

201318040A

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

防疫上緊急対応を要する一類感染症や新興・再興感染症  
に対する予防・診断・治療法に関する研究

H25-新興-一般-004

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

平成 26 年 3 月

研究代表者 下島 昌幸

(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

防疫上緊急対応を要する一類感染症や新興・再興感染症  
に対する予防・診断・治療法に関する研究

H25-新興-一般-004

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

平成 26 年 3 月

研究代表者 下島 昌幸

(国立感染症研究所)

## 目 次

I. 総括研究報告書	
1. 防疫上緊急対応を要する一類感染症や新興・再興感染症に対する予防・診断・治療法に関する研究 下島 昌幸	…1
II. 分担研究報告書	
1. ウイルス性出血熱の感染機構の解析 下島 昌幸	…15
2. ハンタウイルス感染症の診断法および疫学に関する研究 有川 二郎	…23
3. フィロウィルスの疫学・診断・治療法に関する研究 高田 礼人	…27
4. 出血熱ウイルスの増殖後期過程の解析と予防・治療法開発への応用 安田 二郎	…35
5. 新型レオウイルスに関する研究 小林 剛	…41
6. ラッサウイルスに対する組換え VSV シュードタイプを用いた中和抗体測定法開発 西條 政幸	…47
7. クリミア・コンゴ出血熱のアジアでの疫学的調査に関する研究 森川 茂	…55
8. 新規コロナウイルスの診断と感染機構に関する研究 松山 州徳	…63
9. ラブドウイルスベクターを用いた出血熱ウイルス感染症に対するワクチンの開発 伊藤 睦代	…73
10. コウモリウイルスを効率的に分離するための「自然免疫系遺伝子群ノックアウトコウモリ細胞」の作出 加来 義浩	…81
11. 組換えワクシニアウイルスを用いた効果的且つ安全な LCMV/SFTSV ワクチンの開発 吉河 智城	…89
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	…95

# I. 総括研究報告書

研究代表者：下島 昌幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）

#### 研究要旨

開発等に伴う人・動物ベクターの行き来や環境変化を原因に、一類感染症や新興・再興感染症が国内で発生する可能性は十分考えられ、緊急対応を要する。本研究では、これらの感染症に対するより正確・迅速な診断法の整備や予防法・治療法の開発に取り組んでいる。各感染症がおかれた状況は様々なため取り組み方も様々であるが、本年度の研究の多くは今後の成果のための準備となっている。

フィロウイルス感染症ではエボラウイルス種も区別できる迅速診断系のための単クローン抗体の作出を行った。ハンタウイルス感染症でもウイルス種を区別できるイムノクロマトグラフィーを構築し患者血清を用いた検証を行い ELISA 法と比較した。ラッサウイルス等の出血熱ウイルスに共通して認められる機構で、広く抗ウイルス薬の標的となりうるウイルス出芽過程の詳細な研究にも取り組んだ。ヒトに呼吸器症状を引き起こす新規レオウイルスにおいては抗原・抗体検出にむけた各ウイルス蛋白質の調製や病原性・薬物スクリーニングを目指した遺伝子操作系の構築を行った。クリミア・コンゴ出血熱やラッサ熱に対しては診断により有用な代替中和抗体価測定法の構築を開始し、またクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの新たな地域（モンゴル）への拡大の有無をヒツジで調査した。MERS コロナウイルス感染症では、呼吸器ウイルスに多く見られる初期感染機構を標的とした薬物効果の検討を行った。新興感染症の原因ウイルスを持つ可能性が高いコウモリからのウイルス分離を容易にする細胞作りも開始した。出血熱・新興感染症ウイルスに対するワクチンとして、有効と考えられるウイルスベクターを用いた開発を開始した。

これらの各研究は、それぞれの感染症におけるより正確で迅速な診断、治療薬・予防法の開発に繋がるものであり、一類感染症や新興・再興感染症の国内発生時におけるより適切な対応を可能にする。

#### 研究分担者

有川二郎、高田礼人（北海道大学）； 安田二郎（長崎大学）； 小林 剛（大阪大学）  
西條政幸、森川茂、松山州徳、伊藤睦代、加来義浩、吉河智城（国立感染症研究所）

#### A. 研究目的

エボラ出血熱等の一類感染症の国内発生はラッサ熱の輸入症例1名だけであるが、毎年疑い患者の報告はある。2008年、ラッサウイルスに近縁な新規レジョウイルスの感染症がアフリカで発生した。中国ではエボラウイルスの豚での感染が報告された。一類感染症と同様に重篤な疾患となるヘニパ・ハンタウイルス感染症も新種ウイルスが見つかり分布域も拡大している。2007年、

日本においても東南アジアからの帰国者1名が呼吸器症状を示し、2例しか報告のないレオウイルスが分離された。2012年には中東で新型コロナウイルスによる肺炎が数名の患者に発生した。中国においては致死率の高い新規ブニヤウイルスによる重症熱性血小板減少症候群（SFTS）が報告された。

開発等に伴う人・動物・ベクターの行き来の増加や環境変化を原因に、このような通常見られな

い一類感染症等が今後日本で発生する可能性は十分考えられる。国立感染症研究所では診断法については構築されつつあるが、新規病原体の発見や流行地の拡大もあり、より正確で迅速な診断法の改良やより幅広い地域での疫学状況の把握が防疫上緊急に必要である。基礎研究も含めた予防法・治療法の開発も必要である。

本研究では、これらの病原体研究に携わり材料や情報の蓄積がある研究者らが協力し、実験手法やアイデア、得られた結果を共有し合いながら3年間かけて次のことに取り組む。

- 出血熱ウイルス（ハンタウイルスを含む）：ウイルス遺伝子・抗原や抗体の（迅速）検出系の確立および改良、アフリカ・アジア等における疫学調査、ウイルスの侵入・出芽機構の解析とその阻害法の探索
- 重症呼吸器ウイルス（レオウイルス、新型コロナウイルス）：ウイルス遺伝子・抗原や抗体の検出系の確立と疫学調査。遺伝子操作系の確立とウイルスの複製機構・病態発現機序の解明やワクチン開発および薬剤探索に有用な組換えウイルスの作製、組織指向性、特にプロテアーゼ感受性の解析とその阻害剤の探索
- 新型ヘニパウイルス群：ウイルス遺伝子・抗原や抗体の検出系の確立と発生国での検出系の評価
- ワクチン開発：出血熱ウイルスの蛋白質を発現するウイルスベクターの作製と動物モデルにおける検討、ワクチンとしての応用

## B. 研究方法

- 1) ウイルス性出血熱の感染初期および後期過程の解析：クリミア・コンゴ出血熱ウイルス（CCHFV）の中和抗体測定には、水疱性口内炎ウイルス（VSV）をベースにしたシュードタイプウイルスを用いた。エンベロープ蛋白質は CCHFV IbAr10200 株のものを用いた。中国新疆ウイグル自治区の CCHF 疑い患者 65 名の血清を用いた。ルジョウイルスの感染は HIV をベースにしたシ

ュードタイプウイルスを用いた。ラッサウイルス Z 蛋白質の欠損変異体あるいは置換変異体をプラスミドより細胞に発現させ、培養上清への VLP 産生をウエスタンブロットにより評価した。またミリスチル化への影響を Click-chemistry を利用し検討した。エボラウイルスの糖蛋白質 GP の C 末端に V5 タグを付加した野生型 GP1,2 及び GP1, GP2 を作製した。

- 2) ハンタウイルス感染症の診断法および疫学に関する研究：HFRS, HPS, NE (ヨーロッパでみられる HFRS)の原因となるハンタウイルスに対する抗体を検出するために、それぞれに対応する組換え抗原を三本の検出ラインとして同一ストリップに塗布する Multiplex ICG を作成した。同時に、3 種類の抗原を混合して塗布するタイプのストリップも作成した (Mix-antigen ICG)。これらを HFRS, HPS, NE 患者血清および抗体陰性者血清を用いて有用性を検討した。
- 3) フィロウイルスの疫学・診断・治療法に関する研究：プラスミドを用いて発現させた Zaire エボラウイルスのウイルス様粒子を免疫原にして、ウイルス NP 分子に対するマウス単クローン抗体を作製した。認識エピトープは合成ペプチドを作製し決定した。また NP 分子内のウイルス種特異的抗原部位を予測し、合成ペプチドをウサギに投与し抗血清を得た。
- 4) 新型レオウイルスに関する研究：PRV Miyazaki 株 RNA を逆転写し cDNA を作成後、5'、3'末端領域特異的 NBV プライマーを用いて PCR を行いコンセンサス配列の決定を行った。末端配列の決定は、Maan らの論文 (Maan et al. 2007. J Virol. Methods 143:132-9) を参考に行った。逆転写した cDNA を環状化後増幅し、次世代シーケンサーにて配列を得てアラインメントを行う方法でも塩基配列の決定を試みた。10 分節全ての cDNA を T7RNA ポリメラーゼプロモーター - D 型肝炎リボザイム間に挿入し、T7RNA ポリメラーゼ発現 L929 細胞にトランスフェクションし組換えウイルスを

産生させた。組換え sigmaC 蛋白質の発現を大腸菌で行い、マウスに免疫し特異抗体の作製も行った。バキュロウイルス発現系による major outer capsid 蛋白質および cell attachment 蛋白質の組換え発現も行った。

- 5) ラッサウイルスに対する組換え VSV シュードタイプを用いた中和抗体測定法開発:水疱性口内炎ウイルス VSV にラッサウイルスのエンベロープ蛋白質を被らせたシュードタイプウイルス(感染レポーターとしてルシフェラーゼや GFP を持つ)を中和抗体測定に、ラッサウイルス組換え NP 蛋白質を抗原にした ELISA を IgG 抗体価測定に用いた。ヒト血清はナイジェリア北部在住の方から、発熱等の診断目的に採取された血清 297 検体を用いた。
- 6) クリミア・コンゴ出血熱のアジアでの疫学的調査に関する研究:野生動物・家畜・マダニのデータからリスク評価を行ったモンゴル国内の地域(リスクが高いと評価された地域複数と低いと評価された地域)のヒツジ血清を非働化し抗 CCHFV 抗体の有無を調べた。バキュロウイルス発現系で調製した CCHFV NP 蛋白質を抗原にした ELISA および CCHFV NP 蛋白質を安定発現する HeLa 細胞を抗原にした間接蛍光抗体法を抗体測定法として用いた。
- 7) 新規コロナウイルスの診断と感染機構に関する研究:細胞は膜型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 を発現させた Vero 細胞 (Vero-TMPRSS2) および肺胞上皮細胞由来の Calu-3 細胞株を用いた。MERS-CoV は EMC strain (エラスマスメディカルセンターより入手)を用いた。ウイルスの細胞侵入は感染後 5 時間後に作られるウイルス mRNA をリアルタイム PCR 法で検出することにより定量した。
- 8) 出血熱ウイルス感染症に対するワクチンの開発:出血熱を引き起こすラッサウイルスのモデルとしてリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) を用いた。非増殖型組換え狂犬病ウイルス (P 遺

伝子が欠損)をベクターに、LCMV の主要抗原である GPC 遺伝子を発現する組換えウイルスをリバースジェネティクスにより作出した。GPC 遺伝子を挿入しなかったものも作製し、陰性コントロールとした。細胞培養痘そうワクチンであるワクシニアウイルス LC16m8 株 (もしくは LC16mO 株)もベクターとして、B5R 遺伝子領域に LCMV の蛋白質遺伝子を単独あるいは複数組み合わせで置換した。ウイルス蛋白質の発現はウエスタンブロットもしくは蛍光抗体法により検証した。ウイルスを濃縮して C57BL マウスに接種(筋肉あるいは腹腔)後、LCMV WE 株により攻撃接種(脳内)した。

- 9) コウモリウイルスを効率的に分離するための「自然免疫系遺伝子群ノックアウトコウモリ細胞」の作出:ヤエヤマオオコウモリ由来の FBTK 細胞を用い、自然免疫関連遺伝子のノックアウトを試みた。クロオオコウモリや他の哺乳動物と比較することにより、ヤエヤマオオコウモリの MyD88, MDA5, IFN $\alpha$ 2 遺伝子の配列決定とゲノム構成の推測を行った。CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウトを行った。

### C. 研究結果

- 1) ウイルス性出血熱の感染初期および後期過程の解析:CCHFV のシュードタイプウイルスの感染価は、エンベロープ蛋白質の C 末端を短くすることにより増加した。CCHF 疑い患者の中和抗体の有無は、NP 蛋白質を抗原とした ELISA での結果と比べ、特異性 100%、感度 59.1%であった。ルジョウイルスの感染性状は新世界アレナウイルスよりも旧世界アレナウイルスのものに似ており、感染は細胞表面蛋白質の Ax1, Tyro3, DC-SIGN, LSECtin により高められた。Z 欠損変異体のうち 3-10 番目のアミノ酸を欠損させた変異体は VLP 産生が著しく減少し、ミリスチル化されていなかった。この欠損部位にミリスチル化共通配列(M-G-X-X-X-S/T)を挿入したが VLP の

産生は認められなかった。V5 タグを付加したエボラウイルス GP1,2 及び GP1, GP2 蛋白質の発現は確認できた。

2) ハンタウイルス感染症の診断法および疫学に関する研究

146 検体の患者血清の内訳は HFRS 患者血清 (急性期 21, 回復期 35)、NE 患者血清 (急性期 26, 回復期 36)、HPS 患者血清 (急性期 12, 回復期 16) である。Multiplex ICG および Mix-antigen ICG とともに高い感度と特異性を示した。また、これらの ICG は ELISA と同等かそれ以上の検出限界を示した。

3) フィロウィルスの疫学・診断・治療法に関する研究：複数の抗 NP 抗体が得られ、5 つあるエボラウイルス種への反応性から、7 つのグループに分けられた。多くは認識エピトープを決定でき、いずれも NP 分子の C 末端側に位置していた。マールブルグウイルスへの反応性は認められなかった。作製したウサギ血清はウイルス種特異的な反応性を示した。

4) 新型レオウイルスに関する研究：PRV Miyazaki 株の全塩基配列の決定とリバーシジェネティクスの開発に成功した。Miyazaki 株をバックボーンとするマラッカ株ならびにネルソンベイ株 S1 遺伝子を持つ組換えウイルスの作製にも成功した。大腸菌発現の SigmaC 蛋白質で作製したマウス血清は感染細胞に対して特異的に反応した。同株の major outer capsid 蛋白質と cell attachment 蛋白質、Melaka 株および HK23629 株の cell attachment 蛋白質を発現および精製した。

5) ラッサウイルスに対する組換え VSV シュードタイプを用いた中和抗体測定法開発：IgG-ELISA では 21 検体 (7.5%) が、中和抗体測定では 53 検体 (19%) が陽性を示した。1987 年のラッサ熱患者の日本輸入例の回復期血清も中和抗体測定において陽性であった。

6) クリミア・コンゴ出血熱のアジアでの疫学的調査に関する研究：南部のゴビ砂漠辺縁には抗体陽性

のヒツジが存在し、南西域の新疆隣接地域では抗体陽性率が高かった。

7) 新規コロナウイルスの診断と感染機構に関する研究：Vero-TMPRSS2 細胞は MERS-CoV 感染後 15 時間程度で非常に大きい細胞融合を呈した。さらに、ウイルス粒子上のスパイク蛋白が感染と同時に細胞を融合させる Fusion From Without がウイルス細胞吸着後、僅か 3 時間程度で確認された。Calu-3 細胞へもよく感染し細胞膜融合を引き起こし、プロテアーゼ阻害剤 EST ではほとんど阻止されず、TMPRSS2 阻害剤カモスタットで 1/10 程度に抑える事ができた。

8) 出血熱ウイルス感染症に対するワクチンの開発：LCMV GPC 蛋白質を発現する非増殖型組換え狂犬病ウイルスが得られた。P 蛋白質発現細胞での増殖は GPC 遺伝子の挿入により若干遅くなっていた。筋肉/腹腔接種により、LCMV によるマウスの致死を軽減することができた。LCMV 蛋白質を単独あるいは複数発現する組換えワクシニアウイルスを作製した。ただし LCMV の Z 蛋白質の発現は確認できなかった。

9) コウモリウイルスを効率的に分離するための「自然免疫系遺伝子群ノックアウトコウモリ細胞」の作出：ヤエヤマオコウモリの各自然免疫関連遺伝子の部分配列を決定し、第一エクソンに存在すると考えられた。遺伝子ノックアウト細胞の作製を試みたが期待する細胞は得られなかった。

#### D. 考察

1) ウイルス性出血熱の感染初期および後期過程の解析：CCHFV の中和抗体は、用いるエンベロープ蛋白質の由来株に依存するか検討する必要がある。CCHFV およびルジョウイルスの結果はいずれも感染性ウイルスを用いた評価を行う必要がある。ラッサウイルス Z はこれまでに知られていない新たなミリスチル化配列によってそのミリスチル化が制御されていることが示唆される。

- 2) ハンタウイルス感染症の診断法および疫学に関する研究：IgM 抗体陽性で IgG 抗体が十分に上昇していない発症初期の血清についても、高い感度と特異性を示したことから、本法は感染初期迅速診断法として有用であると考えられた。現在までにヒト用 Multiplex ICG を準備できたが、現場での応用については未だ実施していない。げっ歯類でのハンタウイルスの常在が確認されている地域で試用すること目的とした準備を進める必要がある。
- 3) フィロウィルスの疫学・診断・治療法に関する研究：作製した抗体を組み合わせることによりイムノクロマトグラフィーの開発が可能となり、迅速診断法の構築に寄与すると考えられる。
- 4) 新型レオウイルスに関する研究：開発に成功した遺伝子操作系は、各ウイルス蛋白質の機能解析、病原性解析、さらには簡易な薬剤スクリーニング系の開発に極めて有用と考えられる。作製に成功した sigmaC 蛋白質は臨床サンプルからの抗体検出系の開発を行う上で有用である。抗原検出・抗体検出に向け更に実験を進める予定である。
- 5) ラッサウイルスに対する組換え VSV シュードタイプを用いた中和抗体測定法開発：IgG-ELISA に比べシュードタイプウイルスを用いた中和抗体測定法は感度が低く感染性ラッサウイルスを用いた評価の必要があるが、本研究成績はシュードタイプウイルスによる抗体検出法の診断における有用性を示唆すると考えられる。また、今回用いた血清はろ紙に含ませ乾燥させる処理を行っており、このような処理をせずに評価した血清の IgG-ELISA の結果と比べ陽性率が低いため、血清の処理法により抗体検出効率が低下する可能性がある。
- 6) クリミア・コンゴ出血熱のアジアでの疫学的調査に関する研究：CCHFV 常在地である新疆隣接地域では抗体陽性率が高い傾向があったが、新疆流行地の抗体陽性率よりは低かった。モンゴルでは CCHF 患者がこれまで報告されていないことから、ウイルス保有ダニの分布濃度は新疆の流行地と比較して低いと思われる。今後、ヒトの血清疫学、ダニの分子疫学等を行う必要がある。
- 7) 新規コロナウイルスの診断と感染機構に関する研究：Vero-TMPRSS2 細胞は MERS-CoV の良い感受性細胞であり、ウイルスの検出と分離に利用できると考えられる。また MPRSS2 阻害剤カモスタットが MERS-CoV 感染を阻止する抗ウイルス薬となる可能性がある。
- 8) 出血熱ウイルス感染症に対するワクチンの開発：非増殖型組換え狂犬病ウイルスベクターにおいては、接種ルートや摂取量、接種間隔、また免疫応答の解析を予定している。外来遺伝子（LCMV のもの）を発現する組換えワクシニアウイルスは作製できた。用いた LCMV の Z 蛋白質の抗体が適切でなかったと考えられ、変更が必要である。
- 9) コウモリウイルスを効率的に分離するための「自然免疫系遺伝子群ノックアウトコウモリ細胞」の作出：解析する細胞クローン数の増加、標的配列やプロモーター・遺伝子導入試薬の変更が必要と考えられる。
- E. 結論
- いずれの感染症においても、各感染症がおかれた状況に合わせて予防・診断・治療に関した成果が順当に出ており、来年度以降の成果に繋がっていくと考えられる。
- F. 健康危険情報
- 現時点では特になし。
- G. 研究発表
1. 論文発表
- 1) Amada T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Shimizu K, Koma T, Hayashimoto N, Gamage CD, Nishio S, Takakura A, Arikawa J. Rapid, whole blood diagnostic test for detecting anti-hantavirus antibody

- in rats. *J Virol Methods* 193(1):42-49, 2013
- 2) Takada A. Do therapeutic antibodies hold the key to an effective treatment for Ebola hemorrhagic fever? *Immunotherapy* 5(5):441-3, 2013.
  - 3) Changula K, Yoshida R, Noyori O, Marzi A, Miyamoto H, Ishijima M, Yokoyama A, Kajihara M, Feldmann H, Mweene AS, Takada A. Mapping of conserved and species-specific antibody epitopes on the Ebola virus nucleoprotein. *Virus Res* 176(1-2):83-90, 2013.
  - 4) Hoenen T, Groseth A, Callison J, Takada A, Feldmann H. A novel Ebola virus expressing luciferase allows for rapid and quantitative testing of antivirals. *Antiviral Res* 99(3):207-13, 2013.
  - 5) Noyori O, Matsuno K, Kajihara M, Nakayama E, Igarashi M, Kuroda M, Isoda N, Yoshida R, Takada A. Differential potential for envelope glycoprotein-mediated steric shielding of host cell surface proteins among filoviruses. *Virology* 446(1-2):152-61, 2013.
  - 6) Noyori O, Nakayama E, Maruyama J, Yoshida R, Takada A. Suppression of Fas-mediated apoptosis via steric shielding by filovirus glycoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 441(4):994-8, 2013.
  - 7) Maruyama J, Miyamoto H, Kajihara M, Ogawa H, Maeda K, Sakoda Y, Yoshida R, Takada A. Characterization of the envelope glycoprotein of a novel filovirus, lloviu virus. *J Virol* 88(1):99-109, 2014.
  - 8) Bukreyev AA, Chandran K, Dolnik O, Dye JM, Ebihara H, Leroy EM, Mühlberger E, Netesov SV, Patterson JL, Paweska JT, Sapphire EO, Smither SJ, Takada A, Towner JS, Volchkov VE, Warren TK, Kuhn JH. Discussions and decisions of the 2012-2014 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Filoviridae Study Group, January 2012-June 2013. *Arch Virol*, in press
  - 9) Kuhn JH, Bào Y, Bavari S, Becker S, Bradfute S, Brauburger K, Rodney Brister J, Bukreyev AA, Cai Y, Chandran K, Davey RA, Dolnik O, Dye JM, Enterlein S, Gonzalez JP, Formenty P, Freiberg AN, Hensley LE, Hoenen T, Honko AN, Ignatyev GM, Jahrling PB, Johnson KM, Klenk HD, Kobinger G, Lackemeyer MG, Leroy EM, Lever MS, Mühlberger E, Netesov SV, Olinger GG, Palacios G, Patterson JL, Paweska JT, Pitt L, Radoshitzky SR, Ryabchikova EI, Sapphire EO, Shestopalov AM, Smither SJ, Sullivan NJ, Swanepoel R, Takada A, Towner JS, van der Groen G, Volchkov VE, Volchkova VA, Wahl-Jensen V, Warren TK, Warfield KL, Weidmann M, Nichol ST. Virus nomenclature below the species level: a standardized nomenclature for filovirus strains and variants rescued from cDNA. *Arch Virol*, in press.
  - 10) Komoto S., Kawagishi T., Kobayashi T., Ikizler M., Iskarpatyoti J., Dermody T. S., and Taniguchi K. A plasmid-based reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses driven by a plasmid-encoded T7 RNA polymerase. *J. Virol. Methods* 196:36-39. (2014).
  - 11) Boehme K. W., Hammer K., Tollefson W. C., Konopka-Anstadt J. L., Kobayashi T., and Dermody T. S. Nonstructural Protein  $\sigma$ 1s Mediates Reovirus-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *J. Virol.* 87:12967-12979. (2013).
  - 12) Kato F, Ishida Y., Kawagishi T., Kobayashi T., Hishiki T., Miura T., and Igarashi T. Natural infection of cynomolgus monkeys with dengue virus occurs in epidemic cycles in the Philippines. *J. Gen. Virol.* 94:2202-2207. (2013).
  - 13) Shojima T., Hoshino S., Abe M., Yasuda J., Shogen H., Kobayashi T., and Miyazawa T. Construction and characterization of an infectious molecular clone of Koala retrovirus. *J. Virol.* 87:5081-5088. (2013).
  - 14) Fujita Y, Otsuki H., Watanabe Y., Yasui M., Kobayashi T., Miura T., and Igarashi T. Generation of a replication-competent chimeric simian-human

- immunodeficiency virus carrying env from subtype C clinical isolate through intracellular homologous recombination. *Virology* 436:100-111. (2013).
- 15) 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
  - 16) 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.* (in press)
  - 17) Yoshikawa T, Saijo M, Morikawa S. Emergence of zoonotic orthopox virus infections. In *Viral Infections and Global Change* (ed. Singh SK), pp377-387, 2014, Wiley Blackwell, New Jersey
  - 18) Uda A, Sekizuka T, Tanabayashi K, Fujita O, Kuroda M, Hotta A, Sugiura N, Sharma N, Morikawa S, Yamada A. Role of Pathogenicity Determinant Protein C (PdpC) in Determining the Virulence of the *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* SCHU. *PLoS One.* 2014 Feb 18;9(2):e89075.
  - 19) Hotta A, Fujita O, Uda A, Sharma N, Tanabayashi K, Yamamoto Y, Yamada A. and Morikawa S. In vitro Antibiotic Susceptibility of *Francisella tularensis* isolates from Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2013;66(6):534-6.
  - 20) Fujita O, Hotta A, Uda A, Yamamoto Y, Fujita H, Shinya F, Asano S, Morikawa S, Tanabayashi K, Yamada A. Identification of the source of *Francisella tularensis* infection by a multi-locus variable-number tandem repeat analysis. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2013;66(6):543-5.
  - 21) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akihiko Uda, Osamu Fujita, Toshio Mizoguchi, Junji Shindo, Chun-Ho Park, Noboru Kudo, Hitoshi Hatai, Toshifumi Oyamada, Akio Yamada, Shigeru Morikawa, and Kiyoshi Tanabayashi. Serosurveillance for *Francisella tularensis* among wild animals in Japan using a newly developed competitive ELISA. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, in press
  - 22) 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.
  - 23) Sunohara M, Morikawa S, Fuse A, Sato I. Role of promoter element in c-mpl gene expression induced by TPO. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2013;89(4):131-5.
  - 24) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki T, 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
  - 25) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Shigeru Morikawa, Akio Yamada, Kiyoshi Tanabayashi. 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
- 26) Shirato K, Kawase M, Matsuyama S. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection mediated by the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol*. 2013 Dec;87(23):12552-61.
- 27) Takayama-Ito M, Nakamichi K, Kinoshita H, Kakiuchi S, Kurane I, Saijo M, Lim CK. A sensitive in vitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines. *Biologicals* 42:42-7, 2014
- 28) Kakiuchi S, Nonoyama S, Wakamatsu H, Kogawa K, Wang L, Kinoshita-Yamaguchi H, Takayama-Ito M, Lim CK, Inoue N, Mizuguchi M, Igarashi T, Saijo M. Neonatal herpes encephalitis caused by a virologically confirmed acyclovir-resistant herpes simplex virus 1 strain. *J Clin Microbiol*. 2013; 51 (1) :356-9.
- 29) Wang LX, Takayama-Ito M, Kinoshita-Yamaguchi H, Kakiuchi S, Suzutani T, Nakamichi K, Lim CK, Kurane I, Saijo M. Characterization of DNA polymerase-associated acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1: mutations, sensitivity to antiviral compounds, neurovirulence, and in-vivo sensitivity to treatment. *Jpn J Infect Dis*. 2013; 66 (5) :404-10.
2. 日本語総説等
- 1) 梶原 将大、小川 寛人、高田 礼人 (2013) フィロウィルスの生態、*実験医学* 31(19):3054-3060.
3. 学会発表
- 1) 須田遊人、谷英樹、西條政幸、堀本泰介、下島昌幸、シュードタイプウイルスのクリミア・コンゴ出血熱ウイルス中和抗体価測定への応用、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸
- 2) 須田遊人、谷英樹、下島昌幸、堀本泰介、西條政幸、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスのシュードタイプを用いた中和抗体価測定系の構築、第 156 回日本獣医学会、2013 年 9 月、岐阜
- 3) Arikawa J, Amada T, Yoshimatsu K, Hayashimoto N, Koma T, Shimizu K, Gamage CD, Shiokawa K, Nishio S, Ahlm C, Takakura A : Development of an Immunochromatography Strip Test for Detecting Anti-hantavirus Antibody in Rodent and Human Sera by Using an N-terminal Common Antigenic Site of Hantavirus N protein. IX International Conference on HFRS HPS & Hantaviruses, Beijing, China (2013.06)
- 4) Arikawa J, Koma T, Yoshimatsu K, Nagata N, Sato Y, Shimizu K, Amada T, Nishio S, Hasegawa H : Role of Neutrophils in the Induction of Pulmonary Edema during Hantavirus Infection in C.B-17Scid Mice. 15th International Negative Strand Virus Meeting, Granada, Spain (2013.06)
- 5) 有川二郎 : 実験用ラットを感染源とする腎症候性出血熱(HFRS)の実験室型流行から学ぶ事. 第 13 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会、札幌 (2013.09)
- 6) 吉田玲子、Katendi Changula、野依修、Andrea Marzi、宮本洋子、石島麻理、Heinz Feldmann、Aaron S. Mweene、高田礼人、エボラウイルス核タンパク質のエピトープ解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日、神戸
- 7) 丸山隼輝、前田健、小川寛人、迫田義博、高田礼人、Lloviu virus の表面糖タンパク質 GP の性状解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日、神戸
- 8) 黒田誠、藤倉大輔、野依修、中山絵里、梶原将大、丸山隼輝、宮本洋子、吉田玲子、高田礼人、TIM-1 の多型が及ぼすフィロウィルス

- の細胞感受性に対する影響、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日、神戸
- 9) 野依修、中山絵里、丸山隼輝、吉田玲子、高田礼人、フィロウイルス糖蛋白質によるアポトーシスシグナル阻害作用、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日、神戸
- 10) Reiko Yoshida, Andrea Marzi, Yasuhiko Suzuki, Manabu Igarashi, Friederike Feldmann, Douglas Brining, Heinz Feldmann, and Ayato Takada. Protective Efficacy of Neutralizing Monoclonal Antibodies in a Nonhuman Primate Model of Ebola Hemorrhagic Fever. Fifteenth International Conference on Negative Strand Viruses, June 20, 2013, Granada, Spain.
- 11) Masahiro Kajihara, Andrea Marzi, Eri Nakayama, Takeshi Noda, Manabu Igarashi, Makoto Kuroda, Rashid Manzoor, Keita Matsuno, Heinz Feldmann, Reiko Yoshida, Yoshihiro Kawaoka, and Ayato Takada. Antibody-mediated inhibition of Marburg virus budding. Fifteenth International Conference on Negative Strand Viruses, June 20, 2013, Granada, Spain.
- 12) Shuzo Urata and Jiro Yasuda : The impact of GPC and N-terminal region of Lassa virus Z on virus-like particle release、XV international Conference on Negative Strand Viruses、Granada、Spain、16-21 June 2013
- 13) 浦田秀造、安田二郎：ラッサウイルスの粒子形成・出芽解析、第 54 回日本熱帯医学会大会、長崎、2013 年 10 月 4 日-5 日
- 14) 浦田秀造、安田二郎：アレナウイルスの粒子形成・出芽解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10 日-12 日
- 15) 小林剛「Identification and characterization of a new fusogenic orthoreovirus from a patient with acute respiratory infection」新興・再興感染症に関するアジア・アフリカリサーチフォーラム 2014、仙台市（2014 年 1 月 20～22 日）
- 16) 小林剛「Identification and characterization of a new fusogenic orthoreovirus from a patient with acute respiratory infection」日本・タイ感染症共同研究センターセミナー、タイ バンコク市（2013 年 11 月 15 日）
- 17) 川岸崇裕、金井祐太、岡本徹、松浦善治、小林剛「哺乳類オルソレオウイルスの腫瘍細胞溶解能の検討と遺伝子操作系の確立」第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸市（2013 年 11 月 10～12 日）
- 18) 金井祐太、川岸崇裕、松浦善治、小林剛「レポーター遺伝子発現オルソレオウイルスの構築」第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸市（2013 年 11 月 10～12 日）
- 19) 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 との比較. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10-12 日、神戸
- 20) 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 10-12 日、神戸
- 21) 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 10-12 日、神戸
- 22) 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 10-12 日, 神戸
- 23) 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 10-12 日, 神戸
- 24) 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 10-12 日, 神戸
- 25) 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 10-12 日, 神戸
- 26) 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 10-12 日, 神戸
- 27) 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 10-12 日, 神戸
- 28) 谷英樹, 下島昌幸, 福間藍子, 谷口怜, 吉河智城, 福士秀悦, 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 10-12 日, 神戸
- 29) 高橋徹, 前田健, 亀井敏昭, 水谷哲也, 下島昌幸, 福士秀悦, 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 10-12 日, 神戸
- 30) 伊藤 (高山) 睦代: 狂犬病ワクチン検定における試験管内不活化試験法の開発, 第 23 回感染研シンポジウム, 2013 年 5 月
- 31) 垣内五月, 王麗欣, 伊藤 (高山) 睦代, 林昌宏, 辻正徳, 谷口修一, 西村秀和, 岡明, 水口雅, 西條政幸: 造血幹細胞移植患者におけるアシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス 1 型についての検討, 第 23 回抗ウイルス療法研究会総会, 東京, 2013 年 6 月
- 32) 垣内五月, 佐藤正明, 伊藤 (高山) 睦代, 林昌宏, 蒲ひかり, 東裕哉, 大澤由記子, 木村聡, 津川潤, 坪井義夫, 水口雅, 岡明, 西條政幸: ヘルペス脳炎を起因した単純ヘルペスウイルス 1 型のアシクロビル感受性の検討, 第 45 回小児感染症学会総会・学術集会, 札幌, 2013 年 10 月
- 33) 伊藤 (高山) 睦代, 林昌宏, 森本金次郎, 垣内五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, 西條政幸: ラッサウイルスなどのアレナウイルスに対する非増殖型組換え狂犬病ウイルスワクチンの開発, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月
- 34) 山口幸恵, 林昌宏, 伊藤 (高山) 睦代, 垣内五月, 田島茂, 高崎智彦, 倉根一郎, 渡邊治雄, 西條政幸: 日本脳炎ウイルスの神経侵襲性を決定する宿主側因子の解析, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月

- 35) 垣内五月、王麗欣、伊藤（高山）睦代、林昌宏、西村秀一、辻正徳、谷口秀一、水口雅、岡明、西條政幸：造血幹細胞移植におけるアシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス 1 型感染症の臨床的意義に関する研究，第 61 回日本ウイルス学会学術集会，神戸，2013 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

現時点では予定なし。

## II. 分担研究報告

防疫上緊急対応を要する一類感染症や新興・再興感染症に対する予防・診断・治療法に関する研究

— 分担研究報告書 —

分担研究課題：ウイルス性出血熱の感染機構の解析

分担研究者：下島 昌幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨

クリミア・コンゴ出血熱はアフリカ、東欧、中東、中国、ロシアなど最も広範囲に認められる一類感染症で、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスによって引き起こされる。本ウイルスの糖蛋白質のシュードタイプウイルスを用いた代替中和抗体測定法の確立を行った。核蛋白質に対する抗体の有無と高い相関を示す結果が得られ、血清診断の1つとして有効なものと考えられた。

新興感染症の1つとして、2008年にザンビア - 南アにおいてルジョウイルスの感染による出血熱が発生し、5人が罹患し4人が死亡した。本ウイルスの糖蛋白質の性状を近縁のウイルスのものと比較した結果、旧世界アレナウイルスに似た性状を有することが判明した。

近年、東南アジア等ではコウモリ由来のネルソンペイオルソレオウイルスに関連したウイルスによる新興の呼吸器感染症が複数認められている。2007年にはインドネシアから帰国した日本人が呼吸器症状を示し、新規ネルソンペイオルソレオウイルス（Miyazaki-Bali/2007株）が分離されている。本株の全塩基配列を決定した。本ウイルスの検出と識別のため、2種の蛋白質を選びバキュロウイルス発現系で組換え蛋白質として発現させた。

A. 研究目的

クリミア・コンゴ出血熱はアフリカ、東欧、中東、中国、ロシアなど最も広範囲に認められる一類感染症で、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス（CCHFウイルス）によって引き起こされる。血清診断で抗体を検出する方法は複数知られているが、その中で中和抗体の検出は高い特異性を有するため原因ウイルスの特定に非常に有効であり、国内での疑い患者発生時における診断に有益である。しかし中和抗体の検出にはCCHFウイルス（一種病原体）の取り扱いが必要で、我が国では現在BSL4施設が稼働していないため、実際にはCCHFウイルスに対する中和抗体を国内で測定することはできない。一方、ウイルスの糖蛋白質を外套させたシュードタイプウイルス（水疱性口炎ウイルス（VSV）ベースのもの等）

は比較的安全性が高く、たとえ糖蛋白質の由来が一種病原体のウイルスであってもBSL2施設等で取り扱うことが出来る。そこでCCHFウイルスの中和抗体の測定として、CCHFウイルスの糖蛋白質を外套させたVSVシュードタイプウイルスに対する中和抗体の測定が代替とならないか検討した。

2008年9月、ザンビアで出血熱症状を示した患者1名が南アフリカ共和国に運ばれ、関わった医療関係者など計4名が類似の症状を示した。5名中4名が死亡している。患者からはアレナウイルス科に属する新規ウイルス（ルジョウイルス）が分離され、新興感染症であることが判明した。アレナウイルス科は二十数種のウイルスから構成され、旧世界アレナウイルスグループと新世界アレナウイルスグループに分けられるが、ゲノ

ム情報レベルではルジヨウイルスがいずれに分類されるか明確ではない。そこでヒト免疫不全ウイルス (HIV) ベースのシュードタイプウイルスを用い、ルジヨウイルスの糖蛋白質の性状を旧世界・新世界のウイルスのものと比較した。

ネルソンペイオルソレオウイルス (NBV) グループ (あるいは Pteropine Orthoreovirus) はマレーシアやオーストラリア等に住むオオコウモリから分離されるレオウイルスから構成されるが、近年は発熱および呼吸器症状を示す現地の住人もしくは旅行者からも同ウイルスが見つかり、新興感染症の 1 つとなっている。2007 年、インドネシアを訪問した日本人が帰国後同様の症状を示し、NBV (Miyazaki-Bali/2007 株) が分離されている。NBV 全般の検出と株の識別のため、全塩基配列を決定と抗原もしくは抗体検出用の組換え蛋白質発現を行った。

## B. 研究方法

### B-1. CCHF ウイルス

IbAr10200 株の糖蛋白質 GP の cDNA を蛋白質発現用プラスミドにクローニングした。GP 蛋白質の C 末端の細胞内領域は 63 アミノ酸の長さがあるが、この部分を 44, 24, 10, 1 アミノ酸の長さに短くしたのもクローニングした。VSV ベースのシュードタイプウイルスでレポーターが GFP のものもしくはルシフェラーゼのものを用い、Takada et al., PNAS, 1999 の方法に従い CCHF ウイルスの GP を外套させたシュードタイプウイルスを作製した。アフリカミドリザル由来の Vero E6 細胞を感染標的とし、感染の検出は蛍光顕微鏡 (レポーターが GFP の場合) もしくはルミノメーター (レポーターがルシフェラーゼの場合) で行った。検体として中国新疆ウイグル自治区の CCHF 疑い患者 65 名の血清を用いた。CCHF ウイルスの NP 蛋白質を抗原とした ELISA で内 22 名が抗 NP 抗体陽性と判定されたものである (Saijo et al., JMV, 2005、感染研内

倫理委員会にて承認済み)。検体とシュードタイプウイルスを混合後、標的細胞に感染させた。カットオフ値は ROC 解析にて高い特異性と高い感度が得られるよう設定した。

### B-2. ルジヨウイルス

糖蛋白質 GPC の cDNA を蛋白質発現用プラスミドにクローニングした。Venus をレポーター蛋白質とする HIV ベースのシュードタイプウイルスを Shimojima et al., JID, 2007 に従い作製した。感染標的としてヒト由来 Huh7 細胞・Jurkat 細胞を用いた。他のアレナウイルス (ラッサウイルス、フニンウイルス、チャパレウイルス、サビアウイルス) の糖蛋白質に対しても同様にシュードタイプウイルスを作製し用いた。

### B-3. ネルソンペイオルソレオウイルス

Miyazaki-Bali/2007 株をヒト由来 293T 細胞に感染させ、凍結融解・RNase 処理・DNA 除去を行った後に RNA を精製した。RNA の 3'末端にリンカーを付加し cDNA に逆転写後、RNase H にて 1 本鎖 DNA とした。環状化と増幅を行い、次世代シーケンサー (454 FLX) にて配列を得てアラインメントを行った。得られた塩基配列をアミノ酸配列に変換し、NBV グループの株間での比較を行った。保存されている蛋白質とそうでない蛋白質をバキュロウイルス発現系で組換え蛋白質として発現を行った。

## C. 研究結果

### C-1. CCHF ウイルス

GP を全長のまま用いた場合のシュードタイプウイルスの感染価は低く、中和抗体の評価に用いられるとは考えにくかった。一方、GP の細胞質内領域を短くして用いた場合の感染価は高くなり、10 アミノ酸の長さにしたもの (GPdel10) が最も高い感染価を示した (図 1)。この感染は NH<sub>4</sub>Cl 処理・M $\beta$ CD 処理で阻害され、野生型の CCHF ウイルスの感染性状 (Simon et al., JGV, 2009) と一致するものであった (図 2)。よって

この GPdel10 を外套させた VSV ベースのシュードタイプウイルスを中和抗体の測定に用いた。CCHF 疑い患者の血清を FCS2%含 DMEM で 20 倍希釈しシュードタイプウイルスと混合、Vero E6 細胞に感染させたところ、いくつかの検体ではシュードタイプウイルスの感染が低くなっていた (図 3 上)。カットオフ値は NP 蛋白質を抗原とした ELISA での結果と合わせて ROC 解析を行い (図 3 左)、シュードタイプウイルスの感染が血清非存在下の値の 39%を下回った場合に感染阻害と判定した。感染阻害は特異性 100%、感度 59.1%であった (図 3 右)。

### C-2. ルジョウイルス

ルジョウイルス GP と他 4 つのアレナウイルス GP のシュードタイプウイルスの 2 種類の細胞 (Huh7 細胞および Jurkat 細胞) における感染価は図 4 のようであった。感染価の Huh7 細胞/Jurkat 細胞の比は旧世界アレナウイルスのラッサウイルスの場合で 200 と最も高く、新世界アレナウイルスのフニン、チャパレ、サビアウイルスでは 11~18 と低値であった。ルジョウイルスの比は 91 であった。次にこれらのシュードタイプウイルスの感染価を Jurkat 細胞 (コントロール細胞と、Axl 発現・Tyro3 発現・DC-SIGN 発現・LSEctin 発現の Jurkat 細胞) で算出した。ラッサウイルスの場合、コントロール細胞での感染価と比べ、Axl 発現・Tyro3 発現でより高い値を示し、DC-SIGN 発現・LSEctin 発現ではもっと高い値を示し (図 5)、Shimajima et al., JV, 2012 と一致した。フニン、チャパレ、サビアウイルスの場合、Axl 発現・Tyro3 発現の効果はなく、DC-SIGN 発現・LSEctin 発現で高い値を示した。ルジョウイルスはラッサウイルスと同様のパターンを示した (図 5)。

### C-3. ネルソンベイオルソレオウイルス

Miyazaki-Bali/2007 株の全塩基配列を決定した。NBV グループの 9 株間で各蛋白質のアミノ酸配列を比較したところ、major outer capsid 蛋

白質で高い相同性が、cell attachment 蛋白質で低い相同性が認められた (図 6)。NBV グループ全般のウイルス (やその抗体) の検出には major outer capsid 蛋白質が、NBV グループ内の株 (やその抗体) の識別には cell attachment 蛋白質が適していると考えられた。Miyazaki-Bali/2007 株の major outer capsid 蛋白質 cDNA、Miyazaki-Bali/2007 株、Melaka 株、HK23629 株の cell attachment 蛋白質 cDNA (後者の 2 株については人工合成) をバキュロウイルスにポリヒスチデンタグを付加して組み込み、SDS-PAGE および Western Blot にて発現および精製を確認した。

### D. 考察

CCHF ウイルスの中和抗体測定では高い特異性が見られたものの感度は高くない可能性があり、原因として、1:用いた GP の由来株が適切でなかった、2:抗 NP 抗体があっても抗 GP 抗体がない (少ない)、ことが考えられ、今後の検討事項である。また、同じ血清の野生型 CCHF ウイルスに対する中和抗体を測定することで、シュードタイプを用いた今回の方法の適切さを評価する必要がある。

ルジョウイルスの感染が旧世界アレナウイルスのラッサウイルスの感染と似ていることが判明したが、一方で旧世界アレナウイルスに認められるジストログリカンの受容体としての利用はルジョウイルスでは認められないという報告がある。ルジョウイルスには旧世界アレナウイルスに認められない感染機構もあると考えられる。

NBV の研究では組換え蛋白質の発現と精製が確認できたので、抗体作製に取り掛かる。株の識別もできる NBV の抗原検出系および抗体検出系が構築できると期待される。

### E. 結論

シュードタイプウイルスを用いた CCHF ウイ

ルスの中和抗体測定系の構築を行った。

ルジョウウイルスの感染機構が旧世界アレナウイルスと似ていることが判明した。

NBV の Miyazaki-Bali/2007 株の全塩基配列の決定と組換え蛋白質の発現・精製を行った。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

### 2. 学会発表

- 1) 須田遊人、谷英樹、西條政幸、堀本泰介、下島昌幸、シュードタイプウイルスのクリミ

ア・コンゴ出血熱ウイルス中和抗体価測定への応用、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸

- 2) 須田遊人、谷英樹、下島昌幸、堀本泰介、西條政幸、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスのシュードタイプを用いた中和抗体価測定系の構築、第 156 回日本獣医学会、2013 年 9 月、岐阜

知的財産権の出願・登録状況