

個々のプライマー候補 1 については、ギャップ記号が挿入されているアライメント上での位置が記録されているが、元の対象配列ではその位置が記録されていない。そのため、全てのプライマー候補 1 について元配列上の位置と方向を記録した。

続いて、位置の記録を基に、各プライマー候補 1 の 3' 方向 100~600 塩基の範囲について探索プライマーと反対方向のプライマー候補 1 が存在した場合、二本のプライマー候補を PCR 産物を生成するセットとして記録した。PCR プライマーセットの記録にあたって、セットの候補に使われたプライマー候補 1 を別に保存し、使用されなかったプライマー候補は候補から棄却した。結果として、プライマー候補 1 の一部のみが次段階のプライマーとしてリストに残った。

⑤ PCR に寄与すると予測されたプライマー候補 1 の伸長(図 1E)

PCR に寄与すると予測されたプライマー候補 1 について、再度標的ゲノム上での 5' 隣接配列を 5 塩基取得してプライマー候補に連結し、プライマーの全長を 26 塩基とした。このことにより、プライマー候補はいずれも 63°C 以上のアニーリング温度を持つことが算出され、後にプライマーのアニーリング温度を 63°C に統一する作業が可能となった。この段階のプライマーをプライマー候補 2 とした。

⑥ 忌避配列を含むプライマー候補 2 の棄却(図 1F)

CCCCC などの同一塩基の連続または CTCT などのヒトゲノム上に多数存在するリピート配列を含むプライマー候補 2 は、PCR に実際に使用した場合に、非特異的 PCR 産物を生成する可能性が高いため、プ

ライマー候補から棄却した。

⑦ プライマー候補 2 による仮想 PCR(図 1G)

対象ウイルスゲノム上のプライマー候補 2 の位置は、プライマー候補 1 の時点で算出されているが、この位置を基に、④で示した仮想 PCR を実施した。④と同なじく、仮想 PCR の対象となったプライマー候補のみをリストに残し、他を候補から棄却した。

⑧ プライマー候補 2 の塩基長の調整(図 1H)

プライマー候補 2 について、最近接塩基対法(Nearest Neighbor method)に基づいてアニーリング温度を算出した(http://www.genosys.jp/whatsnew/tm/tm_syosail.html)。プライマー候補 2 が degenerate プライマーである場合は、可能なプライマー塩基配列全てについてアニーリング温度を算出し、平均値を当該プライマーのアニーリング温度とした。アニーリング温度が 64°C を越える場合、各プライマーの 5' 端の 1 塩基を除いた配列について、アニーリング温度を再計算した。5' 端からの塩基の除去は、アニーリング温度が 64°C となるまで繰り返された。結果として、長さは異なるがアニーリング温度が同一のプライマーセット候補がリストに残り、これをプライマー候補 3 とした。

⑨ プライマー候補 3 の評価(図 1I)

プライマー候補 3 について、セルフダイマーの形成とヘアピン構造の形成について、塩基配列内の相補配列を探索することにより予測した。セルフダイマーの形成とヘアピン構造については、アニーリング温度も算出し、セルフダイマーについては 20°C 以上ヘアピン構造については 16°C 以上が予測

された場合、それらの構造が安定で、PCRに使用した場合に副次産物が大量に形成されることが予測されるため、候補から棄却した。これらの棄却の対象とならなかったプライマー候補をプライマー候補4とした。

⑩ プライマー候補4による仮想PCR(図1J)

プライマー候補4について④に述べた方法で計算上のPCR産物の形成を予測した。プライマー候補4は、いずれかのPCR産物の形成に関与することが⑧で明らかであるため、PCRを形成する二本のプライマー候補4をプライマーペア候補とした。

⑪ プライマーペア候補の評価(図1K)

リストされた各プライマーペア候補についてプライマーダイマーの形成とそのアニーリング温度を予測した。アニーリング温度が20℃を越える場合、当該ペアをプライマーペアリストから棄却した。この時点でリストに残ったプライマーおよびプライマーペアを最終的なプライマーセットとした。

各プライマーセットについては、プライマーの配列と forward および reverse プライマーの degeneracy, ゲノム上の平均位置、PCR産物の平均サイズ、および forward および reverse プライマーの degeneracy の合計値を記録した。

⑫ プライマーペアの順位づけ

①から⑪の過程を通じてリストに残ったプライマーセットについて、degeneracy の合計値の低い順に順位を付けた。続いて、同一の合計 degeneracy を持つプライマーセットについては、PCR産物の平均サイズが低い順に順位を付け、高い順位のものを選択した。このプライマーセットを鋳型のゲノム断片を合成し、検証実験を行う合成プライマー候補とした。

5. プライマー検証のためのウイルスゲノム断片の合成

① DNA合成用連結オリゴマー設計プログラム(図2)

設計されたプライマーの増幅効率を検証するためには、プライマーの鋳型となる種々のウイルス断片が必要となるが、実験室では入手および取り扱いが困難なウイルスも存在するため、連結するオリゴマーをアニーリングおよびPCRすることにより100~400塩基程度のDNA断片を合成した(OE-PCR法)。OE-PCR法に用いる19~60塩基のオリゴマーは、基本的にはDNA Works2プログラムに基づいて設計された(図2, <http://mc11.ncicrf.gov/dnaworks/dnaworks2.html>)。本研究では、多数のゲノム断片を合成する必要があったため、OE-PCRのためのオリゴマーを設計するプログラムを、HooverとLubkowskiの方法(Hoover and Lubkowski, 2002)に従って作成した。

すなわち、合成対象となる塩基配列の5'端からアニーリング温度が70℃と予測される長さの塩基配列を第一オリゴマーとして設定し、続けて、第一オリゴマーの3'端からアニーリング温度が60℃となるように第二オリゴマーとの重複領域を設定した。続けて第一オリゴマーと相補的で第一オリゴマーとの重複部分を含めた配列長が55塩基程度のオリゴマーを設計し、第二オリゴマーとした。さらに、この第二オリゴマーの5'端からアニーリング温度が60℃となるように第三オリゴマーとの重複領域を設定した。このオリゴマーを追加する作業を対象塩基配列の5'端まで繰り返した。

設定されたオリゴマーは、全て依頼合成され、OE-PCR 反応に用いられた。

②OE-PCR 反応

OE-PCR は、3'→5' exonuclease 活性を持つ耐熱性 DNA polymerase (PrimeStar HS)により実施された。

すなわち、5×PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μl、1×dNTP Mixture (2.5 mM) 4 μl、2 pmol の各 Oligomer、および PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μl) 0.5 μl と滅菌蒸留水を up to 50 μl となるように混合し、[98°C 10 sec - 60°C 5 sec - 72°C 10sec] の条件で 30 サイクル反応し、一次鋳型を作成した。続けて、5×PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μl、1×dNTP Mixture (2.5 mM) 4 μl、20 pmol 5'端の Oligomer、20 pmol 3'端の Oligomer および PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μl) 0.5 μl と滅菌蒸留水を up to 50 μl となるように混合し、[98°C 10 sec - 60°C 5 sec - 72°C 10sec] の条件で 30 サイクル反応し、プライマー検証用鋳型を作成した。

プライマー検証用鋳型は、10⁹~1 copy になるように純水で希釈され、degenerate プライマーの鋳型として使用された。

6. ウイルス RNA の逆転写

感染細胞から抽出されたウイルス RNA による増幅実験を行うため、LCMV M1 または Zaire Ebola ウイルス感染 VeroE6 細胞抽出 RNA を p(dN)₆ により逆転写 (SuperScriptIII, Invitrogen) した cDNA を鋳型として用いた。

7. degenerate プライマーによる PCR

OE-PCR 反応により作成されたウイルス

ゲノム断片を鋳型とした degenerate プライマーによる PCR は、GoTaq Green PCR Mix (プロメガ)によって実施された。反応条件としては、タッチダウン PCR 法を用いた。

すなわち、2×GoTaqMix (Mg²⁺ plus) 12.5 μl、50 pmol の各 degenerate プライマー、OE-PCR で作成された鋳型 DNA に滅菌蒸留水を 25 μl となるように混合し、反応溶液とした。

反応は 95°C 1 min の後、[94°C 30 sec — 67°C 30 sec — 72°C 60 sec] の反応を一回おこない、続けて、[94°C 30 sec — 66°C 30 sec — 72°C 60 sec] の反応を一回行った。このように各回アニーリング温度を 1°C ずつ下げつつ 10 サイクルの反応を実施した。

続けて、[94°C 30 sec — 55°C 30 sec — 72°C 60 sec] の反応条件で 20 サイクルの反応をした。

ウイルスゲノムの cDNA を鋳型とする場合には、GoTaq Green PCR Mix に加え、High Fidelity kit (Roche) も用いられた。

PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動または、マイクロチップ電気泳動装置 (MCE202- MultiNA, 島津) により分析された。

High Fidelity kit では、二種の反応温度サイクルが利用された。すなわち、94°C 5min、[94°C 30sec — 30°C 30sec — 55°C 30sec — 72°C 2min] × 5、[94°C 30sec — 55°C 30sec — 72°C 2min] × 20、72°C 10min または、94°C 5min、[94°C 30sec — 55°C 30sec — 72°C 2min] × 25、72°C 10min が用いられた。ウイルス cDNA の増幅では、GoTaq Green PCR Mix について Expand HiFi と同一の条件([94°C 30sec — 55°C 30sec — 72°C 2min] × 25、72°C 10min) も試みられた。

8. マイクロチップゲル電気泳動

メーカーの手順書に従い、PCR 反応後の反応溶液を機器にセットし、分析した。本報告では、100~400 塩基の PCR 産物が分析対象となったため、分離緩衝液として DNA-500 Separation buffer (島津)を、マーカーとして DNA-500 marker for MultiNA(島津)を用いた。

C 研究結果

1. CoCoMo プログラム(Ver3)によるプライマーの設計

1-1. 旧世界アレナウイルス

Vieth ら(2007)が報告した旧世界アレナウイルス用プライマーが各種旧世界アレナウイルスを共通して効率良く増幅することが報告されていたため、このプライマーが設計に含まれることをプログラムの開発目標とした。そのため、CoCoMo プログラムに入力するウイルスゲノムは、Vieth ら(2007)がプライマー設計に用いた、Mobara ウイルス、5 種の Mopeia ウイルス分離株、2 種の Ippy ウイルス分離株、Dandenong ウイルス(LCMV の変異株)、7 種の Lassa ウイルス分離株、6 種の LCMV 分離株および Mopeia ウイルスと Lassa ウイルスの組換え体の L-Segment 配列全長とした(表 2)。

CoCoMo プログラムは、AANAA などアニリング温度の低さから 3' 端の motif として適切でない 16 種を除いた 240 種のモチーフの局在を 23 種の配列の整列結果について求め、のべ 14,573 か所の局在位置を記録した。これらの局在のうち、整列上の位置の差が 20 塩基以内であった局在位置

(motif・方向・位置)が 562 点あった。これらのうち、flanking 配列の degeneracy が 1024 以下で、かつ 100~500 塩基の PCR 産物を生じる motif は 118 件であった。それらからプライマー候補が作出され、忌避配列の棄却と塩基配列長の調節を行った後、セルフダイマーおよびヘアピンを生じる可能性が低いと判断されたものは 86 件だった。これらのプライマーから 170 組の PCR 用プライマーペアが予想されたが、このうち 16 組についてはプライマーペア間でダイマーが形成されることが想定されたため棄却された。最終的には、80 本のプライマーによる 152 組のプライマーセットが有効な degenerate プライマーとして予想された。

予想されたプライマーを degeneracy の低さとサイズの小ささに応じて順位づけをしたところ、一位となった配列は、Vieth らが提唱したプライマーと同一のウイルスゲノム上の位置で設計されたものであった(表 3)。

プライマーの検証は、OE-PCR の合成長の短いものから検証を進めるため、順位第 3 位で、177 塩基の比較的小さな増幅産物を生成するプライマーセットについて行った(プライマー ID 3)。PCR を検証するためのゲノム断片は、23 件の塩基配列のうち、代表的ウイルス種・株を含む 8 件を選択し、プライマー ID 3 による増幅領域を抽出してリストを作成した(表 4)。続けて、DNA Works2 または独自開発の連結オリゴマー作成ソフトにより、該当するゲノムフラグメントについて相互に重複するオリゴマーを設計し(表 5)、OE-PCR によりウイルスゲノム断片を合成した(図 3)。

8 件のウイルスゲノム断片について実施

された OE-PCR のうち、7 件については 2 回目の PCR の後、目的の 180 塩基付近に明確なバンドが確認されたが、Ippy ウイルスについては、予定よりも小さなバンドが多数存在した(図 3)。ただし、この場合についても 180 塩基にも薄いバンドが認められ、一定比率で目的のバンドが合成されていることが示唆された。これらの合成フラグメントについては、マイクロチップ電気泳動装置が算出した 180 塩基のバンドの定量値を元に、 $1\mu\text{l}$ あたりの copy 数が $10^5 \sim 1$ となるように純水で希釈された。

続けて、希釈された合成フラグメントを鋳型として、旧世界アテナウイルス共通 degenerate プライマーによる PCR 反応を実施した(図 4)。Ippy ウイルスおよび LCMV Mx 株では PCR バンドは 10^5 copies でのみ確認され、Lassa, LCMV Ahmstrong, Mobala, Mopeia および Dandenong ウイルスでは 10^3 copies を鋳型とした場合にも薄いバンドが認められた。また、Lassa Z148 株については、 10^2 copies を鋳型とした場合でもバンドが確認された。

Pair ID1~18 の 13 種のプライマーセットについては、LCMV M1 株感染細胞から抽出されたウイルス RNA 鋳型とした RT-PCR が実施された(図 5)。ID 1, 2, 3, 13, 14, 15 および 18 番のプライマーセットについては、Expand High Fidelity kit で 30°C アニーリングを含む温度サイクル(図 5A)、Expand High Fidelity kit で単純な温度サイクル(図 5B)および GoTaq Mix(図 5C)で増幅産物が確認された。

Pair ID 9,10,16 および 17 番のプライマーセットについては、キットおよび温度サイクルによってバンドが認められたが、一部

の条件ではバンドが目視されなかった。いずれの条件でも、Vieth(2007)のプライマーは強いバンドを示した。

続けて、Primer Pair ID 1, 2, 3, 13 および 15 について LCMV M1 株 RNA を用いて RT-PCR の検出感度を検討した(図 6)。Vieth(2007)のプライマーを標準プライマーセットとして比較したところ、Vieth(2007)のプライマーは、 10^1 copies/reaction、Primer Pair ID 1, 2, 13 は 10^2 copies/reaction、Primer Pair ID 3 は 10^3 copies/reaction までバンドが検出された。

1-2. Ebola ウイルス

Ebola ウイルスは、Zaire, Cote d'Ivoire, Bundibugyo, Sudan および Reston の 5 種が報告されている(Towner et al., PLoS Pathogens 4 (11), e1000212)。プライマー設計には、この 5 種のウイルスゲノムを対象とした(表 6)。

CoCoMo プログラムでは、基本 motif の局在を 5 種の配列の整列結果について求め、のべ 152,573 か所の局在位置を記録した。これらの局在のうち、整列上の位置の差が 20 塩基以内であった局在位置(motif・方向・位置)が 3758 点あった。これらのうち、flanking 配列の degeneracy が 1,024 以下で、かつ 100~500 塩基の PCR 産物を生じる motif は 2,006 件であった。それらからプライマー候補が作出され、セルフダイマーおよびヘアピンを生じる可能性が低いと判断されたものは 1,975 件だった。これらのプライマーから 24,170 組の PCR 用プライマーペアが予想された、コプライマーセットについて、ペア間ダイマーが形成されるセットを棄却し、最終的には 1,975 本のプライマーによる 17,215 組のプライマーセットが、

有効な degenerate プライマーとして予想された(表7に一部を示す)。これらのプライマーの多くは、10塩基以内の相異で相互に重複している領域で設計されていたため、それらを整理したところ、2295のプライマーセットがオリジナルに設計されたことが示された(結果示さず)。

プライマーの検証は、OE-PCRの合成長が短く、かつ degeneracy が低いプライマーセットとして順位第3位(プライマーID 3)のプライマーセットの増幅対象領域について作成することとした(表8)。それぞれ、について独自開発プログラムにより連結オリゴマーが設計され(表9)依頼合成後連結された。

OE-PCRでは5種のウイルス塩基配列について目的の180塩基付近に明確なバンドが確認された(図7)。これらの合成フラグメントについては、マイクロチップ電気泳動装置が算出した180塩基のバンドの定量値を元に、1 μ lあたりの copy 数が目標値となるように純水で希釈された。

続けて、希釈された合成フラグメントを鋳型として、Ebola ウイルス共通 degenerate プライマーによる PCR 反応を実施した(図8)。すべての Ebola ウイルスについて、PCR バンドは1 copy まで確認された。

Zaire Ebola ウイルスについては、抽出 RNA についても degenerate プライマーを用いた増幅実験を行い、IDI および3の二種のプライマーセットについて明確なバンドを得た。

D 考察

本研究では、前年度に開発した CoCoMo プライマー設計アルゴリズムを発展させ、

相同性の比較的低いウイルスグループにも適用可能なプログラムを開発した。プログラムの新興・再興感染症への適用の可能性を検討するために、23件の旧世界アレンウイルス分離株と5種のエボラウイルスについてそれぞれ共通プライマーを設計した。前年度の方法では、6塩基 motif について配列および位置が一致ものを探索するが、旧世界アレンウイルス間では配列とおよその位置が一致する motif は見いだされずプライマーは設計されなかったのに対し(結果示さず)、本年度は、旧世界アレンウイルスで43件、Ebola ウイルスでは17,215組のプライマーが設計された。

degenerate プライマーを motif の局在を基に予測するプログラムは、前年度に初期バージョンが開発され、相互にホモロジーが高いウイルス集団に対して有効な設計が行われた(CoCoMo Ver1)。degenerate プライマーの設計プログラムは、一般的に対象配列数が増えるごとに、また、それぞれの長さが増大するごとに、級数的に計算時間が増大するが、motif の局在に基づく CoCoMo Ver1 は、多数の配列に対しても、計算時間の増大を抑えて短時間でプライマー設計を可能にした。このことから、motif に基づくプライマー設計という方法は、有効性の高い方法であることが示唆された。

本年度においては、前年度に開発した方法(CoCoMo Ver1)を Arena ウイルスに適用することを試みた。Arena ウイルスは、旧世界 arena ウイルスと新世界 arena ウイルスに分けられるが、それらの中でも塩基配列の多様性が大きく、プライマーの設計は難しいといわれている。CoCoMo Ver1 を用いてプライマー設計を試みたところ、有効なプ

プライマーは設計されなかった。本年度、その原因について、検討を進めた結果、arena ウイルス内である程度保存されているアミノ酸配列を、効率よくプライマー設計につなげることが有効との示唆を得た。この検討に基づき、アミノ酸配列を基にプライマーを設計するプログラムを作成したが、工程が複雑になり、計算時間が増大したにも関わらず、十分有効なプライマー設計はなされなかった。そのため、塩基配列 motif 探索とアミノ酸配列相同性の長所を両方生かす検索方法を検討した。その結果、コドンとの同調が可能な 1 塩基のギャップを含む 4 塩基の motif が、有効な探索用 motif として考案された(CoCoMo Ver3)。

本年度改善されたプログラムは、前年度に比べて、多様性の高いウイルス群に対する設計効率が高かった。この効率の高さは、ウイルス間共通のギャップ motif が多数存在することと関係していると考えられる。本年度用いたギャップ motif は 2 組の 2 塩基の固定塩基の motif に、1 塩基の自由塩基を加えたものであるが、2 塩基一致の後 1 塩基は相異を許容するという探索方法は、コドンの縮重のパターンと一致しており、アミノ酸コードの変化を伴わないサイレントな変異の影響を受容するデザインとなっている。そのため、アミノ酸配列が一致する蛋白質レベルでの保存領域で、多くプライマー設計用の motif が検出されたものと考えられる。

ギャップ motif は、2 アミノ酸残基のウイルス間の一致に伴って検出されてしまうため、多数の同一配列のギャップ motif が記録され、適切な選択を行わなければ、プライマーの予測には莫大な計算時間が必要にな

る。そのため、本年度は、motif 選定過程にホモロジーに基づくアライメント(整列)過程を導入した。複数の候補から、精度と計算時間の短さから MAFFT プログラムが選定された。このプログラムの導入により、多数のギャップ motif 一致点から、ウイルス塩基配列上の相同領域を示すギャップ motif 一致点を選択することが可能となった。続けて、仮想 PCR を実施することにより、プライマーとして有効な配列が効率良く選択された。

本年度は、アニーリング温度の算出についても高速のプログラムを整備した。その結果、設計されたプライマー候補についての熱力学的な評価が可能となり、一般的なプライマー設計プログラムと同等の性能をプログラム内に持つに至った。

実験的にウイルス RNA を用いた検出試験では、旧世界アレナウイルスに含まれるが設計に対象配列とならなかった LCMV M1 株で効率の良い PCR 反応が示された。設計対象以外のウイルスでの PCR が可能なことから、塩基配列未報告の新興ウイルスを既知の近縁種から検出することが可能であることが示唆される。

アミノ酸配列の一部が保存される現象は、各種ウイルス群で知られているため、本プログラムは、多種のウイルス群に適用可能であることが期待されている。

本年度は、多様性の高いウイルス群を設計対象としたため、設計された degenerate プライマーの PCR 反応を検証する必要が高まった。ウイルス自体の入手には困難な場合もあるため、人工的な DNA 合成技術により、ゲノムフラグメントを調製することとした。100 塩基以上の配列では、直接的オ

リボヌクレオチド合成では、時間と費用が多大にかかるのに対し、60塩基以下のオリゴマーは、低価格での合成が可能である。近年、60塩基以下のオリゴマーをもとに、アニーリングと連結により、低いコストで100~1,000塩基の塩基配列を合成する技術が開発・改良されている。この技術には、対象の塩基配列から、適切な重複部分を持つオリゴマー群を設計するプログラムにより可能となった。本研究では、プライマー設計に用いたプログラムの一部がゲノム断片の人工合成に転用できたため、独自で人工遺伝子合成用オリゴマーの設計プログラムを作成した。このプログラムは、これまでに試用した13種のうち12種のフラグメントについて、効率の良く合成反応が進んだ。このプログラムを改良することにより、今後、塩基変化が中程度に散在しているウイルスグループについて、一部のオリゴマーをウイルス間で共有することにより、多数の塩基配列の合成コストを下げることも期待される。

塩基配列情報からのゲノム断片の合成が自由に行えるようになったため、設計されたプライマーは全てPCRにより検証された。人工ゲノムフラグメントについて希釈系列を作ることにより、感度も推測することができるようになった。今後は、プライマーの増幅効率を設計プログラムにフィードバックすることにより、これまで以上に効率的なプライマー設計が可能となることが示唆される。

新興ウイルスが疑われる症例でのウイルスの検出は、血清、喀痰や鼻汁など宿主のゲノムおよびRNAが大量に存在している状況で実施することが求められる。そのた

め、宿主ゲノムまたは宿主RNAの存在下でのPCRを検討する必要がある。本年度において、高速のギャップ motifの検索プログラムを開発したため、長大なヒトゲノムについてもギャップ motifを集計し、頻度分析を行うことが可能である。この頻度分析をプライマー設計と連動させることにより、宿主ゲノム混在条件での検出効率の高いプライマーの設計も可能と考えられる。

本年度開発された degenerate プライマーの設計プログラムについては、人工DNA合成ウイルス断片により多種ウイルスを増幅可能であることが示された。また、設計対象に含まれないウイルス株を効率よく検出できたことから、新興・再興ウイルスの検出技術としての有望性が示された。今後、付随して開発されたプログラムと検出技術を活用することにより、より確実に新興・再興ウイルスに対応可能な検出技術を開発することが期待される。

E 結論

本年度は昨年度のPCRプライマー設計アルゴリズムを改良して、アレナウイルスの様に、遺伝子全域に亘って変異が多く、共通プライマーの設定が困難であったウイルスに対しても、プライマー設計が可能であることを、本アルゴリズムにより設計されたプライマーを用いて合成DNA鋳型及びウイルス感染細胞RNAを用いて検証した。同様に新たに出現した Bundibugyo ebola ウイルスを含め全てのエボラウイルス遺伝子を検出できるプライマーの設計も可能であることを示した。このため、本アルゴリズムにより設計されたプライマーを複数用いることにより、近年出現した新種エボラウイルスや新種旧世界アレナウイルスによる出血熱患者

の急性期の病原同定技術の向上が期待される。これらの成果は、同様にウイルス種が多く共通プライマーの設計が困難であった HPS の原因となる新大陸のハンタウイルス群、南米出血熱の原因となる新世界アレンウイルスの特に B クレード群の出血熱ウイルスの共通プライマーの設計に応用可能と考えられる。

F 健康危険情報

該当なし。

G 研究発表

Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi N, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani T. Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). *Emerg Infect Dis.* 2008 ; 14 (2) :347-9.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Sakai K, Ueno Y, Ueda S, Yada K, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Mutoh K, Yoshioka K, Nakamura M, Takehara K, Morikawa S, Mizutani T. : Novel reovirus isolation from an Ostrich (*Struthio camelus*) in Japan. *Vet Microbiol.*, 134: 227-32 2009
2. Yamao T, Eshita Y, Kihara Y, Satho T, Kuroda M, Sekizuka T, Nishimura M, Sakai K, Watanabe S, Akashi H, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Miyata T, Sakata A, Hosokawa M, Nakashima M, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Nakauchi M, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. : Novel virus discovery in field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). *Arch Virol.*, 154(1):153-8, 2008.
3. Saijo M, Morikawa S, and Kurane I. : Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics. *Expert Opin. Med. Diagn.* 2(10): 1151-1171, 2008
4. Ure AE, Ghiringhelli PD, Possee RD, Morikawa S, Romanowski V.: Argentine hemorrhagic fever diagnostic test based on recombinant Junin virus N protein. *J Med Virol.* 2008 ;80(12):2127-33.
5. Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K, Maejima M, Fukushi S, Morikawa S, Taguchi F. : Entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein. *J Virol.* 2008 ;82(23):11985-91.
6. Takimoto K, Taharaguchi M, Morikawa S, Ike F, Yamada YK. : Detection of the antibody to lymphocytic choriomeningitis virus in sera of laboratory rodents infected with viruses of laboratory and newly isolated strains by ELISA using purified recombinant nucleoprotein. *Exp Anim.* 2008;57(4):357-65.
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.* 2008;43(1):56-9.
8. 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-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol.* 2008; 172 (6):1625-37.
9. 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 severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Microbiol Immunol.* 2008; 52 (2) :118-27.

10. 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.* 2008;61(2):140-2.
11. Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi N, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani T. : Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). *Emerg Infect Dis.* 2008;14(2):347-9.
12. Saijo M, Suzutani T, Mizuta K, Kurane I, Morikawa S. : Characterization and susceptibility to antiviral agents of herpes simplex virus type 1 containing a unique thymidine kinase gene with an amber codon between the first and the second initiation codons. *Arch Virol.* 2008; 153(2):303-14.
13. Fukushi S, Watanabe R, Taguchi F. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for analysis of virus entry mediated by SARS coronavirus spike proteins. *Methods Mol Biol.* 2008;454:331-8.
14. Kawase M, Shirato K, Matsuyama S and Taguchi F. (2009) Protease-mediated entry via endosome of human coronavirus 229E. *J. Virol.* 83: 712-721.
15. Yasui, F., Kai, C., Kitabatake, M., Inoue, S., Yoneda, M., Yokochi, S., Kase, R., Sekiguchi, S., Morita, K., Hishima, T., Suzuki, H., Karamatsu, K., Yasutomi, Y., Shida, H., Kidokoro, M., Mizuno, K., Matsushima, K. and Kohara, M. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunol.*, 18(9):6337-48, 2008
16. Takayama, I., Kubo, M., Takenaka, A., Fujita, K., Sugiyama, T., Arai, T., Yoneda, M., Sato, H., Yanai, T. and Kai, C. Pathological and phylogenetic features of prevalent canine distemper viruses in wild Masked palm civets in Japan. *Comp. Immunol. Microb.*, in press, 2008 Sep 5 [Epub ahead of print]
17. Terao-Muto, Y., Yoneda, M., Seki, T., Watanabe, A., Tsukiyama-Kohara, K., Fujita, K. and Kai, C. Heparin-like glycosaminoglycans prevent the infection of measles virus in SLAM-negative cell lines. *Antiviral Res.*, 80: 370-376, 2008.
18. Sato, H., Honma, R., Yoneda, M., Miura, R., Tsukiyama-Kohara, K., Ikeda, F., Seki, T., Watanabe, S., Kai, C. Measles virus induced cell-type specific changes in gene expression. *Virology*, 321-330, 2008.
19. Hagiwara, K., Sato, H., Inoue, Y., Watanabe, A., Yoneda, M., Ikeda, F., Fujita, K., Fukuda, H., Takamura, C., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Sugano, S., Ohmi, S. and Kai, C. Phosphorylation of measles virus nucleoprotein upregulates the transcriptional activity of minigenomic RNA. *Proteomics*, 8, 1871-1879, 2008.6.
20. Inoue, Y., Tshukiyama-Kohara, K., Yoneda, M., Sato, H. and Kai, C. Inhibition of host protein synthesis in B95a cells infected with HL strain of measles virus. *Comp. Immunol. Microb.*, 32:

29-41, 2008.

21. Sato, H., Kobune, F., Ami, Y., Yoneda, M. and Kai, C. Immune responses against measles virus in cynomolgus monkeys. *Comp. Immunol. Microb.*, 31(1), 25-35, 2008.
22. Igarashi, M., Ito, K., Kida, H., and Takada, A. (2008) Genetically destined potentials for N-linked glycosylation of influenza virus hemagglutinin. *Virology* 376 (2) : 323-329.
23. Kishida, N., Sakoda, Y., Shiromoto, M., Bai, G.R., Isoda, N., Takada, A., Laver, G., and Kida, H. (2008) H2N5 influenza virus isolates from terns in Australia: genetic reassortants between those of the Eurasian and American lineages. *Virus Genes* 37(1) : 16-21.
24. Murakami S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Kiso M, Kida H, Takada A, Nidom CA, Mai le Q, Yamada S, Imai H, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y, Horimoto T. (2008) Cross-clade protective immunity of H5N1 influenza vaccines in a mouse model. *Vaccine* 26(50) : 6398-6404.
25. Soda, K., Ozaki, H., Sakoda, Y., Isoda, N., Haraguchi, Y., Sakabe, S., Kuboki, N., Kishida, N., Takada, A., and Kida H. (2008) Antigenic and genetic analysis of H5 influenza viruses isolated from water birds for the purpose of vaccine use. *Arch. Virol.* 153 (11) : 2041-2048.
26. Sakuma, T., Noda, T., Urata, S., Kawaoka, Y., and Yasuda, J.: Inhibition of Lassa and Marburg virus production by Tetherin. *Journal of Virology*, 83, 2382-2385, 2009.2
27. Chandy, S., Yoshimatsu, K., Ulrich, R.G., Mertes, M., Okumura, M., John, T., Balraj, V., Muliylil, J., Mammen, J., Abraham, P., Arikawa, J., Sridharan, G.: Seropidemiological study on hantavirus infections in India. *ELESEVIER/Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102.70-74, 2008
28. Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Hatsuse, R., Okumura, M., Nakamura, I., Arikawa, J.: Lack of vertical transmission of Hantaan virus from persistently infected dam to progeny in laboratory mice. *Arch Virol in press*
29. Yamamoto, H., Li, Tian-Cheng., Koshimoto, C., Ito, K., Kita, M., Miyashita, N., Arikawa, J., Yagami, K., Asano, M., Tezuka, H., Suzuki, N., Kurosawa, T., Shibahara, T., Furuya, M., Mohri, S., Sato, H., Ohsawa, K., Ibuki, K., Takeda, N.: Serological Evidence for Hepatitis E Virus infection in Laboratory Monkeys and Pigs in Animal Facilities in Japan. *Exp. Anim.* 57(4), 367-376, 2008
30. Arai, S., Ohdachi, D.S., Asakawa, M., Kang, H.J., Mocz, G., Arikawa, J., Okabe, N., Yanagihara R. : Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotichus talpodeis*). *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (42): 16296-301, 2008
31. Nakamura, I., K. Yoshimatsu, B. H. Lee, M. Okumura, M. Taruishi, K. Araki, H. Kariwa, I. Takashima, and J. Arikawa. : Development of a serotyping ELISA system for Thailand virus infection. *Arch Virol* 153:1537-42, 2008
32. 有川二郎 : 「ハンタウイルス肺症候群」新臨床内科学 (第9版) (2008.3)

33. 有川二郎：「ハンタウイルス」 ウイルスハンドブック No.10 2. 呼吸器系ウイルス (2008.4) (p25～27)
34. 有川二郎：「ハンタウイルス肺症候群 (HPS)」特集 輸入感染の可能性のある希少感染症 Vol.24, No.11,(2008.10) 化学療法の領域『医科ウイルス学』南江堂
35. 有川二郎：「10ハンタウイルス」バイオセーフティの事典 病原微生物とハザード対策の実際 [バイオメディカルサイエンス研究会] 編集 (P285～P287) 2008.12.10
36. 有川二郎：「腎症候性出血熱」小児疾患診療のための病理生理 小児内科 40 増刊号 第4版 (P1222～P1225) 2008
37. 林 昌宏,チクングニヤ熱,化学療法の領域, 24 (11):1606-1613, 2008
38. 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
39. 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