

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）
バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究
分担研究報告書

新興アレナウイルスに対応可能なウイルス抗原検出法の開発に関する研究

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所獣医科学部

研究要旨：ヒトに高い病原性を示すアレナウイルス（旧世界アレナウイルスのラッサウイルス、新世界アレナウイルスのフニンウイルスなど）はバイオテロに用いられる可能性のある病原体でBSL4に分類されている。最近、ザンビア、南アフリカで原因不明の出血熱症状を呈した患者から分離されたLujjo(ルジヨ)ウイルス、ザンビアでげっ歯類から分離されたLuna(ルナ)ウイルスなど、相次いで新種のアレナウイルスが報告された。このことからアレナウイルス科の未知のウイルスがまだまだ数多く存在することを示唆される。本研究では、このような新種アレナウイルスなども検出可能な手法を開発するために、アレナウイルスの高度保存領域に対する抗体を作製した。この抗体は、種々のアレナウイルスのリコンビナントタンパク質および、感染性アレナウイルスに広く交差反応性を示した。本領域を抗体作製の標的とすることは、新種、新型のアレナウイルスを漏れなく検出できる技術の確立につながると期待できる。

研究協力者：福士秀悦、吉河智城、谷英樹、谷口怜、福岡藍子、下島昌幸、西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）

A 研究目的

ヒトに高い病原性を示すアレナウイルス（旧世界アレナウイルスのラッサウイルス、新世界アレナウイルスのフニンウイルスなど）はBSL4病原体に分類され、バイオテロ・犯罪に使われるおそれのある生物剤に含まれる。最近、ザンビア、南アフリカで原因不明の出血熱症状を呈した患者から分離さ

れたLujjo(ルジヨ)ウイルス、ザンビアでげっ歯類から分離されたLuna(ルナ)ウイルスなど、相次いで新種のアレナウイルスが報告された。このことからアレナウイルス科の未知のウイルスがまだまだ数多く存在することを示唆される。このような新興アレナウイルスに対応可能なウイルス検出技術を確立することは、バイオテロ対策上、重要な課題である。アレナウイルスはウイルス株間の遺伝子変異が極めて多く、現在まで新種、新型のアレナウイルスを漏れなく検出可能なPCR法は開発されていない。ルジヨ

ウイルスは、同じ旧世界アレナウイルスであるラッサウイルスとも遺伝的、血清学的にもかなり異なるため、ウイルス発生時には同定に時間がかかっている。分離同定された新興アレナウイルスに関しては、その都度新規ウイルス検出法や血清診断法が整備されている。このため、新興アレナウイルス発生時にヒトや宿主動物の疫学的解析ができず、根本的な対応ができていない。バイオテロに新興アレナウイルスが使用されると、原因が特定できない可能性が高い。本研究では、新興アレナウイルスも検出可能な手法を開発することを目的とする。平成23年度はアレナウイルス間で広く保存されているN蛋白質領域のペプチド抗体を作製し、各種アレナウイルスのリコンビナントNPを用いて、交差反応性を明らかにした。平成24年度は、作製した抗体により、新種のアレナウイルスである、ルジョウイルス、ルナウイルスが検出できるか検討した。平成25年度は海外の感染症研究機関との共同研究によりラッサウイルスに抗原性の近縁なモペイアウイルス(MOPV)、モバラウイルス(MOBV)および、フニンウイルスの弱毒生ワクチン株であるCandid#1を入手し、作製した抗体がウイルスそのもの(Authenticウイルス抗原)に反応するか検討した。また、免疫に用いる抗原の改良を行ない、すべてのアレナウイルスを検出するための抗体作製について検討した。

B 研究方法

アレナウイルス NP の高度保存領域のペプチド合成と抗ペプチド血清の作製：

平成 23、24 年度の研究により、アレナウイルス NP の cap-binding 領域の高度保存領域である、アミノ酸 298-311 位と 311-324 位の 2 種のペプチドに対する、ウサギ抗ペプチド抗体を作製した。(図 1) 本領域はウイルス増殖における NP の機能に必須の領域であることから、未知のアレナウイルスにおいても保存されている可能性が高い。

組換えバキュロウイルスを用いた各種アレナウイルス NP 抗原の調製：

旧世界アレナウイルスのラッサウイルス(LASV)、ルジョウイルス(LUVJ)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)に加え、2011年ザンビアにおいて分離されたルナウイルス(LUNV)の組換え NP をバキュロウイルス発現システムで調製した。新世界アレナウイルスの南米出血熱の原因ウイルスであるフニンウイルス(JUNV)、ガナリトウイルス(GTOV)、サビアウイルス(SABV)、マチュポウイルス(MACV)、チャパレウイルス(CHPV)の組換え NP も同様に調製した。陰性コントロール抗原として組換え蛋白質を発現しないバキュロウイルス(P)を用いて組換え NP と同様の手法で調製した(図 2)。これらの抗原を用いて ELISA を行ない、抗体との反応性を解析した。

Authentic ウイルス抗原の調製

抗 peptide 311-324 抗体が authentic ウイルス抗原に反応するかどうか検討するため、

以下のアレナウイルスを入手し、ウイルス抗原を調製した。

モペイウイルス(MOPV):モザンビーク(1977年)、およびジンバブエ(1981年)で、野ネズミの一種(*Mastomys*)から分離されたアレナウイルス。ヒト抗体陽性例が報告されているが、このウイルスによるヒトの感染症は報告が無く、ヒトへの病原性は無いと考えられている。BSL3。

モバラウイルス(MOBV): 1983年に中央アフリカ共和国で、野ネズミ(*Praomys*と*Mastomys*)から分離されたアレナウイルス。ラッサウイルスやモペイウイルスと血清学的に交叉する。ウイルス学的性状もこれらのウイルスと類似する。BSL3。

Candid#1:弱毒化フニンウイルス(生ワクチン株)。フニンウイルスはBSL4に分類されるが、Candid#1はヒトに発病させるおそれほとんどないとして、平成25年3月7日付で病原体管理規制の対象から除外。BSL2。

LCMV WE株: LCMVプロトタイプの一つ。BSL2。

MOPV、MOBV、Candid#1をVeroE6細胞に感染(MOI=0.01)させ、4日後(モペイウイルス、モバラウイルス)あるいは、7日後(Candid#1)、感染細胞を1%NP40/PBSに懸濁し、上清を回収、ウイルス抗原とした。同様にLCMV(WE株)をVero E6に感染(MOI=0.1)させ、3日後感染細胞を1%NP40/PBSに懸濁し、上清を回収、ウイルス抗原とした。

C 結果

ペプチド抗体と各種アレナウイルス NP との反応性

ラッサウイルス NP のアミノ酸 297-311 位および、311-324 位のペプチドをウサギに免疫して得られた血清を用いて、旧世界アレナウイルスの LUNV、LASV、LUJV、LCMV、新世界アレナウイルスの南米出血熱の原因ウイルスである JUNV、GTOV、SABV、MACV、CHPV のリコンビナント NP との反応性を ELISA で調べた(図 3)。抗 peptide 297-311 抗体は ELISA で反応が弱かった。一方、抗 peptide 311-324 抗体は、LCMV-NP 以外のアレナウイルス NP に強く反応し、新種の旧世界アレナウイルスであるルナウイルスにも強く反応した。peptide 311-324 のアミノ酸配列を比較すると ${}_{311}\text{CLSGDGWPYIASRT}{}_{324}$ の 322 位の S が LCMV だけ C であることから、322 位のアミノ酸が抗 peptide 311-324 抗体との反応に重要であると考えられた(図 1)。

Authentic ウイルス抗原との反応性

平成 23,24 年度の研究はウイルス抗原としてリコンビナント NP を用いて、抗体の反応性を検討してきた。平成 25 年度はラッサウイルスに抗原性の近縁な MOPV、MOBV および、フニンウイルス弱毒生ワクチン株 Candid#1 のウイルス抗原を調製し、peptide 311-324 抗体との反応性を ELISA で検討した。MOPV、MPBV に対する陽性コントロールはウサギ抗 Luna ウイルス NP 血清を用い、Candid#1、LCMV に対する陽性コントロールとしてそれぞれのウイルスのリコンビナント NP で免疫したウサギ抗血清を用いた。peptide

311-324 抗体は、ウサギ抗血清を用いた場合よりも O.D. 値は低いが、candid#1, MOPV, MOBV に反応した (図 4)。

次に、ウイルス抗原を用いてウエスタンブロットによる peptide 311-324 抗体の反応性を検討した。ELISA と同様、candid#1, MOPV, MOBV に反応した。これらの結果はリコンビナント NP を用いた ELISA の結果と一致した。しかし、MOBV に対する反応は、Candid#1 および MOPV に比較して弱く、LCMV には全く反応しなかった。アミノ酸配列の比較から、MOBV と LCMV では本ペプチド領域のアミノ酸 322 位が Cys であることが抗体の反応性に影響していると考えられた。

アレナウイルスの GP-2 領域のペプチド

アレナウイルスの GP-2 にはすべてのアレナウイルスで保存されている領域がある (図 6)。この部分のペプチド CNYSKFWYLEHAK を合成し、これに対するウサギ抗体を作製した。これを用いてアレナウイルス抗原を検出できるか検討した。ELISA、ウエスタンブロットともにこの抗体は MOPV に強く反応し、他のウイルスにはほとんど反応しなかった (図 7)。

D 考察

現在まで、新興アレナウイルスのリコンビナントタンパク質等を用いて血清診断、病原診断法が開発されているが、旧世界、新世界アレナウイルスともを広く検出可能な抗体は無い。

本研究では、高度にアレナウイルス間で保存された領域のペプチドの抗血清を作製し、各種アレナウイルスとの反応性を解析した。抗 peptide 311-324 抗体は、リコンビナント NP を抗原とした検討では、LCMV を除く全ての出血熱原因アレナウイルス及び、2011 年に発見された新種の旧世界アレナウイルスであるルナウイルスにも強く反応した。また、Authentic ウイルス抗原を用いた検討でも、このペプチド抗体は旧世界アレナウイルスである MOPV, MOBV および、新世界アレナウイルスである Candid#1 に反応することが明らかになった。一方、GP-2 ペプチドに対する抗体は MOPV に反応したが、Candid#1, MOBV に反応しなかった。アレナウイルスを広く検出するためには、免疫に用いる GP-2 ペプチド配列の改良が必要である。LCMV に対する反応性に関して課題は残るが、NP の peptide 311-324 位を標的とした抗体は、ラッサウイルス、フニンウイルス等、バイオテロに使用される可能性があるアレナウイルスをもれなく検出できると期待できる。

今後、海外の BSL4 施設を有する感染症研究機関との共同研究により、ラッサウイルス、フニンウイルス等、アレナウイルスそのものを使った、抗体の反応性の検討を行う必要が有る。

E 結論

(1) アレナウイルスの NP に高度に保存される部位のペプチドに対する抗体 (抗 peptide 311-324 抗体) は LCMV-NP 以外の

アレナウイルスのリコンビナント NP に強く反応し、新種のアレナウイルスであるルジヨウイルス、ルナウイルスにも強く反応することが明らかになった。

(2) Authentic ウイルス抗原を用いた検討でも、抗 peptide 311-324 抗体旧世界アレナウイルスである MOPV, MOBV および、新世界アレナウイルスである Candid#1 に反応することが明らかになった。NP の本領域を標的とした抗体は、ラッサウイルス、フニンウイルス等、バイオテロに使用される可能性があるアレナウイルスをもれなく検出できると期待できる。

(3) LCMV を含むすべてのアレナウイルスに反応する抗体を作製するため、新たに GP-2 ペプチドに対する抗体を調製した。しかし Candid#1、MOBV に反応しなかったため、今後は免疫に用いる GP-2 ペプチド配列の改良が必要である。

F 研究発表

1 論文発表

- 1) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J Virol.* 87(12):7170-7175. 2013.
- 2) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T,

Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* Dec 12. 2013.

3) Arai S, Nguyen ST, Boldgiv B, Fukui D, Araki K, Dang CN, Ohdachi SD, Nguyen NX, Pham TD, Boldbaatar B, Satoh H, Yoshikawa Y, Morikawa S, Tanaka-Taya K, Yanagihara R, Oishi K. Novel Bat-borne Hantavirus, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2013 Jul;19(7):1159-61.

4) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki 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 学会発表

- 1) 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、宇田晶彦、谷口怜、福間藍子、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の確定診断に使用されるコンベンショナル PCR の評価、及びリアルタイム定量 PCR 戸の比較 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 2) 福間藍子、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、下島昌幸、森川茂、前田健、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の血清学的診断法の開発 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 3) 長谷川秀樹、亀井敏昭、高橋徹、鈴木忠樹、片野晴隆、中島典子、福士秀悦、下島昌幸、前田健、水谷哲也、森川茂、西條政幸 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群の 1 剖検例 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 4) 西條政幸、高橋徹、前田健、水谷哲也、大松勉、吉河智城、谷英樹、福士秀悦、下島昌幸、福間藍子、緒方もも子、鈴木忠樹、中島典子、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、山岸拓也、倉根一郎、森川茂 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された 11 名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 5) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、福間藍子、加来義浩、朴ウンシル、谷英樹、吉河智城、井上智、今岡浩一、下島昌幸、西條政幸、前田健 SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 6) 谷口怜、福士秀悦、Masangkay Joseoh、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 7) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、井上智、安藤秀二、前田健、西條政幸、森川茂 マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 8) 下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、福間藍子、谷口怜、前田健、高橋徹、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する ribavirin の in vitro 増殖抑制効果 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 9) 新倉綾、福士秀悦、森川茂、山田靖子 リフトバレー熱ウイルス L 蛋白のポリメラーゼ機能における C 末端領域の重要性 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 10) 福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、緒方もも子、下島昌幸、森川

茂、西條政幸 ナイジェリアにおけるリ
フトバレー熱の血清疫学 第 61 回日本
ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10
日から 12 日、神戸

11) 谷英樹、下島昌幸、福間藍子、谷口怜、
吉河智城、福土秀悦、森川茂、前田健、
高橋徹、西條政幸 重症熱性血小板減少
症候群ウイルス GP を外套したシュード
タイプ VSV の作製 第 61 回日本ウイルス
学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12
日、神戸

12) 高橋徹、前田健、亀井敏昭、水谷哲也、
下島昌幸、福土秀悦、谷英樹、吉河智城、
森川茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠
樹、永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大
石和徳、西條政幸 重症熱性血小板減少
症候群 (SFTS) の日本における初症例
第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013
年 11 月 10 日から 12 日、神戸

G 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

図 1 アレナウイルスの高度保存領域と合成ペプチド

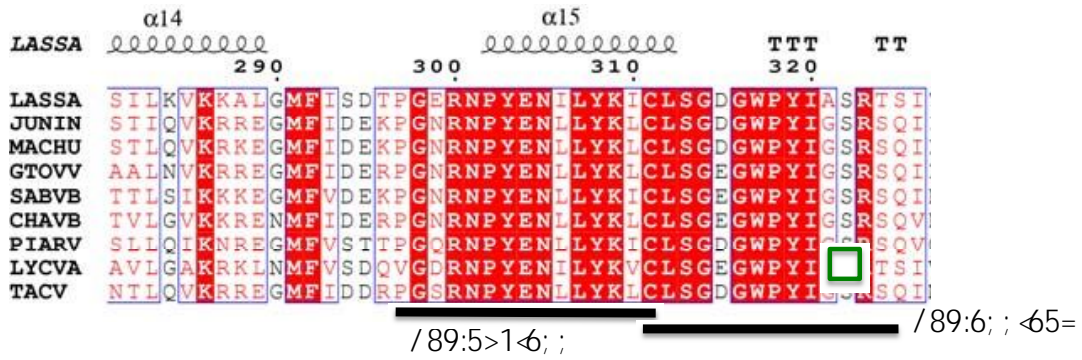


図 2 組換えバキュロウイルスを用いた各種アレナウイルス NP 抗原の調製

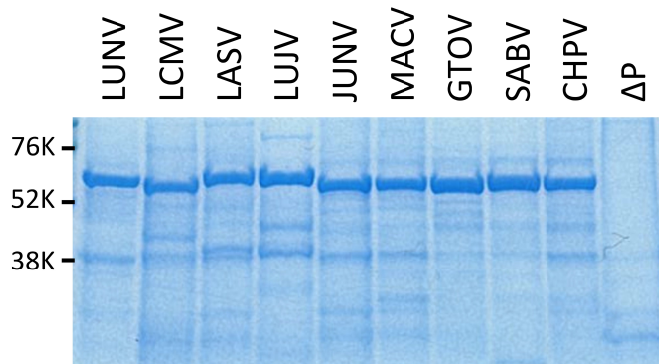


図 3) アレナウイルス高度保存領域ペプチド抗体による ELISA

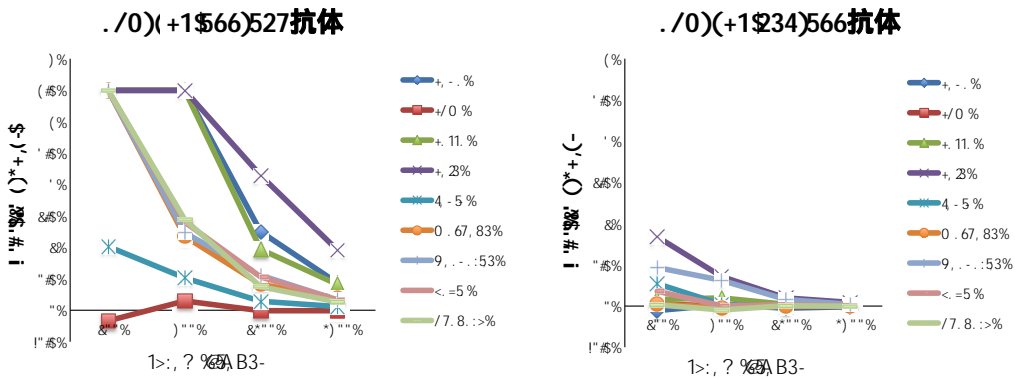


図4 ELISAによるペプチド抗体の authentic ウイルス抗原との反応

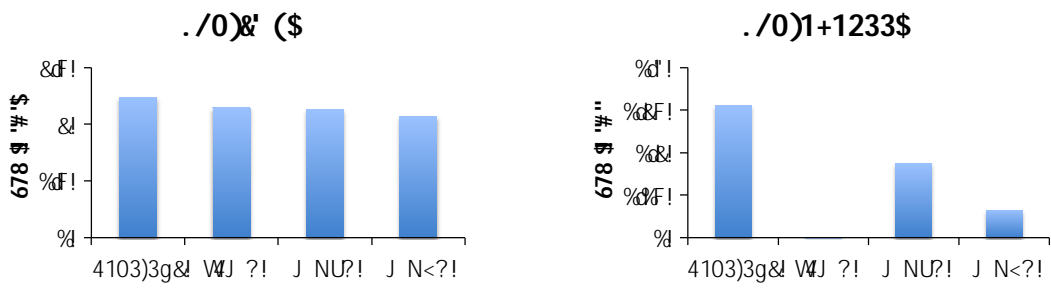


図5 ウェスタンブロッティングによるペプチド抗体の authentic ウイルス抗原との反応

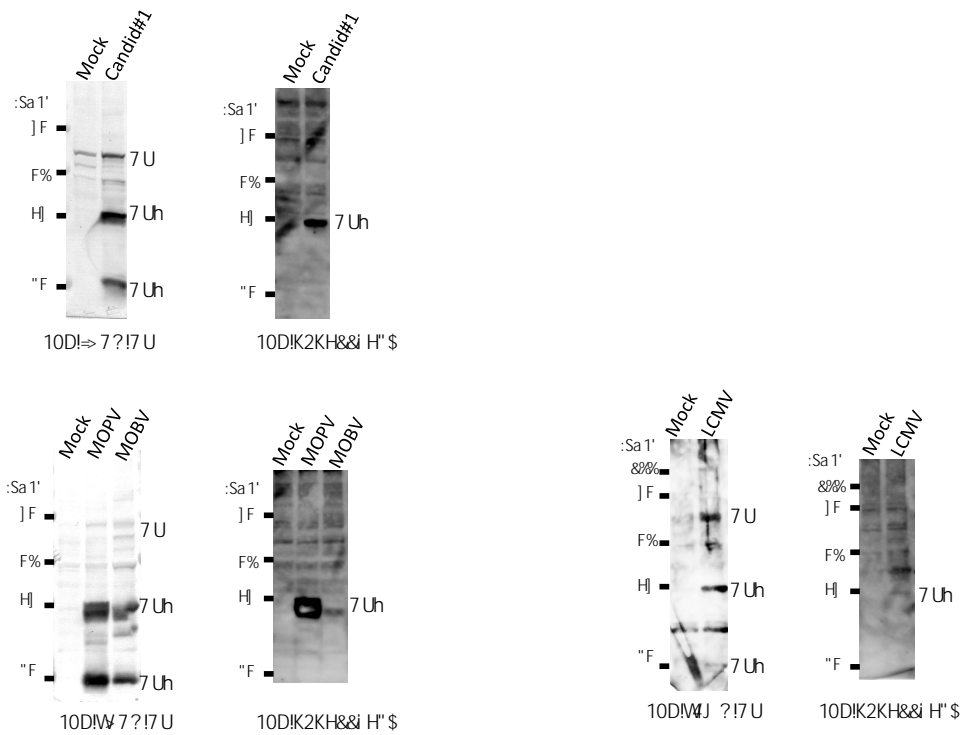


図6 アレナウイルスの GP-2 で保存されている領域

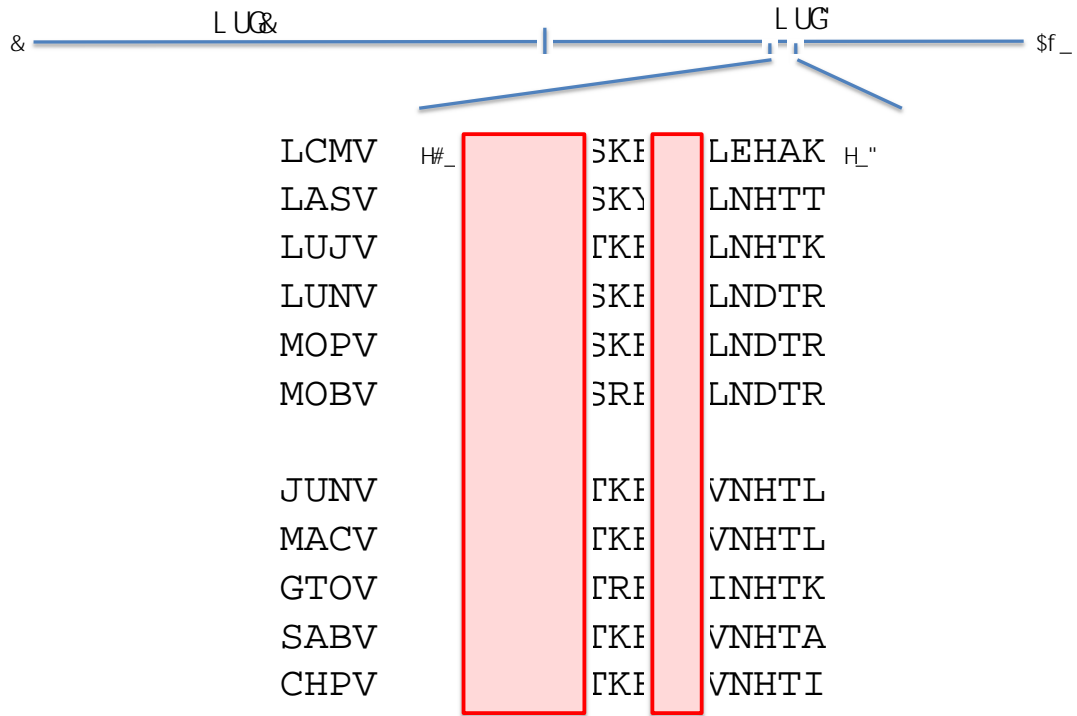


図7 アレナウイルスの GP-2 ペプチド抗体を用いた ELISA (左図) およびウエスタンブロッティング (右図)

