

我が国で開発され、備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性、生産性向上
および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究

分担報告書

出血熱ウイルスを含むバイオテロ関連病原ウイルス検出法の改良

所 属 国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長
研究分担者 下島 昌幸

研究要旨: バイオテロで用いられた病原体を特定することはバイオテロによって生じる健康被害や経済的被害を小さくすることに繋がる病原体の特定(あるいは検出)には PCR による遺伝子検出が特異性や感度、所要時間等の面で優れると言える。しかし既知の病原体とは遺伝子情報が異なる新規株や変異株が用いられた場合には PCR では検出できない場合もあり、他の手法による検出を行なう必要がある。検出法の1つとして培養細胞を用いたウイルス分離の手法の確認を行なった。エボラウイルス、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスを感染させた細胞を作製し、これに各ウイルスに対する抗血清を反応させたところ、明瞭な陽性反応を示した。細胞変性効果が認められなくてもウイルス抗原が検出される場合があった。エボラウイルス、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスについてはバイオテロでの病原体特定法の1つとして分離手法の確認ができたと言える。

研究協力者

黒須剛・国立感染症研究所・主任研究官

吉河智城・国立感染症研究所・主任研究官

A. 研究目的

バイオテロが生じた場合、用いられた病原体を特定することはバイオテロによって生じる健康被害や経済的被害を小さくすることに繋がる病原体の特定には当然ではあるが迅速性や正確性が求められる。

バイオテロで用いられる病原体の特定(あるいは検出)には PCR による遺伝子検出、培養細胞を用いたウイルス分離、電子顕微鏡による病原体の観察等のいくつかの手法があるこれらのうち PCR による遺伝子検出は特異性や感度、所要時間等の面で優れ、迅速かつ正確な病原体の特定になると言える。しかし、PCR による遺伝子検出は病原体が持つ遺伝子情報に基づくものであるため、配列が異なる新規株や変異株が用いられた場合には PCR では検出できない場合もある。他の手法は特に迅速性はあまり期待できないとはいえ、それぞれ PCR による検出では弱い場合でも対応できる特徴を持つこのうちウイルス分離は、通常培養細胞に病原体を感染させ、病原体を増殖させた状態から病原体の抗原検出(場合によっては遺伝子検出)を行なう手法である。遺

伝子配列が多少異なる新規株や変異株であっても抗原性が完全に異なることは科学的に考えにくい。このため、この方法では既知のものと多少異なるものであっても検出することができるバイオテロ対策の1つとして、病原体特定の1つの方法として是非準備しておきたい方法と言える。

これまで日本には感染症法でいう特定一種病原体は存在せず、国立感染症研究所ウイルス第一部では人工合成した病原体遺伝子等を用いて一類感染症を実験室診断する手法を整備してきた。その中で、ウイルスの抗原検出のためのウサギ血清(抗血清)も準備してきた。ただし実際のウイルスを必要とする中和抗体価の測定等は実施不可能だった。2019年9月になり、国立感染症研究所はオリンピックなどのバイオテロが起こりうるイベント等への対策として、海外の研究機関から特定一種病原体(エボラウイルス、マールブルグウイルス、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、フニンウイルス、ガナリトウイルス、マチュポウイルス、サビアウイルス)を輸入し、これまで不可能だった中和抗体測定法の整備等を行なうこととした。入手したウイルスを増殖させ、その力

価を測定する必要があるが、この力価測定の作業自体が上述のウイルス分離とほぼ同一であることから、力価測定をウイルス分離の手法の確認と見做して作業を行なった。

B. 研究方法

1. 感染研におけるウイルス(P1 ストック)の作製
入手した特定一種病原体を BSL4 実験室において培養細胞の VeroE6 に接種し、CO₂ インキュベーターで培養した 1 週間後、上清を回収し、分注してディープフリーザーで保存した。
2. 力価測定
分注したウイルスを解凍し、10 倍階段希釈を作製し、各々を VeroE6 細胞(あるいは Vero 細胞もしくは Vero9013 細胞)に接種し、CO₂ インキュベーターで 1 週間培養したホルマリン固定と Triton-X100 処理後、ウサギ抗血清および蛍光 2 次抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察した TCID₅₀/mL を算出した細胞変性効果 (CPE) での力価測定も行なった。

【倫理面への配慮】

該当しない。

C. 研究結果

1. 感染研におけるウイルス(P1 ストック)の作製
ザイルエボラウイルス、スーダンエボラウイルス、ラッサウイルス (Mali 株)、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (Bagdad12 株) について P1 ストックを作製した接種した VeroE6 細胞で、ザイルエボラウイルス、スーダンエボラウイルスおよびクリミア・コンゴ出血熱ウイルス (Bagdad12 株) の場合に明瞭な CPE が認められた。
2. 演習の構成
ザイルエボラウイルスおよびスーダンエボラウイルス: VeroE6/Vero/Vero9013 細胞のいずれでもウイルス濃度が濃い部分では明瞭な CPE を認めた (図 1)。しかし、ウイルスが増殖し抗原が抗血清で検出される場合でも CPE が明瞭でない場合があった手法の簡素化や統一化が望まれることから、VeroE6 細胞と抗体染色を力価測定に用いることとした。
クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (Bagdad12 株): VeroE6/Vero 細胞においては明瞭な CPE が認められ、CPE の有無とウイルス抗原の有無とは一致した (図 2)。Vero9013 細胞では CPE が明瞭でない場合があった手法の簡素化や統一化が望まれることから、VeroE6 細胞と抗体染色を力価測定に用いることとした。

ラッサウイルス (Mali 株): VeroE6 細胞でのみ力価測定を行なった CPE は明瞭でない場合があった手法の簡素化や統一化が望まれることから、VeroE6 細胞と抗体染色を力価測定に用いることとした。

D. 考察

ウイルスの増殖に伴う CPE は認められるもののあまり劇的なものではなく、ウイルス抗原の確実な検出には抗血清による染色が安定かつ確実な手法であると考えられた。力価測定、加えてウイルス分離の確認では、抗血清による染色結果に基づくものが良いと考えられた。

E. 結論

バイオテロ発生時の病原体特定の方法の 1 つであるウイルス分離の手法を確認した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

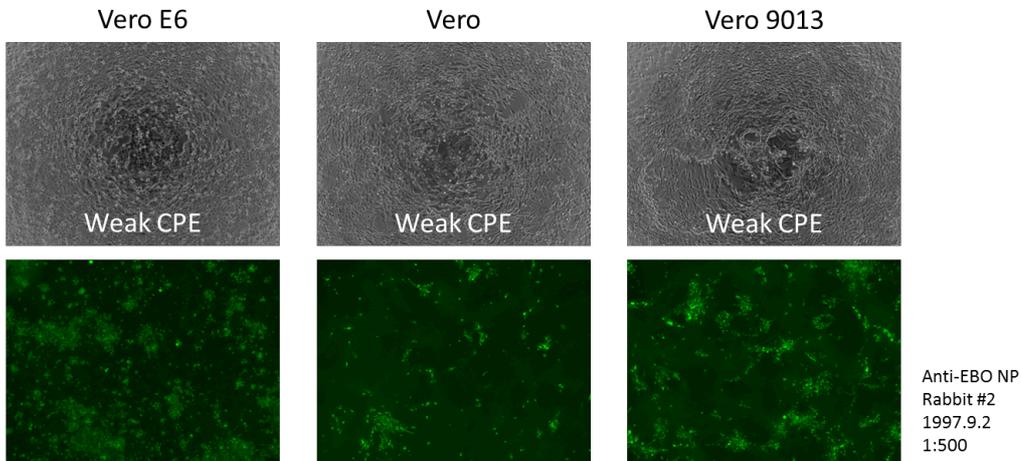
- 1) Suzuki T, Sato Y, Sano K, Arashiro T, Katano H, Nakajima N, Shimojima M, Kataoka M, Takahashi K, Wada Y, Morikawa S, Fukushi S, Yoshikawa T, Saijo M, Hasegawa H. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus targets B cells in lethal human infections. *J Clin Invest.* 2020 Jan 6. pii: 129171. doi: 10.1172/JCI129171.
- 2) Tani H, Kawachi K, Kimura M, Taniguchi S, Shimojima M, Fukushi S, Igarashi M, Morikawa S, Saijo M. Identification of the amino acid residue important for fusion of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein. *Virology.* 2019 Sep;535:102-110. doi: 10.1016/j.virol.2019.06.014.
- 3) Park ES, Shimojima M, Nagata N, Ami Y, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, Watanabe S, Kurosu T, Kataoka M, Okutani A, Kimura M, Imaoka K, Hanaki K, Suzuki T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda K, Morikawa S. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Phlebovirus causes lethal viral hemorrhagic fever in cats. *Sci Rep.* 2019 Aug 19;9(1):11990. doi: 10.1038/s41598-019-48317-8.
- 4) Shiota T, Li TC, Nishimura Y, Yoshizaki S,

- Sugiyama R, Shimojima M, Saijo M, Shimizu H, Suzuki R, Wakita T, Muramatsu M, Ishii K. Integrin $\alpha 3$ is involved in non-enveloped hepatitis E virus infection. *Virology*. 2019 Oct;536:119-124. doi: 10.1016/j.virol.2019.07.025. Epub 2019 Jul 30.
- 5) Kanai Y, Kawagishi T, Sakai Y, Nouda R, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Cell-cell fusion induced by reovirus FAST proteins enhances replication and pathogenicity of non-enveloped dsRNA viruses. *PLoS Pathog*. 2019 Apr 25;15(4):e1007675. doi: 10.1371/journal.ppat.1007675. eCollection 2019 Apr.
- 6) 下島昌幸. 世界における節足動物媒介性ウイルス感染症(ブニヤウイルス)感染症の流行状況. *グローバル時代のウイルス感染症*, 日本医事新報社, 東京, p21-24, 2019
2. 学会発表
- 1) 下島昌幸. 日本と海外の BSL-4 施設の最新事情 ワークショップ「日本における BSL4 施設の現状」. 第 19 回日本バイオセーフティ学会 学術集会, 令和元年 11 月 20 日, 東京
- 2) Shimojima M, Sugimoto S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kurosu T, Saijo M. A novel functional screening method to identify severe fever with thrombocytopenia syndrome virus entry factors from cDNA library. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (W1-1-02)
- 3) Kurosu T, Okuzaki D, Phanthanawiboon S, Yoshikawa T, Shimojima M, Saijo M. IL-17A produced from gamma/delta T cells plays a critical role in vascular leakage of severe dengue hemorrhagic fever in mice. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (W1-1-09)
- 4) Phanthanawiboon S, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Watanabe S, Nagata S, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Okuzaki D, Saijo M, Kurosu T. Flavivirus infection induces suppression of megakaryo-erythro cells in bone marrow. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (O1-2-01)
- 5) Watanabe S, Yoshikawa T, Kurosu T, Fukushi S, Kaku Y, Morikawa S, Shimojima M, Saijo M. Establishment of a recombinant attenuated vaccinia virus, LC16m8, expressing nipah virus surface glycoproteins. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-07)
- 6) Yamada H, Kimura M, Tan L, Taniguchi S, Shimojima M, Fukuhara T, Matsuura Y, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, Saijo M, Tani H. Minigenome-based reporter system suitable for high-throughput screening of small compounds able to inhibit replication and/or transcription of SFTSV. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-27)
- 7) Sano S, Fukushi S, Yamada S, Harada S, Yoshikawa T, Kurosu T, Shimojima M, Saijo M. Development of an RT-LAMP assay for the rapid detection of SFTS virus. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-28)
- 8) Satoh M, Kato H, Ito-Takayama M, Fukushi S, Shimojima M, Yasukawa M, Saijo M. Favipiravir-susceptibility of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus isolated from fatal SFTS patients treated with favipiravir. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-29)
- 9) Kato H, Takayama-Ito M, Satoh M, Kinoshita H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Kurosu T, Nakajima N, Komeno T, Furuta Y, Saijo M. Evaluation of in vitro antiviral effect of favipiravir on the replication of the different genotypes of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-30)
- 10) Takayama Ito M, Sato M, Kato H, Kinoshita H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Kurosu T, Nakajima N, Komeno T, Furuta Y, Saijo M. Attempt to make severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) resistant to favipiravir. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-31)
- 11) Fujii H, Tani H, Taniguchi S, Yoshikawa T, Fukushi S, Yamada S, Harada S, Lim C-K, Takayama Ito M, Maeki T, Kurosu T, Shimojima M, Uda A, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y,

- Morikawa S, Saijo M. Establishment of a lethal model of Heartland virus infection in mice and evaluation of the efficacy of ribavirin and T-705 by using the model. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-32)
- 12) Tan L, Yamada H, Kimura M, Taniguchi S, Shimojima M, Fukushi S, Morikawa S, Saijo M, Tani H. Generation of single-round infectious particles of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-33)
- 13) Sugimoto S, Suda Y, Kurosu T, Yoshikawa T, Oba M, Omatsu T, Horimoto T, Mizutani T, Saijo M, Shimojima M. Characterization of Soft tick bunyavirus isolated from ticks in Japan. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 31, 2019, Tokyo (O3-3-05)
- 14) Suzuki T, Sato Y, Sano K, Arashiro T, Katano H, Nakajima N, Takahashi K, Kataoka M, Wada Y, Morikawa S, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Saijo M, Hasegawa H. B cells with immunophenotypic resemblance to plasmablasts are main viral targets in human lethal SFTSV infection. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 31, 2019, Tokyo (O3-3-07)
- 15) Park E, Shimojima M, Yoshikawa T, Nagata N, Iwata N, Suzuki T, Ainai A, Watanabe S, Kurosu T, Ami Y, Noguchi A, Wada Y, Imaoka K, Saijo M, Hasegawa H, Maeda K, Morikawa S. Development of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) vaccine for cats. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 31, 2019, Tokyo (O3-3-08)
- 16) 下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの最新の知見. 第71回日本衛生動物学会大会 市民公開講座「マダニが運ぶ感染症から身を守れ！」. 平成31年4月21日, 山口 (山口大学大学会館大ホール)
- 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: ザイールエボラウイルスの力価測定

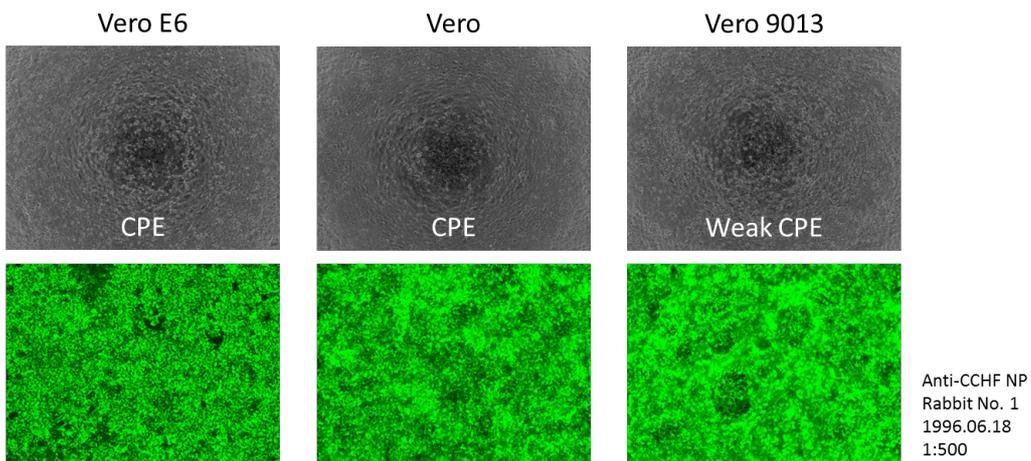
ZEBOV-Yambuku P1 titration



TCID ₅₀ /mL (log ₁₀)	Vero E6	Vero	Vero9013
CPE-based	ND	5.5-7	5.75-7.5
IFA-based	7.5	8	8

図2: クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの力価測定

CCHFV-Bagdad12 P1 titration



TCID ₅₀ /mL (log ₁₀)	Vero E6	Vero	Vero9013
CPE-based	5.5	5.25	4.75-6.5
IFA-based	5.5	5.5	5