

本研究は組換え DNA 実験を含むことから、組換え DNA 実験指針に基づき実施する。本研究で作製する増殖可能な組換えウイルスを用いた感染実験については、大臣確認実験に相当し、「ネルソンペイオルスレオウイルスにおける複製機構ならびに病態発現機序の解明」で遺伝子組換え生物等の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置について大臣確認を得ている(平成 25 年 7 月 9 日、承認番号 3563)。

動物実験の実施は、当研究機関の動物実験倫理委員会において審査し、承認を得た上で行う。動物愛護と動物福祉の観点から十分な配慮を行う。国が定めた「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」等の関連法律・基準ならびに「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づいた「大阪大学における動物実験の実施に関する規定」を遵守する。

C. 研究結果

●PRV Miyazaki 株の全 10 分節ゲノム塩基配列の決定

Miyazaki 株のウイルスゲノム全塩基配列を決定した結果、Miyazaki 株は PRV 群に属するウイルスであることが明らかとなった(図 1)。さらに、Miyazaki 株は同時期(2007 年)、同地域(インドネシア)で分離された香港株と高い相同性を示した(図 2)。

●PRV Miyazaki 株の遺伝子操作系の開発

Miyazaki 株の遺伝子操作系の開発を試みた(図 3)。その結果、Miyazaki 株由来 10 分節クローン cDNA を培養細胞に導入したところ、24 時間後に組換えウイルスの産生が認められた(図 4)。さらに、他の PRV 株のモノリアソータントウイルスの作製を試みた結果、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ペイ株 S1 遺伝子を持つ組換えウイルスの作製に成功した(図 5)。コンタミネーションの可能性を否定するため、S 遺伝子内の人為的マーカー変異の有無を確認したと

ころ、すべての組換えウイルスでマーカー変異が確認された。

●組換え PRV Miyazaki 株 sigmaC の発現および抗体作製

SigmaC 蛋白質を大腸菌で発現させた結果、予想された分子量の組換え蛋白質の発現が確認された。さらに、発現が確認された組換え蛋白質を精製し、一部をマウスに免疫し、抗体の作製を行った(図 6)。作製した抗体の特異性を検討した結果、この抗体は感染細胞に対して特異的に反応した(図 6)。

D. 考察

Miyazaki 株の全ウイルスゲノムシーケンシス解析の結果、Miyazaki 株感染者と同様に 2007 年、インドネシアから香港に帰国した旅行者から分離された PRV 香港株と相同性が高かったことから、同地域での散発的なアウトブレイクの発生が示唆された。今後、同地域でのさらなる詳細な疫学解析が望まれる。開発に成功した Miyazaki 株の遺伝子操作系は、今後、Miyazaki 株の各ウイルス蛋白質の機能解析、病原性解析、さらにはレポーター遺伝子発現 NBV を作製することで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。

E. 結論

平成 25 年度に遂行予定であった Miyazaki 株のウイルスゲノム全塩基配列決定、診断システムに必須の抗原、抗体の作製、遺伝子操作系開発に用いる全分節遺伝子のクローニング、発現確認については、予定通りに遂行された。Miyazaki 株における遺伝子操作系の開発については前倒しで開発に成功したことから、今後、より一層の研究の進展が期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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).

2. 学会発表

- 1) 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）
- 2) 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）

- 3) 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）
- 4) 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）

H. 知的財産権の出願・登録状況

図1. Miyazaki株および他のPRV株間におけるアミノ酸配列比較解析 (L, M, S遺伝子)

Strain	S1			S2	S3	S4	M1	M2	M3	L1	L2	L3
	p10	p17	σ C	σ 1	σ NS	σ 2	μ A	μ B	μ NS	λ C	λ B	λ A
Nelson Bay	72.6	52.9	43.6	98.1	96.7	93.4	92.1	96.6	91.5	92.3	96.3	96.7
Melaka	93.7	84.1	57.3	99.0	98.9	98.1	96.3	100.0	97.1	97.0	98.4	98.4
Kamper	100.0	98.6	93.7	98.6	98.3	96.7	96.2	95.0	97.6	97.3	98.6	98.5
HK23629/07*	94.4	85.5	56.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Sequences are partially determined.

図2. Miyazaki株ゲノム系統学解析 (S2, S3, S4遺伝子)

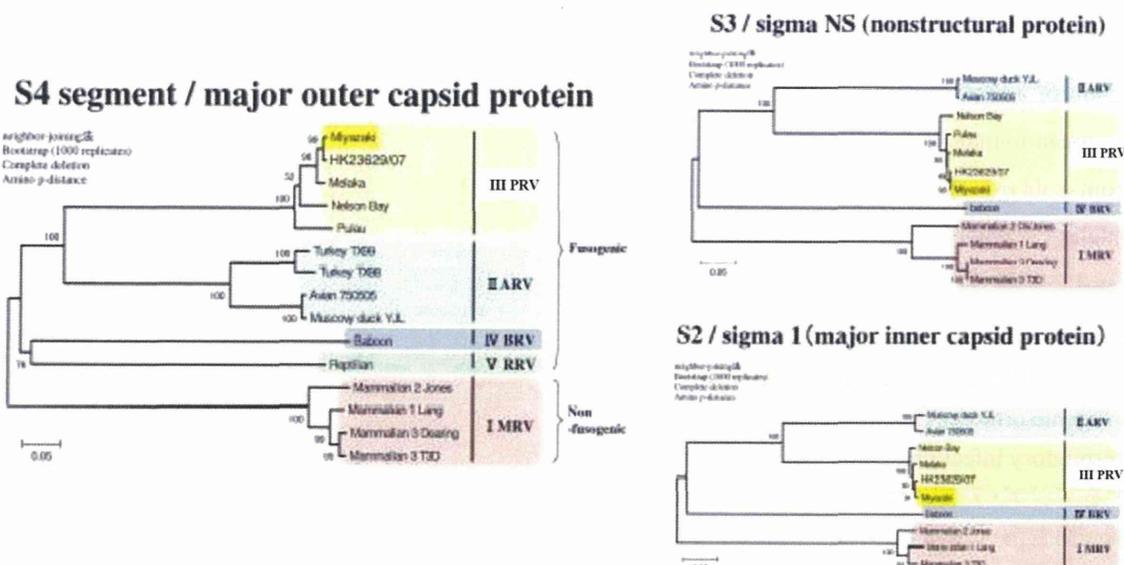


図3. Miyazaki株における 遺伝子操作系の確立(1)

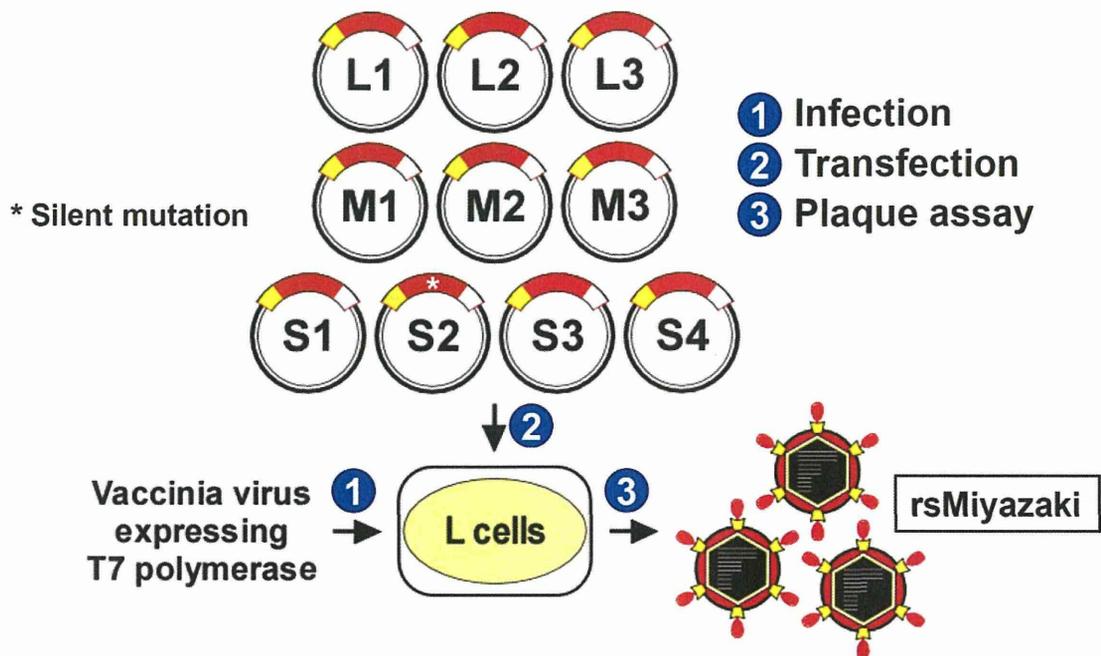


図4. Miyazaki株における 遺伝子操作系の確立(2)

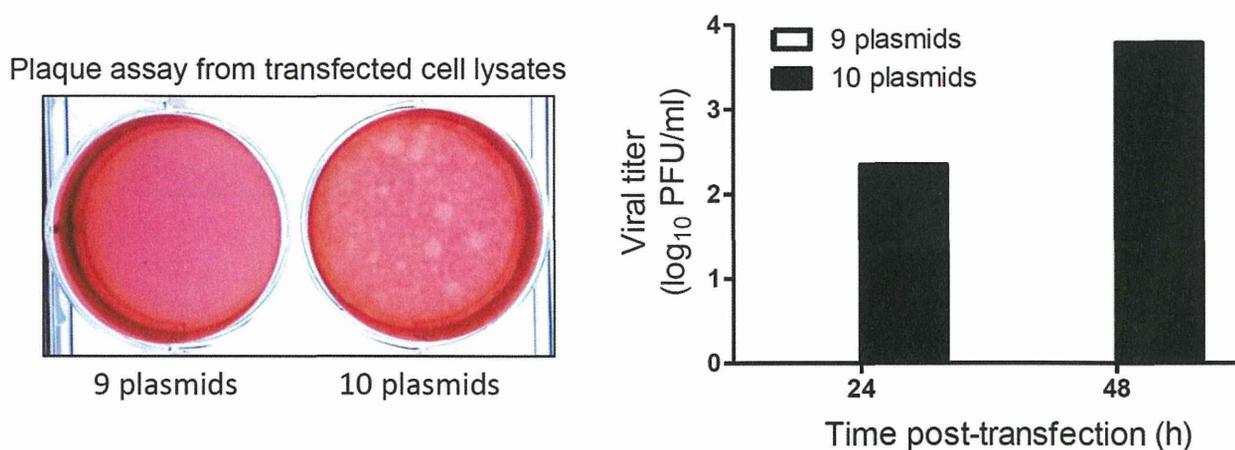


図5. 組換えPRVモノリアソータントの作製

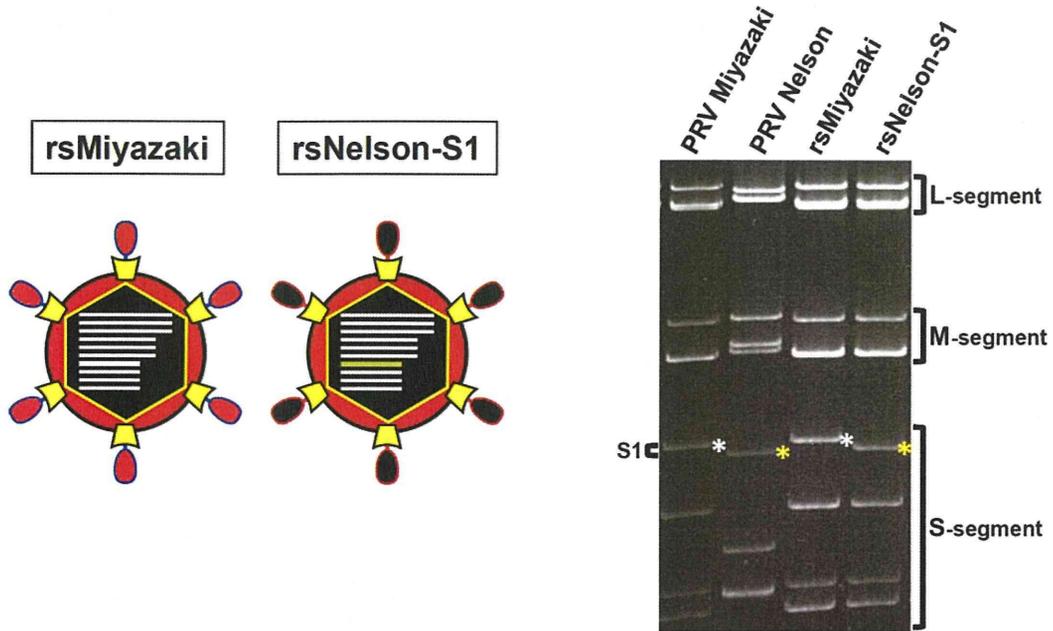
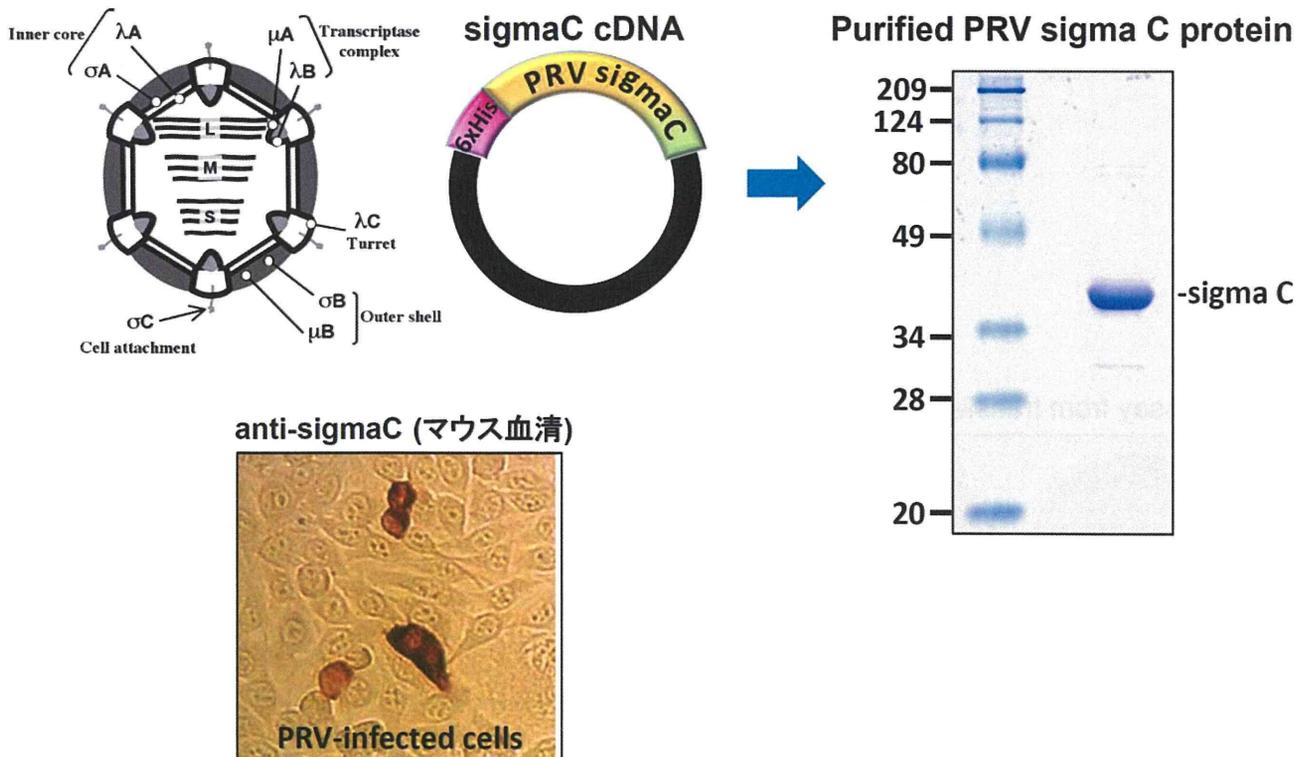


図6. 組換えsigmaCの発現(大腸菌)



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：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

研究分担者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部長
研究協力者	福士秀悦	同・ウイルス第一部主任研究官
研究協力者	谷英樹	同・ウイルス第一部主任研究官
研究協力者	David N Bukbuk	マイドゥーグリ大学（ナイジェリア）

研究要旨

ラッサウイルス (Lassa virus, LASV) は、アレナウイルス属アレナウイルス科に分類されるウイルスで、ウイルス性出血熱の原因ウイルスの一つである。LASV は日本には存在しない。しかし、ヒトにおいて致死性の感染症を引き起こすことがあり、輸入感染症対策上重要な感染症である。LASV は国際的に BSL-4 病原体に指定されている。しかし、BSL-4 研究施設が国立感染症研究所等に設置されているものの稼働されていないことから、日本では感染性のある LASV を扱うことはできないので、診断に有用な中和抗体検査が実施できない。そこで本研究では LASV に対する中和抗体を、LASV の膜蛋白を表面にまとった水疱性口内炎ウイルス (VSV) シュードタイプを用いて、安全に測定するためのシステムを開発した。LASV の組換え核蛋白質を抗原とした抗体測定法 (IgG-ELISA) による結果とシュードタイプを用いた測定法による結果と比較した。ラッサ熱患者においては、本システムを用いて抗体価の上昇が認められたことから、診断における有用性があることが認められるが、検出感度と特異度については感染性のある LASV を用いた抗体価と比較して評価する必要がある。

A. 研究目的

国立感染症研究所ウイルス第一部ではラッサ熱の抗原検出による診断システムとしてラッサウイルス (Lassa virus, LASV) の遺伝子増幅検査、抗原検出 ELISA、分離ウイルスの同定システムが、抗体検出法として LASV の組換え核タンパク質 (LASV-rNP) を抗原とした間接蛍光抗体法、ELISA が開発・整備されている。しかし、感染性 LASV を扱うことができないことから、診断において極めて有用な中和抗体を測定するシステムは整備されていない。

そこで本研究では、LASV に対する中和抗体測定システムを開発し、その有用性を評価した。

B. 研究方法

1) VSV シュードタイプウイルスの作製

水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus, VSV) に LASV のエンベロープ蛋白質 (GP) を被らせたシュードタイプウイルス (LASVpv) を作製した (図 1)。この VSV 遺伝子の GP 蛋白質遺伝子を欠損させ、その部分にルシフェラーゼ遺伝子が挿入されている。シュードタイプ VSV の感染力価を、ルシフェラーゼ活性を測定することで、定量的に評価することが可能である。ラッサ熱患者における抗体価の推移を測定する際には VSV 遺伝子の GP 蛋白質遺伝子を欠損させ、その部分に GFP 遺伝子が挿入されている LASVpv-GFP を用いた。抗体価は、GFP 発現細胞を計測してその減少率を測定して評価した。

2) LASV-rNP を抗原とした IgG-ELISA

LASVに対するIgG抗体をLASV-rNPを抗原としたIgG-ELISAにより測定した(Saijo M, et al., Clin Vaccine Immunol, 2007).

3) 血清

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。

(倫理面からの配慮について)

本研究に使用された血清はマイドゥーグリ大学医学教育病院の倫理委員会での承認と患者からのインフォームドコンセントを得た上で採取された。この研究については、国立感染症研究所の「ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会」による承認のもとに実施された。

C. 研究結果

1) LASV-rNPを抗原としたIgG-ELISAによる被検血清のLASVに対する抗体陽性率。

細菌等のコンタミネーションにより検査できなかった18検体を除く279検体中21検体(7.5%)がLASVに対する抗体陽性を呈した(図2, 表1)。

2) LASVpvに対する中和活性測定による抗体検出。

LASVpvを用いた中和活性測定において、ルシフェラーゼ活性が50%以上の抑制を呈した場合に陽性と判定した場合、LASVpvに対する中和活性陽性率は279検体中53検体(19.0%)であった(図3, 表1)。

3) 回復期ラッサ熱患者におけるLASVpv-GFPに対する中和抗体

ラッサ熱患者の回復期におけるLASVpv-GFPに対する中和活性レベルは、陽性を呈した(図4)。

D. 考察

日本国内には稼働されている高度封込施設がないので、BSL-4病原体として指定されている感染性LASVを扱うことができず、ラッサ熱の血清

診断に特異性の高い考えられる中和抗体を測定することはできない。そこでLASV-GPをシュードタイプVSV膜表面にまとっているLASVpvを複製し、中和抗体測定システムを開発した。1987年に輸入感染症として日本国内で発症したラッサ熱患者の回復期血清中にはVSVpvを中和する抗体が検出された(図4)。本システムはLASVに対する抗体を検出する上で有用であることが示唆された。LASV-rNPを抗原とするIgG-ELISAと比較すると、VSVpvによる抗体検出法は、検出感度は約50%で低く、特異度は約84%と高い値を示した。VSVpvによる抗体検出法の感度と特異度を評価するには感染性LASVを用いた中和抗体測定法と比較して評価する必要があるが、本研究成績はVSVpv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。ただし、さらなる研究が必要である。

今回の研究ではナイジェリアのマイドゥーグリ市周辺の人々の血清がVSVpvによる抗体検出法の診断における有用性の評価に用いられた。血清をろ紙に浸して乾燥させ、それを本研究室に送付し、さらにそこから血清を改めて蒸留水を用いて抽出してから研究に用いられた。これまでの私たちの研究では血清を上記のような処理をすることなく検査するとLASV-rNPを抗原としたIgG ELISAによる同地域のLASV抗体陽性率は約20%であった(データ未表示)。今回の研究では7.5%と、それに比べて低く、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。

E. 結論

VSVシュードタイプLASVpvを用いた中和抗体測定法は、ラッサ熱の診断に有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

G. 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.* (in press)
- 3) Yoshikawa T, Saijo M, Morikawa S. Emergence of zoonotic orthopox virus infections. In *Viral Infections and Global Change* (ed. Sigh SK), pp377-387, 2014, Wiley Blackwell, New Jersey

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 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

- 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 10-12 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 10-12 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 10-12 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 10-12 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 10-12 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 10-12 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 10-12 日, 神戸
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

表 1. ナイジェリア・マイドゥーグリ市周辺の 279 人を用いた LASV-rNP を抗原とした IgG-ELISA 法と LASVpv に対する中和活性測定法による成績の関係

抗体測定法	LASV-rNP を抗原とした ELISA			計
	判定	陽性 (%)	陰性 (%)	
LASVpv に対する 中和活性	陽性*	11 (52.4)	42 (16.3)	53
	陰性	10 (47.6)	216 (83.7)	226
	計	21	258	279

* : コントロールに対して 50%以上のルシフェラーゼ活性の抑制を示した血清を陽性とした.

VSV pseudotype-based neutralization assay

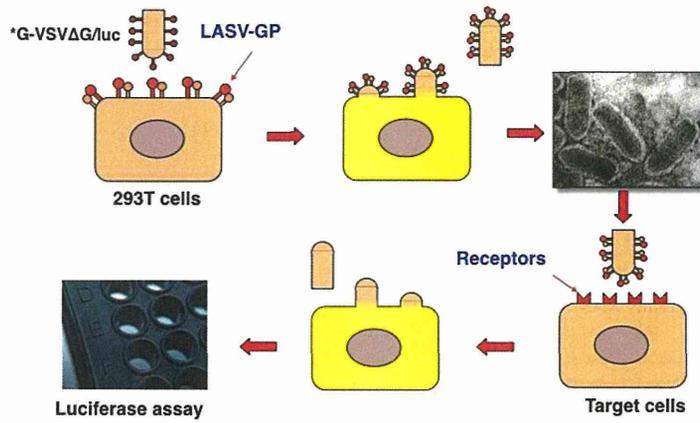


図1. ルシフェラーゼ活性を発現する LASVpv に対する中和活性測定法の概略

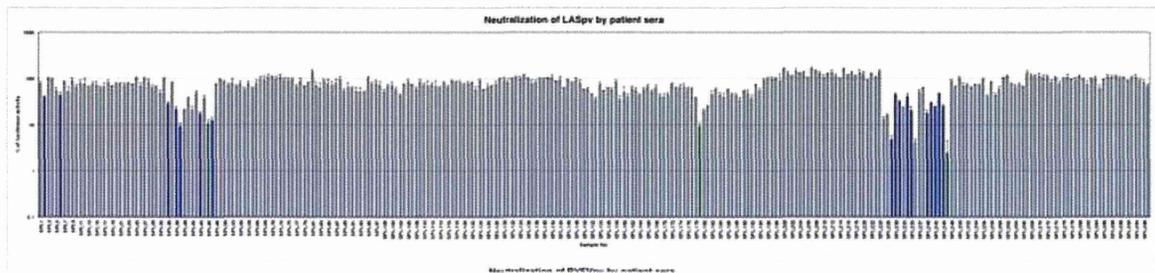


図2. ナイジェリア・マイドゥーグリ市周辺の 279 人における LASVpv に対する中和抗体保有状況

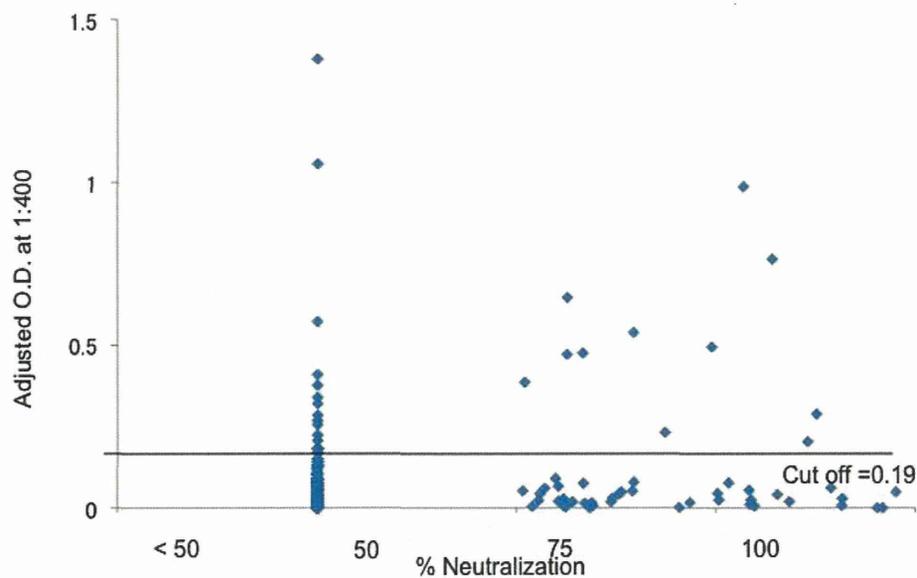


図 3. ナイジェリア・マイドゥーグリ市周辺の 279 人を用いた LASV-rNP を抗原とした IgG-ELISA による、血清 400 倍希釈における OD 値と LASVpv に対する中和活性測定法によるリンフェラーゼ活性抑制率の関係

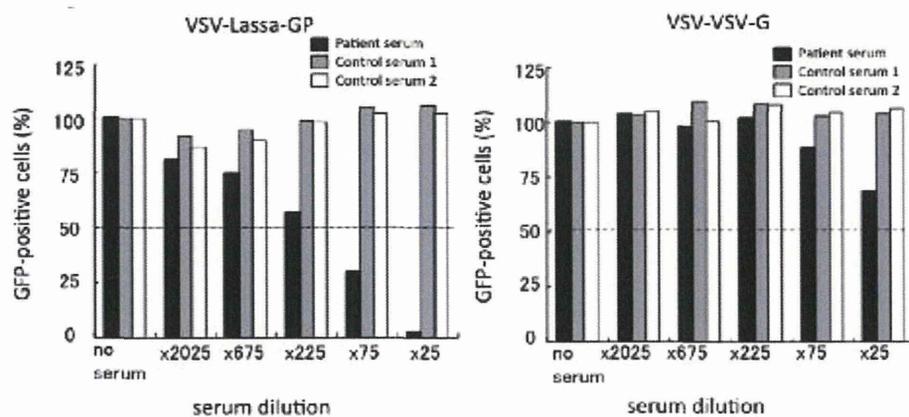


図 4. 1987 年に日本で輸入感染例としてラッサ熱と診断された患者回復期の血清の LASVpv-GFP に対する中和活性

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：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

分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所獣医科学部）

研究要旨

1 類感染症に指定されているウイルス性出血熱ウイルス（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）のうち、最も地理的な分布が広いのはクリミア・コンゴ出血熱(CCHF)である。CCHF患者は、アフリカ、バルカン、中東、アジアで発生していて、特にトルコやインドで患者が増加している。CCHFウイルス(CCHFV)を媒介するのは主にHyalomma属のマダニで、北限は北緯50度とされている。中国では、新疆ウイグルで患者が発生している。また、タクラマカン砂漠辺縁を中心としてウイルス保有マダニが分布する。モンゴルは、国土の多くが北緯50度以南で中国の北部に隣接し、新疆の東にゴビ砂漠が展開する。本研究では、モンゴルにCCHFVが分布するかを明らかにすることを目的とし、ヒツジのCCHFV抗体保有状況を調査した。その結果、総計1700匹以上のヒツジ血清を組換えCCHFV-NPを用いたIgG-ELISAで調べた。間接蛍光抗体法(IF)による結果とIgG-ELISAの成績をROC解析により解析し、IgG-ELISAのCut off値を決定した。その結果、ウランバートル北部のSelenge県では抗体陽性ヒツジはいなかった。一方、南部のKhovd県からDornogovi県にかけては抗体陽性ヒツジが見出された。ヒツジの抗体陽性率は、西側の新疆近辺で最も高く20%以上、東南部では5-10%と低かった。本研究から、モンゴルにはCCHFVが存在することが強く示唆された。

研究協力者：Odbileg Raadan, Boldbaatar Bazartseren (Institute of Veterinary Medicine Mongolian State University of Agriculture, Mongolia)、Roger Hewson (PHE, UK)、朴ウンシル、木村昌伸、今岡浩一(国立感染症研究所獣医科学部)、福士秀悦、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

1 類感染症に指定されているウイルス性出血熱ウイルス（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）のうち、地理的な分布が最も広いのはクリミア・コンゴ出血熱(CCHF)である。CCHF患者は、アフリカ、バルカン、中東、アジアで

発生していて、特にトルコやインドで患者が増加している。また、ウイルスの存在は古くから知られていたギリシャでも近年CCHF患者が発生した。また、パキスタンなどアジア諸国でCCHFの流行が相次いでいる。このことから、海外からの帰国者、海外からの渡航者が国内でCCHFを発症するリスクはウイルス性出血熱の中では最も高いと考えられる。2012年には英国でアフガニスタンからの帰国者が発症し死亡する事例が報告されている。

CCHFウイルス(CCHFV)を媒介するのは主にHyalomma属のマダニで、北限はこれらのマダニが生息可能な北緯50度とされている。中国では、新疆ウイグルでCCHF患者が発生し、新疆のタクラマカン砂漠辺縁を中心とし

てウイルス保有マダニが広く分布する。モンゴルは、国土の多くが北緯 50 度以南で中国の北部に隣接し、新疆の東にゴビ砂漠が展開する。本研究では、モンゴルに CCHFV が分布するかを明らかにすることを目的とし、ヒツジの CCHFV 抗体保有状況を調査した。

B. 研究方法

1) IgG-ELISA 用 CCHFV-NP 抗原：

His-tagged CCHFV-NP 発現組換えバキュロウイルスを Tn5 昆虫細胞に感染させ、細胞ライセートから Ni⁺⁺カラムクロマトグラフィーにより His-tagged CCHFV-NP を精製した。対象抗原には polyhedrin KO バキュロウイルス感染細胞から同様に処理したものをを用いた。IgG-ELISA は、Qing Tang らの方法に従った (J. Virol. Methods, 108:111-6, 2003)。

2) 間接蛍光抗体法 (IF) 用抗原：

HeLa 細胞に CCHFV-NP 哺乳類細胞発現プラスミド (pKS336-CCHFV-NP) を transfection し、blasticidin S hydrochloride で選択して作製した CCHFV-NP 発現細胞と HeLa 細胞を 1:3 で混合した塗抹標本を用いた。二次血清には抗ヒツジ IgG-FITC を用い Sajo M らの方法に従って行った (J. Clin. Microbiol. 40(2): 372-5, 2002)。

3) ヒツジ血清：

モンゴルの各地で 2013 年に採血されたヒツジ血清 (1716 頭) を非働化した後、試験に用いた。ヒツジの調査に関しては、モンゴル獣医学研究所等が世界銀行の支援を受けた。

4) モンゴルでの調査対象地域の選択：

Dr. Roger Hewson により、野生動物・家畜・マダニの分布のデータからリスクを評価した。CCHFV を媒介するマダニが生息するか、CCHFV 流行地の新疆に地理的に隣接あるいは近隣であるか、CCHFV を増幅するマダニの吸血対象となる動物相が十分かを総合的に解析して調査対

象県を選定した。

C. 研究結果

1) モンゴルでの調査対象地域：

CCHFV を媒介する *Hyalomma asiaticum asiaticum*, *Dermacentor daghestanicus*, *D. nutalli* が生息する、新疆に地理的に隣接あるいは近隣である、CCHFV を増幅するマダニの吸血対象となる動物相が充分でありリスクがあると判断された Khovd, Gobi-Altai, Bayankhongor, Umnugobi, Dornogobi 県 (図 1) 及びリスクが低いと判断された Selenge 県を対象地域とした。

2) ROC 解析：

Selenge 県の 98 頭のヒツジ血清を IgG-ELISA, IF で調べた結果全てが陰性であった。そこで、これらを含む 341 頭のヒツジ血清の IgG-ELISA, IF の成績をプロットした結果、図 2 に示すように IF 陽性群と陰性群の IgG-ELISA での血清希釈 400 倍での OD 値は、それぞれ平均 0.74/標準誤差 0.035、0.083/0.024 であった。

3) Receiver Operating Characteristic analysis (ROC 解析)：

2) のデータを ROC 解析した結果、ROC 曲線積面積は 0.9 と IgG-ELISA の成績が効率よく抗体陽性を識別できると判断された (図 3(a))。また、TG-ROC 解析では、感度、特異度のバランスの良い Cut off OD 値は 0.431 でその時の感度、特異度は 83.3%、82.5%であると予想された (図 3(b))。

4) CCHFV 抗体陽性ヒツジの分布：

Selenge 県の 96 頭は全て抗体陰性であった。その他の CCHFV が存在するリスクがあると判断された Khovd, Gobi-Altai, Bayankhongor, Umnugobi, Dornogobi 県では抗体陽性ヒツジが認められ、その陽性率は Khovd, Gobi-Altai 県で 27%、Bayankhongor 県で 13.8%、Umnugobi,

Dornogobi 県ではそれぞれ 7.1%、8.6%と西域ほど高かった (図 4)。

D. 考察

CCHF は、アフリカ、バルカン、中東、アジアでしばしば流行し、特にトルコやインドで患者が増加している。ウイルスの存在は古くから知られていたギリシャでも近年 CCHF 患者が発生し、2012 年には英国でアフガニスタンからの帰国者が発症している。このことから、海外からの帰国者、海外からの渡航者が国内でウイルス性出血熱を発症する可能性は、CCHF が最も高いと考えられる。モンゴルは天然資源が豊富であることから海外との共同開発により最も経済発展率が高い国であり、日本人の渡航も年々増加している。一方、モンゴルは、炭疽、ブルセラ、狂犬病、ダニ媒介性脳炎等、多くの重篤な動物由来感染症の常在地でもある。モンゴルの南部のゴビ砂漠辺縁には CCHF ウイルス (CCHFV) を媒介する *Hyalomma* 属等のマダニが分布し、さらに CCHF 常在地である中国の新疆に隣接することから、CCHFV が存在する可能性がある。これらの観点から、本研究ではモンゴルに CCHFV が分布するかを明らかにすることを目的とし、ヒツジの CCHFV 抗体保有状況を調査した。その結果、南部のゴビ砂漠辺縁にはウイルス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いことがわかった。新疆の CCHF 流行地のヒツジの抗体陽性率と比較すると陽性率は低いこと、これらの地域で 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が、これらの陽性地域では CCHF のリスクがあると考えられる。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。

E. 結論

モンゴルのヒツジの CCHFV 抗体調査を行った結果、モンゴル南部の宿主ダニ生息地域では抗体陽性動物が認められ、新疆隣接地域では抗体陽性率が高い傾向があった。ただし、現在まで CCHF 患者の報告はない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, et al. , Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Inf Dis.*, 2014 Mar;209(6):816-27.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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
- 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, and Takeda M. Canine Distemper Virus Associated with a Lethal Outbreak in Monkeys Readily Adapted to Use Human Receptors. J Virol. 2013, 2013 Jun;87(12):7170-5.
 - 9) 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
 - 10) 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
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

現在出願予定はない。

- 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日から12日、神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況

図1 モンゴルでの調査対象地域（楕円囲い部分及び Selenge 県）

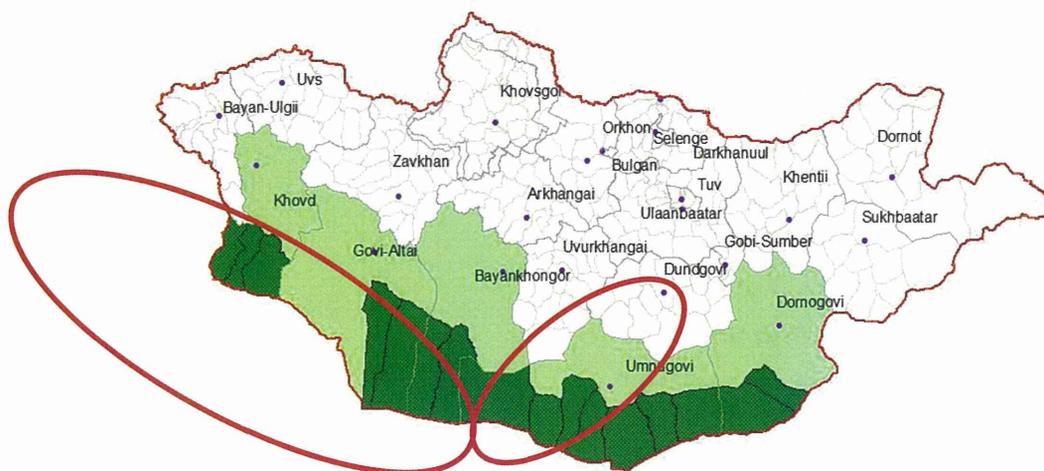
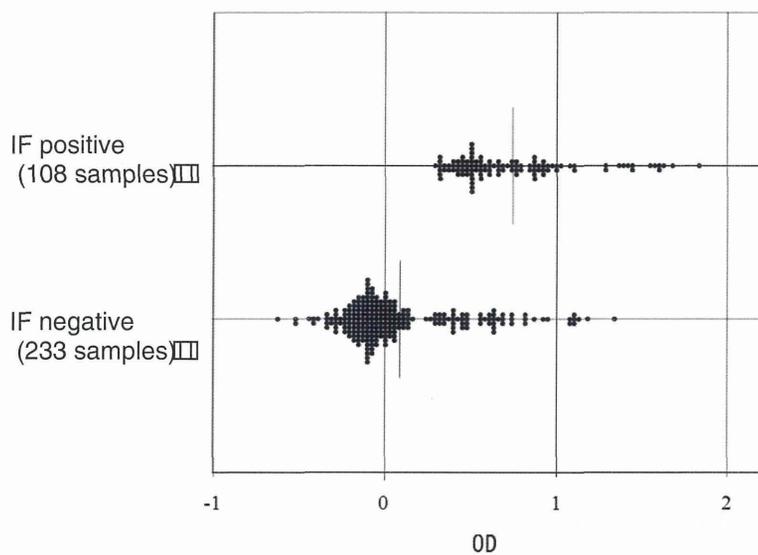
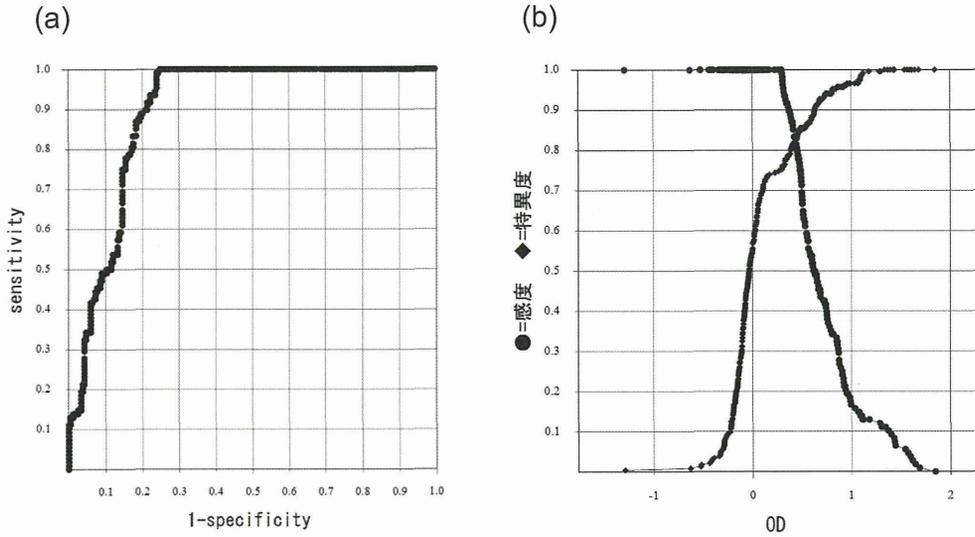


図2 CCHF-IF 陽性群と陰性群の IgG-ELISA の血清希釈 400 倍での OD 値の分布



Average OD value / SE of IF positive and negative were 0.74/0.035 and 0.083/0.024, respectively.

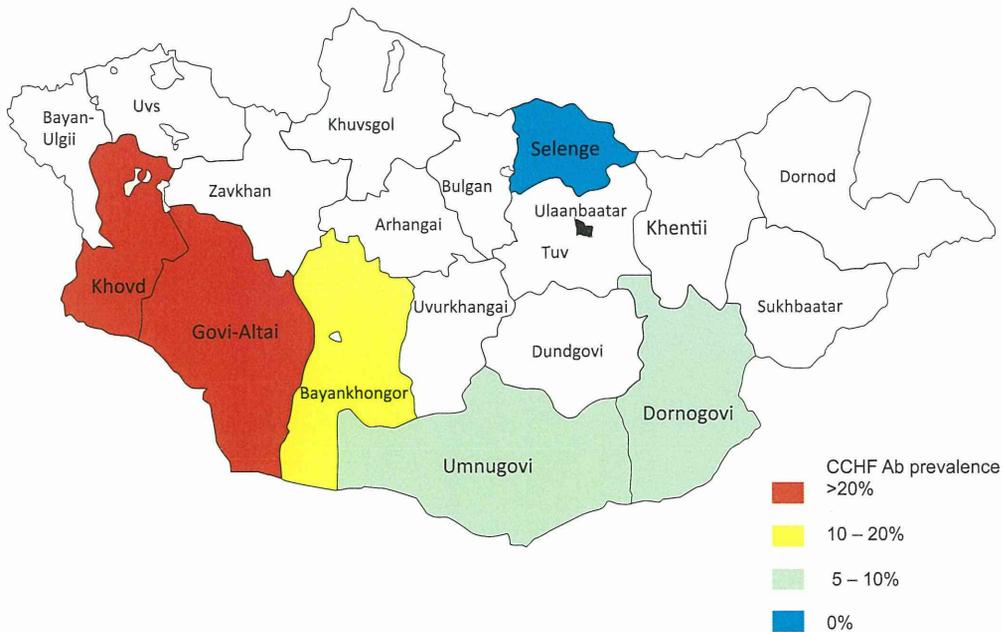
図3 ROC解析によるIgG-ELISAの信頼度とCut off値の決定



ROC (a) and TG-ROC (b) analyses of the CCHF-IgG-ELISA.

ROC and two-graph-ROC curve were analyzed and drawn using StatFlex software. The area under the ROC curve is 0.900, which indicates the ELISA has a good probability distinguishing between sheep with CCHF antibody and those without antibody (a). The most optimal **sensitivity (83.3%) and specificity (82.5%)** are obtained when the cutoff value is set at **OD405 of 0.431**.

図4 モンゴルにおけるCCHFV抗体陽性ヒツジの分布



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：新規コロナウイルスの診断と感染機構に関する研究
分担研究者：松山 州徳（国立感染症研究所 ウイルス第三部四室）

研究要旨

2012年に中東で新たに発生し、今でも月に数人のペースで感染者の見つかり続けている中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）について、この病原体の国内検査体制の維持に貢献することを目的とする。さらにウイルスの細胞侵入機構について基礎研究おこない、予防治療法に必要な知見を報告することで国際的貢献に繋げることを目的とする。今回の新型コロナウイルスの様な、いつ現れるかわからないような病原体に対して、アウトブレイクに先立ってワクチンや抗血清、あるいは抗ウイルス薬を開発することは、理想的ではあるが、現実的では無い。我々は最近明らかとなっているウイルスの細胞侵入機構の知識を応用し、既存の薬の中から、ウイルス増殖を抑える化合物を選び出し、肺胞上皮由来の培養細胞を用いて抗ウイルス効果を確認した。

A. 研究目的

近年、呼吸器ウイルスは、宿主のプロテアーゼを使ってヒトに感染することがわかってきた。インフルエンザを活性化するプロテアーゼには、トリプシン、トリプターゼクララ、ミニプラスミン、HATが報告され、またコロナウイルスでは、トリプシン、カテプシン、エラスターゼが報告されてきた。しかし、2006年に Böttcher らにより肺胞上皮細胞に特異的に発現している膜型セリンプロテアーゼ「TMPRSS2」がインフルエンザウイルスを活性化することが報告されてからは、2008年には九州大学の白銀らによりヒトメタニューモウイルスが、2010年には我々のグループにより中東呼吸器症候群コロナウイルス（SARS-CoV）が、2012年にはヒトコロナウイルス NL63 が活性化されることが報告され、TMPRSS2 が呼吸器ウイルス活性化の主役因子であると考えられるようになってきた。我々の未報告のデータは、呼吸器ウイルスの半数以上が TMPRSS2 を使って感染することを示唆して

いる。もし TMPRSS2 の阻害剤を見つければ、多くの呼吸器ウイルスの感染を阻止する薬になると考えられるので、我々は阻害剤の検索を行い、セリンプロテアーゼ阻害剤の「カモスタット」が、TMPRSS2 の活性を特異的に阻害し、SARS-CoV の細胞侵入を阻止することを見出した。カモスタットは、既に肺炎の治療のための飲み薬として処方されている。また我々は、コロナウイルスのみならず、インフルエンザ、メタニューモ等の広範の呼吸器ウイルスの増殖を抑える抗ウイルス薬として転用される可能性を提案し、基礎研究を重ねている。今回は SARS-CoV で得られた細胞侵入経路の知見と阻害剤の効果が、MERS-CoV でも同様に見られるかどうかを、一連の阻害剤を用いた実験で確認した。

B. 研究方法

本研究に用いた細胞は、Vero 細胞に TMPRSS2 を発現させた Vero-TMPRSS2 (Shirogane Y, 2008 J