

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：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

分担研究者：有川 二郎（北海道大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨

ハンタウイルス感染症は、げっ歯類媒介性の人獣共通感染症である。腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の主に二つ疾病が知られているが、その症状は多岐にわたり、インフルエンザウイルス感染症、レプトスピラ症、B型肝炎などとの鑑別が困難な場合もあることが知られている。確実な診断のためには、血清診断および遺伝子診断が必要である。現在では世界各国からの輸入症例が懸念されることから、すべての病原性ハンタウイルス感染症をカバーし、かつ簡便に診断することが必要である。また、信頼度の高い疫学的情報を得るためにも、簡便な鑑別診断法が必要である、そのため本研究では迅速で簡便な診断法として、三種類のハンタウイルス組換え NP 抗原を用いた多項目同時検出人血清用イムノクロマトグラフィー(Multiplex ICG)法の開発を行った。さらに鑑別診断の対象として重要なレプトスピラ抗原を本システムに加えることを試みた。

A. 研究目的

ハンタウイルスには数多くの血清型、遺伝子型が存在する。これらは宿主げっ歯類に依存しており、ウイルスと宿主が共存し、共に進化してきた事によると考えられている。これまでに、Hantaan (HTNV)、Seoul (SEOV)、Dobrava (DOBV)、Thailand (THAIV)および Puumala (PUUV)ウイルスは HFRS の原因となり、SinNombre, Andes (ANDV) ウイルスを始めとするアメリカネズミ亜科のげっ歯類によって媒介されるウイルスは HPS の原因となる。これらのハンタウイルス群のウイルスは互いに抗原性が大きく相違し交差反応性が低いことから、病原性ハンタウイルス感染症の血清診断には少なくとも三種類の抗原が必要である。昨年度はこれらに対する抗体を迅速にスクリーニングし診断する手段として、多項目同時検出イムノクロマトグラフィー(Multiplex ICG)を選択し開発

を進めてきた。

レプトスピラ症は高熱を伴い腎臓、肝臓への症状を呈するために、HFRS との鑑別が必要な感染症である。タイやスリランカでレプトスピラ症を疑われた患者にはハンタウイルス抗体が陽転している例が確認されている。ハンタウイルス感染症を疑われた患者が最終的にレプトスピラ症と診断された例もある。同様に東ヨーロッパでもハンタウイルス感染症とレプトスピラ症の鑑別が必要であるとの報告もある。また、ラット類はレプトスピラの宿主であり、重要な供給源である。これまでの野性ラット類の研究ではハンタウイルスとレプトスピラが同一集団内で維持されていて、さらに同時に保有する個体が多いことが分かって来ている。これは尿を介する水平感染が両病原体について平行して起こっていることを示唆し、同時にヒトへの感染の機会があることも示唆している。今年度はレ

プトスピラも含めた鑑別診断を迅速に行うための ICG の開発を目的とした、レプトスピラ抗原の開発を試みた。

## B. 研究方法

レプトスピラに対する抗体を検出するための組換え抗原を作成することを試みた。病原性レプトスピラに特異的に外膜に存在する LipL32 を発現することを試みた。L. interrogans 血清型 Manilae UP-MMC-NIID 株の LipL32 の全長の ORF および 87-188 のアミノ酸をコードする cDNA を PCR 法で増幅し、pET43.1, pRSET プラスミドにクローニングし、BL21(DE3)株を用いた大腸菌ベクターシステムでの発現を試みた。さらに 87-188 の部分は pPICZ $\alpha$  プラスミドにクローニングし、Pichia pastoris KM71H 株に組換え、組換え抗原を培養上清に発現させた。どちらも N 末端側に付加した 6 X His タグを用いてニッケルカラムで精製を行った。これらの抗原を用いて ELISA, Western blot, ICG の血清学的検索を行った。抗体はマウスモノクローナル抗体 4 種類(D14/2, D58/3, Y22/1 and D62/1)およびマニラ株実験感染ラット血清、ベトナムの自然感染ラット血清を用いた。

## C. 研究結果

全長の組換え LipL32 を抗原としてラット血清をモノクローナル抗体と競合的に結合させたところ、D14/2 と D58/3 が強く競合し、感染時に誘導される主要エピトープである可能性が示された。Y22/1 はほとんど阻害効果を示さなかった。D62/1 は D58/3 と同一のエピトープに結合した。この結果から 87-188 番のアミノ酸を抗原として酵母システムで発現させた(tLipL32p)。同じ領域を大腸菌で発現させた物を rLipL32e とした。この二つの抗原を比較した結果、野性ラット血清では rLipL32e に強いバックグラウンド反応があることが分かった。一方、tLipL32p

では見られなかった。血清を大腸菌で吸収処理することにより、このバックグラウンド反応は軽減され、tLipL32p の結果と直線的な相関が認められた。この結果から、tLipL32e で見られるバックグラウンド反応は大腸菌に由来する物と考えられた。ELISA における tLipL32p の至適濃度は 1 ug/ml であり、一方 tLipL32e は 8-16 ug/ml であった。この結果から、抗原の効率は tLipL32p が良いことが明らかとなった。この抗原を SDS-PAGE および Western blotting を実施したところ、両抗原ともに予想通りの分子量で精製されていることが明らかとなった。tLipL32e は Western blot で感染血清およびモノクローナル抗体と良好な反応を示したが、tLipL32p は膜への転写効率が著しく不良であった。さらに ICG のためのニトロセルロース膜への吸着も著しく低く ICG を構築することができなかった。tLipL32e は非特異反応が強くやはり ICG の構築は困難であった。

## D. 考察

現在までにヒト用およびラット用ハンタウイルス抗体検出 Multiplex ICG を準備できた。これは地域を問わず輸入症例等の検索に有用である。近隣諸国での現場での応用を考えた場合、アジア型ハンタウイルス抗原とレプトスピラ抗原との Multiplex ICG はたいへん有効であると考えられる。これもまた、ヒトおよび宿主であるラット類の両方において必要とされる。今後は他の抗原候補である LigA, LigB, OmPL1 等について同様の検討を勧め、効率的な疫学的データを得ることを目標としたい。

## E. 結論

全試験を 15 分で終了できる ICG は簡易診断法として多くの感染症で使われている方法である。これをハンタウイルスの多様性、類似疾患を考慮して実用的な組み合わせにして応用する

ことは、質の高い疫学情報を収集する上で、また迅速に血清診断する上で重要であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

#### G. 研究発表

##### 3. 論文発表

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. *Virology* 2014, 11, 87.

##### 4. 学会発表

1) 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

2) Arkawa J: Hantavirus infection - rodent borne zoonosis. One Health International Conference - 2014, University of Peradeniya, Peradeniya, SriLanka, 5-6 September, 2014

3) 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

4) 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

5) 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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：フィロウィルスの疫学・診断・治療法に関する研究

分担研究者：高田 礼人（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・教授）

研究要旨

新種のフィロウイルス（Lloviu cuevavirus: LLOV）による感染症の診断法開発のために、LLOVの表面糖蛋白質（GP）を分泌型に改変した組換え蛋白質を作出し、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)に用いる抗原としての有用性を評価した。また、2014年に西アフリカで見つかったエボラウイルスを検出できるように既存の Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を改良した。

A. 研究目的

フィロウイルス科はマールブルグウイルス属およびエボラウイルス属からなる。現在見つかった全てのエボラおよびマールブルグウイルスはヒトまたはサルに急性で致死率の高い感染症を惹き起こす病原体である。現在のところ、マールブルグウイルス属は一種のみが知られているのに対し、エボラウイルス属は進化系統学的に5種 Zaire、Sudan、Tai Forest、Bundibugyo および Reston) に分けられている。このうち Reston エボラウイルスのみアジアで見ついている。近年、霊長類以外の動物（コウモリ、ブタ、イヌ、ダイカー）の感染が確認され、フィロウィルスの疫学に関する研究は新たな展開をみせている。

フィロウイルスによる感染症（エボラ出血熱およびマールブルグ出血熱）は主に中央アフリカで散発的な流行を繰り返してきたが、近年それらの発生頻度が高くなっている。特に、2012年には合計4回の独立した発生が報告された。また、2008年に、ウガンダから帰国したオランダ人が、自国でマールブルグ出血熱を発症する事例が起きた。アメリカでも同様の事例が確認

され、輸入感染症病原体としてのこれらのウイルスの危険性が先進各国で再認識されている。特に、2014年に西アフリカで発生したエボラ出血熱は未曾有の大流行となり、近隣アフリカ諸国にも感染が拡大した。また、流行地で診療に携わった医療従事者等への感染も複数報告され、一部はアメリカおよびヨーロッパに帰国後に発症し、世界的な問題となっている。

ヒトに対する病原性が強いこと、そして効果的な予防・治療法が実用化されていないことから、エボラおよびマールブルグウイルスは Biosafety Level 4 施設で取り扱わなければならない病原体である。本研究では、これらのウイルスによる感染症の診断法開発のために、感染動物あるいはヒト血清中のウイルス特異抗体およびウイルス抗原を高感度で検出する方法の確立とその野外応用を目指す。

B. 研究方法と結果

LLOV に対する特異抗体を検出する ELISA 法の確立のために、GPの膜貫通領域と細胞質内領域を欠失させ His タグを付加した分泌型の糖蛋白質を発現するプラスミドを構築した。これ

を導入した培養細胞の上清中に分泌される組換え蛋白質を精製し ELISA の抗原に用いた。既知の全てのフィロウイルス種に対するマウス抗血清を用いて特異性を確認したところ、LLOV GP 抗原には LLOV GP に対する抗血清のみが反応し、他のフィロウイルスとは血清学的に交差しない事が明らかとなった(図 1)。本法を用いて、インドネシアのブタの血清中の IgG 抗体検出を試みたところ、陽性と思われる個体が確認された(図 2)。

1976 年にザイールで分離されたエボラウイルス (Zaire ウイルスのプロトタイプ) と比較すると 2014 年にギニアで分離された Zaire ウイルスの塩基配列の相同性は 97% であった。これまでに確立された LAMP 法で使用されているプライマーの配列を確認したところ、塩基配列のミスマッチが複数存在し、効率よく検出できない可能性が明らかとなった。そこで、比較的保存性が高い L 遺伝子をターゲットにしたプライマーを設計しなおし、2014 年に感染者から分離された実際のウイルス RNA を検出できるか否かを確認したところ、既存の RT-PCR 法と同定の感度でウイルスの検出が可能であった(図 3)。

### C. 考察

LLOV は、2002 年にフランス、スペインおよびポルトガルで大量死したユピナガコウモリ的一种から検出された。このウイルスのコウモリ以外の動物に対する病原性や種特異性は不明である。また、インドネシアのオランウータンやバングラデシュのフールツバットから複数のフィロウイルス種に対する特異抗体が検出されている。これらの報告は、未知のフィロウイルスがアジア・ヨーロッパも含めて広範囲に存在する可能性とともに、フィロウイルスの分布域は、現在我々が認識しているよりも遥かに広い可能

性を示唆している。本研究では、インドネシアのブタが LLOV に感染している可能性が示唆された。フィリピンの Reston ウイルスの例と同様にブタの間でウイルスが流行しているのか、他の動物種(例えば、コウモリ)から頻繁に暴露されているのか今後明らかにする必要がある。

これまでは、フィロウイルスによる感染症は世界の限られた地域でしか発生が認められていないが、昨今の急激な国際化による人の移動および動植物の輸出入に伴い、ウイルスが他国に拡散する可能性が高まっている。また、新種のエボラウイルスの出現やブタにおけるレストンエボラウイルスの感染は、フィロウイルス感染症対策上、新たな問題を提起した。さらに、エボラウイルスのような致死率の高い出血熱ウイルスはバイオテロリズムの手段として使用される可能性が指摘されている。このような危険度の高い伝染性病原体が日本に持ち込まれた場合に備えて国家レベルで対策を講じる事が急務となってきた。これらの病原体の日本国内への侵入の有無を迅速に判断し、適切な対応措置を執るために、抗ウイルス薬やワクチンの開発とともに、感度および特異性の高い診断法の確立は重要な課題である。

### D. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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, Saphire 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.

3. 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, Saphire

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.

4. 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.

5. Kajihara M, Takada A. Host Cell Factors Involved in Filovirus Infection. *Current Tropical Medicine Reports* (in press)

## 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. 高田礼人、フィロウィ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

2. 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

3. 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

4. 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.

5. 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.

E. 知的財産権の出願・登録状況

図 1 : LLOV GP 抗原に対するマウス抗血清の反応性

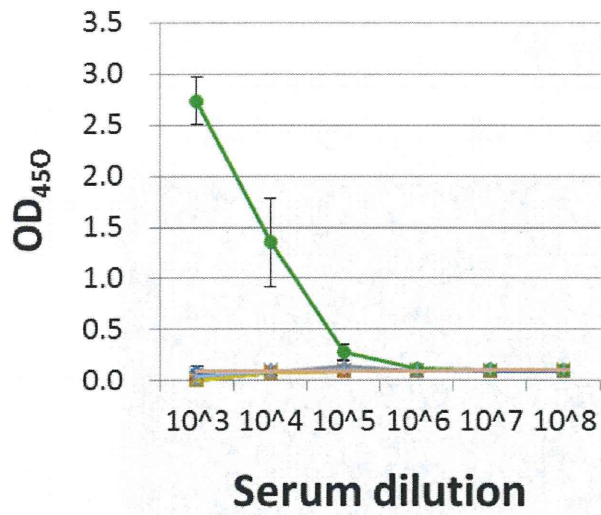


図 2 : LLOV GP 抗原に結合するブタ血清中の IgG 抗体

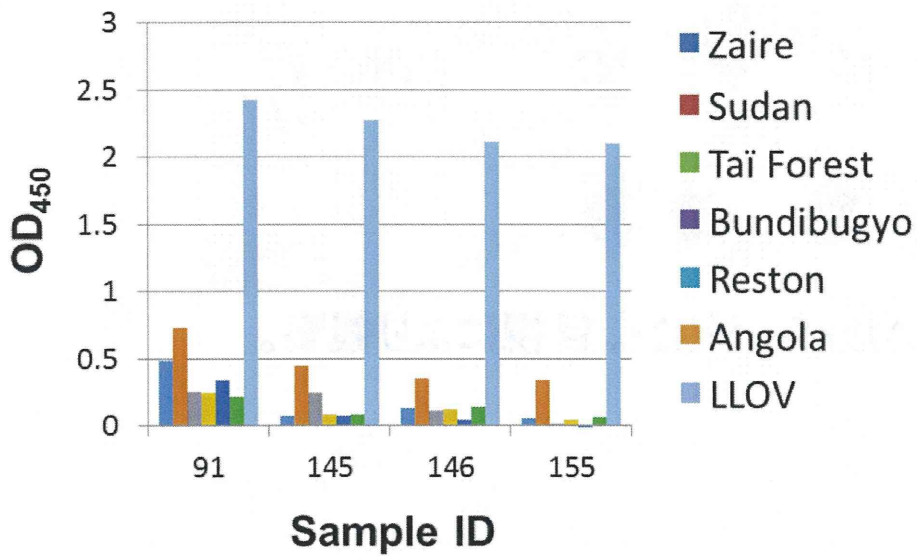
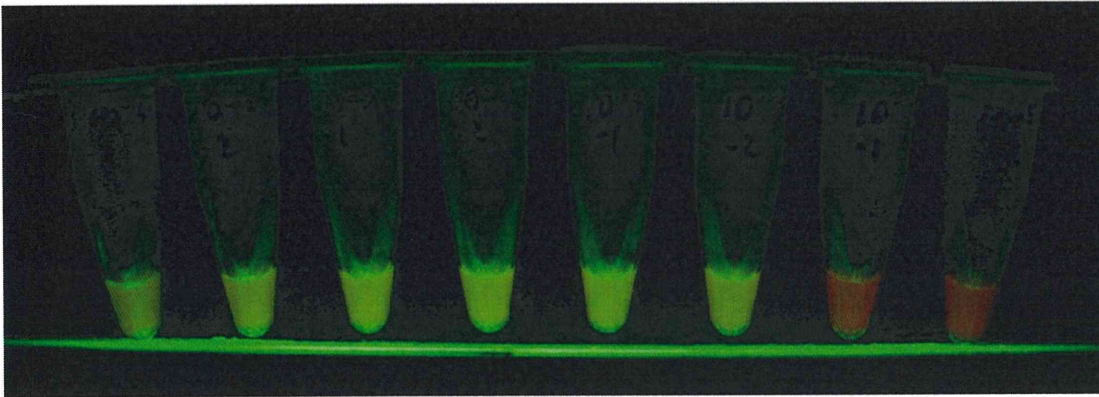




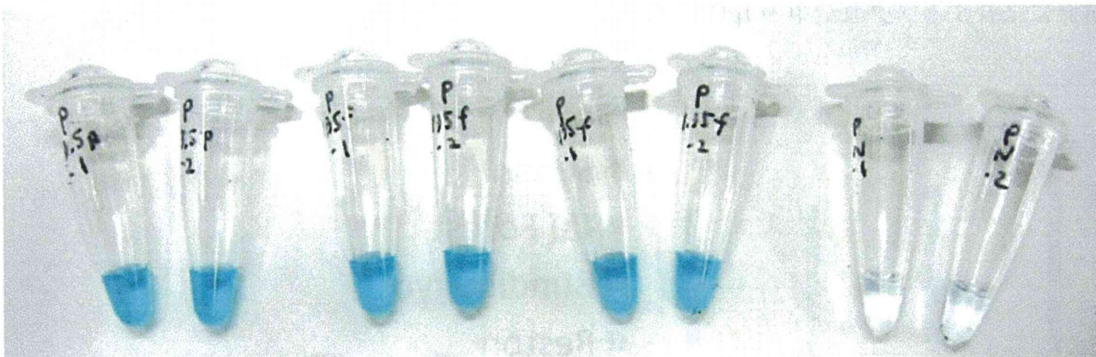
図3 : Zaire ebolavirus 検出用 LAMP 法

## ウイルスRNA希釈

-2   -2   -3   -3   -4   -4   -5   -5



蛍光試薬による検出。簡易LED装置にて観察。



ロイコ色素を用いたバージョン。目視により観察。

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：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

分担研究者：安田 二郎（長崎大学熱帯医学研究所教授）

#### 研究要旨

ラッサ熱の原因ウイルスであるラッサウイルス（LASV）の粒子形成・出芽においてウイルスマトリクスタンパク質Zは中心的な役割を果たす。Zの出芽に必須な配列および機能を解析するため、Z欠損変異体を作製し、そのウイルス様粒子（VLP）産生能を比較検討した。その結果、3-10番目のアミノ酸がVLP産生に重要で、かつ細胞膜との結合に重要なミリスチル化を制御する配列であることを明らかにした。さらに、Zの3-10番目のアミノ酸をミリスチル化タンパク質として知られるHIV-1 GagやRSV v-srcの3-10番目のアミノ酸と置換することで一部VLP産生が回復することも見出した。しかし、これらの変異体は野生型と比較すると、細胞内のタンパク質安定性が低下しており、VLP産生効率も低下していることが示された。以上の結果から、Zの3-10番目のアミノ酸がVLP産生に重要であること、さらにLASV Z特異的な配列が効率の良いVLP産生に必要なことが明らかとなった。

#### A. 研究目的

アレナウイルス科に属するラッサウイルスはラッサ熱の原因ウイルスである。ラッサウイルスは西アフリカにおいて毎年数十万人の感染者が報告され、発症者の致死率は10-40%と考えられている。ラッサウイルス感染に対する有効なワクチンや抗ウイルス薬はなく、感染初期におけるリバビリンの静脈内投与が一部の感染者の発症予防に有効である。ただし、効果が限定的であること、副作用が強いこと、投与方法が限定されていることからより有効な治療法の確立が望まれている。

我々はこれまでにラッサウイルス粒子形成過程の分子生物学的解析を進めてきたが、この機構をより詳細に理解することで抗ラッサウイルスの標的を見出すことを本研究の目的とした。

#### B. 研究方法

#### ラッサウイルス粒子形成機構の解析

ラッサウイルスのZタンパク質はウイルス粒子形成・出芽において中心的な役割を果たす。実際、Zタンパク質の細胞内単独発現でウイルス様粒子（VLP）が産生される。このことから、感染性ラッサウイルスの使用はバイオセーフティーレベル（BSL）-4に限定されているものの、ウイルス粒子産生機構の解析はZタンパク質やその他のタンパク質の過剰発現系を用いてBSL-2で可能となった。これまでにラッサウイルスZによるVLP産生に必要なZ側の因子として2番目のグリシン（G2）、中央に位置するRINGドメイン、そしてC末端に位置する二つのL-ドメイン（PSAPとPPPY）が知られている。昨年度、我々はG2とL-ドメイン以外の配列を平均10アミノ酸ずつ削ったZ欠損変異体を作製し（ $\Delta 1$ - $\Delta 9$ ）、これらZ欠損変異体によるVLP産生能を検討した。その結果 $\Delta 1$ （3-10番目アミノ

酸欠損)が VLP 産生に重要であることを報告した。

そこで、本年度は LASV Z の 3-10 番目のアミノ酸が LASV Z のアミノ酸配列特異的に VLP 産生に重要であるか検討するために、ミリスチル化の解析が進んでいる HIV-1 Gag または Rous Sarcoma virus (RSV)の v-src の 3-10 番目の配列を LASV ZΔ1 に挿入することで、その VLP 産生能を検討・比較した (図 1A)。また、これら変異体の細胞内局在も共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

#### C. 研究結果

野生型 (WT) の LASV Z の細胞内発現及び VLP 産生は効率良く検出された。一方、両変異体 (HIV-1 Gag10 及び v-src10)の細胞内発現は WT と比較して減弱していた (図 1B)。VLP 産生量を定量化したところ、両変異体において VLP 産生も WT と比較して減弱していることが明らかとなった (図 1B)。LASV Z の WT 及び両変異体の 293T 細胞における細胞内局在を観察したところ、全ての Z は細胞膜及び一部の細胞内オルガネラに局在することが明らかとなった (図 2)。

WT と両変異体での局在の大きな違いは見られず、後期エンドソームマーカーである CD63 との共局在は観察されなかった。

#### D. 考察

LASV Z の WT 及び変異体の VLP アッセイ (図 1)から、LASV Z の 3-10 番目のアミノ酸は細胞内発現の安定性に寄与することが示唆され、加えて VLP の効率的な産生に LASV Z 特異的なアミノ酸が重要であることが示唆された。5 番アミノ酸がスレオニン (T)/セリン (S)であることがミリスチル化シグナルのコンセンサス配列として知られているが (M-G-X-X-T/S、図 1A \*)、LASV Z の粒子産生には必ずしも T/S が必要で

はないことが示唆された。細胞内局在の解析から (図 2)、野生型と両変異体の VLP 産生効率の違いが Z の細胞内局在の変化によるものではないことが示された。

#### E. 結論

LASV Z の 3-10 番目のアミノ酸はミリスチル化に重要であり、VLP 産生に必須であることが明らかとなった。また、この 3-10 番目の LASV Z 特異的なアミノ酸配列は Z による効率的な VLP 産生に重要であるとともに、Z の安定性にも寄与していることが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 5. 論文発表

##### 6. 学会発表

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

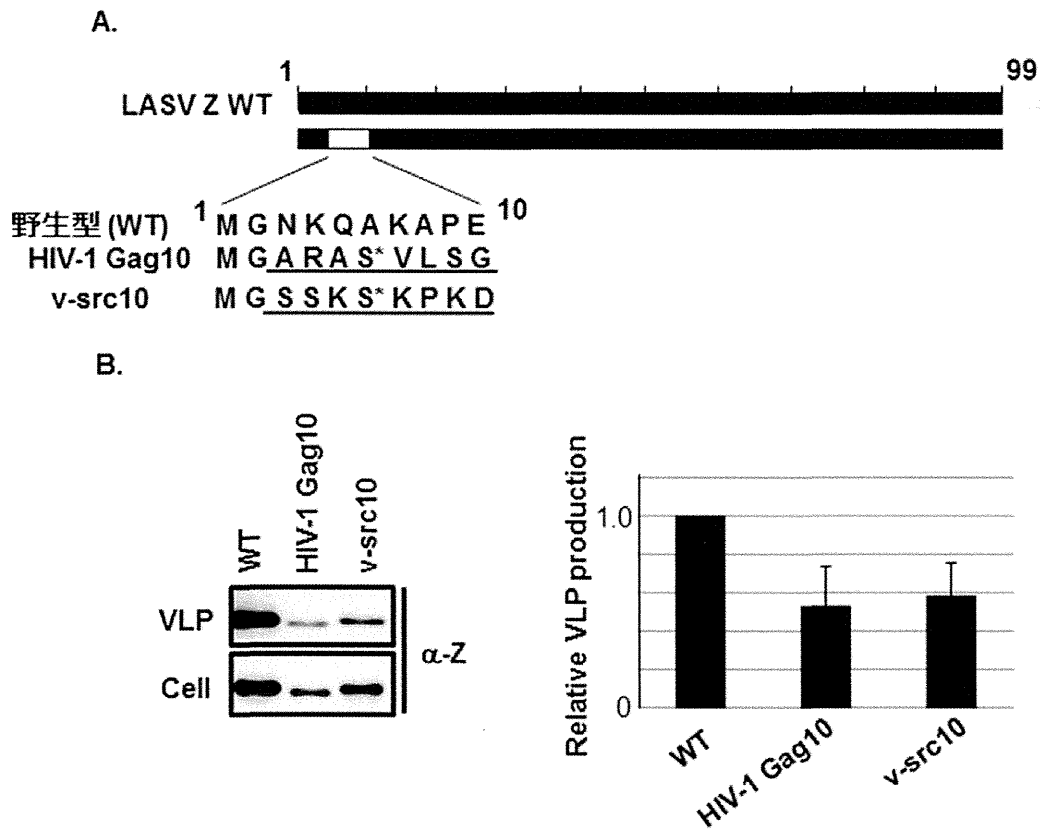


図1 ラッサウイルスZ 3-10番アミノ酸はタンパク質の安定性及び粒子産生において重要である

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：新型レオウイルスに関する研究

分担研究者：小林 剛（大阪大学微生物病研究所 特任准教授）

#### 研究要旨

本研究課題は高病原性新型レオウイルス（Pteropine Orthoreovirus; PRV）の感染制御基盤を確立することを目的としている。平成26年度では、前年度に開発に成功した PRV Miyazaki 株における遺伝子操作系を用いて、株間において相同性が大きく異なり、病原性にも深く関わる S1 遺伝子（p10、p17、sigmaC をコードする）の変異ウイルスを作製し、解析を行った。その結果、p10、p17、sigmaC はウイルスの複製に必須でないことを明らかにした。これらの成果は、新型レオウイルスの複製機構、病態発現機序を理解する上で極めて有用な知見と考えられる。

#### A. 研究目的

Pteropine Orthoreovirus (PRV) は、ヒトに重篤な呼吸器疾患を引き起こすコウモリを起源とする高病原性レオウイルスである。本研究課題では、PRV 感染における迅速な診断法の確立、遺伝子操作系、動物モデルの確立を行うことで、PRV の感染制御に関する研究基盤を確立することを目的としている。平成26年度では、PRV の遺伝子操作系を用いて、病原性に関与すると考えられる S1 遺伝子にコードされる p10、p17、sigmaC の変異ウイルスを作製し、これらのウイルスタンパク質のライフサイクルにおける役割について培養細胞を用いて解析を行った。

#### B. 研究方法

##### ●S1 遺伝子変異 PRV の作製

PRV S1 遺伝子は3つの Open Reading Frame (ORF) をコードしており、p10、p17、sigmaC が発現される。これら3種類の PRV タンパク質の詳細な機能は明らかにされていないことから、p10、p17、sigmaC の各々の発現を

欠損させた変異ウイルスの作製を行った。方法として、p10、p17、sigmaC ORF の翻訳開始コドンに変異 (ATG→ACG) を加え、さらに翻訳開始コドンのすぐ下流に翻訳終止コドンを入れた S1 遺伝子変異レスキュープラスミドをそれぞれ構築した。構築した各種 S1 遺伝子変異プラスミドを他の Miyazaki 株由来の9つの分節遺伝子レスキュープラスミドと同時に T7 RNA ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルス感染 L929 細胞にトランスフェクションし、培養後、目的とする組換えウイルスをプラークアッセイにより単離した。sigmaC 欠損ウイルスについては、sigmaC ORF の大部分を欠損させた組換えウイルスの作製についても行った (sigmaC-del)。p10 については、欠損ウイルスに加え、細胞活性融合ドメイン (Hydrophobic domain) を含む p10 機能領域内に様々なアミノ酸変異を導入した組換えウイルスについても作製した。各種組換えウイルスの細胞融合活性、培養細胞での複製能等について詳細な解析を行った。

(倫理面への配慮)

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、「ネルソンペイオルソ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)。

### C. 研究結果

#### ●PRV p10 変異ウイルスの機能解析

p10 は細胞融合能を保持することが知られている。p10 のウイルス複製における機能を解析するため、p10 欠損ウイルスの作製を試みた。p10 欠損ウイルスの作製に成功したことから、p10 は培養細胞における複製には必須でないことが明らかとなった。培養細胞に感染させ、細胞融合能について解析した結果、野生型 PRV は、顕著な細胞融合活性を示したのに対し、p10 欠損ウイルスでは細胞融合活性が消失していた(図1)。培養細胞におけるウイルス増殖能について解析した結果、p10 欠損ウイルスは野生型 PRV と比較して、増殖能が顕著に低下していた(図1)。次いで、p10 機能領域内に様々なアミノ酸変異を導入した変異ウイルスを作製し、培養細胞における複製能を検討した結果、ウイルス複製能は細胞融合活性と強い相関性が認められた(図2)。これらの結果より、p10 はウイルス複製に必須ではないが、p10 の細胞融合活性は効率的なウイルス複製に関与していることが示唆された。

#### ●PRV p17 欠損ウイルスの機能解析

トリレオウイルスのp17は核-細胞質間をシャトリングすることが知られているが、PRV p17のウイルス複製における機能については解明が進んでいない。p17 のウイルス複製における機能を解析するため、p17 欠損ウイルスの作製を

試みた。その結果、p17 欠損ウイルスの作製に成功したことから、p17 は培養細胞における複製には必須でないことが明らかとなった。次いで、培養細胞に感染させ、細胞融合能について解析した結果、p17 欠損ウイルスは、野生型 PRV と同様に細胞融合活性を示した。Vero 細胞におけるウイルス増殖能について解析した結果、p17 欠損ウイルスは野生型 PRV と同程度の増殖能を示した(図3)。これらの結果から、p17 は少なくとも Vero 細胞における複製には必須でないことが示唆された。

#### ●PRV sigmaC 欠損ウイルスの機能解析

PRV sigmaC はセルアタッチメントタンパク質として、細胞への吸着・侵入に重要な役割を担っていることが示唆されている。sigmaC のウイルス複製における機能を詳細に解析するため、sigmaC 欠損ウイルスの作製を試みた。その結果、sigmaC 欠損プラスミドをトランスフェクションし、培養後、プラークアッセイを行った結果、プラークが観察された。次いで、プラークから得られた組換えウイルスのゲノム電気泳動およびシーケンス解析を行った。その結果、sigmaC 遺伝子を欠損させた変異ウイルスからの S1 遺伝子の泳動パターンは野生型と比較し、明らかにサイズが異なっていた(図4)。シーケンス解析の結果、目的とする変異も確認された。sigmaC 特異抗体を用いて、感染細胞における sigmaC タンパク質の発現を解析した結果、sigmaC 欠損ウイルスでは sigmaC の発現が認められなかった(図4)。sigmaC 欠損ウイルスの L929 細胞における感染性、複製能を解析した結果、sigmaC 欠損ウイルスは野生型ウイルスと同程度の感染性、増殖能を示した(図5)。これらの結果は、sigmaC は L929 細胞におけるウイルス複製に必須でないことを示している。

### D. 考察

PRV p10 欠損ウイルスの解析から、p10 はウ

ウイルスの複製に必須ではないが、効率的なウイルス複製に重要であることが明らかとなった。また、p10の複製能増強作用にはp10の細胞融合活性が深く関与していた。今後、p10のin vivoにおける病原性への関与について動物モデルを用いて解析する必要がある。過去に他のレオウイルスのPRV p10ホモログである細胞融合タンパク質を用いた動物実験の解析では、病原性の増強に深く関与していることが報告されている。そのため、p10欠損ウイルスでは野生型と比較して、病原性の低下が予想され、p10欠損ウイルスを弱毒ワクチン候補株として応用できる可能性が期待される。

PRV p17欠損ウイルスを用いた解析結果から、p17はVero細胞における増殖には影響しないことが明らかとなった。p17は核と細胞質に局在し、ORF内における局在化シグナルの存在も報告されている。しかし、p17に存在する機能ドメインとウイルス増殖能における関連性については不明である。p17の機能ドメインに変異を加えた組換えウイルスを作製し、様々な細胞株、動物モデルを用いて組換えウイルスの詳細な解析を行うことで、p17の機能を明らかにできると考えられる。

sigmaC欠損ウイルスが作製できたことから、sigmaCは少なくともL929細胞での複製には必須ではないことが明らかとなった。sigmaCはセルアタッチメントに必要と考えられているが、L929細胞ではsigmaCおよび（あるいは）他のPRVタンパク質がウイルスの吸着・侵入に重要な役割を担っていることが示唆された。今後、sigmaC欠損ウイルスの様々な細胞株に対する感染性の検討、感染受容体の同定を行い、PRVの感染初期過程を標的とした抗ウイルス戦略の策定に有用な知見を蓄積する必要があると考えられる。

## E. 結論

前年度に前倒しでPRV Miyazaki株における遺伝子操作系の開発に成功したことから、平成26年度はPRVの遺伝子操作系を駆使し、S1遺伝子の変異ウイルスを作製し、ウイルスタンパク質の機能解析を行った。得られた成果は、PRVに対するワクチン開発、レポーター遺伝子を用いた抗ウイルス薬のスクリーニング系を開発する上で有用な知見と考えられる。継続して研究を遂行することで今後、より一層の進展が期待される。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 7. 論文発表

1. 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).
2. 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).
3. 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).

#### 8. 学会発表

1. 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）
2. 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）
3. 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）
4. 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）
5. 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 回日中国際ウイルス学会、中国長春市（2014 年 8 月 25～27 日）
6. 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）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況



図1. p10欠損ウイルスの性状解析

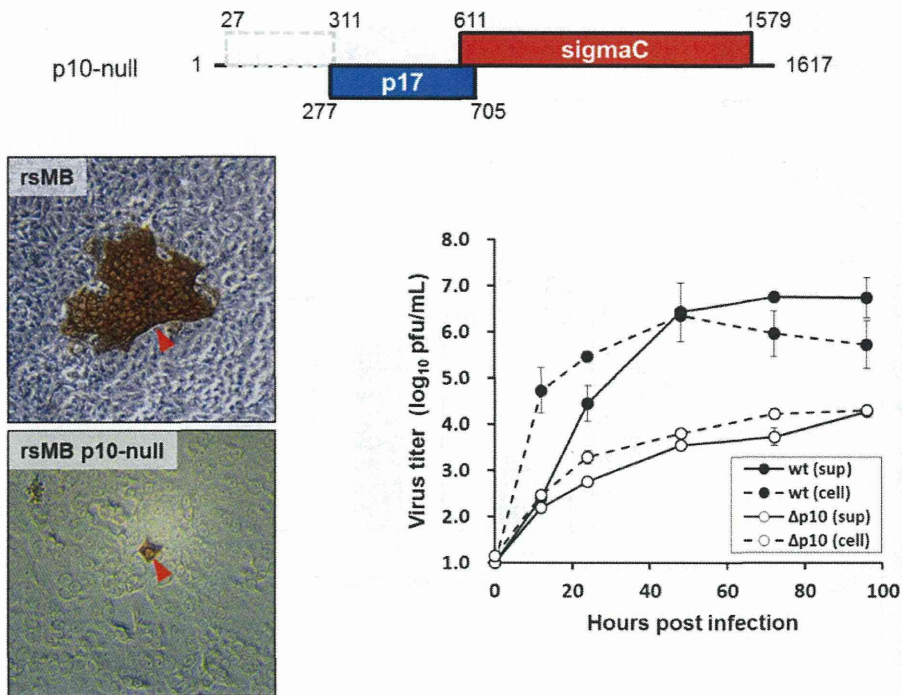


図2. p10アミノ酸変異ウイルスの性状解析

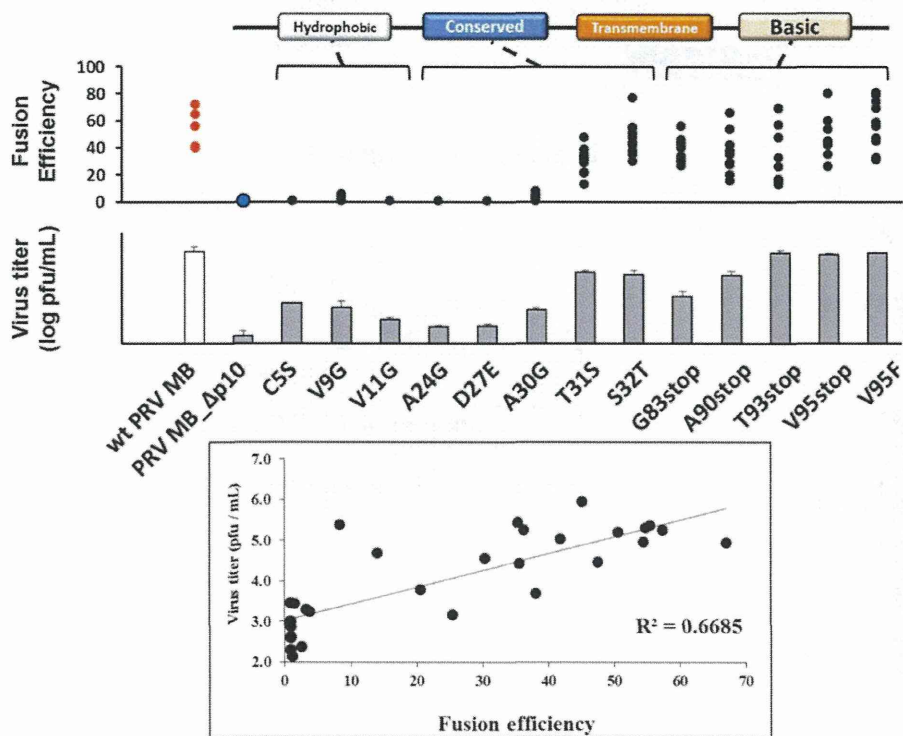


図3. p17欠損ウイルスの性状解析

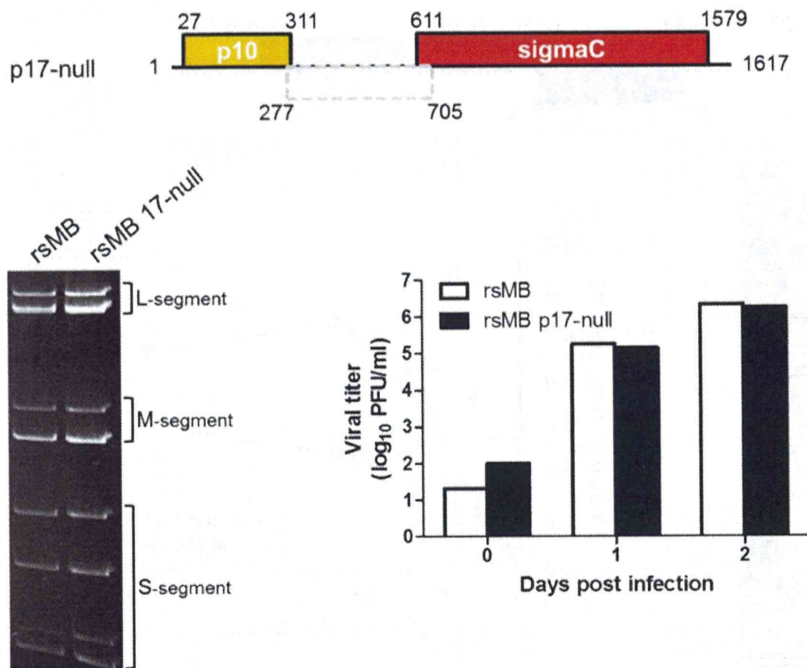


図4. sigmaC欠損ウイルスの性状解析1

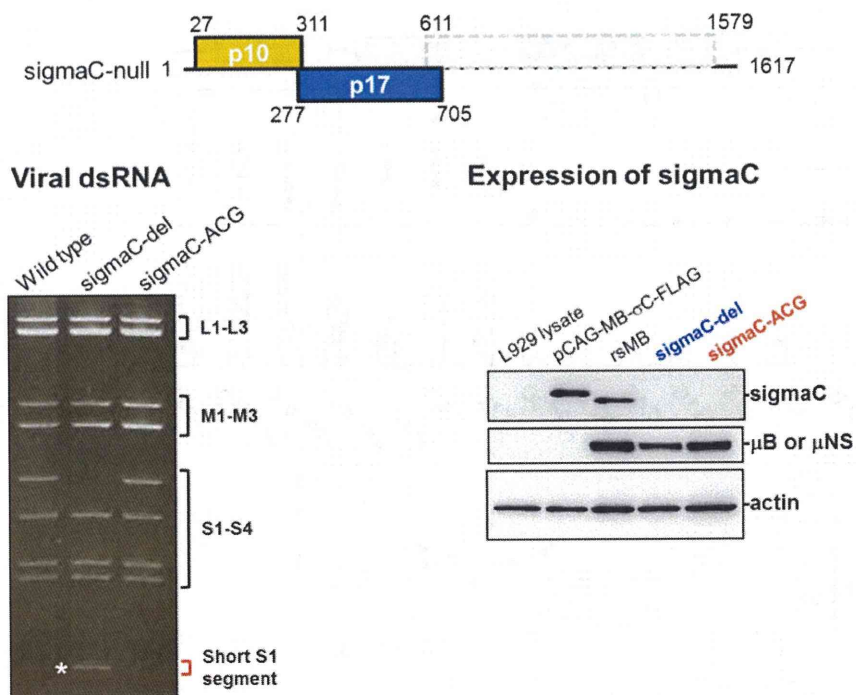
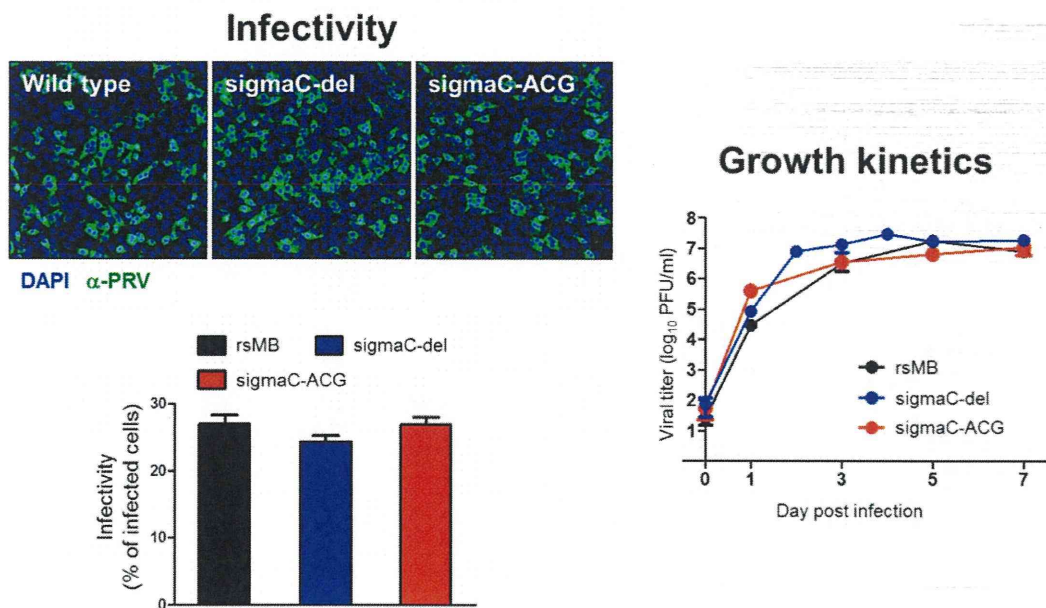


図5. sigmaC欠損ウイルスの性状解析2



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：レオウイルス等の感染機構と予防・治療への応用

分担研究者：堀本 泰介（東京大学大学院農学生命科学研究科・准教授）

研究要旨

リフトバレー熱は人獣共通感染症であり公衆衛生学的に重要なウイルス感染症である。わが国には流行がないが輸入感染症となる恐れがあり、検査体制の構築が必要である。本研究では、VSV シュードタイプウイルスを用いた簡便な中和抗体検出系の確立を目指し力価の高い抗原ウイルス作製法を検討し、問題点を提示した。一方、コウモリ由来ウイルスの公衆衛生学的リスク評価のため、フィリピンのオオコウモリからウイルス分離を試みたところ、新規のレオウイルスの分離に成功した。さらに、同ウイルスの膜融合タンパク質 p10 をクローニングしその新規ウイルスベクター開発への応用性を検討したところ、p10 搭載することで非増殖型ウイルスの感染性増強が認められた。このウイルスベクター戦略は、新規ワクチンの開発に応用できる可能性がある。

A. 研究目的

(1)リフトバレー熱の疫学調査や診断に役立てるために、BSL2 で使えるリフトバレー熱ウイルス (RVFV) の VSV シュードタイプウイルスを用いた簡便な中和抗体検出系を確立する。

(2) コウモリ由来新規レオウイルスに関する疫学調査を行い、ヒトへの浸潤状況、病原性の有無に関する情報を収集する。またコウモリから分離したウイルスの性状に基づく新規ウイルスベクターを開発しワクチン開発に活かす。

B. 研究方法

(1)RVFV のエンベロープタンパク質 Gn/Gc を被った VSV シュードタイプウイルスを作製した。さらに高力価のシュードタイプウイルスを作製するために、本ウイルスの Gn/Gc タンパク質の細胞質内領域を欠損した変異体や VSV のエンベロープタンパク質 G とのキメラタンパク質を作製し、シュードタイプウイルス作製に用いた。

(2)ウイルス分離のために、フィリピンで採材した *Eonycteris splanca* (ヨアケオオコウモリ)の口腔スワブおよび直腸スワブを培養細胞に摂取した。コウモリ由来新規レオウイルス p10 遺伝子をクローニングし、インフルエンザウイルス遺伝子発現プラスミドに組み込み一回増殖型インフルエンザウイルスベクターの作製を試みた。

(倫理面への配慮)

研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）に関わる状況、実験動物に対する動物愛護上の配慮などに倫理面に配慮する必要のある研究は行っていない。

C. 研究結果

(1)野生型の Gn/Gc タンパク質を用いた場合のシュードタイプウイルスの力価は 104 FFU/ml 程度であった。細胞質内領域欠損変異体や GnGc