

—VSVG キメラタンパク質を用いた場合でもシュードタイプウイルスの力価は野生型の場合と同程度であった(図 1)。

(2) オオコウモリ口腔スワブサンプルを摂取した MDCK 細胞において巨細胞形成を伴う CPE が観察された。電子顕微鏡、遺伝子検査によって新規のプテロパインオルソレオウイルス (PRV) であることがわかった(図 2)。この PRV の p10 遺伝子を細胞に発現させると巨細胞が形成された(図 3)。p10 遺伝子の有無で一回増殖型インフルエンザウイルスベクター感染細胞内での M1 タンパク質発現を比べたところ p10 遺伝子があることで発現量が増加した(図 4)。

D. 考察

(1)RVFV は Gn/Gc タンパク質によってウイルス粒子形成されるので、VSV シュードタイプウイルス上に乗りにくい構造をしている可能性が考えられた。今後は非増殖型 RVFV の作製も含め検討する。

(2)p10 タンパク質が誘導する細胞融合によって感染細胞数が増加し、ウイルスタンパク質の発現量が増加したことが考えられる。今後は動物モデルを用いてワクチンベクターとしての有用性を評価する。

E. 結論

レオウイルス p10 タンパク質を用いたウイルスベクター開発の進展が期待できる成果が得られた、一方 BSL2 で扱える RVFV のシュードタイプウイルスの作製は改善の余地が大いにある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

9. 論文発表

10. 学会発表

1)谷口怜、堀本泰介、Masangkay Joseph、Puentespina 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)

2)谷口怜、堀本泰介、Masangkay Joseph、Puentespina 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のプテロパインレオウイルスの分離、日本ウイルス学会学術集会、2014年11月(横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

p10 タンパク質を発現するウイルスベクターの出願を予定している。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

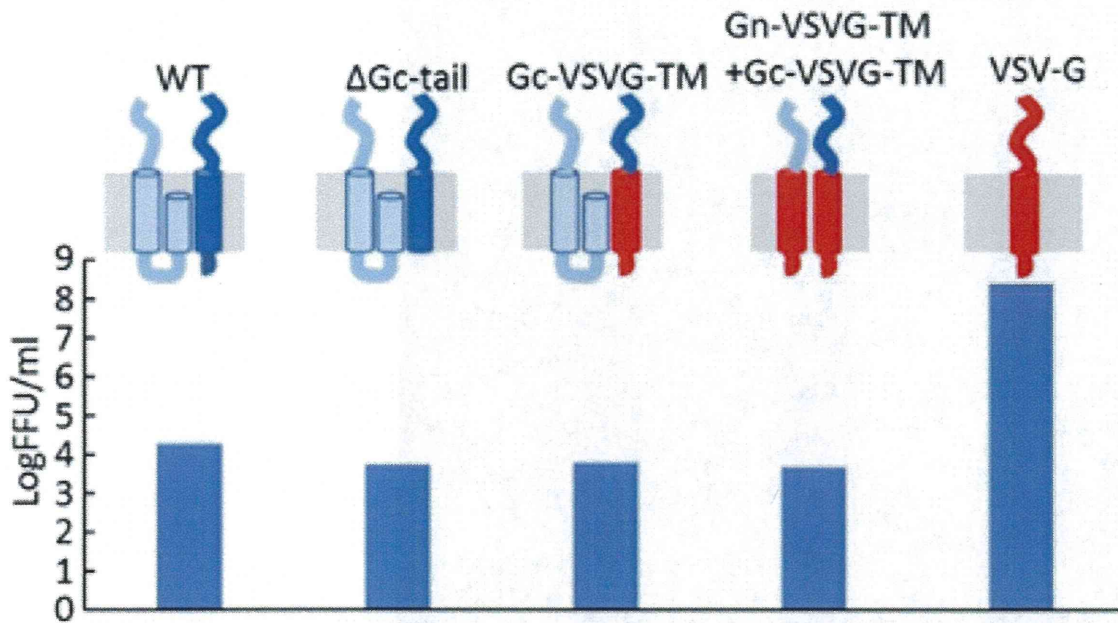


図1. RVFVのVSVシュードタイプウイルス

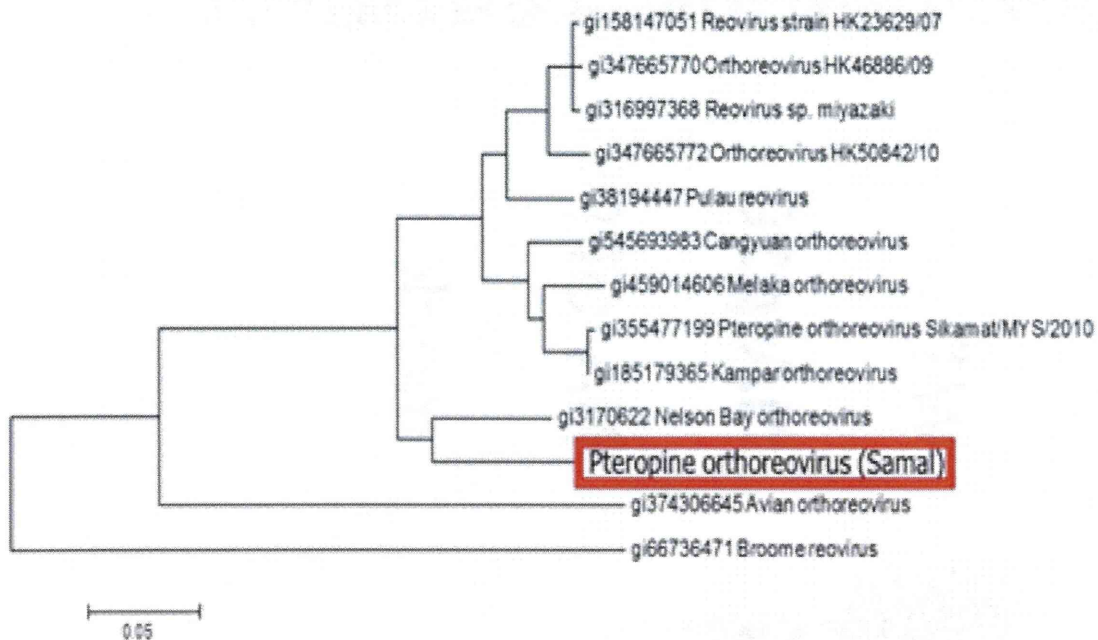


図2. PRV(Samal)株の系統樹解析

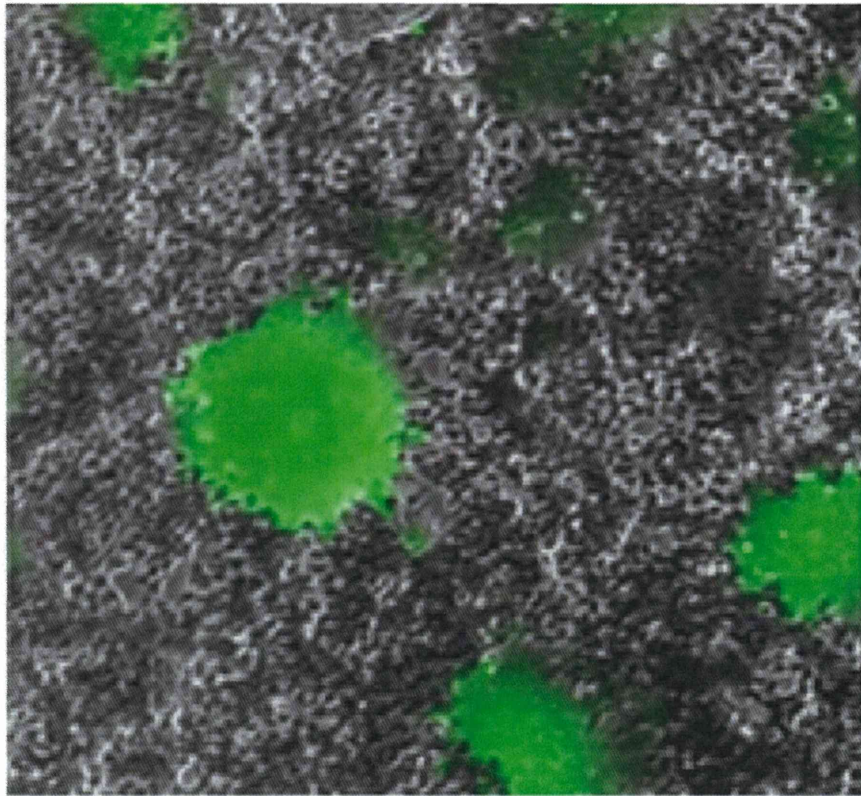


図3. p10タンパク質発現による巨細胞形成

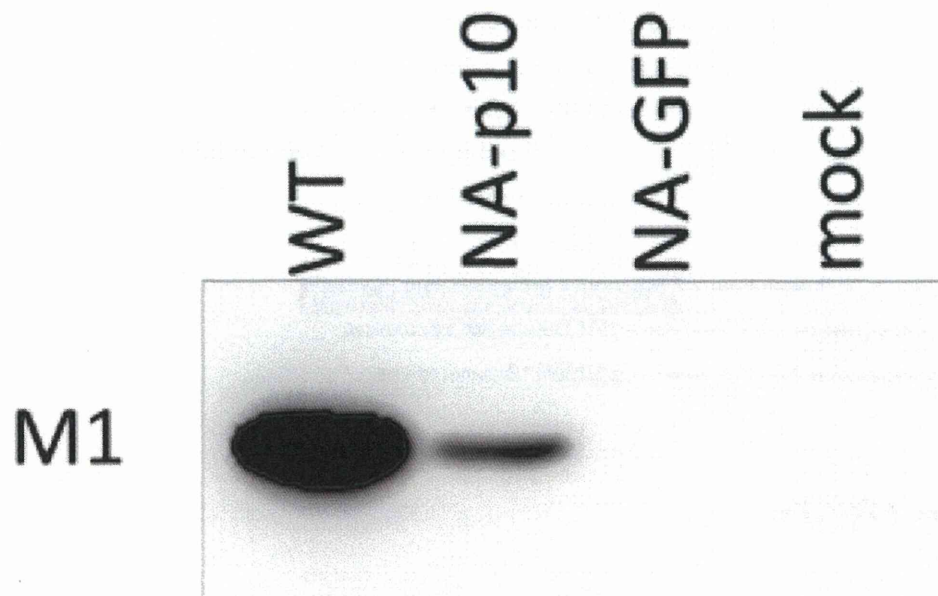


図4. p10タンパク質を発現するインフルエンザウイルススペクター感染細胞中のM1タンパク質発現

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：新型レオウイルスの型別抗体検出法の解析

分担研究者：西條 政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）

分担研究者：下島 昌幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨

コウモリレオウイルス Pteropine orthoreovirus (PRV) による呼吸器疾患が今世紀に入り相次いで報告されている。PRVの cell attachment protein (CAP) 以外の蛋白質のアミノ酸配列は株間で高度に保存されているが、CAP の場合は比較する株によって 60%以下の一致しか認められない。このことは血清疫学調査において感染していた株を推測するのに用いることを示しており、PRV の伝播状況把握に有益な情報となりえる。

CAP の一致度合いから PRV のヒト由来分離株は 3 グループに分けられるので、各々のグループの株の CAP を組換えバキュロウイルスを用いて発現させ精製し、ウサギ抗血清を得た。CAP を抗原とした ELISA で、抗血清の交差反応は弱いながらも認められた。

3 グループの CAP への反応性で感染 PRV 株の型別が可能か、あるいは CAP の短縮化が必要か、今後検討すべきである。

A. 研究目的

コウモリ由来レオウイルス Pteropine Orthoreovirus (以下 PRV) は 1960 年代にオーストラリアの食果コウモリから初めて分離された。培養細胞において巨細胞を形成するなど哺乳類レオウイルス Mammalian Orthoreovirus (主に小児に風邪や下痢を起こす) とは異なる性状を持ち、中和の交差反応も示さなかった。マレーシアや中国の食果コウモリからも PRV は見出されている。

今世紀に入り、PRV による成人の呼吸器疾患が相次いで報告された (右下表、Chua et al., 2007, 2008, 2011)。いずれもマレーシア在住もしくはインドネシアのバリ島への訪問歴があり、多くでコウモリとの接点があるため、マレーシアやインドネシアのコウモリを宿主とする本ウ

イルスがヒトに感染し呼吸器疾患を引き起こしたと考えられる。家族が遅れて類似の症状を示していることから、ヒトからヒトへ伝播しうるウイルスである。2007 年にはバリ島を訪問した日本人成人男性が発熱・咳・咽頭痛を示し帰国後入院し、PRV の感染であることが判明した (Yamanaka et al., 2014)。このような例は他にインドネシアを訪問し香港で発症した 3 例があり (Wong et al., 2012)、PRV は輸入感染症をも起こすウイルスと言える。マレーシアでは患者発生地域で抗体調査が行われ、住民の約 13% が抗体陽性であり、認識はされていないものの PRV が蔓延しているものと考えられる (Chua et al., 2007)。

これまで分離されたヒト由来 PRV は 7 株が塩基配列情報とともに知られている。PRV の蛋白

質のうち、cell attachment protein (CAP) 以外の蛋白質は良く保存されているが、CAPは株間によってはアミノ酸配列の一致が60%以下となる(図1)。この7株はMiyazaki-Bali/2007グループ(HK46886、HK50842およびKampar株を含む)、Melakaグループ(Sikamat株を含む)、HK23629グループの3グループに分けられると考えられる。アミノ酸配列の不一致度合は、血清疫学調査においてCAPを抗原に用いれば、感染から回復し体内からPRVが消失した後も感染していたウイルス株をある程度推測できる可能性があることを示し、PRV伝播状況の有益な情報を得られる可能性があること意味する。

本研究では、CAPを抗原にした抗体検出系を構築し、感染PRV株の型別が可能か検討した。

B. 研究方法

B-1. 抗CAP血清の調製

Miyazaki-Bali/2007株、Melaka株、HK23629株のCAP cDNAを用いて組換えバキュロウイルス発現系で各CAPを発現させた。精製は高濃度(8M)のUrea溶液への溶解性を用いて行った。精製CAPはアジュバントTiterMax Goldとともにウサギ2羽ずつに皮下投与し、各CAPに対する抗血清を得た。

B-2. ELISA

バキュロウイルス感染Tn5細胞を1% NP40で処理したlysateを抗原(800倍希釈)に用いたELISAにて抗血清の反応性を検討した。

C. 研究結果

C-1. ELISAにおける抗血清の反応性

Miyazaki-Bali/2007株CAPを免疫原にして得られた抗血清の反応性を図2に示す。Miyazaki-Bali/2007株CAPに対する強い反応性が高希釈においても認められた。Melaka株CAPを免疫原にして得られた抗血清の反応性を

図3に示す。Melaka株CAPに対する強い反応性が高希釈においても認められた。HK23629株CAPを免疫原にして得られた抗血清の反応性を図4に示す。HK23629株CAPに対する強い反応性が高希釈においても認められた。

D. 考察

ウサギの免疫に用いた抗原とELISA抗原が一致する場合のELISAでの反応性は、一致しない場合に比べ明らかに強いものであった。免疫にウサギを2羽ずつ用いたが、いずれのウサギでも同様の傾向を示した。この結果は当然ともいえるものではあるが、実際に抗原-抗体の組み合わせの一致/不一致がELISAで判断できるか確認する必要がある、本研究により明らかに区別できることが確認できた。

より明確な型別、あるいはイムノクロマトグラフィ-ICGによるより簡便な区別をすると想定した場合には、不一致の組み合わせでの反応を下げる工夫が必要である。例えば全長のCAPを抗原とするのではなく、配列の一致が低い抗原性の高い領域のみをELISA(あるいはICG)の抗原として用いる等である。更に患者血清としてMiyazaki-Bali/2007株の由来である患者の回復期の血清があるので、その反応性がどのように出るか今後検討する必要がある。

E. 結論

コウモリレオウイルスPRVの保存性の低い蛋白質CAPを抗原としたELISAで、感染していたPRV株(グループ)を区別しうることを確認した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

11. 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) 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.

5) 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.

12. 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レト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：PRVのヒト分離株間におけるCAPおよびMOPのアミノ酸配列の一致

ヒト由来 Pteropine Orthoreovirus		右上: Major outer capsidの株間の一致(アミノ酸%)						
		Miyazaki	HK46886	HK50842	Kampar	Sikamat	Melaka	HK23629
左下: Cell attachment proteinの 株間の一致 (アミノ酸%)	Miyazaki	-	99.4	99.2	96.7	98.3	98.1	99.2
	HK46886	100.0	-	99.2	96.9	98.3	98.0	99.2
	HK50842	99.4	99.4	-	97.2	98.6	98.3	98.9
	Kampar	93.7	93.5	92.9	-	96.7	97.5	96.6
	Sikamat	57.1	56.2	56.5	55.6	-	98.6	98.0
	Melaka	57.3	56.4	56.7	56.1	96.3	-	97.8
	HK23629	56.2	56.2	55.6	56.5	67.3	66.4	-

図2：抗 Miyazaki-Bali/2007 株 CAP 血清の ELISA における反応性

Results: IgG ELISA for further antibody titer determination in the hyperimmune serum harvested from rabbits, immunogenicity and potential cross-immunogenicity among the immunogen group(s) in Recombinant Proteins Immunized Rabbits Using Baculovirus Infected Cell Lysate (CL) (1:800)
 Immunogen: pAcYM-1-His - Recombinant Cell Attachment Protein-Miyazaki-Bali/2007 Orthoreovirus

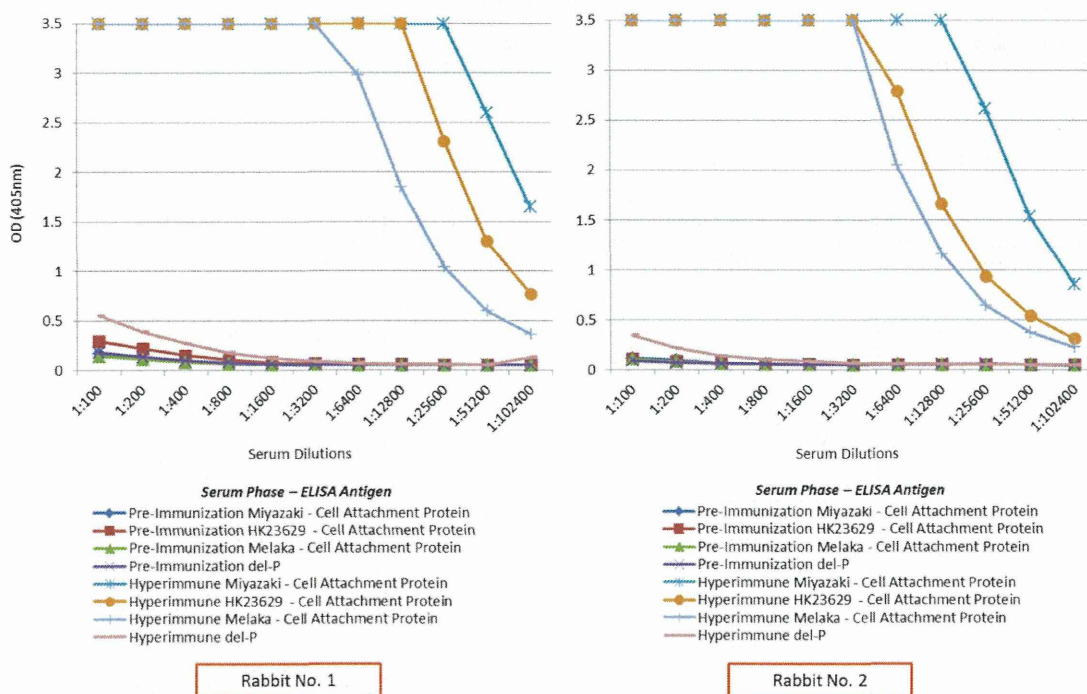


図3：抗 Melaka 株 CAP 血清の ELISA における反応性

Results: IgG ELISA for further antibody titer determination in the hyperimmune serum harvested from rabbits, immunogenicity and potential cross-immunogenicity among the immunogen group(s) in Recombinant Proteins Immunized Rabbits Using Baculovirus Infected Cell Lysate (CL) (1:800)
Immunogen: pACYM-1-His - Recombinant Cell Attachment Protein-Melaka Orthoreovirus

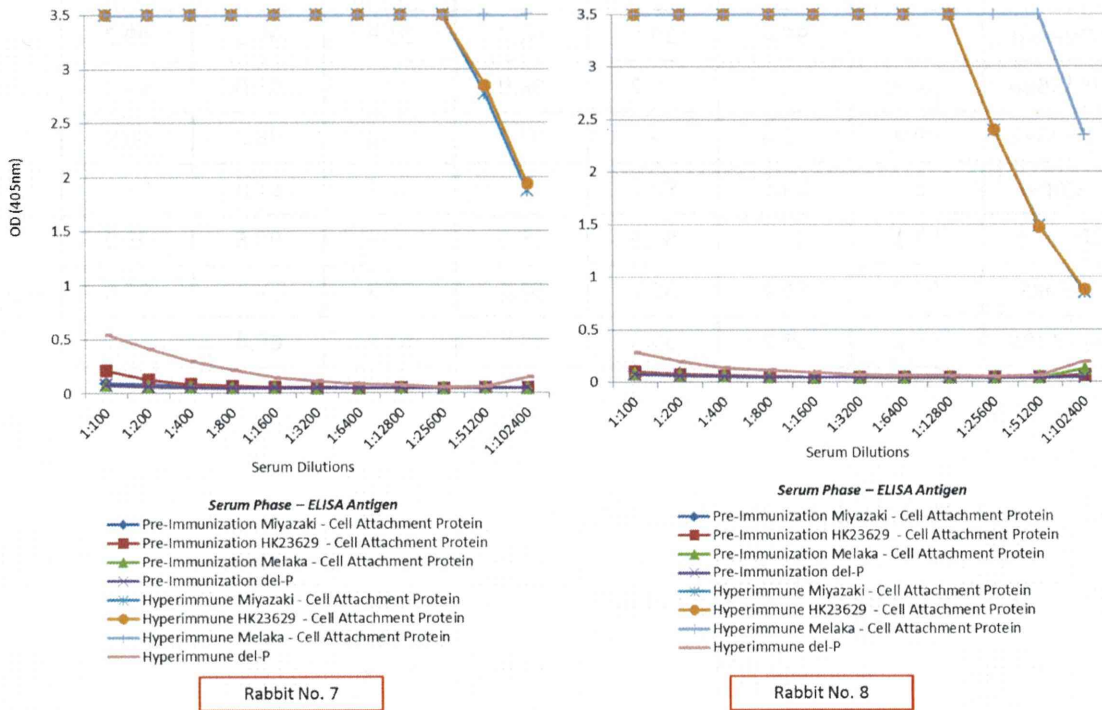
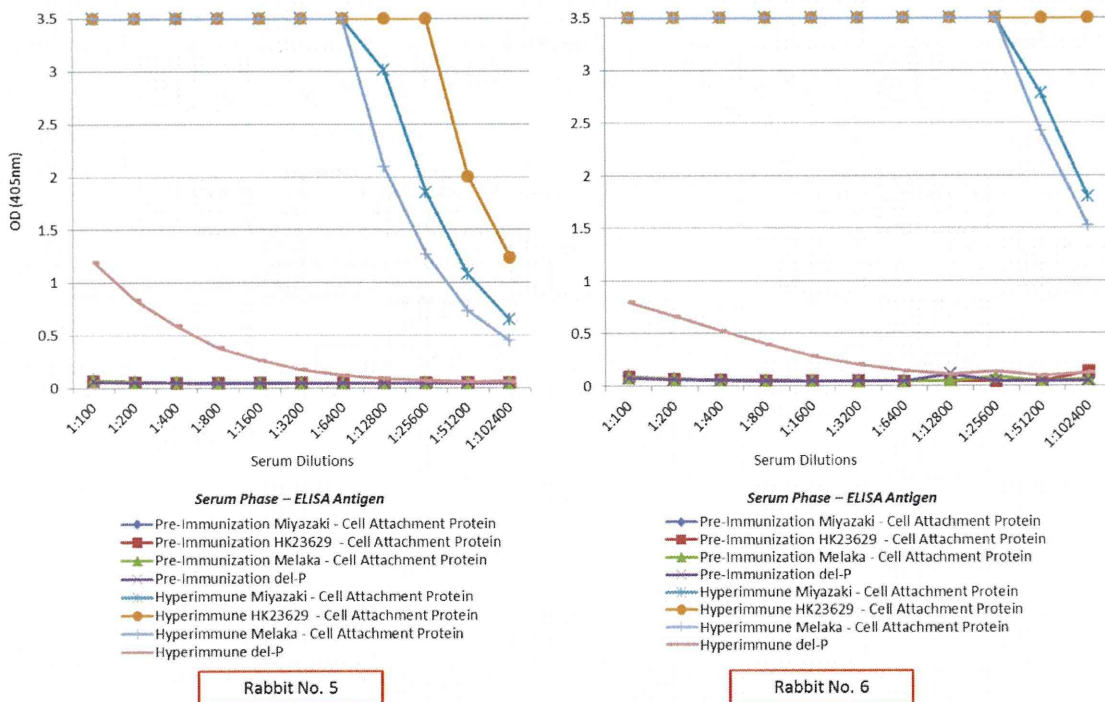


図4：抗 HK23629 株 CAP 血清の ELISA における反応性

Results: IgG ELISA for further antibody titer determination in the hyperimmune serum harvested from rabbits, immunogenicity and potential cross-immunogenicity among the immunogen group(s) in Recombinant Proteins Immunized Rabbits Using Baculovirus Infected Cell Lysate (CL) (1:800)
Immunogen: pACYM-1-His - Recombinant Cell Attachment Protein-HK23629 Orthoreovirus



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：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

分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所獣医科学部）

研究協力者：朴ウンシル、木村昌伸、今岡浩一（同、獣医科学部）、

福士秀悦、福間藍子、下島昌幸、西條政幸（同、ウイルス第一部）

研究要旨

1 類感染症に指定されているウイルス性出血熱ウイルス（エボラ出血熱、マールブルグ出血熱、ラッサ熱、クリミア・コンゴ出血熱、南米出血熱）のうち、最も広範囲に分布するのはクリミア・コンゴ出血熱(CCHF)である。CCHFは、アフリカ、バルカン、中東、アジアで発生していて、特にトルコやインドでは近年患者が急増している。CCHF ウイルス (CCHFV) を媒介するのは主に *Hyalomma* 属のマダニで、北限は北緯 50 度である。CCHF は、中国では新疆ウイグルで発生し、タクラマカン砂漠辺縁を中心としてウイルス保有マダニが分布する。モンゴルは、国土の多くが北緯 50 度以南で中国の北部に隣接し、新疆の東にゴビ砂漠が展開する。本研究では、モンゴルに CCHFV が分布するか、する場合にはどの地域に分布するかを明らかにすることを目的とする。これまでにヒツジの CCHFV 抗体保有状況を調査した結果、南部の Khovd 県から Dornogovi 県にかけて陽性動物が見出された。ヒツジの抗体陽性率は、西側の新疆近辺で最も高く 20%以上、東南部では 5-10%と低かった。さらにモンゴルの人の血清疫学を実施した結果、比較的低率ながら抗体陽性者が見出され、モンゴルには CCHFV が存在することが強く示唆された。

その他の研究協力者：Odbileg Raadan, Boldbaatar Bazartseren (Institute of Veterinary Medicine Mongolian State University of Agriculture, Mongolia)、Roger Hewson (PHE, UK)

A. 研究目的

1 類感染症に指定されているウイルス性出血熱ウイルス（エボラ出血熱、マールブルグ出血熱、ラッサ熱、クリミア・コンゴ出血熱、南米出血熱）のうち、最も広範囲に分布するのはクリミア・コンゴ出血熱(CCHF)である。CCHFは、アフリカ、バルカン、中東、アジアで発生していて、特にトルコやインドで患者が増加している。また、ウイルスの存在は古くから知られていたギリシャでも近年 CCHF 患者が発生している。さらに、パキスタンなどアジア諸国でも CCHF の流行が相次いでいる。このため、海

外からの帰国者、海外からの渡航者が国内で CCHF を発症するリスクは高まっていると考えられる。2012 年には英国でアフガニスタンからの帰国者が発症し死亡している。

CCHF ウイルス (CCHFV) は主に *Hyalomma* 属のマダニにより媒介されるが、*Dermacentor* 属、*Rhipicephalus* 属、*Boophilus* 属のマダニによっても媒介される。CCHF はこれらのマダニが生息可能な北緯 50 度以南で発生する。中国の新疆ウイグルは、アジアの CCHF 発生地として最も東側で、新疆のタクラマカン砂漠辺縁を中心としてウイルス保

有マダニ *Hyalomma asiaticum* が広く分布する。モンゴルでは CCHF の報告はないが、国土の多くが北緯 50 度以南で中国北部に隣接し、新疆の東にはゴビ砂漠が展開する。ゴビ砂漠辺縁には CCHFV を媒介可能な *Hyalomma asiaticum*, *Demacentor nutalli*, *Demacentor daghestanicus* が生息している。本研究では、モンゴルに CCHFV が分布するかを明らかにし、CCHF 発生リスクを評価することを目的とする。

B. 研究方法

B-1. IgG-ELISA 用 CCHFV-NP 抗原

His-tagged CCHFV-NP 発現組換えバキュロウイルスを Tn5 昆虫細胞に感染させ、細胞ライセートから Ni⁺⁺カラムクロマトグラフィーにより His-tagged CCHFV-NP を精製した。対象抗原には polyhedrin KO バキュロウイルス感染細胞から同様に処理したものをを用いた。

B-2. 間接蛍光抗体法 (IF) 用抗原

HeLa 細胞に CCHFV-NP 哺乳類細胞発現プラスミド (pKS336-CCHFV-NP) を transfection し、blasticidin S hydrochloride で選択して作製した CCHFV-NP 発現細胞と HeLa 細胞を 1:3 で混合した塗抹標本を用いた。二次血清には抗ヒツジ IgG-FITC または抗ヒト IgG-FITC を用いた。

B-3. 検体

モンゴルの各地で 2013 年に採血されたヒツジ血清 (1716 頭)、ヒト血清を非働化した後試験に用いた。試験は全てモンゴルにおいて実施し、必要な抗原や試薬は日本から送付した。本研究におけるモンゴル側の共同研究機関である、モンゴル動物由来感染症研究所、モンゴル獣医学研究所等は世界銀行の支援を受けている。

B-4. 調査対象地域の選択

英国 Public Health England の Prof. Roger Hewson により、野生動物・家畜・マダニの分布のデータからリスクを評価した。CCHFV を

媒介するマダニが生息するか、CCHF 流行地の新疆に地理的に隣接あるいは近隣であるか、CCHFV を増幅するマダニの吸血対象となる動物相が十分かを総合的に解析して調査対象県を選定した。

(倫理面からの配慮について)

本調査は、モンゴルの動物由来感染症研究所、獣医学研究所等の研究所を主研究機関として行われたもので、モンゴルの当該研究所において倫理規定にそってインフォームドコンセントを取得して収集されたヒト血清を用い、当該研究所において承認された研究である。研究分担者は、モンゴルとの共同研究により血清診断キットの供与と技術移転を行い、モンゴルにおいて技術指導を行い、成績の提供を受けた。このため、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. モンゴルでの調査対象地域

英国 Public Health England の Prof. Roger Hewson により、CCHFV を媒介する *Hyalomma asiaticum asiaticum*, *Demacentor daghestanicus*, *D. nutalli* が生息し、新疆に地理的に隣接あるいは近隣であり、これらのマダニの吸血対象となる動物相が充分であることから、リスクがあると判断された以下の県 (Khovd, Gobi-Altai, Bayankhongor, Umnugobi, Dornogobi 県 (図 1)) を調査対象地域とした。マダニがほとんど生息せずリスクが低いと判断された Selenge 県を対象県とした。

C-2. CCHFV 抗体陽性ヒツジの分布

Selenge 県の 96 頭は全て ELISA 及び IF で抗体陰性であった。ROC などにより ELISA の cut off 値を設定して調査した結果、ヒツジの抗体陽性率は Khovd, Gobi-Altai 県で 27%、Bayankhongor 県で 13.8%、Umnugobi, Dornogobi 県ではそれぞれ 7.1%、8.6%と西域

ほど高かった (図 2)。

C-3. 健常人の CCHFV 抗体陽性率

モンゴルの 300 検体の健常人血清を ELISA、IF で CCHFV 抗体調査を行った結果、ELISA の cut off 値を 0.4 とした場合抗体陽性率 8.6%、IF では抗体陽性率 5.4%であった (表 1)。

D. 考察

CCHF は、アフリカ、バルカン、中東、アジアで流行している。近年トルコやインドでは患者が急増し、ギリシャでも近年 CCHF 患者が発生した。2012 年にはアフガニスタンから英国へ帰国した後、CCHF を発症し、死亡した輸入症例が出ている。このため、海外からの帰国者、海外からの渡航者が国内で CCHF を発症するリスクがある。モンゴルは近年経済成長が著しく、日本人の渡航も年々増加している。モンゴルは、炭疽、ブルセラ、狂犬病、ダニ媒介性脳炎等、多くの重篤な動物由来感染症の常在地であるが、CCHF に関しては不明である。モンゴルの南西部から南部にかけてのゴビ砂漠辺縁には CCHFV を媒介する *Hyalomma* 属等のマダニが分布し、CCHFV 常在地である中国新疆と隣接する。このため、CCHFV が存在する可能性は高い。本研究ではモンゴルに CCHV が分布するかを明らかにすることを目的とし、これまでにヒツジの CCHFV 抗体保有状況を調査した結果、南部のゴビ砂漠辺縁にはウイルス抗体陽性のヒツジが存在し、南西域の新疆隣接地域では抗体陽性率が高いことがわかった。新疆の CCHF 流行地のヒツジの抗体陽性率と比較すると陽性率は低いこと、これらの地域で CCHF 患者がこれまで報告されていないことから、ウイルス保有ダニの分布濃度は新疆の流行地と比較して低いと思われるが、これらの陽性地域では CCHF のリスクがあると考えられる。ヒトの血清疫学が行われた結果、これらの地域には陽性率は高くはないものの抗体陽性者がいることがわかった。

今年度は、モンゴルのこれらの地域のマダニの分子疫学及びウイルス分離を英国 PHE で実施する予定であったが、西アフリカのエボラ出血熱大流行対応で英国 PHE における共同研究が実施できなかった。来年度にマダニの調査を行い、モンゴルにおける CCHF のリスクを評価する予定である。

また、今年度はパキスタンからの血清診断系の供与を依頼されたため、ヒツジの血清疫学調査用の検査システムを提供した。

E. 結論

モンゴル南部の宿主ダニ生息地域では血清疫学的調査からは CCHFV が存在することが強く示唆された。ただし、現在まで CCHF 患者の報告はない。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

13. 論文発表

- 1) Paola Katrina G. Ching, Vikki Carr de los Reyes, Maria Nemia Sucaldito, 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) 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

3) 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.

4) 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.

14. 学会発表

1. 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

2. 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

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

8. Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushi, 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

9. Akihiko Uda, Hiroki Kawabata, Shuetsu Fukushi, 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.

10. Shigeru Morikawa, Akihiko Uda, Masanobu Kimura, Kawabata, Hiroki, Shuetsu Fukushi, 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

図1：モンゴルでの調査対象地域（楕円囲い部分及び Selenge 県）

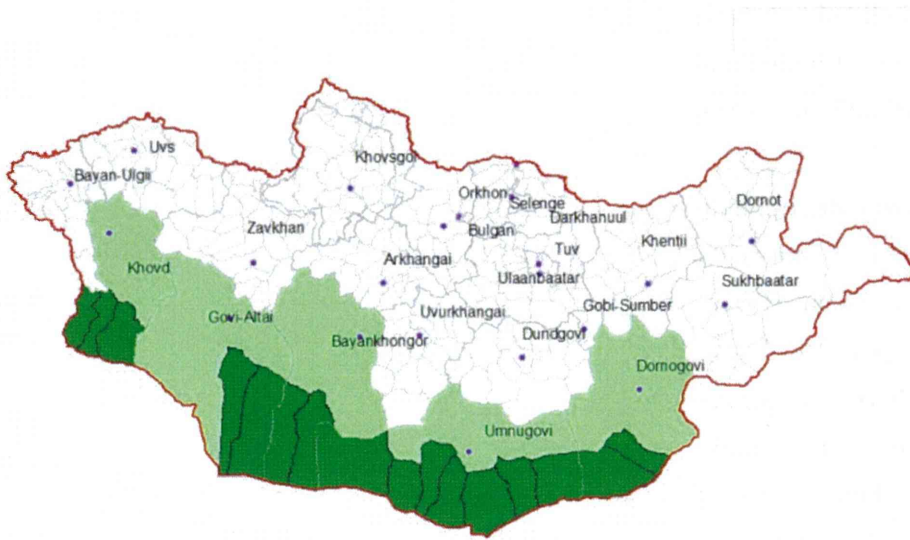


図2：モンゴルにおける CCHFV 抗体陽性ヒツジの分布

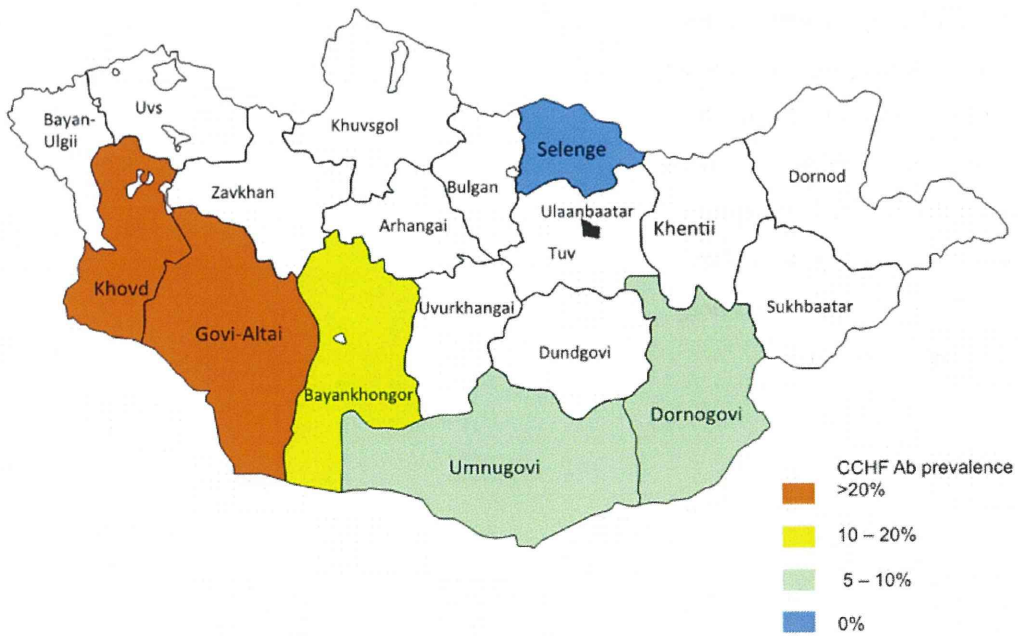


表 1 : ELISA 及び IF によるモンゴルの健常人における CCHFV 抗体陽性率

ELISAによるCCHFV抗体陽性率

県	陽性	検体数	陽性率
Bayankhongor	12	46	26.1%
Dornogobi	9	69	13.0%
GoviAltai	1	45	2.2%
Khovd	0	27	0.0%
Umnugobi	2	92	2.2%
総計	24	279	8.6%

IFによるCCHFV抗体陽性率

県	陽性	検体数	陽性率
Bayankhongor	5	46	10.9%
Dornogobi	4	69	5.8%
GoviAltai	1	45	2.2%
Khovd	3	27	11.1%
Umnugobi	2	92	2.2%
総計	15	279	5.4%

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：新規コロナウイルスの診断と感染機構に関する研究

分担研究者：松山 州徳（国立感染症研究所 ウイルス第三部四室）

研究要旨

サウジアラビアでは、中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）による肺炎患者の発生が続いている。2012年3月から現在（2015年2月16日）までに感染者1023人が見つかり、そのうち36%が重症の肺炎で死亡している。このウイルスは中東とアフリカのヒトコブラクダに鼻風邪として蔓延していることが明らかとなっているが、ほとんどの感染者はラクダ接触歴が無いことや、不顕性感染者が多く見つかることから、ヒトからヒトへウイルスが広がっている可能性が疑われている。このことから、MERS-CoVがいつ日本に侵入しても不思議ではない状況にあるといえる。我々は、このウイルスの変異がもたらすリスクを評価するために、ウイルスのスパイク（S）蛋白の変異と病原性の関係について研究している。本研究の結果は、MERS-CoVが2012年から2013年の間にS蛋白の1020番目のアミノ酸を変異させてエンドソームを介した細胞侵入経路を回避することにより、その後起こる自然免疫反応も回避するように進化したことを示唆している。本研究はコロナウイルスの遺伝子変異による病原性の変化を評価するための、基礎的研究である。

A. 研究目的

アラビア半島において中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）の感染者が見つかり続けている。このウイルスは中東とアフリカのヒトコブラクダに鼻風邪として蔓延しており、簡単に排除することができないことがわかってきた。今のところこのウイルスがアラビア半島を超えて世界中に広がる様子は見られないが、ウイルス遺伝子の変異によりヒトからヒトへの感染の頻度が上がる可能性は考慮しておく必要がある。本研究は、ウイルスの変異を監視し、伝播性や病原性と関連付け、本邦におけるウイルス侵入のリスクを評価するための基礎的知見を得るものである。

これまで検出された MERS-CoV の遺伝子には多数の変異が見つまっている。特に2013年のアウトブレイクで見つかった変異は、スパイク

(S)蛋白の1020番目のアミノ酸に変異があり、しかも地域別（Hafr-Al-Batin と Riyadh）にそれぞれ別の変異、Q1020H と Q1020R が見つまっている。これらの変異は、何らかの意味のある進化のポジティブセレクションと考えられているが、その意味は明らかでない。本研究では、ウイルスの変異と病原性の関係を、上記のS蛋白の変異を手がかりに解析する。

B. 研究方法

MERS-CoV とその変異株、及び VSV シュードタイプウイルスを用い、ウイルス遺伝子の変異と細胞侵入経路の関係を、①マクロファージ、肺胞上皮等を用いた細胞種による侵入経路の違い、②細胞表面とエンドソームからのそれぞれの侵入経路の違いによる自然免疫誘導の違い、の視点から解析をおこなった。

B-1. プロテアーゼ依存的細胞侵入の解析

プロテアーゼ（トリプシン、エラスターゼ）及び膜貫通型プロテアーゼ（TMPRSS2）存在および非存在下での、それぞれのシュードタイプウイルスの培養細胞への侵入を調べた。また MERS-CoV の「リアルタイム PCR を用いたウイルス細胞侵入の定量」もおこなった。この方法は、培養細胞表面に吸着させたウイルスをプロテアーゼ処理し、ウイルスと細胞膜を融合させ、細胞に侵入して複製を開始したウイルスの RNA を回収し、Real-Time PCR を行うことによりウイルスの細胞侵入を定量するものである。患者検体から分離された 2 種類のヒトのコロナウイルス（MERS と 229E）を用いて、細胞侵入効率を比較した。

B-2. 細胞侵入経路のコントロールと細胞の抗ウイルス応答

我々は既に、プロテアーゼとプロテアーゼ阻害剤を用いて、コロナウイルスの細胞侵入経路をコントロールする方法を、ヒト気道上皮由来細胞（Calu-3）を用いて報告しているが、より生体内に近い条件を設定するために、単球由来の U963 細胞との混合培養を行い、ウイルスの感染とそれに伴う抗ウイルス応答およびウイルス増殖を調べた。特に、細胞の抗ウイルス応答は、様々なサイトカインの発現量を調べ、さらに、前述のシュードタイプウイルスの S 蛋白にこれらの変異を導入して感染実験をおこない、上記のウイルス増殖と細胞応答を解析し、コロナウイルスの S 蛋白の変異と病原性の関係を調べた。

C. 研究結果

上記の MERS-CoV の S 蛋白中の変異（T1015N, Q1020R, Q1020H）および 2013 年の MERS-CoV に見られた変異（Q833R）をもつシュードタイプウイルスを VERO 細胞（VERO/+TMPRSS2）と TMPRSS2 発現 VERO

細胞（VERO/+TMPRSS2）に感染させ、感染価の変化を調べた。5 代継代 MERS-CoV に見られる 1015 の変異により、VERO への感染価は上がり、1020、833 の変異で下がる傾向が見られた。これらの変異は図 1 の S 蛋白の構造モデルに示した解列予想部位（オレンジ色部分）を取り巻くように位置していた。

5 代継代 MERS-CoV（T1015N）と継代 1 代の MERS-CoV（変異なし）の VERO 細胞への感染を比較したところ、5 継代株では VERO への感染価が 10 倍程度高くなっていた（図 2）。この結果は 5 代の継代で MERS-CoV はカテプシン感受性が 10 倍高くなったことを示しているのと同時に、生体内のウイルスはカテプシン感受性が低くなるように馴化していることを示唆している。

生体内ウイルスと培養細胞馴化ウイルスのカテプシン感受性の特徴と同様の結果が、鼻風邪コロナウイルス 229E の臨床分離株と 20 回継代株の間でも見られた（図 2）。カテプシン感受性に関わる変異の S 蛋白の立体構造内での位置を図 2 に示すが、MERS-CoV と同様にカテプシン解列予想部位（オレンジ色部位）を取り巻くように位置していた。

次に何故生体内から分離されるウイルスはカテプシン感受性の低いのかを明らかにする目的で、カテプシン感受性と抗ウイルス効果誘導の関係を調べた。U937 マクロファージ細胞に MERS-CoV はエンドソーム経路を通過して細胞侵入できるが、ウイルス RNA の複製は 2 倍程度の上昇が見られるのみで感染可能なウイルス複製は見られない（図 4）。一方、マクロファージでは MERS の感染により多種のサイトカインが誘導されることが報告されているため、感染にともなって抗ウイルス効果が発揮されると考えられる。そこで、MERS 感受性の高い Calu-3 細胞（ヒト上気道由来）と U937 マクロファージ細胞を混合培養し、マクロファージ存在下で

の Calu-3 におけるウイルス増殖を調べた。MERS-CoV は Calu-3 細胞ではよく増殖し、U937 細胞では全く増殖しなかったが、これら2種の細胞の混合培養では、ウイルス増殖は1万から10万分の一の低い感染価に抑えられた(図5)。この増殖が抑えられた混合培養に、カテプシン阻害剤、あるいはサイトカインの抗血清を加えることにより、ウイルス増殖を5倍から100倍程度回復させることができた(図5)。この結果はウイルスのカテプシン経路を介した細胞侵入がサイトカインを誘導し、抗ウイルス効果を発揮する可能性を示唆している。

D. 考察

MERS-CoV の宿主プロテアーゼを介した細胞侵入機構を解析し、エンドソームを介したウイルス細胞侵入経路が、後に起こる免疫反応を左右する可能性があることを見出した。生体内から分離されるコロナウイルスはエンドソーム経路を避ける傾向があり、2013年に見つかった MERS-CoV の変異は、エンドソーム親和性を更に下げる特徴をもっており、生体内で抗ウイルス効果を避けるように進化したことが伺える。

E. 結論

ヒトの集団に蔓延したり、重症を引き起こすように突然変異するウイルスを解析すること、あるいは前もってそれを予測するような研究は、特にインフルエンザウイルスを対象として研究されている。監視されている突然変異部位は、ウイルス糖蛋白のレセプター結合部位と薬剤耐性部位、解裂部位および中和エピトープである。本研究では、コロナウイルスの変異が宿主の抗ウイルス効果に及ぼす影響を、これまで検討されてこなかった「細胞侵入経路におけるカテプシン感受性決定部位」について検討し、日々変化するウイルスのリスクを理解するための手掛

かりとして提案したい。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

15. 論文発表

16. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

図1 : VSV シュードタイプウイルスを用いた MERS-CoV の S 蛋白のエンドソーム親和性アミノ酸変異の特定

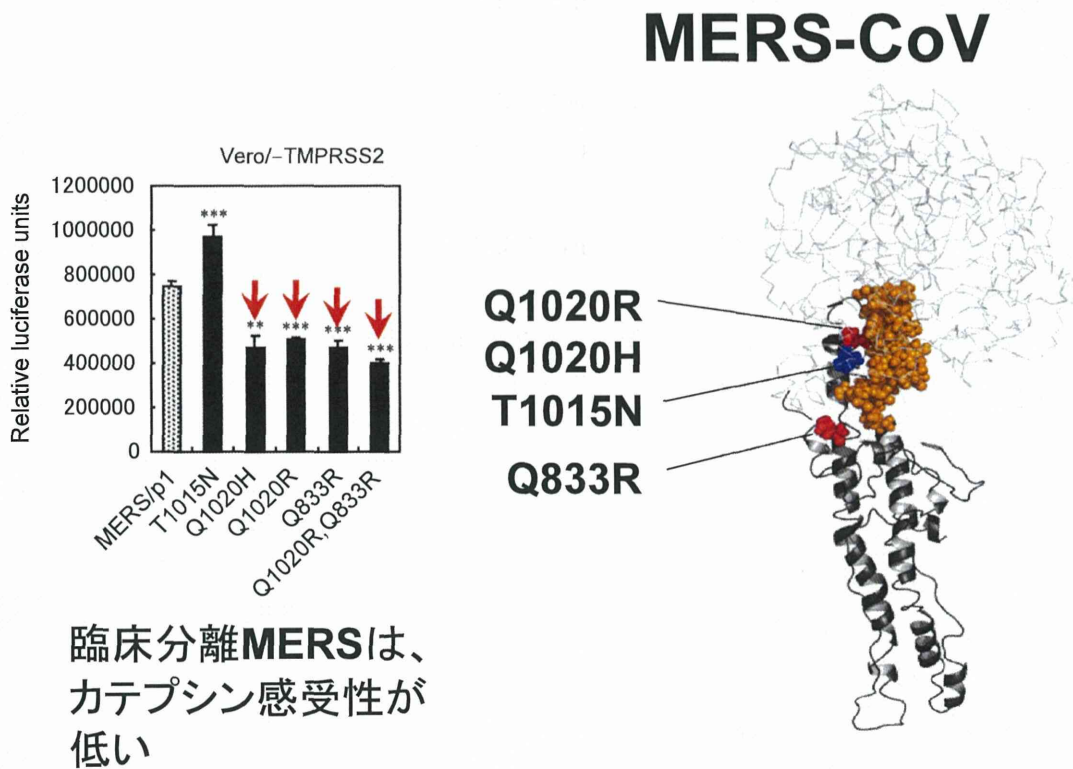


図2 : 5代継代 MERS-CoV 株のエンドソーム経路を介した Vero 細胞への細胞侵入

