

1. LAMP 法に用いるプライマーの改良
SARS-CoV ゲノムの塩基配列番号 9000、14000、28000 近辺の領域でそれぞれプライマー設計を行い、増幅効率の良好なセットについて感度比較を行ったところ、現在開発済みセット以上の成績は得られなかった。

2. LAMP 法に用いる逆転写酵素の再スクリーニング

現行酵素と同等の反応性を有するものを 10 種類見出した。前年度分と合わせ 17 種類の酵素に関して、感度比較を行ったが特に感度が向上するものはなかった。しかし逆転写反応の阻害がみられたラクトフェリンとヘパリンを用いて阻害の影響を検討したところ、阻害の影響が小さいものが 1 種見つかった。

3. RNase inhibitor の効果

RNase を含むものとしてヒトの唾液を反応溶液に添加すると反応阻害がみられるが、さらに RNase inhibitor を加えると反応が回復することが判明した。このように反応溶液に RNase inhibitor を添加しておくことは RNase の影響抑制に有効であることがわかった。

D. 考察

1. LAMP 法に用いるプライマーの改良
残念ながら現行プライマーセットを超える感度を有するセットを見いだせなかった。プライマーの改良では改善は難しいものと思われる。

2. LAMP 法に用いる逆転写酵素の再スクリーニング

逆転写反応の阻害物質であるヘパリン、ラクトフェリンの影響が少ない酵素が 1

つであるが見つかった。この酵素は 2 つの酵素のブレンド品であったが、ブレンドの効果なのか、他の添加物の効果なのかは判明していない。今後本酵素を用いて RT-LAMP 反応の詳細な条件検討を行う予定である。

3. RNase inhibitor の効果

RNase inhibitor を添加することで、RNA を特に高感度に検出する場合に効果を発揮するものと期待できる。

E. 結論

1. 現在開発済みのプライマーセット以上の成績は得られなかった。2. 逆転写酵素のスクリーニングを行い、ヘパリン、ラクトフェリンの阻害の影響の小さな酵素を一つ見いだした。3. RNase inhibitor を添加しておくことは RNase の影響抑制に有効であることがわかった。プライマーセットの改良は未達成であったが、2, 3 の結果より、現在より高感度測定が可能になるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

1. LAMP法に用いるプライマーの改良

Primer	スクリーニング	感度試験		
		10 ⁴ copies	10 ² copies	10copies
現行	18K	○	○	○
	9K4	×	-	-
	9K49	×	-	-
	9K57	×	-	-
	9K79	×	-	-
	14K56	×	-	-
	14K325	×	-	-
改良	28K2	○	×	-
	28K5	○	△	-
	28K16	○	×	-
	28K30	×	-	-
	28K42	○	×	-
	28K55	○	×	-
	28K90	○	×	-
	28K110	○	△	-
	28K119	○	×	-

感度試験 判定時間45分

○: 検出率100%

△: 検出率50%以下

×: 非検出

-: 未検討

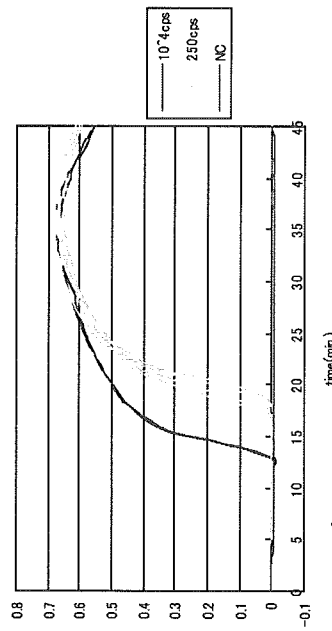
2. LAMP法に用いる逆転写酵素の再スクリーニング

逆転写酵素名	メーカー	酵素の由来	RNaseH 活性	阻害物質の影響	
				ヘパリン	ラクトフェリン
AMV Reverse Transcriptase	FINNZYMES	AMV	+	X	X
AMV Reverse Transcriptase	Invitrogen	AMV	+	X	X
Cloned AMV	Invitrogen	AMV	+	X	X
Omniscript	QIAGEN	?	?	X	X
Sensiscript	QIAGEN	?	?	X	X
ImProm-II™ Reverse Transcriptase	プロメガ	?	?	X	X
トランスクリプターリバーソトランスクリプターゼ	ロシユ	?	+	X	X
MultiScribe Reverse Transcriptase	ABI	M-MLV	?	X	X
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen	M-MLV	-	X	X
Reverse iT RTase Blend	日本エネテイクス	AMV+MMLV	+	○	○
ArrayScript™ RT	Ambion	M-MLV	?	X	X
Reflectase Reverse Transcriptase	Active Motif	AMV	+	X	X
AMV Reverse Transcriptase	Qbiogene, Inc.	AMV	+	X	X
EuroScript	ニッポンジーン	M-MLV	?	X	X
HIV Reverse Transcriptase, Recombinant	Worthington Biochemical Co.	HIV	?	X	X
HIV REVERSE TRANSCRIPTASE, RECOMB.	Calbiochem-NovabiochemCo.	HIV	?	X	X
Reverse Transcriptase, HIV	CHIMERx	HIV	?	X	X

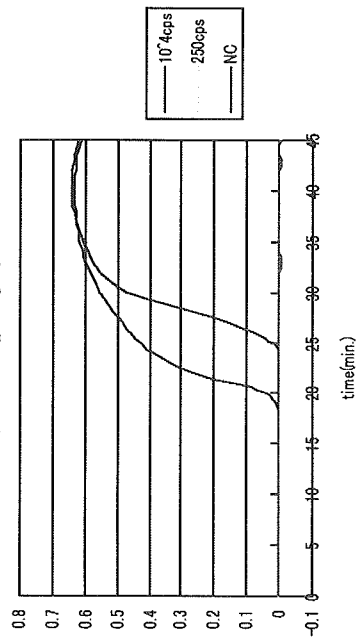
阻害物質の影響
○：反応阻害少ない
■：反応阻害あり

3. RNase inhibitorの効果

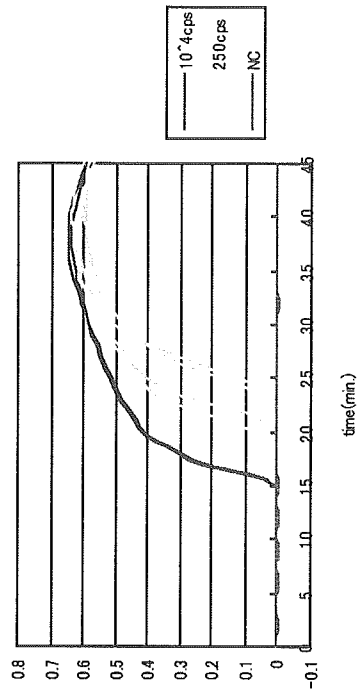
1) 唾液無し (Control)



2) 唾液あり



3) 唾液あり + RNase inhibitor



厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
分担研究報告書

7. 分担研究課題：SARS 鑑別診断法の開発

分担研究者：北村義浩 東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野助教授

研究要旨：SARS と鑑別すべき急性呼吸器感染症の起因微生物の迅速診断技術を開発することを目的とする。迅速な診断が可能になれば適切な公衆衛生的な対応を早期に執ることができる。核酸増幅法の一つである LAMP 法でインフルエンザ、マイコプラズマについて検出可能なプライマーセットを試行錯誤で作製した。これらの検出感度を相互比較して調べた。標的微生物の増幅する核酸領域と HIV のゲノムの一部とのキメラ RNA を試験管内で作製した。このキメラ核酸を HIV 検出プライマーセットと標的微生物プライマーセットで同じように増幅検出して、検出できなくなる限界希釈度を求めることによって感度を決定した。中でも A 型インフルエンザウイルス検出については極めて高い感度を達成できた。

A. 研究目的

SARS の確定診断には起因ウイルスである SARS コロナウイルス (SARS-CoV) の検出が欠かせない。一方、臨床上極めて似た像を呈するインフルエンザやマイコプラズマ肺炎と鑑別することも極めて重要である。そこで本研究では SARS と鑑別すべき急性呼吸器感染症の起因微生物の迅速診断技術を開発することを目的とする。本研究が目指す"迅速"鑑別診断は単なる"特異的"診断よりも意義がある。迅速な診断が可能になれば有効な封じ込め（公衆衛生的な対応）を執ることができるだろう。

B. 研究方法

核酸増幅法の一つである LAMP 法で微生物のゲノムの一部を増幅して検出する。1 カ所を増幅するためには 6 カ所の特異領域を設定し、4 種類のプライマーを設計する。現在、信頼性の高いプライマー

設計法は確立していないので、試行錯誤・実験的にプライマーセットをデザインするしか方法がない。

反応液にごく僅かの 2 本鎖検出蛍光色素 (SYBR green) を加えることによって増幅をリアルタイムに検出できる。一般的には標的核酸が十分量あれば (1 million copies per reaction) 10 分以内に検出できる。さまざまなプライマーを作製し、標的核酸を 30 分間以内に増幅できた場合に有効なプライマーと判定した。

SARS-CoV の鑑別診断対象として、インフルエンザ、マイコプラズマの病原体の検出をめざした。

(倫理面での配慮)

該当しない。動物を用いないし、かつ、ヒトを対象とする研究でもないから。

C. 研究結果

本年度は設計したプライマーの感度を相互に比較した。

感度を測定するためには、比較対象の基準となる核酸が必要であるので、p24 (HIV-1 由来)の断片を基準断片とした。基準 p24 断片と標的微生物の標的領域を連結させたキメラ核酸を試験管内で T7 RNA ポリメラーゼで合成し感度比較用核酸とした (図 1)。この核酸の 10 倍希釈系列を作製して検出されなくなる限界希釈度を求め感度の比較に使った (図 2)。

7つ作製した A 型インフルエンザウイルス検出用プライマーセットの内、3つは基準に用いた p24 プライマーセットよりも感度が悪かった。1つは、より高感度のプライマーセットであった。残り3つのセットは使用したウイルスの株によって高い場合と低い場合があった (図 3)。

2つ作製した B 型インフルエンザウイルス検出用プライマーセットの内、1つは基準に用いた p24 プライマーセットと同じ感度であった。残り1つは、より高感度のプライマーセットであった (図 3)。

3つ作製した SARS-CoV 検出用プライマーセットの内、1つは基準に用いた p24 プライマーセットよりも遙かに感度が低かった。もう1つも感度が低かった。残りの1つはより高感度のプライマーセットであった (図 3)。

D. 考察

感度の高いプライマーセットが各微生物について少なくとも1種類はデザインできた。RNA ウイルスは変異が豊富であ

るので、すべてのウイルスを検出できるかどうかは今度の課題の一つである。

E. 結論

感度の高い LAMP プライマーセットが SARS-CoV, インフルエンザウイルス (A 型、B 型)、マイコプラズマの各微生物について少なくとも1種類はデザインできた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 発表

(1)原著

1. Yan H, Chiba-Mizutani T, Nomura N, Takakura T, Kitamura Y, Miura H, Nishizawa M, Tatsumi M, Yamamoto N, & Sugiura W. A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 16, 363-373, 2005
2. Shiomi K, Matsui R, Isozaki M, Chiba H, Sugai T, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Chiba T, Yan H, Kitamura Y, Sugiura W, Omura S, Tanaka H. Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase. *J Antibiot.* 58, 65-68, 2005

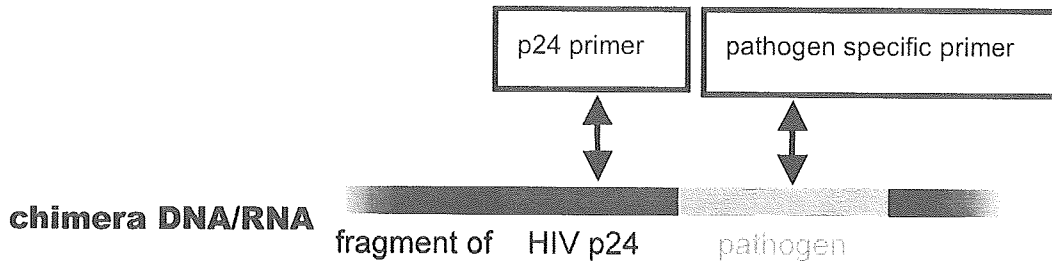


図1. HIV-1 p24遺伝子断片と標的微生物の標的領域を連結させたキメラ核酸
 当該キメラ核酸をT7 RNAポリメラーゼを用いて*in vitro*合成し、感度比較用核酸とした。
 これにより正確に2つのプライマーセットの感度比較ができる。

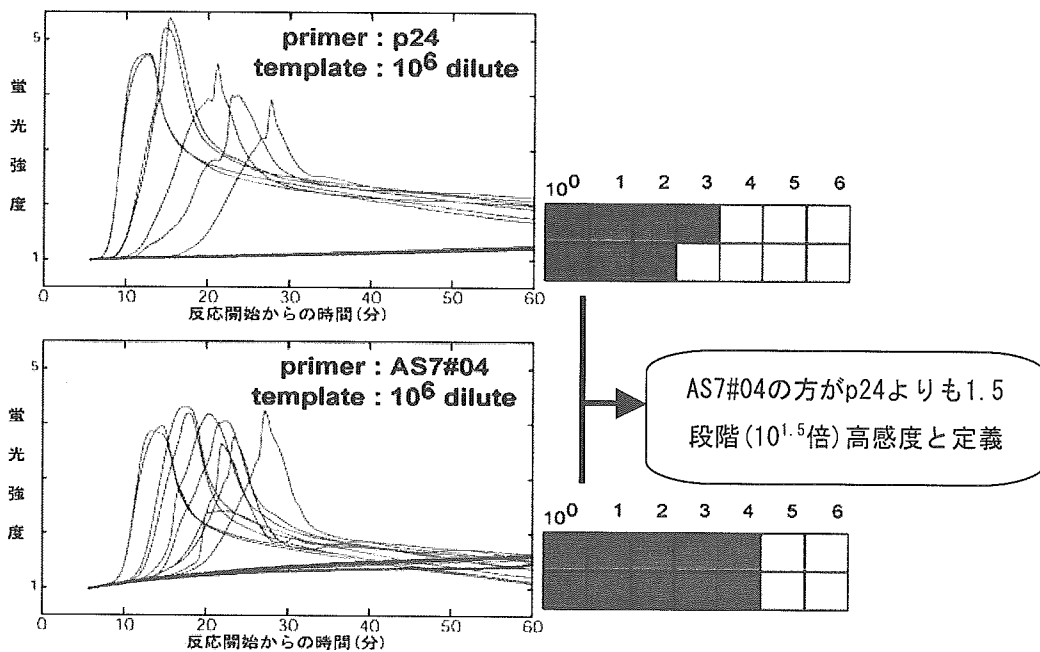


図2. LAMP法の感度比較法の例

鋳型に p24/Influenza キメラ RNA の 10 倍希釈系列を用いて HIV p24-LAMP と AS7#4-LAMP の検出感度を比較した。この場合、AS7#4-LAMP の感度が HIV p24-LAMP の 1.5 倍の感度とする。

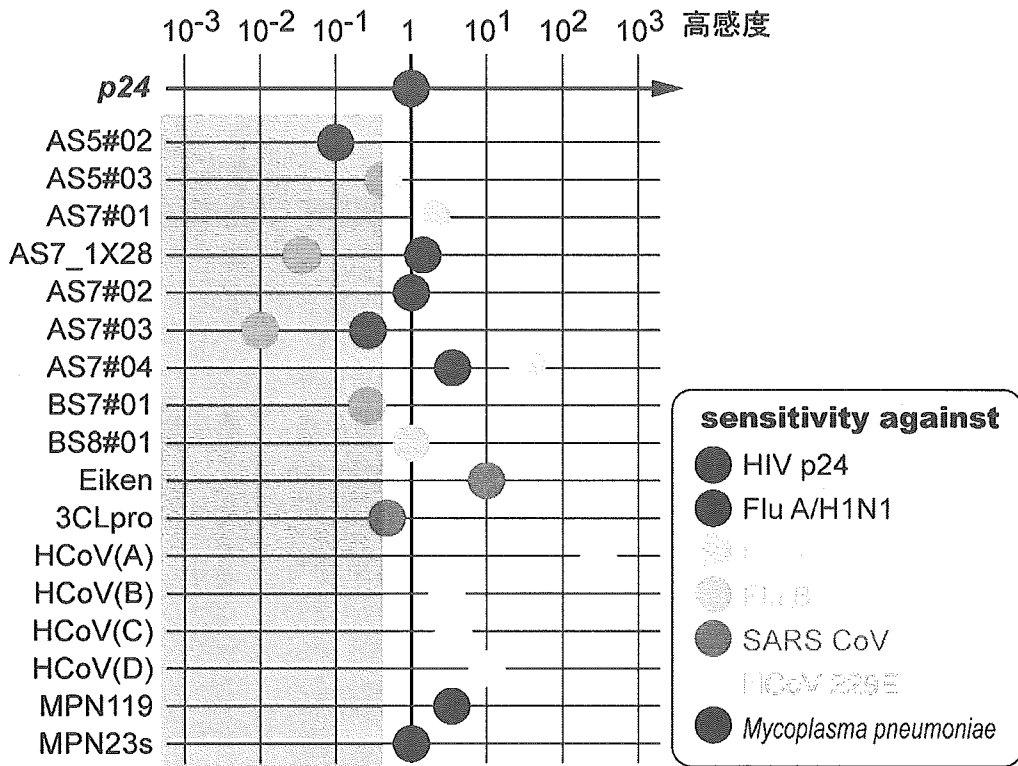


図3. LAMP法の感度比較

SARS-CoV は、栄研のプライマーセットが高感度であった。A 型インフルエンザウイルス検出用プライマーセット 7 種の内、AS7#04 が最も高感度であった。B 型インフルエンザウイルス検出用プライマーセットでは、BS8#01 の感度が高かった。ヒトコロナウイルス 229E の検出に関しては、HCoV(A)が非常に高感度であった。*Mycoplasma pneumoniae* の検出は、MPN119 が高感度であった。

SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究

8. 分担研究課題：改良 Representational difference analysis (RDA 法)を用いた SARS-CoV
の検出

分担研究者：森川茂（国立感染症研究所ウイルス第1部第1室長）

協力研究者：水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、倉根一郎（同、ウイルス第1部）

遠藤大二（酪農学園大学獣医学部放射線学教室）

研究要旨：SARS 等のこれまで未知の新興ウイルス感染症が発生した場合、通常ウイルスの分離、同定が行われた後に、近縁ウイルスの遺伝子情報に基づいた primer を設計して PCR 法を開発する。そのため、新興ウイルスの遺伝子情報を得るまでにかかなりの期間が必要となる。これまでにウイルス感染細胞から未知のウイルス遺伝子を同定する手段として、Representational difference analysis (RDA 法)が開発されているが、感染細胞由来のリボソーム RNA が標的遺伝子検出における非特異的反応の主原因となるため有効利用されていない。リボソーム RNA や種々の RNA ウイルスのゲノムにおける 6 塩基配列の出現頻度を比較すると、リボソーム RNA では出現頻度が低く、RNA ウィルスには出現する配列が存在した。本研究では、リボソーム RNA では出現頻度が極めて低い 6 塩基配列のうち、多くの RNA ウィルスゲノムに広く存在する配列 96 種類のプライマーを合成した。SARS-CoV 感染 Vero E6 細胞と非感染細胞から抽出した RNA を用いて、これらの混合プライマーにより RDA 法の逆転写反応を行った結果、最終的に RDA 法で得られた PCR 産物が SARS-CoV の遺伝子由来であることが明らかとなった。この改良 RDA 法 (Non-Ribo RDA) は、特定のウイルスを標的とした”specific primer”を用いることなく、感染細胞から SARS-CoV を検出できることから、SARS の様な新興ウイルス感染症発生時に極めて有用な遺伝子検出法であると考えられる。

A. 研究目的

現在、RNA ウィルスの検出・同定には、RT-PCR 法や LAMP 法が広く用いられている。RT-PCR 法や LAMP 法では、RNA ウィルスの遺伝子配列に特異的なプライマーを用いて部分遺伝子領域を増幅する。このため、これらの遺伝子増幅法では、標的

ウィルスの遺伝子配列情報が既知であることが前提となる。しかし、SARS-CoV のような新興ウィルスの出現時には、原因ウィルスが分離同定されるまでは、多種のウィルスを想定して検査方法を検討する必要がある。このような場合、単一種のウィルスをごとに一組のプライマーを設定する必要

があるため、PCR 法によってウイルスを特定するのは難しいことが予想される。そこで、検出すべき対象が広い場合や病原体が特定できない場合に対応して、感染組織に存在して非感染組織に存在しない遺伝子を検出する方法として Representational difference analysis (RDA)法が開発されている。RDA 法では、非感染細胞の RNA 由来 cDNA により感染細胞の RNA 由来 cDNA をサブトラクションする。しかし、細胞に大量に含まれるリボゾーム RNA (rRNA) により標的遺伝子の検出において非特異的反応が障害となるため、RDA 法が新興ウイルス感染症に用いられてはいない。そこで、本研究では rRNA 由来 cDNA の合成を抑制する方法を用いて、RDA 法の改良を試みた。さらに、本研究で改良した RDA 法が SARS-CoV にも適用できるかについての検討を行ない、新興ウイルス感染症に迅速に対応できる系を開発することを目的とした。

B. 研究方法

1) Non-Ribo RDA 用プライマーの設計

rRNA には結合し難く、ほとんどの RNA ウイルスのゲノムに結合可能な配列をもつプライマーは、協力研究者の酪農学園大学・遠藤大二博士により設計された。

2) Non-Ribo RDA 法

SARS-CoV 感染 Vero E6 細胞 (24 時間後) と非感染 Vero E6 細胞から RNA を抽出した後、1)で設計したプライマーを用いて逆転写後、*E.coli* DNA polymerase, *E.coli* DNA ligase 及び RNaseH を用いて二本鎖の cDNA を合成し、*DpnII* で消化した。末端に *Bam* HI リンカー (RBam24:5'-AGC

ACT CTC CAG CCT CTC ACC GAG-3' ; RBAM12: 5'-GAT CCT CGG TGA-3') を付加して 5'-overhanging 部位を fill-in した後、RBam24 primer で PCR を行った。PCR amplicon を *DpnII* で消化後に、SARS-CoV 感染細胞由来 amplicon 末端には、別の *Bam* HI リンカー (JBam24:5'-ACC GAC GTC GAC TAT CCA TGA ACG-3' ; JBAM12: 5'-GAT CCG TTC ATG-3') を付加して、リンカーを付加していない大過剰の非感染細胞由来 amplicon と混合後、denature / hybridization した。その後、JBam24 により PCR を行った (図 1)。

(倫理面での配慮: 本研究は、ヒト検体、動物実験、遺伝子組換え実験に該当しない。)

C. 結果

1) Non-Ribo RDA 用プライマーの設計

トータル RNA を材料として従来の RDA 法を実施した場合に、大量に存在する rRNA 由来の cDNA が逆転写反応後産物の大多数を占めることが知られている。結果として感染細胞に由来する cDNA の中で、ウイルス由来の cDNA の占める割合が低くなるので、RDA 法においてウイルスの cDNA を効率的に増幅することは困難になる。そこで、cDNA を合成する際に、rRNA の逆転写効率を低くしながら RNA ウイルスの逆転写効率を下げないようなプライマーを設計した。すなわち、rRNA と RNA ウイルスの双方について、遺伝子データベースに登録された塩基配列中に存在する 6 塩基配列の出現頻度を分類および集計した (図 2)。その結果、rRNA には低頻度にしか

存在しない 6 塩基のパターンが存在することおよび、rRNA での低頻度塩基配列パターンの出現頻度はサテライトやウイルスなど他の種類の配列では低くないことが示された。この結果に基づき、rRNA 配列中で出現頻度の最も低い 96 種の 6 塩基配列をウイルス検出のための RDA 法のためのプライマーとして使用することとした(表 1、Non-Ribo RDA 用プライマーセット)。

2) ランダムプライマーと Non-Ribo RDA 用プライマーの各種ウイルス中での存在確率の比較

Non-Ribo RDA 用プライマーに含まれる塩基配列のパターンの出現確率を各科のウイルスで算出した。GenBank, EMBL に登録されているウイルスの塩基配列情報から、各遺伝子情報に含まれる分類情報を元に、脊椎動物への感染が報告されている 22 科の塩基配列データ 1,791 件の配列情報を解析対象とした。Non-Ribo RDA 用プライマーの塩基配列パターン 96 種、ウシのサテライトに存在しない 6 塩基配列パターン 96 種類 (nonV00125) およびランダムに選択した 6 塩基配列パターン 96 種について、ウイルス科ごとの出現確率のメディアン、最小値および最大値を表 2 に示す。配列が完全にランダムな場合、6 塩基配列が取りえる 4,096 種のうち、96 種の出現確率は、理論的に $96/4,096=23.4 \times 10^{-3}$ となるが、実際のランダムヘキサマー96種についての出現確率は理論値に近似した。また、nonV00125 についても出現確率はランダムヘキサマーと同程度であった。一方、Non-Ribo RDA 用プライマーについては、ほとんどのウイルス科でランダムヘキサマ

ーと同様の出現確率のメディアンを示した。しかし、Adeno, Calici, Herpesviridae では、ウイルス種により rRNA ($0.28-7.22 \times 10^{-3}$) よりも低い出現確率のものがあった。ただ、全体としては、ウイルスにおける Non-Ribo RDA 用プライマーの出現頻度は rRNA よりもランダムヘキサマーに近い値を示しており、広範囲のウイルスに適用が可能であることが示唆された。

3) モデル RNA を用いた定量的解析

上記の Non-Ribo RDA 用プライマーを用いた RDA 法の有用性を検討するため、pCIneo プラスミドから T7 RNA ポリメラーゼにより合成した RNA を定量的にラット RNA と混合して cDNA を合成し、制限酵素 *DpnII* で切断後、アダプターを結合して RDA 法を行った。その結果、pCIneo から合成した RNA 由来 amplicon の増幅は、ランダムプライマーによる cDNA 合成では、合成 RNA/ラット RNA が 1/10 以下で、Non-Ribo RDA 用プライマーを用いた場合には、1/300 まで確認できた。すなわち、Non-Ribo RDA 用プライマーは、ランダムヘキサマーに比べてモデル RNA(非ラット RNA)増幅を 30 倍程度向上させることができた。

4) SARS-CoV への適用

Non-Ribo RDA 用プライマーによる RDA 法を用いて SARS-CoV 感染細胞の RNA から SARS-CoV の遺伝子断片が検出されるか否かを検討した。SARS-CoV を m.o.i.=2.0 で Vero E6 細胞に感染させ 24 時間後にトータル RNA を抽出した。コントロールとして非感染細胞からトータル

RNA を抽出して用いた。Non-Ribo RDA 用プライマーを用いて cDNA 合成後に RDA 法を行なって (図 1)、PCR 産物を得た (図 3)。これらの PCR 断片が SARS-CoV の遺伝子由来であることは、サザンブロットハイブリタイゼーションにより確認された。この結果から、今回報告した改良 RDA 法は SARS-CoV の検出にも有効であることが示された。

D. 考察

本研究では、従来の RDA 法で頻繁に見られる rRNA の大量混入が原因の非特異的な反応を新しいプライマーを設計することで克服できた。この改良 RDA 法により、特異的プライマーを用いずに SARS-CoV が検出できた。この方法は、SARS-CoV などの新興ウイルス感染症が発生した場合、ウイルスが特定されなくても培養細胞で分離されればその遺伝子を増幅する上で極めて有用であり、その塩基配列から分離ウイルスの同定が可能である。今後、ウイルス分離を必要としない RDA 法の改良が行われれば、より迅速に新興ウイルス感染症発生時の対応が可能になると考えられる。

E. 結論

rRNA での出現頻度の低い hexamer を用いて cDNA 合成を行う、改良 RDA 法により SARS-CoV の特異的プライマーを用いずに SARS-CoV 遺伝子を増幅することができた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizutani T, Fukushi S, Iizuka D, Inanami O, Kuwabara M, Takashima H, Yanagawa H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Inhibition of cell proliferation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006 Mar 1; 46(2):236-43.
2. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEBS Lett*. 2006 Feb 20; 580(5):1417-24. Epub 2006.
3. Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102 (35) :12543-7.
4. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Miyajima N, Taguchi F, Itamura S, Kurane I, Morikawa S. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Gen Virol*. 2005; 86: 2269-74.
5. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. JNK and PI3k/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1741 (1-2): 4-10.
6. Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane I. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe

- acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus. *Antiviral Res.* 2005; 66(2-3):159-63.
7. Ohnishi K, Sakaguchi M, Kaji T, Akagawa K, Taniyama T, Kasai M, Tsunetsugu-Yokota Y, Oshima M, Yamamoto K, Takasuka N, Hashimoto S, Ato M, Fujii H, Takahashi Y, Morikawa S, Ishii K, Sata T, Takagi H, Itamura S, Odagiri T, Miyamura T, Kurane I, Tashiro M, Kurata T, Yoshikura H, Takemori T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Jpn J Infect Dis.* 2005; 58(2): 88-94.
 8. Endoh D, Mizutani T, Kirisawa R, Maki Y, Saito H, Kon Y, Morikawa S, Hayashi M. Species-independent detection of RNA virus by representational difference analysis using non-ribosomal hexanucleotides for reverse transcription. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(6):e65.
 9. Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NT, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J Virol Methods.* 2005; 125 (2):181-6.
 10. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello DE, Peiris JS, Chen PJ, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine.* 2005; 23 (17-18):2269-72.
2. 知的財産権の出願・登録（予定を含む）
特許取得：該当なし
 3. 学会発表
 1. Mizutani T, Fusushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Importance of JNK and PI3K/Akt signaling pathways for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. Xth International Nidovirus Synposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
 2. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of SARS-CoV infections in experimental animals. Xth International Nidovirus Synposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
 3. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus Synposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
 4. 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. SARSコロナウイルス感染細胞におけるAktリン酸化の重要性. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
 5. 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. VSVシュード

- タイプを用いたSARS-CoV感染の解析.
第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005
年11月, 横浜
6. 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福
士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子,
佐多徹太郎. マウス, ラットを用いた経
代によるSARS-CoVの病原性の変化. 第
53回日本ウイルス学会学術集会. 2005
年11月, 横浜
 7. 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一
郎, 森川茂. SARS-CoVスパイクタンパ
ク質とACE2の相互作用のVSVシェード
タイプを用いた解析. 第28回日本分子生
物学会年会. 2005年12月, 博多

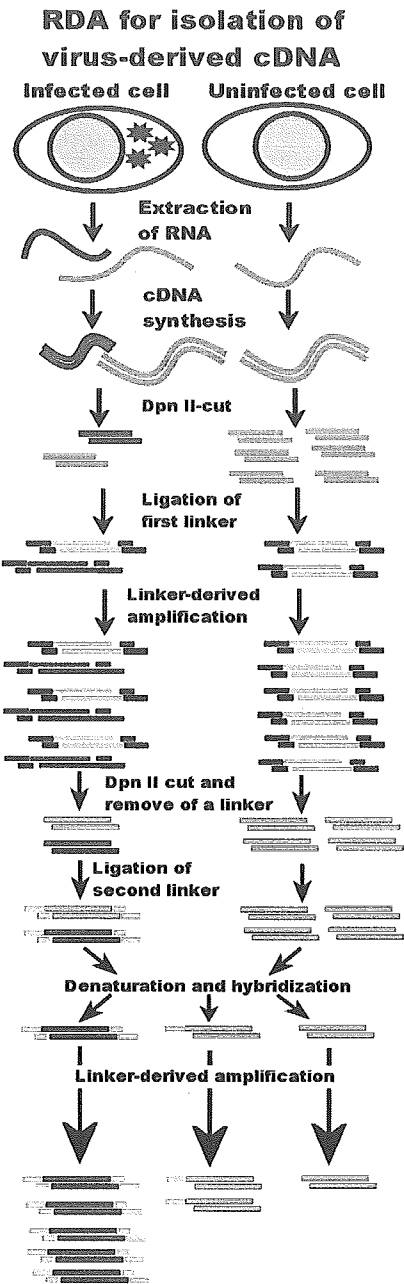


図1. RDA法の模式図

ウイルス感染細胞と非感染細胞から全RNAを抽出してNon-Ribo RDA用プライマー96種セットでcDNAを合成し、DpnII消化後BamHI-linkerを付加しlinker特異的PCRにより増幅する。DpnII消化後ウイルス感染細胞由来 amplicon には別の BamHI-linker を付加して大過剰の非感染細胞由来 amplicon と混合後、denature/hybridizationして細胞由来 amplicon を subtract する。Linker 特異的 primer による PCR によりウイルス特異的 amplicon を増幅する。

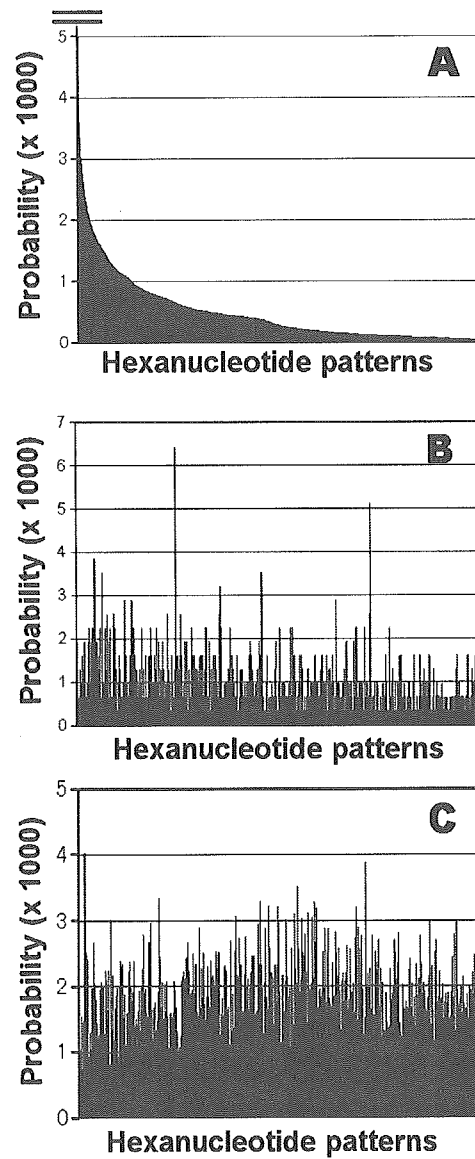


図2. 6塩基パターンの分布。
 6塩基パターン(Hexanucleotide Patterns)を rRNA(A)、サテライトリピー
 ト(B)および牛パラインフルエンザウイルス(C)の塩基配列で調べ、
 rRNA での出現頻度 (Probability $\times 10^3$) 順にならべた。

表1 Non-Ribo RDA 用プライマーセットの塩基配列(Motif)

Motif	Motif	Motif	Motif	Motif	Motif	Motif	Motif
GATATC	GATACT	CGATAT	ACTACT	ATAGTC	CTTAGT	ACTAAG	AACTTA
TAGTAT	CGTATA	GTATAC	TAACGA	CTAGTA	CTTACA	GCATAC	ATAACG
TATAGT	GTATAG	AATCCA	CGACTA	GTAATA	TTATGC	CAATAT	ATGTTA
TATATA	CGGTTA	TAGCAC	TACTAG	TAAGTT	ATACGC	ACCGTA	TGGTAT
ATACTA	AATAGT	ATATCG	AGTAGT	ATATCC	CGCTTA	GTGCTA	TGCGTA
ATATAT	CGCATA	AATATT	GTAAAC	TCGATA	TAACGC	ACGCTA	GGATAT
GTGCAC	ATTACG	TATAGC	GTCTAC	GTACCA	GGTCAT	ATGTGC	CATAGC
ACTATA	TTAACA	CTTGTA	TACAAG	GTATCA	CTCATA	AGCTTA	CATACT
CGTAAT	AGTATC	TAGTCG	TACCAG	ATACTC	AATTTG	CGACAT	CGGATA
CTATAC	TGTTAA	GTAGAC	TGGATT	ACATTA	CTGGTA	GCTATA	TTACTA
TATACG	ACTATT	CTATAG	TCGTTA	ATATTG	TTCATG	GCTATG	ACTCGT
TATGCG	TAACCG	TAGCTA	ATAGTA	CGTCTA	GCGATA	TGTAAG	TAAGGT

※上記 96 種の 6 塩基 oligomer を合成し、同一量混合した溶液を制限プライマーとして使用した。

表2 脊椎動物感染ウイルスにおける Non-Ribo RDA 用プライマー、Non サテライトプライマー(NonV00125)およびランダムプライマー(RandomHexamer)の出現確率

Family	Number of Species	Non-Ribo RDA	NonV00125	RandomHexamers
Adenoviridae	25	15.3 (6.5-28.3)*	25.0 (19.4-47.1)	23.8 (22.8-47.6)
Arenaviridae	8	17.0 (13.1-19.2)	26.0 (23.3-27.6)	24.5 (23.8-25.1)
Astroviridae	7	17.4 (14.5-19.2)	23.9 (22.4-25.6)	24.3 (23.5-25.2)
Bornaviridae	1	20.0 (20.0-20.0)	21.8 (21.8-21.8)	23.7 (23.7-23.7)
Bunyaviridae	26	22.8 (11.8-30.7)	26.2 (21.8-29.7)	23.7 (23.1-25.3)
Caliciviridae	23	13.2 (7.1-19.3)	23.5 (19.1-26.5)	24.1 (23.4-25.4)
Coronaviridae	51	24.2 (23.9-31.4)	25.3 (25.2-29.9)	23.6 (23.5-24.3)
Filoviridae	3	21.9 (20.8-22.6)	24.9 (24.4-26.2)	25.0 (24.5-25.1)
Flaviviridae	53	14.1 (8.6-23.4)	22.4 (19.0-25.9)	24.0 (21.6-25.2)
Hepadnaviridae	14	16.6 (9.7-27.2)	21.6 (18.0-25.3)	24.0 (21.3-24.5)
Herpesviridae	31	15.0 (3.7-29.2)	22.6 (16.4-27.2)	23.5 (22.8-24.5)
Iridoviridae	3	17.7 (14.1-25.2)	23.3 (20.8-29.3)	23.5 (21.9-23.6)
Orthomyxoviridae	1029	17.6 (6.3-29.7)	24.3 (16.2-32.9)	24.3 (20.0-27.9)
Papillomaviridae	123	24.7 (7.7-34.3)	24.9 (18.7-28.9)	23.2 (21.1-25.0)
Parvoviridae	59	20.5 (6.3-35.9)	25.0 (19.5-31.2)	23.8 (21.6-25.1)
Picornaviridae	90	19.3 (7.1-30.6)	24.3 (19.0-29.0)	24.0 (22.6-25.1)
Polyomaviridae	16	18.4 (14.0-28.5)	22.0 (20.6-26.4)	23.6 (22.3-24.7)
Poxviridae	21	37.6 (8.2-44.8)	26.9 (22.7-32.0)	22.9 (21.3-24.0)
Reoviridae	89	28.4 (12.9-38.4)	26.2 (19.2-31.5)	23.8 (20.7-25.8)
Retroviridae	86	17.0 (9.9-27.6)	22.1 (18.2-26.8)	23.3 (21.6-24.6)
Rhabdoviridae	14	16.8 (9.2-25.3)	22.7 (19.0-26.3)	23.6 (23.1-24.2)
Togaviridae	19	20.0 (7.6-24.3)	23.3 (20.1-25.1)	23.7 (22.7-24.5)

*×10⁻³、メディアン(最小値-最大値)を示す

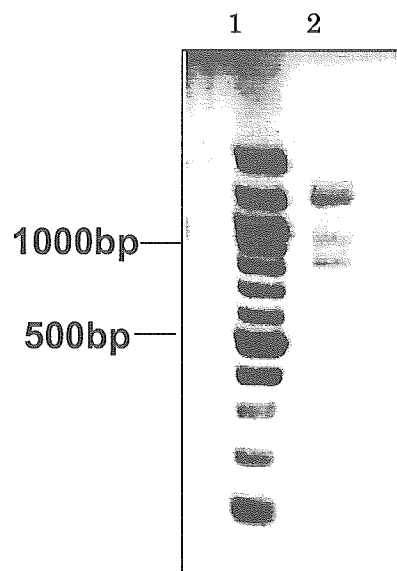


図 3. Non-Ribo RDA 法による SARS-CoV 遺伝子の検出
lane1; 100 bp ladder, lane2; RDA 法により増幅された遺伝子

「SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究」

9. 分担研究課題：SARS-CoV 感染動物モデルにおけるウイルスの動態と免疫応答の解析
-小動物を用いた感染モデルの開発-

分担研究者：永田典代（国立感染症研究所、感染病理部）

協力研究者：岩田奈織子、長谷川秀樹、佐藤由子、原嶋綾子、佐多徹太郎（同所、同部）
福士秀悦、西條政幸、森川茂（同所、ウイルス第一部）

研究要旨：小動物における SARS-CoV 感染モデルを作製しウイルスの感染動態を調べることを目的とした。今年度はラットを用いて SARS-CoV の継代を行い、その病原性の変化とウイルスの変異について解析した。その結果、SARS-CoV のレセプター結合領域に一ヶ所変異がみとめられ、ウイルスの感染性は増加した。また、病理学的に感染増殖部位の拡大と炎症反応の増悪を確認した。

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス感染後の抗体応答、ウイルス感染および抗原の分布などを解析し適切な診断材料、材料採取時期に関して検討するための動物モデルを作製することを目的とした。マウス、ラットは SARS-CoV の感染は成立するが、SARS 発症には至らない。特にラットにおいて二種類の SARS 患者からの分離株は異なる病原性を示したことから、このうち比較的病原性の低い株を用いて、ラットを用いてウイルスを継代した。

B. 研究方法

継代と感染実験：

SARS 患者からの分離株である

Frankfurt (Dr. Ziebuhr より分与) 10^8 TCID₅₀/ml をラット (F344, 4 週齢, 100 μ l 接種) に経鼻接種した。接種後 3 日目の肺洗浄液を用いて 10 回の継代接種を行い、得られたウイルスを VeroE6 細胞で一回継代した。このウイルスを用いて $10^{7.4}$ TCID₅₀/ml をラット 1 匹あたり 100 μ l の経鼻接種による感染実験を行った。いずれも動物数は一群 6 匹 (病理用、ウイルス解析用を各 3 匹ずつ) として接種後 3, 5, 7, 21 日目に解剖し材料を採取した。なお、比較対照として Frankfurt 株を用いて同様の感染実験を行った。

病理学的解析：

過麻酔による安楽殺を行い、心臓採血後解剖し、組織を採取し常法どおり 10% ホルマリン緩衝液固定後にパラフィン切片組織を作製し病理学的解析を行った。