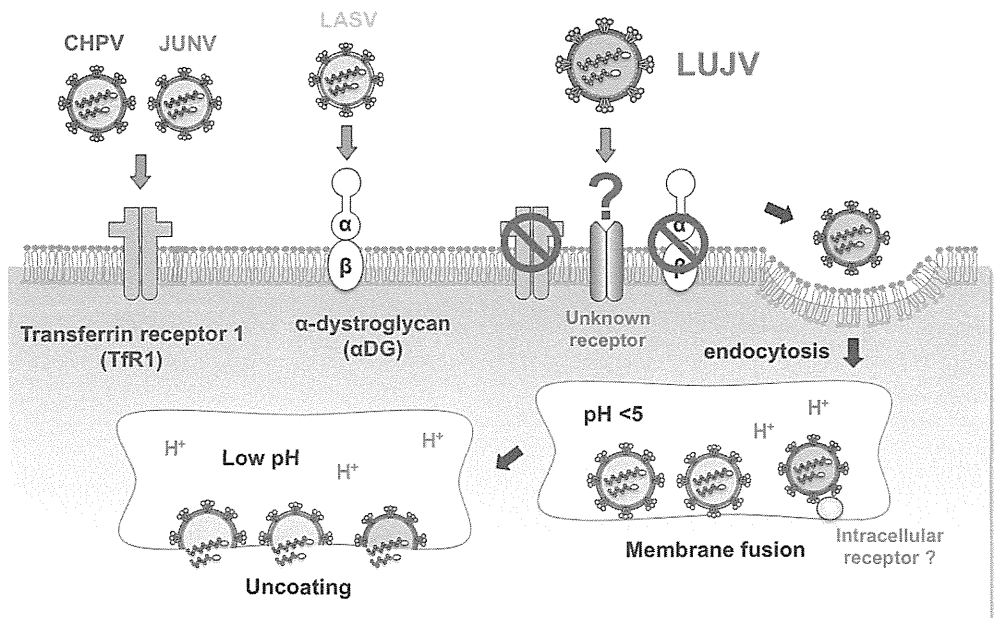


図10 ルジヨウイルスの細胞侵入機構

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表



### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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)
25. 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.
26. 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
27. 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.
28. 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.
29. Kai, C. and Yoneda, M. Henipavirus infections – An expanding zoonosis from fruit bats. *Journal of Disaster Reseach*, 6, 390-397, 2011.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
  36. 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.
  37. 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.
  38. 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.
  39. 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.
  40. 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.
  41. Takada, A. (2012) Filovirus tropism: cellular molecules for viral entry. *Front Microbiol.* 2012;3:34.
  42. Arikata, M., Itoh, Y., Okamatsu, 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.
  43. 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.
  44. Uchida, Y., Kanehira, K., Mase, M., Takemae, N., Watanabe, C., Usui, T., Fujimoto, Y., Ito, T., Igarashi, M., Ito, K., Takada, A., Sakoda, Y., Okamatsu, 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.