

201420027A

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 26 年度 総括・分担研究報告書

平成 27 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 ……21
3. フィロウイルスの疫学・診断・治療法に関する研究
高田 礼人 ……25
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 ……31
5. 新型レオウイルスに関する研究
小林 剛 ……35
6. レオウイルス等の感染機構と予防・治療への応用
堀本 泰介 ……43
7. 新型レオウイルスの型別抗体検出法の解析
西條 政幸 ……47
8. 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 ……53
9. 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 ……61
10. 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 ……67
11. SEAP 発現型シュードタイプ VSV を用いたニパウイルス中和試験法の高度化および遅発／再発性ニパ脳炎モニタリングへの応用可能性の検討
加来 義浩 ……73
12. 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 ……81

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……91

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、すぐ利用可能な段階まで来ているものから来年度以降の成果が期待されるものまでである。

フィロウイルス感染症では西アフリカでエボラ出血熱を起こしているウイルスも検出できるよう LAMP 法を改良し、また新規にインドネシアにエボラウイルス（LLOV）が存在する可能性を示唆した。ハンタウイルス感染症の診断では鑑別に必要となるレプトスピラ症も区別できるよう Multiplex ICG 法を開発を開始した。ラッサ熱ではラッサウイルスの増殖後期過程に起こる出芽に重要なアミノ酸を同定した。東南アジアで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体検出 ELISA 法を確立し、またウイルスの遺伝子操作による病原性解析と蛋白質機能解析を開始した。クリミア・コンゴ出血熱では迅速・簡便な代替中和抗体価測定法の英国への技術移転と、新たな地域（モンゴル）のヒツジおよびヒトで抗体陽性個体が存在することを示した。MERS コロナウイルス感染症では、ウイルスが細胞侵入時に用いるプロテアーゼの依存性を調べることで病原性予測が可能になることを示した。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を作出した。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行い、その一部はマウスにおいて有用性を示した。

これらの各研究の成果は、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、最新の疫学状況把握に繋がるものであり、国内侵入予防と国内発生時におけるより適切な対応を可能にすると考えている。

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）； 堀本泰介（東京大学）
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、毎年国内の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ル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数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発生しこれまで1,000人以上の患者を出している。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、国

内でも毎年数十名以上の患者がいることが明らかとなった。2014 年にはギニアで発生したエボラ出血熱がリベリア・シエラレオネを中心に周辺国に大規模に広まり、欧米では輸出例のみならず二次感染例も発生した。この流行に関連しこれまで 5 例のエボラ出血熱疑い患者が帰国している（結果としていずれも陰性）。

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既存の感染症についての診断法はほぼ構築されているが、新規病原体（あるいは新種）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（特に迅速）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源での検出系の評価

○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。昨年度は中国新疆ウイグル自治区の CCHF 疑い患者 65 名の血清を用いて評価したが、今年度は英国 PHE への技術移転とタジキスタンの CCHF 疑い患者 6 名の血清を評価した。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、出芽に重要なミリスチル化のキーとなるアミノ酸の同定を行った。
- 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 ICG を昨年度作成した。ハンタウイルス感染症と同じくげっ歯類により媒介され類症鑑別を要するレプトスピラ症用の ICG（いずれはハンタウイルス感染症との Multiplex ICG）の開発を試みた。
- 3) フィロウイルスの疫学・診断・治療法に関する研究：フィロウイルス科キュエバウイルス属の LLOV のウイルス様粒子を産生・精製し抗血清を得た。LLOV GP 蛋白質を抗原にインドネシアのブタ血清中の抗体の有無を ELISA で調べた。西アフリカで発生しているエボラ出血熱のウイルスの遺伝子情報を調べ、LAMP 法のためのプライマー設計を行った。
- 4) 新型レオウイルスに関する研究：ウイルス株間で保存されていない蛋白質 cell attachment protein (CAP) をバキュロウイルス発現系で発現および精製し、ウサギに免疫した。CAP を抗原に用いたウイルス株型別の抗体検出 ELISA 系の

構築を試みた。また昨年度構築したリバーシジェネティクス法を用い、S1 セグメントにあるウイルス蛋白質の機能解析を行った。ウイルス蛋白質の1つ p10 が持つ細胞融合能を新規ワクチンの構築に活用できないか検討した。フィリピンのコウモリからウイルス分離を行い、塩基配列の同定を行った。

- 5) リフトバレー熱ウイルスの BSL2 で可能な中和抗体価測定：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の力価を高めるため、GP 蛋白質の細胞膜あるいは細胞質内を欠損あるいは置換した。
- 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：昨年度ヒツジの調査を行い、CCHF ウイルスが存在することが示唆されたモンゴルにおいてヒトの抗体調査を行った。抗体調査はバキュロウイルス発現系の NP を抗原とした ELISA 法もしくは哺乳類細胞 HeLa の安定発現細胞を抗原とした IFA 法で行った。
- 7) 新規コロナウイルスの診断と感染機構に関する研究：MERS コロナウイルスの細胞侵入時に用いていると考えられるプロテアーゼ(エンドソーム内のもや膜型 TMPRSS2) への依存度を調べる手法を構築し、MERS コロナウイルスの最近の変化との関連を調べた。
- 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。非増殖型の組換え狂犬病ウイルス (P 遺伝子が欠損)あるいは増殖型の細胞培養痘そうワクチン LC16m8 株 (もしくは LC16mO 株) をベクターとし、LCMV の GPC, NP, Z 蛋白質を単独あるいは複数を組み合わせて発現させた。痘そうワクチンでは重症熱性血小板減少症候群 SFTS ウイルスの蛋白質も発現させた。マウスモデルを用いてこれらワクチン候補の評価を行った。
- 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 CRISPR/Cas9 システムを用いて行った。ニパウイルスの中和抗体価をシュードタイプ VSV を用いて行う方法をより簡素化した。

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 の中和抗体価を迅速かつ簡便に測定する方法としてシュードタイプウイルス(レポーターが GFP のものとルシフェラーゼのもの)の両方のシステムを英国 PHE に技術移転した。移転に伴い力価測定の方法や用いる細胞株の変更が必要であった。この方法を用い、PHE が所有するヒト血清の中和抗体価を測定し、ELISA と関連するデータを得た。ラッサウイルスの出芽を担う Z 蛋白質のアミノ酸配列の中で、3-10 番目のアミノ酸が VLP 産生に重要で、かつミリスチル化も制御していることを明らかにした。ミリスチル化を担う他のウイルス蛋白質 (HIV の Gag や RSV の v-src) ではこの機能を満たすことは出来ず、ミリスチル化を担うラッサウイルス特異的な配列であると考えられた。
- 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
類症鑑別とするレプトスピラの LipL32 蛋白質の抗原性の高い部分を酵母で発現させたものが ELISA で非特異的によく反応した。しかしニトロセルロース膜への転写効率が悪く、Western blotting および目的の ICG での抗体検出が困難であった。
- 3) フィロウイルスの疫学・診断・治療法に関する研究：LLOV VLP の抗血清を得た。LLOV の分泌型 GP 蛋白質を抗原にした ELISA では、LLOV 抗血清のみが反応し、エボラウイルスの抗血清は反応せず、LLOV GP に対する抗体を特異的に検出できると考えられた。この ELISA 法でインドネシアのブタの血清中の LLOVGP 抗体の有無を調べ

たところ、4 個体では LLOV GP に明らかな陽性反応を示した。西アフリカのエボラウイルスの配列をもとに LAMP 法のプライマーを設計しなおしたところ、既存の RT-PCR と同感度でウイルス RNA を検出可能であった。

- 4) 新型レオウイルスに関する研究 : Miyazaki-Bali/2007 株、Melaka 株および HK23629 株の CAP 蛋白質を発現・精製し、ウサギ抗血清を得た。各 CAP を抗原とする ELISA 法を構築したところ、ウイルス株と血清の組み合わせが正しい場合に最も強い反応 (吸光度) が見られた。組換えウイルスの作製では S1 セグメントにある p10, p17, Sigma C 蛋白質のどれを欠損させても増殖するウイルスが得られた。p10 蛋白質の欠損では増殖能の低下が認められたが、他の蛋白質の欠損では明らかな低下は認められなかった。
- 5) リフトバレー熱ウイルスの BSL2 で可能な中和抗体価測定 : リフトバレー熱ウイルス GP 蛋白質の細胞膜あるいは細胞質内を欠損あるいは置換したが、シュードタイプウイルスの力価を高めることはできなかった。
- 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 : モンゴルのヒト血清の抗体陽性率はヒツジほどは高くはないものの平均で 8.6% (ELISA), 5.4% (IFA) であった。ただしモンゴルにおいて CCHF 患者の報告はない。
- 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 細胞で MERS コロナウイルスを継代したところ、ウイルスの S 蛋白質の開裂部位周辺に変異が入り、細胞侵入がエンドソーム内プロテアーゼ (カテプシン) により依存するようになっていた。このウイルスの U937 細胞 (マクロファージ) での増殖は悪いが、カテプシン阻害剤を添付することにより産生ウイルス量はある程度回復した。
- 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 LCMV 脳内接種チャレンジ

に防御効果があることが確認された。血清中に狂犬病ウイルスに対する中和抗体は高く誘導されていたが、LCMV に対する抗体は検出されなかった。哺乳マウスに直接接種しても症状は示さなかった。ワクシニアウイルス LC16mO では LCMV あるいは SFTSV の 1 つあるいは複数を発現する組換えウイルスを得た。LCMV を腹腔に接種し全頭死亡に至るマウスとして CBA マウスを見出した。

- 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 : FBTK 細胞を用い、自然免疫関連遺伝子 Myd88 のノックアウト細胞を CRISPR/Cas9 システムを用いて作出した。シュードタイプ VSV では得られたウイルスを超遠心して遊離のレポーター SEAP を除去することにより中和抗体測定法の簡素化に成功した。マレーシアの過去の患者血清に応用したところ、疫学背景と一致する結果が得られ、本法の有効性が示された。

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 : 英国 PHE への CCHFV の代替中和抗体価測定法の技術移転は完了した。PHE 所有の CCHF (疑い) 患者血清の評価で ELISA と一致する結果が得られ、この測定法が有益であることが再確認された。あとは実際の CCHF ウイルスを用いて得られた中和抗体価と相関するかどうか検討するのみである。ラッサウイルスの粒子形成メカニズムは他のアレナウイルスとは異なる可能性が考えられた。Z 蛋白質のミリスチル化酵素の同定が必要であろう。
- 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 : 鑑別診断用のレプトスピラの抗原をニトロセルロース膜へ良く転写できるよう、LipL32 蛋白質の短縮化部位の変更あるいは標的抗原自体の変更 (LigA, LigB, OmPL1 等) が必要である。
- 3) フィロウイルスの疫学・診断・治療法に関する研

究：抗体調査に用いた抗原の由来である LLOV はスペイン・フランス・ポルトガルで検出されたウイルスであり、インドネシアのブタで抗体陽性と思われる個体が存在することは、これまで把握していた以上に更に広い範囲でエボラウイルスは存在する可能性があることを示している。

- 4) 新型レオウイルスに関する研究:感染株の型別が抗体で可能であると考えられたが、より容易に区別するためには抗原とした CAP 蛋白質の更なる短縮化(抗原部位の絞り込み)が必要と考えられた。p10, p17, SigmaC 蛋白質を欠損したウイルスを用いることにより、感染初期機構の解析やそれを標的とした抗ウイルス薬あるいは弱毒生ワクチンの開発等が可能になったと考えられる。p10 蛋白質の利用で非増殖型のウイルスの蛋白質発現を高められることが分かり、非増殖型ウイルスベクターのワクチン効率を上げられると考えられた。
- 5) リフトバレー熱ウイルスの BSL2 で可能な中和抗体価測定：Gn/Gc 蛋白質の改変による VSV シュードタイプウイルスの力価を高めることはできなかった。非増殖型リフトバレー熱ウイルスの作製の方が適しているかもしれない。
- 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:モンゴルにおいて隣接の中国新疆ウイグル自治区ほどではないが CCHFV 抗体陽性者がいることが分かった。ただしこれまでモンゴルでは CCHF 患者の存在は知られておらず、CCHFV に類似のウイルスの可能性もある。
- 7) 新規コロナウイルスの診断と感染機構に関する研究:MERS コロナウイルスの細胞侵入経路の違いにより、その後の免疫応答が異なる可能性が示された。生体内での進化を意味している可能性がある。
- 8) 出血熱ウイルス感染症に対するワクチンの開発：LCMV GPC を発現する非増殖型組換え狂犬病ウイルスベクターがマウスにおいて抗 LCMV 効果があり且つ病原性が低いことが示され有望

と言える。ワクシニアウイルスベクターは良い評価系が構築できたので、有望かどうか近々判明すると思われる。

- 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: Myd88 KO コウモリ細胞でのウイルスの増殖具合がどうか期待される。超遠心した VSV-NiV-SEAP がマレーシア等での疫学調査に活用されることが期待される。

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、来年度以降の更なる成果に繋がっていくと考えられる(図1)。

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) 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.* 88(13):7317-7330,2014.
- 2) Bukbuk DN, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Iha K, Fukuma A, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M, Kasolo F, Baba SS. Development and validation of serological assays for viral hemorrhagic fevers and determination of the prevalence of Rift Valley fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*108(12):768-773, 2014.
- 3) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H,

- Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. 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.* 52(9):3325-3333, 2014.
- 4) Hirokazu Kimura, Hiroyuki Tsukagoshi, Akihide Ryo, Yoshiroh Oda, Toshinobu Kawabata, Takashi Majima, Kunihiisa Kozawa, Masayuki Shimojima. Ebola Virus Disease: A Literature Review. *Journal of Coastal Life Medicine* 2014; 4(1):930-935.
- 5) 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.
- 6) Yuko Ohagi, Shinobu Tamura, Chiaki Nakamoto, Hiromichi Nakamoto, M. Saijo, Masayuki Shimojima, Yoshio Nakano and Tokuzo Fujimoto. Mild Clinical Course of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection in an Elderly Japanese Patient. *Infectious Diseases. Case Rep Infect Dis.* 2014;2014:918135.
- 7) Amada T, Yoshimatsu K, Koma T, Shimizu K, Gamage CD, Shiokawa K, Nishio S, Ahlm C, Arikawa J. Development of an immunochromatography strip test based on truncated nucleocapsid antigens of three representative hantaviruses. *Virol J* 2014, 11, 87.
- 8) Kuroda M, Fujikura D, Noyori O, Kajihara M, Maruyama J, Miyamoto H, Yoshida R, Takada A. A polymorphism of the TIM-1 IgV domain: implications for the susceptibility to filovirus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 455(3-4):223-228, 2014.
- 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* 159(5):1229-1237, 2014.
- 10) Kuhn JH, Andersen KG, Bào Y, Bavari S, Becker S, Bennett RS, Bergman NH, Blinkova O, Bradfute S, Brister JR, Bukreyev A, Chandran K, Chepurinov AA, Davey RA, Dietzgen RG, Doggett NA, Dolnik O, Dye JM, Enterlein S, Fenimore PW, Formenty P, Freiberg AN, Garry RF, Garza NL, Gire SK, Gonzalez JP, Griffiths A, Happi CT, Hensley LE, Herbert AS, Hevey MC, Hoenen T, Honko AN, Ignatyev GM, Jahrling PB, Johnson JC, Johnson KM, Kindrachuk J, Klenk HD, Kobinger G, Kochel TJ, Lackemeyer MG, Lackner DF, Leroy EM, Lever MS, Mühlberger E, Netesov SV, Olinger GG, Omilabu SA, Palacios G, Panchal RG, Park DJ, Patterson JL, Paweska JT, Peters CJ, Pettitt J, Pitt L, Radoshitzky SR, Ryabchikova EI, Sapphire EO, Sabeti PC, Sealfon R, 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. Filovirus RefSeq entries: evaluation and selection of filovirus type variants, type sequences, and names.

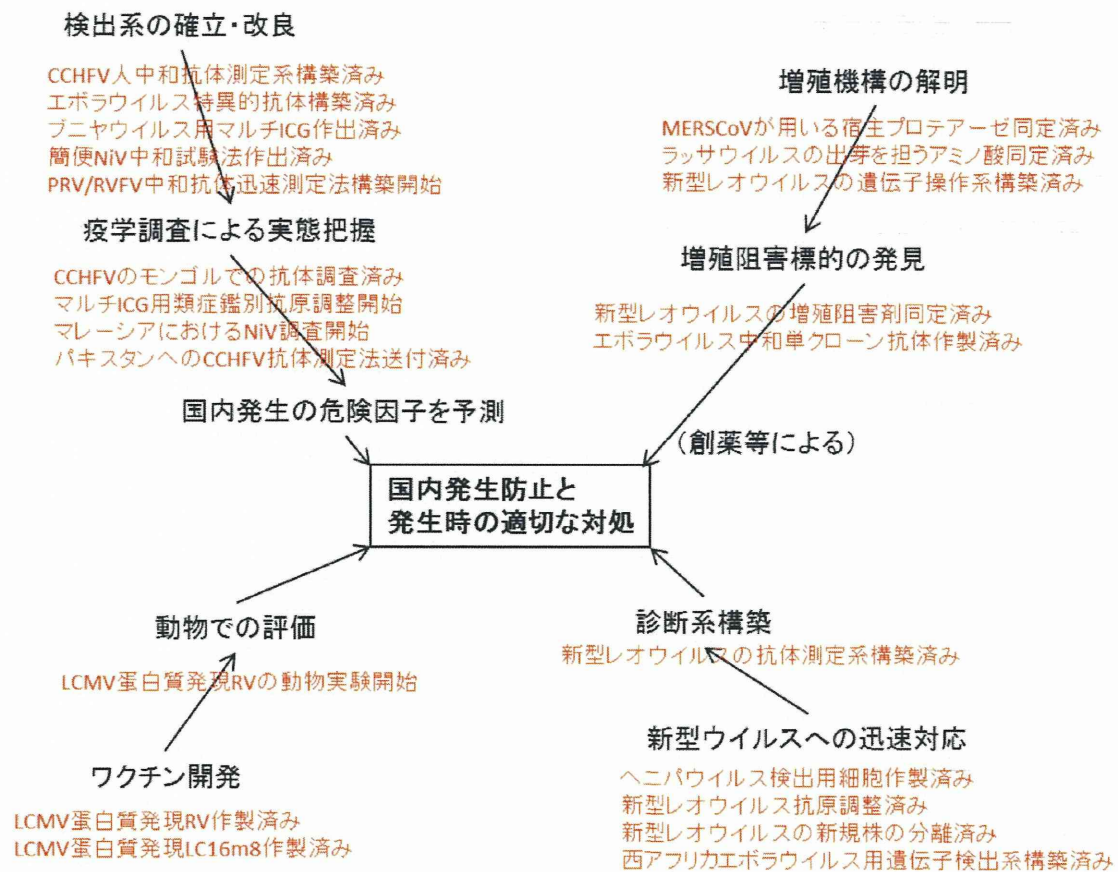
- Viruses 26;6(9):3663-3682, 2014.
- 11) Changula K, Kajihara M, Mweene AS, Takada A. Ebola and Marburg virus diseases in Africa: increased risk of outbreaks in previously unaffected areas? *Microbiol Immunol* 58(9):483-491, 2014.
 - 12) Kajihara M, Takada A. Host Cell Factors Involved in Filovirus Infection. *Current Tropical Medicine Reports* (in press)
 - 13) Kato F, Kobayashi T., Tajima S., Takasaki T., Miura T., Igarashi T., and Hishiki T. Development of a novel dengue-1 virus replicon system expressing secretory gaussia luciferase for analysis of viral replication and discovery of antiviral drugs. *Jpn. J. Infect. Dis.* 67:209-212. (2014).
 - 14) Yamanaka A., Iwakiri A., Yoshikawa T., Sakai K., Harpal S., 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., and Morikawa S. Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species Nelson Bay orthoreovirus. *PLoS One* 9:e92777. (2014).
 - 15) 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).
 - 16) 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
 - 17) 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
 - 18) Ching PK, de Los Reyes VC, Sualdito MN, Tayag E, Columna-Vingno AB, Malbas FF Jr, Bolo GC Jr, Sejvar JJ, Eagles D, Playford G, Dueger E, Kaku Y, Morikawa S, Kuroda M, Marsh GA, McCullough S, Foxwell AR. Outbreak of henipavirus infection, Philippines, 2014. *Emerg Infect Dis.* 21:328-31 (2015)
2. 日本語総説等
 - 1) 大西なおみ、東秀明、高田礼人 (2014) エボラ出血熱ワクチン・炭疽ワクチン、最新医学 69(4): 865-871.
 - 2) 高田礼人 (2014) エボラ出血熱、現代科学 523: 16-18
 - 3) 高田礼人 (2014) フィロウィルスのウイルス学、医学の歩み (印刷中)
 - 4) 高田礼人 (2014) エボラ出血熱とはどんな病気か、生活と環境 (印刷中)
 3. 学会発表
 - 1) 福士秀悦、永田典代、岩田奈織子、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、下島昌幸、西條政幸. 高齢マウスにおける重症熱性血小板減少症候群ウイルスの感染感受性の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
 - 2) 福間藍子、福士秀悦、吉河智城、鈴木忠樹、谷英樹、谷口怜、下島昌幸、西條政幸. SFTS ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA への応用. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .

- 3) 西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、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, 横浜, (2014. 11) .
- 4) 下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、谷口怜、西條政幸. ブラークを形成する SFTS ウイルスによる中和抗体価測定. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 5) 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 による細胞阻害効果. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 6) 谷口怜、堀本泰介、Joseph Masangkay、Puentepina Roberto Jr.、大松勉、永田典代、江川和孝、福間藍子、Harpal Singh、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、下島昌幸、吉河泰弘、西條政幸、久和茂、前田健. フィリピンのコウモリからのプテロパイソウイルスの分離. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .
- 7) 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, 横浜, (2014. 11) .
- 8) Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Masayuki Saijo, Masayuki Shimojima. Development of antigen-capture ELISA for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).
- 9) Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Joseph S Masangkay, Roberto P Puentespina, Tsutomu Omatsu, Ken Maeda, Aiko Fukuma, Tomoki Yoshikawa, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shigeru Kyuwa, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. Seroepidemiological study of SFTS in wild bats in the Philippines. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).
- 10) Yoshimatsu K, Yasuda SP, Shimizu K, Koma T, Amada T, Isozumi R, Arikawa J : Persistence of Seoul virus infection in rodent reservoir (*Rattus norvegicus*). 7th European Meeting on Viral Zoonoses, PALAIS DES CONGRES, Saint-Raphael, France, May 24-27, 2014
- 11) Arkawa J : Hantavirus infection - rodent borne zoonosis. One Health International Conference - 2014, University of Peradeniya, Peradeniya, SriLanka, 5-6 September, 2014
- 12) Gamage CD, Yoshimatsu K, Varatharajan V, Rajapakse RPVJ, Kularathne SAM, Nwafor-Okoli C, Koma T, Amada T, Shimizu K, Obayashi Y, Tamashiro H, Arikawa J: Endorsement of the existence of hantavirus infection and circulation of Thailand virus like virus in Kandy, Sri Lanka. One Health International Conference – 2014, University of Peradeniya, Peradeniya, SriLanka, 5-6 September, 2014
- 13) 塩川愛絵、Chandika Gamage,小泉信夫、清水健太、津田祥美、迫田義博、吉松組子、有川二郎、レプトスピラ感染野生ラットの血清学的診断法開発;大腸菌と酵母菌発現系による組換え病原性レプトスピラ共通抗原 (LipL32 抗原) 応用性の比較,第 157 回日本獣医学会学術集会(札幌)平成 26 年 9 月 9 日
- 14) 塩川愛絵、Chandika Gamage,小泉信夫、清水健太、津田祥美、迫田義博、吉松組子、有川二郎、組換え抗原発現系の違いによる野生ラットレプトスピラ感染診断時バックグラウンド反応軽減について-大腸菌と酵母菌発現組換え病原性レプトス

- ピラ共通抗原 (LipL32 抗原) の比較-」第 11 回北海道実験動物研究会総会・学術集会 (旭川) 平成 26 年 7 月 26 日
- 15) 高田礼人、フィロウイルス感染症に対する防御免疫における抗体の役割、第 79 回インターフェロン・サイトカイン学会、2014 年 6 月 20 日、札幌
- 16) 黒田誠、藤倉大輔、南保明日香、野依修、梶原将大、丸山隼輝、宮本洋子、吉田玲子、高田礼人、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日、横浜
- 17) 古山若呼、黒田誠、丸山隼輝、宮本洋子、吉田玲子、高田礼人、エボラウイルスの抗体依存性感染増強現象における Fc レセプターを介したシグナル伝達経路の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日、横浜
- 18) Junki Maruyama, Hiroko Miyamoto, Masahiro Kajihara, Hirohito Ogawa, Ken Maeda, Yoshihiro Sakoda, Reiko Yoshida, Ayato Takada. Characterization of the envelope glycoprotein of a novel filovirus, Lloviu virus. XVI International Congress of Virology, July 28, 2014, Montreal, Canada.
- 19) Makoto Kuroda, Daisuke Fujikura, Osamu Noyori, Eri Nakayama, Masahiro Kajihara, Junki Maruyama, Hiroko Miyamoto, Reiko Yoshida, Ayato Takada. Antibody-mediated inhibition of Marburg virus budding. XVI International Congress of Virology, July 28, 2014, Montreal, Canada.
- 20) 金井 祐太、川岸 崇裕、松浦 善治、小林 剛「遺伝子改変オルソレオウイルスを用いた新規腫瘍溶解ベクターの開発」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜市 (2014 年 11 月 10~12 日)
- 21) 川岸 崇裕、金井 祐太、谷 英樹、下島 昌幸、西條 政幸、松浦 善治、小林 剛「高病原性コウモリ由来レオウイルスのリバースジェネティクスの確立」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜市 (2014 年 11 月 10~12 日)
- 22) 川岸 崇裕、金井 祐太、谷 英樹、下島 昌幸、西條 政幸、松浦 善治、小林 剛「高病原性コウモリ由来レオウイルスの遺伝子操作系の確立」第 157 回日本獣医学会学術集会、札幌市 (2014 年 9 月 9~12 日)
- 23) 金井 祐太、川岸 崇裕、下島 昌幸、西條 政幸、松浦 善治、小林 剛「Fusogenic reovirus がコードする FAST 蛋白質の機能解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、札幌市 (2014 年 9 月 9~12 日)
- 24) Takahiro Kawagishi, Yuta Kanai, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Yoshiharu Matsuura, Takeshi Kobayashi 「Identification and characterization of a new fusogenic orthoreovirus from a patient with acute respiratory infection」第 10 回中国際ウイルス学会、中国長春市 (2014 年 8 月 25~27 日)
- 25) 小林 剛「急性呼吸器系疾患患者から分離された新型レオウイルスの解析」第 2 回感染症国際研究センターシンポジウム、東京 (2014 年 3 月 18 日)
- 26) 谷口怜、堀本泰介、Masangkay Joseph, Puentespin Roberto Jr., 大松勉、永田典代、江川和孝、福士秀悦、谷英樹、下島昌幸、吉川康弘、西條政幸、久和茂、前田健フィリピンのコウモリからネルソンベイグループに分類されるオルソレオウイルスの分離、日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 (札幌)
- 27) 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
- 28) 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マ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
- 29) 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
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushima, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani, 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
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 西條政幸、伊藤（高山）睦代、森本金次郎、垣内五月、山口幸恵、堀谷まどか、林昌宏：リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染症に対する非増殖型組換え狂犬病ワクチンの開発. 第19回日本神経感染症学会学術集会 2014年9月 金沢
- 38) 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：非増殖型組換え狂犬病ウイルスを用いたアレナウイルスに対するワクチンの開発. 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月 横浜
- 39) 福士秀悦、永田典代、岩田奈織子、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、下島昌幸、西條政幸. 高齢マウスにおける重症熱性血小板減少症候群ウイルスの感染感受性の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、(2014.11) .
- H. 知的財産権の出願・登録状況
現時点では予定なし。

図 1 : 全体の流れ図



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）

分担研究者：西條 政幸（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。これまで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価測定法の確立を試みてきたが、その確立のためには本法によって得られた結果がクリミア・コンゴ出血熱ウイルス自体を用いて得られた結果と一致あるいは相関する必要がある。

しかしクリミア・コンゴ出血熱ウイルスを用いた中和抗体価の測定は現状では海外のBSL4施設等でないと行うことが出来ない。そこで英国保健省PHEへのシュードタイプウイルスを用いた代替中和抗体価測定法の技術移転と、PHEが所有するクリミア・コンゴ出血熱（疑い）患者や健常人血清の代替法による抗体価の測定を行った。

今後はPHEにおいてクリミア・コンゴ出血熱ウイルス自体を用いた中和抗体価測定を同じ血清に対して行い、我々の代替中和抗体価測定法での結果との相関を調べる予定である。

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価の測定として、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価の測定が代替とならないか検討してきた。

この代替中和抗体価測定法により中国新疆ウイグル自治区で発生したCCHFの流行時に得られたCCHF患者（疑い患者を含む）の血清を用いて中和抗体の有無および中和抗体価を測定し、その結果がCCHFウイルスNPを抗原としたELISAでの結果と比較的相関することを昨年度報告した（特異性100%、感度59.1%）。しかし中和抗体が標的とする抗原は糖蛋白質であり、ELISAの抗原としたNP（核蛋白質）とは別の

ものである。比較的相関した結果であったとはいうものの、本来は CCHF ウイルス自身での中和抗体（価）との相関を見るべきである。本年度は CCHF ウイルスを取り扱っている海外の BSL4 施設を訪問し、代替中和抗体価測定法の技術移転を行うとともに、その BSL4 施設を有する研究機関が所持する CCHF（疑い）患者血清の代替法における中和抗体価を測定した。

B. 研究方法

B-1. 代替中和抗体価測定法の技術移転

必要となるシードウイルスの調整と力価測定、シードウイルスを用いた CCHF ウイルス糖蛋白質外套のシュードタイプウイルスの調整と力価測定のそれぞれにつき、英国保健省 PHE の研究室が所持する培養細胞や各試薬・各機器を用いて PHE 研究者とともにいった。

B-2. 代替中和抗体価測定法による中和抗体価の測定

PHE がこれまで行ってきたタジキスタンにおける CCHF 疫学調査で得た CCHF（疑い）患者の血清うち、十分な量があるものを PHE 側に選んでもらい用いた。また SIGMA 社の市販の健常人血清およびトルコでの疫学調査で得た健常人血清も用いた。これらの血清は 56℃30 分の非働化処理を行った後に用いた。

希釈血清をシュードタイプウイルスと混合し 1 時間 37℃で培養後、Vero 細胞に感染させた。約 16 時間後、Vero 細胞を蛍光顕微鏡下で写真撮影し、GFP を発現している細胞数を数えた。中和抗体価のカットオフ値は 50%減少を指標に算出した。

B-3. ELISA による抗 CCHF ウイルス NP 抗体の測定

PHE で開発したバキュロウイルス発現の NP を抗原にした ELISA を用い、血清中の抗 NP 抗体を測定した。血清の希釈倍率は 100 倍で行った。

（倫理面からの配慮について）

ヒト血清を用いて得られた研究結果は、英国 PHE に技術移転をしたのちに PHE の研究者によって得られた成績を提供されたものであるので、国立感染症研究所の倫理規定に該当しない。

C. 研究結果

C-1. 代替中和抗体価測定法の技術移転

シードウイルスの力価測定は本来 BHK 細胞で行っていたが、PHE の所持する BHK 細胞では力価を測定できなかった。細胞を Vero 細胞に変更、培養時間を延長（1 晩から 2 晩へ）、さらにホルマリン処理とクリスタルバイオレット染色の追加を行うことで、プラークを明瞭に観察でき力価を求めることが出来た。CCHF ウイルス糖蛋白質を該当したシュードタイプウイルスの力価測定は PHE が所持する Huh7D12 細胞ではできなかったため、Vero 細胞に変更した。これら以外の各ステップはこれまでやってきた材料や手法を変えることなく実行可能であった。

C-2. 代替中和抗体価測定法による中和抗体価の測定

シュードタイプウイルスのレポーターである GFP の発現は、撮影した GFP 発現細胞の写真を Image-J ソフトを用いて計測し数値化した。用いたヒト血清 Tajik1, 5, 8, 10, 11, 12, conv22/7/14, Neg serum SIGMA, Turkey1 の 50%感染減少価（中和抗体価）はそれぞれ<1:20, <1:20, >1:1280, 1:20, 1:80, 1:80, >1:1280, <1:20, <1:20 であった。

C-3. ELISA による抗 CCHF ウイルス NP 抗体の測定

ヒト血清 Tajik1, 5, 8, 10, 11, 12, conv22/7/14, Neg serum SIGMA はそれぞれ 0.072, 0.113, 0.711, 0.363, 2.353, 1.172, 2.741, 0.131 であった。ヒト血清 Turkey1 については測定しなかった（図 1）。

D. 考察

用いたヒト血清のうち、conv22/7/14 は CCHF 患者の回復期の血清であることが分かっているものであり、代替中和抗体価測定法・ELISA のいずれでも陽性（高い値）を示した。一方、健康人由来の Neg serum SIGMA および Turkey1 の血清は代替中和抗体価測定法で検出限界以下の値を示し、Neg serum SIGMA は ELISA で低値（陰性）を示した。これらのことは PHE において代替中和抗体価測定法が良く行なえていることを示している。

残りのタジキスタンの6つの血清は、代替中和抗体価測定法で2つが陰性、4つが陽性であった。抗体の有無の面では ELISA における陽性・陰性の結果と完全に一致するものであった。しかし陽性を示した血清のうち、Tajik8 は中和で高値、ELISA で中程度の値を示し、Tjik11 は中和で中程度の値、ELISA で高値を示し、強弱の面では一致するとは言い難いが、抗体が標的とする抗原が異なることが原因であると考えられる。CCHF では抗 GP 抗体の変動と抗 NP 抗体の変動がずれることが知られているからである。

今後は CCHF ウイルス自体を用いた中和抗体価測定を同じ血清に対して行い、代替中和抗体価測定法での結果との相関を調べる予定である。中和抗体の有無と強弱の点で相関が認められれば、代替中和抗体価測定法が CCHF ウイルスを用いた方法にとって代わる中和抗体測定法と判断できる。

E. 結論

シュードタイプウイルスを用いた CCHF ウイルスの代替中和抗体価測定系の英国 PHE への技術移転を行った。

PHE が所持する CCHF（疑い）患者血清の中和抗体価を代替法で測定した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.* 88(13):7317-7330,2014.

2) Bukbuk DN, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Iha K, Fukuma A, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M, Kasolo F, Baba SS. Development and validation of serological assays for viral hemorrhagic fevers and determination of the prevalence of Rift Valley fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*108(12):768-773, 2014.

3) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. 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.* 52(9):3325-3333, 2014.

4) Hirokazu Kimura, Hiroyuki Tsukagoshi, Akihide Ryo, Yoshiroh Oda, Toshinobu Kawabata, Takashi Majima, Kunihisa Kozawa, Masayuki Shimojima. Ebola Virus Disease: A Literature Review. *Journal of*

Coastal Life Medicine 2014; 4(1):930-935.

5) 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.

6) Yuko Ohagi, Shinobu Tamura, Chiaki Nakamoto, Hiromichi Nakamoto, M. Saijo, Masayuki Shimojima, Yoshio Nakano and Tokuzo Fujimoto. Mild Clinical Course of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection in an Elderly Japanese Patient. *Infectious Diseases. Case Rep Infect Dis.* 2014;2014:918135.

2. 学会発表

1) 福士秀悦、永田典代、岩田奈織子、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、下島昌幸、西條政幸. 高齢マウスにおける重症熱性血小板減少症候群ウイルスの感染感受性の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .

2) 福間藍子、福士秀悦、吉河智城、鈴木忠樹、谷英樹、谷口怜、下島昌幸、西條政幸. SFTS ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA への応用. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .

3) 西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、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, 横浜, (2014. 11) .

4) 下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、谷口怜、西條政幸. プラークを形成する SFTS ウイルスによる中和抗体価測定. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .

5) 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 による細胞阻害効果. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .

6) 谷口怜、堀本泰介、Joseph Masangkay、Puentepina Roberto Jr.、大松勉、永田典代、江川和孝、福間藍子、Harpal Singh、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、下島昌幸、吉河泰弘、西條政幸、久和茂、前田健. フィリピンのコウモリからのプテロパインオルソレオウイルスの分離. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .

7) 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, 横浜, (2014. 11) .

8) Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Masayuki Saijo, Masayuki Shimojima. Development of antigen-capture ELISA for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).

9) Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Joseph S Masangkay, Roberto P Puentespina, Tsutomu Omatsu, Ken Maeda, Aiko Fukuma, Tomoki Yoshikawa, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shigeru Kyuwa, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. Seroepidemiological study of SFTS in wild bats in the Philippines. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).

H. 知的財産権の出願・登録状況

図 1 : ヒト血清の代替中和抗体価測定法における中和抗体価と ELISA における OD 値

Human sera	Tajik1	Tajik5	Tajik8	Tajik10	Tajik11	Tajik12	Convalescent 22/7/14	Neg Serum SIGMA	Turkey1 (healthy donor)
ELISA	Neg 0.072	Neg 0.113	Pos 0.711	Pos 0.363	Pos 2.353	Pos 1.172	Pos 2.741	Neg 0.131	Not tested
IRNT ₅₀	<1:20	<1:20	>1:1280	1:20	1:80	1:80	>1:1280	<1:20	<1:20

