

地球規模課題対応国際科学技術協力

(感染症研究分野「開発途上国のニーズを踏まえた感染症対策研究」)

「アフリカにおけるウイルス性人獣共通感染症の調査研究」

(相手国: ザンビア)

平成25年度実施報告書

代表者: 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

<平成24年度採択>

1. プロジェクト全体の実施概要

ザンビアで野生動物、家畜およびヒトの検体を収集し、保有ウイルスを調査することによって、自然宿主、宿主域および伝播経路を解明する。また、野生動物が保有する未知のウイルスを探索し、病原体としてのリスクを評価する。さらに、ウイルス性人獣共通感染症の診断法開発および疫学調査をザンビア大学の研究者と共同で実施することによって、ザンビアにおける本分野の研究・教育体制を整備するとともに人材を育成する。

本年度は、専門家の派遣を開始し、ザンビア大学獣医学部への設置とウイルス実験室のセットアップを実施するとともに、University Teaching Hospital と Central Veterinary Research Institute を訪問し、共同研究の推進について合意した。研究面では、昨年度に作出したエボラザイールウイルスの核蛋白質 NP に対するモノクローナル抗体を用いて、NP のエピトープマッピングを行い、全てのエボラウイルスに共通するエピトープを認識する抗体を複数得た。また、近年新しく遺伝子のみが発見された新種のフィロウイルス(LLOV)の表面糖蛋白質 GP の機能解析のためのシュードタイプウイルスシステムを確立するとともに、LLOV の表面糖蛋白質 GP を抗原として用いた ELISA を用いた試験を開始した。さらに、ザンビア大学、ザンビア野生動物局およびザンビア農業省の協力によって、食果コウモリ、げっ歯類、野生水禽、ブタおよびマダニ等からサンプルを採取し、バイオリソースとして保存した。また、これらのサンプルを用いてウイルスおよびウイルス特異抗体の検出に着手した。

今後、野生動物および家畜からの採材を継続するとともに、様々なウイルスの遺伝子の検出、ウイルス分離および特異抗体の検出を進めるとともに、これまでに作出した抗体および組み換え蛋白質を診断法開発に応用する。また、開発・改良した方法を用いて、動物およびヒトの疫学調査を実施する。

2. 研究グループ別の実施内容

研究項目1: 診断・治療法の開発

① 研究のねらい

ウイルス抗原およびウイルス特異抗体を高感度で迅速に検出する手法を開発・改良する。

② 研究実施方法

1) 組み換えウイルス蛋白質を発現・精製し、抗体作成のための免疫原として利用するとともに、ウイルス特異抗体検出のための ELISA 法等に供する。また、培養が困難なウイルスに関して、シュードタイプウイルスを活用する。

2) ウイルス蛋白質に対する抗血清およびマウスモノクローナル抗体を作出し、特異性を基にイムノクロマト法、免疫組織染色法およびサンドイッチ ELISA 法等の抗原検出診断法に供する。

3) モノクローナル抗体の診断・予防・治療薬への応用を検討する。

4) コンピュータ解析によって、ウイルス遺伝子上の特異的配列および共通配列を探索する。

5) 遺伝子配列解析に基づき新規プライマーセットをデザインし、RT-PCR 法および LAMP 法などを確立する。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

昨年度に作出したエボラザイールウイルスの核蛋白質 NP に対するモノクローナル抗体を用いて、NP のエピトープマッピングを行い、全てのエボラウイルスに共通するエピトープを認識する抗体を複数得た。また、近年新しく遺伝子のみが発見された新種のフィロウイルス(LLOV)の表面糖蛋白質 GP の機能解析のためのシュードタイプウイルスシステムを確立するとともに、LLOV の表面糖蛋白質 GP を抗原

として用いた ELISA を用いた試験を開始した。当初の計画(全体計画)に対して、概ね順調に進んでいる。

- ④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)
モノクローナル抗体作出をザンビア大学のスタッフと一緒に実施することによって、日本で抗体作出技術を学ばせた。
- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)
特になし

研究項目2:自然宿主および伝播経路の解明

① 研究のねらい

ザンビアを取り囲む国々で毎年のように発生しているエボラおよびマールブルグ出血熱、ザンビア国内で2008年に発生した新種のアレナウイルスによる出血熱、もしウイルスが侵入した場合にはザンビアの養鶏業界に深刻な打撃を与えるであろう鳥インフルエンザ等について、野生動物・家畜・家禽等が保有するウイルスのサーベイランスをザンビア大学獣医学部との共同研究として実施する

② 研究実施方法

- 1) ザンビア国内で野生動物(コウモリ、げっ歯類、霊長類、水禽類等)および家畜等から血液、臓器および糞便等を採取する。
- 2) 既存の手法および研究項目1で開発する新規手法を用いて、採取した臓器および血清サンプルからウイルス遺伝子およびウイルス特異抗体の検出を試みる。
- 3) 必要に応じてウイルス分離を試みる。レベル 4 病原体であることが疑われる場合、米国 NIH の BSL-4 施設を使用して実験を継続する。
- 4) ザンビア国外への持ち出し可能なサンプルについて、マイクロアレイ法あるいは次世代シーケンサー等を活用し、未知の病原体遺伝子を探索する。
- 5) 感染性ウイルスまたはウイルス遺伝子が検出された場合には、塩基配列を決定し、進化系統解析を行う。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

ザンビア大学、ザンビア野生動物局およびザンビア農業省の協力によって、食果コウモリ、げっ歯類、ブタおよびマダニ等からサンプルを採取し、バイオリソースとして保存した。また、これらのサンプルを用いてウイルスおよびウイルス特異抗体の検出に着手した。さらに、ザンビアに飛来する野生水禽の糞便サンプルから、H3、H6 および H11 亜型のインフルエンザウイルスを分離し、ライブラリーに追加した。未知のウイルスに関して、ザンビア国外への持ち出し可能なサンプルについて、次世代シーケンサー等を活用し、未知の病原体遺伝子を探索する体制を整えた。

- ④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)
これまでに、インフルエンザウイルスの分離・同定技術を移転し、鳥インフルエンザのサーベイランスを共同で行っている。国内で発生している H1N1 インフルエンザ(ヒト)への対応について、University Teaching Hospital (UTH) と共同で遺伝子解析を行い技術情報を交換した。さらに、ザンビア国内で発生したアフリカ豚コレラの診断をザンビア大学および Central Veterinary Research Institute (CVRI) のスタッフと共同で実施し、本病の PCR による診断法の技術移転に着手した。
- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)

特になし

研究項目3: 宿主域および病原性決定因子の探索

① 研究のねらい

分離されたウイルスの病原性および宿主域を決定する因子を推定し、リスクを評価する。

② 研究実施方法

1) 感染性ウイルスが分離された場合、様々な培養細胞および動物に接種し、増殖性および病原性を解析する。レベル 4 病原体の場合、米国 NIH の BSL-4 施設を使用して実験を行う。

2) ウイルス遺伝子をクローニングし全塩基配列を解析するとともに、病原性発現および宿主域を決定する因子を分子レベルで探索する。

3) サーベイランスを継続すると共に、得られた成績をもとに病原体としてのリスクを評価する。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

近年見つかった新種のフィロウイルス(LLOV)をモデルとして、シュードタイプウイルスシステムを用いて、宿主域および病原性の推定を試みるなど、新たに病原体が見つかった際に必要な実験系の確立が順調に進んでいる。

④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

今後分離されるウイルスの増殖性および病原性を解析するための、動物飼育アイソレーターのザンビア大学への導入を決定した。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)

特になし

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

① 本年度発表総数(国内 0 件、国際 9 件 [うち“in press”3 件])

② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、国際 9 件)

③ 論文詳細情報

1. Maruyama J, Miyamoto H, Kajihara M, Ogawa H, Maeda K, Sakoda Y, Yoshida R, Takada A. Characterization of the envelope glycoprotein of a novel filovirus, lloviu virus. *J Virol*. 2014 Jan;88(1):99-109.
2. Noyori O, Matsuno K, Kajihara M, Nakayama E, Igarashi M, Kuroda M, Isoda N, Yoshida R, Takada A. Differential potential for envelope glycoprotein-mediated steric shielding of host cell surface proteins among filoviruses. *Virology*. 2013 Nov;446(1-2):152-61.
3. Noyori O, Nakayama E, Maruyama J, Yoshida R, Takada A. Suppression of Fas-mediated apoptosis via steric shielding by filovirus glycoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Nov 29;441(4):994-8.
4. Changula K, Yoshida R, Noyori O, Marzi A, Miyamoto H, Ishijima M, Yokoyama A, Kajihara M, Feldmann H, Mweene AS, Takada A. Mapping of conserved and species-specific antibody epitopes on the Ebola virus nucleoprotein. *Virus Res*. 2013 Sep;176(1-2):83-90.
5. Hoenen T, Groseth A, Callison J, Takada A, Feldmann H. A novel Ebola virus expressing luciferase allows

for rapid and quantitative testing of antivirals. Antiviral Res. 2013 Sep;99(3):207-13.

6. Kuhn JH, Bao Y, Bavari S, Becker S, Bradfute S, Brister JR, Bukreyev AA, Cai Y, Chandran K, Davey RA, Dolnik O, Dye JM, Enterlein S, Gonzalez JP, Formenty P, Freiberg AN, Hensley LE, Honko AN, Ignatyev GM, Jahrling PB, Johnson KM, Klenk HD, Kobinger G, Lackemeyer MG, Leroy EM, Lever MS, Lofts LL, Mühlberger E, Netesov SV, Olinger GG, Palacios G, Patterson JL, Paweska JT, Pitt L, Radoshitzky SR, Ryabchikova EI, Sapphire EO, Shestopalov AM, Smither SJ, Sullivan NJ, Swanepoel R, Takada A, Towner JS, van der Groen G, Volchkov VE, Wahl-Jensen V, Warren TK, Warfield KL, Weidmann M, Nichol ST. Virus nomenclature below the species level: a standardized nomenclature for laboratory animal-adapted strains and variants of viruses assigned to the family Filoviridae. Arch Virol. 2013 Jun;158(6):1425-32.
7. Bukreyev AA, Chandran K, Dolnik O, Dye JM, Ebihara H, Leroy EM, Mühlberger E, Netesov SV, Patterson JL, Paweska JT, Sapphire EO, Smither SJ, Takada A, Towner JS, Volchkov VE, Warren TK, Kuhn JH. Discussions and decisions of the 2012-2014 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Filoviridae Study Group, January 2012-June 2013. Arch Virol. (in press).
8. Muleya W, Sasaki M, Orba Y, Ishii A, Thomas Y, Nakagawa E, Ogawa H, Hang'ombe B, Namangala B, Mweene A, Takada A, Kimura T, Sawa H. Molecular Epidemiology of Paramyxoviruses in Frugivorous Eidolon helvum Bats in Zambia. J Vet Med Sci. (in press).
9. Kuhn JH, Bao 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, Sapphire 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. (in press).

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳 (国内 0 件、国際 0 件、特許出願した発明数 0 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数 (国内 0 件、国際 0 件)

4. プロジェクト実施体制

(1) 「北海道大学」グループ (アフリカにおけるウイルス性人獣共通感染症の調査研究)

- ① 研究者グループリーダー名: 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)
- ② 研究項目
 - 1: 診断・治療法の開発
 - 2: 自然宿主および伝播経路の解明
 - 3: 宿主域および病原性決定因子の探索

以上