

令和 3 年 8 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08091

研究課題名(和文) レストンエボラウイルス感染実態の解明を目指した新たな基盤技術の創出

研究課題名(英文) Development of fundamental technologies for elucidation of the nature of Reston ebolavirus infection

研究代表者

福士 秀悦 (Fukushi, Shuetsu)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長

研究者番号：80373398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：サルにおけるレストンエボラウイルス(REBOV)感染実態を解明するための基盤技術の確立を目的として、フィリピンのREBOV感染サルにおけるウイルス遺伝子解析を行い、REBOV特異的な遺伝子領域を標的としたプライマー・プローブの設計をした。これを用いたリアルタイムPCR法を開発し、その有用性をフィリピンのREBOV感染サル組織から抽出したRNAを用いて検証した。REBOVのNPに特異的なモノクローナル抗体を用いた競合ELISAによる、血清抗体検出法を確立した。さらに、GPに対するモノクローナルを作製するための、GP発現系の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により開発される抗体および遺伝子検出法は、現在、サル検疫施設において行われている検査に加え、レストンエボラウイルス感染の確定診断法として適用できる可能性があり、公衆衛生対策への技術的貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research project is to develop fundamental technologies for elucidation of the nature of Reston ebolavirus (REBOV) infection. I analyzed genome sequences of REBOV detected from cynomolgus monkeys in the Philippines and designed novel primer/probes for a real-time PCR method to detect REBOV infection. This method is evaluated using RNA samples obtained from REBOV infected monkeys. For a serological testing, I developed competitive ELISA for detecting serum anti-REBOV antibody using REBOV-NP specific monoclonal antibody. In addition, the REBOV-GP expression system was established. It might be a useful material for developing anti-GP monoclonal antibodies.

研究分野：ウイルス学

キーワード：レストンエボラウイルス 抗体検出 遺伝子検出

## 1. 研究開始当初の背景

レストンエボラウイルス(REBOV)はカニクイザルに重症の出血熱症状を起こすエボラウイルスである。1996年までにフィリピンの飼育施設および、フィリピンから米国、イタリアに輸出されたカニクイザルで複数回集団発生し、2008年にはフィリピンの2箇所の養豚場のブタでも集団発生している。コウモリなど野外動物の調査によると、フィリピンで複数種のおオコウモリがREBOVに対する抗体を保有することが明らかになっている。

2015年、フィリピンのカニクイザル飼育施設REBOV感染が発生した。サルにおける流行は19年ぶりである。約1ヶ月の間に12頭死亡し、うち4頭の剖検組織サンプルからREBOVが検出された。しかし、過去のREBOVの流行と同様、どこからウイルスが侵入したかは不明であり、サル飼育施設におけるREBOV流行の全容は明らかになっていない。

REBOV抗体保有調査は主に組換えウイルス蛋白質を抗原としたELISA等により行われている。最近、抗原的に類似した未知のエボラウイルスの存在が示唆されていることから、これまで調査研究されてきた抗体反応がREBOVそのものに対するものなのか正確に判断できない可能性がある。

サル飼育施設で急激な死亡数の増加あるいは、異常な病態が観察された場合、剖検組織サンプルからのウイルス遺伝子検出が行われる。しかし、死亡個体が少なく、重篤な症状を示す個体がない場合、平常時の自然死と区別がつきにくい。2015年の流行ではREBOVに感染している無症候感染サルが多数存在したことが、その後の抗体検査で明らかになった。平常時でも輸出前検査で一部のサルを対象に抗体検査が行われることがあるが、抗体検査では遅きに失する可能性がある。このため、無症候感染サルを早期に発見するためのウイルス遺伝子検出法の整備も必要である。

## 2. 研究の目的

サルにおけるREBOV感染症はフィリピンを中心に今後も散発的に発生する可能性があることから、REBOVの特異的抗体スクリーニング法および、ウイルス遺伝子検出によるREBOV検知システムを確立することは取り組むべき重要な研究課題である。本研究ではREBOV感染実態を解明するための新たな基盤技術を確立することを目的とし、REBOV特異的MAbの作製と、これを用いたREBOV特異的抗体スクリーニング法、リアルタイムPCRによるウイルス遺伝子検出法の開発を行う。

## 3. 研究の方法

### 1) リアルタイム PCR

REBOVの遺伝子配列情報を収集し、高度に保存された領域にプライマー、プローブを設計した。感染サルのリンパ節組織からRNAを抽出し、リアルタイムPCRに用いた。

### 2) REBOVに対するモノクローナル抗体

すでに感染研ウイルス第一部で作製されたREBOVのNPに対するモノクローナル抗体Res2-1D8 (Ikegami et al, Clin. Diagn. Lab. Immun. 2003) を精製した。ビオチンラベリングキット (Dojindo社) を用いてビオチン化モノクローナル抗体Res2-1D8を作製した。

### 3) 競合 ELISA

被験血清サンプルとビオチン化モノクローナル抗体Res2-1D8を混合し、37 1時間インキュ

ベート後、大腸菌で発現、精製した REBOV-NP (Ikegami et al, Epidemiol. Infect. 2003) を抗原とした競合 ELISA (Fukushi, Methods Mol. Biol. 2020) に用いた。

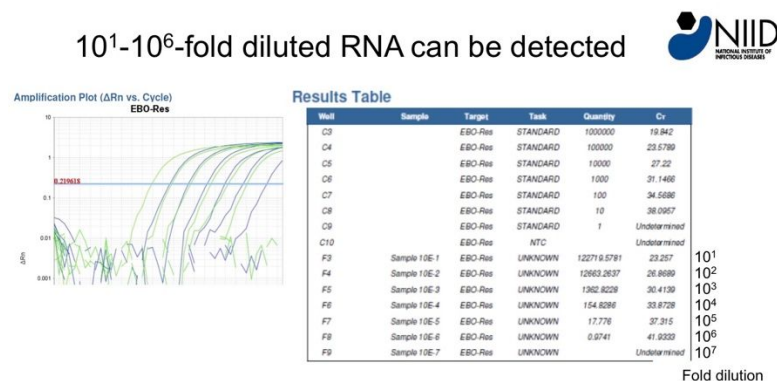
4) REBOV 特異的抗体を得るため、293T 細胞で発現精製した REBOV の GP を抗原として用い、マウスに免疫した。

5) ワクシニアウイルス Lc16m8 ベクターをベースに GP を組み込み、GP 発現ワクシニアウイルス m8-REBOV-GP を作製した。

#### 4. 研究成果

##### 1) ウイルス遺伝子解析及びリアルタイム PCR 法の構築

2015年フィリピンで流行したREBOVについて、感染サルのリンパ節組織からRNAを抽出し、RT-PCRにより遺伝子増幅し、塩基配列を決定した。また、共同研究者のDr Ina Smith (CSIRO)によって感染サルのリンパ節組織からREBOVが分離され、ゲノム全長が解析決定された。遺伝子系統解析から、2015年にフィリピンのサル管理施設で流行したREBOVは2008年にフィリピンのプタ間で流行したREBOVに近縁であることを明らかになった (Demet et al, EID 2018)。REBOVの遺伝子情報を収集し、高度に保存された領域にプライマー、プローブを設計し、REBOV特異的リアルタイムPCRを構築した。フィリピンの感染サル組織から抽出したRNAを用いて検討したところ、リアルタイムPCR法により従来のRT-PCRと同様、高感度にREBOV遺伝子を検出できることが示された (図1)。



with the same sensitivity as conv PCR using ResNP1/2

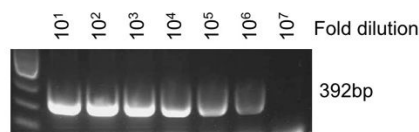


図1. リアルタイム PCR による REBOV 検出。REBOV 感染サルリンパ節組織から抽出した RNA を 10 段階希釈し、リアルタイム PCR 及びコンベンショナル RT-PCR に用いた。

##### 2) モノクローナル抗体を用いた競合 ELISA による抗 REBOV 抗体検出

被験血清サンプルとビオチン化モノクローナル抗体 Res2-1D8 を混合し、組換え REBOV NP を抗原とした競合 ELISA に用いた。被験血清として REBOV、リフトバレー熱ウイルス (RVFV)、ラッサウイルス (LASV)、ザイール型エボラウイルス (ZEBOV) の組換え NP タンパク質あるいは、中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV) の S タンパク質を免疫したウサギ血清、ZEBOV の組換え NP を免疫したサル血清および、サル陰性コントロール血清を用いた。REBOV の NP を免疫したウサギ血清はビオチン化モノクローナル抗体 Res2-1D8 が組換え REBOV に ELISA plate 上で結合するのを濃度依存的に阻害した (図2)。一方、RVFV、LASV、ZEBOV の組換え NP および MERS-CoV の S タンパク質を免疫したウサギ血清を加えても阻害しなかつ

た。さらに ZEBOV の NP およびサル陰性コントロール血清も同様、Res2-1D8 の結合を阻害しなかった ( 図 2 )。これらの結果から、モノクローナル抗体 Res2-1D8 を用いた競合 ELISA により、REBOV の NP に対する抗体を検出可能であることが示された。

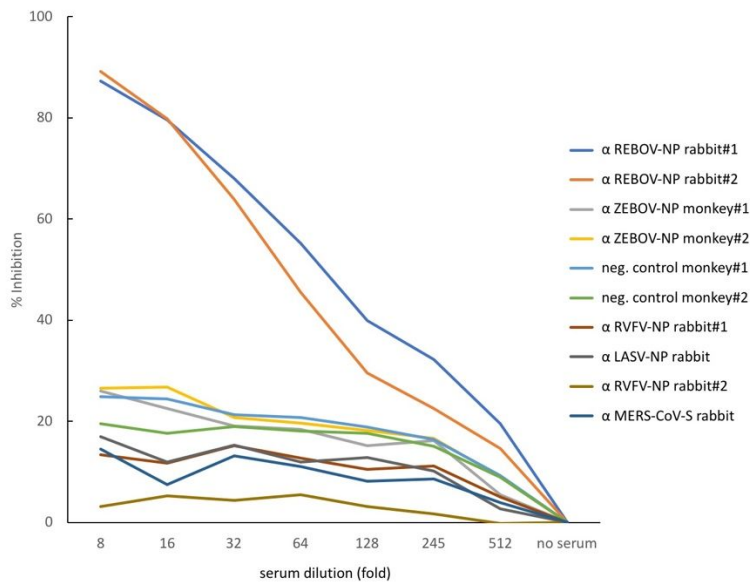


図 2. モノクローナル抗体 Res2-1D8 を用いた競合 ELISA による抗 REBOV 抗体の検出。

3) NP はエボラウイルス種間で高度に保存されているタンパク質であり、抗 NP 抗体を標的とした検出では交差反応により、REBOV 以外の異なるエボラウイルス種の抗体を検出する可能性は否定できない。より特異性の高い、抗 GP 抗体を標的とした検出系を開発するため、293T 細胞で発現精製した REBOV の GP ( 図 3 ) を抗原として使い、マウスに免疫した。

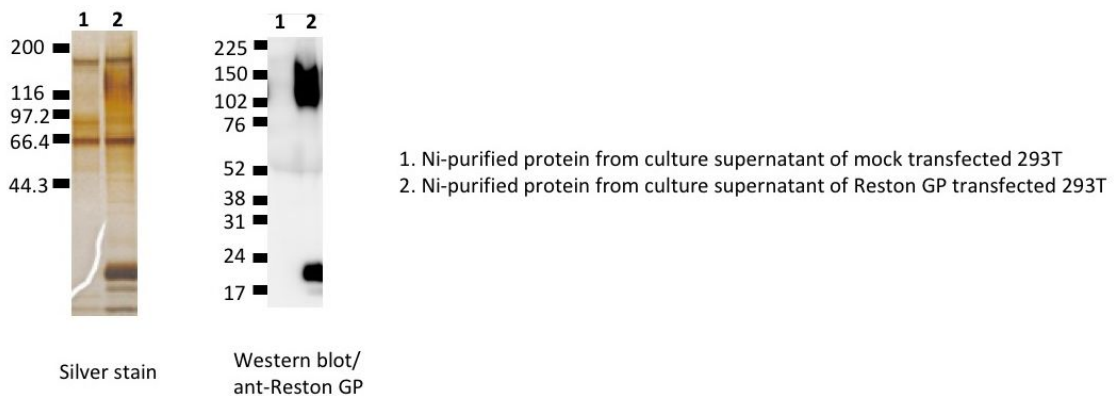


図 3. 組換え REBOV-GP の発現と精製。REBOV-GP を発現する plasmid を 293T 細胞にトランスフェクトし、培養上清から GP を精製した。

この GP をマウスに免疫し、ハイブリドーマを作製したが REBOV-GP に対するモノクローナル抗体を得ることができなかった ( データを示さず )。そこで、GP の発現系を変更することとし、ワクシニアウイルス Lc16m8 ベクターをベースに GP 遺伝子を組み込み、GP 発現ワクシニアウイルス m8-REBOV-GP を作製した。組換えワクシニアウイルスを感染させた RK13 細胞中に GP 発現が確認された ( 図 4 )。この組換えワクシニアウイルスは、抗 GP モノクローナル抗体を得るための免疫原として使用可能と考えられた。

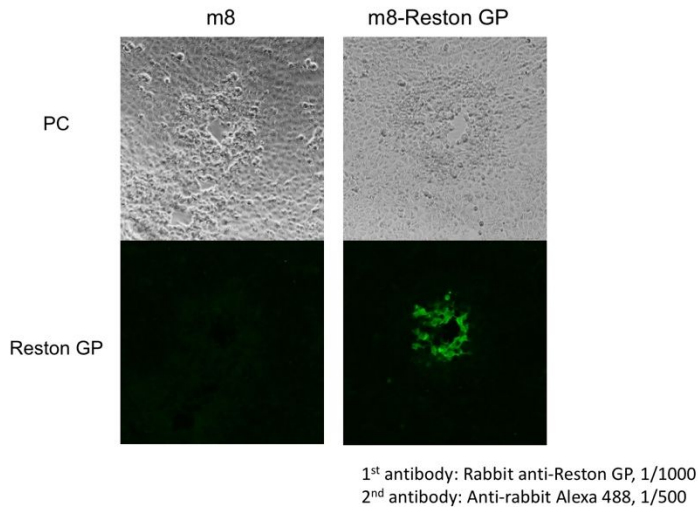


図4. 組換えワクシニアウイルスによる REBOV-GP の発現。REBOV-GP を組み込んだ組換えワクシニアウイルスを RK13 細胞に感染させ、蛍光抗体法で細胞中の GP を検出した。

#### 4) 結論

REBOV リアルタイム PCR および REBOV-NP に対するモノクローナル抗体を用いた競合 ELISA による抗体検出法を開発した。これらの基盤技術はレストンエボラウイルスの感染実態を解明するための有用なツールとなりうる。2020 年度は新型コロナウイルス流行に伴う海外渡航の制限のため、本研究で開発した手法のフィリピンのサル検体を用いた検討はできなかった。また、更に抗体検出の特異性を高めるため、GP を標的としたモノクローナル抗体の作製及び、これを用いた競合 ELISA 法を確立することが今後の課題である。

#### 5) 謝辞

本研究は Dr. Catalino Demetria (フィリピン熱帯医学研究所)、Dr Ina L. Smith (オーストラリア CSIRO)との共同研究で行われた。また、本研究を実施するに当たり、多大な協力を賜りました国立感染症ウイルス第一部スタッフの皆様に深謝する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Demetria C, Smith I, Tan T, Villarico D, Simon EM, Centeno R, Tachedjian M, Taniguchi S, Shimojima M, Miranda NLJ, Miranda ME, Rondina MMR, Capistrano R, Tandoc A 3rd, Marsh G, Eagles D, Cruz R, Fukushi S.	4. 巻 24
2. 論文標題 Re-emergence of Reston ebolavirus in Cynomolgus Monkeys, the Philippines, 2015.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Emerg Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 1285-1291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3201/eid2407.171234.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Shumpei Watanabe, Takeshi Kurosu, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo
2. 発表標題 Re-emergence of Reston Ebola Virus in Cynomolgus Monkeys in the Philippines, 2015
3. 学会等名 第66回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストラリア	CSIRO			
フィリピン	RITM			