

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 地球規模保健課題解決推進のための研究事業 日米医学協力計画  
(英語) Research Program on the Challenges of Global Health Issues: U. S. -Japan  
Cooperative Medical Sciences Program

研究開発課題名： (日本語) 日米医学協力計画を基軸としたウイルス性疾患の感染制御に関する研究  
(英語) Research on the control of viral infections through U.S.-Japan  
Cooperative Medical Sciences Program

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人北海道大学大学院医学研究院微生物学免疫学分野  
病原微生物学教室 特任教授 有川二郎

所属 役職 氏名： (英語) Department of Microbiology, Graduate School of Medicine,  
Hokkaido University, Professor, Jiro Arikawa

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

以下、5名の米側カウンターパート研究者をAMED予算より我が国に招聘し、第64回日本ウイルス学会(平成28年10月札幌)において関連研究分野における特別講演を行った。米側カウンターパート研究者の氏名、所属と専門分野は以下のごとくである。Richard Kuhn, Purdue University, flavivirus maturation, Diane Griffin, John Hopkins University, measles virus immunity, Harry Greenberg, Stanford University, rotavirus immunity, Connie Schmaljohn, U.S. Army Medical Institute of Infectious Diseases, HFRS and VEE virus DNA vaccine, Raul Andino, University of California, Zika virus adaptation. また、同時に日本側ウイルス性疾患専門部会員の研究グループによっても学会において研究発表を行い、日米相互の情報交換と相互理解を行った。日本側ウイルス性疾患専門部会員の氏名、所属と専門分野は、以下のごとくである。有川二郎、北海道大学、SFTS と HFRS ウイルス、西園晃、大分大学、狂犬病、森田公一、長崎大学、デングウイルス、RVFV, ダニ媒介性ウイルス、森川茂、国立感染症研究所、ダニ媒介性ウイルス、SFTSV, RVFV。また、学会開催中に、日米合同ウイルス性疾患専門部会を開催し今後の活動や共同研究の可能性について、討議する場を持った。EID 国際会議においてウイルスが担当年でない年の活動として、我が国のウイルス学会に招聘して、相互研究発表や情報交換を行うことは、有効な活動と考えられた。

研究面では、研究開発代表者（北海道大学医学研究院病原微生物学教室、有川二郎）の研究グループと共に、ハンタウイルスの抗体測定法としてイムノクロマトグラフィーを作成し、スリランカをフィールドとした野外試験へ応用した。ハンタウイルス、ソウルウイルス、およびアンデスウイルスについて、VSV シュードタイプウイルス作成の基礎的条件を確立した。スリランカにおいて、ヒトとげっ歯類、トガリネズミ類のハンタウイルス疫学的調査をスリランカの共同研究者とともに進行中である。

大分大学医学部微生物学講座の西園晃教授のグループとともに、NanoLuc もしくは Gaussia Luciferase を発現する組換え狂犬病ウイルス野外株 1088 株 (1088/NLuc もしくは 1088/GLuc) をそれぞれ作出した。Favipiravir を用いた検討から、1088/NLuc は抗ウイルス薬のハイスループットスクリーニングに適用できることが確認された。また、1088 株の N 蛋白質の deletion mutant を用いた解析から、その C 末端 19 アミノ酸が封入体形成に重要であり、薬物標的の候補となりうる株間で保存された領域をその中で見出すことができた。

長崎大学熱帯医学研究所の森田公一教授のグループと共に、アルボウイルスについて研究し、チクングニア熱の後方視的な調査において、2006 年以前からミャンマー、スリランカ、インドネシア、フィリピン、ベトナムなど南アジア、東南アジアに広く分布していたことを明らかにした。またフィジーでは近縁のロスリーパーウイルスの感染が見られた。またデング熱における免疫応答について、戦時中に長崎でデング熱に感染した日本人男性に感染後 70 年をへてもデングウイルスに対する抗体が存在することが示された。さらにアジアにおけるデング熱の疫学調査ではほとんどの国で 4 つの血清型のウイルスが流行しているが、2013 年のミャンマーの大流行ではデング 1 型が優勢な流行であったことが分かり、分子疫学解析から 1 つの遺伝子型が全国に拡大したことが判明した。

札幌医科大学医学部衛生学講座の小林宣道教授のグループと共に、下痢症ウイルスに関して、バングラデシュでは G2P[4] ヒトロタウイルス (A 群) が主流型となっていることを明らかにした。また、同国で 2010、2013 年に得られた G2P[4] ロタウイルス 17 株の全遺伝子配列を系統解析したところ、全ての遺伝子分節にわたり類似した変異が経時的に起きていたことが判明した。バングラデシュで最近検出された B 群ロタウイルス 14 株の全遺伝子分節の解析では、殆どの遺伝子分節で遺伝学的多様性が確認され、インド、バングラデシュに分布する B 群ロタウイルスの間でリアソートメントが起きていることが示唆された。

国立感染症研究所獣医科学部の森川茂部長のグループと共に、SFTSV の GP および NP 発現プラスミドを作製した。これらの発現プラスミドを用いて、DNA ワクチンとしての有用性を検証する前に単独および両者を発現した場合のウイルス蛋白の発現や分布の解析を行っている。

Following 5 US members were invited to attend and speak on certain topics during the 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, which was held in Sapporo from 23 to 25 October 2016. They were funded by AMED. Richard Kuhn (Purdue University): flavivirus maturation, Diane Griffin (John Hopkins University): measles virus immunity, Harry Greenberg (Stanford University): rotavirus immunity, Connie Schmaljohn (U.S. Army Medical Institute of Infectious Diseases) :HFRS and VEE virus DNA vaccine, Raul Andino (University of California): Zika virus adaptation. Virus Disease Japanese Panel members and their co-workers made presentations in English at workshop sessions. Jiro Arikawa (Hokkaido University): SFTSV and

HFRS virus, Akira Nishizono (Oita University): rabies virus, Kouichi Morita (Nagasaki University): Dengue virus, RVFV, Tick virus, Shigeru Morikawa (NIID Japan): Tick borne virus, RVFV, SFTSV. Because both Japan and US members attended the presentations, it provided an effective occasion for mutual understanding of each other's research area. There were two meetings during this annual meeting. Therefore, the other meeting could be a possible alternative for a previously scheduled "USJCMSP Joint Working Conference on Viral Diseases" which was not held due to unavailability of NIAID fund. Through the meetings, we, the members exchanged information and discussed future collaboration. Application and possible theme for USJCMSP Collaborative awards were also discussed.

Research activities: Jiro Arikawa (Hokkaido University): Hantavirus: Hantavirus immunochromatographic serodiagnostic system was developed and its application trials in both human and rat sera in Sri Lanka were started. Pseudotyped VSV (pVSV) with recombinant hantavirus envelope protein of Hantaan virus, Seoul virus, and Andes virus for rapid serotyping were developed. Epidemiological studies of hantavirus among both human and small mammals in Sri Lanka, Central Province and Uva Province were started.

Akira Nishizono (Oita University): Rabies: Recombinant street rabies virus 1088 strains expressing NanoLuc or Gaussia luciferase (1088/NLuc or 1088/GLuc, respectively) was generated. By preliminary tests using favipiravir, it was found that 1088/NLuc is applicable to a high-throughput antiviral drug screening against rabies virus. Furthermore, by deletion mutant analysis, it was found that C-terminal 19 amino acid residues of the 1088 strain N protein are responsible for the formation of Negri bodies and also identified a highly conserved motif to be a target for an antiviral compound within the region.

Kouichi Morita (Nagasaki University): Arbovirus: The retrospective serological data suggest that chikungunya virus infection is widely spread in Myanmar, Sri Lanka, Indonesia, the Philippines and Vietnam in South Asia and Southeast Asia in and before 2006. Ross River virus is being maintained in a limited number of population in Fiji. We also, report that the existence of dengue-specific antibodies in the serum of a person after 70 years from infection and, DENV-2 played a role in this Nagasaki dengue epidemic (1942-1944). In addition, our epidemiological study in Asia provided that four serotypes of dengue virus circulated in 2013 dengue outbreak. Dengue-1 was the dominant serotype and has persisted mostly for more than one decade in Myanmar.

Nobumichi Kobayashi (Sapporo Medical University): Gastroenteric virus: Recently, G2P[4] has been a dominant genotype of human Rotavirus A in Bangladesh. Whole genomic analysis of 17 G2P[4] rotavirus strains in 2010 and 2013 in Bangladesh revealed that similar mutations in all the gene segments occurred chronologically. Whole genomic analysis of recent 14 human Rotavirus B strains in Bangladesh elucidated the presence of genetic diversity among most of gene segments, suggesting occurrence of reassortment events among Rotavirus B in India and Bangladesh.

Shigeru Morikawa (NIID Japan): SFTSV: Mammalian expression vector to express SFTSV GP and NP have been constructed. Expression and distribution of the recombinant proteins in the mammalian cells upon transfection of each construct or both constructs are analyzing.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 5件、国際誌 7件)

1. Shiokawa, K., Gamage, C. D., Koizumi, N., Sakoda, Y., Shimizu, K., Tsuda, Y., Yoshimatsu, K., and Arikawa, J. Evaluation of truncated LipL32 expressed by *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* for serodiagnosis of Leptospira infection in rodents. J Vet Med Sci. 2016, 78, 221-230.
2. Shimizu, K., Hamaguchi, S., Ngo, C. C., Li, T. C., Ando, S., Yoshimatsu, K., Yasuda, S. P., Koma, T., Isozumi, R., Tsuda, Y., Fujita, H., Pham, T. T., Le, M. Q., Dang, A. D., Nguyen, T. Q., Yoshida, L. M., Ariyoshi, K., and Arikawa, J. Serological evidence of infection with rodent-borne hepatitis E virus HEV-C1 or antigenically related virus in humans. J Vet Med Sci. 2016, 78, 1677-1681.
3. Ngwe Tun MM, Inoue S, Thant KZ, Talemaitoga N, Aryati A, Dimaano EM, Matias RR, Buerano CC, Natividad FF, Abeyewickreme W, Thuy NT, Mai LT, Hasebe F, Hayasaka D, Morita K. Retrospective seroepidemiological study of chikungunya infection in South Asia, Southeast Asia and the Pacific region. Epidemiol Infect. 2016, 144, 2268-2275.
4. Ngwe Tun MM, Muta Y, Inoue S, Morita K. Persistence of Neutralizing Antibody Against Dengue Virus 2 After 70 Years from Infection in Nagasaki. Biores. Open Access, 2016, 5, 188-191.
5. Ngwe Tun MM, Kyaw AK, Makki N, Muthugala R, Nabeshima T, Inoue S, Hayasaka D, Moi ML, Buerano CC, Thwe SM, Thant KZ, Morita K. Characterization of the 2013 dengue epidemic in Myanmar with dengue virus 1 as the dominant serotype. Infect Genet Evol. 2016, 43, 31-37.
6. Mya Myat Ngwe Tun, Rohitha V. Muthugala, Nguyen Thi Thu Thuy, Pham Hoai Linh Ly, Le Thi Hien Thu, Dang Thi Dinh, Nguyen Viet Hoang, Le Thi Quynh Mai, Meng Ling Moi, Corazon C. Buerano, Kouichi Morita, and Futoshi Hasebe. Dengue-associated acute encephalitis syndrome cases in Son La province, Vietnam in 2014. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2016, (DOI: 10.7883/yoken.JJID.2016.246).
7. Akira Yoshikawa, Takeshi Nabeshima, Shingo Inoue, Masanobu Agoh, and Kouichi Morita. Molecular and serological epidemiology of Japanese encephalitis virus (JEV) in a remote island of western Japan: an implication of JEV migration over the East China Sea. Trop Med Health. 2016, 44, 8, (doi: 10.1186/s41182-016-0010-0.)
8. Aida S, Nahar S, Paul SK, Hossain MA, Kabir MR, Sarkar SR, Ahmed S, Ghosh S, Urushibara N, Kawaguchiya M, Aung MS, Sumi A, Kobayashi N. Whole genomic analysis of G2P[4] human Rotaviruses in Mymensingh, north-central Bangladesh. Heliyon. 2016, 2, e00168
9. Aung MS, Nahar S, Aida S, Paul SK, Hossain MA, Ahmed S, Haque N, Ghosh S, Malik YS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Sumi A, Kobayashi N. Distribution of two distinct Rotavirus B (RVB) strains in the north-central Bangladesh and evidence for reassortment event among human RVB revealed by whole genomic analysis. Infect Genet Evol. 2017, 47,77-86.
10. Yoshimatsu, K., Arai, S., Shimizu, K., Tsuda, Y., Boldgiv, B., Boldbaatar, B., Sergelen, E., Ariunzaya, D., Enkhmandal, O., Tuvshintugs, S., Morikawa, S., and Arikawa, J. Antibody detection from Middendorff's vole (*Microtus middendorffii*) against Tula virus captured in Mongolia. Jpn J Vet Res. 2017, 65, 39-44.
11. Gamage, C. D., Yoshimatsu, K., Sarathkumara, Y. D., Kulendiran, T., Nanayakkara, N., and Arikawa, J. Serological evidence of hantavirus infection in Girandurukotte, an area endemic for chronic kidney disease of unknown aetiology (CKDu) in Sri Lanka. Int J Infect Dis. 2017, 57,77-78.

12. Obana, S., Shimizu, K., Yoshimatsu, K., Hasebe, F., Hotta, K., Isozumi, R., Nguyen, H. T., Le, M. Q., Yamashiro, T., Tsuda, Y., and Arikawa, J. Epizootiological study of rodent-borne hepatitis E virus HEV-C1 in small mammals in Hanoi, Vietnam. J Vet Med Sci. 2017, 79, 76-81.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ラット主要感染症モニタリング用イムノクロマト法の開発英語:Development of immunochromatographic test for diagnosis of major infections in laboratory rats, 口頭, 土佐紀子, 吉松組子, 石田智子, 林元展人, 塩川愛絵, 高倉彰, 有川二郎, 第 63 回日本実験動物学会総会 (川崎市), 2016/5/18, 国内.
2. Single and multiplex immunochromatographic test for diagnosis of major infections in laboratory rats, 口頭, Noriko Tosa, Kumiko Yoshimatsu, Tomoko Isida, Nobuhiro Hayashimoto, Kanae Shiokawa, Akira Takakura, Jiro Arikawa, 第 11 回日中国際ウイルス学会 (観音寺市), 2016/7/1, 国内.
3. 大阪市で捕獲したラットにおける人獣共通感染症の病原体の感染状況の調査, 口頭, 清水健太, 五十棲理恵, 高見一利, 木俣勲, 塩川愛絵, 吉松組子, 津田祥美, 西尾佐奈恵, 有川二郎, 第 159 回日本獣医学会学術集会 (藤沢市), 2016/9/6, 国内.
4. Hantavirus infection among rodent, shrew and human in Sri Lanka : スリランカのヒトとげっ歯類におけるハンタウイルス感染症に関する研究, 口頭, Kumiko Yoshimatsu, Chandika Gamage, Thiviya Kulendiran, Hasith Wickramasinghe, Yomani Sarathkumara, SAM Kularathne, Nishanatha Nanayakkara, Kanae Shiokawa, Kenta Shimizu, Yoshimi Tsuda, Jiro Arikawa, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 (札幌市), 2016/10/23, 国内.
5. Generation of a recombinant street rabies virus expressing red fluorescent protein E2-Crimson for in vivo imaging analysis, Poster session, Kentaro Yamada, Minoru Isomura, Kazuko, Noguchi, Akira Nishizono, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/24, 国内.
6. Isolation and characterization of two distinct phenotypes Dengue type-1 virus isolated from the same dengue patient, Vietnam 2013, 口頭, Bui Thu Thuy, Meng Ling Moi, Takeshi Nabeshima, Pham Hoai Linh Ly, Pham Thi Hang, Dang Thi Dinh, Nguyen Ngoc Linh, Nguyen Thi Thu Thuy, Le Thi Quynh Mai, Kouichi Morita, Futoshi Hasebe, 第 53 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2016/9/1, 国内.
7. Dengue associated acute encephalitis syndrome cases in Son La Province, Vietnam in 2014, ポスター, Myat Ngwe Tun, Rohitha Muthugala, Nguyen Thi Thu Thuy, Pham Hoai Linh Ly, Le Thi Hien Thu, Dang Thi Dinh, Nguyen Viet Hoang, Le Thi Quynh Mai, Meng Ling Moi, Corazon C. Buerano, Kouichi Morita, Futoshi Hasebe, 第 15 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2016/9/6, 国内.
8. ミャンマー国における 2015 年のデングウイルス感染症アウトブレイクの臨床学的・ウイルス学的・疫学的特徴, ポスター, Kyaw Aung Kyaw, Ngwe Tun Mya Myat, Moi Meng Ling, 鍋島武, Soe Kyaw Thu, Myint Aye Aye, 早坂大輔, Buerano Corazon C, Thant Kyaw Zin, 森田公一, 第 57 回日本熱帯医学会大会, 2016/11/5, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

身近に迫る感染症「デング熱・ジカ熱」, 森田公一, 長崎県環境保健研究センター合同シンポジウム, 2016/7/23, 国内.

1. デング熱, 森田公一, 第 12 回日本小児科医会生涯研修セミナー, 2016/10/10, 国内.

2. ウイルスって何？ どうして病気になるの？ 有川二郎, 第 64 回北日本ウイルス学会学術集会市民公開講座, 2016/10/22, 北海道大学クラーク会館, 札幌市, 国内.
3. 開発途上国のニーズを踏まえた感染症対策, 森田公一, 第 57 回日本熱帯医学会, シンポジウム, 2016/11/5, 国内.

(4) 特許出願