

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 35m<sup>2</sup> の実験室内には 壁面オートクレーブ、安全キャビネット、CO<sub>2</sub> 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、40m<sup>2</sup> (小実験室) と 70m<sup>2</sup> (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、クラス安全キャビネット(2 台)、CO<sub>2</sub> 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、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、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ことと利便性がよい、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 Nluc 活性が低下した (図 3)。Nluc 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Nluc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).

- 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)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

##### 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

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非動物に感染する動物	感染性動物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 (レズン種のみ)	発熱、頭痛、下痢、嘔吐、出血傾向	~88%	無	無	有	有	可	Ver0-E6細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管 (感染症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	Fields Virology 5 <sup>th</sup> 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	Ver0-E6細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管 (感染症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	Fields Virology 5 <sup>th</sup> 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、紫斑、消化管出血、黄疸、肝腎不全	9~30%	無	無	無	有	可	Ver0-E6細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管 (感染症法特定第一種病原体管理基準に従う)。	マウス	不明	Fields Virology 5 <sup>th</sup> ed.
ラッサウイルス	アレナウイルス科 アレナウイルス属	有	齧歯目 Mastomys natalensis	また乾季及び雨季から雨季にかけて宿主がヒトの居住地に侵入し、家畜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。	高アフリカ	発熱、不安感、筋痛、嘔吐、下痢、咽頭炎、出血	1-2%	無	リバビリン	有	有	可	Ver0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 (感染症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 <sup>th</sup> ed. 1792-1827, 2007. Eric Vela, Viruses vol4 1802-1829 2012
ルジャウイルス	アレナウイルス科 アレナウイルス属	有	不明	不明、ただしヒト-ヒト感染、及び院内感染の可能性有。	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	Ver0細胞、BHK21細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管 (感染症法特定第一種病原体管理基準に従う)。	不明	不明	Briese et al. PLoS Pathogen vol. 5 (5) e1000455 2009
フィンウイルス	アレナウイルス科 アレナウイルス属	有	齧歯目 Calomys mucronatus	糞食物の収穫期において宿主がヒトに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、嘔吐、食欲不振、めまい、出血	15-30%	Candid1株 (アルゼンチンでのみ認可)	無	有	有	可	Ver0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 (感染症法特定第一種病原体管理基準に従う)。	モルモット、マウス (P/Nu (pY R-))	不明	Eric Vela, Viruses vol4 1802-1829 2012. Kolokotsova et al. J. Virol. vol. 84 (24) 13063-7, 2010
ガナリウイルス	アレナウイルス科 アレナウイルス属	有	齧歯目 Zygodontomys brevicauda, Sigmodon alstoni	糞食物の収穫期において宿主がヒトに接触することで感染が拡大する。原因と考えられる。	ベネズエラ	発熱、不安感、頭痛、筋痛、嘔吐、食欲不振、めまい、出血	25%	無	無	有	有	可	Ver0細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管 (感染症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 vol4 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	アレナウイルス科 アレナウイルス属	有	齧歯目 Calomys callosus	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、嘔吐、食欲不振、めまい、出血	25%	無	無	有	有	可	Ver0細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管 (感染症法特定第一種病原体管理基準に従う)。	マウス (STAT1-/-)、マカクサル、アフリカオドリザル	不明	Eric Vela, Viruses vol4 1802-1829 2012. Bradfute et al. Virol J. vol 8. 300, 2011
サビアウイルス	アレナウイルス科 アレナウイルス属	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	Ver0細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管 (感染症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	アレナウイルス科 アレナウイルス属	有	不明	不明	ボリビア	頭痛、発熱、筋痛、嘔吐、出血	不明	無	無	有	有	可	Ver0細胞	密閉容器に入れ、施設できる保管庫に保管 (感染症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・ノホト熱帯医学研究所.



図 2. シュードタイプ MLV によるフィロウイルスの感染性アッセイ

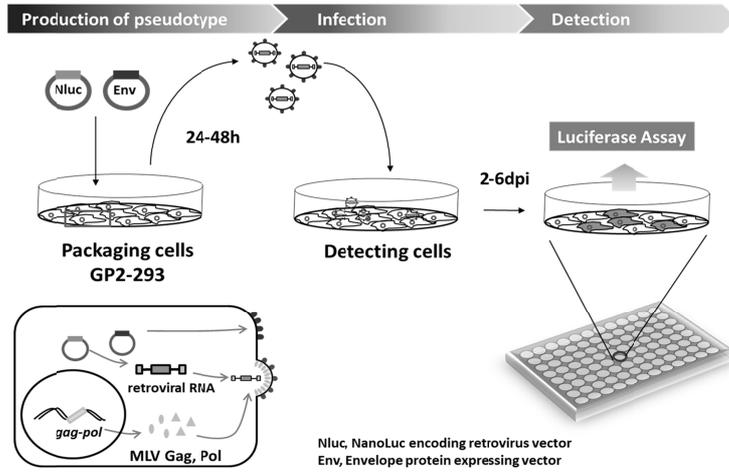


図 3. 薬剤による GP 外套シュードタイプ MLV の感染性への影響.

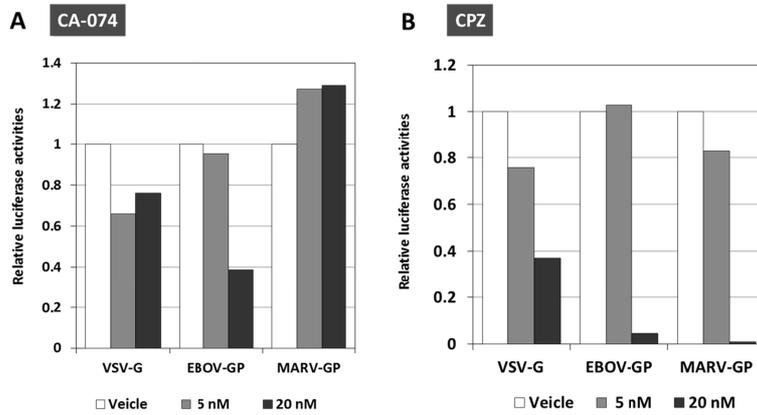


図 4. 各細胞株における Nluc 活性値の比較

