

|    |      |                               |      |                           |   |     |
|----|------|-------------------------------|------|---------------------------|---|-----|
| 43 | 1128 | AGCAGCAGTGGTGGTGA             | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTCCC      | 0 | 135 |
| 44 | 1854 | GAAGACTTACACAAGCCTGGG         | 1944 | TGGCTATACCTAAAGTCATGAATCC | 0 | 135 |
| 45 | 1862 | AAGACTTACACAAGCCTGGG          | 1959 | TTGGCTATACCTAAAGTCATGAATC | 0 | 135 |
| 46 | 1854 | GAAGACTTACACAAGCCTGGG         | 1959 | TTGGCTATACCTAAAGTCATGAATC | 0 | 136 |
| 47 | 1730 | GGACAGTTATYTGACCACCCC         | 1829 | CCAGGCTTGTGTAAGTCTTCA     | 1 | 103 |
| 48 | 1172 | GAASAACTCAGTGAAGCAGCTTT       | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCC         | 1 | 103 |
| 49 | 1172 | GAASAACTCAGTGAAGCAGCTTT       | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTCCC      | 1 | 104 |
| 50 | 1735 | ATGGACAGTTATYTGACCACCCC       | 1829 | CCAGGCTTGTGTAAGTCTTCA     | 1 | 104 |
| 51 | 1730 | GGACAGTTATYTGACCACCCC         | 1839 | CCCAGGCTTGTGTAAGTCTTC     | 1 | 104 |
| 52 | 1166 | GAASAACTCAGTGAAGCAGCTT        | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCC         | 1 | 104 |
| 53 | 1738 | CATGGACAGTTATYTGACCACCC       | 1829 | CCAGGCTTGTGTAAGTCTTCA     | 1 | 105 |
| 54 | 1167 | TGAASAACTCAGTGAAGCAGCT        | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCC         | 1 | 105 |
| 55 | 1166 | GAASAACTCAGTGAAGCAGCTT        | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTCCC      | 1 | 105 |
| 56 | 1735 | ATGGACAGTTATYTGACCACCCC       | 1839 | CCCAGGCTTGTGTAAGTCTTC     | 1 | 105 |
| 57 | 1730 | GGACAGTTATYTGACCACCCC         | 1836 | GCCCAGGCTTGTGTAAGTCTT     | 1 | 105 |
| 58 | 1735 | ATGGACAGTTATYTGACCACCCC       | 1836 | GCCCAGGCTTGTGTAAGTCTT     | 1 | 106 |
| 59 | 1730 | GGACAGTTATYTGACCACCCC         | 1824 | GCCCAGGCTTGTGTAAGTCT      | 1 | 106 |
| 60 | 1738 | CATGGACAGTTATYTGACCACCC       | 1839 | CCCAGGCTTGTGTAAGTCTTC     | 1 | 106 |
| 61 | 1167 | TGAASAACTCAGTGAAGCAGCT        | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTCCC      | 1 | 106 |
| 62 | 1170 | CTGAASAACTCAGTGAAGCAGC        | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCC         | 1 | 106 |
| 63 | 1170 | CTGAASAACTCAGTGAAGCAGC        | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTCCC      | 1 | 107 |
| 64 | 1735 | ATGGACAGTTATYTGACCACCCC       | 1824 | GCCCAGGCTTGTGTAAGTCT      | 1 | 107 |
| 65 | 1738 | CATGGACAGTTATYTGACCACCC       | 1836 | GCCCAGGCTTGTGTAAGTCTT     | 1 | 107 |
| 66 | 1164 | CTCTGAASAACTCAGTGAAGCAG       | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCC         | 1 | 107 |
| 67 | 1730 | GGACAGTTATYTGACCACCCC         | 1819 | GCCCAGGCTTGTGTAAGTC       | 1 | 107 |
| 68 | 1164 | CTCTGAASAACTCAGTGAAGCAG       | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTCCC      | 1 | 108 |
| 69 | 1735 | ATGGACAGTTATYTGACCACCCC       | 1819 | GCCCAGGCTTGTGTAAGTC       | 1 | 108 |
| 70 | 1738 | CATGGACAGTTATYTGACCACCC       | 1824 | GCCCAGGCTTGTGTAAGTCT      | 1 | 108 |
| 71 | 1159 | CTCTGAASAACTCAGTGAAGCA        | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCC         | 1 | 108 |
| 72 | 1139 | AGCTCTGAASAACTCAGTGAAGC       | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCC         | 1 | 109 |
| 73 | 1738 | CATGGACAGTTATYTGACCACCC       | 1819 | GCCCAGGCTTGTGTAAGTC       | 1 | 109 |
| 74 | 1159 | CTCTGAASAACTCAGTGAAGCA        | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTCCC      | 1 | 109 |
| 75 | 1139 | AGCTCTGAASAACTCAGTGAAGC       | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTCCC      | 1 | 110 |
| 76 | 1150 | AAAGCTCTGAASAACTCAGTGAA<br>G  | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCC         | 1 | 110 |
| 77 | 1150 | AAAGCTCTGAASAACTCAGTGAA<br>G  | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTCCC      | 1 | 111 |
| 78 | 1156 | GAAAGCTCTGAASAACTCAGTGAA<br>A | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCC         | 1 | 111 |
| 79 | 1152 | GAAAGCTCTGAASAACTCAGTGAA      | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCC         | 1 | 112 |
| 80 | 1156 | GAAAGCTCTGAASAACTCAGTGAA<br>A | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTCCC      | 1 | 112 |
| 81 | 1143 | TGAAAGCTCTGAASAACTCAGTGA      | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCC         | 1 | 113 |
| 82 | 1152 | GAAAGCTCTGAASAACTCAGTGAA      | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTCCC      | 1 | 113 |
| 83 | 1143 | TGAAAGCTCTGAASAACTCAGTGA      | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTCCC      | 1 | 114 |
| 84 | 1146 | GTGAAAGCTCTGAASAACTCAGTG      | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCC         | 1 | 114 |
| 85 | 1155 | GGTGAAAGCTCTGAASAACTCAGT      | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCC         | 1 | 115 |
| 86 | 1146 | GTGAAAGCTCTGAASAACTCAGTG      | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTCCC      | 1 | 115 |
| 87 | 1148 | GGTGAAAGCTCTGAASAACTCAG       | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCC         | 1 | 116 |
| 88 | 1863 | AAGCCTGGGCRAGTTAGC            | 1961 | AGTCATGAATCCTTGACGCACT    | 1 | 116 |

|     |      |                         |      |                        |   |     |
|-----|------|-------------------------|------|------------------------|---|-----|
| 89  | 1155 | GGTGAAGCTCTGAASAACTCAGT | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTGCC   | 1 | 116 |
| 90  | 1863 | AAGCCTGGGCRAGTTAGC      | 1946 | AGTCATGAATCCTTGACGAC   | 1 | 117 |
| 91  | 1860 | ACAAGCCTGGGCRAGTTAG     | 1961 | AGTCATGAATCCTTGACGACT  | 1 | 117 |
| 92  | 1141 | GGTGAAGCTCTGAASAACTCA   | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCCG     | 1 | 117 |
| 93  | 1148 | GGTGAAGCTCTGAASAACTCAG  | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTGCC   | 1 | 117 |
| 94  | 1847 | CACAAGCCTGGGCRAGTTA     | 1961 | AGTCATGAATCCTTGACGACT  | 1 | 118 |
| 95  | 1863 | AAGCCTGGGCRAGTTAGC      | 1951 | AAGTCATGAATCCTTGACGCA  | 1 | 118 |
| 96  | 1860 | ACAAGCCTGGGCRAGTTAG     | 1946 | AGTCATGAATCCTTGACGAC   | 1 | 118 |
| 97  | 1140 | GTGGTGAAGCTCTGAASAACTC  | 1266 | TCTCCTGAACTGGTCCCG     | 1 | 118 |
| 98  | 1141 | GGTGAAGCTCTGAASAACTCA   | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTGCC   | 1 | 118 |
| 99  | 1863 | AAGCCTGGGCRAGTTAGC      | 1963 | CTAAAGTCATGAATCCTTGACG | 1 | 119 |
| 100 | 1140 | GTGGTGAAGCTCTGAASAACTC  | 1264 | GATTCTCCTGAACTGGTGCC   | 1 | 119 |

図1 CoCoMo プログラムの模式図

A: 対象配列の整理

|     |                    |
|-----|--------------------|
| A 株 | ATGGCGGCCGTATGTGCC |
| B 株 | ATGGGGCGTATGAGCC   |
| C 株 | ACCGCGGCTGTGCG     |
|     | ↓                  |
| A 株 | ATGGCGGCCGTATGAGCC |
| B 株 | ATGGC-GCCGTATGACCC |
| C 株 | ATCGCGG-C---TGAGCG |

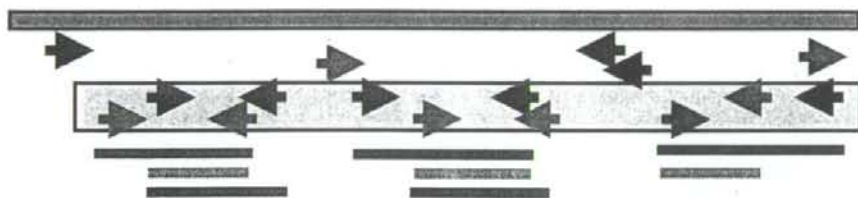
B: ギャップ motif 検索の概念図

|                               |                                  |
|-------------------------------|----------------------------------|
| A                             | 株                                |
| GCCAGATGGCGGCCGTATGAGCGAATGCG |                                  |
| B                             | 株                                |
| ギャップmotif                     | ATYGC                      GASCG |

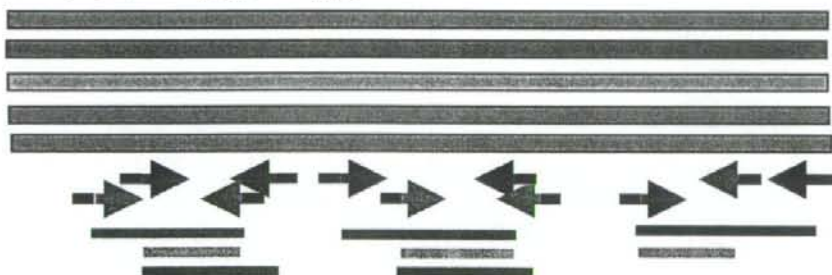
C: motif flanking 配列の抽出と degenerate 配列の決定

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Å                             | 株      |
| GCCAGATGGCGGCCGTATGAGCGAATGCG |        |
| B                             | 株      |
| GCCAG                         | AATGCG |
| CGGGG                         | ATACCC |
| SSSRGATYGC                    |        |

D: プライマー候補 1 の仮想 PCR



E: プライマー候補 1 の伸長



F: 忌避配列を含む候補の棄却



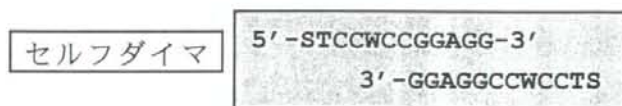
G: プライマー候補 2 による仮想 PCR



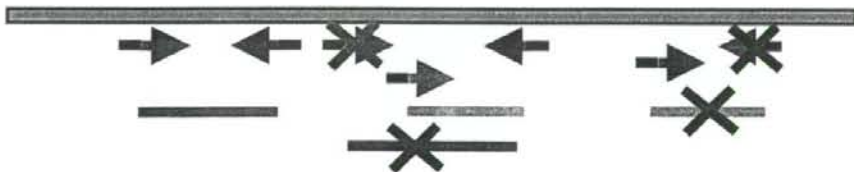
H: プライマー候補 2 の塩基長の調整



I: プライマー候補 3 の評価



J: プライマー候補 3 の評価



K: プライマーペア候補 2 の評価

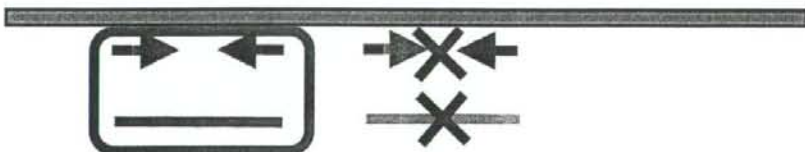


図2 OE-PCR法の概念図

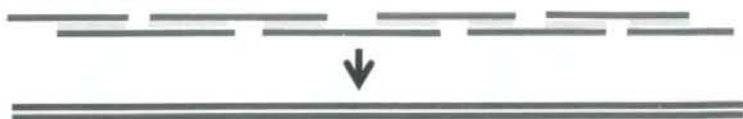


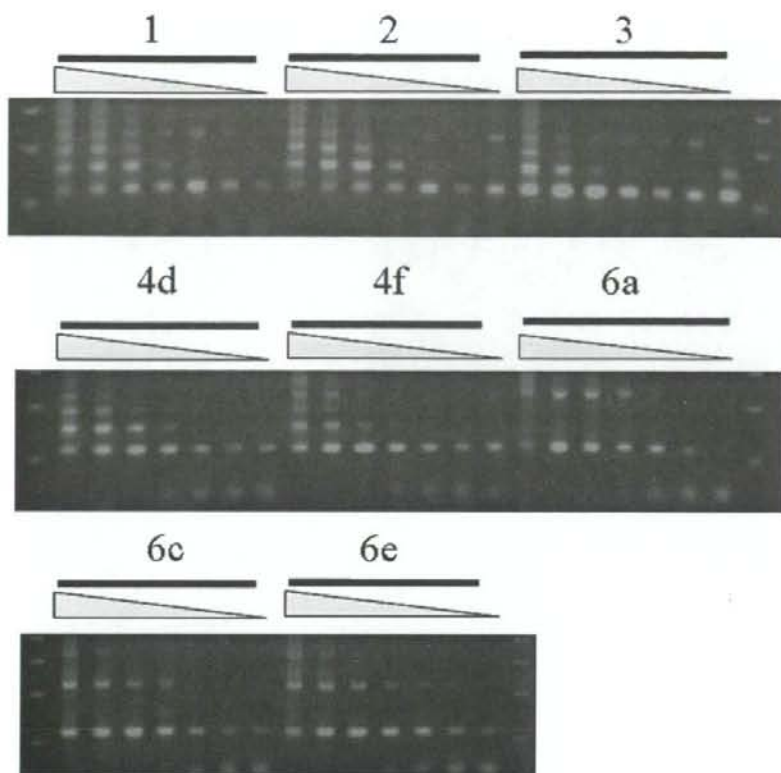
図3 HCV ゲノム断片の OE-PCR

Genotype 1 2 3 4d 4f 6a 6c 6e



HCV の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントのアガロース電気泳動像。PCR 反応は PrimerStarHS キットによって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左端マーカを示す。

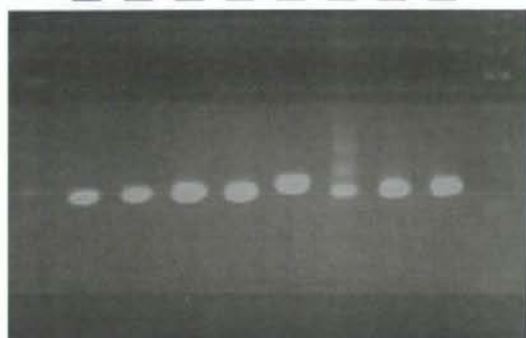
図4 HCV OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅



HCV の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントを鋳型として degenerate プライマーで一部を増幅した PCR 産物のアガロース電気泳動像。各レーンの上一段目に OE-PCR の分子設計の元となった Genotype および Subtype の名称を、二段目に OE-PCR 産物の copy 数の序列を示す。三角形の底辺から  $10^9$ ,  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  および  $10^0$  の OE-PCR 産物が理論的に PCR 反応の鋳型として用いられたことを示す。PCR 反応は GoTaqMixture によって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左端にマーカーの位置を示す。

図5 HBV ゲノム断片の OE-PCR

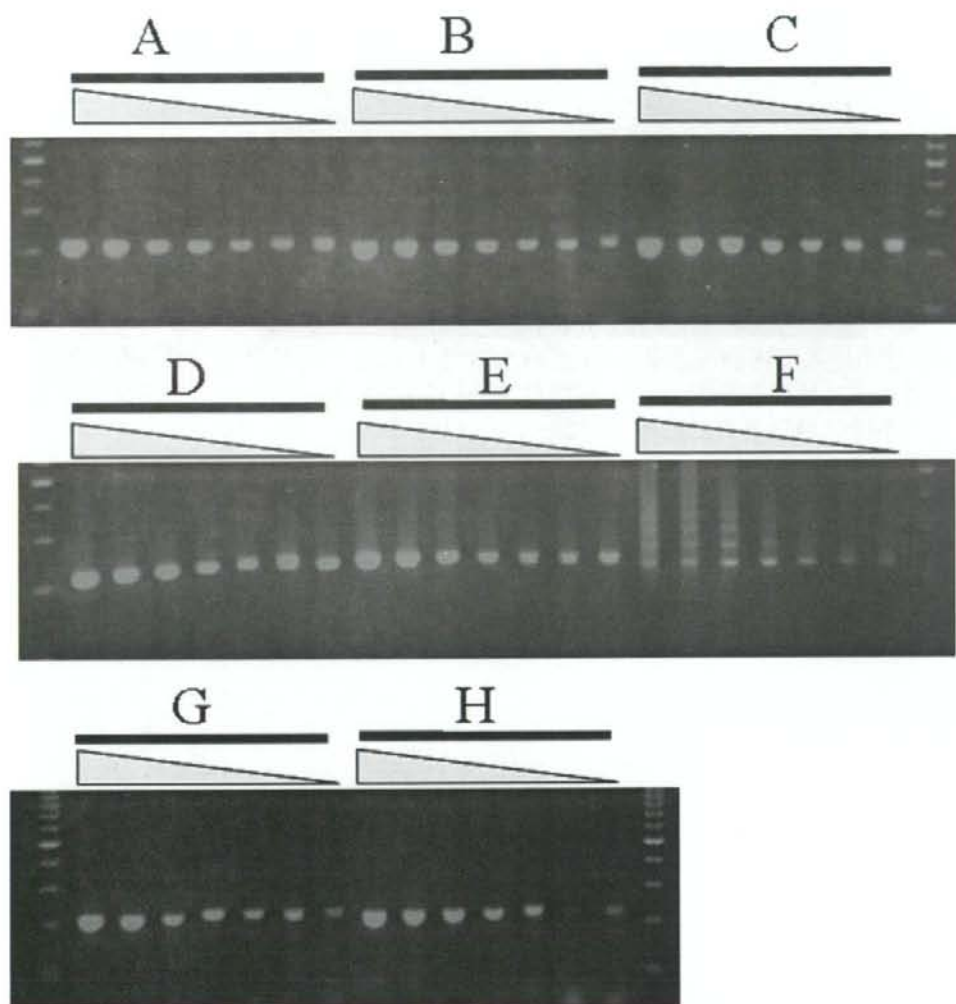
Genotype    A   B   C   D   E   F   G   H



HBV の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントのアガロース電気泳動像。PCR 反応は PrimerStarHS キットによって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左端マーカを示す。



図6 HBV OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅

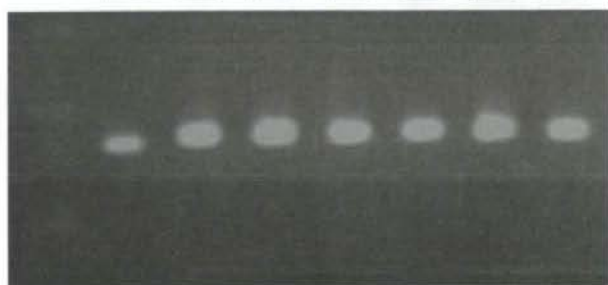


HCV の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントを鋳型として degenerate プライマーで一部を増幅した PCR 産物のアガロース電気泳動像。各レーンの上一段目に OE-PCR の分子設計の元となった Genotype の名称を、二段目に OE-PCR 産物の copy 数の序列を示す。三角形の底辺から  $10^9$ ,  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  および  $10^0$  の OE-PCR 産物が理論的に PCR 反応の鋳型として用いられたことを示す。PCR 反応は GoTaqMixture によって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左端にマーカーの位置を示す。



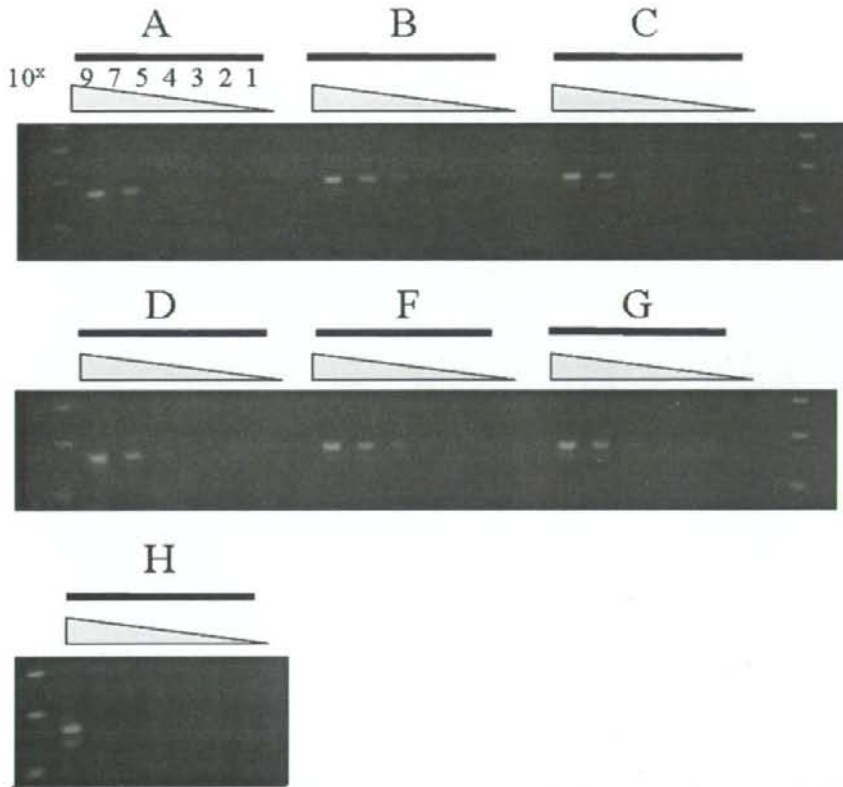
図7 HIV-1 ゲノム断片の OE-PCR

Genotype    A    B    C    D    F    G    H



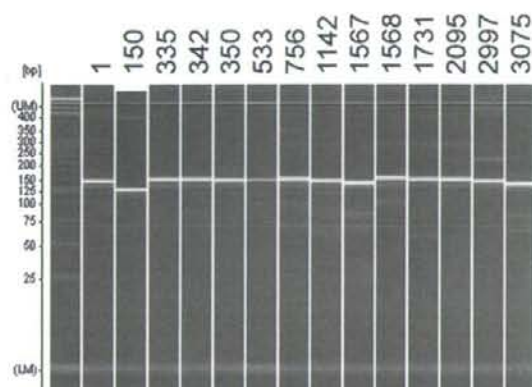
HIV-1 の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントのアガロース電気泳動像。PCR 反応は PrimerStarHS キットによって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左端マーカを示す。

図8 HIV-1 OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅



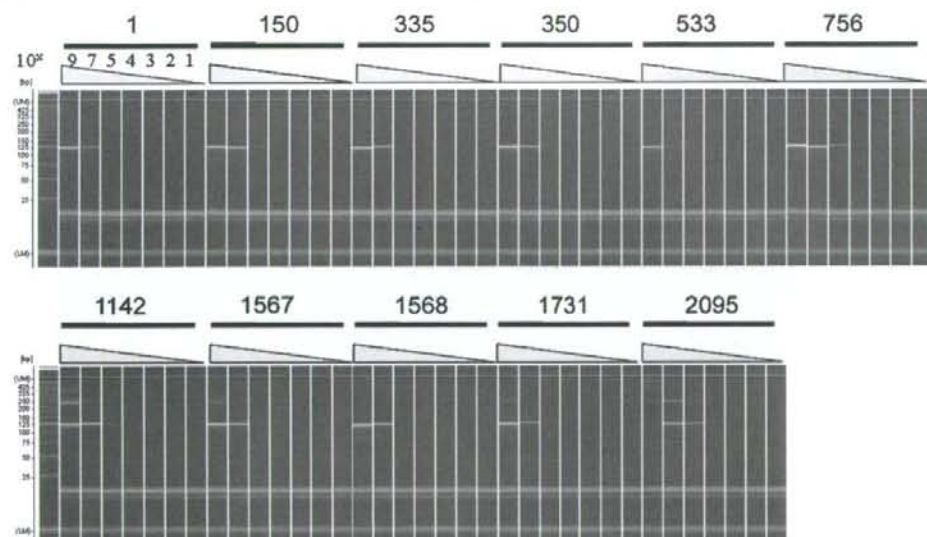
HIV-1 の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントを鋳型として degenerate プライマーで一部を増幅した PCR 産物のアガロース電気泳動像。各レーンの上一段目に OE-PCR の分子設計の元となった Genotype の名称を、二段目に OE-PCR 産物の copy 数の序列を示す。三角形の底辺から  $10^9$ ,  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  および  $10^0$  の OE-PCR 産物が理論的に PCR 反応の鋳型として用いられたことを示す。PCR 反応は GoTaqMixture よって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左端にマーカーの位置を示す。

図 9 HEV ゲノム断片の OE-PCR



HEV の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントのマイクロチップ電気泳動像。各レーンには、塩基配列情報の元になった塩基配列の ID(表 15)を示す。PCR 反応は PrimerStarHS キットによって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左にマイクロチップ電気泳動装置が算出したマーカの位置を示す。

図 10 HEV OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅



HEV の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントを鋳型として degenerate プライマーで一部を増幅した PCR 産物のマイクロチップ電気泳動像。各レーンの上一段目に OE-PCR の分子設計の元となった塩基配列の ID(表 15)を、二段目に OE-PCR 産物の copy 数の序列を示す。三角形の底辺が

ら  $10^9$ ,  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  および  $10^0$  の OE-PCR 産物が理論的に PCR 反応の鋳型として用いられたことを示す。PCR 反応は GoTaqMixture よって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左にマイクロチップ電気泳動装置が算出したマーカの位置を示す。

厚生労働科学研究補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究

ウイルス遺伝子の非特異的増幅方法の確立

|       |   |  |
|-------|---|--|
| 研究分担者 | 国立感染症研究所ウイルス第一部<br>血液・安全性研究部  | 水谷哲也<br>浜口功・山口一成                                       |
| 研究協力者 | 日本パーカーライジング広島工場<br>酪農学園大学獣医学部<br>国立感染症研究所血液・安全性研究部<br>大分大学医学部<br>福岡大学医学部<br>東京大学農学部 | 中島龍生・木場佳治<br>遠藤大二<br>滝澤和也・水上拓郎<br>江下優樹<br>佐藤朝光<br>明石朝臣 |

**研究要旨**

これまでに複数のウイルス遺伝子を非特異的に増幅することにより操作の簡便化を狙った研究をおこない、キアゲン社の QuantiTect Whole transcriptome kit をベースに、合成アルブミン mRNA を用いて操作の簡便化と感度の上昇を目標に改良を行った。この方法は、我々が開発した Rapid determination system of viral nucleic acid sequences (RDV 法) のバージョン 4 という位置付けになった。数 100 分子の遺伝子を非特異的に増幅して、ダイレクトシーケンスにより、特定のウイルスを検出することが可能になった。しかし、操作はまだ簡便ではなくある程度の熟練した操作が必要であることから、この方法を基準にして非特異的増幅方法の見直しを行った。

**A. 研究目的**

昨年度は複数のウイルス遺伝子を非特異的に増幅することにより操作の簡便化を狙った研究をおこない、キアゲン社の QuantiTect Whole transcriptome kit をベースに、合成アルブミン mRNA を用いて操作の簡便化と感度の上昇を目標に改良を行った。この方法は、我々が開発した

Rapid determination system of viral nucleic acid sequences (RDV 法) のバージョン 4 という位置付けになった。数 100 分子の遺伝子を非特異的に増幅して、ダイレクトシーケンスにより、特定のウイルスを検出することが可能になった。しかし、操作はまだ簡便ではなくある程度の熟練した操作が必要であることから、この方法を基準にして非特異的増幅方法

の見直しをおこなう。

ウイルス核酸の検出において、非特異的な増幅ではないがある特定のウイルス種を幅広く検出する方法がいくつかある。本研究班では HCV、HBV、HIV について degenerate primer を用いた増幅について検討をおこなっている。PCR 増幅産物は primer 間に存在する配列をプローブにした DNA チップで検出され、標的ウイルスの増幅を確認している。実際に血液製剤からこれらのウイルスが検出されたときには、確定の検査が必要になる。一般に、PCR 増幅産物の確定には DNA チップは用いられず、遺伝子配列の決定を行う。遺伝子配列の決定は、(1)増幅に用いたプライマーを使ってダイレクトシーケンス、もしくは(2)増幅産物をプラスミドにクローニングして大腸菌で増やしたのちにプラスミド上の配列をプライマーとして使用してシーケンスをおこなう。後者の場合には実験室中に舞う大腸菌がいわゆる DNA コンタミネーションの原因になり、それ以降の検査に影響を及ぼすので敬遠される。前者は簡便な方法であるが、degenerate primer の場合には効率よくシーケンスのプライマーにならないので塩基配列を決定できない。そこで、本研究では、DNA チップによる検出後の確定を目的とした、degenerate primer 増幅産物のダイレクトシーケンスの新しい技術を開発する。

## B. 研究方法

### 1. 簡便な非特異的増幅方法

(1) Templify を用いた増幅：GEヘルスケア社の Templify は試薬を 2 回加える

だけの簡単な増幅方法である。Templify は特にプラスミドなどの環状 DNA の増幅効率が良い。そこで、部分的環状構造を取る HBV について検討した。HBV-1 を 1000, 100, 10, 1, 0, -1 分子用意し、マニュアルに従って Templify の反応をおこなった後に HBV specific primer を用いて PCR をおこなった。

(2) Genomiphi HY を用いた増幅：GEヘルスケア社の Genomiphi HY は反応時間が 18 時間必要であるので迅速性に欠けているが、増幅効率は優れているので同様に検討した。

(3) その他、Loopamp (栄研化学) や PyroPhage3137 DNA polymerase (フナコシ)、DOP-PCR 法 (ロシユ社) などの非特異的増幅キットを検討した。また、独自の方法として、Phi29 酵素と Locked nucleic acid 標識を組み合わせた primer を用いる方法などを試みた。

(4) 増幅効率の良い結果が得られた方法について、HBV のほかに HCV, HIV についても検討した。

### 2. Degenerate primer 増幅産物のダイレクトシーケンス (図 1)

コウモリの脾臓から DNA を抽出後、広範にヘルペスウイルスを検出できる degenerate primer (TGV, IYG, KGI) を用いて PCR をおこなった。最終的に約 200bp の増幅産物が得られたので、制限酵素 HaeIII で切断後、RDV adaptor を結合した。TGV primer と 16 種類の RDV primer (N1-16) で個別に PCR をおこなった。得られた増幅産物について、ダイレクトシーケンスを実施した。



## C. 研究結果

### 1. 簡便な非特異的増幅方法

Templify はマニュアル通りに増幅しても効率の良い結果は得られなかったが、dNTP を過剰に添加することにより増幅効率は大幅に改善された。特に、最終濃度 1667 $\mu$ M のときに、1000 倍以上の増幅が見られたが不安定な反応であることがわかった。一方、Genomiphi HY では 100 分子の HBV が約 5000 倍に増幅された。本方法は反応時間が長いのが欠点であるが、反応自体は簡単なので実用的であると考えられる。他の方法では HBV の遺伝子はほとんど増幅されなかった。そこで、HIV, HBV, HCV を含んだ (不活化) 血清の標準品、Accurun、を用いて Genomiphi HY を検討した。各血清 50 $\mu$ l を出発材料として RNA と DNA を同時に抽出し、そのうち 6 $\mu$ l を cDNA 化した。20 $\mu$ l の cDNA 中、2.5 $\mu$ l を Genomiphi HY の反応に用いた。反応後、cDNA と増幅産物を希釈した溶液について、ウイルス特異的なプライマーで PCR を行うことにより、増幅効率を判定した。その結果、HCV と HBV では 10000 倍以上、HIV では 1000 倍以上増幅されていた (図 2)。

### 2. Degenerate primer 増幅産物のダイレクトシーケンス

方法に示したように、TGV primer と RDV primer のうち N8 primer において、約 100bp の増幅産物が得られた。そこで、N8 primer からダイレクトシーケンスをおこない遺伝子配列を決定したところ、約 80bp の配列情報が得られ、新しいヘルペスウイルスの配列であることがわかった。

この 80bp の配列から specific primer をデザインして TGV-KGI 間の塩基配列をダイレクトシーケンスにより決定した。このウイルスを *Hipposideros diadema* herpesvirus (HDHV) と名付けた。系統樹から、HDHV はガンマヘルペスウイルスに属することがあきらかになった。

## D. 考察

Genomiphi HY はどのウイルスも効率良く非特異的に増幅できるキットである。一昨年に報告した RDV ver4.0 にこのキットを組み合わせることで更に改良可能であると考えられる。一方、本研究で開発した新しいダイレクトシーケンス法は、degenerate primer で増幅されたウイルス遺伝子がどのような配列であっても、最終的にはダイレクトシーケンスできることを示している。

## E. 結論

本研究は DNA チップと組み合わせることにより、特定ウイルスの検出や確定をおこなうことができる (図 3)。

## F. 研究報告

Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi M, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani T. Isolation of a novel adenovirus from a fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). *Emerging Infectious Diseases* 2008, 14: 347-349.

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: 56-59.

(Corresponding author: Tetsuya Mizutani)

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: 140-142.

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.* (in press)  
(Corresponding author: Tetsuya Mizutani)

Nakamura S, Yang CS, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, Goto N, Takahashi K, Yasunaga T, Ikuta K, Mizutani T, Okamoto Y, Tagami M, Morita R, Maeda N, Kawai J, Hayashizaki Y, Nagai Y, Horii T, Iida T, Nakaya T. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput

sequencing approach. *PLoS ONE.* 2009. 4:e4219.

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 from field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). *Arch Virol.* 2009. 154. 153-158.

(Corresponding author: Tetsuya Mizutani)

Kazuya Shirato and Tetsuya Mizutani. Tumor necrosis factor and carcinoma by hepatitis C and B virus-infection. In *Oncogene and Proteins: New Research* (edited by Artur H. Malloy and Earl C. Carson). Nova Publishers. 2008. pp273-287.

(Corresponding author: Tetsuya Mizutani)

Kazuya Shirato and Tetsuya Mizutani. Viral Proteins, Host Cell Proteins, and Manipulation of the Cell Cycle by Viruses. In *Progress in cell growth process research.* (edited by T. Hayashi) Nova Publishers. 2008.

Pp135-147.

(Corresponding author: Tetsuya Mizutani)

崎病の原因微生物の同定」 in 関東川崎病研究会レポート No.23 (in press)

Kazuya Shirato and Tetsuya Mizutani.  
Replication, Transcription, and Translation of Coronaviruses. In Viral Genomes. (edited by Zhi Freng and Ming Long) Nova Publishers. (In press)

(Corresponding author: Tetsuya Mizutani)

Tetsuya Mizutani. Signaling pathways of SARS-CoV in vitro and in vivo. In Molecular Biology of the SARS-Coronavirus (Edited by Sunil K Lai) (in press)

水谷哲也 「川崎病ウイルス病因説」 アクチュアル小児科診療 -Actual Series of Clinical Pediatrics. 「川崎病のすべて」(総編集:五十嵐隆、専門編集:石井正浩) 中山書店 (印刷中)

Tetsuya Mizutani. Characterization of Signaling Pathways in Cells Infected with SARS-CoV. In Host Gene Responses to RNA Viral Infection. Edited by Decheng Yang. World Scientific Publishing. In press

(Corresponding author: Tetsuya Mizutani)

水谷哲也 「大量シーケンスによる川

1

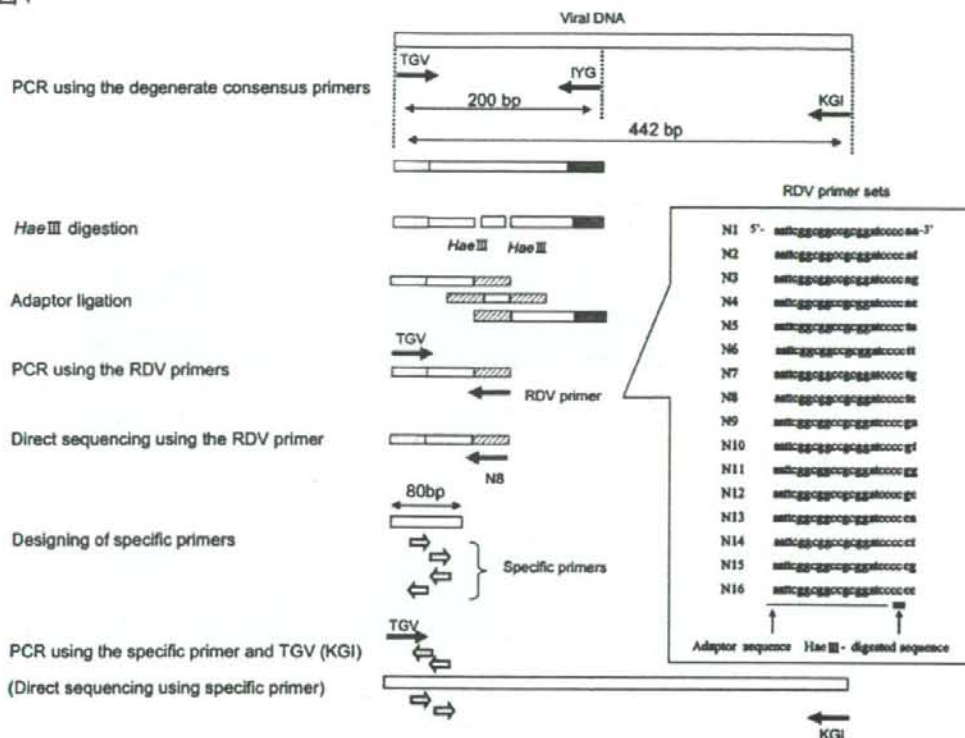


図2

増幅産物を希釈して原液cDNAと比較

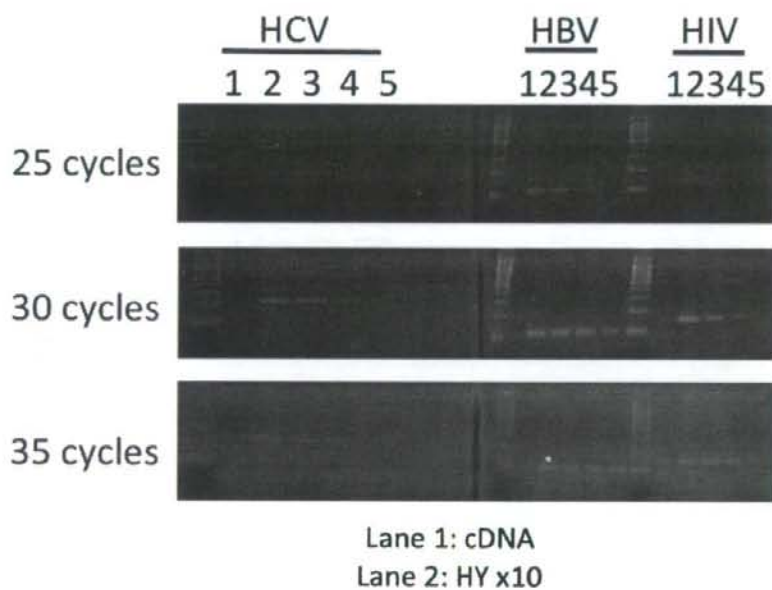


図 3

