

図10. ウサギ抗THOV NPペプチド抗体を用いたウエスタンブロット解析
 THOV HI-Kamigamo-25株非感染VeroE6細胞(レーン1)と感染VeroE6細胞抽出液(レーン2)を、4-12%SDS-PAGE上に展開し、PVDF膜にブロットした。次に、PVDF膜に展開させた蛋白質に抗THOV NPペプチド抗体を反応させ、THOV NPを検出した。矢印はTHOV NPを示す。レーンMは蛋白質のサイズマーカーを泳動した。

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
分担総合研究報告書

病原体及び毒素の管理システムおよび評価に関する総括的な研究(H24-新興-一般-013)

ヒトに病原性のある呼吸器感染症起因病原体の解析とリスク分類

研究分担者 西村秀一 国立病院機構仙台医療センター臨床研究部
ウイルス疾患研究室・室長

研究要旨:

呼吸器系ウイルス感染症についてのリスク管理に必要な情報を得ることを目的に、広範囲にわたる疫学、臨床、ウイルスの性質等の情報を収集した。さらにはそこで不足している、外部環境中のウイルスの活性維持あるいは失活のための条件の実験的検討、あるいは、環境中に存在するウイルスの不活化手段の妥当性の有無に関する実験的検討のために、方法論を確立した。情報収集対象の中での主要な位置を占めるインフルエンザウイルスを対象に、独自の実験により空中浮遊時ならびに環境表面付着時の、気温・湿度と活性保持時間の関係を調べた。また特殊装置あるいは特殊化合物の空中への拡散によるウイルス不活化や殺菌作用を謳う市販製品が、果たして実生活環境あるいは実験室内環境下で効果があるのか、何らかの効果があるとすれば、その効果発揮に必要な条件は何かといった観点で、実際のウイルス不活化/殺菌作用を検証した。

A. 研究目的 ウイルスの病原性やヒトにおける伝染性等の情報はウイルスの管理上必要な情報であり、それをコンパクトにまとめられれば、ウイルスを保存する各施設における保存や取り扱いの上で、使い勝手の良い有用な情報集となる。よって、その作成に参加する。

また、そうした情報の中に欠けている、外部環境へのウイルス漏出の際の、ウイルス汚染の問題に関して、ウイルスの不活化に関する知見収

集の観点からの実験系をつくり、実際に応用してみる。さらに、リスク管理としては、呼吸器系ウイルスに対する治療薬候補の検索も大事であり、情報収集のみならず既存の薬物での対応の可能性も探るべきであり、その例として、ヒト初代呼吸器上皮細胞を用いてウイルスの既存薬物への感受性を調べる方法論の確立を試みた。

B. 研究方法

1) 呼吸器系ウイルス感染症についてリスク管理に必要な情報を得ることを大目的とし、文献的情報収集を行った。

2) さらに、環境中のウイルスの安定性に関するデータ収集のための実験系の確立を試みた

3) 呼吸器系ウイルスに対する治療薬候補の検索を目的に、ヒト初代呼吸器上皮細胞を用いてウイルスの薬剤感受性を調べる方法論の確立を試みた

(倫理面からの配慮について)

倫理面で問題になるようなことは、特にない

C. 研究結果

1) 呼吸器系ウイルス感染症についてリスク管理に必要な情報を得ることを目的に情報収集を行った。とくに従来のBSL分類に含まれていない近年注目され始めた呼吸器系ウイルスについて遺漏なく情報収集することを心がけ、集めた病検体を情報は、新規病原体調査表として研究代表者がとりまとめたものの中に掲載された。さらに、SARS コロナウイルス（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス）、MERS コロナウイルス（中東呼吸器症候群コロナウイルス）、A/H5N1インフルエンザウイルス、A/H7N9インフルエンザウイルスに関する、疫学・臨床情報の収集を行った。以上の試みで収集された情報は、今後、研究代表者が編集予定のガイドラインの中に生かされる予定である。

2) 病原体が外部環境に漏れた場合の環境中における活性の維持/喪失に関しては、これまでほとんど情報がなかった。そこで、そうしたデータの取得のための方法論の確立を目的に、インフルエンザウイルスを例に、空中浮遊時ならびに環境表面付着時における気温・湿度と活性保持時間

の関係を調べるための独自の実験系の確立を試み、ほぼ立ち上げることができた。これによって温度・湿度と空中浮遊ウイルスの失活の関係を調べたところ、我々の系でも、HarperやShafferらの古典的系による実験の成績に基づいて従来言われてきたこととほぼ同じ傾向が確認された。現在、浮遊途中で湿度が急激に変わった場合に、ウイルスの失活率にそれに応じた変化が短時間で現れるのかを調べる実験を行っている。

3) また、これを用いて二酸化塩素を含むゲル基材から生活空間に二酸化塩素を芳香剤のように放出することで生活空間あるいは環境表面のウイルス不活化や殺菌効果を謳う市販製品を対象に、実際の効果を上述の我々の実験系でためしてみたところ、ウイルスの積極的失活は、湿度に依存しており、70%RHといった高湿度条件下で100ppb近い高い空間濃度が得られた場合著しいものの、冬の室内環境に相当するような乾燥状態25%RHでの効果はほとんどないことが判明した。そこで、製品ではない純粋な二酸化塩素そのもので実験したところ、同様の成績となった。なお、一方で黄色ブドウ球菌を用いた実験では、上述の100ppb付近の空間濃度であっても殺菌効果は認められなかった。

4) ヒト気管上皮細胞を用い、抗ウイルスを目的としない薬剤の、呼吸器系ウイルスに対する抗ウイルス作用を調べた。ライノウイルス、RSウイルスに対して調べた結果、去痰薬 Ambroxol、急性喘息治療薬 Tiotropium にライノウイルスの増殖を、また喘息、COPD薬 Formoterol 気管支喘息治療用ステロイド Budesonide、去痰薬

l-carbocysteine に RS ウイルスの増殖を、同細胞において有意に抑制する作用を認めた。これによって呼吸器系ウイルスに対する治療薬候補の検索の上で、*in vitro* における既存薬剤の効果を調べるほぼ最終段階の実験系としての例を示すことができた。

D. 考察

今回はインフルエンザウイルスを代表として方法論の確立を試みたが、今後はいろいろなウイルスで試す必要がある。とくに環境付着ウイルスに対するやり方は、将来的に BSL4 の実験施設が稼動した際には、エポラウイルス等、極めて危険なウイルスに対しても応用可能であろう。

E. 結論

今後も、呼吸器系ウイルスの感染に関する知見について情報収集と指針情報の改定と、それに基づく対応準備を継続的に行うべきである。

また、我々がインフルエンザウイルスでおこなった外部環境中のウイルスの活性に関する研究をすべてのウイルスで実施することが望ましい。

それとともに、環境中のウイルスを失活させる適切な方法の模索が必要であり、それらの使用条件の検討ならびに無効な方法の排除のための検証が大事である。また、特異的治療法に乏しいウイルス感染症においても、既存の薬剤の効果を、今一度試してみるという戦略も、選択肢の一つとして考えるべきである。

F. 健康危険情報

H7N9 インフルエンザや MERS については、本報告書を記載している現在、さしあたり目前に迫

った大きな脅威は存在しない。だが、そうとはいえ、危機管理という観点からは、油断することなく本邦での発生時の準備を、水面下で粛々と進めておくべきであろう。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Katsushima Y, Katsushima F, Suzuki Y, Seto J, Mizuta K, Nishimura H, Matsuzaki Y: Characteristics of mycoplasma pneumoniae infection identified by culture in a pediatric clinic. *Pediatr Int*, 57: 2014 Sep 29. doi: 10.1111/ped.12513.
- 2) M Yamaya, LK Nadine, C Ota, H Kubo, T Makiguchi, R Nagatomi, H Nishimura. Magnitude of influenza virus replication and cell damage is associated with interleukin-6 production in primary cultures of human tracheal epithelium. *Resp. Physiol.Neurol.*, 202: 16-23, 2014.
- 3) E Hatagishi, Okamoto, Ohmiya, H Yano, T Hori, W Saito, H Miki, Y Suzuki, R Saito, T Yamamoto, M Shoji, Y Morisaki, S Sakata, H Nishimura: Establishment and Clinical Applications of a Portable System for Capturing Influenza Viruses Released through Coughing. *PLOS ONE* 2014 Aug 1;9(8):e103560. doi: 10.1371
- 4) Yamaya M, Nishimura H, Nadine LK, Ota C, Kubo H, Nagatomi R: Ambroxol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Arch Pharm Res* 37, 520-529, 2014.
- 5) Yamaya M, Nishimura H, Nadine L, Kubo H,

- Nagatomi R: Formoterol and budesonide inhibit rhinovirus infection and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Respiratory Investigation* 52:251–260, 2014.
- 6) M Yamaya, L Nadine, H Kubo, K Saito, R Saito, H Nishimura: Effects of neuraminidase inhibitors on the release of oseltamivir-sensitive and oseltamivir-resistant influenza viruses from human airway epithelial cells. *Journal of Medical Virology* DOI: 10.1002/jmv.23974, 2014
- 7) E Takashita, M Ejima, R Itoh, M Miura, A Ohnishi, H Nishimura, T Odagiri, M Tashiro: A community cluster of influenza A (H1N1) pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveillance*, 19:1–6, 2014
- 8) Y Matsuzaki, K Sugawara, C Abiko, T Ikeda, Y Aoki, K Mizuta, N Katsushima, F Katsushima, Y Katsushima, T Itagaki, Y Shimotai, S Hongo, Y Muraki, H Nishimura: Epidemiological information regarding the periodic epidemics of influenza C virus in Japan (1996–2013) and the seroprevalence of antibodies to different antigenic groups. *J Clinical Virol.* 61: 87–93, 2014
- 9) K Fukushima, T Takahashi, S Ito, M Takaguchi, M Takano, Y Kurebayashi, K Oishi, T Kato, E Y Park, H Nishimura, T Takimoto, T Suzuki: Terminal Sialic Acid Linkages Determine Different Cell Infectivities of Human Parainfluenza Virus Type 1 and Type 3. *Virology* 464–465, 424–431, 2014.
- 10) Vinh QN, Abe S, Sun G, Matsuoka A, Nishimura H, Ishuhara M, *Matsui T: Rapid screening for influenza using a multivariable logistic regression model to save labor at a clinic in Iwaki, Fukushima, Japan. *American Journal of Infection Control* 42:551–553, 2014
- 11) Z Ysng, A Suzuki, O Watanabe, M Okamoto, A Ohmi, W Huang, and H Nishimura: An outbreak of human metapneumovirus in a severe motor-and-intellectual disabilities' ward in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 67:318–32, 2014
- 12) K Tajima, H Nishimura, S Hongo, M Hazawa, A S-Nakamura, K Tomiyama, C Obara, T Kato: Estimation of secondary measles transmission from a healthcare worker in a hospital setting. *International Journal of Infectious Diseases* 24: e11–e13, 2014
- 13) H Nishimura, S Sakata, A Kaga: A New Methodology for Studying Dynamics of Aerosol Particles in Sneeze and Cough Using a digital high-vision, high-speed video system and vector analyses. *PLoS ONE* 8: e80244. doi:10.1371/journal.pone.0080244, 2013.
- 14) E Takeshita, Y Muraki, K Sugawara, H Asao, H Nishimura, K Suzuki, T Tsuji, S Hongo, Y Ohara, Y Kawaoka, M Ogawa, Y Matsuzaki: Intrinsic Temperature Sensitivity of Influenza C Virus Hemagglutinin–Esterase–Fusion Protein. *J. Virol.*, 86: 13108–13111, 2012.
- 15) M Yamaya, H Nishimura, L Nadine, H Kubo, R Nagatomi: Tulobuterol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of

- human tracheal epithelial cells. *Physiological Reports* 2013. 1: e00041.
- 16) K Mizuta, C Abiko, Y Aoki, T Ikeda, Y Matsuzaki, S Hongo, T Itagaki, N Katsushima, A Ohmi, H Nishimura, and T Ahiko: Molecular epidemiology of Coxsackievirus A16 strains isolated from children in Yamagata, Japan between 1988 and 2011. *Microbiol. Immunol.* 57: 400–405, 2013.
- 17) S Yamayoshi, S Iizuka, T Yamashita, H Minagawa, K Mizuta, M Okamoto, H Nishimura, K Sanjoh, N Katsushima, T Itagaki, Y Nagai, K Fujii, and S Koike: Human SCARB2-Dependent Infection by Coxsackievirus A7, A14, and A16 and Enterovirus 71. *J. Virol.* 86: 5686–5696, 2012.
- 18) A Takeyama, K Hashimoto, M Sato, S Kanno, K Takano, M Ito, M Katayose, H Nishimura, Y Kawasaki, M Hosoya: Rhinovirus load and disease severity in children with lower respiratory tract infections. *J. Med. Virol.* 84: 1135–1142, 2012.
- 19) Yamaya M, Nishimura H, Hatachi Y, Yasuda H, Deng X, Sasaki T, Mizuta K, Kubo H, Nagatomi: Levofloxacin inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 4052–61, 2012.
- 20) Ebina M, Taniguchi H, Miyasho T, Yamada S, Shibata N, Ohta H, Hisata S, Ohkouchi S, Tamada T, Nishimura H, Ishizaka A, Maruyama I, Okada Y, Takashi K, Nukiwa T.: Gradual increase of high mobility group protein b1 in the lungs after the onset of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Med*, 91: 64–86, 2012.
- 21) M Yamaya, H Nishimura, Y Hatachi, H Yasuda, X Deng, T Sasaki, H Kubo and R Nagatomi: Inhibitory effects of Tiotropium on rhinovirus infection in human airway epithelial cells. *European Respiratory J.*, 40: 122–132, 2012.
- 22) K Shirato, M Kawase, O Watanabe, C Hirokawa, S Matsuyama, H Nishimura and F Taguchi: Differences in neutralizing antigenicity between laboratory and clinical isolates of HCoV-229E isolated in Japan in 2004–2008 depend on the S1 region sequence of the spike protein. *J. Gen. Virol.*, 39: 1908–1917, 2012.
- 23) T Kooriyama, M Okamoto, T Yoshida, T Nishida, T Tsubota, A Saito, M Tomonaga, T Matsuzawa, H Akari, H Nishimura, T Miyabe–Nishikawa: Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees. *Primates*, DOI 10.1007/s10329-012-0320-8, 2012.
- 24) Asada M, Yoshida M, Hatachi Y, Sasaki T, Yasuda H, Deng X, Nishimura H, Kubo H, Nagatomi R, Yamaya M: l-Carbocysteine inhibits respiratory syncytial virus infection in human tracheal epithelial cells. *Respir Physiol Neurobiol.*, 180: 112–118, 2012.
- 25) 菱川容子, 橋本真帆, 倉橋宏和, 別府玲子, 大谷可菜子, 西村秀一: 重症心身障害児(者)施設におけるヒトメタニューモウイルスの集団感染と重症例の発生 日本重症心身障害学会誌 39:379–386, 2014.

- 26) 山口育男, 青山知枝, 山本優, 木下恵子, 伊藤由美, 西村秀一: イムノクロマト法インフルエンザウイルス抗原検出キット BD ペリターシステム Flu における機器判定の感度とその目視判定に対する優越性の検討. 日本臨床微生物学雑誌 23:39-44, 2013.
- 27) 西村秀一: 殺菌性能を有する空中浮遊物質の放出を謳う各種電気製品の, 寒天平板培地上の細菌に対する殺菌能の本体についての解析. 感染症学会誌 86: 723-733, 2012.
- 28) 西村秀一: 殺菌能力を謳う各種空気洗浄電気製品の, 塗布乾燥状態の細菌に対する効果の有無の検証. 日本環境感染学会誌 27: 342-345, 2012.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし
1. 特許取得
- なし
2. 実用新案登録
- なし
3. その他
- なし

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
分担総合研究報告書

病原体及び毒素の管理システムおよび評価に関する総括的な研究(H24-新興-一般-013)

ヒトに病原性のあるズーノーシス起因病原体の解析とリスク分類の研究

研究分担者 奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部・主任研究官

研究要旨:

発生が稀だが、公衆衛生上極めて重大な影響を与えうる動物由来感染症(Zoonoses)の海外および国内での発生状況に関する調査を行った結果、新興・再興感染症としてヒトに重篤な症状を引き起こす可能性のある細菌性およびウイルス性の疾病に関する発生リスク判定のための基礎的発生動向データの蓄積ができ、継続したモニタリングの必要性が明らかとなった。

A. 研究目的

ヒトに重篤な症状を引き起こす可能性のある動物由来感染症の海外および国内での発生状況を調査し、発生リスクに応じた備えを可能とするため、PubMed を始めとした各種発生報告からのデータ収集と、対象となる疾病毎に発生リスクを評価し、万一の発生に備えを行うことが目的である。

B. 研究方法

4) PubMed を肇とする各種の発生動向調査によるヒトに病原性のあるズーノーシス起因病原体の検索。
PubMed による細菌性ズーノーシスの発生報告を収集するための文献検索は以下のキー

ワードを組み合わせる調査集計した。ただし、最近の発生について調査するため、2000 年以降の文献に限定した。抽出された文献を病原体毎に分類し、発生報告数が 3 報以上の病原体についてリスク分類を行った(図 1)。検索キーワード「zoonoses」「bacterial」「human」「patient」「animal」

また、ProMed や OIE からの報告による発生動向調査も同時に行い、網羅的な発生動向調査システムについて検討した。

C. 研究結果

平成 24 年度からの調査において、発生が稀な新興・再興感染症の発生報告としては文献ベースの検索である PubMed が最も有

効であると思われた。事例報告も充実しており、検索も容易であった。一方、OIE あるいは ProMed による発生報告では既に監視伝染病としてリストアップされている炭疽、ブルセラ症、鼻疽、類鼻疽といった既知の疾病発生動向は追跡できたものの新規疾病への対応には限界があることが明らかとなった。

D. 考察

新興・再興感染症のなかでヒトに重篤な病原性をもつ細菌性およびウイルス性の動物由来感染症は様々な疾病の発生が報告されていることが明らかとなった。これらの中には病原性メカニズムや感染源、感染経路が明確ではないものも複数あることからの確なリスク管理が求められる。

E. 結論

動物由来感染症は数多く発生しているが、新興・再興かつヒトへの重篤な病原性を示す可能性のある疾病の発生頻度は低いレベルであり、日本国内での発生もみられなかった。一方、輸入感染症として国内に侵入する可能性は常にあるので継続した発生動向モニタリングおよび的確な発生リスク管理が必要であり、それを可能とするシステムの構築を行うことが重要であると思われる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

なし

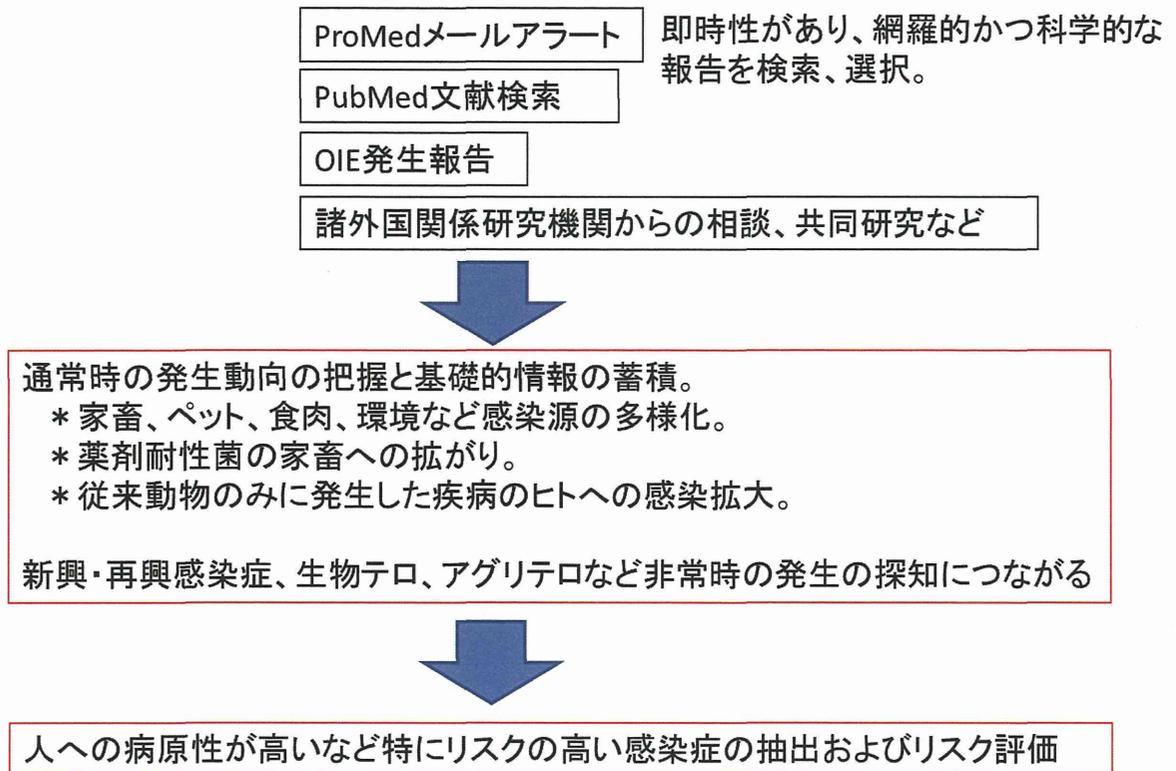
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図を挿入

図 1. 細菌性およびウイルス性新興・再興動物由来感染症の発生動向の把握のためのフローチャート

細菌性およびウイルス性新興・再興動物由来感染症の発生動向の把握



継続した情報収集により平時の傾向および流行地域の絞り込みなどが把握可能となる

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
分担総合研究報告書

病原体及び毒素の管理システムおよび評価に関する総括的な研究(H24-新興-一般-013)

ヒトに病原性のある出血熱ウイルスの解析とリスク分類に関する研究

研究分担者 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

研究要旨:

ヒトに致死性の高い出血熱をひき起こすウイルスの性状について文献的評価に基づくリスク解析、ドイツ・ハンブルグの BSL-4 施設における BSL-4 病原体検査および施設仕様に関する情報の収集、病原体管理システム ICBS の試験運用と評価を本研究において行った。また、BSL-4 病原体の感染性評価モデルとして新規レポータータンパク質を用いたシュードタイプウイルスによる感染性アッセイ法を確立した。

A. 研究目的

- 1) ヒトに致死性の高い出血熱をひき起こすウイルスの性状について文献的評価を行い、リスク解析を行う。
- 2) 諸外国における BSL-4 病原体管理・使用の現状について情報を収集し、わが国のバイオセーフティおよびバイオセキュリティの向上に役立てる。
- 3) 病原体管理システム ICBS の試験運用を行い、システムの評価を行う。
- 4) BSL-4 病原体の増殖機構の解析、および抗ウイルス化合物スクリーニング系として有用なシュードタイプウイルスによるフィロウイルス感染性評価モデルの確立を行う。

B. 研究方法

1) 出血熱ウイルスのリスク解析

ヒトに出血熱を引き起こす BSL-4 病原体について学術論文・総説等を分析し、リスク解析を行った。

2) BSL-4 施設の情報の収集

ドイツ・ハンブルグ市にあるベルンハルト・ノホト熱帯医学研究所(BNI)(図 1)の BSL-4 を訪問し、病原体管理体制について情報収集を行った。

3) 病原体管理システムの試験運用

平成26年度より国立感染症研究所にて開発された病原体管理システム ICBS を長崎大学熱帯医学研究所新興感染症学分野に導入し、BSL-2 病原体の管理作業を試験的に行った。

4) シュードタイプウイルスの作製

マウス白血病ウイルス(MLV)の Gag-Pol を恒常的に産生する GP2-293 細胞を用いて、エボラウイルス(EBOV)またはマールブルグウイルス(MARV)の表面糖タンパク質 GP を外套し、深海エビ由来高発光ルシフェラーゼ NanoLuc™(Nluc)遺伝子をレポーターとして搭載したシュードタイプ MLV を作出した(図2)。ヒトおよびサル由来の各種細胞株に対して、シュードタイプ MLV 感染させ、2-6日間培養後に細胞内のNluc活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した。Nluc 活性値よりEBOVまたは MARV GP による細胞への感染性を定量、評価した。

(倫理面からの配慮について)

該当なし。

C. 研究結果

1) 出血熱ウイルスのリスク解析

ヒトに出血熱を引き起こすフィロ、ブニヤ、アレナウイルス科のウイルスについて、ウイルス学上の分類、ヒトへの感染性、宿主、ヒトへの感染経路、分布、臨床像、致死率、ワクチンの有無、有効な薬剤の有無、実験室感染の有無、院内感染の有無、培養の可否、培養方法、病原体の保管方法、利用可能な実験動物、動物間における感染リスクをまとめた(表1)。

2) BSL-4 施設の情報の収集

BNI は旧棟と新棟からなり(図 1)、旧棟の BSL-4 実験室は 30 年以上前に設置され、これまでに多くの研究成果をあげてきただけで

なく、ドイツ、オランダ、ベルギーで発見された出血熱の輸入感染症例の診断も行ってきた(表2)。BSL-4 実験室は駐輪場に面しており、駐輪場側の4つの窓(防弾ガラスを使用)から実験室内が丸見えである。約 35m² の実験室内には 壁面オートクレーブ、安全キャビネット、CO₂ インキュベーター、高速遠心機、超遠心機、顕微鏡、冷凍庫などがある。実験室内は常に-50Pa の陰圧に制御されている。給排気は各2重のHEPAフィルターを介して外気と連絡している。停電時に備えて非常用電源もある。薬液シャワーには1.5%過酢酸を使用しており、退出時には3分間の薬液シャワーを浴び、その後5分間水のシャワーで水洗する。排液は水酸化ナトリウムで中和後、高温滅菌されてから排水される。次亜塩素酸等ではなく過酢酸を使用しているのは環境への負荷を考慮しているからである。BSL-4 病原体は実験室内の冷凍庫に保管されている。

新棟のBSL-4は2012年中に稼働開始する予定であり、40m²(小実験室)と70m²(大実験室)の独立した2ユニットのBSL-4実験室を有する。各実験室の入り口は別になっており、前室、スーツ室、薬液シャワー室を有する。両室の間には扉があり、往来できる。BSL-4 区域の扉はすべて空気調整式の完全密閉性扉である。廊下側には複数の窓(3重ガラス構造:内側より断熱ガラス・強化ガラス・防弾ガラス)があり、実験室内の様子を見ることができる。実験者は廊下の反対側にある更衣室で着替え、前室から入室し、スーツ室、薬液シャワー(過酢酸)室を通り、実験室に入る。BSL-4 実験室では最大5名が作業できる。各実験室

(ユニット)には壁面オートクレーブ、パスボックス、クラスⅡ安全キャビネット(2台)、CO₂インキュベーター(2台)、-80℃および-152℃の超低温槽、耐火薬品庫が設置してある。また、大実験室内には動物飼育設備(マウス、ハムスター、モルモット用)も完備している。-50Paの陰圧制御、2重のHEPAフィルターを介した排気、非常用電源の完備、薬液シャワーに過酢酸を使用など、基本的には旧棟のBSL-4と同様の仕様である。BSL-4病原体は実験室内の-80℃および-152℃の超低温槽で保管される。実験室はステンレスの函体構造であり、密封性を確保するために接続はネジなどを使用せず、溶接が施されている。また、室内に機器・配管等を取り付けるためのビスやボルトもすべてステンレス面に溶接固定されている。配管やラインについても外部への接続部分は密閉性を確保できるように工夫されている。配管等はすべてむき出しでメンテナンスし易くなっている。実験室の床は耐薬シートで扉部分には敷居(段差)があるため、火災時など室内に水が散布されても7,200Lまでは室外に漏出しない。BSL-4実験室内には流し等はなく、排液は薬液シャワー排液(過酢酸含有)および火災時の消火水のみである。これらの排液は地下にある排液処理装置で処理された後、排出される(水酸化ナトリウムで中和後、121℃で熱処理)。処理能力は1時間に250Lである。

3) 病原体管理システムの試験運用

長崎大学熱帯医学研究所新興感染症学分野にて所有するBSL-2病原体2種をICBSに登録し、保管バイアル数、使用本数等の管理

を行った。

本システムは、従来の帳簿記載による管理方法と比較し全体として有用性が高いとの意見があった。個別には、①現行では、バーコードリーダーで読み取った各バイアルの情報を管理用PC画面上で見る形だが、液晶画面付のバーコードリーダーの使用等により、バイアル情報をバーコードリーダー上で閲覧、更新できると良い、②バーコードリーダー端末からのサーバーPCへのデータの遠隔入力ができるると利便性がよい、③バイアル使用時に即入力できるため記入漏れの防止にも繋がる、などの意見があった。

4) シュードタイプウイルスの作製

EBOVまたはMARV GPを外套したシュードタイプウイルス(MLV/EBOV-GP, MLV/MARV-GP)の作製条件(DNAトランスフェクション量、上清回収時間)を決定した。EBOVおよびMARVの細胞侵入過程を阻害するカテプシンB阻害剤(CA-074)、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤(Chlorpromazine, CPZ)にて感染前に培養細胞を処理すると被感染細胞のNIuc活性が低下した(図3)。NIuc活性を指標とした感染量の定量に最適な細胞株を探索するため、ヒト由来細胞株A549, SW13, HeLa, Huh-7、および霊長類由来細胞株Vero, VeroE6に同量のシュードタイプMLVを感染させたところ、MLV/EBOV-GP, MLV/MARV-GPについてVeroE6, HeLa, SW13細胞において高いNIuc活性が検出された(図4)。

D. 考察

1) 出血熱ウイルスのリスク解析

出血熱ウイルス 10 種について性状をまとめた。これらの情報はリスク解析に有用であると考えられる。

2) BSL-4 施設における BSL-4 病原体検査および施設運用に関する情報の収集

BNI の BSL-4 では 30 年以上も感染症研究や輸入感染症例の診断に大きな成果を上げてきた。2008 年にオランダで発生したマールブルグ出血熱の輸入感染症例においても、試料の受領からわずか 3 時間半でフィロウィルスを検出し、16 時間以内にマールブルグウイルス感染であることを突き止めている。平素から BSL-4 病原体についての研究を行っているから、このような迅速な対応が取れるのだと思われる。

3) 病原体管理システムの運用

管理対象となる病原体数、バイアル数が更に増加した場合、本システムの有用性は非常に高いと考えられる。運用実績の積み重ねにより更に実用性が高まると考えられる。

4) シュードタイプウイルスの作製

EBOV および MARV GP を外套したシュードタイプ MLV は、GP を介した宿主細胞への感染機構を反映すると考えられる。これを用いた感染性アッセイは、中和抗体価測定法あるいは抗ウイルス作用を示す化合物のスクリーニング法としても応用できると考えられる。

E. 結論

1) 出血熱ウイルス 10 種について性状をまとめ

た。

2) BNI の BSL-4 施設についての情報及び検査の実例を調査した。

3) バーコードリーダー端末による病原体管理システム ICBS を試験運用し、意見収集を行った。

4) フィロウィルス GP を外套したシュードタイプ MLV による感染性アッセイは、感染性ウイルス粒子を用いない感染性評価モデルとして応用できる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Urata S, Yasuda J. Molecular mechanism of arenavirus assembly and budding. *Viruses* 4: 2049-2079, 2012.

2. 学会発表

1) 黒崎陽平, 西村聡子, 浦田秀造, 安田二郎. インターフェロン誘導性抗ウイルス因子, Tetherin/BST-2 によるハザラウイルスの増殖抑制. 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, (2012.12)

2) 黒崎陽平, 西村聡子, 浦田秀造, 安田二郎. ハザラウイルス増殖抑制に関わる細胞性因子. 2nd Negative Strand Virus-Japan, 沖縄, (2013.01)

3) Yasuda, J.: Diagnostic studies of Lassa fever in Nigeria. 6th US-J Medical Biodefense Research Symposium, "New Frontiers in

Medical Biodefense Research Between the United States and Japan”, Nagasaki, Japan (2013.02).	該当なし
4) 黒崎陽平, 浦田秀造, 安田二郎. 抗エボラウイルス剤の開発に向けたシュードタイプウイルスによる感染性アッセイ系の確立. 第54回日本熱帯医学会大会, 長崎, (2013. 10)	1. 特許取得 該当なし 2. 実用新案登録 該当なし 3. その他 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

表 1. 出血熱ウイルスのリスク解析

病原体名	分類(科,属等)	ヒトへの感染性	宿主	ヒトへの感染経路	分布	臨床像	致死率	ワクチンの有無	有効な薬剤の有無	実験室感染の有無	院内感染の有無	培養の可否	培養方法	病原体の保管方法	感染実験を実施する場合には用いられる動物	感染性動物園における感染リスク	参考文献
エボラウイルス	フィロウイルス	有	コウモリ(未確定)	不明	アフリカ、フィリピン(リストン種のみ)	発熱、頭痛、下痢、嘔吐、出血傾向	~8%	無	無	有	有	可	Vero-E6細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管(感染法特定第一種病原体管理基準に従う)。	マウス、モルモット、サル	血液、体液等を介した感染動物との濃厚接触	Fieles Virology 5 th ed.
マールブルグウイルス	フィロウイルス	有	コウモリ(未確定)	不明	アフリカ	発熱、頭痛、下痢、嘔吐、出血傾向、紅斑性丘疹	~90%	無	無	有	有	可	Vero-E6細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管(感染法特定第一種病原体管理基準に従う)。	マウス、モルモット、サル	血液、体液等を介した感染動物との濃厚接触	Fieles Virology 5 th ed.
クリミア-コンゴ出血熱ウイルス	ブニヤウイルス	有	マダニ(Hyalomma属)	マダニの咬傷、汚染家畜との接触	アフリカ、中東~中央アジア	発熱、頭痛、寒熱、消化管出血、黄疸、肝腎不全	5~30%	無	無	無	有	可	Vero-E6細胞、または乳のみマウスの脳内接種	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管(感染法特定第一種病原体管理基準に従う)。	マウス	不明	Fieles Virology 5 th ed.
ラッサウイルス	レナウイルス科 レナウイルス属	有	齧歯目 <i>Mastomys natalensis</i>	主に乾季及び雨季から雨季にかけて宿主がヒトの居るに侵入し、食物等を糞尿で汚染することで感染が拡大する。また、ヒト-ヒトの感染もある。	西アフリカ	発熱、不安感、結核症、疲労、嘔吐、下痢、咽頭炎、出血	1~2%	無	リバビリン	有	有	可	Vero細胞、BHK21細胞やヒト由来培養細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管(感染法特定第一種病原体管理基準に従う)。	マウス、モルモット、マカクサル、マーモセット	不明	Buchmeier M et al. Field Virology 5 th ed. 179-2, 182-7, 2007. Eric Vela. Viruses vol.4 1802-1829 2012
ルジャウイルス	レナウイルス科 レナウイルス属	有	不明	不明、ヒト-ヒト感染、及び動物感染の可能性有。	ザンビア	頭痛、不安感、下痢、嘔吐、発熱、胸痛、脳内浮腫、血小板減少	80% (4/5)	無	無	有	有	可	Vero細胞、BHK21細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管(感染法特定第一種病原体管理基準に従う)。	不明	不明	Brisse et al. PLoS Pathogen vol. 5 (5) e1000455 2009
ブンギウイルス	レナウイルス科 レナウイルス属	有	齧歯目 <i>Calomys merus ulinus</i>	農作物の収穫期において宿主と接触することで感染が拡大する。ヒト-ヒト感染もある。	アルゼンチン	発熱、不安感、頭痛、筋痛、寒熱、嘔吐、下痢、出血	15~30%	Qandif1株(アルゼンチン産でのみ認可)	無	有	有	可	Vero細胞、BHK21細胞やヒト由来培養細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管(感染法特定第一種病原体管理基準に従う)。	モルモット、マウス(FNa/β ₇ R-)	不明	Eric Vela. Viruses vol.4 1802-1829 2012. Kolokoltsova et al. J Virol. vol. 84 (24) 13063-7. 2010
ガナリトウイルス	レナウイルス科 レナウイルス属	有	齧歯目 <i>Zygodontomys brevicauda</i> , <i>Signatodon aberti</i>	農作物の収穫期において宿主と接触することで感染が拡大する。ヒト-ヒト感染もある。	ベネズエラ	発熱、不安感、頭痛、筋痛、寒熱、嘔吐、下痢、出血	25%	無	無	有	有	可	Vero細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管(感染法特定第一種病原体管理基準に従う)。	モルモット、マカクサル	不明	Eric Vela. Viruses vol.4 1802-1829 2012. Hall et al. Am J Trop Med Hyg. Vol. 55 (1) 81-8. 1996
マチュポウイルス	レナウイルス科 レナウイルス属	有	齧歯目 <i>Calomys callosus</i>	宿主がヒトと接触することで感染拡大。	ボリビア	発熱、不安感、頭痛、筋痛、寒熱、嘔吐、下痢、出血	25%	無	無	有	有	可	Vero細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管(感染法特定第一種病原体管理基準に従う)。	マウス(STA11-1)、マカクサル、アフリカドブソウジ	不明	Eric Vela. Viruses vol.4 1802-1829 2012. Bradfute et al. Virol J. vol. 8, 300, 2011
ザビアウイルス	レナウイルス科 レナウイルス属	有	不明	宿主がヒトと接触することで感染拡大。	ブラジル	発熱、白血球・血小板減少	33%	無	無	有	有	可	Vero細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管(感染法特定第一種病原体管理基準に従う)。	不明	不明	González et al. Virology vol. 221(2) 318-24. 1996
チャレウイルス	レナウイルス科 レナウイルス属	有	不明	不明	ボリビア	頭痛、発熱、関節痛、嘔吐、出血	不明	無	無	有	有	可	Vero細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管(感染法特定第一種病原体管理基準に従う)。	不明	不明	Delgado et al. PLoS Pathogen vol. 4 (4) e1000047 2008

表 2. BNI の BSL-4 施設での診断実績

日時	感染場所	発症場所	感染症名	感染者
1999 年 8 月	象牙海岸	ドイツ	黄熱	旅行者
2000 年 1 月	象牙海岸	ドイツ	ラッサ熱	旅行者
2000 年 3 月	ナイジェリア	ドイツ	ラッサ熱	ナイジェリア人
2000 年 6 月	シエラレオーネ	オランダ	ラッサ熱	旅行者
2001 年 10 月	ガンビア	ベルギー	黄熱	旅行者
2006 年 7 月	シエラレオーネ	ドイツ	ラッサ熱	シエラレオーネ人
2008 年 7 月	ウガンダ	オランダ	マールブルグ出血熱	旅行者
2009 年 9 月	アフガニスタン	ドイツ	クリミアコンゴ出血熱	米軍人

図 1. ベルンハルト・ノット熱帯医学研究所.



図 2. シュードタイプ MLV によるフィロウィルスの感染性アッセイ

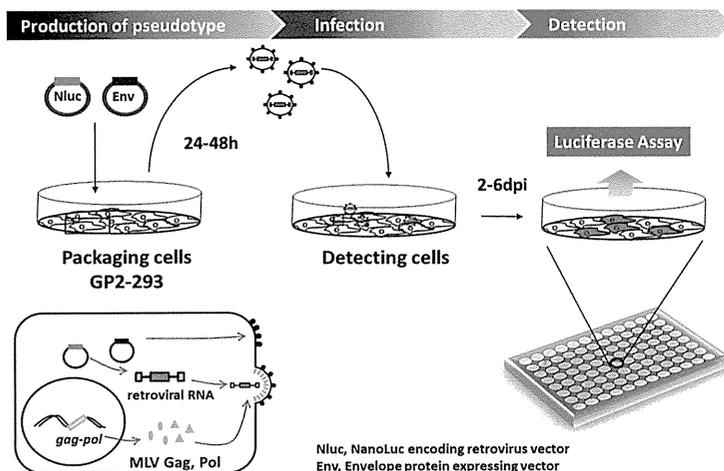


図 3. 薬剤によるGP外套シュードタイプ MLV の感染性への影響.

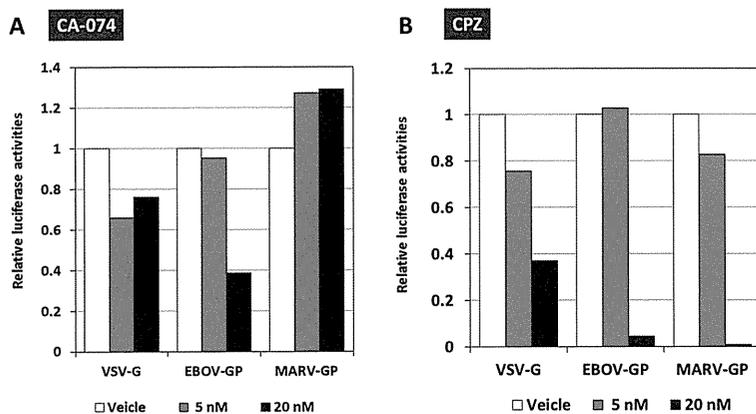
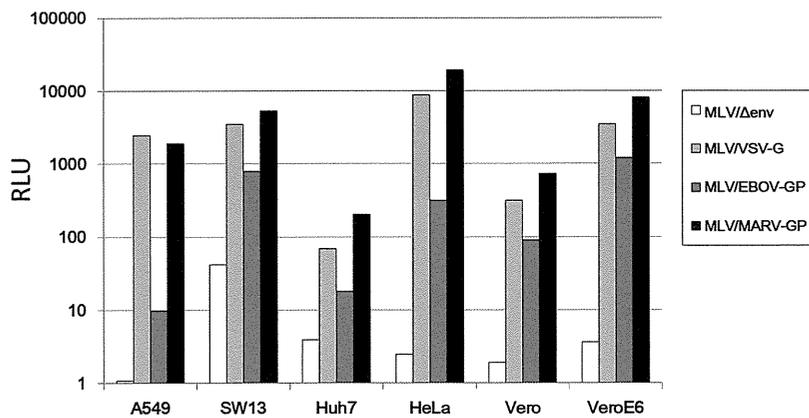


図 4. 各細胞株におけるNluc活性値の比較



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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
分担総合研究報告書

病原体及び毒素の管理システムおよび評価に関する総括的な研究(H24-新興-一般-013)
デングウイルスのゲノム解析およびデータベース化に関する研究

研究代表者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・部長
研究協力者	高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス第一部・室長
	中山絵里	国立感染症研究所ウイルス第一部・研究員
	モイメンリン	長崎大学熱帯医学研究所・准教授
	田島茂	国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

研究要旨：

2014年8月末、海外渡航歴のない患者がデング熱に感染していることが確認された。その後、代々木公園、新宿中央公園等を感染推定地域とする国内症例が合計162例確認された。日本では2010年以降ほぼ毎年200例を超す輸入症例が報告されており、輸入症例を介して国内にデングウイルスが侵入した可能性が高い。2014年は国内流行が終息するまでに44例の輸入症例が報告された。本研究では国内流行株の由来を明らかにすることを目的とし、国内流行株および2014年のデング熱輸入症例由来ウイルスのエンベロップ蛋白質の塩基配列を決定し、系統学的解析を実施した。その結果、国内流行株はアジアで流行するウイルスと近縁で、異なる2株のウイルスが本流行に関与していたことが明らかとなった。

A. 研究目的

2014年のデング熱の国内流行では合計162例が報告された。感染推定地域は最初の症例が報告された代々木公園に留まらず、新宿中央公園、上野公園、千葉県、静岡県等に拡大した。感染推定地域の異なる症例が同一のウイルスによるものか、複数のウイルス株が関与しているかどうかを明らかにすることを目的に本実験を行った。

また、日本では2010年以降ほぼ毎年200例以上の輸入症例が報告されていることから、輸入症例を介してデングウイルスが国内に侵入した可能性が考えられた。デングウイルスは血清型1～4型が存在する。国内流行株と同じ血清型1型に属す輸入症例由来ウイルスと国内流行株の関係を明らかとすることを目的とした。

B. 研究方法

患者血清由来ウイルスのエンベロープの塩基配列をダイレクトシーケンスまたは次世代シーケンサーを用いて決定した。ダイレクトシーケンス実施のため、患者血清から High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて RNA を抽出し、ランダムプライマーおよび Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, CA, USA)を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を Q5 High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, MA, USA) およびプライマーセット, den1s792 (GAGACTTGGGCTTTGCGACAC), den1c2919 (AGTCACGCAATTTCAACCATA)を用いて PCR を行い、増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンスで決定した。次世代シーケンスでは、Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Texas, USA)を用いて患者血清から RNA を抽出し、ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation Kit (Epicentre, WI, USA)を用いて RNA-seq ライブラリーを作成した。作成したライブラリーは Illumina MiSeq を用いて解析した。決定したエンベロープ蛋白質の塩基配列を基に系統学的解析を行った。

(倫理面からの配慮について)

行政検査依頼を通じて分離されたデングウイルス等を用いて解析した。

C. 研究結果

確定診断を行った国内症例 42 例のうち、感染推定地域の異なる症例を中心に 11 例の患者血清中のウイルス遺伝子の塩基配列を決定し、系

統解析を実施した。国内症例第一例目(14-100J)由来のエンベロープの塩基配列 (GenBank : LC002828) は、2013 年の中国の分離株および 2010 年のインドネシアの分離株と近縁であった。また、11 症例中 1 症例(14-181J)を除き、14-100J 由来のエンベロープの塩基配列と 100% 一致した。一方、14-100J と 14-181J 由来のエンベロープの塩基配列の相同性は 98.4%で、1485 塩基中 24 塩基が異なっていた。14-181J は東京の訪問歴がない静岡県在住の患者であった。

デングウイルスには血清型 1~4 型が存在するが、輸入症例 44 例のうち 20 例が国内流行を起こした血清型と同じ 1 型のウイルスによるものであった。血清型 1 型による輸入症例 20 例のうち、9 症例でエンベロープの塩基配列を決定し、系統解析を実施した(図 1)。このうち 8 月末にシンガポールで感染した患者(14-144)由来の配列 (GenBank : LC012534) が国内流行株と近縁で、エンベロープの塩基配列の相同性は 99.9% (1483/1485 塩基)であった。

D. 考察

解析した国内症例 11 例のうち、10 例は第一例目(14-100J)の塩基配列と 100%一致したことから、同一のウイルスによるものと考えられた。一方、14-181J 由来のウイルスは 14-100J と異なるウイルス株であり、2014 年の国内流行は少なくとも 2 種類の異なるウイルス株によって引き起こされていたことが明らかとなった。

輸入症例の患者 14-144 は 8 月 20~24 日にシンガポールを訪問し、21 日にシンガポールで蚊に刺されている。帰国後、国内の感染推定地域の訪問歴はなく、27 日に発症した。14-144 由来の