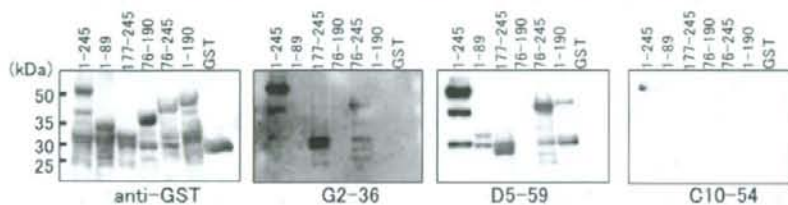


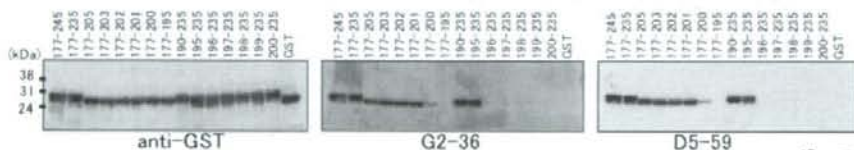
(図7) 単クローン抗体のエピトープ解析 (1)



	G2-36	D5-59	C10-54
NP1-245	+	+	+
NP1-89			
NP177-245		+	+
NP76-190			
NP76-245		+	+
NP1-190			

moAb G2-36およびD5-59はNPのC末端側、C10-54はNP全長に反応した

(図8) 単クローン抗体のエピトープ解析 (2)



	G2-36	D5-59
NP177-245	+	+
NP177-235	+	+
NP177-205	+	+
NP177-203	+	+
NP177-202	+	+
NP177-201	+	+
NP177-200		
NP177-195		
NP190-235	+	+
NP195-235	+	+
NP196-235		
NP197-235		
NP198-235		
NP199-235		
NP200-235		

moAb G2-36およびD5-59はa.a 195-201(TFTQPMN)を認識

(図9) NPのアミノ酸配列のアライメント

NP12	181	NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	240
ZC1349		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
ZH548		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
ZM557		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
Z54365		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
NpH24		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
Z25074		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
T1		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
ZH501		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
ZH1776		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
76370		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
Z26974		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
HvB375		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
Smithburn		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
ANK6807		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
ANK3837		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
SAS1		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
clone13		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
Z17374		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
CARR1622		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
Z2HB1449		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
74H559		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
Z126078		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
Zinga		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
Z185378		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
Kenya		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
Saud12000		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
Kenya83		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
Z2HB1230		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
SAS75		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
Kenya56		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
OS8		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
OS3		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
OS9		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
OS1		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
ARD38388		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDS	
En1ebbe		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	
Kenya57		NP	NRRTKEEVA	AAVNSNF	SHEKRRFLKAF	GL	VDSMGKPSAAVMAAGA	

ほかのフレボ			3F5V					
ウイルス属			3FNV					
			TOSV					
			NYSLRGAQRDIEESKLAALNSFIDNTORRAFLLKFGILLTSGARATAVYKILAEY					
			NP'SLRTKOPNEIAADKEXMAAMSGRFFTRDKKLLMVGILLNEDLVLTPAIIKCAEK					
			NP'SLRTKOAMEVAADKEXMAAMSGRFFTRDKKLLIAGVILLDEDLVLASAVYRSAEK					

RVFV NPのアミノ酸配列のうち 195TFTQPMN201はすべての株で保存されていた

厚生労働科学研究費 新興・再興感染症研究事業

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立
及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：霊長類におけるサル痘ウイルス感染症における IMV および
EEV 蛋白に対する抗体応答

研究分担者：西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部第三室・室長）

研究協力者：森川茂、網康至¹、永田典代²、長谷川秀樹²、横手公幸³、倉根一郎

（同 ウイルス第一部、¹実験動物管理室、²感染病理部、³財）化学及び血清療法研究所）

研究要旨：オルソポックスウイルスの細胞に感染するには、intracellular mature virion (IMV) や extracellular enveloped virion (EEV) の形態に成熟している必要がある。さらに、感染個体において感染が体内で広がるには、EEV に成熟したウイルスが必要である。本研究では、カンクイザルのサル痘ウイルス感染症における、IMV 関連蛋白および EEV 関連蛋白に対する抗体応答を、プロテオミク解析により明らかにした。サル痘ウイルス感染時には、EEV 関連蛋白 (F13L, A33R, A34R, A36R, B5R) および IMV 関連蛋白 (L1R, H3L, D8L, A13L, A17L, L5R) 全てに対する抗体誘導が認められた。LC16m8 天然痘ワクチン接種半年後に陽性が維持されていた EEV 蛋白は F13L と A33R であり、一方、Lister 株天然痘ワクチン接種の場合の EEV 関連蛋白は、F13L, A33R に加えて、B5R であった。B5R 遺伝子に 1 塩基欠損が認められ、正常な B5R 蛋白の発現のない天然痘ワクチン LC16m8 接種カンクイザルにおいては、B5R に対する抗体誘導は認められなかった。しかし、LC16m8 株のカंकイザルにおけるサル痘発症予防効果は Lister 株のそれと比較すると若干弱いことから、B5R 膜蛋白が誘導する免疫はサル痘発症には重要な蛋白のひとつであることが明らかにされた。

A. 研究目的

サル痘は、サルにおける天然痘様疾患として 1958 年に初めて報告され、その病原体はサル痘ウイルスである。サル痘ウイルスは、天然痘の病原体（痘瘡ウイルス）と同様に、ポックスウイルス科オルソポックスウイルス属に分類される 2 本鎖 DNA ウイルスである。1970 年には、ヒトのサル痘ウイルス感

染症（ヒトサル痘）がコンゴ民主共和国（旧ザイール）において天然痘様疾患としてはじめて報告された。ヒトサル痘は、中央および西アフリカにおいて流行しており、現在でもコンゴ民主共和国などで流行している。

2003 年にアメリカ合衆国において、ヒトサル痘がアフリカ大陸以外で初めて流行した。この流行は、サル痘ウイルスの宿主であ

るげっ歯類がペット用にアフリカからアメリカ合衆国に輸出され、それがサル痘ウイルスに感染していて、そのげっ歯類から、同一個所で飼育されていたプレーリードッグに感染が広がり、感染プレーリードッグからさらにヒトへ感染したことによる。このことは、ヒトサル痘は対策の必要な輸入感染症のひとつであることを示している。また、ヒトサル痘の臨床症状は天然痘と類似しているため、天然痘によるバイオテロの脅威に直面している現在、天然痘との鑑別診断の重要性が指摘されている。

本研究では、カニクイザルのサル痘ウイルス感染症における intracellular mature virion (IMV) や extracellular enveloped virion (EEV) 関連する蛋白に対する抗体応答について、プロテオミク解析を用いて明らかにした。さらに、天然痘ワクチン LC16m8 または Lister 免疫個体におけるこれらの蛋白に対する抗体誘導について解析し、EEV 関連蛋白のひとつである BSR のサル痘発症予防における重要性を評価した。

B. 研究方法

- 1) ウイルス. 国立感染症研究所に保存されているサル痘ウイルス Zr-599 株 (西アフリカ型) を用いた。
- 2) 霊長類および感染実験. 8 頭のカニクイザルを使用した。3 頭のカニクイザルには 10^6 PFU の Zr-599 株を皮下接種経路 (Naive 群) で、3 頭 [LC16m8-(-6M)群] には天然痘ワクチン LC16m8 接種 6 ヶ月後に、2 頭 [Lister-(-6M)群] には天然痘

ワクチン Lister 接種 6 ヶ月後に、 10^6 PFU の Zr-599 株を皮下接種経路で感染させた。本感染実験は、国立感染症研究所村山庁舎の高度安全研究施設内で実施された。

- 3) 抗体検出. ワクチニアウイルスを抗原とした IgG-ELISA により、感染個体における IgG 抗体反応の推移を解析した。
- 4) プロテオミク解析. 抗原コーティング用スライド [FASTTM slides (Whatman)] に、in-vitro translation システム (RST, Roche Diagnostics) を用いて発現されたワクチニアウイルスの IMV および EEV 関連蛋白 (組換え蛋白) を固定し、抗原 (プロテオームチップ) とした。プロテオームチップは、蛋白ブロッキング液で 30 分間処理し、次いで被験血清と反応させ、さらに、結合した抗体をビオチン化ヤギ抗-ヒト IgA + IgG + IgM (H+L) 抗体 (Jackson Immunolabs) で標識した。続いてストレプトアビジン標識-PBXL3 を結合抗体と反応させ、ScanArray Express HT (Perkin Elmer) を用いて蛍光強度を検出した。

(倫理面からの配慮について)

本研究は、動物愛護の立場に配慮し、国立感染症研究所実験動物委員会の承認を得た上で実施された。

C. 研究結果

- 1) 臨床症状. Naive 群のカニクイザルでは、サル痘ウイルス感染症は致死的であり、ウイルス接種部位には直径 10cm 程度のひ

どい潰瘍性病変が認められた (図 1)。ウイルス接種部位には LC61m8(-6M)群では軽い潰瘍性病変が認められたが、Lister(-6M)群では潰瘍性病変は認められなかった。

- 2) 全粒子抗原に対する抗体反応。IgG-ELISA で測定されたワクチニアウイルス全粒子を抗原とした抗体推移を、Naive 群、LC61m8(-6M)群、Lister(-6M)群毎に示した (図 2)。Naive 群では感染後 10 日で抗体反応は認められた。LC61m8(-6M)群、Lister(-6M)群では、チャレンジ後数日でブースター効果を伴う抗体反応が誘導された。
- 3) IMV および EEV 関連蛋白に対する抗体反応。Naive 群においては、EEV 関連蛋白 (F13L, A33R, A34R, A36R, B5R) および IMV 関連蛋白 (L1R, H3L, D8L, A13L, A17L, L5R) 全てに対する抗体の誘導が確認された (図 3 と図 4)。LC61m8(-6M)群と Lister(-6M)群における EEV 関連蛋白および IMV 関連蛋白への抗体応答。LC61m8(-6M)群における LC16m8 天然痘ワクチン接種半年後に抗体陽性が維持されていた EEV 関連蛋白は、F13L と A33R であり、一方 Lister(-6M)群の場合の EEV 関連蛋白は、F13L, A33R, B5R であった。ワクチン接種両群の個体にサル痘ウイルスを感染させると、EEV 関連蛋白のすべてに強い抗体誘導が認められた。LC61m8(-6M)群で誘導される EEV 関連蛋白抗体の程度は、Lister(-6M)群のそれらよりもより高い値を示した。

D. 考察

霊長類におけるサル痘ウイルス感染症は、ヒトにおける天然痘のモデルとして最も信頼性のあるものとして考えられている。現在、天然痘関連バイオテロリズムの危険性が指摘されている。また、サル痘ウイルスによるヒト感染症、いわゆるヒトサル痘が天然痘類似疾患としてアフリカにおいて流行している。このような状況では、天然痘ワクチン研究は現在でも重要である。

本研究では、1) 霊長類のサル痘ウイルス感染症における IMV および EEV 関連蛋白に対する抗体応答、2) 天然痘ワクチン LC16m8 株または Lister 株接種既往のあるカニクイザルのサル痘ウイルス感染症における IMV および EEV 関連蛋白に対する抗体応答、を明らかにした。

天然痘ワクチン LC16m8 は Lister 株から作製された、温度感受性と細胞選択性という性質を有する高度弱毒化天然痘ワクチンである。しかし、EEV 関連蛋白 B5R をコードする遺伝子に 1 塩基欠損があり、正常な B5R 膜蛋白の発現はみられない。このことにより LC16m8 が天然痘発症予防に対する効果を疑問視する専門家もいる。本研究では、LC16m8 株接種においては、B5R 膜蛋白に対する抗体は誘導されないことが確認された。また、感染防御に重要な EEV 関連蛋白および IMV 関連蛋白の反応パターンは B5R 膜蛋白への反応以外には、差が認められなかった。LC16m8(-6M)群個体におけるウイルス血症レベルが Lister(-6M)群個体のそれよりも有

意に高く、また、サル痘ウイルスチャレンジ部位に Lister(-6M)群個体では潰瘍性病変が認められなかったのに対して、LC16m8(-6M)群個体では軽い病変が認められた。これらの成績は、LC16m8 にはサル痘や天然痘の予防に有効ではあるものの、これらの感染症発症予防における B5R に対する免疫誘導の重要性が明らかにされた。

E. 結論

本研究では、霊長類のサル痘ウイルス感染症における IMV および EEV 関連蛋白に対する抗体応答、天然痘ワクチン LC16m8 株または Lister 株接種既往のあるカニクイザルのサル痘ウイルス感染症における IMV および EEV 関連蛋白に対する抗体応答、を明らかにした。サル痘や天然痘の予防における B5R に対する免疫誘導の重要性を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

- 1) Saijo, M., Suzutani, T., Mizuta, K., Kurane, I., Morikawa, S.: Characterization and susceptibility to antiviral agents of herpes simplex virus type 1 that codes a unique thymidine kinase gene with an amber codon between the first and the second initiation codons. Arch Virol 153:303-314, 2008
- 2) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Iizuka, I., Sakai, K., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains. Jpn J Infect Dis 61:140-142, 2008
- 3) Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Harashima, A., Sato, Y., Saijo, M., Taguchi, F., Morikawa, S., Sata, T.: Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. Am J Pathol 172:1625-1637, 2008
- 4) Ami, Y., Nagata, N., Shirato, K., Watanabe, R., Iwata, N., Nakagaki, K., Fukushi, S., Saijo, M., Morikawa, S., Taguchi, F.: Co-infection of respiratory bacterium with SARS coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. Infect Microbiol 52:118-127, 2008
- 5) 福士秀悦, 平井明香, 新倉綾, 山田靖子, 前田健, 吉川泰弘, 横山勝, 水谷哲也, 酒井宏治, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂: コウモリ由来ACE2発現細胞を用いた SARSコロナウイルスの感染性の解析. 獣医畜産新報 61:199-201, 2008
- 6) 北本憲利, 森川茂, 西條政幸, 加藤陽二, 田中智之: 抗ワクシニアウイルス単クローン抗体のサル痘ウイルスに対する反応

性とその有用性. 感染症学雑誌

82:224-225, 2008

- 7) Watanabe, S., Mizutani, T., Sakai, K., Kato, K., Tohya, Y., Fukushi, S., Saijo, M., Yoshikawa, Y., Kurane, I., Morikawa, S., Akashi, H.: Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). *J Clin Virol* 43:56-59, 2008
- 8) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I.: Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics. *Exp Opin Med Diagnost* 2:1155-1171, 2008

2.学会発表

- 1) 西條政幸, 塩田智之, 錫谷達夫, 倉根一郎, 森川茂: 293T細胞におけるHSV-1組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用: 第18回抗ウイルス療法研究会, 鹿児島 (2008. 5)
- 2) Saijo, M.: Virological insight into Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak in Xinjiang, China: Third AREVA-Pasteur Forum, Shanghai, China (2008. 6)
- 3) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Iwata, N., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Kurata, T., Morikawa, S.: Post-exposure vaccination with a highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, for protection of nonhuman primates from monkeypox: 13th International Conference on Infectious Diseases, KL, Malaysia (2008. 6)

- 4) Izuka, I., Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Morikawa, S.: The loop-mediated isothermal amplification-based diagnostics for monkeypox virus infection: 13th International Conference on Infectious Diseases, KL, Malaysia (2008. 6)
- 5) 西條政幸: 1類感染症: 第3回輸入感染症講習会, 逗子市 (2008. 9)
- 6) 水谷哲也, 山尾卓也, 江下優樹, 片野晴隆, 黒田誠, 関塚剛史, 渡辺俊平, 明石博臣, 竹原一明, 木原悠希, 佐藤朝光, 西村美保, 酒井宏治, 富士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 中内美名, 倉根一郎, 森川茂: ウイルスの網羅的検出法 (RDV法) と次世代シーケンサーによる新しいウイルスの発見: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)
- 7) 酒井宏治, 網康至, 水谷哲也, 岩切章, 山本正悟, 平井明香, 須崎百合子, 滝本一弘, 田原口元子, 飯塚愛恵, 富士秀悦, 西條政幸, 永田典代, 長谷川秀樹, 山田靖子, 倉根一郎, 森川茂: 急性呼吸器疾患患者から分離された新型レオウイルスの性状解析及びマウスでの感染実験: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)
- 8) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 富士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎: SARS-CoV感染動物モデルを用いたSARS発症機序の解明と治療法

- の検討: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)
- 9) 石岡賢, 佐藤友香, 金子久俊, 西條政幸, 錫谷達夫: HSV-1に対するアシクロビルとインターフェロンが相乗効果を示す機構について: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)
- 10) 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 飯塚愛恵, 塩田智之, 緒方もも子, 酒井宏治, 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 森川茂: 劇症型サル痘に関する解析: 性状, ウイルス学的所見, 病理: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)
- 11) 飯塚愛恵, 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 塩田智之, 緒方もも子, 酒井宏治, 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 森川茂: Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法によるサル痘迅速診断: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)
- 12) 福士秀悦, 中内美名, 酒井宏治, 西條政幸, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂: リフトバレー熱ウイルスのNPに対する単クローン抗体の作製と抗原検出ELISA法への応用: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)
- 13) 中内美名, 福士秀悦, 酒井宏治, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 西條政幸, 森川茂: 南米出血熱の実験室診断法の開発: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)
- 14) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 水谷哲也, 飯塚愛恵, 塩田智之, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂: 高度弱毒痘そうワクチン LC16m8の霊長類におけるサル痘発症予防: 長期予防効果に関する検討: 第12回日本ワクチン学会学術集会, 熊本市 (2008. 11)
- 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

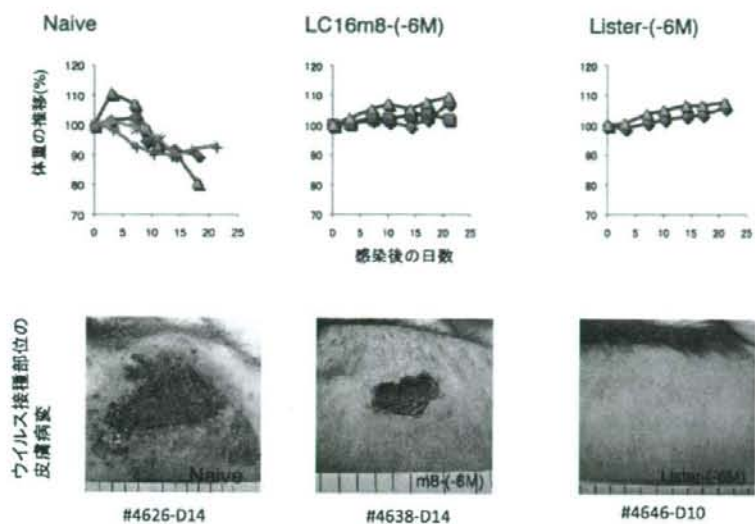


図 1. Naive 群, LC61m8(-6M)群, Lister(-6M)群におけるサル痘ウイルス感染後の体重の推移 (上) と感染部位の潰瘍性病変 (下) .

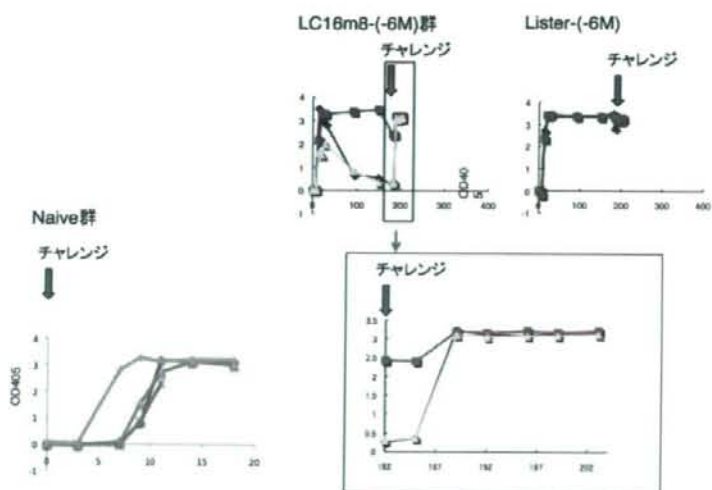
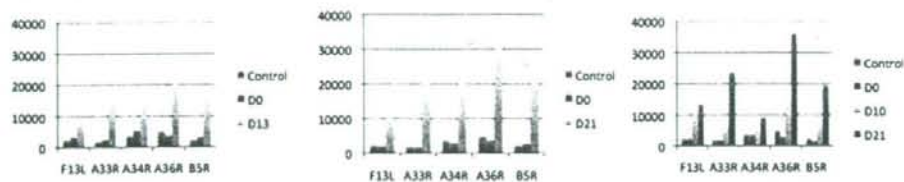
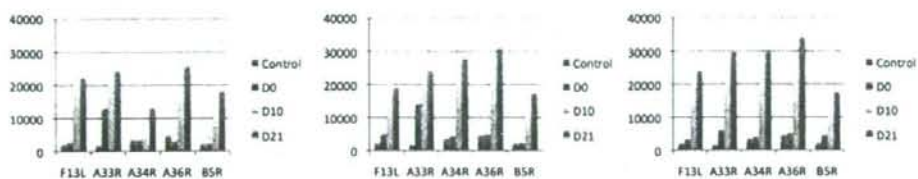


図 2. Naive 群, LC61m8(-6M)群, Lister(-6M)群におけるサル痘ウイルス感染後のウイルス全粒子抗原 IgG-ELISA における 1:400 倍希釈血清の OD 値の推移.

Naive群



LC16m8(-6M)群



Lister(-6M)群

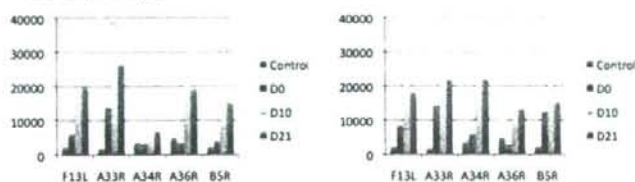
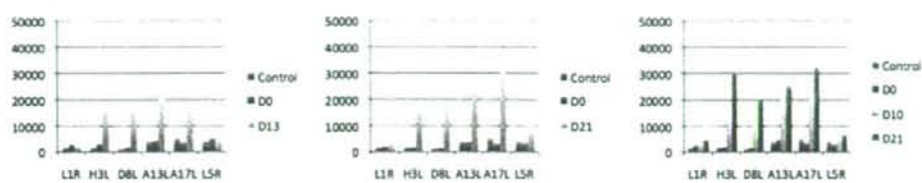
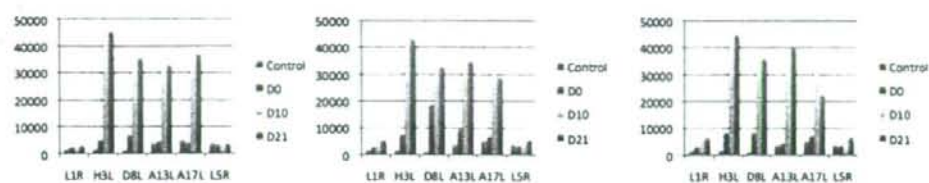


図3. プロテオミク解析による, Naive 群(上段), LC61m8(-6M)群(中段), Lister(-6M)群(下段)におけるサル痘ウイルス感染後の EEV 関連蛋白への抗体反応. Control は被験血清を反応させない場合(4検体)の蛍光強度の平均. D0, D10, D21 は, サル痘ウイルス感染後の日数を示す.

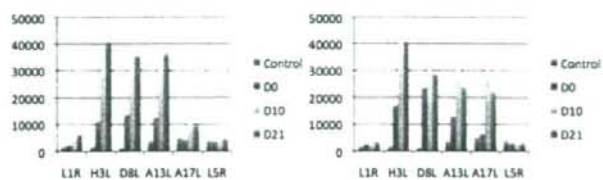
Naive群



LC16m8(-6M)群



Lister(-6M)群



プロテオミク解析による，Naive群（上段），LC61m8(-6M)群（中段），Lister(-6M)群（下段）におけるサル痘ウイルス感染後のEEV関連蛋白への抗体反応．Controlは被験血清を反応させない場合（4検体）の蛍光強度の平均．D0，D10，D21は，サル痘ウイルス感染後の日数を示す．

厚生労働科学研究費 新興・再興感染症研究事業

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立 及び予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：重症急性呼吸器症候群の発症モデル動物系による発症機構と
ワクチン、治療法の開発

研究分担者：田口文広（国立感染症研究所・ウイルス第3部）

研究協力者：網 康至（国立感染症研究所・動物管理室）

白戸憲也（国立感染症研究所・ウイルス第3部）

研究要旨：重症急性呼吸器症候群（SARS）は野生動物由来の新興感染症であり、原因病原体は新型コロナウイルス（SARS-CoV）である。SARS病態は重症肺炎であり、致死率は約10%と極めて高い。SARS-CoVはその受容体を発現している種々の組織で増殖するが、肺での高い増殖と重症肺炎の発症機構についてはよく分かっていない。我々は、培養細胞でのSARS-CoV感染がトリプシンやエラスターゼなどにより著しく亢進することを見だし、重症肺炎の引き金となる原因の一つとして、肺でのエラスターゼ産生に注目した。これまでの研究では、弱毒細菌（パスツレラ菌）感染やLPS投与により軽度の炎症を持つ肺ではエラスターゼ産生が誘導され、SARS-CoV感染が増強され、その結果重症化肺炎に至る可能性を示唆した。微弱肺炎マウスで病原性を示すマウス馴化株(Fr-mo)は未馴化親株(Fr-1)のマウスの肺—肺継代を10代以上繰り返し獲得された株であるが、微弱肺炎を持つマウスへの親株Fr-1感染は肺炎を持たないマウス感染より、100倍以上増殖が高いことから、微弱肺炎マウスでの継代ではより速やかに病原性株の出現が予想された。そこで、本年度は、この可能性を検討するため、パスツレラ感染マウス（微弱肺炎マウス）を用いて、Fr-1株を継代し病原性株の出現を検討したところ、3-5代目継代ウイルス(Fr-pp)が高い病原性を示した。また、Fr-pp株はFr-mo株とは異なり、マウスへの馴化に依るものではなく、SARS患者から分離された原型のSARS-CoVとの相同性が高いことが判明した。以上の結果から、微弱肺炎を持つマウスでは、ヒトSARS原株の増殖が高いことが示唆された。

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群（SARS）は2002年晩秋から2003年春にかけて中国広東省から香港を経て、東南アジアを中心とする全世界へと伝播した動物由来の新興感染症であり、その致死率の高さから世界を震撼させた。原因病原体はそれまで報告されたウイルスとは異なる新たなコロナウイルス

（SARS-CoV）であることが明らかにされた。SARS-CoVに関する研究は驚くべき速さで進行しているが、SARS-CoVがどのような機構で重症肺炎を引き起こすのかについては不明な点が多い。我々は、培養細胞VeroE6におけるSARS-CoV感染がトリプシンなどの様々なプロテアーゼにより亢進することを報告した。その分子機構としては、

細胞表面の SARS-CoV 受容体 angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) に結合した SARS-CoV のスパイク (S) 蛋白がプロテアーゼにより活性化され、その結果、本来エンドゾーム経路で感染する SARS-CoV が細胞表面から直接侵入することが可能になったためと考えられた。この様な活性を示すプロテアーゼとしては、トリプシン、サーモリジン、ディスパーゼと共に、炎症時に肺で産生分泌されるエラスターゼがあり、SARS-CoV 感染時に、他の原因により産生されるエラスターゼが、感染亢進を誘導し、その結果重症肺炎が引き起こされる可能性が示唆された。このことを検証するため、弱毒パストツレラ菌や大腸菌由来の lipopolysaccharide (LPS) がマウス肺中で SARS-CoV 感染を増強するかについて検討し、マウス馴化 SARS-CoV を用いた場合、SARS-CoV 感染が亢進され、重症肺炎を誘導することが明らかにされた。一方、マウスで病原性を示す馴化株 Fr-mo は、親株 Fr-1 をマウス肺-肺継代を 10 回行うことにより獲得されたが、微弱肺炎マウスを用いた継代では、ウイルス感染が高いためより速やかにマウス病原性ウイルスの出現が推測される。本年度は、その可能性について検討した。

B. 研究方法

SARS-CoV は Ziebuhr 博士から分与された親株 Frankfurt-1 (Fr-1) を用いた。Fr-1 株の微弱肺炎マウスへの感染は以下のように行った。麻酔下のマウス (日本チャールスリパー (株) から購入した 6 週齢雄 BALB/c) に 106-107 cfu/20 μ l のパストツレラ菌を経鼻接種し、1 日後に Fr-1 株 20 μ l を経鼻接種した。その後、2-3 日に感染マウス肺を採取

し、リン酸緩衝液 (PBS) で 10% 乳剤を作成し、その 20 μ l を微弱肺炎マウスに接種した。同様の操作を繰り返し、1 から 5 代継代のウイルス Fr-pp を得た。また、対照として、微弱肺炎を呈さない正常マウスでも同様の継代を行い Fr-mm を得た。このウイルスの増殖及び定量、プラークローニングには、VeroE6 細胞を用い、細胞培養には DMEM+5% 牛胎児血清を用いた。ウイルスの定量は既に報告した plaque assay により行った。

得られたウイルスの病原性に関しては、昨年度の報告書に記載したように、パストツレラ菌感染の微弱肺炎を持つマウスで検討した。

C. 研究成果

我々はこれまで、マウスに病原性を示さないが、軽度の呼吸器炎症を引き起こす細菌、パストツレラ菌を用いて、その感染がマウス肺中のエラスターゼ産生を促し、また同時に SARS-CoV の肺での増殖を増強することを報告した。即ち、これまでのマウスを用いた動物実験から、肺でのエラスターゼ産生が重症化肺炎のトリガーになる可能性が考えられた。微弱肺炎マウスでの SARS-CoV 親株が、通常マウスと比べると 100 倍高いことから、微弱肺炎マウスでの Fr-1 株の継代は、より速やかにマウス馴化株の出現を可能にすることが推測されたので、その可能性を検討した。

マウスにパストツレラ菌を経鼻投与し、1 日後に Fr-1 株を経鼻接種した。Fr-1 株投与後 2-3 日で、マウスの体重減少、逆毛などの臨床症状が観察されたので、この時期にマウス肺を採材し、3-4 匹分の肺をプールして、PBS と

乳鉢を用いて、マウス肺の10%乳剤を作成した。乳剤は3000rpmで10分遠心し、その上清をマウス継代ウイルス、Fr-ppとして、分注し-80Cで保存した。保存Fr-ppを上記と同様に、微弱肺炎マウスに接種し、同様の継代を5回繰り返した。対照として、パスツレラ菌非接種の正常マウスを用いて、Fr-1株と同様に5回継代した（Fr-mm株を得た）。

継代により病原性が変化したか否かを検討するため、3代及び5代継代のウイルスのマウス病原性を比較した。Fr-pp、Fr-mm両株とも、既に3回継代したウイルスが、パスツレラ菌感染の微弱肺炎マウスに、体重減少、逆毛、などの病原性を示したが、5回継代のウイルスは更に程度の強い病原性を示し、死亡するマウスも見られた。これらのウイルスは遺伝子レベルでは変異ウイルスの集合体であるので、5回継代ウイルスを用いて、ブランククローニング法により幾つかのクローンを分離し、そのS遺伝子の塩基配列を決定した。

その結果、Fr-pp、Fr-mm両株ともFr-1株と比べ、一個のアミノ酸変異が見られた（表1）。Fr-1はヒト由来分離Frankfurt株をVeroE6細胞で2-3代継代により樹立した株で、最初ヒトから分離されたウイルス親株と比べ既に一個のアミノ酸変異を獲得し、これはIFN- α , β が機能しないVeroE6細胞での増殖に起因する変異と考えられる。正常マウス継代による病原性獲得ウイルスFr-mmのS蛋白はFr-moと同様であり、Fr-1のS蛋白受容体結合部位に更に一個のアミノ酸変異が認められた。一方、Fr-ppはヒト由来株Frankfurt親株のS蛋白と一致し、そのことからFr-1

の変異に依るものではなく、Fr-1株に微量に含まれるFrankfurt株原型が選択されたものと考えられた。

Fr-pp、Fr-mm及びFr-1のクローンについて、マウス病原性を比較した。その結果、何れの株も正常マウスには体重減少、逆毛などの臨床症状を示すことはなかったが、パスツレラ感染微弱肺炎マウスでは、Fr-pp、Fr-mm両株は、強い病原性を示し、20-50%の感染マウスが死亡した。Fr-mo株はFr-mm株と同様のS蛋白を有し、マウスに対する病原性も同様であるが、この株の分離には通常マウスを用いての10回以上の肺-肺継代が必要であった。今回得られたFr-mmは5回継代により分離することが可能であった。

本年度得られた結果から、エラストーゼ誘導が認められる微弱肺炎マウスから、少ない継代で病原性ウイルスを分離することが可能であり、更に分離されたウイルスはマウス馴化によるものではなく、ヒトに病原性を示す原株である可能性が示唆された。

D. 考察

SARS-CoVのウイルスゲノムや抗原は呼吸器や腸管など激しい病変が認められる組織以外にも、肝臓、腎臓、小脳、脾臓など多くの組織で検出されている。これらの組織では、SARS-CoVの受容体ACE2が発現されており、特に心臓、腎臓では高い発現が認められる。一方、ACE2の高い発現が認められる血管内皮細胞での増殖は認められない。これらのことから、SARS-CoVの標的臓器を規定する因子は受容体以外にも存在することが予想される。

我々は培養細胞でのプロテアーゼ存

在下で SARS-CoV 増殖が高くなることを報告したが、細菌感染などによる微弱肺炎を呈した肺では、エラストアーゼ等が産生されることなどを考慮すると、エラストアーゼなど SARS-CoV 増殖を亢進させるプロテアーゼは SARS-CoV の標的臓器決定に重要な役割を果たしているものと推測される。このことを検証するため、マウスに軽度の呼吸器炎症を引き起こす細菌感染が SARS-CoV 感染を増強するのかを検討し、その結果、SARS-CoV 単独感染ではマウスに肺炎、体重減少等の臨床症状を示すことはなかったが、パストツレラ菌と、マウス馴化株の混合感染では、ヒト SARS と類似性の高い重症肺炎を引き起こすことを観察した。即ち、マウス馴化 SARS-CoV と弱病原性呼吸器細菌により、SARS の動物病態モデルを作出することが可能となった。

この実験中に、パストツレラ菌感染マウスでのマウス非馴化株の増殖が通常マウス肺と比べ、100 倍以上高いことが明らかにされた。本年度の研究では、微弱肺炎を持つマウスを用いて SARS-CoV の継代を行った場合、より速やかに病原性ウイルスの出現が予想されるため、その可能性について検討した。その結果、継代 3-5 代で病原性の高いウイルスが分離された。しかしながら、病原性ウイルスは遺伝子レベルでマウス馴化ウイルスより、重症肺炎患者から分離されたヒト原型 SARS-CoV との類似性が高く、このウイルスは微弱肺炎での増殖が高いことが考えられた。即ち、ヒトに重症肺炎を引き起こすウイルスは、エラストアーゼなどのプロテアーゼ存在化でより選択的に増殖する可能性が考えられた。

今回得られたウイルスがマウスへの馴

化よりウイルス増殖の微細環境に馴化したウイルス（即ちプロテアーゼ存在下での増殖が極めて高い）であるとすると、他の動物に対しても、微弱肺炎状態であれば、増殖亢進や病原性上昇の可能性が考えられる。今後、ハムスターなどの実験小動物を用いて研究を進め、強い病原性発現が認められれば、最終目標であるサルを用いて、重症化肺炎の動物モデルの樹立を試みたい。

E. 結論

パストツレラ菌感染による微弱肺炎マウスでの SARS-CoV の継代により、病原性の強いウイルス株が分離された。分離したウイルスは、重症肺炎に陥った SARS 患者分離株と酷似したウイルスであり、マウスに馴化した結果ではなく、人病原性を示すウイルスが、エラストアーゼの存在する肺での増殖能が高いため、選択された可能性が推測された。この仮説が正しいとすると、マウス以外の実験動物においても、微弱肺炎を引き起こす条件では、高い病原性を示す可能性がある。今後、本研究により得られた分離株 Fr-pp を用いて、ハムスターなどの小動物で検討し、高い病原性を示すことが明らかにできれば、最終的な動物モデルとしてサルを用いた研究を行いたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawase M, Shirato K, Matsuyama S and Taguchi F. (2009) Protease-mediated entry via endosome of human coronavirus 229E. *J. Virol.* 83: 712-721.
2. Fukushi S, Watanabe R and Taguchi F (2008) Pseudotyped vesicular stomatitis

- virus for analysis of virus entry mediated by SARS coronavirus spike proteins. *Methods Mol. Biol.* 454:1-8
3. Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K, Maejima M, Fukushi S, Morikawa S and Taguchi F. (2008) Entry from cell surface of SARS coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein. *J. Virol.* 82: 11985-11991
 4. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F. Morikawa S and Sata T. (2008) Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *American J. Pathol.* 172: 1625-1637
 5. Ami Y, Nagata N, Shirato K, Watanabe R, Iwata N, Nakagaki K, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S and Taguchi F (2008) Co-infection of respiratory bacterium with SARS coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Microbiol. Immunol.* 52: 118-127
2. 学会発表
1. 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代眞人、田口文広：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組み換え SARS ワクチンとしての検討 第 55 回日本ウイルス学会総会、札幌 2007.10.21-23
 2. 田口文広、川瀬みゆき、白戸憲也、松山州徳：ヒトコロナウイルス (HCoV) 229E の細胞侵入機構解析、第 56 回日本ウイルス学会総会、岡山、2008.10.26-28
 3. 松山州徳、田口文広：マウスコロナウイルス S タンパクの 2 段階構造変化の解析 第 56 回日本ウイルス学会総会、岡山、2008.10.26-28
 4. 平井明香、大塚伸久、池田敏男、谷口理恵、中垣慶子、鈴木秀佳、網康至、山田靖子、糸原重美、田口文広：マウス系統間におけるマウス肝炎ウイルス感受性差に関する研究、第 56 回日本ウイルス学会総会、岡山、2008.10.26-28
 5. 白戸憲也、前嶋円、平井明日香、松山州徳、網康至、川瀬みゆき、田口文広：Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) のウイルス馴化株の分離と性状解析 第 56 回日本ウイルス学会総会、岡山、2008.10.26-28
 6. 田口文広、白戸憲也、網康至：パスツレラ感染マウスを用いた病原性 SARS コロナウイルスの分離 第 56 回日本ウイルス学会総会、岡山、2008.10.26-28

表 1 : SARS-CoV の S 蛋白内の変異

ウイルス株	ウイルスの由来	480 番目アミノ酸	641 番目アミノ酸
Frankfurt 原株	患者からの分離株	Asp	His
Fr-1	原株を VeroE6 細胞で 2-3 代継代	Asp	Tyr
Fr-pp	Fr-1 を微弱肺炎マウスで 5 代継代クローン	Asp	His
Fr-mm	Fr-1 を正常マウスで 5 代継代クローン	Glu	Tyr
Fr-mo	Fr-1 を正常マウスで 10 代継代	Glu	Tyr

赤字で示したアミノ酸は Frankfurt 原株と比べた変異

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立及び
予防・治療法の開発に関する研究

分担研究課題：新興ウイルスが出現した場合の迅速なウイルス同定法の開発

研究分担者：遠藤 大二（酪農学園大学獣医学部放射線学教室）

研究要旨：新興・再興ウイルスが出現した場合の迅速なウイルス同定のための方法として、ウイルス間での共通性の高い degenerate プライマーの設計方法が開発された。当該プログラムでは、前年度報告したプログラムを元に、整列塩基配列上におけるギャップ 4 塩基 motif の局在に基づいたプライマー設計を行うことにより、ウイルス塩基配列の多様性への対応を向上させた。プログラムを旧世界アレナウイルスウイルスおよび Ebola ウイルスに適用して設計されたプライマーは、人工合成されたウイルスゲノム断片およびウイルスゲノム cDNA を鋳型とした PCR 反応で、対象範囲のウイルス種を共通して増幅した。これらの結果から、本年度開発されたプログラムは新興・再興ウイルスが出現した場合の迅速な検出方法の開発のために有用であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、新世界アレナウイルスや新世界ハンタウイルスを初めとして、新興・再興ウイルスの出現が数多く報告されている。海外からの帰国者が出血熱などの症状を呈した場合には、迅速にウイルス種を鑑別することにより、拡大の抑止と対応策の策定が必要となる。ウイルスの検出・同定法として、感染履歴を検出できるという点で抗体による検査が有利であるが、遺伝子の一部を増幅することにより迅速にウイルス種を同定できる点では PCR 法の実用性が高い。たとえば、インフルエンザウイルスでは、塩基配列の保存領域が明確であることから、PCR 法による遺伝子型の同定が迅速に行われている。しかしながら、アレナウイルスやハンタウイルスなどでは、検討すべきウ

イルス数が多いばかりではなく、保存領域が明確でなく、新興ウイルスも検出範囲に含めた場合には、現在報告されているプライマーでは十分とは言えない。

前年度において、分担者らは、特定の位置に二種以上の塩基が混合したオリゴマーをプライマーとして用いる方法(degenerate プライマー PCR)が有効な方法であることを示した。広い範囲のウイルス株またはウイルス種に対して degenerate プライマーを設計する場合、従来の人的方法では、ウイルスの塩基配列を整列(アライメント)させた結果について、研究者が塩基置換または変異が少ない領域を目視で特定した上、プライマー配列が選択される。本研究では、対象ウイルスでの出現頻度の高い 6~10 塩基程度のパターン(motif)を選択し、それら

を起点として degenerate プライマーを設計するプログラム(Coordination of Common Motifs, CoCoMo アルゴリズム)を開発した。当該アルゴリズムは、HEV および SARS ウイルスに対して一定の効率を持つプライマーを設計し、多数のウイルスを対象とした場合でも一週間程度の計算時間で予測結果が得られたことから、一定の実用価値が示された。

本年度においては、すでに複数種のウイルスに対するプライマーが設計されている旧世界アレナウイルスとエボラウイルスに対するプライマー設計を試みることにした。プログラムは、前年度の CoCoMo アルゴリズムを原型として、対象ウイルス群に共通するプライマーが設計されるように改善された。改善に当たっては、CODEHOP 法など、成果を上げているプライマー設計アルゴリズムが取り入れられた。

設計されたプライマーの実用性を検討するためには、増幅対象となる塩基配列を持つ DNA を用いた PCR 反応が実施された。本研究で対象とするウイルスは多岐にわたっており、既知のウイルス全てを鋳型として準備することは難しかったため、連結オリゴマーPCR(OE-PCR)法を用いてプライマーの鋳型となるウイルスゲノム領域を合成した。加えて、一部のウイルスについては、抽出されたウイルス RNA を用いた、RT-PCR も実施された。

これらの試行により、新興ウイルスにも迅速に対応可能な PCR プライマーの設計方法を開発・検証することを、本研究の目的とする。

B. 研究方法

1. 塩基配列の記載方法

塩基配列および degenerate 配列は、Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) による Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences, Recommendations 1984

(<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html>)に従った。

塩基の縮重性(degeneracy)は表 1 に従い、積算縮重値 Sd は塩基配列内の全ての degenerate nucleotide の積算縮重値(degeneracy)を積算した。例えば、ATRYBNCC の場合、degeneracy は $2 \times 2 \times 3 \times 4 = 48$ とした。degeneracy の指標としては、degeneracy と等しい値を得るための 2 の指数も用いた。

2. プライマー設計プログラム群の開発環境

CoCoMo アルゴリズムを実施するためのコンピュータとしては、64bit CPU (Athlon64)および 2G バイトのメモリーを搭載した DOS/V 仕様パーソナルコンピュータを用いた。プログラムを稼働するためのオペレーティングシステムとしては、Linux (Ubuntu8.04)を用いた。

開発言語としては、Ruby 1.86 を、同言語のバイオインフォマティクス用の拡張モジュールとしては bioruby を、データベースとの接続モジュールとしては MySQL/Ruby を使用した。鋳型上の 6~12 塩基の motif の出現頻度を累計するための gas ソフトをコンパイルおよび稼働するためには、gcc C コンパイラを使用した。

複数のウイルスの塩基配列を整列させるためには、MAFFT プログラム(MAFFT version 6, <http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>)を用いた。

元遺伝子データ、処理過程の一時データ、予測プライマー塩基配列、位置情報および方向等の付随情報を格納するためのデータベースには MySQL 5.0 (<http://dev.mysql.com/>)を使用した。

3. 対象ウイルスデータ

各ウイルスの既知のゲノム塩基配列データは、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)よりダウンロードし、bioruby により MySQL のテーブルに格納した。

4. 2008 年度版 CoCoMo アルゴリズム (CoCoMo Ver3)の構成

CoCoMo Ver3 では degenerate プライマーを設計するために下記の順で処理を実施した。

① ウイルスゲノム配列のアライメント (図 1A)

テーブルに格納されたデータを、MAFFT プログラムによりアライメントした。アライメント上では、相同性を持つ配列が再構成された配列上で同じ位置にくるように配置され、相同位置までの塩基配列が不足する場合には、“-”の記号(ギャップ)が挿入され、位置の調整が行われた。結果として、“-”の記号を加えて 5'端からカウントしたアライメント上での塩基の位置は共通配列上の位置を示すように調整された。

② 共通ギャップ motif の検索(図 1B)

探索対象とする motif は、前年度は連続する 6~7 塩基としたが、このように規定して、

旧世界アレナウイルス共通 motif を探索した場合、対象ウイルスに共通して存在し、かつアライメント上での共通位置に局在する 6 塩基 motif は非常に少なく、それらの motif を起点として設計されたプライマーはほとんど見出すことができなかった。そのため、アライメント上の同一位置に存在しながら多数のウイルスに共通して存在する motif として、一塩基を検索対象から外したギャップモチーフを用いることとした。このモチーフは ATNGC のように 4 塩基は motif としてウイルスゲノム上での位置を探索する対象とするが、中央の 1 塩基は N に示すようにどのような塩基でも探索上許容することとした。すなわち、ATNGC というギャップモチーフを探索した場合、ウイルスゲノム上の ATCGC, ATAGC, ATGGC および ATTGC の配列が探索対象となる。

このギャップ motif について、全ての対象ウイルスゲノム上での位置を特定しその位置を比較した。すべての対象ウイルス上に存在し、アライメント上での位置が 20 塩基以内であるようなギャップ motif を選択し、共通ギャップ motif とした。

③ degenerate flanking 配列の算出(図 1C)

前ステップにおいて抽出された共通ギャップ motif について、その 5'側の 16 塩基を各ウイルスゲノムから抽出し、対象ウイルスで共通する degenerate 配列と degeneracy を算出した。このステップで degeneracy が 1,024 を超える場合には、当該ギャップ motif はプライマー予測対象から外した。

このステップで degeneracy が 1,024 以下と予測された flanking 配列とギャップ motif の連結した配列をプライマー候補 1 とした。

④ プライマー候補 1 の仮想 PCR(図 1D)