

図3：20代継代 HCoV-229E 株のエンドソーム経路を介した HeLa 細胞への細胞侵入と、VSV シュードタイプウイルスを用いた HCoV-229E の S 蛋白のエンドソーム親和性アミノ酸変異の特定

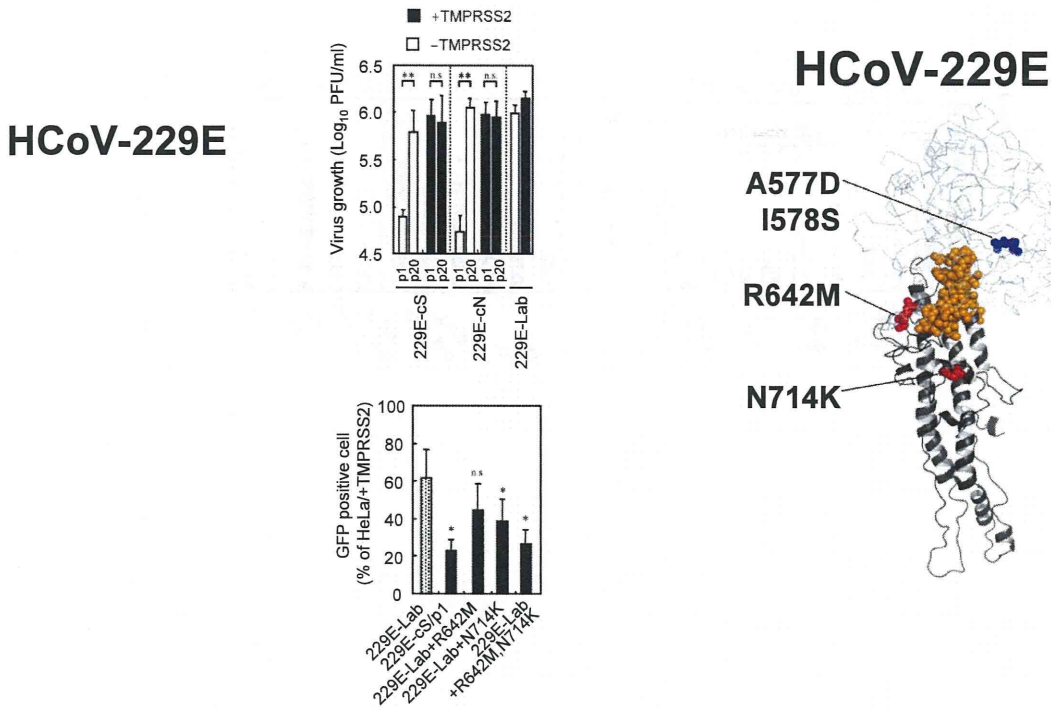


図4：マクロファージに分化した U937 細胞での MERS-CoV の増殖とウイルス mRNA の合成、およびエンドソーム経路を介したウイルスの細胞侵入

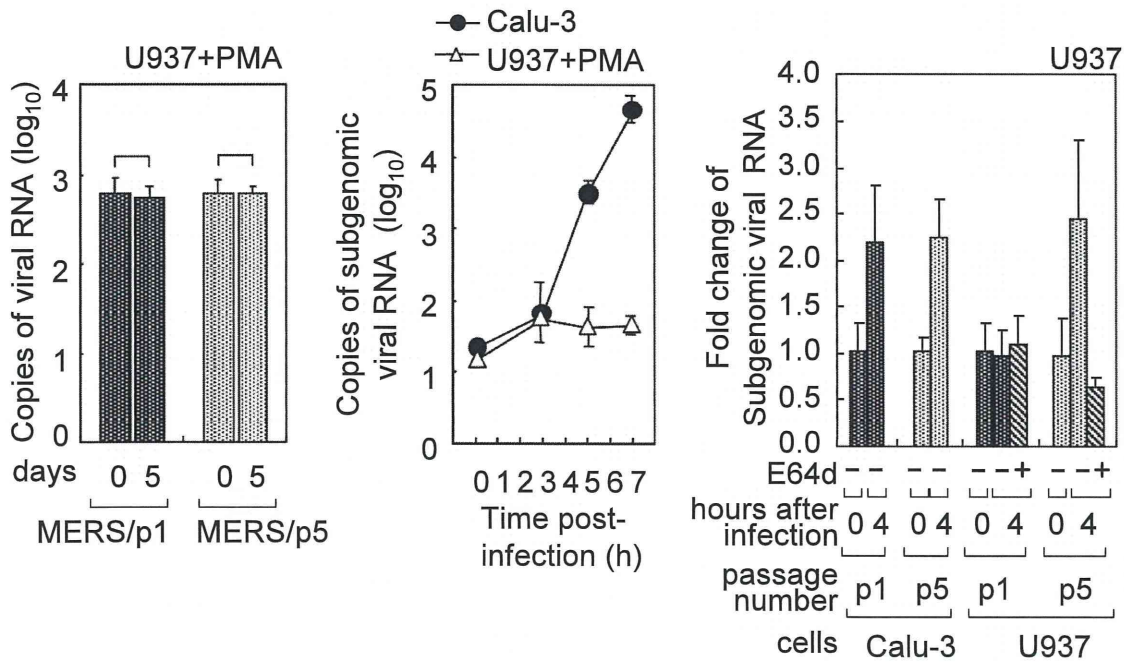
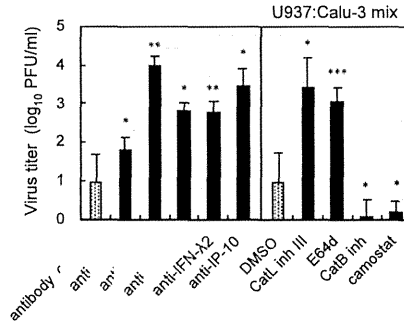
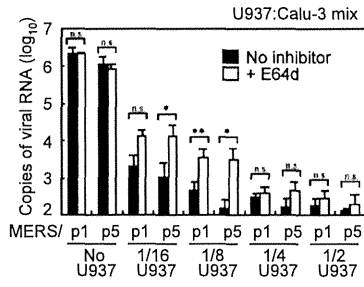
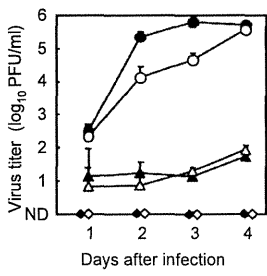


図 5 : U937 細胞と Calu-3 細胞の混合培養における MERS-CoV の増殖と、カテプシン阻害剤および抗サイトカイン抗体によるウイルス増殖の亢進

MERS/p1 ●, p5 ○ in Calu-3  
 MERS/p1 ▲, p5 △ in U937:Calu-3 mix  
 MERS/p1 ◆, p5 ◇ in U937



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：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

分担研究者：伊藤 睦代（国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官）

#### 研究要旨

致死的な出血熱であるラッサ熱にはいまだ有効なワクチンがない。そこで、本研究ではラッサウイルスの感染防御ワクチンとして、安全性が高く、且つ細胞性免疫を強く惹起することが知られている非増殖性ラブドウイルスベクターが有効な手段となりうるかについて、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）のモデル系を用いて個体レベルの解析を行うことを目的とする。昨年度はP遺伝子欠損非増殖型狂犬病ウイルスベクターの系を用いて、LCMVの主要抗原であるGPCを発現する非増殖性狂犬病ウイルスベクター△P-GPCの作出に成功し、これを用いて免疫したマウスにおいて防御効果があることを確認した。今年度は哺乳マウスを用いて△P-GPCの安全性を確認した。また、防御効果についてマウスの匹数を増やして検討を行い、60%の防御率が確認された。さらにこの時の中和抗体価を測定したところ、狂犬病ウイルスに対する中和抗体価は非常に高かったのに対しLCMVに対する中和抗体価の上昇は見られなかった。アレナウイルスに対する感染防御には細胞性免疫が重要であることから、来年度は細胞障害性T細胞の解析を行う予定である。

#### A. 研究目的

致死的な出血熱であるラッサ熱にはいまだ有効なワクチンがない。ラッサウイルスを含むアレナウイルスの感染防御には液性免疫ではなく、細胞性免疫が非常に重要であるといわれていることから、不活化ワクチンでは効果が乏しく、細胞性免疫を惹起するようなワクチンが望ましい。しかし、病原性復帰の問題から弱毒生ワクチンの適用は困難である。そこで、本研究ではラッサウイルスの感染防御ワクチンとして、安全性が高く、且つ細胞性免疫を強く惹起することが知られている非増殖性ラブドウイルスベクターが有効な手段となりうるかについて、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）のモデル系を用いて個体レベルの解析を行うことを目的とする。

本研究室では森本らにより非増殖型狂犬病ウ

イルスベクターの系が確立されている。本ベクターは増殖に必須であるP蛋白質を欠損しており、狂犬病ウイルスに対する感染防御ワクチンとしての安全性および有効性が確認されている。

そこで、昨年度はこの系を用いてLCMVの主要抗原であるGPCを組込んだ非増殖型狂犬病ウイルスベクター△P-GPC株を作出した。さらに、△P-GPC株感染P発現細胞においてGPCが発現していることを蛍光抗体法およびウェスタンブロッティング法により確認した。また、そのワクチン効果についてマウスを用いた攻撃試験を行い確認した。

本年度は哺乳マウスを使用してワクチンとしての安全性について確認を行った。また、感染防御試験についてマウスの匹数を増やして検討した。さらに、マウスの血清を用いて中和抗体価を測定した。

## B. 研究方法

1. 哺乳マウスを用いた安全性確認試験 (図 1) : 本研究で用いた非増殖性狂犬病ウイルスベクターは日本のワクチン株である HEP-Flury 株をベースとした P 遺伝子欠損ウイルスである。HEP-Flury 株は高度に弱毒化されており、成熟マウスに脳内接種しても病原性はみられない。一方、生後 4 日齢以内の哺乳マウスに脳内接種した場合、マウスは神経症状を示して死亡する。そこで、今回作出した  $\Delta$ P-GPC 株および陰性対照として既に安全性の確認されている  $\Delta$ P 株陽性対照として親株の HEP-Flury 株の感染性クローン(rHEP)を生後 4 日齢の哺乳マウス各 16 匹に  $2 \times 10^6$  ffu/mouse 脳内接種し、4 週間の経過観察を行った。経過観察中に瀕死となり哺乳困難となった個体には人道的エンドポイントを適用し、イソフルラン麻酔薬による安楽殺を行った。
2. マウスを用いた防御試験 (図 2) : 前年と同様に 5 週齢の C57BL/6j マウスを用いて感染防御試験を行った。1 群 5 匹のマウスに  $10^6$  ffu/匹の  $\Delta$ P-GPC 株を 1 週間間隔で 2 回腹腔内接種し、その 1 週間後に強毒の WE 株を 300 LD50 (10 pfu) 脳内接種した。陰性対照として  $\Delta$ P 株および希釈液を用いた。攻撃ウイルス接種後 2 週間の観察を行い、その防御効果を比較した。
3. 血清中和抗体価の測定 : 免疫前、第一回免疫 1 週間後、第二回免疫 1 週間後および生残マウスについては攻撃試験後に 100  $\mu$ l の血液を採血し、血清を分離回収した(図 2)。これを 56 °C で 30 分非働化して狂犬病ウイルスおよび LCMV に対する中和抗体価を測定した。狂犬病ウイルスの中和抗体価測定には Neuro-2a 細胞および HEP-Flury 株を使用した。LCMV の中和抗体価測定には Vero 細胞および WE 株を使用した。

## C. 研究結果

1. 哺乳マウスを用いた安全性確認試験 (図 3) : 親株の HEP-Flury 株の感染性クローン(rHEP)を接種した群では、全てのマウスが死亡もしくは瀕死のため安楽殺されたのに対し、 $\Delta$ P-GPC 株を接種したマウスでは 4 週間の観察期間中症状は全く見られなかった。また、empty の  $\Delta$ P においても同様に症状は見られなかった。
2. マウスを用いた防御試験 (図 4) : マウスを用いた防御試験において、偽接種群(Mock)では、5 匹全てが 9 日以内に死亡した。 $\Delta$ P 接種群では、8 匹中 1 匹のみが生残した。それに対し、 $\Delta$ P-GPC 接種群は 10 匹中 6 匹が生残した。感染防御効果は 60%となった。
3. 血清中和抗体価の測定 (図 5, 6) : 狂犬病ウイルスに対する中和抗体価は非常に高かった。また、2 回目免疫後の方が 1 回目免疫後に比べ抗体価が 5 倍程度上昇していた。一方、LCMV に対する抗体価は、生残マウスの攻撃後においても上昇がみられなかった。

## D. 考察

哺乳マウスを用いた安全試験の結果から欠損ウイルスの安全性は親株である HEP-Flury 株と比較して著しく低下していることが確認された。また、 $\Delta$ P-GPC 株と  $\Delta$ P 株はどちらも哺乳マウスへの脳内接種により、症状は観察されず、LCMV の GPC が挿入されたことによる影響はないことが確認された。

マウスを用いた防御試験においては、 $\Delta$ P-GPC による免疫により 60%のマウスが生残し、防御効果があることが確認された。これらマウスの血清を用いた中和抗体価の測定において、生残マウスを含め血清中の LCMV に対する中和抗体価の上昇は認められなかった。これまでもアレナウイルスに対する感染防御には中和

抗体の関与はないことが報告されており、過去の報告と相反しない結果であった。一方、狂犬病ウイルスに対する中和抗体価は強く誘導されており、非増殖性狂犬病ベクターの狂犬病ワクチンとしての効果が再確認された。△P 株と△P-GPC 株の免疫マウスにおいて、抗体価はほぼ同じであり、狂犬病ウイルスに対する防御効果には外来抗原を入れたことによる影響がないことが示唆された。ラッサウイルスの流行地である西アフリカでは狂犬病ウイルスも同時に流行していることから、△P-GPC 株は LCMV と狂犬病ウイルスに対する 2 価ワクチンとしても効果的であることが期待できる。

来年度は接種間隔や接種回数についてさらに検討をするとともに、FACS を用いて LCMV の感染防御に関与していると思われる細胞障害性 T 細胞を中心とした免疫反応についての解析を行う予定である。

#### E. 結論

LCMV の抗原遺伝子 GPC を発現する非増殖性狂犬病ウイルスベクターの作出に成功した。さらにマウスにおける防御効果を確認できた。今後マウスを用いた免疫反応の解析をさらに進めていきたい。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 17. 論文発表

1) 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. 学会発表

1) 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

2) 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

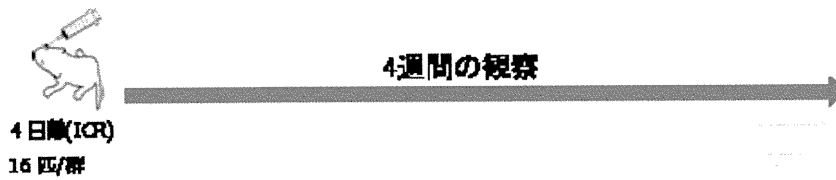
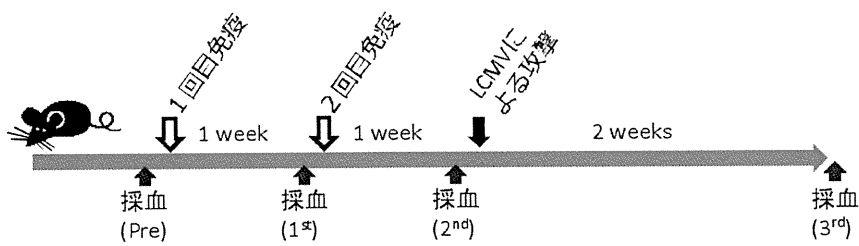


図1：哺乳マウスを用いた安全性確認試験



免疫原： $\Delta$  P-GPC,  $\Delta$ P(empty)  $10^6$  ffu/mouse

または PBS(-) 腹腔内接種, 100 $\mu$ l

攻撃：LCMV-WE株, 300 LD<sub>50</sub> (100 pfu), 脳内接種

mouse：C57BL6j, ♀, 5 週齢

図2：感染防御試験および血液採取のスケジュール

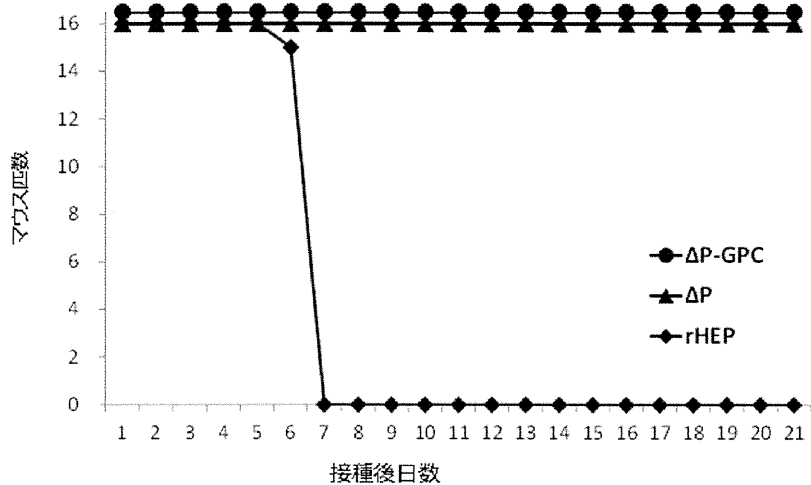


図 3 : 安全性確認試験の結果

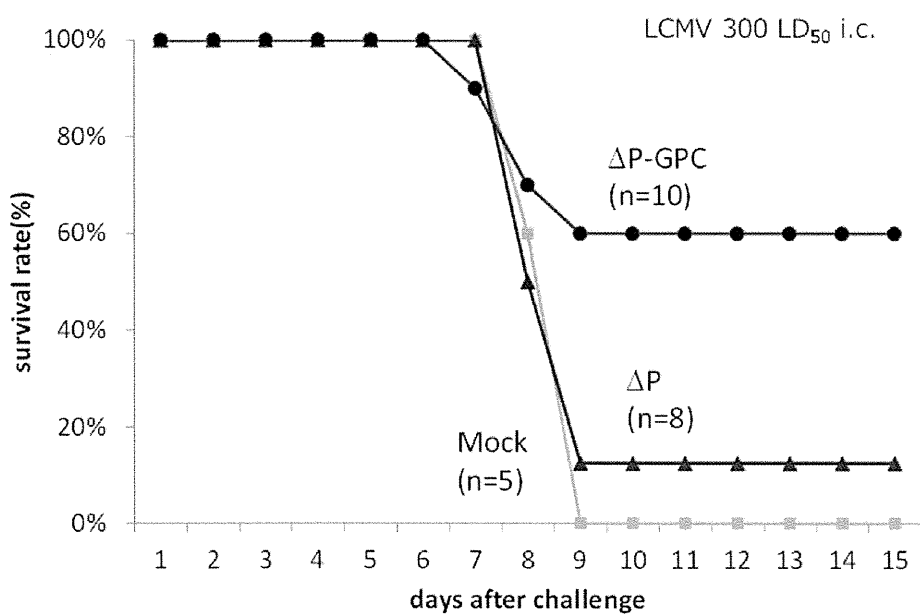


図 4 : 感染防御試験の結果

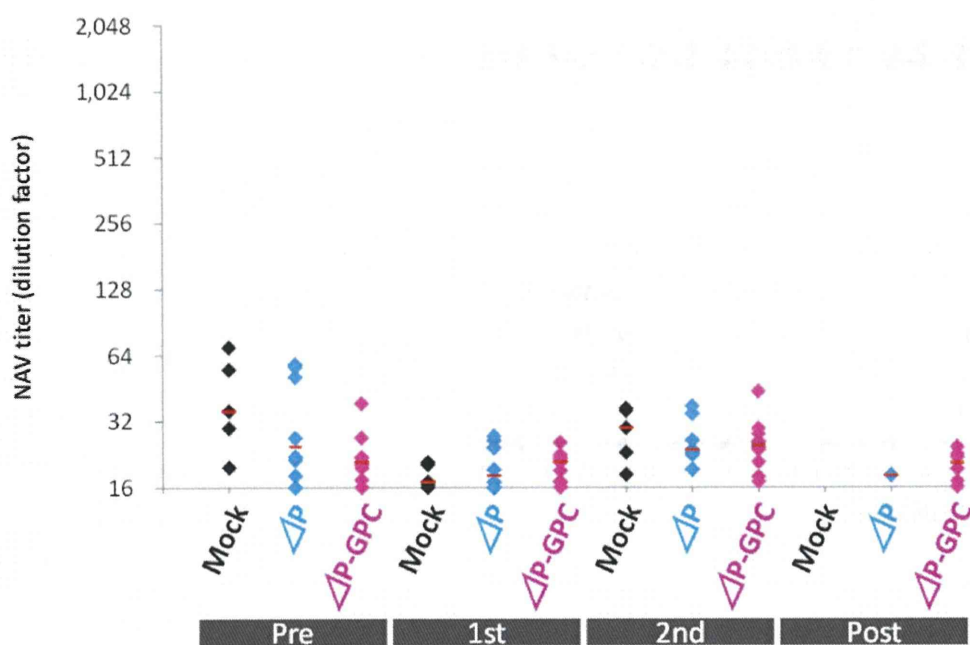


図 5 : LCMV に対する血清中和抗体価

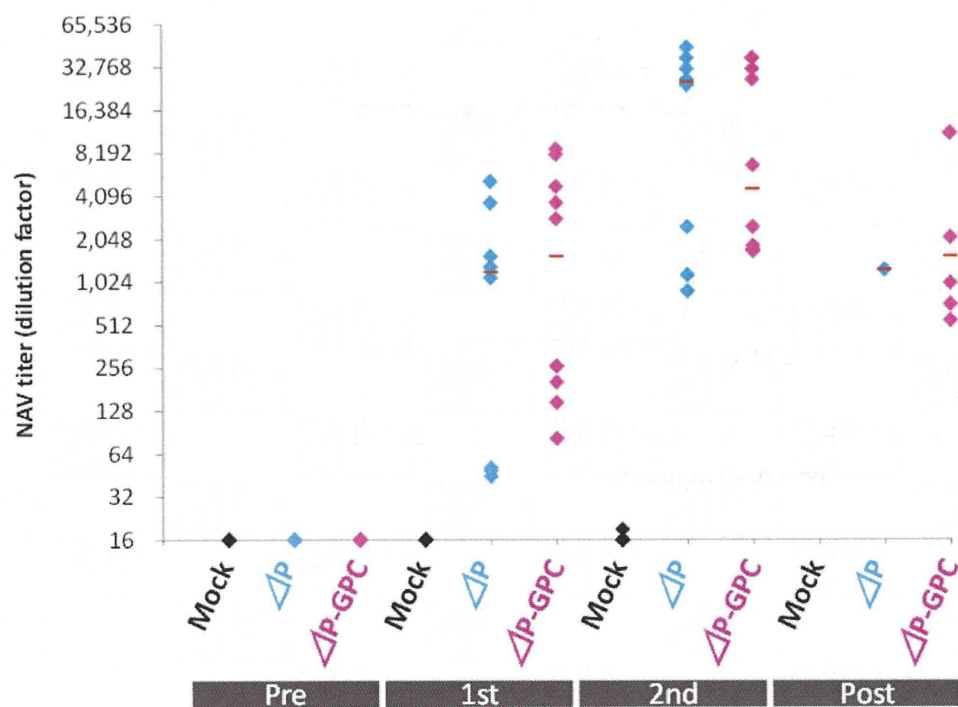


図 6 : 狂犬病ウイルスに対する血清中和抗体価



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：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

分担研究者 国立感染症研究所 獣医科学部 加来義浩

協力研究者 国立感染症研究所 獣医科学部 野口 章

協力研究者 国立感染症研究所 獣医科学部 井上 智

研究要旨

ニパウイルス（NiV）は致死率が高いうえ、治療法・ワクチンが開発されていないことから、近縁のヘンドラウイルス（HeV）とともに、国際的に Biosafetly level 4 (BSL4) 病原体に分類されている。これまでにシュードタイプ VSV を用いた中和試験が開発されたことにより、BSL2 における高感度・高特異性の血清診断が可能となっている。本課題では、

分泌型アルカリフォスファターゼ（SEAP）発現型シュードタイプを用いた中和試験法の迅速性・利便性をさらに高めるため、超遠心処理によりシュードタイプストック液から遊離の SEAP を除去することに成功した。これにより、中和反応液を細胞に接種後、遊離の SEAP を除去するための洗浄が不要となり、中和試験に伴う作業が大幅に簡便になった。また、精製シュードタイプを用いた中和試験を用いて、マレーシアの 98-99 年流行時の元患者および流行地域の住民に対する血清調査を行い、遅発／再発感染のモニタリングに血清検査が応用できるかを検討した。

A. 研究目的

ニパウイルス（NiV）感染症は 1998-99 年にマレーシアで初めて報告された人獣共通感染症で、脳炎による神経症状・呼吸器症状を主徴とする。致死率が高いうえ、治療法・ワクチンが開発されていないことから、近縁のヘンドラウイルス（HeV）とともに、国際的に Biosafetly level 4 (BSL4) 病原体に分類されている。これまでにマレー半島、南アジアで発生が確認されており、とくにバングラデシュでは、ほぼ毎年流行が報告されている。NiV の自然宿主はオオコウモリであり、これらの生息域である熱帯～亜熱帯の多くの地域で、NiV 抗体陽性のオオコウモリが確認されている。このことから、上記の

発生国以外にも潜在的に NiV の感染リスクがあると考えられてきた。

2014 年 4 月にフィリピン・ミンダナオ島で原因不明の脳炎の流行があり、これまでに 7 名の死亡が報告された。国立感染症研究所獣医科学部では、豪州家畜衛生研究所（AAHL）とともに、フィリピン熱帯医学研究所（RITM）の要請を受けて病原体の探索を行った結果、血清および遺伝子検査により、本流行の原因がニパウイルス（NiV）であることを明らかにした。本症例の血清診断には、AAHL の BSL4 施設で感染性 NiV を用いた中和試験が行われたほか、感染研で開発された分泌型アルカリフォスファターゼ（SEAP）発現型シュードタイプ VSV によ

る中和試験も用いられた。シュードタイプ法が実際の NiV 流行事例の診断に利用されたのは初めてであったが、感染性 NiV を用いた従来法と同等以上の感度、迅速性を示したことから、本法の有効性が確認された。本課題では、さらに迅速性・利便性を高めるため、精製シュードタイプを用いて、中和反応液を細胞に接種後、遊離の SEAP を除くための洗浄が不要となる新法の開発を試みた。

一方、NiV は患者体内で潜伏感染をすることが知られており、NiV 患者の 5% は初回感染から数カ月～数年後に脳炎を発症する「遅発性脳炎」を呈し、9% は脳炎が寛解した数カ月～数年後に「再発性脳炎」を発症するとの報告がある。しかし、これまで遅発／再発の機序については解明されておらず、これらの病態の予防・早期診断を目的とした過去患者のモニタリングも行われてこなかった。そこで、マレーシアの 98-99 年流行時の元患者および流行地域の住民に対して、上述のシュードタイプ法を用いて血清調査を行い、遅発／再発感染のモニタリングに血清検査が応用できるかを検討した。

なお、マレーシアにおける血清調査は、国際厚生事業団による「新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究推進事業 [外国への研究委託事業]」の支援を受けた、マラヤ大学医学部との共同研究で実施された。

## B. 研究方法

### B-1. NiV-F/G 蛋白質を外套した SEAP 発現型シュードタイプ VSV (VSV-NiV-SEAP) の精製

まず、以下の方法により VSV-NiV-SEAP を作製した。HEK293T 細胞に、Fugene HD (Promega) を用いて、発現プラスミド NiV-F/pCAGGS, NiV-G/pCAGGS を transfection した。48 時間後に、種ウイルスとなる「VSV (水疱性口炎ウイルス)・G 蛋白質を外套した SEAP 発現型シュードタイプ VSV

(VSV-dG-SEAP)」を接種した。1 時間後に細胞を E-MEM で 3 回洗浄したうえで培養を続け、24 時間後に上清を回収した。上清は 1,500g で 10 分間遠心し、debris を除いたうえで、さらに 10,000g で 10 分間遠心し、上清を回収した。

この上清から、以下の方法で VSV-NiV-SEAP を含む分画を簡易精製した。まず超遠心用の遠心管に 60% および 20% Sucrose 液 (1mM EDTA, 1% FBS を含む) を重層した。さらに、これらの上に、上記のシュードタイプ液を重層し、超遠心機により 24,000rpm で 2 時間遠心した。遠心後、遠心管の上部からパストールピペットを挿入し、60% sucrose 液と 20% sucrose 液の間に形成されたバンド (遠心管 1 本あたり約 2ml) を回収した。回収された分画を別のチューブに移す際、精製シュードタイプがチューブ壁に付着するのを防ぐため、液中の蛋白質濃度を高める目的で、チューブにはあらかじめ E-MEM (10% FBS) を入れておき、すばやく混和した。

得られた精製シュードタイプ液は、分注して -80°C 冷凍庫に保存した後、適宜溶解したうえで、タイトレーションや中和試験に用いた。

### B-2. VSV-NiV-SEAP のタイトレーションおよび中和試験

#### i) タイトレーション

精製 VSV-NiV-SEAP を E-MEM (2% FBS) で 2 倍階段希釈し、96 穴プレート上に confluent になった Vero-ATCC 細胞に接種した。24 時間後、ELISA 用 96 穴プレート Maxisorp (Nunc) に上清 40ul を移したうえで、基質液 (SigmaFast pNPP, SIGMA) 200ul を混和した。37°C で 2 時間反応させた後、発色の程度を ELISA plate reader で測定した (OD405nm)。Background control の OD 値をひいたうえで、OD405=1.0-2.0 の範囲に収まる希釈のシュードタイプを、中和試験に利用した。

#### ii) 中和試験 (血清抗体価のタイトレーショ

ン)

被検血清を 1:80 より 4 倍階段希釈し、上記の適正濃度に希釈したシュードタイプ液と等量混合した。37°C で 1 時間反応させた後、96 穴プレート上に confluent になった Vero-ATCC 細胞に接種した。24 時間後、上述の方法で基質液と反応させたうえで、OD 値を測定した。No-serum control の OD 値と比較し、75% 以上低下した検体を抗体陽性と判定した。

iii) 中和試験（血清抗体の簡易スクリーニング）

被検血清を 1:80 に希釈し、上記の適正濃度に希釈したシュードタイプ液と等量混合した。

以下は、上記の「血清抗体価のタイトレーション」と同様に行った。

B-3. 98-99 年流行における過去患者の診断・聞き取り調査・採血

マラヤ大学医学部／大学病院での受診履歴がある NiV 感染症の過去患者について、現時点で消息が判明する者を対象に、新たに採血を依頼し、NiV 中和抗体価の測定を行う。採血の際に、医師による健康診断ならびに聞き取り調査を実施した。聞き取り調査では、本人および家族について、流行当時の症状の有無、豚との接触歴、再発を疑う症状の有無について尋ねた（添付資料参照）。聞き取り調査票は、国立感染症研究所とマラヤ大学医学部が共同で作成した。調査は、98-99 年の流行の中心地のひとつとなった Negri Sembiran 州、Sungei-Nipah 村で実施された。当時無症状であった住民や、患者認定を受けていない住民を含め、調査への協力者は 24 名であった。

アンケートの結果は、過去の受診履歴と照合し、疫学的な解析に供した。採血した血液から血清を分離し、56°C 30 分の非働化処理を行ったうえで、マラヤ大学医学部において精製シュードタイプを用いた中和試験に供した。

（倫理面への配慮）

本調査は、マラヤ大学医学部のヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会からの承認を受けている。

## C. 研究結果

### C-1. VSV-NiV-SEAP の精製およびタイトレーション・中和試験への利用

精製シュードタイプ液中を 2 倍階段希釈したうえで、Vero-ATCC 細胞に接種し、24 時間後に上清中の SEAP 活性を測定したところ、希釈段階に応じた発色反応が確認された。同時に、精製シュードタイプ液中に遊離の SEAP が残留していないかを調べるため、ストック液を直接基質液と混和したが、background control との差は認められなかった。階段希釈したシュードタイプについては、1:640 希釈における OD405 値が 1.0-2.0 の範囲に収まった。実際の中和試験においては、シュードタイプ液と被検血清を等量混合したうえで反応させ、OD 値を測定することから、1:640 希釈よりも 1 段低い 1:320 希釈を用いることとした。

続いて、陽性対照血清（ウサギに NiV-G/pCAGGS を免疫して得られた、抗 NiV-G 高度免疫血清）を用いて、中和試験における反応性を検証した。上述の方法で中和試験を行い、SEAP 活性を測定したところ、血清希釈に応じた反応曲線が得られた。無血清対照の OD 値と比較したうえで、中和抗体価は 100,00 倍と判定された（図 1）。

### C-2. 過去患者の診断・聞き取り調査・採血

実施した聞き取り調査の結果は、マラヤ大学医学部において過去の受診履歴と照合のうえ、現在解析作業を進めている。全 24 名の協力者のうち、98-99 年流行時に自覚的な臨床症状のなかった住民は 5 名であった。また、近年遅発性脳炎を発症したあとで再発を繰り返し、現在も定期的にマラヤ大学病院に通院する患者も含まれていた。

### C-3. 過去患者血清を対象とした中和試験の実施

全 24 名の協力者の血清を対象に、精製シュードタイプを用いた簡易スクリーニングを行い、中和抗体の有無を調べた。血清を一律 1:80 に希釈し、先述の方法で中和試験を行ったところ、18 検体で中和抗体陽性、6 検体で中和抗体陰性と判定された。抗体陰性 6 名は、上記の聞き取り調査の結果、全員に 98-99 年の流行時に自覚的な臨床症状がなかったと回答していた（表 1）。そのうち 1 名には、遅発／再発脳炎を疑う診断履歴があった。

### D. 考察

2014 年に発生したフィリピンにおける NiV 流行では、シュードタイプ VSV を用いた中和試験が初めて実際の診断に応用された。同時に AAHL の BSL4 施設で行われた、感染性 NiV を用いた従来の中和試験法の結果と比較すると、シュードタイプ法のほうが感度が高く、従来法では検出できなかった発症初期の血清からも、中和抗体を検出することができた。本症の発生リスクのある地域は、BSL4 施設を持たない国々が中心であることから、BSL2 で実施できる本法は、きわめて実用的価値が高い。また本法は、少量の被検血清で実施が可能であり（簡易スクリーニングでは 2.25 $\mu$ l、タイトレーションでも 4.5 $\mu$ l）、希少な患者血清を有効に利用できる点でも大きなメリットがあることが確認された。その一方で、本法の迅速性・利便性をさらに高めるために、いくつかの課題があることが明らかになった。そのひとつが、シュードタイプストック液中に含まれる遊離の SEAP による影響であった。ストック液中には、シュードタイプ作成時に種ウイルスにより合成された SEAP が大量に含まれることから、そのまま使用すると中和試験の OD 測定時に影響を与えてしまう。そのため、中和反応液（シュードタイプと被検

血清の混合液）を Vero 細胞に接種し、1 時間吸着させたあと、シュードタイプストック液中の遊離の SEAP を除くために、96 穴プレート上の各ウェルを 3 回ずつ洗浄しなければならなかった。本課題において、超遠心処理によりシュードタイプを精製し、ストック液から遊離の SEAP を除くことができた。これにより、中和反応液を接種後の洗浄が一切不要になり、作業ははるかに簡便になった。本法の有効性は、マラヤ大学医学部との共同研究で実施された過去患者の血清調査においても確認された。簡易スクリーニングにより、中和反応の翌日には抗体の有無を確認することができた。抗体陰性と判定された 6 名のうち、5 名には流行時に自覚的な臨床症状はなかった。一方、抗体陽性と判定された 18 名は、流行時に何らかの臨床症状を呈していた。上述のとおり、本調査には「正式な患者認定を受けた者」のほかに、「当時症状を呈しながらも、受診せずに患者認定を受けなかった者」、「患者と疫学的なつながりがあり、遅発／再発性脳炎を発症した疑いがある者」などが含まれている。そのため、無症状感染や、遅発／再発性脳炎の発生頻度をあらためて検証することも、本調査の目的のひとつであった。

聞き取り調査の結果については現在も解析が進められていることから、慎重に考察する必要があるが、当時自覚的な臨床症状がなかった協力者 5 名で、抗体の陰性が確認されたことは、本法の有効性を示すひとつのエビデンスと考えられる。一方、陰性者 6 名のうち 1 名には、遅発／再発脳炎を疑う診断履歴があったことから、過去に採血した血清を含めて、抗体価の推移について詳細な確認を進めている。NiV と同様、パラミクソウイルス属に分類される麻疹ウイルスでは、感染後数年の無症状期間を経て、神経症状が現れる亜急性硬化性全脳炎（SSPE）が知られており、血清および髄液中麻疹抗体価の上昇が確定診断となる。本症においても、血清あ

るいは髄液中 NiV 抗体価の測定が、遅発／再発  
脳炎のモニタリングに有効であるか検証する予  
定である。

学会発表  
なし

フィリピン症例に対する応用、マレーシア  
における過去患者の調査を通じて、シュードタ  
イプ VSV を用いた中和試験の利点 (①BSL2 で  
実施可能、②少量の被検血清で検出可能、③一  
般的な ELISA プレートリーダーで測定可能) が  
あらためて確認された。今後、本症の発生リス  
クがある国に、本法の技術移転を行う機会が増  
えることが予想されており、作業の迅速性・利  
便性を高めることはさらに重要になると考えら  
れる。

H. 知的財産権の出願・登録状況

#### E. 結論

超遠心処理により VSV-NiV-SEAP を精製し、  
シュードタイプストック液中から遊離の SEAP  
を除去した。これにより、実際の中和反応にお  
いて、中和反応液を接種後の洗浄が一切不要に  
なり、作業ははるかに簡便になった。本法を  
98-99 年のマレーシア流行における過去患者(お  
よび流行地域の住民) の血清に応用したところ、  
過去の疫学的な背景と整合性のある結果が得ら  
れたことから、本法の有効性が確認された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 19. 論文発表

Outbreak of henipavirus infection,  
Philippines, 2014. 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. Emerg Infect Dis.  
21:328-31 (2015)

図1：精製シュードタイプ (VSV-NiV-SEAP) を用いたウサギ高度免疫血清に対する中和試験 (反応曲線)

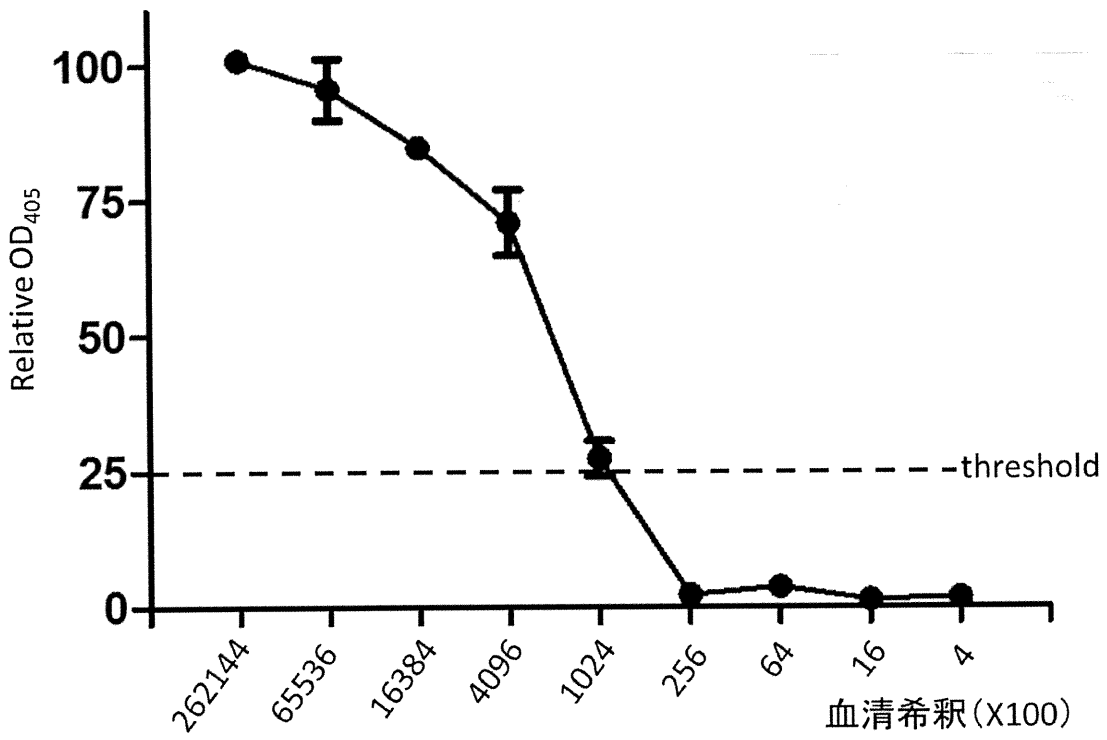


表 1 : NiV 感染症の過去患者を含む Sungei-Nipah 村民の NiV 中和抗体検査の結果

患者番号	中和試験結果		流行時の自覚的 症状
	Relative OD <sub>405</sub>	判定	
1	14.77	+	+
2	16.32	+	+
3	15.23	+	+
4	15.56	+	+
5	15.09	+	+
6	17.17	+	+
7	17.66	+	+
8	170.60	-	-
9	8.94	+	+
10	11.05	+	+
11	154.74	-	-
12	13.86	+	+
13	11.62	+	+
14	12.80	+	+
15	21.60	+	+
16	14.41	+	+
17	10.47	+	+
18	108.48	-	-
19	114.78	-	-
20	21.70	+	+
21	164.95	-	-
22	19.13	+	+
23	18.43	+	+
24	139.34	-	-

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:痘そうワクチン LC16m8 をベースに用いた一類感染症、新興・再興感染症に対する組換えワクチンの開発

分担研究者:吉河 智城(国立感染症研究所ウイルス第一部)

#### 研究要旨

一類感染症や新興ウイルス感染症は、いつ国内で発生するかもしれない。よってワクチン開発は有効な対策の一つになり得る。細胞培養痘そうワクチンの製造承認株であるワクチニアウイルス LC16m8 株は、ワクチンとしての免疫原性を維持しつつ安全性の非常に高いワクチン株である。本研究ではこの株の長所を生かして、一類感染症の一つであるラッサ熱を起こすラッサウイルスを含むアレナウイルスのプロトタイプであるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、そして 2013 年に初めて国内での発生が確認された重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)感染症への効果的なワクチン開発を行う。本年度は前年度に引き続いて LCMV、そして SFTSV の膜表面抗原である GPC、核抗原である NP、N、そして膜裏打ち抗原である Z といった抗原を単価または複数価発現する組換えワクチニアウイルス(recVac)の作製を行い、これに成功した。また LCMV に対するワクチンを評価するために必要な、LCMV を末梢から接種した際に致死感染となるマウスモデルを確立した。今後はこれらの recVac を確立したマウスモデルを用いて評価する予定である。

#### A. 研究目的

一類感染症が日本国内で最後に発生して既に 20 年以上経つ。だが世界規模に視点を変えれば、その発生は起き続けておりいつ再び国内で発生しても不思議ではない。そこで防疫上の観点からワクチンの必要性がある。本研究では一類感染症の一つであるラッサ熱を起こすラッサウイルスを含む、アレナウイルスのプロトタイプであるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、そして 2013 年に初めて国内での発生が確認された重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)感染症への効果的なワクチン開発を行う。

#### B. 研究方法

B-1. ワクチニアウイルス LC16m8 または mO 株を使用したウイルスベクターワクチンを開発

する。これら LC16 系統の株は副反応が他のワクチニアウイルスと比べて大きく低減されている一方で、ワクチンとしての免疫原性は維持されている。各ウイルスへのワクチンとして効果的なウイルス抗原は現時点で不明のため、膜表面抗原である GPC、核抗原である NP、N、そして膜裏打ち抗原である Z といった抗原を単価または複数価発現するウイルスを作製して評価を行う。今年度は前年度に引き続いて LC16mO をベースとして、これらの組換えワクチニアウイルス(recVac)の作製を行った

B-2. LCMV を末梢から接種して致死感染を起こすマウスモデルを確立する。LCMV のタンパク質を発現する組換えワクチニアウイルスのワクチンとしての効果を評価するためには、末梢からの LCMV(WE 株)接種によって致死感染を起こす



マウスモデルを用いるのが理想的である。そこで 1 系統 5 匹ずつ、合計 10 系統のマウス(ICR, A/J、BALB/c、C3H、C57BL/6、C57BL/10、DBA/2、NZW、CBA、FVB)に、 $10^6$  focus forming unit (ffu)/100 $\mu$ l のウイルスを腹腔接種した際の生存率を観察した。

## C. 研究結果

C-1. 作製を行った recVac の概略を図 1 及び図 2 に示す。LC16m8 株では不活性であることが知られている B5R 遺伝子領域を置換する形で LCMV の NP、GPC、Z、また SFTSV の N、または GPC を単価、または複数価発現するウイルスの作製を行った。特に LCMV の NP、GPC、Z タンパク質をすべて発現するウイルスについては、感染細胞から LCMV の VLP が出芽しワクチン効果が更に向上することを期待している。このウイルスの対照として Z タンパク質のアミノ酸に変異を導入して正常な出芽がされないウイルスを作製している。また、陰性対照に使用するウイルスとして該当する B5R 遺伝子領域を除いた  $\Delta$ B5R を作製した。これらの recVac をウサギ RK13 細胞に感染させた後、抗 LCMV GP、NP、Z または SFTSV NP に対する抗体を用いた蛍光抗体法 (IFA) を用いて目的とする抗原の発現を確認した結果を図 3、図 4 そして図 5 に示す。結果として目的とする全ての種類の recVac の作製に成功していることが確認できた。

C-2. 系統毎のマウスの生存率を図 6 に示す。LCMV の腹腔接種によって少なくとも 1 匹以上死亡したマウスの系統は、C57BL/10、CBA、FVB、ICR であった。特に CBA は全頭死亡した。

### 【倫理面への配慮】

ヒト検体、動物は使用していないため該当しない。遺伝子組換えに当っては、文部科学省の承認を得た上で行った。

## D. 考察

本年度は前年度に引き続いて recVac の作製を行い、目的とする全ての種類の recVac の作製に成功した。現在はこれらの recVac についてプラーク精製を行っており、近く完了する予定である。次年度はウェスタンブロッティングを用いてタンパク質の発現を確認する必要があると考えている。また、感染細胞で VLP が発現することが期待される recVac については、今後は電子顕微鏡などを用いて実際に VLP の発現を確認することとしている。

LCMV は、特に脳内接種を用いればマウスに致死感染を容易に起こすことは知られていた。しかしワクチンの評価に理想的な、末梢からの LCMV 接種による致死感染マウスモデルの報告は数少なく、また LCMV の株や用いたマウスの週齢なども報告毎に様々であり検討の必要があった。今回の結果により、CBA マウスは LCMV WE 株の腹腔接種により致死感染を起こすことが初めて明らかとなった。次年度は LD<sub>50</sub> を決定し、作製に成功した recVac のワクチン効果を検討する予定である。

## E. 結論

今年度は recVac 作製を行い、IFA によって目的とする recVac を全種類作製することが出来た。また、LCMV のワクチン評価に必要な末梢からの致死感染マウスモデルを確立できた。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 20. 論文発表

1) 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. 2014. Sensitive and specific PCR systems for detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains and prediction of patient survival based on viral load. *Journal of clinical microbiology* 52:3325-3333.
- 2) 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. 2014. Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. *PLoS One* 9:e92777.
- 3) Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. 2014. Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular stomatitis virus. *J Virol* 88:7317-7330.
- 4) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. 2014. The first identification and retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis* 209:816-827.
- 5) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. 2014. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Japanese journal of infectious diseases* 67:423-427.
- 6) Bukbuk DN, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Iha K, Fukuma A, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M, Kasolo F, Baba SS. 2014. 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* 108:768-773.
21. 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、福岡藍子、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) 福岡藍子、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、福岡藍子、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) 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).

5) 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).

6) 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).

7) 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. SFTSV抗原を発現する組換えワクチニアウイルスの概略

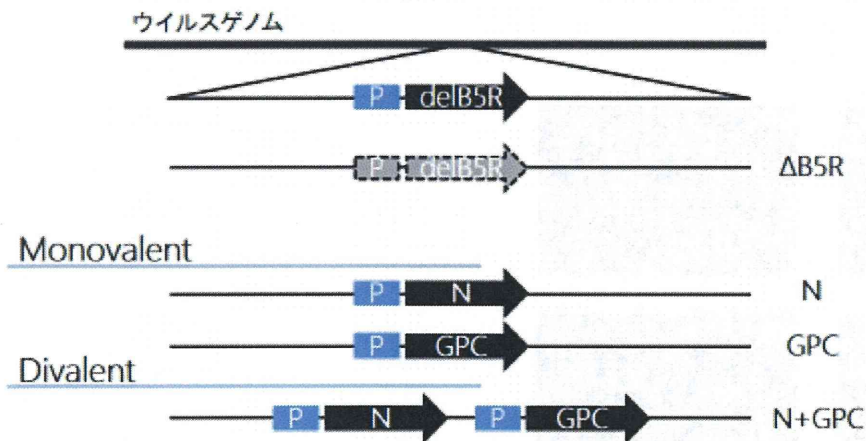


図2. LCMV抗原を発現する組換えワクチニアウイルスの概略

