

201225006B

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

現在、国内で分離・同定できないウイルス性
出血熱等の診断等の対応方法に関する研究

(H22-新興-一般-006)

平成22年度～平成24年度 総合研究報告書

平成25年3月

研究代表者 森 川 茂

(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

現在、国内で分離・同定できないウイルス性 出血熱等の診断等の対応方法に関する研究

(H22-新興-一般-006)

平成22年度～平成24年度 総合研究報告書

平成25年 3 月

研究代表者 森 川 茂

(国立感染症研究所)

目 次

I. 総合研究報告書

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の診断等の 対応方法に関する研究	1
研究代表者：森川茂（国立感染症研究所獣医科学部）	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
--------------------------	----

I. 総合研究報告書

総合研究報告書

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の
診断等の対応方法に関する研究

国立感染症研究所獣医科学部長 森川 茂

研究要旨：エボラ出血熱、マールブルグ出血熱、ラッサ熱、クリミア・コンゴ出血熱、南米出血熱の原因ウイルスは特定1種病原体であり、レベル4病原体であるためBSL4施設以外ではウイルスが取扱えない。新種の出血熱ウイルスのうちブンディブギョエボラウイルス、チャパレウイルスは、感染症法の改正に伴い特定1種病原体に指定された。また、重篤な新興ウイルス感染症でも新種ウイルス（新種のフレボ、ルジヨ、ニパ、ハンタ、牛痘、LCMウイルス）の同定や、動物への感染が拡大している。これらの診断体制は、既知のウイルス種に関してはほぼ確立しているが、新種ウイルスの発見に伴い、診断法の改良や新規診断法の開発が必要である。さらに、感染宿主域を拡大しているウイルスに関しては、その疫学や宿主域拡大に係る機構と病原性に関して明らかにし、人への感染拡大のリスク評価を行う必要がある。本研究では、新種の出血熱ウイルス等の実験室診断法を確立した。また、新興するウイルス感染症に対応可能な遺伝子検出法を改良する。宿主域を拡大しているウイルスでは、その機構を解明した。また、ウイルス粒子形成とその阻害法に関する基礎研究が進展した。

A. 診断法の開発・改良と疫学的解析：ルジヨウイルス、ブンディブギョエボラウイルスの診断法の改良と開発を行った（森川、高田、西條）。ラッサウイルス遺伝子検出RT-LAMPを開発した（安田）。ニパウイルス遺伝子検出RT-Smart-Amp方を開発した（甲斐）。トガリネズミ形目などの小動物から新たにハンタウイルス遺伝子を検出した（新井）。ラット由来牛痘ウイルスの疫学を行った（森川）。ハンタウイルス血清型鑑別ELISA法、イムノクロマト法を開発した（有川）。新興ウイルス、新型ウイルス遺伝子検出法を開発した（水谷、遠藤）。

B. ウイルス学的、分子生物学的解析：ニパウイルスの霊長類感染モデル系を確立し、新たに開発したワクチン候補の有効性を証明した（甲斐）。ニパウイルスの3' UTRによる遺伝子発現制御機構の解明を試みた（甲斐）。サルのイヌジステンパーウイルス感染症流行

の原因 CDV のサルへの病原性、各種動物のレセプター指向性を明らかにした（森川）。SICD マウスでハンタウイルス肺症候群のモデル系を開発し好中球の関与を明らかにした（有川）。エボラウイルス GP が、ヒトおよび霊長類の Tetherin アンタゴニストとして機能すること、GP が Tetherin をトランスゴルジ・ネットワークに滞留させる事を明らかにした。また、南米アレナウイルスの Z 蛋白の P/SAP 配列（L ドメイン）が細胞の Tsg101 を利用して出芽することを明らかにした（安田）。新興アレナウイルスであるルジョウイルスは他のアレナウイルス種と異なり、低 pH による細胞融合活性は認められず、これまでアレナウイルスレセプターとして知られている Tlr1 や DG を利用しない細胞侵入機構を示すことが明らかとなった（谷）。

研究分担者：

甲斐知恵子（東京大学医科学研究所教授）

高田礼人（北海道大学人獣共通感染症共通感染症リサーチセンター教授）

安田二郎（長崎大学熱帯医学研究所新興感染症学分野教授）

有川二郎（北海道大学大学院医学研究科病原微生物学教授）

西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部部長）

水谷哲也（東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター教授）

遠藤大二（酪農学園大学獣医放射線学教授）

新井智（国立感染症研究所感染症情報センター主任研究官）

谷英樹（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）

A. 目的：

稼働している BSL4 がない日本では、エボラ出血熱、マールブルグ病、ラッサ熱、

クリミア・コンゴ出血熱、南米出血熱などのウイルス性出血熱等の診断体制に関しては、遺伝子検出法・抗原検出法・遺伝子組換えで作製した抗原による血清診断法を逐次整備し、患者発生に備えている。整備した検査系も、ウイルスの変異や新種ウイルスの出現の最新情報を入手し対応手段の向上を図る必要がある。この数年間に、チャパレ（ボリビア）、ルジョ（ザンビアと南ア）、ブンディブギョエボラウイルス（ウガンダ）感染症等が新興ウイルス性出血熱として新興した。また、スペインでユビナガコウモリから新種のフィロウイルス（Lloviu ウイルス）が発見された。このような新興ウイルス性出血熱の発生以外にも、ニパウイルスのバングラディッシュやインドでのヒト・ヒト感染、ブタのレストンエボラウイルス感染症、サルのモルビリウイルス感染症、欧州でのヒトや動物園動物での新種の牛痘(cowpox)ウイルス感染症の発生と流行等、これまで想定されていない宿主動物での感染が相次いでいる。ハ

ンタウイルスは、げっ歯類だけでなく、新たにトガリネズミ目の野生動物やコウモリからも検出された。このように、宿主域を拡大する可能性が指摘されているウイルスが、ヒトへ感染が拡大し致死的な新興ウイルス感染症として顕在化するか否かのリスク評価や、その病原性を予測するためには、これらのウイルスの宿主領域を拡大する分子機構を分子生物学的・ウイルス学的に解明することも必要である。さらに、流行地やウイルス分布の想定される地域での分子疫学、血清疫学的解析も、これらのリスク評価をする上で重要である。これらを明らかにするために以下の研究を実施した。

1. 診断法の開発・改良と疫学的解析

- 1) 新種のエボラウイルス (ブンディブギョエボラウイルス) と新種のアレナウイルス (アフリカのルジョウイルスと南米のチャパレウイルス) の診断法の開発・改良、ラッサウイルス N 遺伝子検出用 RT-LAMP 法の開発、ヘンドラ、ニパウイルス用 RT-Smart-Amp 法の開発
- 2) 豚のレストンエボラウイルス感染症の血清診断法の確立
- 3) 南米ハンタウイルス、トガリネズミ目ハンタウイルスの疫学的解析と診断法の開発・改良
- 4) 変異ウイルス・新種ウイルスに対応可能な遺伝子検出法の改良

- 5) 国内の齧歯類での牛痘ウイルス感染状況の疫学的解析
- 6) ナイジェリアやザンビア等でのウイルス性出血熱の血清疫学

2. 宿主域拡大や病原性獲得のメカニズムの解明と対応法の研究

- 1) サルのモルビリウイルス (CDV) のサルへの馴化と病原性獲得の分子機構
- 2) ニパウイルスの病原性の分子機構の解明、動物モデルの開発とワクチン開発
- 3) ハンタウイルスによる肺水腫発症モデル動物の開発
- 4) 出血熱ウイルスの粒子形成・出芽機構の解析とその阻害法開発の基礎研究
- 5) 新興アレナウイルスであるルジョウイルスの細胞侵入機構の解析

B. 研究方法：

1) 診断法の開発・改良と疫学的解析：

ブンディブギョを含む全てのエボラウイルスを検出可能な RT-PCR 法を確立した。血清診断法も改良して、これまでにコウモリとブタのレストンエボラウイルス抗体検出を確立した。GHSAG ラボネットのフィロウイルスワークショップがイタリアで開催されたので、これまでに開発した方法と改良型の評価をした。また、新興フィロウイルス Lloviu にも対応可能なフィロウイルス共通 RT-PCR を開発した。

アフリカで新興したルジョウイルスによる出血熱の血清診断法を開発した。また病原診断法としてウイルス抗原検出 ELISA を開発した。

ハンタウイルスでは、血清型鑑別 ELISA を開発してきたが、さらにより簡便なイムノクロマト法を開発した。

トガリネズミ目ハンタウイルスの国内、国外での疫学調査を実施し、新たなハンタウイルスを発見した。

新種ウイルス発生時や新興ウイルス感染症発生時の迅速な原因ウイルスの同定のため、これまでに開発された変異ウイルス・新種ウイルスに対応可能な遺伝子検出法を改良した。

ザンビア、アジアで動物のアレナウイルスとフィロウイルスの血清疫学調査を実施した。

ナイジェリアのヒト及び動物の各種出血熱ウイルスの疫学を実施した。

2. 宿主域拡大・病原性獲得のメカニズムの解明と対応法の研究

サルに致死性 CDV 感染症の流行初期と後期の分離ウイルスの遺伝子配列の変化の方向と quasispecies に関して次世代シーケンサーを用いて解析した。さらにこのウイルスのサルでの病原性、レセプター指向性を解析した。

ニパウイルスの霊長類感染モデル系を開発した。また、リバーシジェネティックス系によりニパウイルス G 蛋白を発現する

組換え麻疹ウイルスを作製しワクチン効果を検証した。

ハンタウイルスによる肺水腫発症モデル動物を、SCID マウスを用いて開発し発症のメカニズムを解析した。

エボラウイルス GP が、ヒトおよび霊長類の Tetherin アンタゴニストとしての機能解析と、そのメカニズムを解析した。また、南米アレナウイルスの Z 蛋白の P/SAP 配列の L ドメインとしての機能と対応する細胞因子を解析した。

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

C. 結果：

1) 実験室診断法の開発・改良と疫学的解析：

(1) エボラ、マールブルグウイルスの診断法と適用：

ブンディブギョエボラウイルスを含む既知の全てのフィロウイルスの遺伝子塩基配列を比較し、相同性の高い領域を NP 遺伝子から選択し、新たにデザインしたプライマーセットによる RT-PCR を開発した。この RT-PCR 法では、全てのエボラおよびマールブルグウイルス遺伝子を検出できた。新興したフィロウイルス Lioviu ウイルス遺伝子も本 RT-PCR は検出できた。遺伝子検出をより高感度にするために、nested PCR 用プライマーを設定した。これらを

GHSAG ラボネットのフィロウイルスワークショップで評価した結果、TaqMan PCR よりも高感度にフィロウイルス遺伝子を検出し、ウイルスの鑑別も可能であった。一方、TaqMan PCR もブンディブギョエボラウイルスに対応するために改良した結果、ブンディブギョエボラウイルス遺伝子も高感度に検出できた。

これまでに全てのフィロウイルス組換え GP を用いた鑑別 ELISA 法を開発したが、より特異度の高い抗体検査法を開発するため、既知の全てのフィロウイルスの GP を認識する抗体(MGP78)をペルオキシダーゼ標識し、血清中の抗体による競合阻害を検出する方法を開発した。

これまでに、フィリピンの養豚場でレストンエボラウイルス感染症が確認されたことを受け、NP 特異的 IF および ELISA 法、GP 特異的 IF および ELISA 法、pseudotype VSV による代替え中和法等を用いてレストンエボラウイルス流行のあった養豚施設の豚の検体で NP 及び GP 抗体が検出された。また、GP 抗原を用いた ELISA により、インドネシアのサル血清中の IgG 抗体調査を実施した結果、陽性個体が確認された。フィリピンに存在する Reston 種以外のフィロウイルス特異的抗体を保有している個体も多数認められた。

(2) アレナウイルスの診断法と適用：

ルジョウイルスを含む旧世界アレナウイルス共通 RT-PCR により、ザンビアで捕

獲したマストミスから新種のアレナウイルスが検出され感染性ウイルス（ルナウイルス）が分離された。ラッサ、ルジョ、LCM ウイルスの NP 抗原を用いた ELISA を用いて、ザンビアのげっ歯類の血清疫学調査を実施した結果、ラッサウイルス抗体陽性個体が多く認められたが、ルジョウイルス抗体陽性個体も 2 個体認められた。

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

ルジョウイルスの組換え NP を抗原とする血清診断法を開発した結果、ラッサウイルス抗体とは鑑別できた。ルジョウイルス NP に対する単クローナル抗体を用いた抗原検出 ELISA を開発した。英国の HPA との共同研究で、このうち 2 種の単クローン抗体は authentic なルジョウイルス抗原を認識しなかったが、残り 5 クローンは効率よくルジョウイルスを検出できた。

ラッサウイルス N 遺伝子検出用 RT-LAMP 法を開発した。シエラレオネ系統用、ナイジェリア北東部系統用の各 RT-LAMP を開発し高感度で迅速に遺伝子を検出できた。

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

(3) 豚のレストンエボラウイルス感染症の血清診断法の開発と評価：

血清診断法としては、IgG-ELISA として i) 部分 NP 抗原、ii) 全 NP 抗原、iii) 全 GP 抗原を用いた 3 種類を、間接蛍光抗体法用抗原としては、全 NP、全 GP を発現した HeLa 細胞塗抹標本を用いた 2 種類を、代替えウイルス中和試験としては、pseudotype VSV による中和試験法を開発した。フィリピンで流行のあった施設の豚血清と非流行地の豚血清の特異抗体を調べた結果、2008 年のレストンエボラウイルス流行のあった養豚施設の豚の多くに NP 及び GP 抗体が検出され、約 70%の豚がウイルスに感染していたことがわかった。血清診断法で抗原調整の比較的容易な部分 NP 抗原による ELISA 法のフィリピンの研究施設への技術移転も行った。

(4) ハンタウイルスの齧歯目、トガリネズミ目小動物とコウモリからの遺伝子検出：

北海道、本州、九州、沖縄地域のトガリネズミ形目小動物、中国、韓国の齧歯目、モンゴルの齧歯目、トガリネズミ形目及び翼手目、フィリピンの翼手目を対象にハンタウイルス遺伝子検出を試みた結果、北海道、本州およびモンゴルのトガリネズミ形目と中国の齧歯目小動物にこれまで未知の複数のハンタウイルス遺伝子を検出した。フィリピンの翼手目からハンタウイルス遺伝子は検出できなかった。

(5) ハンタウイルス鑑別診断法：

組換え一部欠損 NP 抗原のハンタウイルス種鑑別抗原としての有用性を ELISA で確認した。自然宿主血清および患者血清を用いて、HPS の原因ウイルスであるアンデス、シンノンブレ、ラグナネグラウイルス感染を当該 ELISA で鑑別できた。さらに、ハンタウイルス感染症では急性期に IgM、IgG が検出されることから、より簡便な血清診断法としてイムノクロマト法を開発した。このイムノクロマト法は、ELISA 同様にウイルス種を鑑別でき、さらに ELISA と同等の感度を示した。

(6) 変異や新型のウイルス出現に対応可能なウイルス遺伝子検出法：

新興ウイルス感染症発生時に迅速に病原ウイルスを同定するための遺伝子検出法を確立することを目的に、2つのアプローチで研究を行った。

ウイルスの網羅的検出法 (Rapid Determination system of Viral nucleic acid sequences; RDV 法) に加え、網羅的遺伝子検出法の対象を細菌にまで広げて原因不明疾患の診断をより確実にするために、Rapid Determination system of Bacterial DNA sequences (RDB 法) を確立し、極めて高感度であることを示した。また、新興動物ウイルスとしてネコモルビリウイルスとトリボルナウイルスの遺伝子検出系を開発し、遺伝子検出に成功した。

一方、既知のウイルス遺伝子配列情報から、より広範囲にウイルス遺伝子を検出できるプライマー設計法 CoCoMo を改良した。これまでのプライマー設計アルゴリズムを基礎として、縮重塩基数を 4 個以下に限定したプライマー設計方法を確立し、シミュレーション実験で有用性を確認した。さらにイノシシから RDV 法により検出し分離した新興ラプトウイルス（ニシムロウイルス）検出プライマーを設計し有用性が確認された。ハンタウイルスでデザインされたプライマーによりプログラムの有用性を検討した結果 10 コピーの感度で遺伝子が検出できた。

(7) 国内の齧歯類での牛痘ウイルス感染状況の疫学的解析：

牛痘ウイルス抗原を用いた IgG-ELISA と牛痘ウイルス感染細胞を用いた IFA を作製し、検疫所から分与された 2005 年から 2010 年にかけて国内で捕獲された 739 匹のラット血清（大部分がドブネズミ血清）の抗体保有状況を調べた結果、全てが陰性であった。

(8) ナイジェリアやザンビア等でのウイルス性出血熱の血清疫学：

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

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

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

2. 宿主域拡大・病原性獲得のメカニズムの解明

(1) サルの致死性 CDV 感染症の流行初期と後期の分離ウイルスの遺伝子配列の変化と分離ウイルスの病原性：

流行初期の発症サルから分離された CDV が、野生型 CDV であり実験感染でサルに全身感染症を再現できることを明らかにした。流行初期のウイルス 2 株と流行後期の分離株 2 株の遺伝子配列を比較した結果、感染初期と流行後期の分離株ではそれぞれに若干の *quasispecies* が認められ、後期のウイルス株では若干遺伝子の多様性が増してはいるがかなり遺伝的に安定であった。流行初期の CDV のレセプター指向性の解析から、ウイルスはイヌとマカク属サルの SLAM を効率よく利用したがヒト SLAM は効率よく利用できなかった。一方、ヒト、マカク属サル及びイヌの上皮系細胞レセプターである *nectin4* を効率よく利用して感染した。一方、ヒトの SLAM

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

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

ニパウイルスを腹腔内接種したアフリカミドリザルは、いずれも接種 2 日後から発熱が認められ 4 日後からは体重減少し、7 日目に死亡した。経口・経鼻接種したサルは、7 日目から発熱、体重減少が認められ、14 日後に瀕死となったがその後回復した。腹腔内接種したサルの肺、脾臓、腎臓、心臓、扁桃、腸間膜リンパ節などからウイルス RNA が検出され、病理組織学的にも多くの臓器で病変を認めた。

ワクチン候補として作製したニパウイルスの G タンパク発現組換え麻疹ウイルスを、2 回免疫したサルおよびハムスターにニパウイルスを感染させると、いずれもワクチン効果が顕著に認められた。

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

(3) ハンタウイルスによる肺水腫発症モデルの開発と発症機序：

SCID マウスへハンタウイルスを感染さ

せると、2 週で肺水腫が惹起された。SCID マウスは機能的な T および B リンパ球を欠損するが、気管支洗浄液に好中球が増加していた。そこで、好中球の表面マーカーである GR-1 抗体を SCID マウスへ投与して好中球を除去すると、肺水腫発症率が低下し、好中球の肺水腫に関する病原性発現への関与が示された。病的にこの肺水腫は炎症像を欠く点等 HPS 患者と共通しており、HPS の動物モデルとして有用である。

(4) 宿主の抗ウイルス活性因子 Tetherin の相互作用の解析：

ザイールエボラウイルスとレストンエボラウイルスのウイルス様粒子産生に対する Tetherin の活性を解析した結果、いずれもヒト、サル双方の Tetherin によって抑制された。エボラウイルスの GP は、ヒト、アフリカミドリザル、カニクイザル全ての Tetherin に対してアンタゴニストとして作用し、その活性には種特異性はなかったが、エボラ GP は Tetherin の細胞内局在を後期エンドソーム (LE) からトランスゴルジネットワーク (TGN) へ変化させることがわかった。クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに近縁なハザラウイルスでは、tetherin アンタゴニスト活性はなく IFN- α によるウイルス増殖抑制に tetherin が関与していた。

一方、南米出血熱の原因ウイルスであるフニンウイルス (アルゼンチン出血熱)、マチュポウイルス (ボリビア出血熱) のウイルス粒子出芽には、Z タンパク質内の

P/SAP 配列が L ドメインとして機能し、宿主因子として Tsg101 を利用していた。

(5) 新興アレナウイルスであるルジョウイルスの細胞侵入機構の解析：

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

D. 考察：

稼働している BSL4 がない日本では、ウイルス性出血熱等の診断体制は、遺伝子検出、抗原検出法、遺伝子組換えで作製した抗原による血清診断法を逐次整備し、患者発生に備えている。整備した検査系も、ウイルスの変異や新種ウイルスの出現の最新情報を入手し対応手段の向上を図ってきた。この数年間に新興した出血熱ウイルスには、チャパレウイルス（ボリビア）、ルジョウイルス（ザンビアと南ア）、ブンディブギョエボラウイルス（ウガンダ）等がある。このような新興ウイルス性出血熱の発生以外にも、スペインの死亡したコピナゴウモリからの新種フィロウイルスの発見、ブタのレストンエボラウイルス感

染症、サルモルビリウイルス感染症、欧州でのヒトや動物園動物での新種の牛痘ウイルス感染症の発生と流行等、これまで想定されていない宿主動物での感染が相次いでいる。また、ハンタウイルスでは新たな自然宿主としてトガリネズミ類が発見され、新種のハンタウイルスも検出できた。このように、宿主域を拡大する、あるいはその可能性が指摘されているウイルスが、ヒトへ感染が拡大し致死的な新興ウイルス感染症として顕在化するか否かのリスク評価や、病原性を予測するためには、これらのウイルスの宿主領域を拡大する分子機構を分子生物学的・ウイルス学的に解明することが必要である。さらに、流行地やウイルス分布の想定される地域での分子疫学、血清疫学的解析も、これらのリスク評価をする上で重要である。

本研究班では、「診断法の開発・改良と疫学的解析」では、1) 新種のエボラウイルスと新種のアレナウイルスの診断法の整備、2) 豚のレストンエボラウイルス感染症の診断法と感染の実態、3) 南米ハンタウイルス、食虫目ハンタウイルスの診断法の整備、4) 新興ポックスウイルス、食虫目ハンタウイルスの国内の動物の感染の実態解明、5) 変異ウイルス・新種ウイルス・新興ウイルスに対応可能な遺伝子検出法の改良等が成功裏に行われた。さらに国内のラット由来牛痘ウイルスの疫学、ナイジェリアやザンビアでの疫学にも開発された診断法が有効に利用された。

また、「宿主域拡大・病原性獲得のメカニズムの解明と対応法の研究」では、1) サルの致死性 CDV 感染症の宿主域拡大の分子機構の解明と流行時のウイルスの遺伝子変異の解明、2) ニパウイルスの病原性の分子機構の解明と霊長類発症モデルの開発とワクチン開発、3) ハンタウイルス肺症候群の SCID マウスモデルの開発と好中球の発症への関与、4) 出血熱ウイルス等の粒子形成・出芽機構の解析とその阻害法開発の基礎研究、5) 新興アレナウイルスであるルジョウイルスの細胞侵入機構などが明らかにされた。

E. 結論

「現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の診断等の対応方法に関する研究」を実施した。今年度は、対象ウイルスの遺伝子検出法、抗原検出法、抗体検出法の整備した。各種診断法等に関しては、GHSAG のワークショップや海外の BSL4 実験施設を持つ研究所等との共同研究を積極的に進めることにより可能となった。新型ウイルスや新興ウイルスに対応可能な遺伝子検出法に著しい進展が見られた。

一方、サルの CDV 感染症の流行時のウイルス変異の方向性等を明らかにした。ニパウイルス感染症では霊長類モデル開発とワクチン開発に、ハンタウイルスでは肺水腫発症モデルと発病病理に、重要な知見が得られた。

ウイルスの出芽と宿主細胞抵抗性因子との関係では、エボラウイルスの GP による Tetherin の細胞内局在の変化、南米アレナウイルス Z 蛋白の粒子出芽に重要な L ドメインの同定と関与する宿主因子 Tsg101 の同定等、今後の抗ウイルス薬開発において重要な知見が得られた。また、ルジョウイルスは遺伝的にも既知のアレナウイルスと大きく異なるが、その細胞侵入機構やレセプターも既知のアレナウイルスとは異なった。

F. 健康危険情報

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

2011 年にはスペインで死亡したユビナガコウモリから新種のフィロウイルスが発見された。ユビナガコウモリは日本にも生息する食虫コウモリである。

2011 年にはスウェーデン人が西アフリカでラッサ熱を発症し、特別機で本国へ輸送され治療された。2012 年には英国でクリミア・コンゴ出血熱の輸入症例が発生し死亡した。これらウイルス性出血熱の監視が

重要な状況であることに変わりはない。

2010年には、中国で新種のブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される新種のウイルスによる重症熱性血小板減少症候群(SFTS)が発生した。患者の致死率は約12%と高い。ウイルスはダニにより媒介されるが、特にフタトゲチマダニにより媒介される。2012年に国内でも患者が発生したことが明らかとなり、国内にも SFTS ウイルスが存在することが明らかとなっている。

G. 研究発表

各研究分担者及び「III. 研究成果の刊行に関する一覧表」に記載した。

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

II. 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, Perlroth 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.*