

- 森川茂. コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルスの臓器親和性と病原性. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 2) 佐山勇輔, 福士秀悦, 斎藤麻理子, 飯塚愛恵, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 鈴木陽, 神垣太郎, 玉記雷太, 倉根一郎, 押谷仁, 森川茂. フィリピンのレストンエボラウイルス感染症のウイルス遺伝子解析と感染状況の実態調査. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 3) 岩田奈織子, 永田典代, 辻隆裕, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 横田恭子, 水谷哲也, 西條政幸, 森川茂, 佐多徹太郎. SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の免疫効果と副作用について. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 4) 中道一生, 伊藤陸代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 定位微量投与系を用いたマウスポリオーマウイルスの脳における持続感染様式の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 5) 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, Austin Ure, Victor Romanowski, 森川茂. 南米出血熱の実験室診断法の開発. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 6) 水谷哲也, 前田健, 渡辺俊平, 久和茂, 吉川泰弘, 明石博臣, 中内美名, 酒井宏治, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. ウイルスの網羅的検出法 (RDV 法 ver 3.1) を用いたコウモリ由来新規  $\beta$  ヘルペスウイルスの同定. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 7) 飯塚愛恵, 塩田智之, 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 水口雅, 森川茂. 痘そうワクチン LC16m8 株の温度感受性に関する解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 8) 森川茂, 福士秀悦, 酒井宏治, 永田典代, 長谷川秀樹, 松井珠乃, 水谷哲也, 平井理香, 網康至, 緒方もも子, 西條政幸, 山田靖子, 岡部信彦, 佐多徹太郎, 倉根一郎. カニクイザルの致死的イヌジステンパーウイルス感染事例の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 9) 塩田智之, 飯塚愛恵, 森川茂, 倉根一郎, 水口雅, 西條政幸. 293T 細胞を用いた単純ヘルペスウイルスならびに水痘帯状疱疹ウイルス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 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 10) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. SARS-CoV 感染動物における宿主 Th1/Th2 バランスと重症化の関連. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 11) 酒井宏治, 永田典代, 岩田奈織子, 長

- 谷川秀樹, 松井珠乃, 網康至, 平井理香, 須崎百合子, 水谷哲也, 福士秀悦, 緒方もも子. 西條政幸, 藤本嗣人, 山田靖子, 岡部信彦, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 森川茂. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 12) 中道一生, 伊藤陸代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 脳脊髄液中の JC ポリオーマウイルスを検出するためのリアルタイム PCR 検査系の確立と進行性多巣性白質脳症 (PML) の診断支援. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 13) 西條政幸, 網至康, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 新村靖彦. 横手公幸, 飯塚愛恵, 塩田智之, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂. 痘そうワクチン LC16m8 および Lister 株免疫時における IMV および EEV 蛋白に対する抗体応答とサル痘予防効果. 第 13 回日本ワクチン学会学術総会, 札幌 (2009.09)
- 14) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Iizuka, I., Shiota, T., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Pathology of monkeypox in nonhuman primates leading to the difference in virulence between Gongo Basin and West African strains. 43rd Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program and Special Minisymposium on enterovirus 71, Philadelphia, PA (2009.07)
- 15) Bukbuk, D.N., Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., George, A., Shuetsu, F., Mizutani, T., Kurata, T., Kurane, I., Morkawa, S.: Recombinant nucleocapsid protein-based diagnosis of and seroepidemiological study on Lassa fever. The 109th ASM General Meeting, Philadelphia, PA (2009.05)
- 16) 塩田智之, 森川茂, 飯塚愛恵, 倉根一郎, 西條政幸: 293T 細胞を用いた 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 19 回日本抗ウイルス療法研究会, 東京 (2009. 6)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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)

- 20) 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)
- 21) 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)
- 22) 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)
- 23) 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: 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)
- 24) 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, 福士秀悦, 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)
- 25) 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, 福士秀悦, 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)
- 26) 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)
- 27) 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)
- 28) 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)

- 29) Saijo, M.: Virological insight into Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak in Xinjiang, China: Third AREVA-Pasteur Forum, Shanghai, China (2008. 6)
- 30) 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)
- 31) 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, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂: 高度弱毒化天然痘ワクチン LC16m8 の暴露後使用時の天然痘予防効果: 霊長類におけるサル痘モデルによる検討: 第 11 回日本ワクチン学会学術集会, 横浜 (2007.12)
- 32) 福士秀悦, 前田健, 平井明香, 新倉綾, 山田靖子, 横山勝, 吉川泰弘, 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 を用いた SARS コロナウイルスの感染性の解析: 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2007.10)
- 33) 酒井宏治, 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 遠藤大二, 倉根一郎, 森川茂: 網羅的ウイルスゲノム検出方法を用いたリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) の同定: 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2007.10)
- 34) 水谷哲也, 西村秀一, 酒井宏治, 前田健, 清水博之, 遠藤大二, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂: 新興ウイルス感染症の網羅的検出方法の確立と応用: 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2007.10)
- 35) 佐藤朝光, 江下優樹, 酒井宏治, 見明史雄, 牛島廣治, 高崎智彦, 小滝徹, 遠藤大二, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂, 水谷哲也: タイで採集されたネッタイシマカからの RDV 法による RNA ウイルスの検出: 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2007.10)
- 36) 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂: 高病原性コンゴ盆地型サル痘ウイルス (MPXV) と低病原性西アフリカ型 MPXV の鑑別可能な定量的 PCR 法による MPXV 感染症の診断: 第 55 回日本ウイルス学会・学術集会, 札幌 (2007.10)
- 37) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Iwata, N., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Kurata, T., Morikawa, S.: Therapeutic vaccination with a highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, for protection of nonhuman primates from monkeypox: 41st annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science, Baltimore (2007. 7)



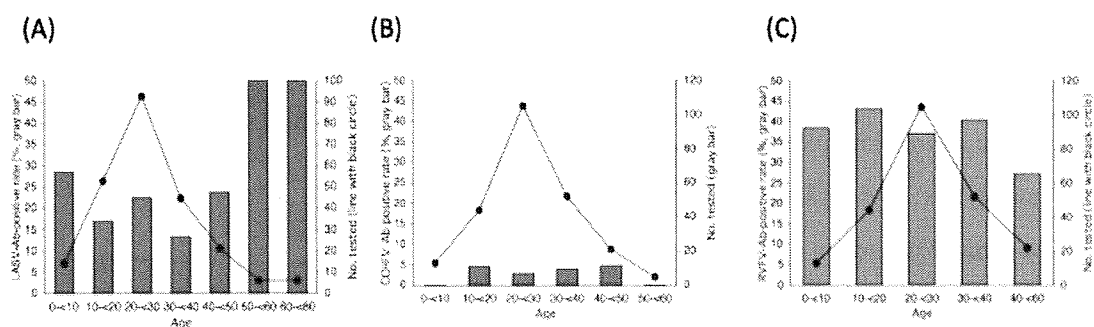


図1. ナイジェリア国北部の住民における各年齢別ラッサウイルス(A), クリミア・コンゴ出血熱ウイルス(B), リフトバレー熱ウイルス(C)に対する抗体保有状況



図2. ラッサ村の住民の一般的な生活居住区内部。穀物保管用倉庫が通常設置されている。乾期にはラッサウイルスの宿主であるマストミスが侵入し、その内部をラッサウイルスで容易に汚染されると考えられる

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  
／現：日本獣医生命科学大学）

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（ACE2）を発現している種々の細胞／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明らかにし、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（パストツレラ菌）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。このことを検討するため、パストツレラ感染マウス（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。本年度は、SARS-CoV 感染後の肺炎がマウスより顕著で且つ人の肺炎のモデルとなりうるハムスターを用いて、Fr-pp の病原性に焦点を当て解析した。ハムスターでは、パストツレラ感染が微弱肺炎を起こし難く、その代替えとして E.Coli 由来の LPS を用いて検討した。これまでのところ、マウスで見られたような重症肺炎を惹起することができず、今後その原因を検討することが求められる。

一方、細胞膜上で発現されているプロテアーゼ TMPRSS2 はインフルエンザウイルスやメタニューモウイルス感染では、ウイルス感染を増強することが報告されている。そこで、TMPRSS2 が SARS-CoV 感染に影響を及ぼすのかについて検討し、受容体結合後の SARS-CoV 感染に関与することを明らかにした。

協力研究者： 網 康至（国立感染症研究所・動物管 理室）、松山州徳（同 ウイルス第 3 部）

## 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由で感染する 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、デイスパーゼと共に、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付いて検討し、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、より速やかにマウス病原性ウイルスの出現が認められた。そのウイルス Fr-pp 株は人から分離されたウイルスと同じ S 蛋白を持つことが明らかにされた。また、Fr-pp はマウス馴化株 Fr-mo と同様、微弱肺炎マウスでは高い病原性を示した。本年度は、Fr-pp のハムスターに対する病原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。微弱肺炎マウスに病原性を示す Fr-mo 株、Fr-mm 株については、本研究班の報告書で既に述べた。ウイルスの定量は既に報告した plaque assay により行った。ハムスターに対する病原性は、以下のように行った。麻酔下のゴールデンハムスター（日本チャールスリバー（株）から購入した6週齢雄）にパスツレラ菌 或いは E.Coli 由来の lipopolysaccharide (LPS) (1mg/ml) を 50  $\mu$ l 経鼻接種し、その後 Fr-1, Fr-mo, Fr-mm 株を約 106 pfu/50  $\mu$ l 経鼻接種し、体重変化と臨床症状を観察した。

（倫理面からの配慮について）

動物実験は、国立感染症研究所実験動物委員会及びバイオリスク管理委員会の承認を得た上で実施した。

## 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、昨年度を 3-5 回の継代で病原性株 (Fr-pp 株) を分離した。Fr-pp, Fr-mo 及び Fr-1 のマウス病原性については、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、パストツレラ感染微弱肺炎マウスでは、Fr-pp, Fr-mm 両株は、強い病原性を示した。そこで、ハムスターに対する病原性を比較する目的で、ハムスターに微弱肺炎を引き起こすため、パストツレラ菌を 106 から 107cfu 経鼻接種し、臨床症状、体重変化を観察したところ、マウスの場合と異なり、パストツレラ感染では変化が認められなかった。マウスでは LPS 投与によりパストツレラ感染と同様の体重現象や毛の逆立ちなどの臨床的な変化が認められたので、ハムスターでの LPS 投与の影響を検討した。LPS 投与 1-2 日で一過性の体重減少が認められた。臨床的には、毛の逆立ち、猫背など、マウスと比べ微小な変化が観察された。また、肺の肉眼的な観察では、殆ど病変は認められなかった。このような予備的な実験から、我々は LPS 投与ハムスターへの SARS-CoV 感染の影響を検討した。マウスの実験系と同様、ウイルス感染後 2 日、4 日に LPS を投与

した場合には、ウイルス感染による大きな変化は認められなかった。ウイルス感染後 1 日に LPS を投与した場合にその他の条件と比べると体重変化、臨床症状に明らかな変化が認められたが、Fr-1 と Fr-mm の間では殆ど差が見られなかった。大部分のハムスターが感染後 2-3 日から 20% ほどの体重減少や毛の逆立ちを示したが、死亡する例はなく全てのハムスターが感染後 2 週間以内に体重の回復が認められ、臨床的な変化も消失した。以上の結果から、ハムスターの場合には、今まで解析した結果からは、Fr-1 と Fr-mm の間で、病原性の差が認められず、また、重症肺炎を引き起こす例も殆どなかった。

インフルエンザやメタニューモウイルス感染で認められている膜結合型セリンプロテアーゼによる感染増強 (エンベロープ糖蛋白の開裂によると考えられる) が SARS-CoV 感染でも認められるのか、について、検討した。バフィロマイシンで処理した細胞 (エンドゾーム経由感染が阻害されている) に SARS-CoV を吸着させて、細胞侵入が起こるか否かに関して、TMPRSS2 発現細胞では感染が成立することが分かった。即ち、TMPRSS2 発現細胞では受容体 ACE2 に結合した SARS-CoV は細胞表面から直接侵入することが示唆された。

一方、TMPRSS2 発現細胞内で増殖した SARS-CoV の S 蛋白は非解裂性であり、また、細胞表面から侵入する能力を欠いた通常の SARS-CoV と同様であることが判明した。即ち、TMPRSS2 発現細胞はエラスターゼ存在下での標的細胞と同様、細胞表面から SARS-CoV 感染を促進することが考えられた。

#### 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、膵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。また、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 の標的細胞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、エラスターゼ等が産生されることなどを考慮すると、エラスターゼなど 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。微弱肺炎を持つマウスを用いて継代 3 - 5 代で病原性の高いウイルスが分離され、興味深いことに、分離された病原性株は遺伝子レベ

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との類似性が高いことが判明した。分離株はエラスターゼなどが存在する微弱肺炎環境下で選択されたと思われる。即ち、ヒトに重症肺炎を引き起こすウイルスは、エラスタ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。

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、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。

これまで SARS の動物モデルとしては多くの実験小動物が用いられて来たが、ハムスターは SARS-CoV に対して、マウスと比べ比較的高い感受性を示すことが報告されている。我々は微弱肺炎マウスの継代により SARS 患者から分離されたウイルスと同一の S 蛋白を持つウイルスを分離し、このウイルスが人に病原性を示し、更にマウスに病原性を示すことから、種々の動物に病原性を示すのではないかと推測した。この仮説を検証するため、今回ハムスターを用いて解析を行ったが、今回設定した条件下では培養細胞分離株の Fr-1 との病原性の差は認められなかった。また、これまでマウスより感受性が高いとされているハムスターで肺炎の重症化を誘導でなかったことから、ハムスターに異なる条件で確実な微弱肺炎を誘導できれば Fr-mm で SARS のモデルとなる重症化肺炎を作出できるのではないかと考えられる。また、本研究の最終目標はサルでの SARS-CoV による重症肺炎の樹立であり、その

ためには、まずハムスターを用いて詳細な条件検討が必要であろう。

一方本研究では、膜結合型セリンプロテアーゼTMPRSS2がSARS-CoVの細胞表面からの感染を可能にすることが示唆された。これは、肺炎時に大量に産生されるエラスターゼによる感染経路と同様である。更に興味深いことは、TMPRSS2はSARS-CoVの表的細胞である肺胞上皮細胞に発現されていること、また、動物実験から、SARS-CoV陽性肺細胞には多くのTMPRSS2陽性細胞が存在することが示唆されており、今後TMPRSS2とSARS病態に関して更なる解析が必要であろう。

#### E. 結論

パストレラ菌感染による微弱肺炎マウスでのSARS-CoVの継代により分離された病原性の強いウイルス株Fr-pp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る。微弱肺炎を持つマウスでは重症肺炎を引き起こすことが出来たが、今回のハムスターを用いた解析では同様の重症肺炎の誘導は出来なかった。マムスターに確実な微弱肺炎を誘導する方法を確立することで、マウス同様の重症化が引き起こされることが期待される。また、本研究では、肺で発現のある新たな膜結合型プロテアーゼがSARS-CoV感染に関与する可能性が示唆され、SARS重症化メカニズム解明のために、今後の研究の進展が期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Matsuyama S, and Taguchi F. (2009) Two step conformational changes mediated by receptor binding and proteolysis of a coronavirus envelope glycoprotein. *J. Virol.* 83: 11133-11141
2. Fukushima A, Fukuda N, Lai Y, Ueno T, Moriyama M, Taguchi F., Iguchi A, Shimizu K and Kuroda K. (2009) Development of a chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme targeting SARS virus. *Intervirology* 52: 99-92
3. Terahara K, Yoshida M, Taguchi F., Igarashi O, Nochi T, Gotoh Y, Yamamoto T, Tsunetsugu-Yokota Y, Beauchemin N, and Kiyono H. (2009) Expression of newly identified secretory CEACAM1a isoforms in the intestinal epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383: 340-346
4. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Ami Y, Fukushi S, Taguchi F., and Tsunetsugu-Yokota Y. (2009) Neutralizing antibody against severe acute respiratory syndrome (SARS)-coronavirus spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. *Microbiol. Immunol.* 53:75-82.
5. Shirato K, and Taguchi F. (2009) Indirect induction of mast cell degranulation and migration by respiratory syncytial virus infection. *Virology* 386: 88-93
6. Kawase M, Shirato K, Matsuyama S and Taguchi F. (2009) Protease-mediated entry via endosome of human coronavirus 229E. *J. Virol.* 83: 712-721.
7. 田口文広、松山州徳 (2009) コロナウイルスの細胞侵入機構 ウイルス第59巻 215- 222
8. 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
9. 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
  10. 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
  11. 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. 白戸憲也、松山州徳、川瀬みゆき、田口文広：膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 によるブタ流行性下痢ウイルス (PEDV) の細胞融合活性の誘導 第 57 回日本ウイルス学会総会、東京、2009. 10.25-27
  2. 柏崎広美、田口文広、渡辺里仁：マウス肝炎ウイルス MHV の感染後初期に単球系細胞に誘導された細胞障害 第 57 回日本ウイルス学会総会、東京、2009. 10.25-27
  3. 平井明香、大塚信久、池田敏男、谷口理絵、中垣慶子、三浦秀佳、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感受性差に関する解析 第 57 回日本ウイルス学会総会、東京、2009. 10.25-27
  4. 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
  5. 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
  6. 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
  7. 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
  8. 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
  9. 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、田代真人、田口文広：高度弱毒化ワクチニアウ

ウイルス株 DIs の組み換え SARS ワ  
クチンとしての検討 第55回に本  
ウイルス学会総会、札幌  
2007.10.21-23

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：新興再興ウイルスに迅速に対応可能な PCR 検査法を開発するため、多種ウイルスに共通するプライマーを設計するプログラムを開発した。平成 19 年度においては、プライマー設計のための方法の基本構築を設計した。対象ウイルス間共通プライマーとしては、複数の塩基を同時に規程する degenerate プライマーとすることを決定し、その設計のためには対象ウイルス塩基配列間で共通する motif を起点とし、degenerate 配列を設定するためのプログラム群を開発した。平成 20 年度においては、前年度開発されたプログラムを改善し、ウイルスを共通して検出するための degenerate プライマー設計プログラム(Co-ordination of common motifs; CoCoMo)として統合的な利用を可能にした。当該設計プログラムは、優れた degenerate プライマー設計能力を旧世界アレナウイルスで示した。このプログラムには、共通プライマーを選択するためのウイルス塩基配列数および相同性範囲に限界があったため、多数のウイルス種用の共通プライマーを設計するため、平成 21 年度においては、新興再興ウイルス感染症に対応することを目的として、CoCoMo プログラムによる設計プライマーの関連ウイルスへの適用を高速に検索するプログラム群を開発した。アレナウイルス科の既知の全ウイルスについて、前年度プログラムを新規開発プログラムを連動させてプライマーを設計したところ、全アレナウイルスを増幅する最少の組み合わせとして 3 組のプライマーペアが選定された。これらのプライマーペアセットは 30 種中 26 種のウイルスについてゲノムを増幅することが示された。検出感度については問題が残されたが、3 年間で開発された方法は新興ウイルスを含む多様なウイルス検出対策として有効であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、エボラウイルス、新世界・旧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、新興ウイルスの出現が数多く報告されている。これら新興ウイルスが出現する背景としては、世界的経済活動の拡

大や自然環境との接点の増加が指摘されており、今後も新興ウイルスの出現頻度は減少しないことが予測される。このような分析を背景として、海外からの帰国者に重篤な感染症が発生した場合に、新興ウイルスを検出する対策の重要性が指摘されている。

検査方法としては、抗体による検査に加え、新たな対象に対し迅速に検査方法を開発するという点でPCR法の重要性が認識されている。

分担者らは、平成19年度において、新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の配列を前年度において、分担者らは、特定の位置に二種以上の塩基が混合した塩基を含むオリゴマーをプライマー (degenerate プライマー) が、複数の異なるウイルス間で有効であることに注目した。Degenerate プライマーの設計には、すべての可能な塩基配列の候補を生成し、鋳型への適用性を調べた中から最適なプライマーを選択する方法が理想的であることは良く知られている。しかしながら、このような総当り的な方法には、莫大な計算時間が必要となるため、現実的には用いられない。そのため、各種近似的な計算方法が開発されているが、どの方法も変異の大きなウイルス間で共通のプライマーを設計するには至っていない。分担者は、従来の方法を改善し、基本的に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方法を開発した (CoCoMo アルゴリズム; Coordination of Common Motifs)。

続けて平成20年度においては、前年度の CoCoMo アルゴリズムを原型として、前年度8塩基を設定したプライマーの設計起点を、より共通 motif を選択可能な1塩基の不定塩基を挟む2つの2塩基で構成される含ギャップ4塩基 motif (Gaped Tetranucleotide Motif, GTNM) に変更し、さらに5'側に連結する21塩基および motif と連結したプライ

マー全体のプライマーとしての適合性の評価の自動化を進め、共通アミノ酸モチーフを起点としてプライマーを設計する CODEHOP 法と類似しながら、より多様性の大きな配列群に対しても有効なプライマーを設計可能な方法に改善した。当該年度のプライマーが対象としたウイルス株は多岐にわたり、該当ウイルス全てを鋳型として準備することは難しかった。そのため、鋳型を人工的に合成する OE-PCR 法を PCR の検証方法として導入した。

平成21年度においては、CoCoMo アルゴリズムの適用範囲をさらに広げるため、設計された多数のプライマー候補の適用可能性を、多数のウイルスについて検索するプログラムを開発した。当該プログラムの開発には、CoCoMo アルゴリズムによって設計された degenerate プライマーとウイルス塩基配列間の相同性を高速で算出する必要があるが、degenerate 塩基配列に関しては適切なプログラムが存在しないため、独自に開発を実施した。結果として、アレナウイルス科の広いウイルス種を増幅するプライマーが設計された。さらに、最適なプライマーペアの組み合わせを検索することにより、全アレナウイルスを増幅可能な3組のプライマーペアのセットが開発された。

これらの開発を通じ、類縁のウイルスからの変異により発生した新興ウイルスを、高い可能性で検出する 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:
- 2.

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。計算中、degeneracy が莫大な数となる場合があったため、指標として degeneracy の 2 を底とする対数を算出し、degeneracy 指数として用いた。

## 2. プライマー設計:

### 1) 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 2~4G 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 (SuSe9, Ubuntu8.04, 8.10 および 9.04)を用いた。

開発言語としては、Ruby 1.87 (<http://www.ruby-lang.org/ja/>)を、同言語のバイオインフォーマティクス用の拡張モジュールとしては BioRuby (<http://dev.bioruby.org/ja/>)を、データベースとの接続モジュールとしては MySQL/Ruby (<http://www.tmtm.org/ja/mysql/ruby/index.html>)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には、独自に開発した

gas ソフトをコンパイルおよび稼働するために、gcc C コンパイラを使用した。

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。

### 2) 連携プログラム

塩基配列間の相同性を算出するためには、NCBI の開発した Blast2 プログラムを使用した。複数のウイルスの塩基配列を整理させるためには、MAFFT プログラム(MAFFT version 6, <http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>)を用いた(平成 20-21 年度)。多数の配列を相同性を指標としてグループ化するためのプログラムとしては mcl (<http://www.micans.org/mcl/>)を利用した(平成 21 年度)。

## 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/>)または EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>)よりダウンロードし、BioRuby を用いたプログラムにより MySQL のテーブルに格納した。

## 4. CoCoMo アルゴリズムの構成

### 1) 平成 19 年度

当該年度の CoCoMo アルゴリズムでは、基本的なプライマー選定方針を提示し、実際の設計においては、各ステップ用のプログラム群を個別に準備した。基本的な処理方法は下記のとおりであった。

#### ① 検索後ダウンロードされた遺伝子デー



タのデータベースへの格納

ウイルス種別の遺伝子データを収集する際には、ウイルスゲノムプロジェクト上の整備されたゲノムデータのみでは、HCVでも90個程度のみがリス手アップされているのみで、既知の遺伝子データを網羅しているとは言えない。そのため、遺伝子データとしては、EMBLまたはGenBankデータベース上で、種名としてウイルス種を特定した検索を実施し、探索された塩基配列データをすべてダウンロードした。特にGenBankは、2005年ごろから50MBを超える大量の検索データのダウンロードも許可しているため(分担者の実施から推測、未確認)、各種ウイルスデータをダウンロードする際には、主として用いた。

② 格納された遺伝子データのサイズおよび相同性を用いた類似塩基配列群(一次グループ)への分類

格納されたデータは、前述のように、ゲノムや特定の抗原遺伝子のみではなく、名称の異なる様々な断片を含んでいる。しかしながら、CoCoMoでは、塩基配列間で共通する motif の頻度を参照してプライマーを設計するため、設計に先だって、塩基配列データを特定遺伝子領域やゲノム全長に分ける必要が生じた。GenBankの規約上では、このような分類は塩基配列に付随するAnnotation情報から読み取ることができることになっているが、塩基配列の登録者は必ずしも同一の遺伝子名称やゲノム全長の記述をしているわけではないため、Annotationによる分類は十分な実用性を示さなかった。そのため、塩基配列の分類のため、塩基配列を長さが大きい順に並べ、順次それよりも短い配列と相同性とサイズ

の類似性を基準として塩基配列を分類した。通常、サイズの差を30%以内で、50塩基以上の相同領域が存在する条件を設定することにより、ゲノムや主要抗原に関する塩基配列を分類し、同一グループにまとめることが可能であった。

③ プライマー設計対象塩基配列群の選定と、塩基配列相互の組み合わせについての相同性の算出

②においてグループ化された塩基配列のうち、ゲノムに相当する塩基配列グループと、250塩基以上のサイズで、100以上の塩基配列から構成されるグループについては、塩基配列相互の相同性を算出した。

④ 対象塩基配列相互の相同性の程度と相互の相同性についての social network analysis による二次グループに分類

Social network analysis は、相互に結合されるノードの親密性やグループ分けを行う手法で、塩基配列間でも一定以上の相同性の存在やその相同性の数値によってグループ化が可能となった。Social network analysis の図示化には、Pajek (<http://pajek.imfm.si/doku.php>) または Graphviz (<http://www.graphviz.org/>)を使用した。

⑤ 二次グループ数が20程度の場合には、各グループから代表のデータを選別して、グループ代表による代表グループを作出

PCRの位置にあるオリゴマーを選択するソフトウェアは、その第一段階で大量の計算容量を必要とする。RNAウイルスのゲノム程度の大きさの塩基配列の場合には、対象塩基配列数を20個程度以内に抑える必要があった。そのため、いったん形成されたグループ内でのバランスをとりつつ、塩

基配列数を減らすための方法として、相同性の高いウイルス群から代表を選択するという方法を選んだ。

⑥ 一旦、可能な 6 塩基モチーフ (平成 19 年度)をすべて想定した上、対象塩基配列上で PCR の位置となる 6~10 塩基 motif を選択する。

motif の選択においては、相補的な motif の一方を削除して残りを選定するという方法がとられた。この方法により、最終的に作成した degenerate プライマーでも相補的にプライマーが自己結合してしまう可能性を無くした。

⑦ 最終的に選択された motif の 5' 端の配列を手作業で調べ、実際の対象配列上に存在する塩基の多様性をすべて満たす degenerate プライマーを作出した。

## 2) 平成 20 年度

当該年度においては、CoCoMo アルゴリズムの一部を修正して、degenerate プライマーの設計を下記のようなものとした。

- ① 検索後ダウンロードされた遺伝子データのデータベースへの格納(変更なし)
- ② 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。

## ③ 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。

## ④ 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。

#### ⑤ プライマー候補 1 の仮想 PCR(図 1D)

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。

#### ⑥ 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。

#### ⑦ 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。

#### ⑧ 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。

#### ⑨ 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\\_syosai.html](http://www.genosys.jp/whatsnew/tm/tm_syosai.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。

#### ⑩ 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℃以上ヘアピン構造については 16℃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。

⑪ 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。

⑫ 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。

⑬ プライマーペアの順位づけ

②から⑫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、高い順位のものをつ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。

3) degenerate 塩基の高速相同性検索(平成 21 年度)

CoCoMo アルゴリズムは、極端に相同性の低いウイルス間では効率的ではなかったが、適切な 6 本以下のウイルス配列に対して適用した場合、1,000 本以上の degenerate プライマーを予測した。CoCoMo アルゴリズムは、計算を軽量にするために、プライマー候補の除去を繰り返すため、予測されたプライマーセットには多くのウイルスに適用可能であるものが含まれることが予測される。そのため、少数のウイルス配列から予測された共通 degenerate プライマーについて、多数のウイルス配列との相同性を調べ、相同性が一定以上のプライマーを適用可能プライマーとして記録する方法を検討した(図 3A)。

この方法は理論的には、プライマー選択の考え方に合致しており、実際に少数のウイルス配列ではうまく稼働する。しかしながら、多数のウイルス配列を対象として多数の degenerate プライマーを検討する必要があるのに対し、degenerate 塩基を含む配列とウイルス配列の相同性検索には長大な計算時間を要した。

そこで、報告者は、塩基配列を 4 桁の二進数に変換し、degenerate 塩基と通常の塩基とのその相同性を高速で算出するプログラムを開発した。塩基配列を 4 桁の二進数にした場合、通常の塩基はいずれかの 1 桁の