

分担研究報告書

ウイルス性特定病原体の鑑別診断法の開発

研究分担者：森川茂（国立感染症研究所 獣医科学部部長）

研究協力者：朴ウンシル（同、獣医科学部）、福土秀悦、吉河智城、谷英樹、谷口怜、下島昌幸、西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：昨年、これまでにない規模のエボラ出血熱の流行が西アフリカで発生し、平成27年2月時点でも未だ終息していない。アフリカでのエボラ出血熱患者の確定診断には RT-PCR による遺伝子診断が行われている。これらは、欧米等の支援によって設置されたラボでのみ実施可能である。エボラ出血熱のように急性期の血中ウイルス量の高い感染症では、ウイルス抗原検出をイムノクロマトで行うことでより簡便に患者の確定診断が可能になる。また、ウイルス中和抗体を効率よく誘導できれば治療用抗体としての利用も可能となる。本研究では、このような観点から、ザイルエボラウイルスの膜糖タンパク質 (GP)の組換えバキュロウイルスを2種類作製した。一つは his タグ付 GP を昆虫細胞に発現する組換えバキュロウイルスで、もう一つは CAG プロモーターにより哺乳類細胞で GP を発現する組換えバキュロウイルスである。それぞれを昆虫細胞 Tn5 と哺乳類細胞 Vero に感染させて GP の発現を比較した結果、前者では Tn5 細胞でのみ GP が発現し、後者では Vero 細胞で GP が発現した。後者の Vero 細胞では preGP と GP1 と思われるサイズの蛋白質が確認された。昆虫細胞では High mannose 型糖鎖まで複合型糖鎖修飾されないため、昆虫細胞と哺乳類細胞で発現された GP は分子量が異なった。これらを用いてマウス等の動物で GP 特異抗体の作製が可能となり、抗原検出用抗体としての応用が期待される。

A 研究目的

昨年、西アフリカにおけるエボラ出血熱の大流行が問題となったが、平成27年2月時点で未だ終息していない。これまで、BSL病原体が取り扱えない日本では、RT-PCRによる遺伝子検出、ウイルス核蛋白質(NP)単クローン抗体を用いた抗原検出法、IgM, IgG抗体検出法、シュードタイプ VSVによる中和抗体検査法などが開発されている。これらの検査法は、アフリカからの帰国者の疑い症例の実験室検査等に実際に用いられている。

一方、アフリカでのエボラ出血熱患者の確定診断にはリアルタイムRT-PCRによる遺伝子診断が行われている。これらは、欧米等の支援によって設置されたラボでのみ実施可能であり、疑い患者検体を検査ラボまで輸送して対応している。エボ

ラ出血熱のように急性期の血中ウイルス量が非常に高い感染症では、ウイルス抗原検出をイムノクロマトで行うことでより簡便に患者の確定診断が可能になる。また、ウイルス中和抗体を効率よく誘導できれば治療用抗体としての利用も可能となる。本研究では、このような観点から、ザイルエボラウイルスの膜糖タンパク質 (GP)を効率よく発現する組換えバキュロウイルスを2種類作製する。用いるプロモーターによりエボラウイルスGPを昆虫細胞で発現する組換えバキュロウイルスとCAG プロモーターにより哺乳類細胞で GPを発現する組換えバキュロウイルスを作製した。これらを用いて、エボラウイルスGP特異的抗体を簡便に作製し、検査法、中和抗体作製を行うことを目的とする。

B 研究方法

1) 組換えバキュロウイルス：

ポリヘドリンプロモーターによりエボラウイルス GP 遺伝子を発現する組換えバキュロウイルス(Ac-his-EBOZ-GP)と CAG プロモーターによりエボラウイルス GP 遺伝子を発現する組換えバキュロウイルス(AcCAG-EBOZ-GP)を作製した(図1)。それぞれの組換えウイルスは、Tn5 細胞で培養しストックウイルス(力価 2×10^7 /mL)を作製した。

2) 昆虫細胞と哺乳類細胞でのエボラウイルス GP の発現：

抗エボラウイルス GP 抗体は、Prof. C. J. Peters (UTMB, Texas, USA) から分与されたウサギ高度免疫エボラウイルス GP 血清を用いた。組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Tn5 とは哺乳類細胞 Vero および Vero E6 に moi=10 で感染させた。感染後 48 時間後に細胞を回収し、SDS-PAGE / Western blotting によりエボラウイルス GP の発現、分子量等を確認した。

C 結果

1) 組換えバキュロウイルス：

2 種類の組換えバキュロウイルスを作製した(図1)。AcCAG-EBO-GP は GP を発現するプロモーターが哺乳類細胞でのみ機能するため、昆虫細胞ではウイルスは増殖するが GP 遺伝子の発現はない。一方、バキュロウイルスは哺乳類細胞に流産感染するため、ウイルスは増殖しないが CAG プロモーターで制御される遺伝子の発現が期待できる。Ac-his-EBO-GP は、ポリヘドリンプロモーターで GP 遺伝子を制御するため昆虫細胞で遺伝子が発現する。

2) 昆虫細胞と哺乳類細胞でのエボラウイルス GP の発現：

2 種類の組換えバキュロウイルスを昆虫細胞と哺乳類細胞に感染後 48 時間で細胞を回収し、エボラウイルス GP の発現を調べた(図2)。その結果、予想通り AcCAG-EBO-GP 感染 Vero 細胞、Vero E6 細胞では EBO-GP の発現が確認された。分子量 160kDa, 130kDa の蛋白質が検出できたが、これは preGP, GP1 に相当すると考えられた。Tn5 細胞(昆虫細胞)では EBO-GP の発現は認められなかった。一方、Ac-his-EBO-GP 感染 Vero 細胞、Vero E6 細胞では EBO-GP の発現は認められなかったが、Tn5 細胞では分子量 130kDa,

60kDa の蛋白質が検出された。130kDa の蛋白質は preGP なのか GP1 なのかは不明である。昆虫細胞では high mannose 型糖鎖修飾はされるが complex 型糖鎖修飾はされないため、両者で分子量が異なると思われた。

D 考察

本研究で作製された組換えバキュロウイルス AcCAG-EBO-GP をマウス等に経鼻接種することにより、エボラウイルス GP 特異的抗体が誘導可能か検討したい。また、Ac-his-EBO-GP 感染 Tn5 細胞から EBO-GP を精製して、マウス等を免疫してエボラウイルス GP 特異的抗体が誘導可能か確認する予定である。両者による免疫で誘導される抗体の中和力価等を比較し、抗原検出に有用な抗体を提供したい。

E 結論

2 種類の組換えバキュロウイルスにより、種々の細胞でエボラウイルス GP を効率よく発現する系ができた。抗体作製にこれらを有効に利用することが可能である。

F 研究発表

1. 論文発表

- 1) Paola Katrina G. Ching, Vikki Carr de los Reyes, Maria Nemia Sualdito, Enrique Tayag, Alah Baby Columna-Vingno, Fedelino F. Malbas, Gilbert C. Bolo, James J. Sejvar, Debbie Eagles, Geoffrey Playford, Erica Dueger, Yoshihiro Kaku, Shigeru Morikawa, Makoto Kuroda, Glenn A. Marsh, Sam McCullough, and A. Ruth Foxwell. Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines. *Emerg Infect Dis.* 2015, 21(5), 21(2):328-31. DOI: 10.3201/eid2102.141433
- 2) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):423-7.
- 3) Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H. Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. *J Gen Virol.* 2014 Oct 15. pii: vir.0.070219-0. doi: 10.1099/vir.0.070219-0.
- 4) David Nadeba Bukbuk, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi,

- Koichiro Iha, Aiko Fukuma, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Francis Kasolo, Saka Saheed Baba. Development and Validation of Serological Assays for Viral Hemorrhagic Fevers and Determination of Prevalence of Rift Valley Fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014 Oct 24. pii: tru163. PMID: 25344695
- 5) Eun-Sil Park, Michio Suzuki, Masanobu Kimura, Keiji Maruyama, Hiroshi Mizutani, Ryuichi Saito, Nami Kubota, Tetsuya Furuya, Tetsuya Mizutani, Koichi Imaoka, Shigeru Morikawa. Identification of a natural recombination in the F and H genes of feline morbillivirus. *Virology*, 2014, 468-470: 524-531
 - 6) Noriyo Nagata, Masayuki Saijo, Michiyo Kataoka, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Yuko Sato, Naoko Iwata-Yoshikawa, Momoko Ogata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata, and Hideki Hasegawa. Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey. *Int J Clin Exp Pathol* 2014, 7(7):4359-4370.
 - 7) Tomoki Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Shoichi Toda, Yukie Shimazu, Koji Yano, Toshiharu Morimitsu, Katsuyuki Ando, Akira Yoshikawa, Miki Kan, Nobuyuki Kato, Takumi Motoya, Tsuyoshi Kuzuguchi, Yasuhiro Nishino, Hideo Osako, Takahiro Yumisashi, Kouji Kida, Fumie Suzuki, Hirokazu Takimoto, Hiroaki Kitamoto, Ken Maeda, Toru Takahashi, Takuya Yamagishi, Kazunori Oishi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, and Masayuki Shimojima. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J. Clin. Microbiol.* 2014 Sep;52(9):3325-33.
 - 8) Aya Zamoto-Niikura, Masayoshi Tsuji, Koichi Imaoka, Masanobu Kimura, Shigeru Morikawa, Patricia J. Holman, Haruyuki Hirata, and Chiaki Ishihara. Sika Deer Carrying *Babesia* Parasites Closely Related to *B. divergens*, Japan. *EID*, 2014, 20(8):1398-1400.
 - 9) Sunohara M, Morikawa S, Fuse A, Sato I. GATA-dependent regulation of TPO-induced c-mpl gene expression during megakaryopoiesis. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2014;90(4):101-6. PMID: 24815109
 - 10) Naoko Iwata-Yoshikawa, Akihiko Uda, Tadaki Suzuki, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa and Noriyo Nagata. Effects of Toll-Like Receptor Stimulation on Eosinophilic Infiltration in Lungs of BALB/c Mice Immunized with UV-Inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus Vaccine. *J. Virol.* 2014, 88(15):8597-8614. DOI: 10.1128/JVI.00983-14.
 - 11) Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular stomatitis virus. *J Virol.* 2014, 88(13):7317-7330. DOI:10.1128/JVI.00512-14.
 - 12) Yamanaka A, Iwakiri A, Yoshikawa T, Sakai K, Singh H, Himeji D, Kikuchi I, Ueda A, Yamamoto S, Miura M, Shioyama Y, Kawano K, Nagaishi T, Saito M, Minomo M, Iwamoto N, Hidaka Y, Sohma H, Kobayashi T, Kanai Y, Kawagishi T, Nagata N, Fukushi S, Mizutani T, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurane I, Kageyama T, Odagiri T, Saijo M, Morikawa S. Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. *PLoS One.* 2014 Mar 25;9(3):e92777. doi: 10.1371/journal.pone.0092777.
 - 13) 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.
 - 14) 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*, 2014 Apr;14(4):234-9

- 15) 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.
2. 学会発表
1. 堀田明豊、棚林清、山田章雄、森川茂. 国内の医師および獣医師への One Health についての意識調査. 第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月
 2. 堀田明豊、木村昌伸、中村幸子、片山敦司、中下留美子、坪田敏男、猪島康雄、鈴木道雄、今岡浩一、棚林清、藤田修、山本美江、宇田晶彦、森川茂. 2007 年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)に対する抗体調査. 第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月.
 3. 堀田明豊、木村昌伸、坪田敏男、中村幸子、片山敦司、中下留美子、猪島康雄、鈴木道雄、今岡浩一、棚林清、藤田修、山本美江、宇田晶彦、森川茂. 「2007 年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) に対する抗体調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 4. 藤田修、宇田晶彦、木村昌伸、藤田博己、今岡浩一、森川茂. 「ニホンジカから採取したダニ類のウイルス遺伝子保有状況からみた自然界における SFTS ウイルス維持様式の検討」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 5. 森川茂、木村昌伸、堀田明豊、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、野口章、井上智、今岡浩一、前田健. 「野生のシカにおける SFTS ウイルス抗体調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 6. 浜崎千菜美、鎌田龍星、野口慧多、寺田豊、下田宙、高野愛、鈴木和男、森川茂、前田健. 「野生動物における SFTS ウイルス感染の疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 7. 松本苑子、橋野正紀、鈴木尋、高野愛、藤田修、堀田明豊、森川茂、高田伸弘、渡邊健太、清水隆、度会雅久. 「ダニにおける Francisella tularensis の全国的疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 8. 堀田明豊、棚林清、山田章雄、森川茂. 「国内の医師および獣医師への One Health についての意識調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 9. 加来義浩、奥谷晶子、河合康洋、野口章、濱本紀子、梁瀬徹、加藤友子、新井智、井上智、森川茂. 「国内で分離された未分類のラプトウイルスの遺伝学的解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 10. 新倉綾、森川茂、平田晴之、石原智明. 「北海道のシニツマダニ *Ixodes persulcatus* から分離された *Babesia microti* の性状解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 11. 新井智、池山優、Boldgiv Bazartseren、Boldbaatar Bazartseren、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、森川茂、Yanagihara Richard、大石和徳. 「モンゴルのトガリネズミに確認された遺伝的に異なるハンタウイルスの共循環」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 12. 池山優、新井智、Kang Haeji、大館智志、Taylor Kyle、中田圭亮、雲野明、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、森川茂、Yanagihara Richard、大石和徳. 「Sarufutsu virus ; オオアシトガリネズミに感染を確認した新規ハンタウイルス」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 13. 朴ウンシル、鈴木道雄、木村昌伸、丸山啓二、水谷浩志、斉藤隆一、久保田菜美、古谷哲也、水谷哲也、今岡浩一、森川茂. 「日本のネコにおける新規モルビリウイルス(feline morbillivirus, FMV)の疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 14. 森川茂、朴ウンシル、今岡浩一、前田健、宇田晶彦. 「SFTS ウイルスの生活環における野生のシカの役割」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
 15. 西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福岡藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸. 「重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
 16. 前田健、濱崎千菜美、下田宙、鎌田龍星、野口慧多、米満研三、高野愛、鈴木和男、森川茂. 「SFTS ウイルスの生活環における動物の重要性」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
 17. 朴ウンシル、佐藤由子、中島典子、古谷哲也、水谷哲也、今岡浩一、森川茂. 「日本国内ネコにおける新規モルビリウイルス (feline morbillivirus, FMV) の疫学調査」第 62 回日

- 本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
18. 河内健吾、氏家誠、谷英樹、森川茂、田口文広。「Baculovirus を用いた牛 Torovirus の可溶性 HemagglutininEsterase protein の発現」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
 19. 新井智、池山優、Se Hun Gu, Son Truong Nguyen, 福井大、大館智志、吉川泰弘、森川茂、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、Richard Yanagihara、大石和徳。「ベトナムの翼手目由来に確認されたハンタウイルスの多様性」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
 20. 谷英樹、谷口怜、福間藍子、福士秀悦、森川茂、下島昌幸、西條政幸。「重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP の細胞融合能と 25-hydroxycholesterol による感染阻害効果」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
 21. 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、江川和孝、下島昌幸、森川茂、西條政幸。「ワクシニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
 22. Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushima, Aiko Fukuma¹ Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani¹ Tomoyuki Yoshikawa, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in domestic and wild animals in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
 23. Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushima, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Masayuki Shimojima¹, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
 24. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushima, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Analyses of cell entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus using pseudotype vesicular stomatitis virus system. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
 25. Akihiko Uda, Hiroki Kawabata, Shuetsu Fukushima, Yoshiharu Kaku, Masayuki Shimojima, Shuji Ando, Ken Maeda, Hiromi Fujita, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Sawabe Kyoko. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
 26. Yu Ikeyama, Satoru Arai, Bazartseren Boldgiv, Bazartseren Boldbaatar, Kazuko Araki, Hiroshi Satoh, Keiko Tanaka-Taya, Shigeru Morikawa, Richard Yanagihara, Kazunori Oishi. Co-circulation of two distinct divergent hantaviruses in Sorex species in Mongolia. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
 27. Shigeru Morikawa, Akihiko Uda, Masanobu Kimura, Kawabata, Hiroki, Shuetsu Fukushima, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Shuji Ando, Sawabe Kyoko, Hiromi Fujita, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in animals and ticks in Japan. The 10th China-Japan International Conference of Virology, Changchun, China, Aug25-28 2014.

G 知的財産権の出願・登録状況
現在出願予定はない。

図 1. エボラウイルス GP 発現組換えバキュロウイルスの模式図

Construction of rec-Baculoviruses

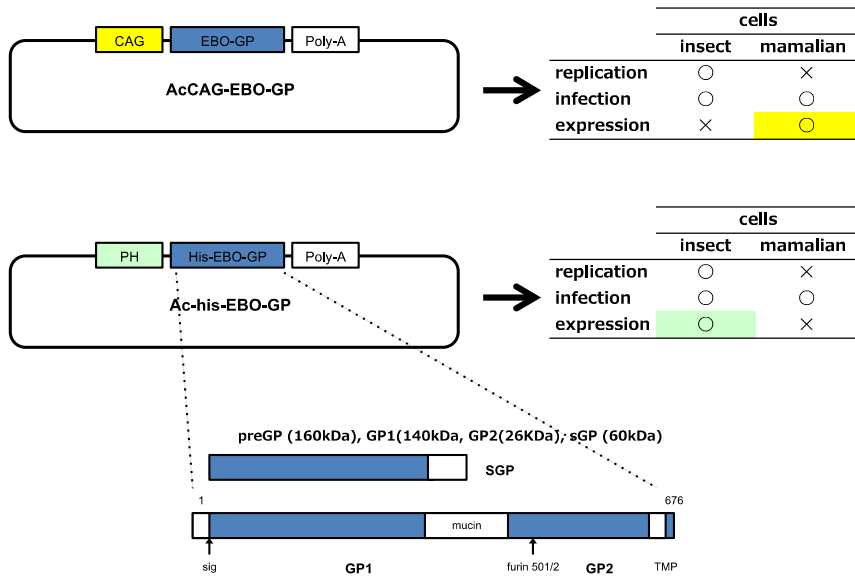


図 2. 組換えバキュロウイルス感染細胞でのエボラウイルス GP の発現
preGP (160kD), GP1(140kDa, GP2(26kDa), sGP (60kDa)

