

. 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殻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殻させた 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 研究者とともに行った。

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。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, >1:1280, 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、健常人由来の 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).

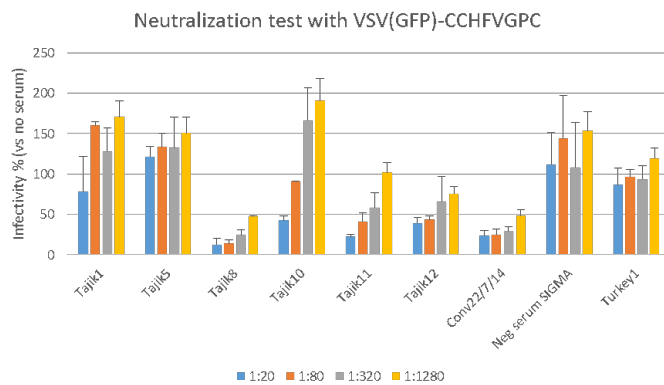
8) Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Masayuki Saijo, Masayuki Shimojima. Development of antigen-capture ELISA for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein. The 10th China-Japan International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

9) Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Joseph S Masangkay, Roberto P Puentes-pina, 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



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用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 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, 511, 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ルー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ている。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, Bao 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

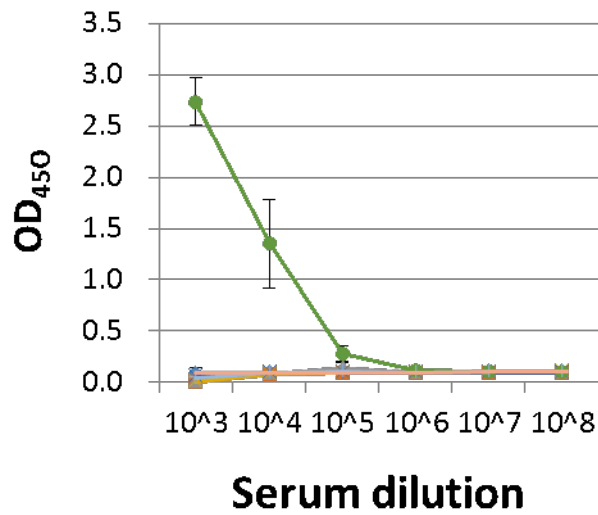


図2：LLOV GP 抗原に結合するブタ血清中の IgG 抗体

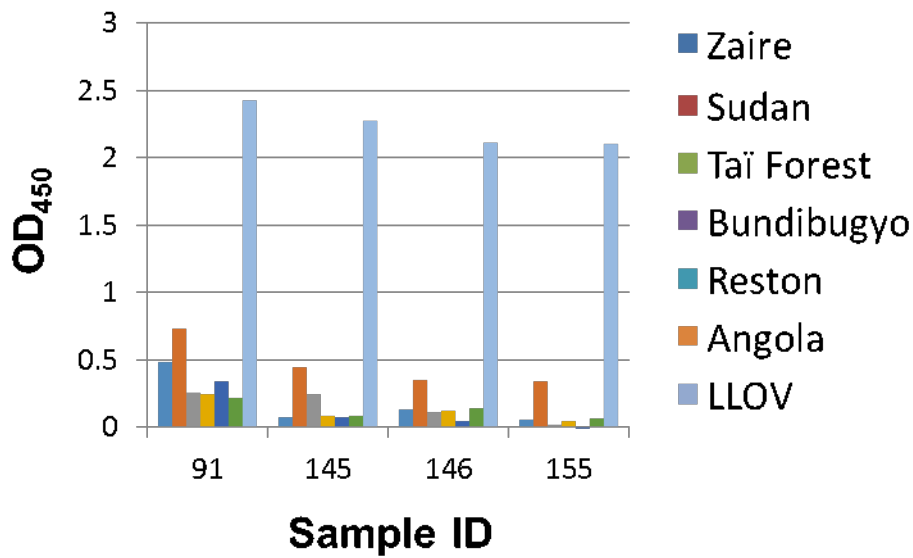
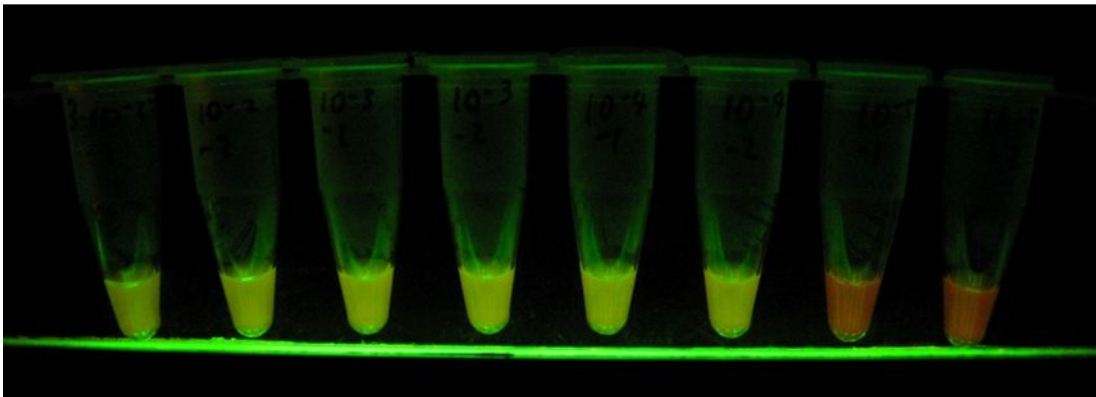


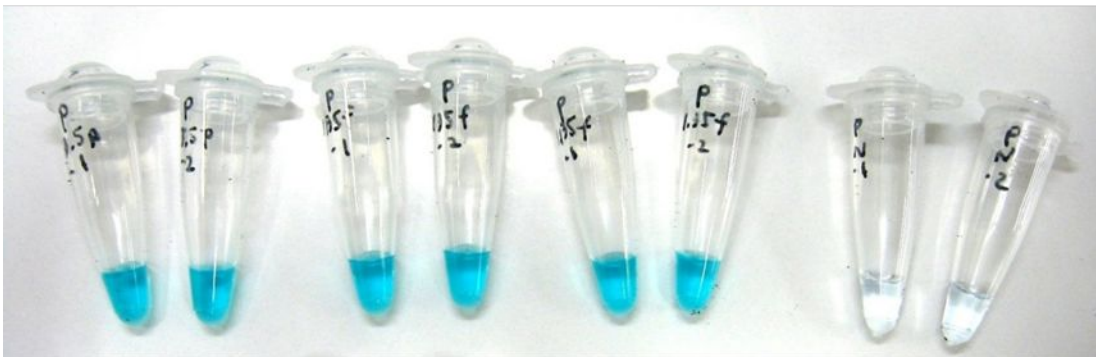
図3 : Zaire ebolavirus 検出用 LAMP 法

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 産生に必要である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 Z Δ 1 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

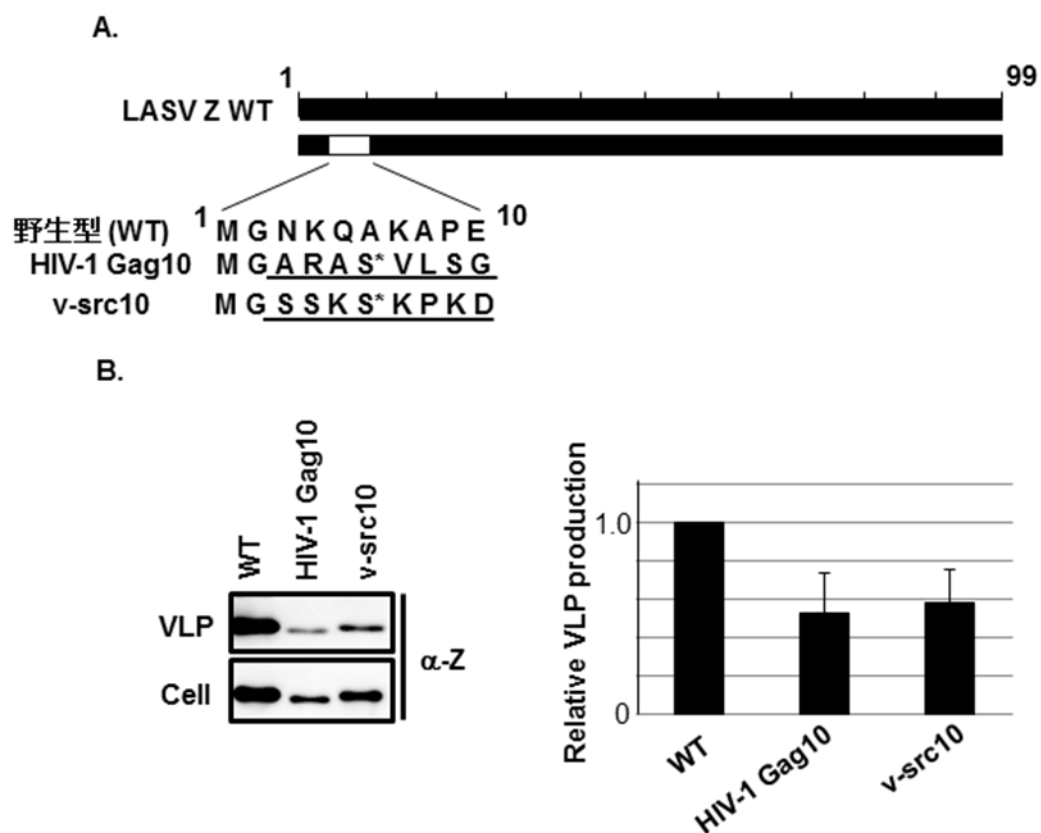


図1 ラッサウイルスZ 3-10番アミノ酸はタンパク質の安定性及び粒子産生において重要である

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））

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挿入した 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ブラン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

前年度に前倒して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).

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）

図1. p10欠損ウイルスの性状解析

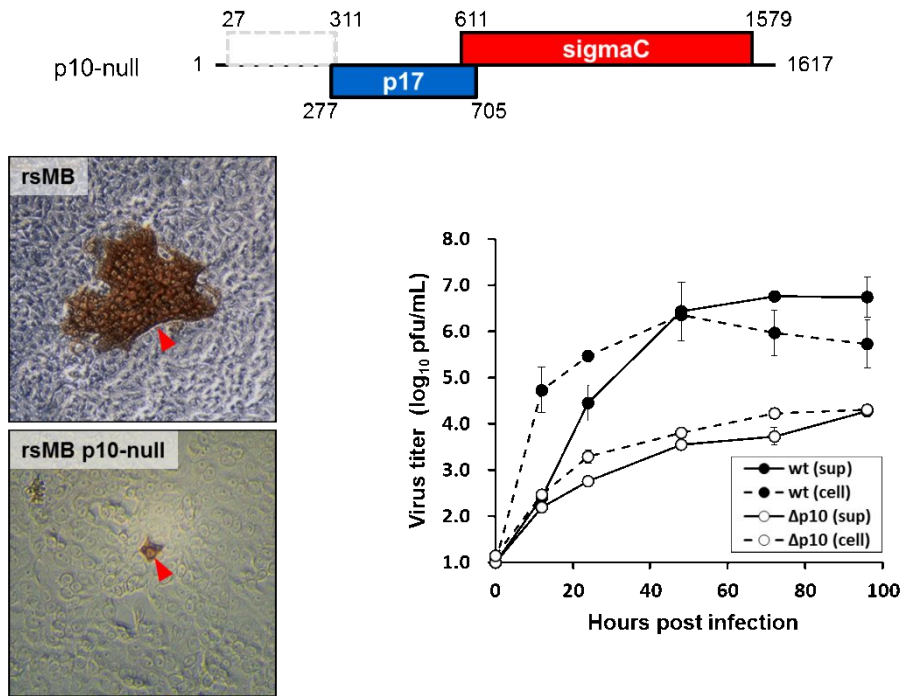


図2. p10アミノ酸変異ウイルスの性状解析

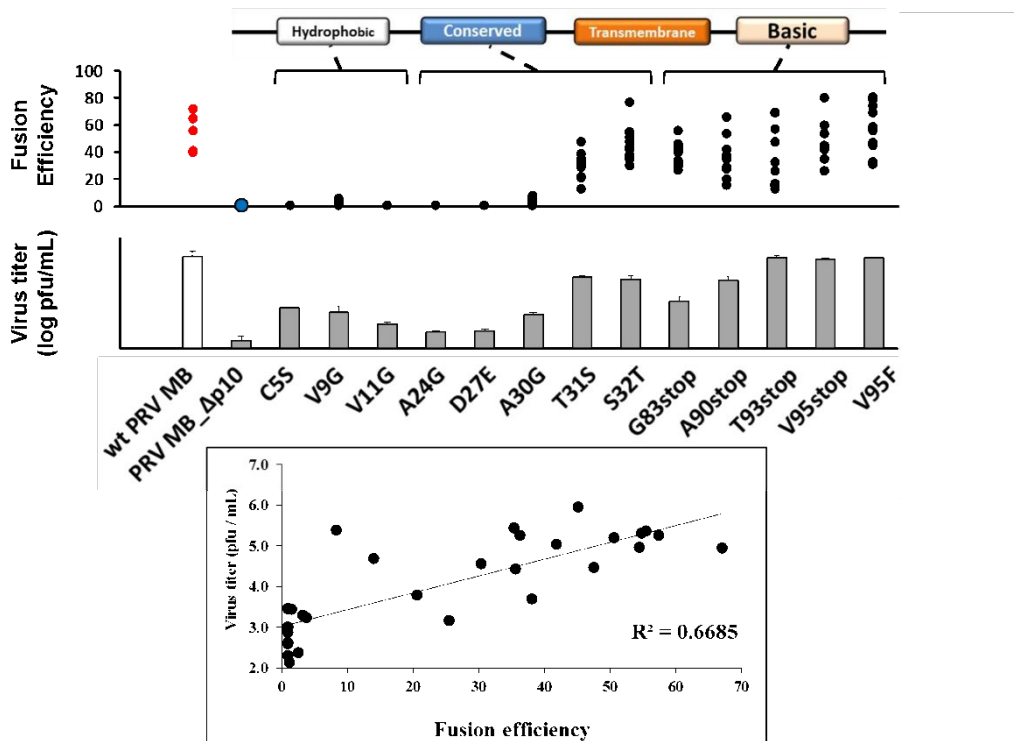


図3. p17欠損ウイルスの性状解析

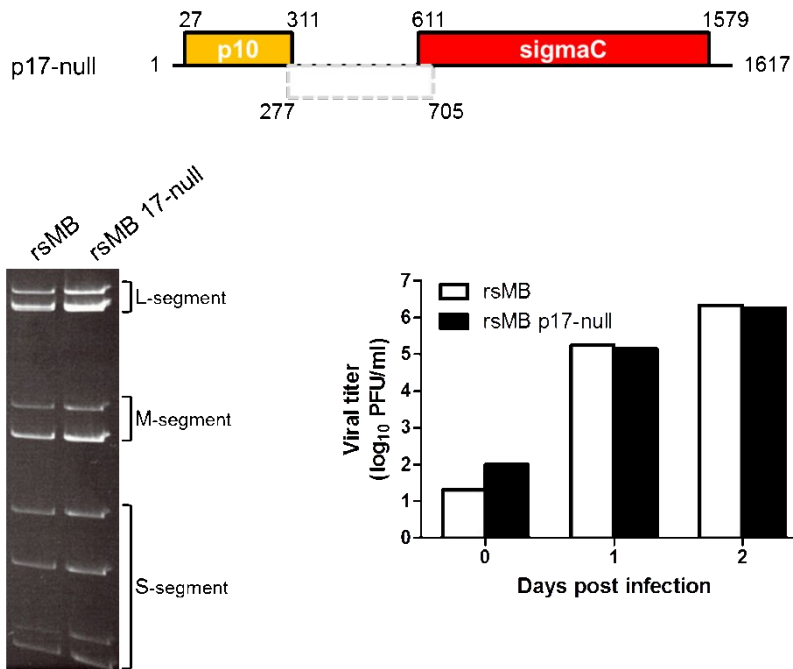


図4. sigmaC欠損ウイルスの性状解析1

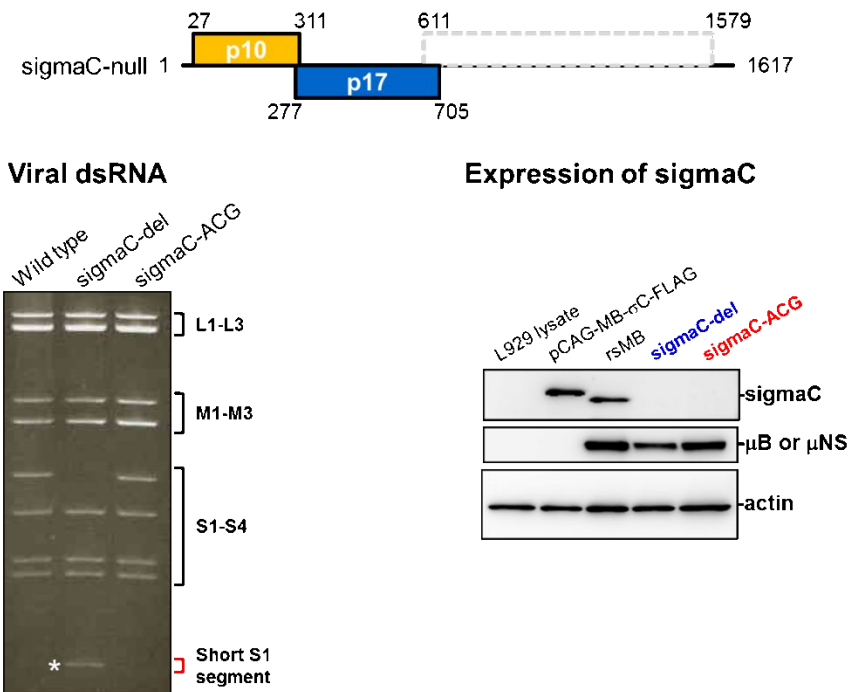
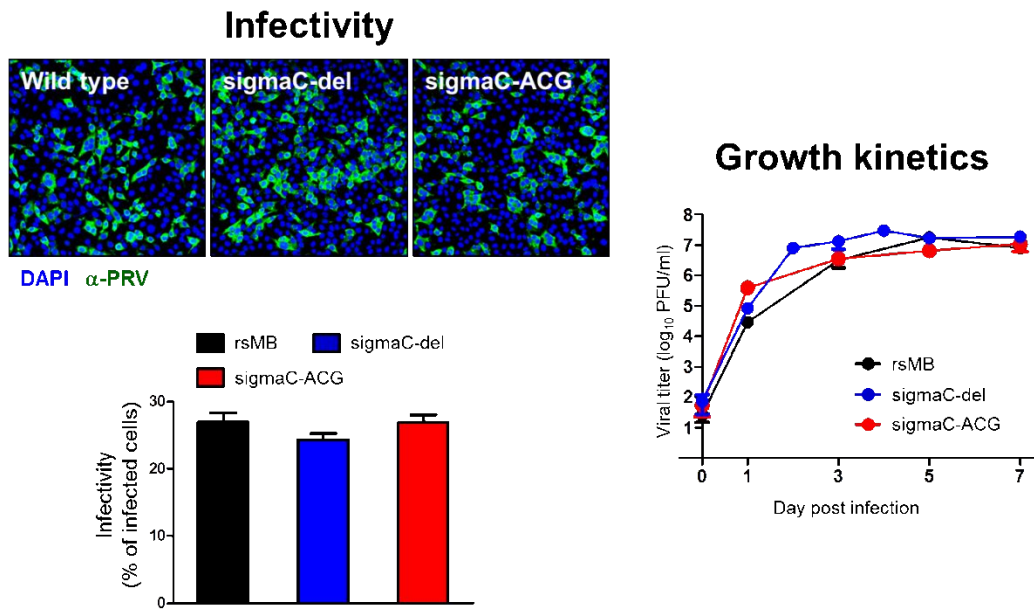


図5. sigmaC欠損ウイルスの性状解析2



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 sp. laea* (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

- VSVG キメラタンパク質を用いた場合でもシール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 シール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 のシール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

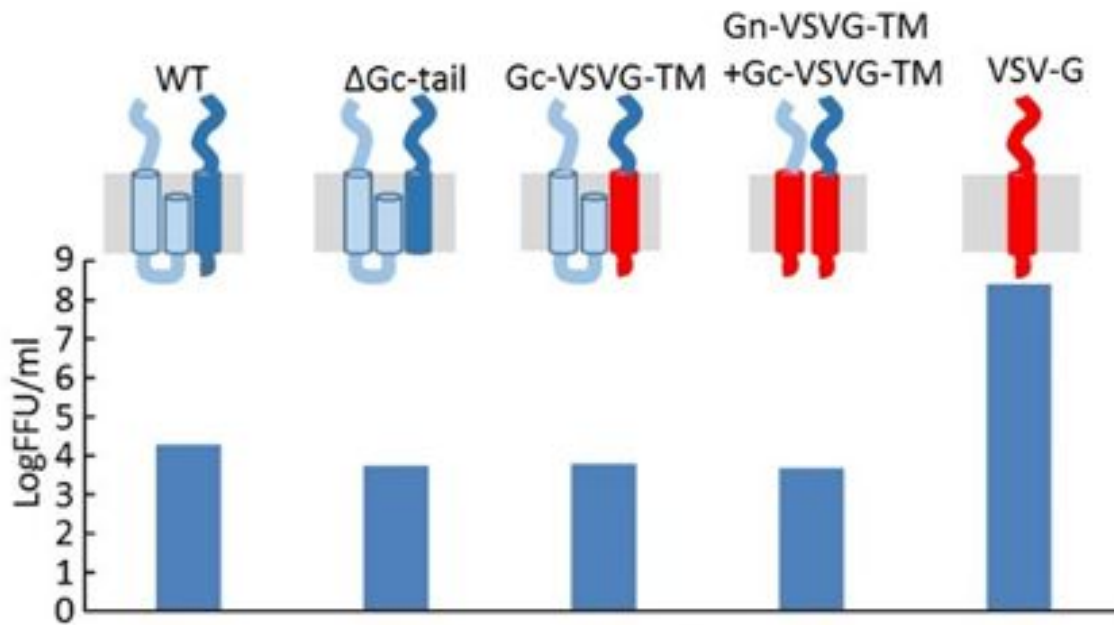


図1. RRVVのVSVシュードタイプウイルス

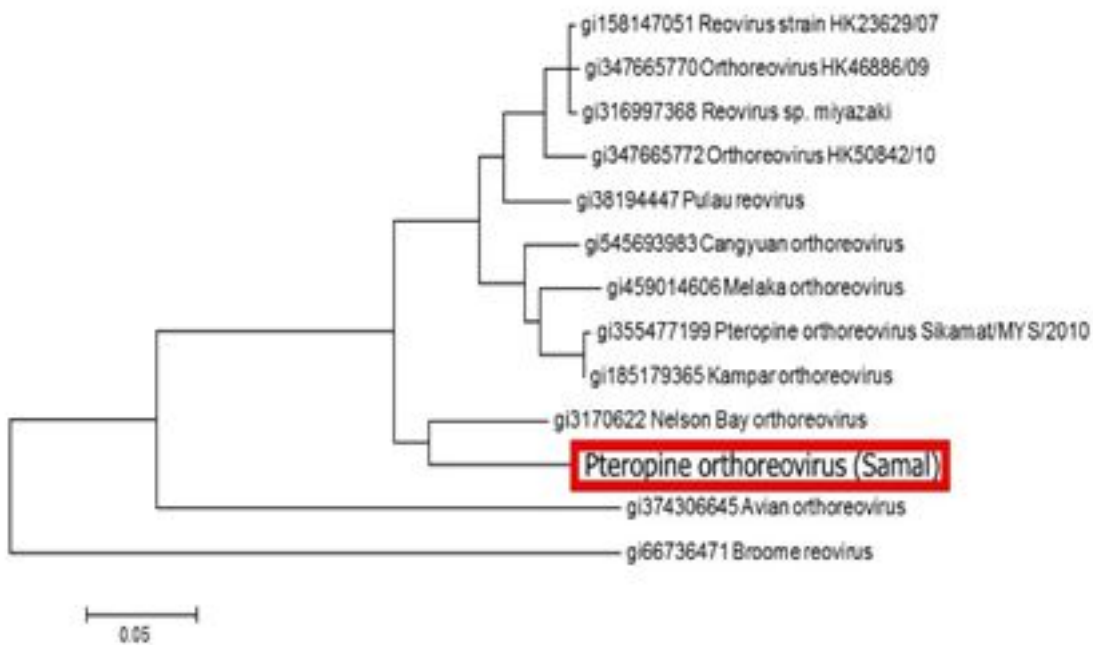


図2. PRV(Samal)株の系統樹解析

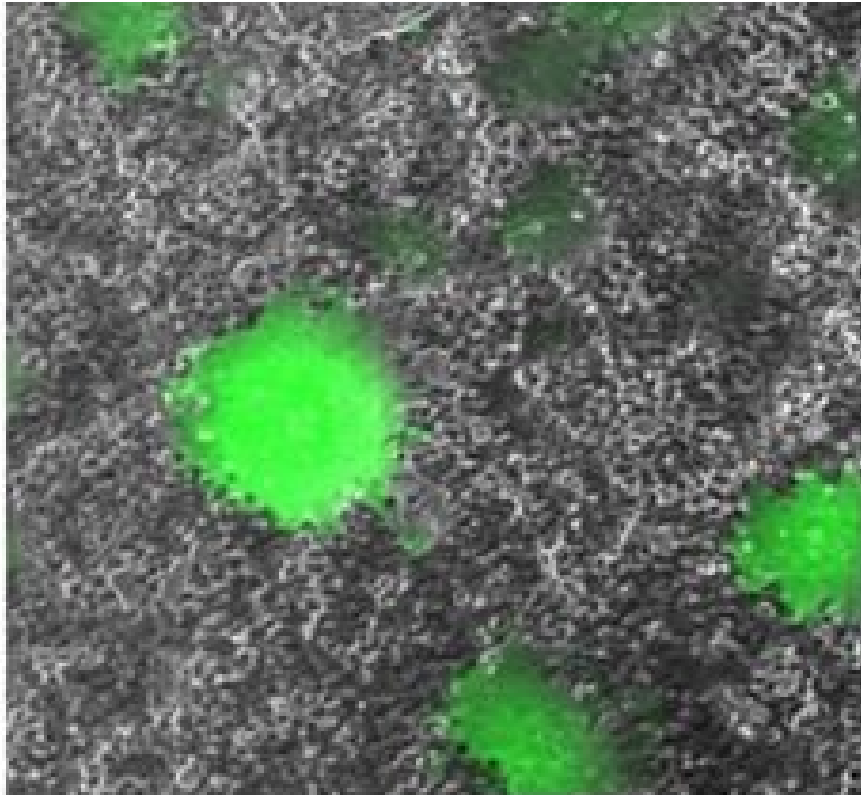


図3. p10タンパク質発現による巨細胞形成

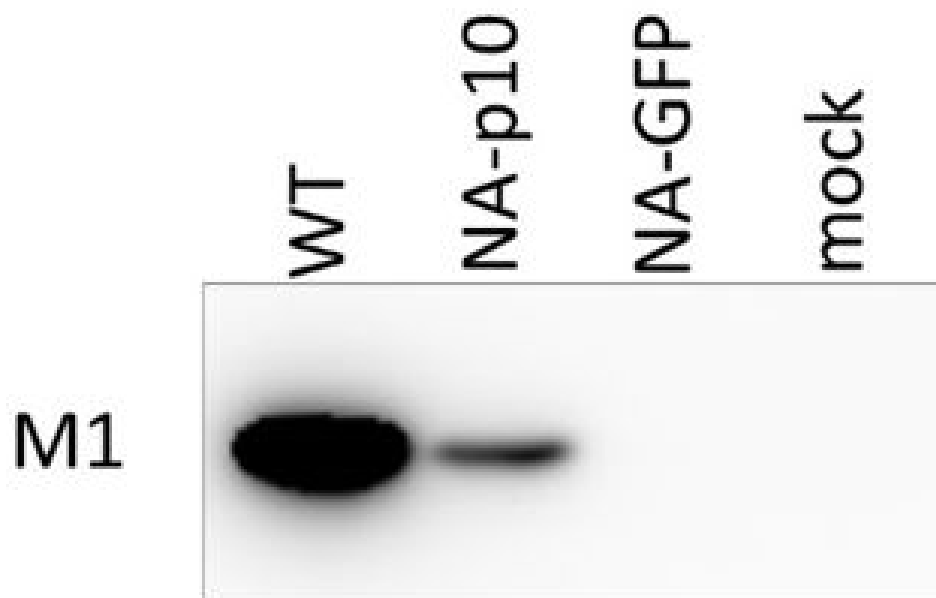


図4. p10タンパク質を発現するインフルエンザウイルススペクター感染細胞中のM1タンパク質発現

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））

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 が消失した後で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、配列の一致が低いが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：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の株間的一致(アミノ酸%)						
		Miyazaki	HK46886	HK50842	Kampar	Sikamat	Melaka	HK23629
左下： Cell attachment proteinの 株間的一致 (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

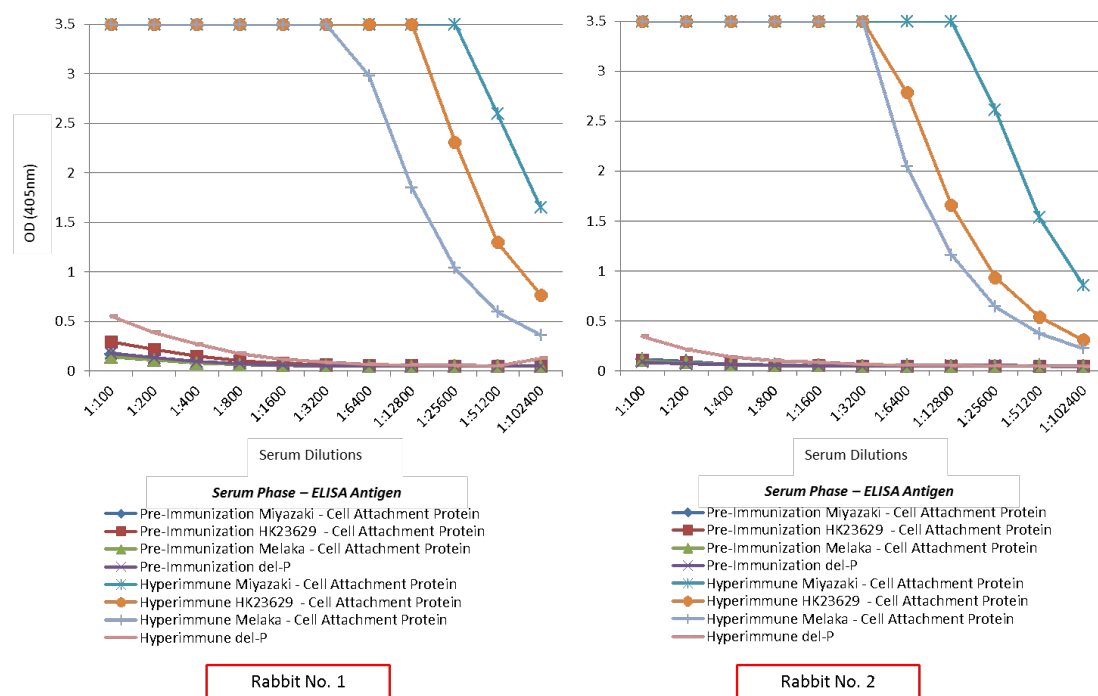


図3：抗 Melaka 株 CAP 血清の ELISA における反応性

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

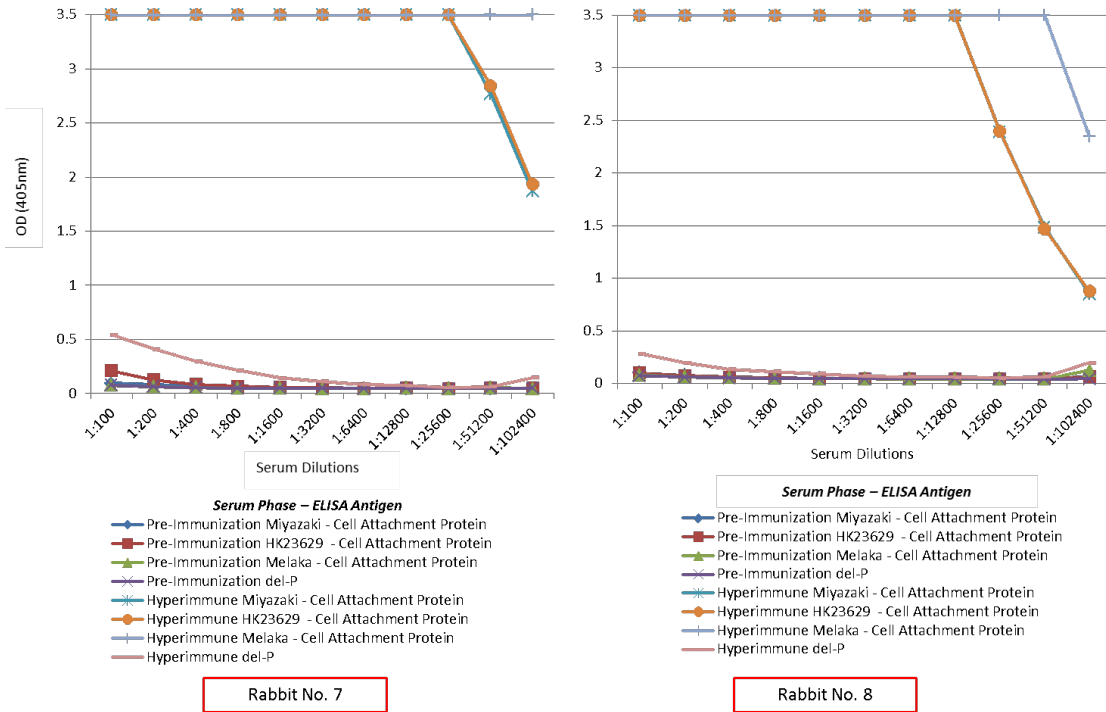
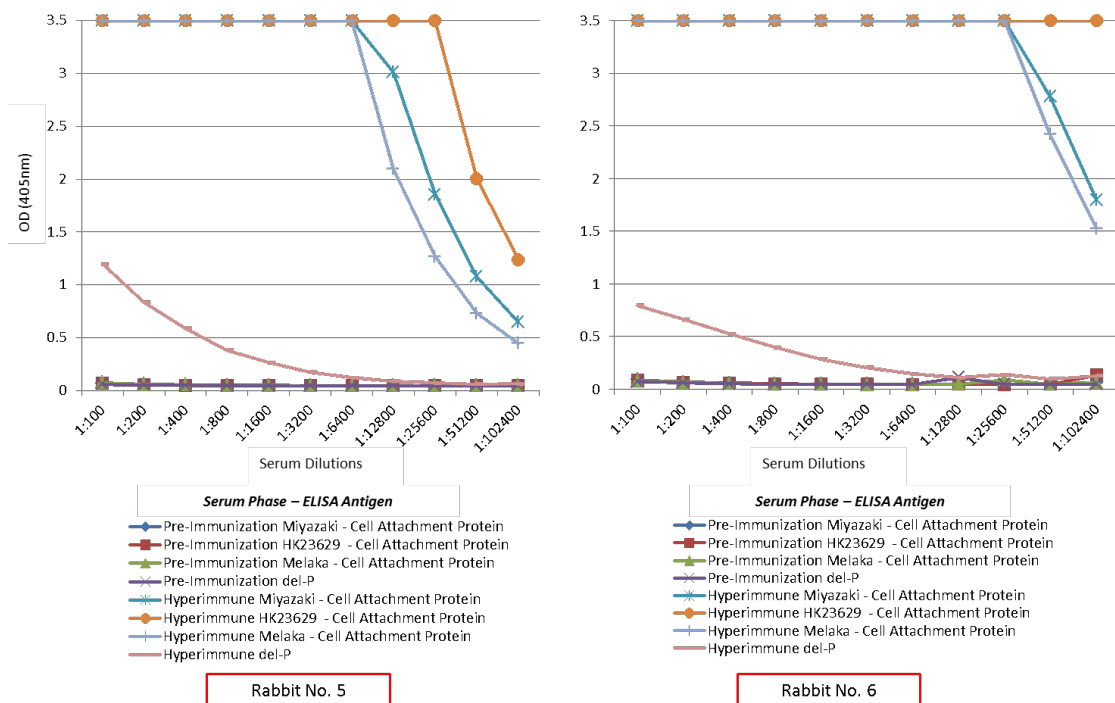


図4：抗 HK23629 株 CAP 血清の ELISA における反応性

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）

福土秀悦、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々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 CCHFV 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 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

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）

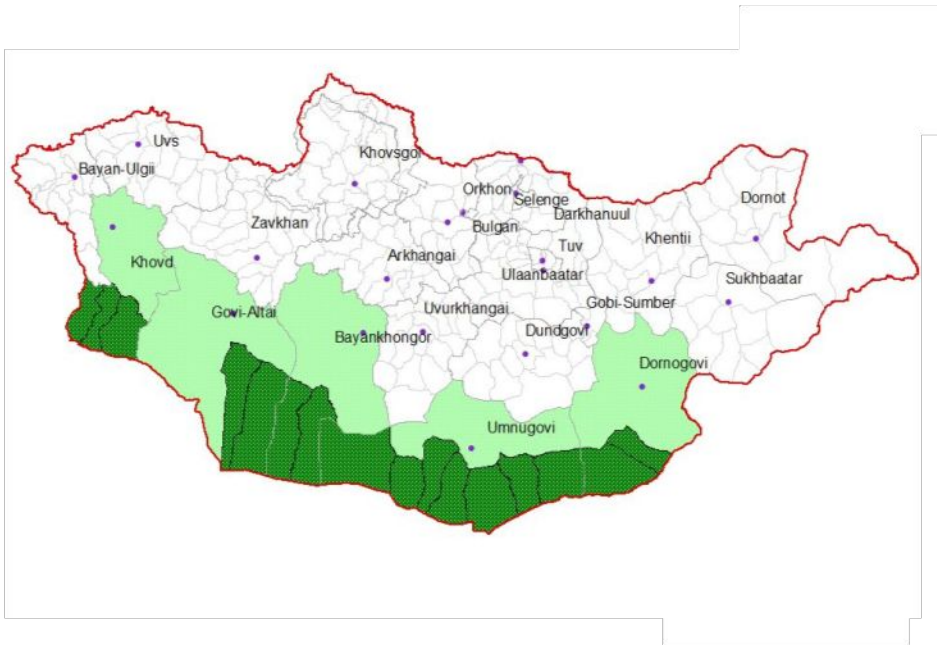


図2：モンゴルにおける CCHFV 抗体陽性ヒツジの分布

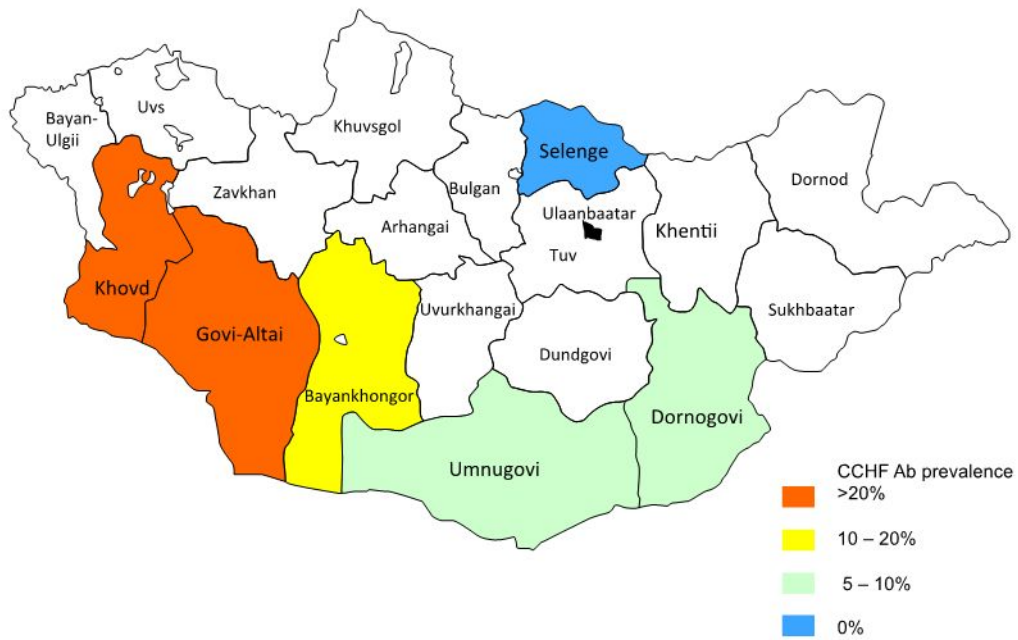


表1：ELISA 及び IF によるモンゴルの健常人における CCHFV 抗体陽性率

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、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、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

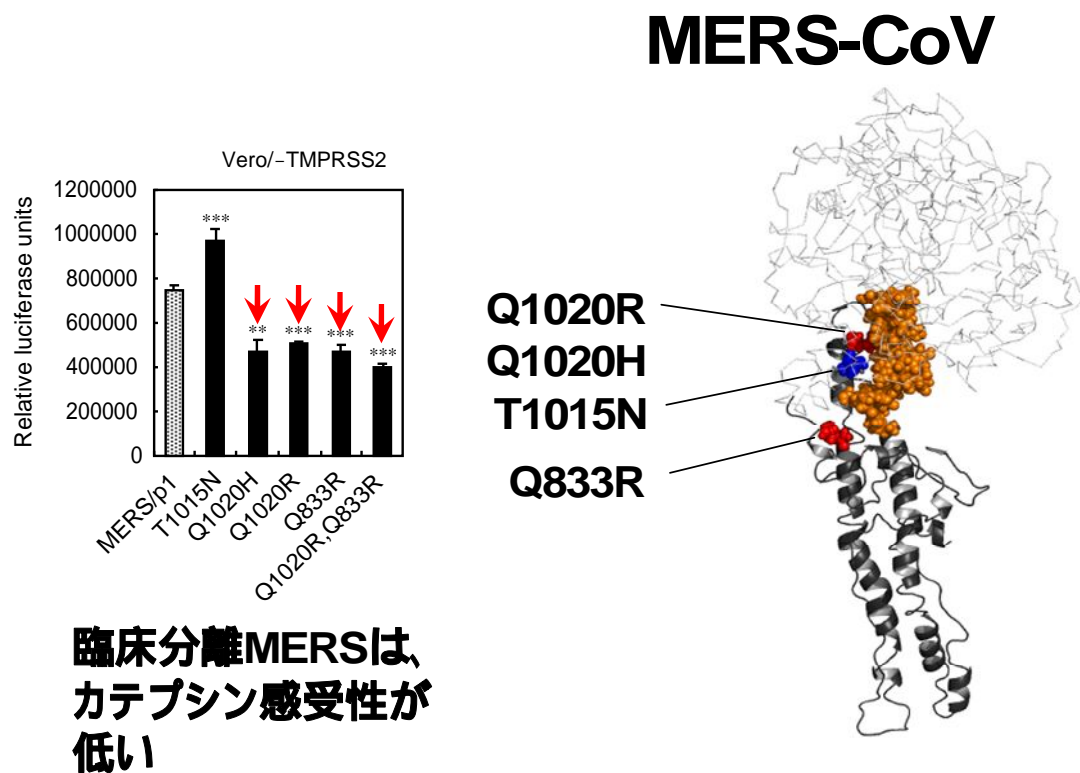


図2：5代継代 MERS-CoV 株のエンドソーム経路を介した Vero 細胞への細胞侵入

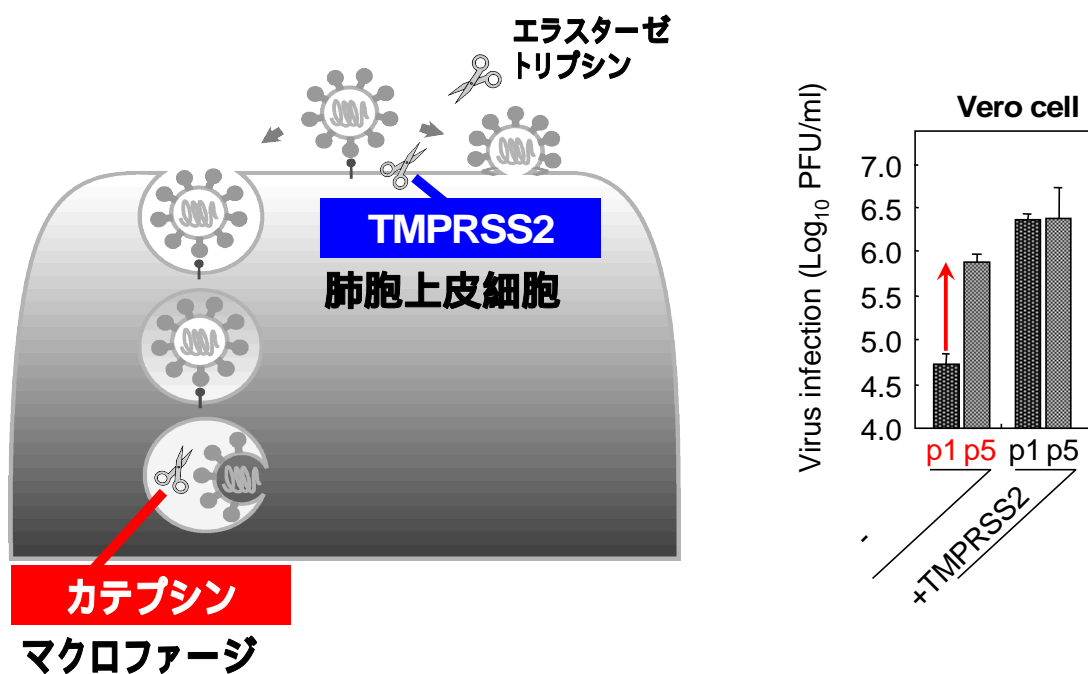


図3：20代継代 HCoV-229E 株のエンドソーム経路を介した HeLa 細胞への細胞侵入と、VSV シュードタイプウイルスを用いた HCoV-229E の S 蛋白のエンドソーム親和性アミノ酸変異の特定

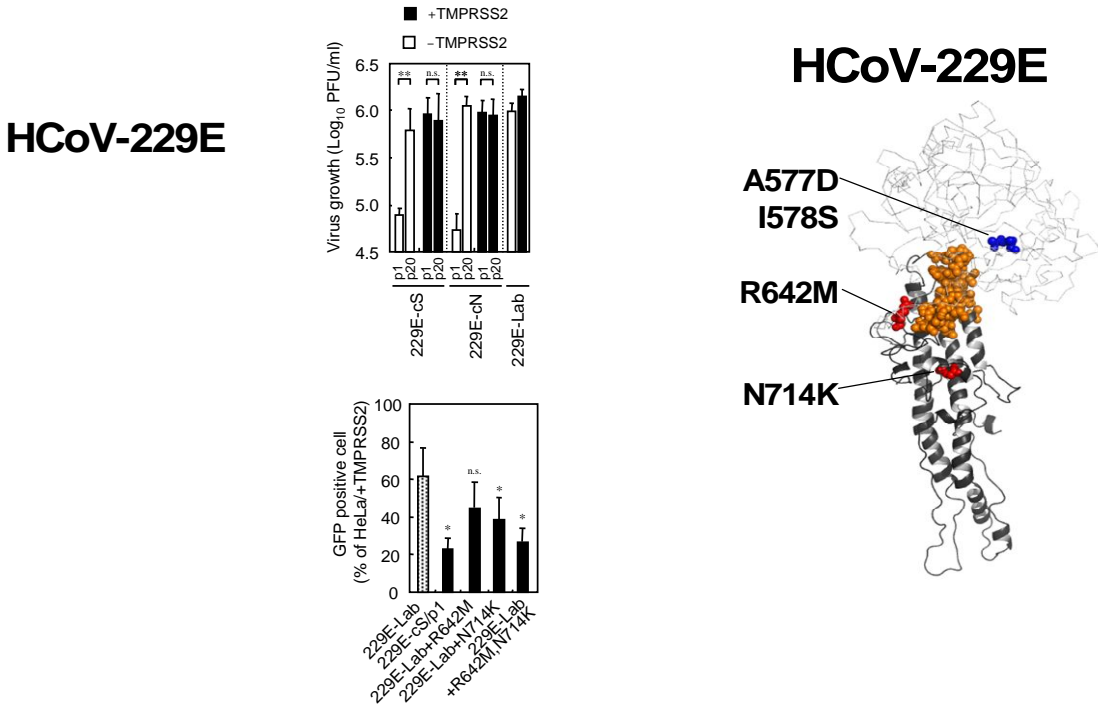


図4：マクロファージに分化した U937 細胞での MERS-CoV の増殖とウイルス mRNA の合成、およびエンドソーム経路を介したウイルスの細胞侵入

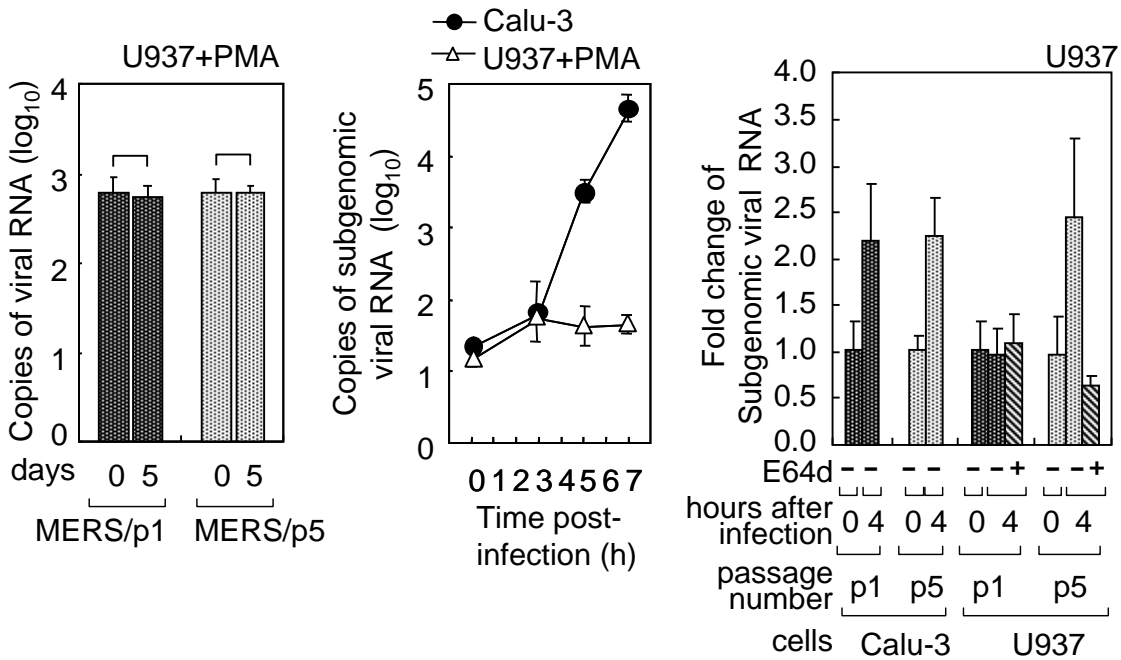
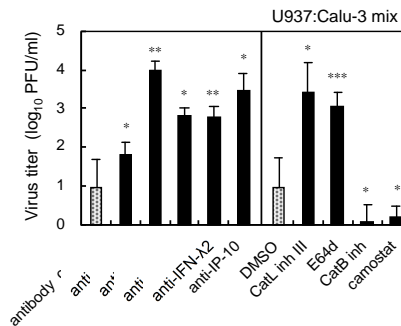
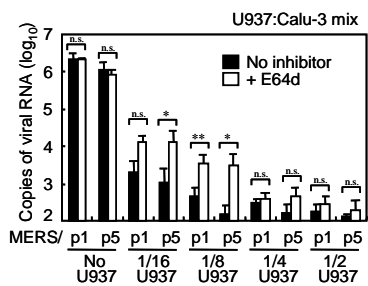
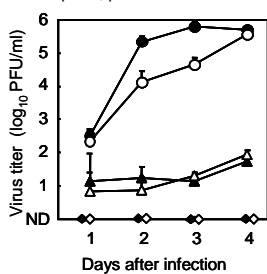


図5 : U937 細胞と Calu-3 細胞の混合培養における MERS-CoV の増殖と、カテプシン阻害剤および抗サイトカイン抗体によるウイルス増殖の亢進

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



平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））

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：ラプト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プト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プト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 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 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 2×10^6 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 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 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 μ 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、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 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。P 接種群では、8 匹中 1 匹のみが生残した。それに対し、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、P-GPC 株と 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、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

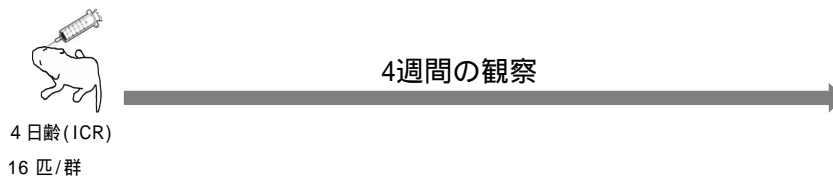


図1：哺乳マウスを用いた安全性確認試験

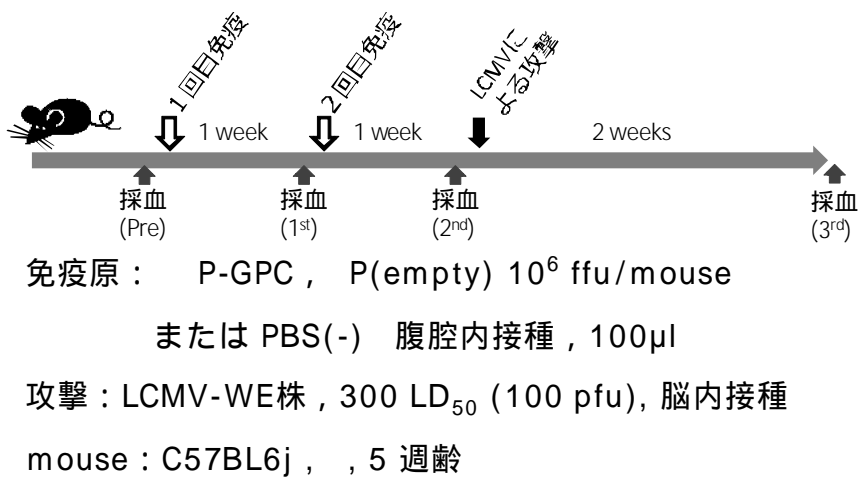


図2：感染防御試験および血液採取のスケジュール

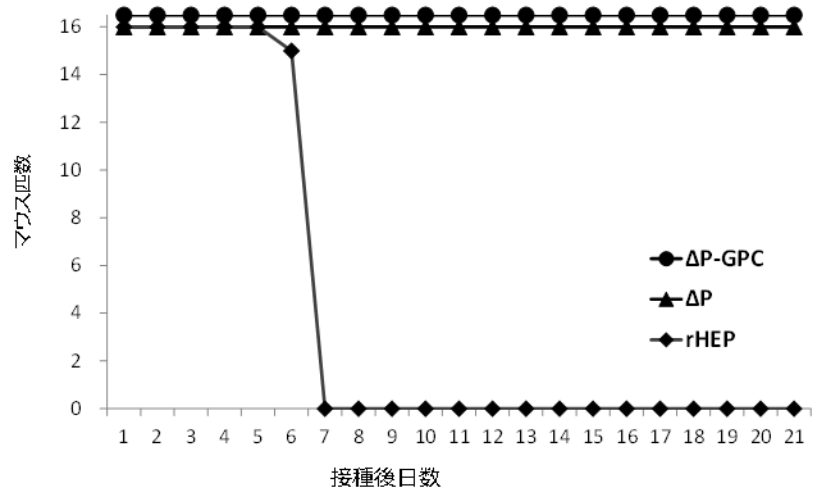


図 3 : 安全性確認試験の結果

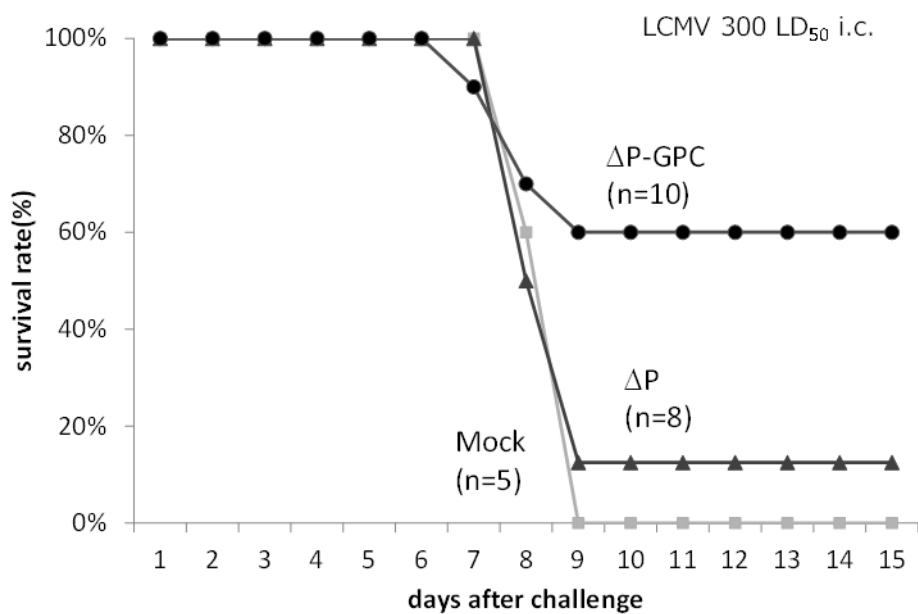


図 4 : 感染防御試験の結果

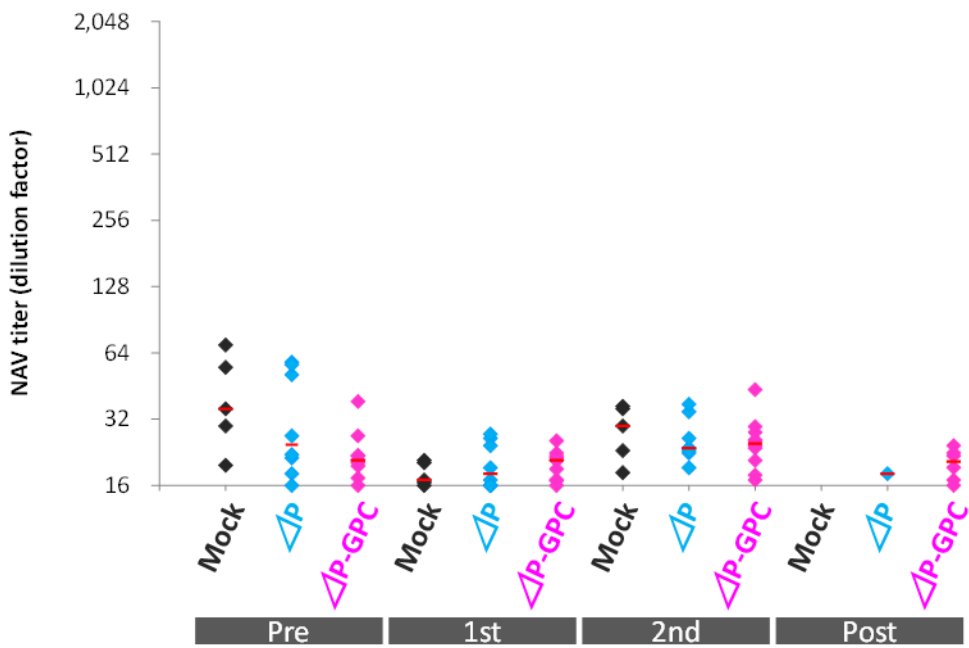


図 5 : LCMV に対する血清中和抗体価

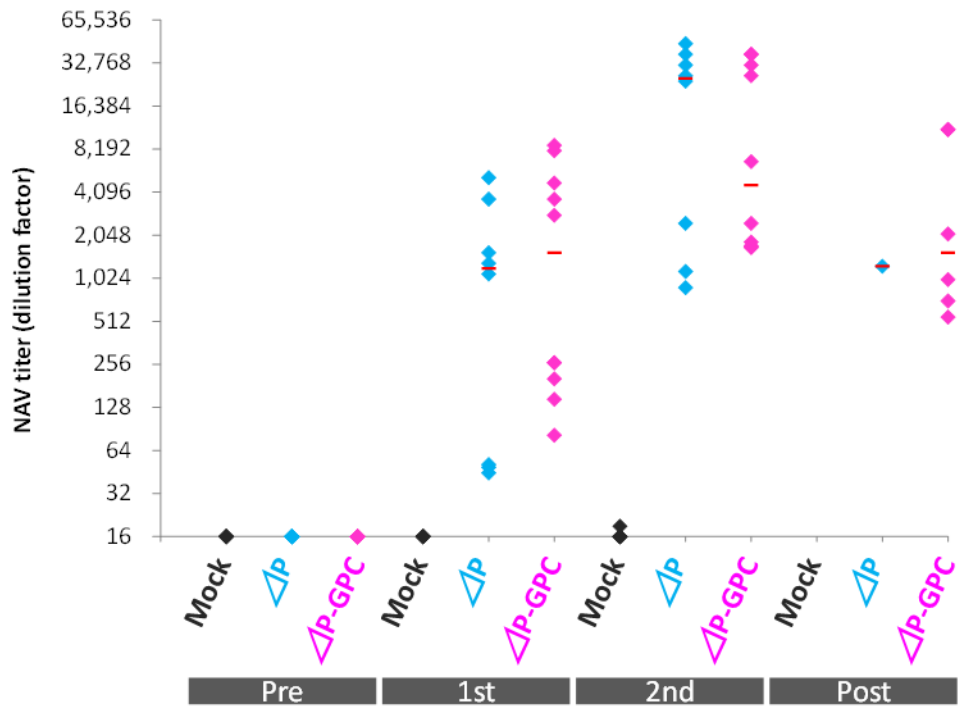


図 6 : 狂犬病ウイルスに対する血清中和抗体価

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））

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 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 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)

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、56-30 分の非働化处理を行ったうえで、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 段階低い 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 100,000 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 を用いた従来から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 μ l、タイトレーションでも 4.5 μ 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 (BSL2 で実施可能、少量の被検血清で検出可能、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, Sucaldito 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）

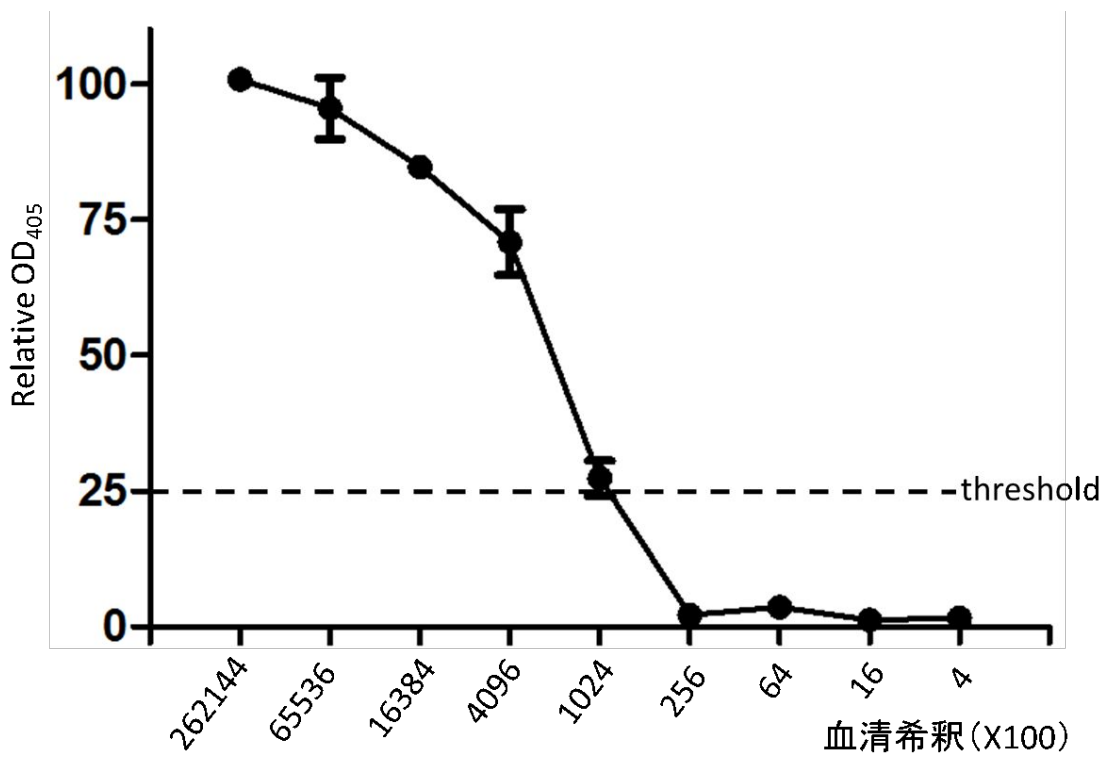


表 1 : NiV 感染症の過去患者を含む Sungei-Nipah 村民の NiV 中和抗体検査の結果

患者番号	中和試験結果		流行時の自覚的 症状
	Relative OD ₄₀₅	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	-	-

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））

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 μ 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 Δ 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。遺伝子組換えに当たっては、文部科学省の承認を得た上でを行った。

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 についてブラン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ト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に行っている。

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 LD₅₀ 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) 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

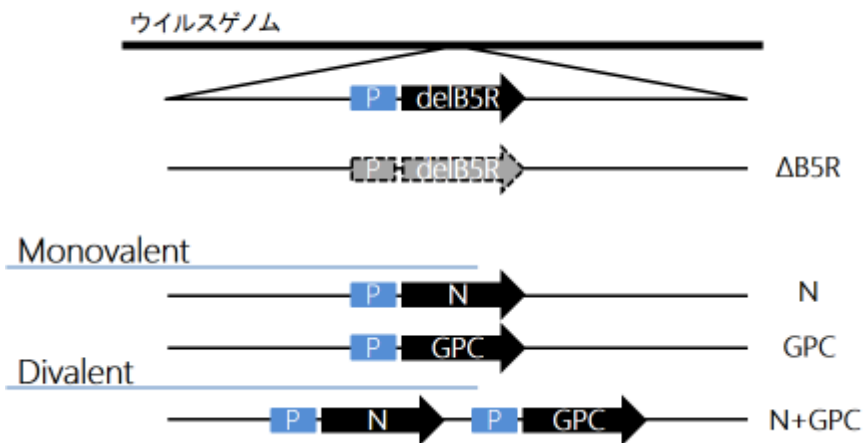


図2. LCMV抗原を発現する組換えワクチニアウイルスの概略

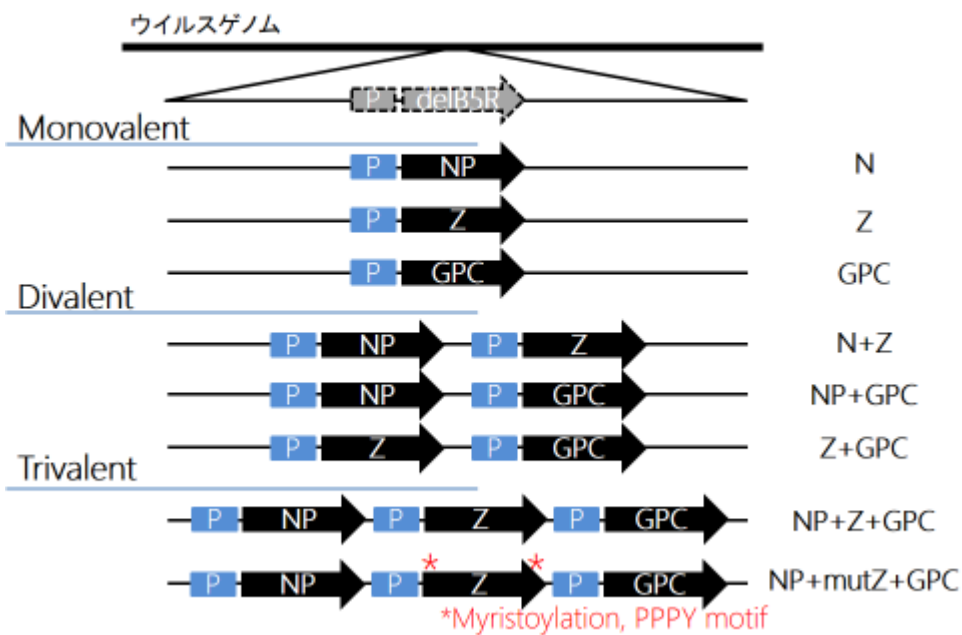


図3 蛍光抗体法によるSFTSV抗原 (N, GPC) の発現確認

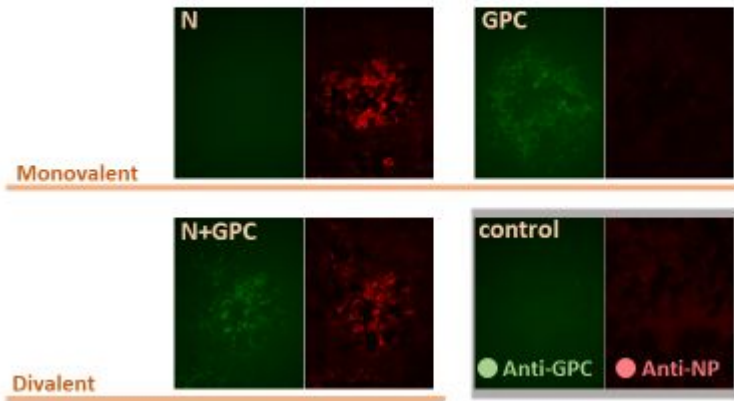


図4 蛍光抗体法によるLCMV抗原 (GPC, NP) の発現確認

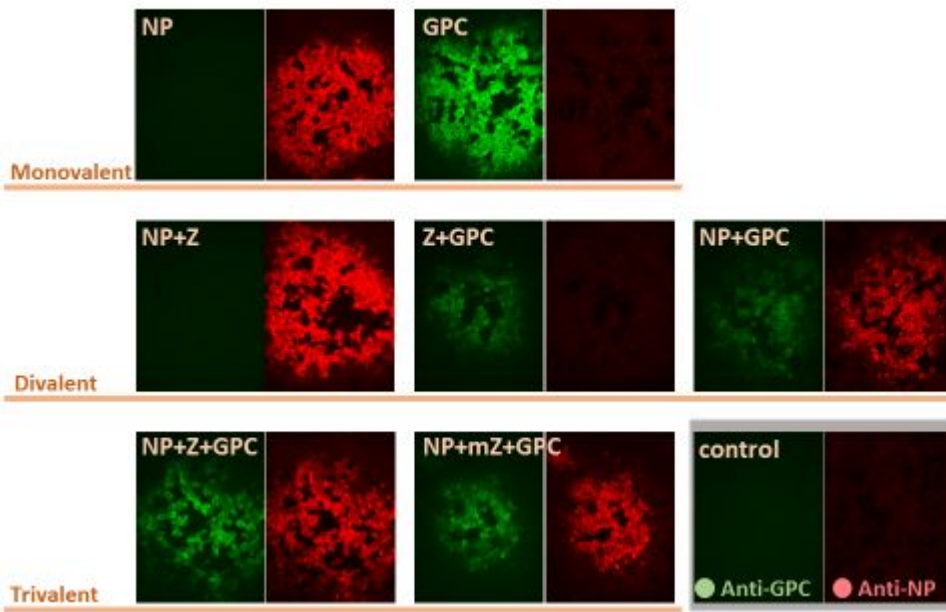


図5 蛍光抗体法によるLCMV抗原(Z)の発現確認

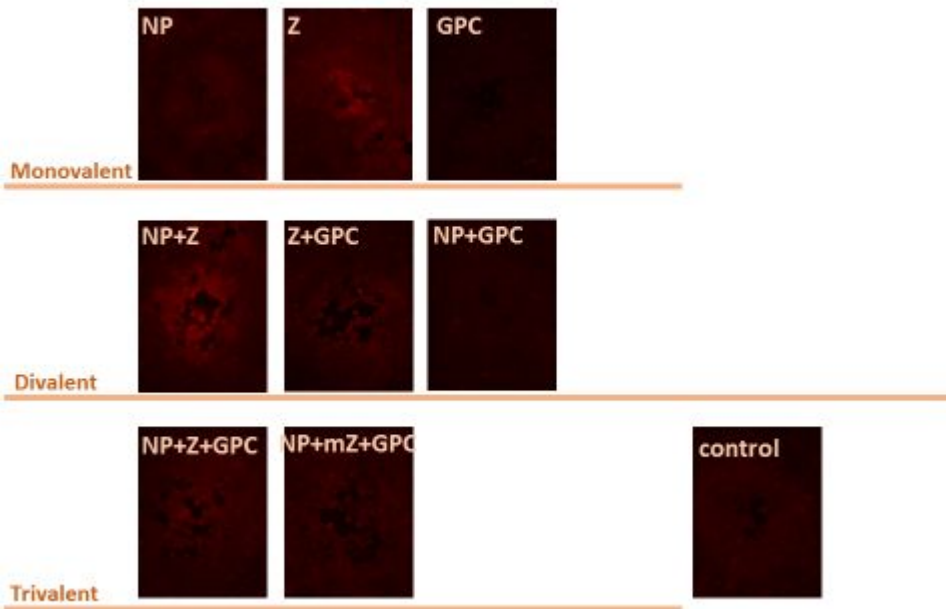


図6 LCMV腹腔接種後のマウス系統毎の生存率の違い

