

201420054B

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

水疱性口内炎ウイルスを用いたアレナウイルス感染中和抗体開発に関する  
基盤研究

平成24年度～平成26年度 総合研究報告書

研究代表者 谷 英樹

平成27(2015)年 3月

## 目次

I.	総合研究報告 水疱性口内炎ウイルスを用いたアレナウイルス感染中和抗体開発に関する基盤研究 谷 英樹 .....	1
II.	研究成果の刊行に関する一覧表 .....	31
III.	研究成果の刊行物・別刷 .....	39

# I. 総合研究報告

総合研究報告書

水疱性口内炎ウイルスを用いたアレナウイルス感染中和抗体開発に関する  
基盤研究

研究代表者 谷 英樹 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

ヒトが罹患する出血熱ウイルス感染症は、重篤な疾患を引き起こし、致死率も高いため、ワクチン及び有効な治療法の開発が急務である。しかしながら、出血熱ウイルスの多くは生物学的封じ込めレベル4(BSL4)病原体に指定されているために、本国はもとより世界的にも研究への取り組みが難しい状況にあり、有効な治療薬の開発は進んでいない。本研究では、細胞侵入阻害薬の開発に向けての基礎研究として、ラッサ熱の原因ウイルスであるラッサウイルス、各種南米アレナウイルスおよび新興ウイルスである重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)の感染を中和できるような、エンベロップ蛋白質(GP)に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。ラッサウイルス、フニンウイルス、ルジョウイルスおよびSFTSVのGPシュードタイプウイルスもしくはGP発現細胞をマウスへ免疫し、ハイブリドーマを作製後、各ウイルスGPシュードタイプVSVの感染中和活性および間接蛍光抗体法を用いて産生抗体の有無を調べた。その結果、SFTSVに対しては感染中和活性が認められたものの、アレナウイルスに対してはどれも認められなかった。感染疑い患者血清によるスクリーニングにおいても、アレナウイルスのGPに対する抗体は、何らかの理由で産生されにくいことが示唆された。

A. 研究目的

アレナウイルス種などが起因となるウイルス性出血熱は、発熱、出血、多臓器不全などを誘発し、致死率の高い重篤な疾患として知られている。しかし

ながら現在まで、これらのウイルス感染症に対して治療薬をはじめ有効なワクチンや抗ウイルス剤の開発は進んでいない。ウイルス感染症に対する効果的な治療薬としては、ウイルスの複製

を阻害する複製阻害剤やウイルスが細胞外に放出（出芽）するのを阻害する出芽阻害剤の他、ウイルスの細胞侵入を阻害できる侵入阻害剤などがあげられる。その中でもウイルスのエンベロープ蛋白質に対する中和抗体薬は、特に出血熱ウイルス感染症のような急性期に劇症化する疾患の場合、ウイルスの生体内への感染そのものを阻止することができ、非常に効果的である。ラッサウイルスをはじめ各種南米アレナウイルスにおいては、未だ効率良くウイルスの感染を中和できるような抗体は得られておらず、治療薬としての開発が必要とされている。

本研究では、ラッサウイルスや各種南米アレナウイルスの感染を阻害できるような中和抗体の作製を試みる。この作製にあたり、本来のウイルスを抗原として用いることは本邦ではバイオセーフティー上、不可能なため、代替モデルとしてアレナウイルスエンベロープ蛋白質を外套したシュードタイプVSVを用いる（図1）。このウイルスを抗原として用いることで、精製蛋白質よりも天然型のウイルスに近い構造を保持したエンベロープ蛋白質に対する抗体を作出することができると考えられる。これまでに、シュードタイプVSVを抗原として抗体を作製した報告例はなく、また抗体産生細胞の選別にシュードタイプVSVの感染実験系を用いる

ことで、直接的に中和活性のある抗体を得る可能性が高い（研究成果概要図参照）。

本研究において、各種アレナウイルスの感染を阻害できるような中和抗体が作製できれば、予防ワクチンのみならず、感染後に治療薬としても利用することができ、抗体医薬品として臨床現場においても有用性は高い。感染患者等への応用にはまだ取り組むべき課題は多いが、将来的なワクチン開発及び抗体療法確立に向けての第一歩になるものと考えられる。特に、西アフリカ等の感染流行地域においては、こうした治療法や治療薬の整備も遅れていると予想されるため、本邦から治療薬として供給することができれば、国際的な貢献度は高い。また、流行地以外での輸入感染例も世界中で見られることから、本邦においても決して対岸の火事ではなく、厚生労働行政として対策を講じておく必要性が高いと思われる。

現在、こうしたアレナウイルス種のエンベロープ蛋白質に対する抗体作製の取り組みは、世界的にもほとんど報告されておらず、感染を阻害できるような中和抗体が得られなくとも、エンベロープ蛋白質を検出できる抗体が作製できれば、アレナウイルス感染症対策に関する基礎研究の有用なツールとして活用できるだけでなく、抗原検出の

ための迅速診断法への開発にも応用することが期待できる。

さらに、新興ウイルス感染症として、一昨年より我が国で発生が問題となっている重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルス (SFTSV) に対しても、感染を中和できるような抗体の作製を試みる。SFTSは数年前に中国で患者発生が報告されたばかりで、中国での致死率は十数パーセントと他のウイルス感染症と比較すると比較的高いと思われる。日本においても一昨年秋に初めて患者が報告されて以降、現在まで110名以上のSFTS患者が発生しており、致死率は30%を超えている。現在まで、予防薬はおろか治療薬も開発されておらず、この疾患に対しては厚生労働行政として緊急の対策を講じておく必要がある。その一環として、ウイルスの感染を阻害できる抗体の作製は、将来的に治療法の一つとして利用できるだけでなく、抗原を検出するツールとして基礎研究、診断の分野にも応用することが可能である。また、SFTSVはブニヤウイルス科に属しており、エンベロープ蛋白質に対する抗体ができにくいとされるアレナウイルス科のウイルスと感染阻害抗体の作製効率を比較することもできる。こうしたことから、必要性和比較対照の両面を勘案し、SFTSVのエンベ

ロープ蛋白質(GP)に対する抗体の作製も試みる。

また、中和抗体が出来にくいと考えられているアレナウイルス種の中でもラッサウイルスに対して、ナイジェリアの感染症疑い患者血清を用いてラッサウイルスGPおよびコントロールとしてリフトバレー熱ウイルス (RVFV) GPを外套したシュードタイプウイルスを用いて検証する (研究成果概要参照)。

## B. 研究方法

### 1. 細胞

各種ウイルスGP発現細胞の作製および蛍光抗体法での評価、シュードタイプウイルスを用いた感染中和活性の測定用として、ヒト腎由来293T細胞、ヒト子宮頸癌由来のHeLa細胞、マウス胎仔由来繊維芽細胞株のNIH3T3細胞、およびヒト肝癌由来Huh7細胞を用いた。培養は、全てウシ胎児血清(FBS)を10%添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)を用いた。

### 2. 発現プラスミド

ラッサウイルス、フニンウイルス、ルジョウイルス、SFTSVおよびRVFVのエンベロープ遺伝子であるGPを、発現プラスミドであるpKS336にクローニングした。

### 3. GP発現細胞の作製

80%コンフルエントの293T細胞に、トランスフェクション試薬であるX-tremeGENE 9 (Roche Applied Science) を用いて、GP発現プラスミドをトランスフェクションし、48時間培養後、発現細胞を0.05%エチレンジアミン四酢酸(EDTA)添加リン酸緩衝液(PBS)にて回収する。GPの発現を患者血清もしくはポリクローナル抗体等で確認した後、発現細胞をセルバンカー（三菱化学メディアエンス株式会社）存在下で、-80°Cの超低温フリーザーにて免疫に用いるまで小分け保存した。

### 4. シュードタイプウイルスの作製

80%コンフルエントの293T細胞にX-tremeGENE 9を用いて、GP発現プラスミドをトランスフェクションし、48時間培養後、EGFPを発現するコントロールプラスミドでトランスフェクション効率を確認し、親ウイルスである\*G-ΔG-Luciをmoi 1で接種する。2時間吸着後に感染しなかった親ウイルスを培地で洗浄し、24時間後に培養上清を回収する。ウイルス感染価は、Huh7細胞を用いて評価し、至適希釈したウイルス液は、-80°Cの超低温フリーザーにて実験に用いるまで小分け保存した。

### 5. マウスへの免疫

6週齢のメスのBALB/cマウスを免疫動物として用いた。2匹1群として、ラッサウイルスGPおよびSFTSV-GP発現細胞を同時に免疫した。フニンウイルスGP発現細胞、ルジョウイルスGP発現細胞は2匹1群としてそれぞれ単独に免疫した。それぞれの群において、免疫回数は1週間のインターバルで3回ずつ行った。

### 6. ハイブリドーマの作製

免疫マウスより脾臓を摘出し、定法に従ってミエローマ細胞とB細胞を、ポリエチレングリコールを用いて融合させた。96ウェルプレートで限界希釈したものをHAT培地で培養し、コロニーが形成されてくるまで培養を続けた。

### 7. シュードタイプウイルス感染中和実験

Huh7細胞を96wellプレートに播種し、24時間前培養する。ハイブリドーマ上清を終濃度が10倍希釈となるように細胞液に添加し、続けて至適量のシュードタイプウイルス液を接種する。そのまま、24時間培養する。24時間後に培養プレートにルシフェラーゼの溶解液と基質の混合溶液（Bright-Glo™ Luciferase Assay System, Promega）を添加し、ルシフェラーゼ活性を指標にウイルスの感染性を評価した。

#### 8. 感染症疑い患者血清を用いた感染中和試験

ラッサウイルス流行地の一つであるナイジェリア北東部、ボルノ州の感染症疑い患者297名から採取された血清を用いて、ラッサウイルスGPおよびコントロールとしてリフトバレー熱ウイルスGPを外套したシェードタイプウイルス（それぞれLASVpv、RVFVpv）による感染中和を、ルシフェラーゼ活性を指標に評価した。なお、患者血清サンプルは、ナイジェリア、マイドゥグリ大学のDavid Bukbuk博士から提供されたものである。

#### 9. 間接蛍光抗体法による抗体産生の確認実験

80%コンフルエントのHeLa細胞およびNIH3T3細胞に、X-tremeGENE 9を用いて、それぞれのウイルスGP発現プラスミドをトランスフェクションし、24時間培養後、トリプシンを用いて回収し、96ウェルプレートに再播種した。24時間培養後、細胞をアセトン/メタノール溶液にて固定し、PBSにて10倍に希釈したハイブリドーマ上清を1時間反応させた。洗浄後、2次抗体として、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgGを用いて、1時間反応させた。再び洗浄後、蛍光顕微鏡下で抗体反応の有無を観察した。

#### 10. ハイブリドーマ上清の精製

ハイブリドーマを、FCSを2%添加したKBM343培地で大量培養し、培養上清を回収、Protein Gカラムで精製した。精製した抗体は蛋白量測定装置にて濃度を測定し、至適濃度に調整した。

#### 11. SFTSV感染中和試験

Huh7細胞を96wellプレートに播種し、24時間前培養する。SFTSV各株と精製した抗体を1時間室温にて混合後、細胞に接種する。2時間吸着後、反応液を捨て1%メチルセルロース添加培地にて3日間培養後、細胞をホルマリンで固定し、NPに対するポリクローナル抗体にて免疫染色し、ウイルスの感染中和活性を評価した。

（倫理面への配慮）

アレナウイルスおよびSFTSVエンベロープ遺伝子を挿入したプラスミドの作製及び使用に関しては、第二種使用等拡散防止措置確認実験として既に文部科学大臣へ申請・承認済みであり（平成20年6月3日付20国文科振第14号および平成23年12月1日付23受文科振第2142号）、規定の要項を遵守して、外部への漏出には十分に留意する。また、VSVはP2レベルの取り扱い病原体であり、VSVGを欠損させたアレナウイルスおよびSFTSVのGP外套シェードタイプウイルスの供与核酸もウ



イルスの伝達性・病原性に影響しないことを勘案し、P2レベルの拡散防止措置を執る。上記を用いた組換えDNA実験は、国立感染症研究所遺伝子組換え実験等安全管理委員会の承認を得る。また特定病原体等の取扱いは感染症法に従う。動物取り扱いに関しては、国立感染症研究所実験動物委員会の審査と承認を得て、動物愛護の精神に則り遂行する。ナイジェリアの血清サンプルの取扱いについては、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査を受け承認済みである（平成24年9月24日受付番号371）。

### C. 研究結果

初年度、ラッサウイルスおよび各種南米アレナウイルスエンベロープ蛋白質（GP）を外套したシュードタイプウイルスを大量作製し、分離用超遠心機を用いてウイルスの濃縮・精製を行ない、マウスへ免疫したものの、血清中の感染中和抗体価はVSVGのシュードタイプウイルスを免疫したマウスの血清のみ、VSVGのシュードタイプウイルスに対して感染中和活性が見られた（図2）。これは、精製ウイルス上に取り込まれているエンベロープ蛋白質の量的な問題であると考えられたので、次年度、質よりも量的な優位性を考慮し、エンベロープ蛋白質を細胞に一過

性に発現させたGP発現細胞を用いて免疫を行った（図3）。脾臓を回収し、定法に従ってハイブリドーマを作製し、96穴プレート約12枚分のハイブリドーマ候補を得た。このハイブリドーマ候補細胞の上清を用いて、免疫したGPに対応するGPを外套したシュードタイプウイルスを用いて、感染阻害活性をルシフェラーゼの値を指標にスクリーニングを行った（図4, 5）。またこれと並行して、GP発現細胞を用いた間接蛍光抗体法によるスクリーニングも行った。

その結果、SFTSV-GP発現細胞を免疫したマウスのハイブリドーマ上清中から、SFTSV-GPを外套したシュードタイプウイルスの感染を特異的に中和できる抗体産生細胞が4クローン得られた（図6）。間接蛍光抗体法においても、複数の陽性クローンが得られており、感染を中和できる抗体産生細胞は蛍光抗体法でも陽性であった（図7）。また、ELISA法でもこれらのクローンはSFTSV-GPに対して陽性反応を示すことがわかった（図8）。

一方、アレナウイルス種は、ラッサウイルスのGPに対しては、蛍光抗体法で検出できる抗体産生細胞が唯一得られたものの、ラッサウイルスGP外套シュードタイプウイルスの感染を中和できるような抗体産生細胞は得られなかった。また、ルジョウイルスやフニ

ンウイルスの GP に対しては、感染中和アッセイにおいても蛍光抗体法においても検出できる抗体産生細胞は得られなかった。最終年度も引き続き、エンベロープ蛋白質を細胞に一過性に発現させた GP 発現細胞を用いて免疫を行った。脾臓およびリンパ節を回収し、定法に従ってハイブリドーマを作製し、96 穴プレート約 18 枚分のハイブリドーマ候補を得たものの、スクリーニングの結果、アレナウイルス種に関しては、どれもシュードタイプウイルスの感染を中和できるハイブリドーマクローンは得られなかった。アレナウイルス種は、これまでも感染中和抗体が得られにくいことが動物実験からも、臨床的にも知られており、実際にウイルス感染症に罹患した患者血清中のアレナウイルス種、特にラッサウイルスに対する中和抗体価が、一般的な他のウイルス感染症と比較して低いかどうかを検証してみた (図 9)。ラッサウイルスの流行地の一つであるナイジェリア北東部、ボルノ州の感染症疑い患者 297 名から採取された血清を用いて、LASVpv および RVFVpv による感染中和を、ルシフェラーゼ活性を指標に測定した結果、RVFVpv では 99%以上の強い中和活性を示すものが多く存在したものの、LASVpv では多くが 60-90%程度しか中和活性を示さなかった (図 10)。このことから、患者血清におい

ても、ラッサウイルスの感染中和抗体価は、他のウイルス感染症のものと比較して低いことが明らかとなった。

SFTSV-GP 発現細胞を免疫したマウスのハイブリドーマ上清中から、SFTSV-GP を外套したシュードタイプウイルスの感染を特異的に中和できる抗体産生細胞は、4 クローン得られており、それぞれのアイソタイプを決定したところ、IgG1 および IgG2a がそれぞれ 2 クローン得られた。この中から最も感染中和活性の高かった 1 クローンについて、ハイブリドーマ細胞の大量培養を行い、上清を精製して、精製モノクローナル抗体の作出を行った。この抗体を用いて、実際の SFTSV の感染中和活性を検証してみたところ、株間による若干の差がみられるものの、感染中和活性が認められた (図 11)。SFTSV の株間による違いは、シュードタイプウイルスでも同様の傾向が認められ、免疫抗原で用いている中国株 HB29 の GP を外套したシュードタイプウイルスおよび SFTSVHB29 株が最も高い中和活性を示した (図 12)。

#### D. 考察

本研究結果より、VSVGのシュードタイプウイルスを免疫した場合のみ、感染を中和できる抗血清が産生されていることがわかり、これは、VSVへのア

レナウイルスGPの取り込み量が低いことが影響していると考えられた。本来のウイルスエンベロープ蛋白質の立体構造等を考えるとシュードタイプウイルスそのものを免疫したほうが、感染を中和できるような抗体の産生効率は高いと考えられるものの、次年度は、抗体作製自体を重視するため、免疫抗原であるエンベロープ蛋白質の質的な優位性よりも量的な優位性を考慮して、シュードタイプウイルスの代わりに各種ウイルスGPを発現させた細胞を抗原として用いた。その結果、アレナウイルス科とは別のブニヤウイルス科のSFTSV-GPに対しては感染を中和できるような抗体産生細胞を複数得ることができた。一方、アレナウイルス科ではラッサウイルスのGPに対しては、蛍光抗体法で検出できる抗体産生細胞が得られたものの、感染を中和できるような抗体産生細胞は得られなかった。この結果より、感染を中和できるような抗体産生細胞は、GP発現細胞を抗原に用いても得られることがわかった。ただ、ウイルス種によって得られる効率が異なり、アレナウイルス科のGPに対しては効率が低いことが予想された。現段階では、構造的な問題なのか、蛋白修飾などの問題なのかは不明であるが、免疫したGP発現細胞でのGPの発現量を比較するとSFTSV-GPと同程度は発現しているため、量的な問題ではな

いと考えられる。また、実際のアレナウイルスの中でもラッサウイルスの流行地であるナイジェリアにおけるウイルス感染疑い患者血清サンプルを得ることができ、このサンプルを用いて、LASVpvの感染中和活性を調べてみた。その結果から、マウスでの免疫と同じように、患者血清中でも他のウイルス種に比べると、LASVpvの感染中和活性は低いことが分かった。最近、ラッサウイルスの膜融合に関与する分子として、Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1)が同定されており、こうした分子を認識する領域をターゲットとする必要があるのかもしれない(図13)。以上のことから、今後、アレナウイルス種に関しては、GPの構造を変化させたものや受容体と結合させた状態など、更に免疫原を工夫する必要があると思われる。また、ラッサウイルスのGP遺伝子を組み込んだ組換えVSVを作製し、これを抗原として免疫することも試みる。既に、このラッサウイルスGPの組換えVSVをマウスに接種することで、実際のラッサウイルスの感染から防御できたという報告があり、マウス血清中にはラッサウイルスの感染を中和できるような抗血清が産生されていると考えられる。シュードタイプVSVがマウス内では増殖できないのに対し、組換えVSVはマウス内でもある程度増殖することが予想さ

れ、マウス内でGPが発現されることも免疫抗原として有利なのではないかと考えられる。

今回、ハイブリドーマのスクリーニングに免疫した発現細胞と同じGPを外套したシュードタイプウイルスを用いた。このシュードタイプウイルスは、リポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子をコードしているため、感染性をルシフェラーゼの活性を元に評価できる。ハイブリドーマの上清とシュードタイプウイルスを供培養して24時間後に測定するだけでスクリーニングでき、この系は今後、アレナウイルスのみならず他のウイルスにおいても感染を阻害するような抗体ならびに薬剤等のスクリーニングに活用できると考えられる。

ブニヤウイルス科のSFTSV-GPに対しては感染を中和できるような抗体産生細胞を複数得ることができており、大量培養してモノクローナル抗体の精製を試みた。この抗体を用いて、シュードタイプウイルスだけでなく、本来のSFTSVの感染も中和することが明らかとなった。しかしながら、中和活性は株間により違いが見られ、抗原として用いた中国株HB29のGPを外套したシュードタイプウイルスおよびHB29株で最も中和活性が高く、他の株では弱い活性しか示さないものもあった。これが、抗原との適合性によるものか、

株の種類によるものかは今後検討する必要があると思われる。また、今後中和活性部位を特定するために、抗体存在下でウイルスを継代培養して、エスケープ変異体を作成し、遺伝子配列より決定する。更に、*in vivo*において、この感染中和抗体が効果的であるかどうかSFTSVの感染動物モデルを用いて検証する。将来的にはヒト抗体として開発し、臨床的にも利用できる可能性を検討していきたい。

## E. 結論

本研究で、ブニヤウイルス科のSFTSVに関して、感染を中和できる抗体産生細胞の選別ができた。更に精製したこのモノクローナル抗体はウイルスの感染中和だけでなく、蛍光抗体法やELISA法にも利用できることがわかった。アレナウイルス科においては、検討したウイルス種では感染を中和できる抗体を得ることが難しく、これは感染疑い患者血清においても同様の傾向を示すことが明らかとなった。ラッサウイルスは、ウイルスの細胞侵入時に複雑なステップで結合や融合することが明らかになり、こうしたステップが抗体産生の出来にくさに影響を及ぼしていることも考えられ、今後抗原の工夫も必要になると思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Viruses*. (2012). 4: 2097-2114.
2. 谷 英樹、福士秀悦、吉河智城、西條政幸、森川茂：アレナウイルス感染症 ウイルス(2013). 62: 229-238.
3. Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, Toru Shigeoka, Takayuki Tominaga, Toshiaki Kamei, Masahiro Honda, Daisuke Ninomiya, Takanori Sakai, Takanori Senba, Shozo Kaneyuki, Shota Sakaguchi, Akira Satoh, Takanori Hosokawa, Yojiro Kawabe, Shintaro Kurihara, Koichi Izumikawa, Shigeru Kohno, Taichi Azuma, Koichiro Suemori, Masaki Yasukawa, Tetuya Mizutani, Tsutomu Omatsu, Yukie Katayama, Masaharu Miyahara, Masahito Ijuin, Kazuko Doi, Masaru Okuda, Kazunori Umeki, Tomoya Saito, Kazuko Fukushima, Kensuke Nakajima, Tomoki Yoshikawa, Hideki Tani, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma, Momoko Ogata, Masayuki Shimojima, Noriko Nakajima, Noriyo Nagata, Harutaka Katano, Hitomi Fukumoto, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Takuya Yamagishi, Kazunori Oishi, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa and Masayuki Saijo. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *Journal of Infectious Diseases*. (2013).
4. 下島昌幸、福士秀悦、谷 英樹、吉河智城、森川 茂、西條政幸：日本における重症熱性血小板減少症候群、ウイルス (2013). 63: 7-12.
5. 谷 英樹、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)、検査と技術 (2013). 41: 1164-1167.
6. 谷 英樹：重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)、臨床と微生物 (2014). 41: 045-049.
7. Hideki Tani, Koichiro Iha, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Yoshihiro Kawaoka, Naoe Nakasone, Haruaki Ninomiya, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa. Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular

- stomatitis virus. *Journal of Virology*. (2014). 88: 7317-7330.
8. Tomoki Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Shoichi Toda, Yukie Shimazu, Koji Yano, Toshiharu Morimitsu, Katsuyuki Ando, Akira Yoshikawa, Miki Kan, Nobuyuki Kato, Takumi Motoya, Tsuyoshi Kuzuguchi, Yasuhiro Nishino, Hideo Osako, Takahiro Yumisashi, Kouji Kida, Fumie Suzuki, Hirokazu Takimoto, Hiroaki Kitamoto, Ken Maeda, Toru Takahashi, Takuya Yamagishi, Kazunori Oishi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Masayuki Shimojima. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. (2014). 52: 3325-3333.
  9. David N. Bukbuk, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Koichiro Iha, Aiko Fukuma, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, F. Kasolo, S.S. Baba. Development and validation of serological assays for viral hemorrhagic fevers and determination of the prevalence of Rift Valley fever in Borno State, Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*. (2014). 108: 768-773.
  10. Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Yuto Suda, Ken Maeda, Toru Takahashi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Effects of ribavirin on severe Fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. (2014). 67: 423-427.
  11. Hideki Tani. Analyses of entry mechanisms of novel emerging viruses using pseudotype VSV system. *Tropical Medicine and Health*. (2014). 42: 71-82.
  12. 谷 英樹、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群ウイルス：バイオセーフティと家族内感染および院内感染に対する対応、*Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* (2014). 35: 37-38.
  13. 福士秀悦、吉河智城、谷 英樹、福間藍子、下島昌幸、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群の検査法、*Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* (2014). 35: 40-41.

14. 谷 英樹、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)、血液フロンティア(2014). 24: 80-83.
2. 学会発表
1. Hideki Tani, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Characterization of pseudotype VSV possessing New and Old World arenavirus envelope proteins. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Japan, 2012.
  2. Hideki Tani, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Analysis of cell entry of New and Old World arenaviruses using pseudotyped viruses bearing their envelope proteins. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012.
  3. Kie Yamamoto, Koichiro Iha, Christine Bruce, Stuart D. Dowall, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Yoshiyuki Ishii, Shigeru Kyuwa, Roger Hewson, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of viral hemorrhagic fevers caused by arenaviruses. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012.
  4. 谷 英樹、伊波興一郎、谷口 怜、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、森川 茂：シュードタイプ VSV を用いたルジョウウイルスの細胞侵入機構の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月
  5. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa: Characterization of New and Old World arenavirus glycoprotein-mediated entry. 15<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Viral Diseases Panel Meeting. Shingapore, March 11-13, 2013.
  6. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa: Analysis of cell entry of a novel arenavirus, Lujo virus, using pseudotype VSV. XV International Conference on Negative Strand Viruses. Granada, Spain, June 16-21, 2013.
  7. Masayuki Shimojima, Toru Takahashi, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani,

- Tomoki Yoshikawa, Tetsuya Mizutani, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Ken Maeda: Severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. XV International Conference on Negative Strand Viruses. Granada, Spain, June 16-21, 2013.
8. 吉河智城、福士秀悦、谷 英樹、宇田晶彦、谷口 怜、福間藍子、前田健、高橋 徹、森川 茂、下島昌幸、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の確定診断に使用されているコンベンショナル PCR の評価、及びリアルタイム定量 PCR との比較 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月
  9. 福間藍子、福士秀悦、谷 英樹、吉河智城、谷口 怜、下島昌幸、森川茂、前田 健、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の血清学的診断法の開発 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月
  10. 西條政幸、高橋 徹、前田 健、水谷哲也、大松 勉、吉河智城、谷 英樹、福士秀悦、下島昌幸、福間藍子、緒方もも子、鈴木忠樹、中島典子、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、山岸拓也、倉根一郎、森川 茂：後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された 11 名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月
  11. 森川 茂、木村昌伸、福士秀悦、福間藍子、加来義浩、朴ウンシル、谷 英樹、吉河智城、井上 智、今岡浩一、下島昌幸、西條政幸：SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月
  12. 谷口 怜、福士秀悦、Masangkay Joseoh、渡辺俊平、大松 勉、下田宙、前田 健、福間藍子、吉河智城、谷 英樹、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和 茂、森川茂：フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月
  13. 下島昌幸、福士秀悦、谷 英樹、吉河智城、福間藍子、谷口 怜、前田健、高橋 徹、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する ribavirin の in vitro 増殖抑制効果 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月
  14. 谷 英樹、下島昌幸、福間藍子、谷口 怜、吉河智城、福士秀悦、森川茂、前田 健、高橋 徹、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP を外套したシュードタイプ VSV の作製 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月



- 学会学術集会、神戸、2013年11月
15. 高橋 徹、前田 健、亀井敏昭、水谷哲也、下島昌幸、福士秀悦、谷 英樹、吉河智城、森川 茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠樹、永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大石和徳、西條政幸：重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の日本における初症例 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月
  16. 須田遊人、谷 英樹、西條政幸、堀本泰介、下島昌幸：シュードタイプウイルスのクリミア・コンゴ出血熱ウイルス中和抗体価測定への応用 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月
  17. 福士秀悦、谷 英樹、吉河智城、谷口 怜、福間藍子、緒方もも子、下島昌幸、森川 茂、西條政幸：ナイジェリアにおけるリフトバレー熱の血清疫学 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月
  18. 須田遊人、谷 英樹、下島昌幸、堀本泰介、西條政幸：クリミア・コンゴ出血熱ウイルスのシュードタイプウイルスを用いた中和抗体価測定系の構築 第156回日本獣医学会学術集会、岐阜、2013年9月
  19. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo: Analyses of cell entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus using pseudotype vesicular stomatitis virus system. XVI International Congress of Virology. Montreal, Canada, July 27-August 1, 2014.
  20. Tomoki Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Aiko Fukuma, Momoko Ogata, Masayuki Saijo, Masayuki Shimojima: Phylogenetic analyses of SFTSVs in Japanese SFTS patients. XVI International Congress of Virology. Montreal, Canada, July 27-August 1, 2014.
  21. Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Eunsil Park, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda: Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in domestic and wild animals in Japan. XVI International Congress of Virology. Montreal, Canada, July 27-August 1, 2014.
  22. Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo: Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVI International Congress of Virology.

- Montreal, Canada, July 27-August 1, 2014.
23. Yuto Suda, Hideki Tani, Masayuki Saijo, Taisuke Horimoto, Masayuki Shimojima: Use of pseudotyped vesicular stomatitis virus for measurement of neutralizing antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. XVI International Congress of Virology. Montreal, Canada, July 27-August 1, 2014.
24. 谷口怜、堀本泰介、Joseph Masangkay、Roberto Puentespina 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 第 157 回日本獣医学会学術集会、札幌、2014 年 9 月
25. 須田遊人、谷 英樹、西條政幸、堀本泰介、下島昌幸：シュードタイプウイルスを利用したクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの株間での中和反応の比較 第 157 回日本獣医学会学術集会、札幌、2014 年 9 月
26. 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、2014 年 9 月
27. 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系の確立 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
28. 河内健吾、氏家 誠、谷 英樹、森川 茂、田口文広：Baculovirus を用いた牛 Torovirus の可溶性 Hemagglutinin-Esterase protein の発現 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
29. 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：若齢および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 年 11 月
30. 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 年 11 月
31. 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 年 11 月
32. 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 による感染阻  
害効果 第 62 回日本ウイルス学会  
学術集会、横浜、2014 年 11 月
33. 谷口 怜、堀本泰介、Joseph  
Masangkay、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 年 11 月
34. 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 年 11 月
35. 須田遊人、谷 英樹、西條政幸、堀  
本泰介、下島昌幸：クリミア・コン  
ゴ出血熱ウイルスの株間でのシェ  
ードタイプウイルスを利用した抗  
体への反応性の比較 第 62 回日本  
ウイルス学会学術集会、横浜、2014  
年 11 月
36. 福間藍子、福士秀悦、吉河智城、谷  
英樹、谷口 怜、鈴木忠樹、佐藤由  
子、長谷川秀樹、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 年 11 月
37. Hideki Tani: Entry and Fusion  
Mechanisms of SFTSV. 17<sup>th</sup>  
International Conference on Emerging  
Infectious Diseases. Viral Diseases  
Panel Meeting. Taiwan, January 25-29,  
2015.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

図 1

## アレナウイルスGP外套VSVシュードタイプウイルス

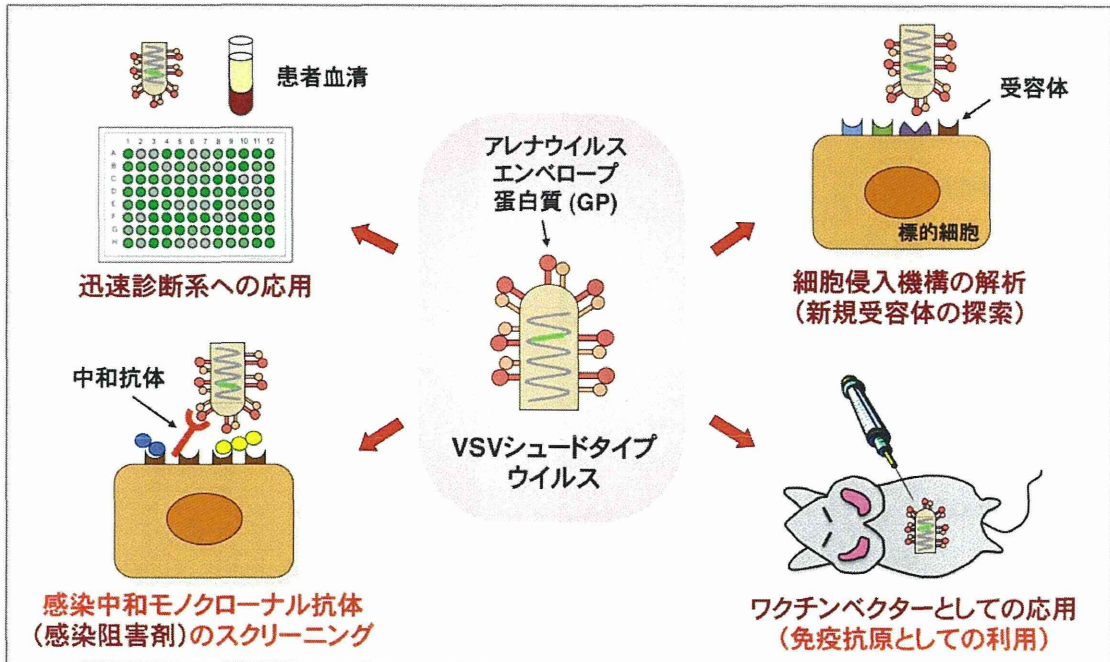
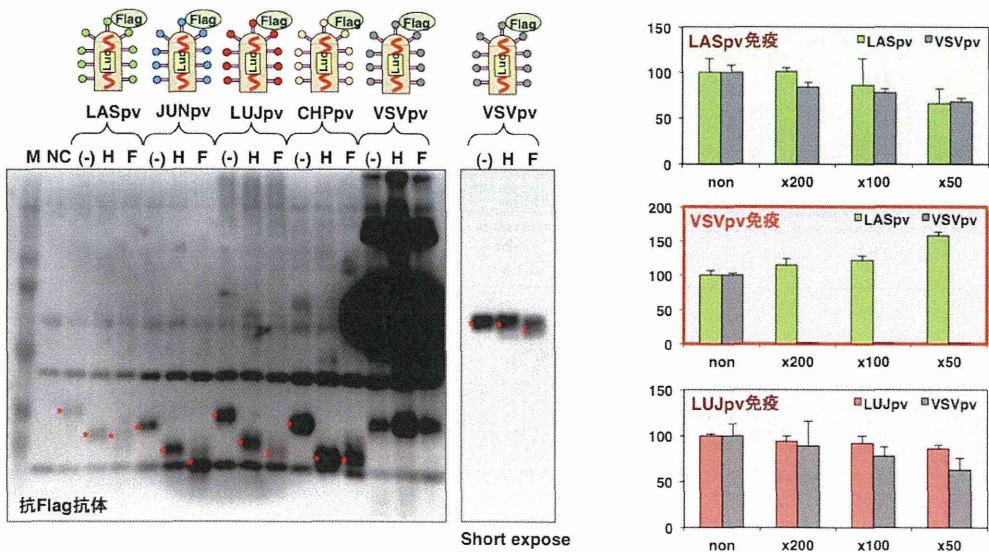


図 2

## 図2 エンベロップ蛋白質の粒子への取り込みと抗血清による感染中和



外来エンベロップ蛋白質の  
取り込み量は少ない!

VSVpv免疫に対してのみ感染  
を中和できる抗血清ができる