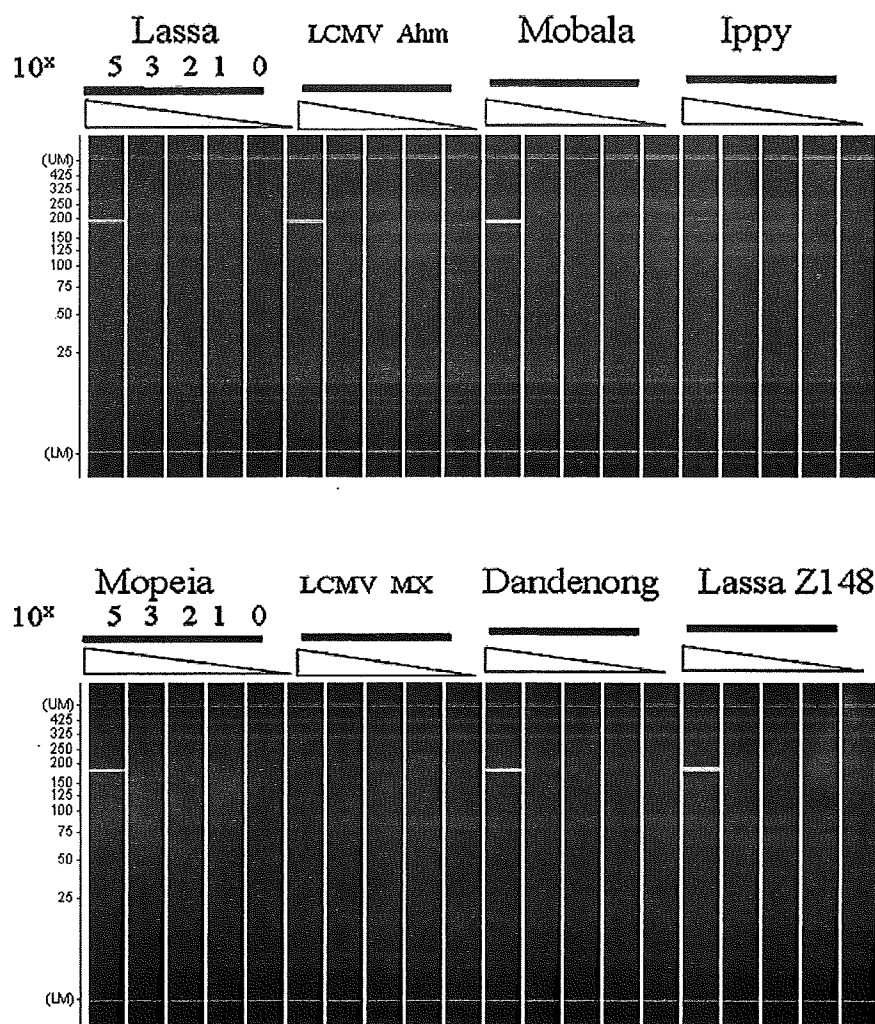


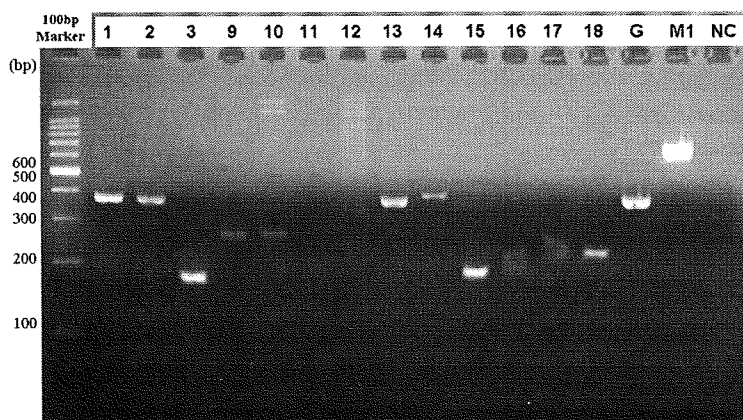
図 4. 旧世界アレナウイルス OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅



Lassa, LCMV Ahmstrong 株(LCMV Ahm)、Mobala, Ippy, Mopeia, LCMV MX 株(LCMV MX), Dandenong および Lassa Z418 株(Lassa Z418)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 170-180 塩基の L 遺伝子断片を増幅した 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ウイルス種および名称を、二段目に OE-PCR 産物の copy 数の 10 の乗数を示す。0 は $10^0=1$ copy 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。

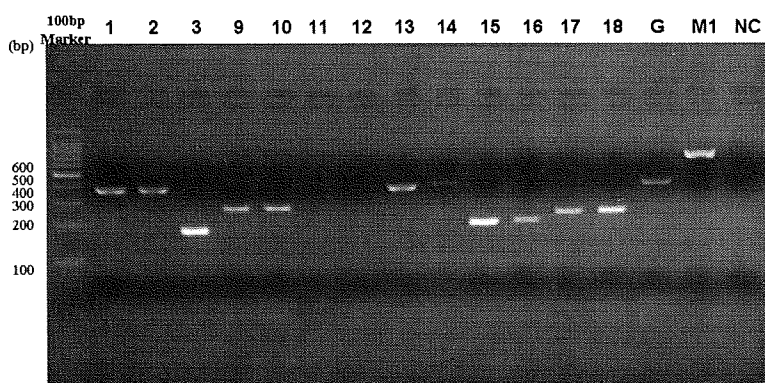
図4 旧世界アレナウイルス共通 degenerate プライマーによる LCMV M1 RNA の増幅

A

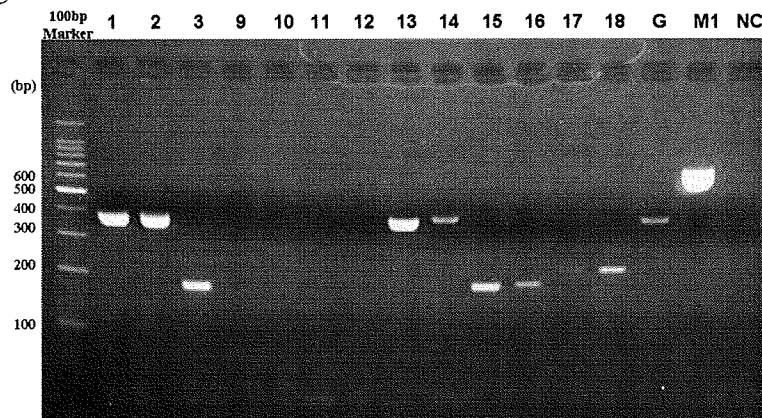


を

B

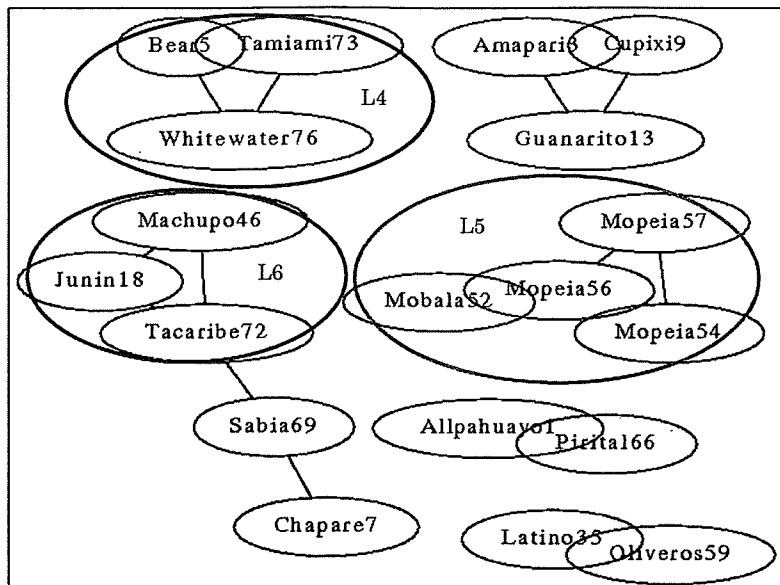


C



LCMV M1 株 RNA の degenerate プライマーによる RT-PCR。LCMV M1 感染 VeroE6 細胞抽出 RNA を p(dN)6 により逆転写 (SuperScriptIII) した cDNA を鋳型として、各種プライマーにより PCR を実施した増幅産物のアガロースゲル電気泳動像。PCR 反応は、ExpandHiFi キット(A: 30°Cアニーリングを含む温度条件, B:55°Cアニーリング温度条件)または GoTaqMix(C)によって実施された。アガロースゲル上に表 3 に示すプライマーセット番号を示す。G は、Vieth(2007)で示された共通プライマー、M1 は LCMV M1 株特異的プライマーセットをそして NC はプライマーを入れない場合の反応を示す。左端のレーンに分子量マーカを示す(100bp Marker)。温度条件の詳細は材料と方法に示す。

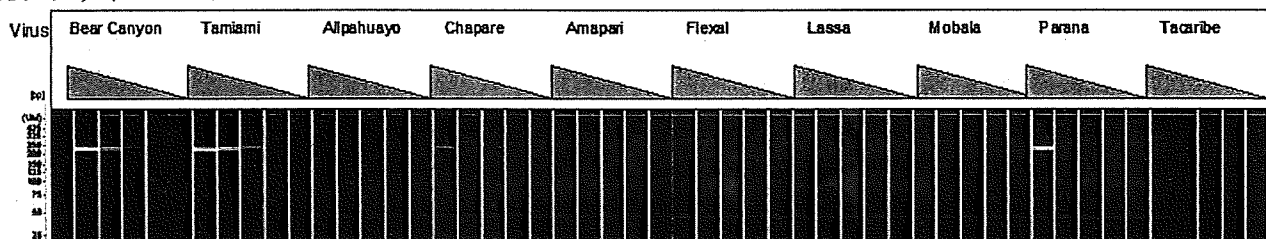
図5 アレナウイルス科ウイルスの相同性に基づいたクラスターとプライマー設計対象グループ



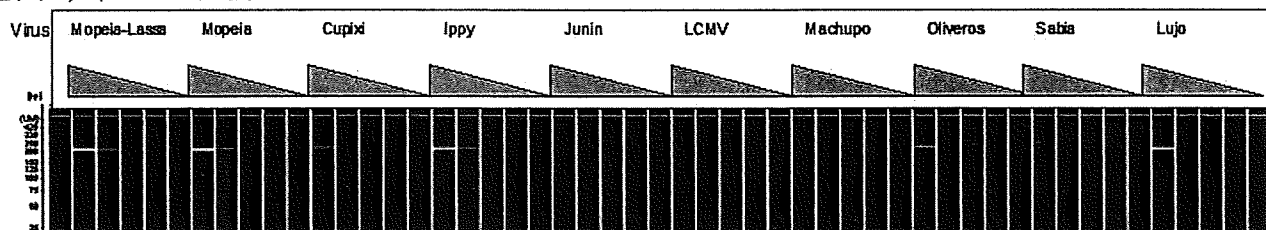
図中の各楕円の点はウイルス種を示し、楕円内にはウイルス名称と本実験に使用した遺伝子番号が連続して記載されている。楕円を結ぶ線は、セグメント全長の10%の相同性領域が存在することを示す。実際にプライマー設計を試みた3つのクラスターを赤青または黄色い円で囲んでいる。

図6 アレナウイルス共通プライマーペアセットによる人工遺伝子増幅試験

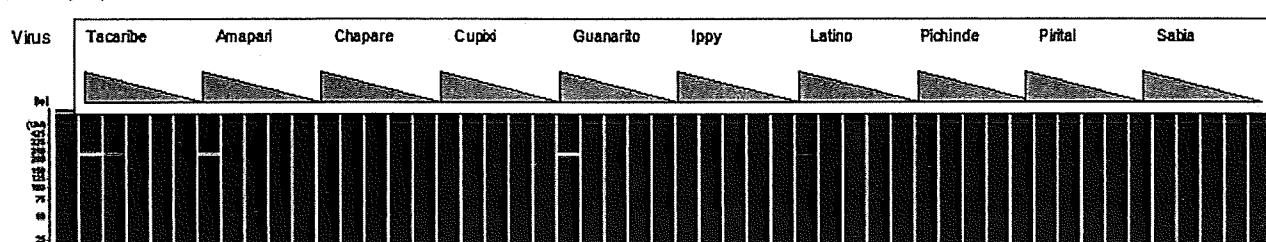
A. プライマーペア L4



B. プライマーペア L5



C. プライマーペア L6



L-segment 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アレナウイルスの種名を、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 $10^5, 10^3, 10^2, 10^1$ 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。レーンの左にマイクロチップ電気泳動装置が算出したマーカーの位置を示す。

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：新興・再興ウイルスに感染した臓器を対象とした
ウイルスの網羅的解析法の開発

研究分担者：水谷 哲也 国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官

研究要旨：ウイルス感染細胞や臓器等からウイルスを網羅的に検出するために、これまで我々が開発してきた方法（RDV 法）を改良した。多くの RNA ウイルスのゲノムの長さが 6kb 以上であること、宿主細胞の RNA は 5kb 以下に集中していることに着目して、感染細胞から抽出した RNA (cDNA) をアガロースゲル電気泳動後に 6kb 以上を採取する方法を確立した。また、多くのウイルス粒子の直径が 200nm 以下、ウイルス粒子外の宿主由来の核酸を核酸分解酵素で除外できることに着目して、検体を 0.45 μm のフィルターを通過させ超遠心や核酸分解酵素の処理により、ウイルス核酸を純化させる方法を確立した。これらの方法を用いてウイルス核酸を純化・濃縮した後、RDV 法のダイレクトシーケンスの技術を組み合わせて、ウイルス核酸の塩基配列を決定した。本研究により、ウイルス感染した臓器からも網羅的にウイルスを検出することが可能になった。

研究協力者：森川茂、倉根一郎（国立感染症研究所）、渡辺俊平、明石博臣（大学院農学生命科学研究科）

A. 研究目的

我々はこれまでの研究で、新興・再興ウイルス感染症の原因ウイルスを迅速に同定するために、ウイルスの網羅的検索法（Rapid determination system of viral RNA/DNA sequences: RDV 法）を開発・改良してきた。RDV 法は PCR を行うサーマルサイクラーやアガロース電気泳動装置、シーケンサーなどウイルスの分子生物学的研究を行うことのできる施設で実施可能であり、次世代型シーケンサーのような高額機器を必要としない。最短 2 日でウイルスの遺伝子配列の一部をダイレクトシーケン

スにより決定できるので、DNA 組み換え申請の必要がない。これまで、RDV 法を用いて数種類の新規ウイルスや希少ウイルスを発見してきたが、出発材料はウイルス分離後の培養上清であった。ウイルス分離後に RDV 法を実施する理由は、細胞由来の遺伝子が少なくウイルス量が多いという理由や、ウイルスゲノムの部分的遺伝子配列決定後に全長を決定できるだけの核酸量を確保するためである。しかし、すべてのウイルスが現存する培養細胞のシステムで分離できるとは限らない。たとえば、ヒトに感染するノロウイルスは分離できる培養細胞が発見されていない。このように、培養細胞を介さなくてもウイルス感染しているヒトや動物の血液や臓器から直接新規ウイルスを検出するシステムを構築する必要がある。

さらに、ウイルス分離の過程では1-2週間を要することも少なくないことや、分離過程においては未同定のウイルスとしてBSL2で実施するので実施者への感染の危険性が伴うことなど、新興・再興ウイルスにおいて、ウイルス分離は必ずしも有効ではない。そこで、本研究では臓器から直接、網羅的にウイルスを検出できるようなRDV法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

1) サイズフラクションを組み合わせたRDV法

猫カリシウイルス (10^6 TCID₅₀) を感染させた Vero 細胞を 24 時間後、Total RNA isolation mini kit (Agilent Technology, USA) を用いて RNA を抽出し、cDNA 合成は SuperScript III kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いておこなった。2本鎖目の cDNA 合成は Klenow fragment (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を用いた。このように得られた dsDNAs は 0.6%アガロースゲルを用いてサイズフラクションを行った。cDNA の回収は NucleoSpin Extract II (Machrey-nagel, Germany) を用い、猫カリシウイルスとリボゾーマル RNA28S を特異的に検出できるプライマーを用いて PCR をおこなった。また、RDV 法は GenomiPhi V2 DNA amplification kit (GE Healthcare, UK) で増幅後、参考文献 1 に従って行った。

2) 超遠心を組み合わせた RDV 法

3 週齢の BALB/cAJcl マウスに $10^{6.4}$ TCID₅₀ ヨコセウイルスを脳内接種後、4 日後に解剖し脳をホモゲナイズした。2,000 g, 10 min, 4 °C で低速遠心した後、上清を 0.45 μ M filter (Millipore) でろ過した。ろ液を 100,000 \times g, 2h, 4 °C の条件で超遠心分離を行い、沈殿を PBS に溶解後 10U Turbo DNase I (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA),

0.01 μ g RNaseA (Quiagen), benzonase (New England Biolabs) で処理した。RNA 抽出は TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いた。RNA は K-8N primer (5'-GAC CAT CTA GCG ACC TCC CAN NNN NNN N-3') を用いて SuperScript III kit (Invitrogen) で cDNA 合成後、Klenow fragment (New England Biolabs) と primer K-8N を用いて 2 本鎖目を合成し、K primer (5'-GAC CAT CTA GCG ACC TCC AC-3') を用いて AmpliTaq Gold により増幅した。RDV 法は GenomiPhi V2 DNA amplification kit (GE Healthcare, UK) で増幅後、参考文献 1 に従って行った。さらに、コウモリコロナウイルス (10^7 コピー分のウイルス量) をフルーツバットに経口投与し、6 日後に小腸をホモゲナイズした。これ以降の方法は、核酸分解酵素として benzonase を用いたこと以外、上記と同様に行った。

(参考文献 1 . Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, et al. Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses. Emerg. Infect. Dis. 2007; 13: 322-324.)

C. 研究結果

1) サイズフラクションを組み合わせた RDV 法

現在知られている主なウイルスとそのゲノムサイズを図 1 に示した。レオウイルス、ビルナウイルス、オルソミクソウイルスを除いて、ほとんどのウイルスは 6kb 以上のゲノムを有している。一方、哺乳類の細胞でもっとも大量に存在する RNA はリボゾーマル RNA であり、大きい方の 28S リボゾーマル RNA は約 5kb である。また、細胞内で転写される mRNA のほとんどは 3kb 以下である。このようなウイルス感染細胞における RNA のサイズの比較により、6kb 以上のフラクションには RNA ウイルスのゲノムが細胞由来の RNA よりも多く含まれて

いると考えられる。すなわち、ウイルス感染臓器から RNA を抽出後、アガロース電気泳動により 6kb 以上の領域から RNA を抽出、RDV 法を実施することにより、ウイルス遺伝子を検出できると考えられる。しかし、RNA の不安定などの理由から、RNA 抽出後にランダムプライマーで cDNA を作り（短い cDNA もできるが全長やそれに近い cDNA もできると考えられる）、2 本鎖 DNA 作成後に電気泳動をおこなった。

実際に猫カリシウイルスの感染細胞を材料にして、アガロース電気泳動による分画行なった。図 2 のように 1kb ごとに cDNA を回収し、リボゾーマル RNA と猫カリシウイルスを増幅する PCR をおこなった。5kb のリボゾーマル RNA は 3kb 以下のフラクションに多く存在しており、8kb の猫カリシウイルスは 1-8kb すべてのフラクションに多く存在していることがわかった。cDNA を合成することにより、本来の RNA のサイズと同じか、短い cDNA が合成されることを反映する結果となった。4-8kb のフラクションにもリボゾーマル RNA が存在する理由は、アガロースゲル電気泳動における「小さいサイズの核酸は大きいサイズのフラクションにコンタミネーションする」という現象によると考えられる。このコンタミネーションは、Phi29 というファージの polymerase をもちいて配列非依存的に増幅を行うことにより解決できると考えられる。この酵素は 3 kb 以下の配列は増幅しにくいという特徴があり、この性質によって大きいサイズのフラクションにコンタミネーションした 3kb 以下の cDNA は増幅されず、逆に 6kb 以上のウイルス cDNA のみを選択的に増幅できる。増幅後は制限酵素処理しアダプター付与してダイレクトシーケンスを行うという RDV 法を適用できると考えられる。フラクション 6-8 から cDNA を回収後、RDV 法を実施したところ、16 PCR

産物のうち、2 つのフラグメントがウイルス由来であった。また、同様の実験は 10kb のゲノムを持つヨコセウイルスでも行い、ウイルス遺伝子を同定できた (data not shown)。特に、ヨコセウイルスについては細胞中のウイルス遺伝子量をリアルタイム PCR で測定することにより、本方法の検出限界は 10,000 コピーであることがわかった。この検出感度は、通常の RDV 法と同等である。

このように本法を用いることにより、培養細胞中のウイルスを配列非依存的におこなうことができたので、今後、臓器を用いた検討をおこなう予定である。また、本法では RNA ウイルスの検出に限っていることや、数種類の RNA ウイルス科については理論的に検出できず、また DNA ウイルスも対象外であることなど、網羅的検出ができないので次の方法を検討した。

2) 超遠心を組み合わせた RDV 法

組織細胞外に存在しているウイルス粒子を効率よく回収した後に、RDV 法を用いてウイルスの遺伝子配列を決定する方法を考案した (図 3)。ヨコセウイルスを 4 匹のマウスの脳内に接種し、ウイルス感染脳をホモジナイズし低速遠心により細胞を除き、フィルターを通して 0.45µm 以下のウイルス粒子を集めた。さらに、超遠心によりウイルス粒子を濃縮し、RNase/DNase 処理を行うことにより、ウイルス粒子の外にある核酸を分解した。次にウイルス粒子から RNA を抽出し、20 塩基のタグ配列の付いたランダムプライマーを用いて cDNA の合成、続いて 2 本鎖 cDNA を作製した。その後、タグ配列を用いて PCR による増幅を 3 度行い、RDV 法を実施した。41 個の PCR 産物についてダイレクトシーケンスを行った結果、1 フラグメントからヨコセウイルスの遺伝子配列が得られた (表 1)。マウスのゲノム

DNA 由来のフラグメントが多数含まれていたため、RNase/DNase よりも強力な核酸分解酵素である benzonase を用いて、同様の実験を行った。コウモリ SARS コロナウイルス感染コウモリの小腸を用いた実験で、31 フラグメントのうち1フラグメントにウイルス遺伝子が検出された(図4、表2)。

D. 考察

本研究では、臓器からウイルスを網羅的に検出する方法を開発することを目的として、2つの方法について検討を行った。結果には書いていないが、古典的なサブフラクションを組み合わせる方法や、DNA チップ上で細胞性 RNA を吸収する方法、プラスに荷電したビーズにウイルスを吸着させて濃縮する方法などを検討してきたが、どれも本法で示した結果以上の成果は得られなかった。

サイズフラクションを組み合わせた方法では、6kb以上のゲノムを有する RNA ウィルスに限定しているが、通常行っている培養上清を対象とした RDV 法と同等の感度が得られた。DNA ウィルスについては、例えば200-300kbpのゲノムを持つヘルペスウィルスなどは宿主細胞のゲノム DNA とアガロース電気泳動では分けることができない。パルスフィールド電気泳動を用いることにより解決できるかもしれないので、今後検討を要する。次に、サイズフラクションを組み合わせた方法は大量の細胞由来の核酸の中からウイルス核酸を分離するのではなく、細胞をできるだけ壊すことなく、超遠心を組み合わせてウイルスを回収する方法についても検討した。この方法ではウイルス粒子外の細胞や核酸を4つの方法で除外している。まず、細胞を低速遠心で除外し、フィルトレーションで選択的にウイルスを回収している。後者のステップでは細菌も除外できる。最後に超遠心でウイル

スを集め、核酸分解酵素により、ウイルス粒子外の核酸を破壊している。結果としてはこのように多くのステップをおこなうことにより、検出感度が低くなってしまったかもしれない。ステップを減らすことにより、感度の上昇を検討していきたいと考えている。

本研究では、ウイルス分離することなく RDV 法によりウイルス遺伝子を網羅的に検出する方法の検討を行い、ウイルスの遺伝子断片を検出することに成功した。実際に新興・再興ウイルス感染症疑いのヒトや動物について実施する場合には、ウイルス分離を同時に行うべきである。新規ウィルスが検出された場合であっても、ウィルスゲノムの全長を決定、ウィルスの性状・病原性を培養細胞や実験動物を用いて検討する必要があるからである。今後はこのように、臓器からの RDV 法・ウィルス分離・病原性の解析などをシステムティックに実施できる体制を作る必要がある。

E. 結論

本研究において、ウイルス感染した臓器や細胞を対象に、ウイルスの網羅的な検出法を確立した。感度の面で改良の余地があるものの、ウイルス分離作業と平行して本法を用いることにより、新興ウイルス感染症の網羅的検出が可能になると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kouji Sakai, Yuichi Ueno, Shuhei Ueda, Kaori Yada, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Kenichiro Mutoh, Kazuki Yoshioka, Masayuki Nakamura, Kazuaki Takehara, Shigeru Morikawa,

- Tetsuya Mizutani. Novel reovirus isolation from an Ostrich (*Struthio camelus*) in Japan. *Vet. Microbiol.* 2009. 134. 227-232.
2. 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.
 3. 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.
 4. Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Ogata M, Nakauchi M, Kurane I, Mizuguchi M, Morikawa S. Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *J. Med. Virol.* 81. 1102-1108. 2009
 5. Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. *J. Gen. Virol.* 2009. 90. 2266-2271.
 6. Shumpei Watanabe, Naoya Ueda, Koichiro Iha, Joseph S. Masangkay, Hikaru Fujii, Phillip Alviola, Tetsuya Mizutani, Ken Maeda, Daisuke Yamane, Azab Walid, Kentaro Kato, Shigeru Kyuwa, Yukinobu Tohya, Yasuhiro Yoshikawa, Hiroomi Akashi. Detection of a new bat gammaherpesvirus in the Philippines. *Virus Genes.* 2009. 39. 90-93.
 7. Nakauchi M, Fukushi S, Saijo M, Mizutani T, Ure AE, Romanowski V, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009. 16. 1132-1138.
 8. Tomomitsu Satho, Hamady Dieng, Tetsuya Mizutani, Yuki Eshita, Takeshi Miyata, Parimal Talukder, Nobuhiro Kashige, Abu Hassan Ahmad and Fumio Miake. Fluorescence can be used to trace the fate of exogenous micro-organisms inside the alimentary tract of mosquitoes. *Journal of Parasitology and Vector Biology.* 1. 013-018. 2009
 9. Kazuya Shirato and Tetsuya Mizutani. Replication, Transcription, and Translation of Coronaviruses. In *Viral Genomes.* (edited by Zhi Freng and Ming Long) Nova Publishers. 2009. pp.159-167.
 10. 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*)

11. 水谷哲也 「川崎病ウイルス病因説」アクト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 (2009) pp30-31.
 12. 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. 2009. pp321-344.
 13. 水谷哲也 「大量シーケンスによる川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 http://www.kawasaki-disease.org/tokyoren/pdf/23report_2.pdf 2009
 14. 水谷哲也 「網羅的ウイルスゲノム検査 [新しいウイルス]」臨床と微生物(近代出版)36巻3号 (2009) p239-244.
 15. 水谷哲也 「新興ウイルス感染症の網羅的検出方法(RDV法)の確立と畜産分野への応用の可能性」獣医畜産新報(文永堂出版)62巻第10号(2009) p821-822
 16. 水谷哲也 「レオウイルス」 in 「広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査(3)(第7版) -その数値をどう読むか-」日本臨床2010年増刊(印刷中)
2. 学会発表
1. 佐藤朝光、山尾卓也、江下優樹、木原悠希、西村美保、Yupha Rongsriyam、Narumon Komalamisra、Rawewan Srisawat、鹿志毛信広、見明史雄、森川茂、水谷哲也 Rapid determination of RNA viral sequence 法 ver4.0 によるネッタイシマカ幼虫からの新しいブニヤウイルスの検出 第61回日本衛生動物学会 2009年04月02日
 2. 西村美保、佐藤朝光、木原悠希、山尾卓也、江下優樹、Yupha Rongsriyam、Narumon Komalamisra、Rawewan Srisawat、鹿志毛信広、見明史雄、水谷哲也 Rapid determination of RNA viral sequence 法 ver4.0 によるネッタイシマカ幼虫からのウイルスの検出 第61回日本衛生動物学会 2009年04月02日
 3. 伊澤晴彦、鋏田龍星、星野啓太、酒井宏治、渡辺俊平、津田良夫、矢野和彦、佐藤朝光、佐々木年則、斉藤一三、小林睦生、水谷哲也、澤邊京子 蚊から分離されたウイルスのRDV法による同定 第61回日本衛生動物学会 2009年04月02日
 4. 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、平井明香、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 水様性下痢を呈したカニクイザルから分離したアデノウイルスの分子系統学的解析 第57回日本ウイルス学会 2009年10月
 5. 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 ver3.1)を用いたコウモリ由来新規βヘルペスウイルスの同定 第57回日本ウイルス学会 2009年10月
 6. 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、Agustin Ure、Victor Romanowski2)、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 2009年10月
 7. 西村美保、早川洋一、遠藤大二、渡辺

- 俊平、佐藤朝光、中島幸彦、鹿志毛信広、見明史雄、緒方もも子、森川 茂、水谷哲也 ミツバチに感染するウイルスの網羅的検出方法の確立 第 57 回日本ウイルス学会 2009 年 10 月
8. 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：SRAS-CoV の免疫効果と副反応について 第 57 回日本ウイルス学会 2009 年 10 月
 9. 佐山勇輔、福士秀悦、齊藤麻理子、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 2009 年 10 月
 10. 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、平井明香、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性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 2009 年 10 月
 11. 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 2009 年 10 月
 12. 西條政幸、網 康至、須崎百合子、塩田智之、飯塚愛恵、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、倉根一郎、佐多徹太郎、倉田 毅、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 2009 年 10 月
 13. 渡辺俊平、前田 健、水谷哲也、鈴木和男、藤井ひかる、上田直也、伊波興一朗、谷口 怜、加藤健太郎、遠矢幸伸、久和 茂、吉川泰弘、明石博臣 改良 RDV 法を用いたコウモリ由来新規 β ヘルペスウイルスの同定 第 148 回日本獣医学会 2009 年 9 月 (鳥取)
 14. 谷口 怜、Masangkay Joseph、渡辺俊平、大松 勉、上田直也、伊波興一朗、藤井ひかる、水谷哲也、久和 茂、明石博臣、吉川泰弘、森川 茂 フィリピンのコウモリからのレストンエボラウイルス抗体検出 第 148 回日本獣医学会 2009 年 9 月 (鳥取)
 15. Bui Nghia Vuong、水谷哲也、荻部一司、Tung Hoang Nguyen、山本 佑、中村菊保、小川晴子、今井邦俊 Attempt to identify viruses isolated from fecal samples of migratory wild birds by the Rapid Determination system of Viral nucleic acid sequences (RDV) 第 148 回日本獣医学会 2009 年 9 月 (鳥取)
 16. 水谷哲也、伊澤晴彦、澤辺京子、星野啓太、鋤田龍星、小林睦生、渡辺俊平、明石博臣、佐藤朝光、酒井宏治、緒方もも子、倉根一郎、森川 茂 ウイルスの網羅的検出法 (RDV 法) の改良と新規ウイルスの検出 第 148 回日本獣医学会 2009 年 9 月 (鳥取)
 17. 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、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 急性呼吸器感染症患者からの新型レオウイルス分離とマウス感染モデルの作製 第 148 回日本獣医学会 2009 年 9 月 (鳥取)
 18. 水谷 哲也、黒田 誠、関塚 剛史、

- 大場 邦弘、緒方 昌平、石井 正浩、森 雅亮、横田 俊平 川崎病の原因究明 -I. ウイルスの網羅的解析- 第29回日本川崎病学会 2009年10月 (名古屋)
19. 黒田 誠、関塚 剛史、佐藤 誠一、大場 邦弘、浜田 洋通、寺井 勝、緒方 昌平、石井 正浩、森 雅亮、横田 俊平、水谷 哲也 川崎病の原因究明 -II. 次世代シーケンサーによる網羅的解析- 第29回日本川崎病学会 2009年10月 (名古屋)
20. 森 雅亮、黒田 誠、関塚 剛史、大場 邦弘、水谷 哲也、横田 俊平 川崎病の原因究明 -III. プロテオーム解析法を用いた患者血清の網羅的解析- 第29回日本川崎病学会 2009年10月 (名古屋)
21. 渡辺俊平、前田健、水谷哲也、鈴木和男、加藤健太郎、吉川泰弘、明石博臣 網羅的ウイルスゲノム検出法を用いたコウモリ由来新規 β ヘルペスウイルスの同定 第15回日本野生動物医学学会 (富山) 2009年9月7日
22. Shumpei Watanabe, Ken Maeda, Kazuo Suzuki, Kentaro Kato, Yukinobu Tohya, Tetsuya Mizutani, Shigeru Morikawa, Hiroomi Akashi 8th International Congress of Veterinary Virology, Budapest, August, 2009 Identification of a novel herpesvirus in bat using improved RDV method
23. 前田 健、本道栄一、佐藤 宏、鈴木和男、浜 夏樹、横山真弓、渡辺俊平、明石博臣、水谷哲也「各種動物由来培養細胞の樹立とその際に分離された新規ウイルス」第24回ヘルペスウイルス研究会、2009年7月(静岡)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

各RNAウイルス科のゲノムサイズ

レオ : L分節 3-4kbp

ビルナ : L分節 3kbp

オルトミクソ: インフルエンザ 2.3k 以下

ボルナ: 9k

ファイロ: 18k

パラミクソ: 15k

ラブド: 11k

ブニヤ: L分節 6.9kb

アレナ: L分節 7.5k

ピコルナ: 7-8k

カリシ: 7-8k

アストロ: 6-7k

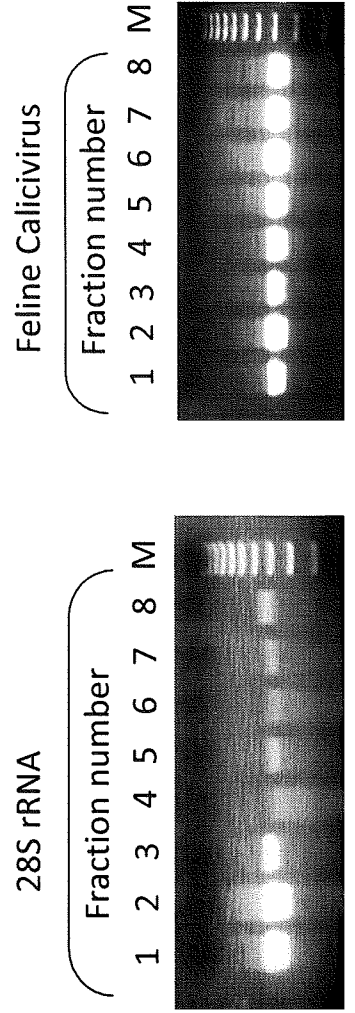
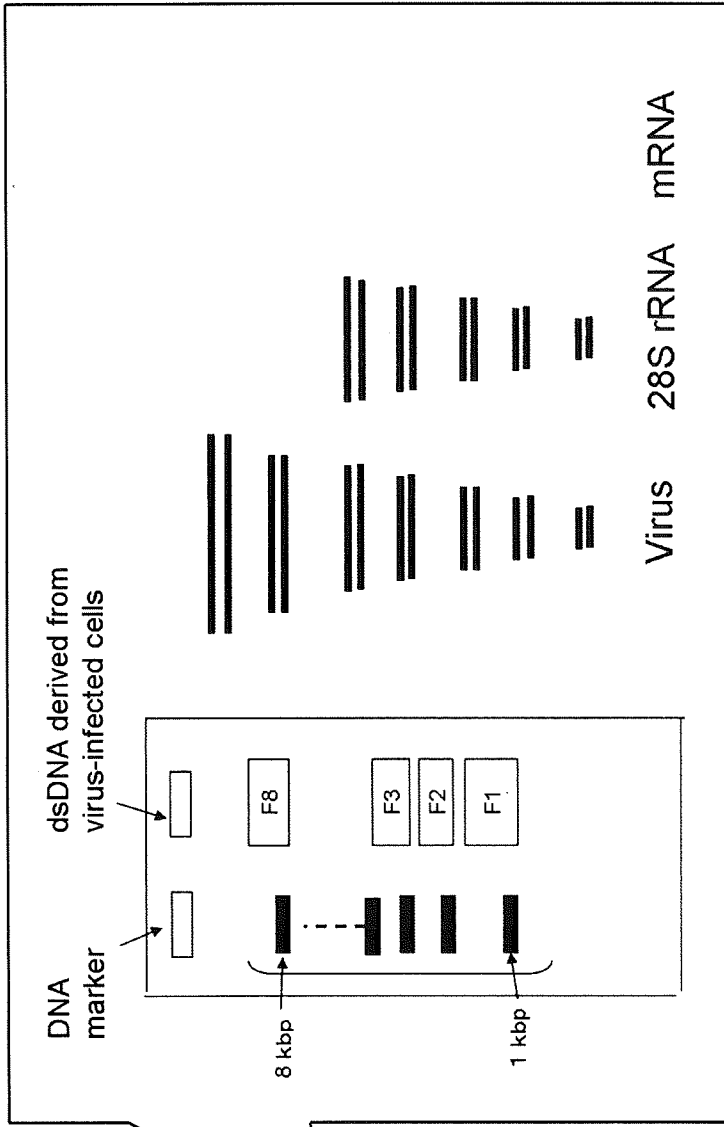
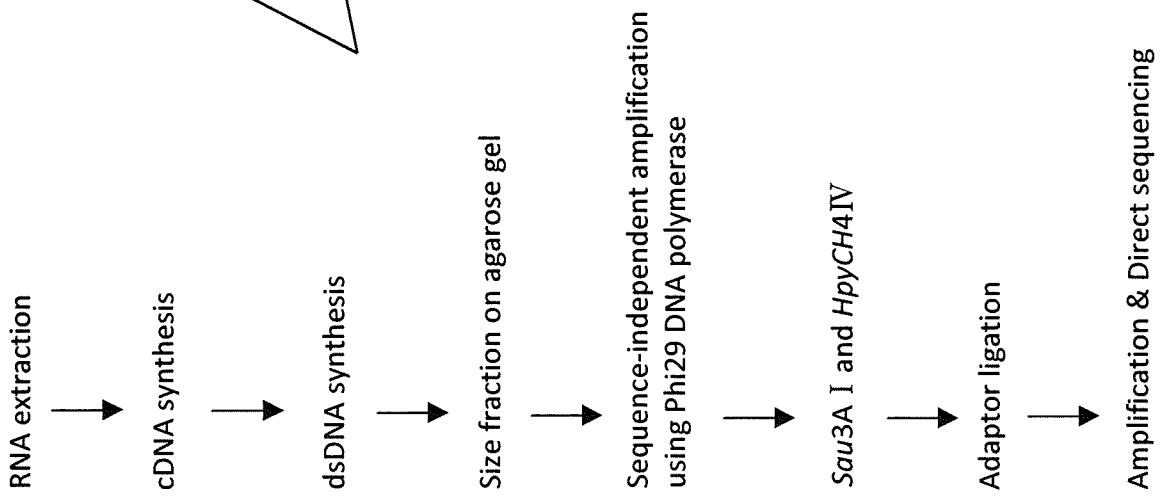
コロナ: 20k

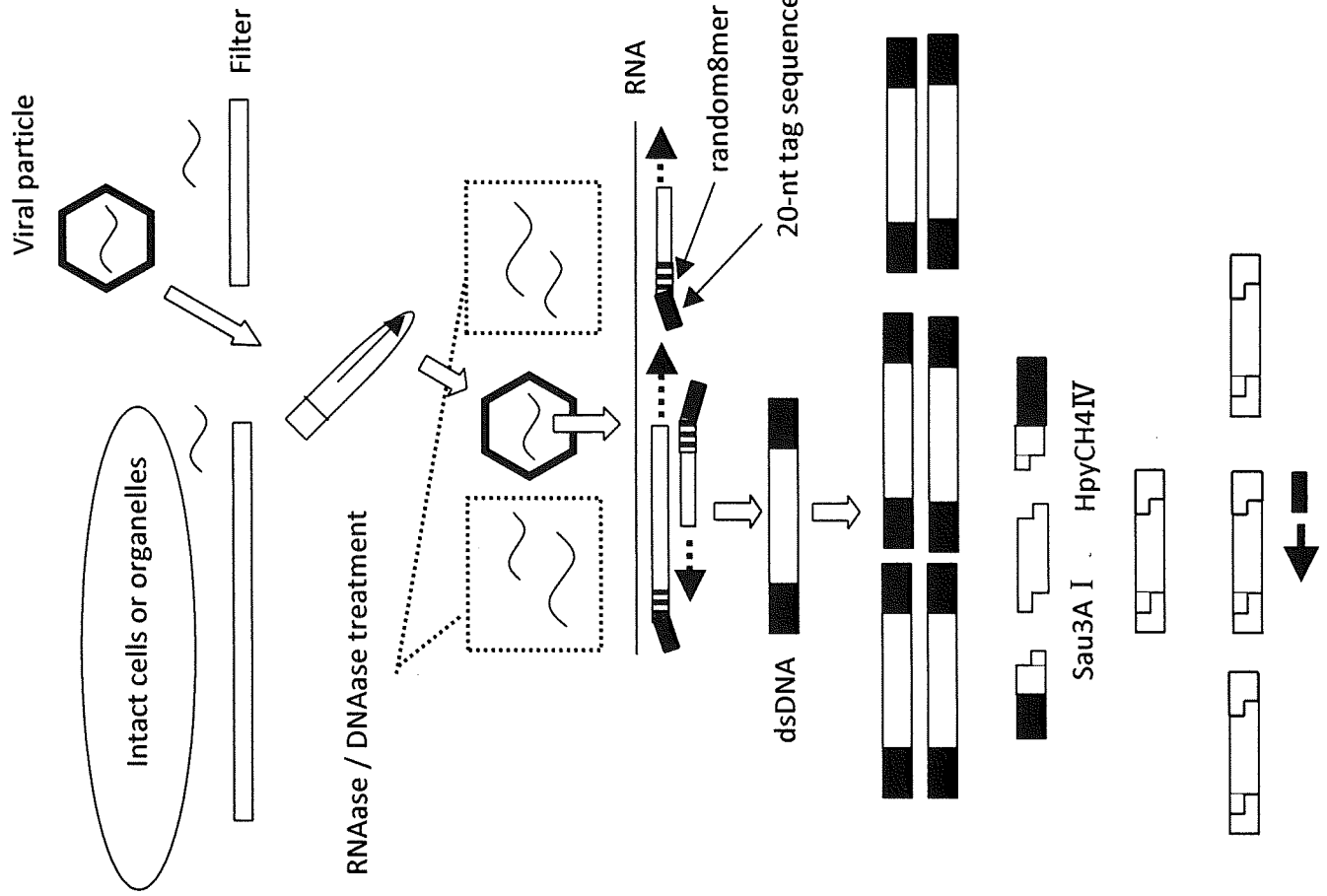
アルテリ: 12-15k

フラビ: 10-12k

トガ: 9-11k

レトロ: 7-11k

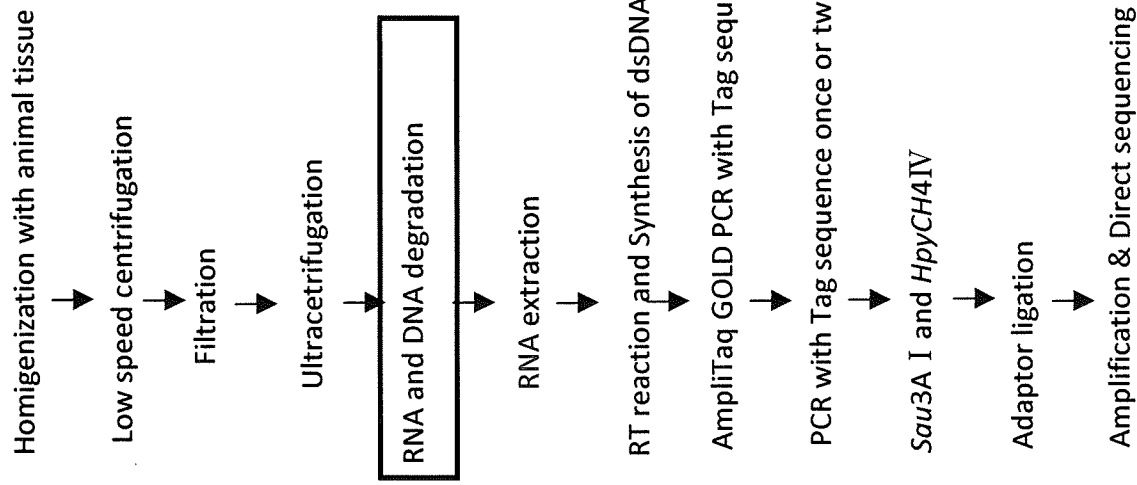




Homigenization with animal tissue
 →
 Low speed centrifugation
 →
 Filtration
 →
 Ultracentrifugation
 →
 RNA and DNA degradation
 →
 RNA extraction
 →
 RT reaction and Synthesis of dsDNA with SISPAK-8N primer
 →
 AmpliTaq GOLD PCR with Tag sequence
 →
 PCR with Tag sequence once or twice
 →
Sau3A I and *HpyCH4IV*
 →
 Adaptor ligation
 →
 Amplification & Direct sequencing

表1. ヨコセウイルスの感染実験で得られたRDV法の遺伝子配列

| Type of cDNA fragment | No. of cDNA fragment |
|--------------------------------------|----------------------|
| Yokose virus | 1 |
| Mouse genomic DNA | 13 |
| Mouse 28s rRNA | 1 |
| E. coli DNA | 1 |
| Pseudoeyrycea conanti 28s rRNA | 1 |
| Unknown sequence due to short length | 15 |
| No read | 9 |
| Total | 41 |



+ benzonase

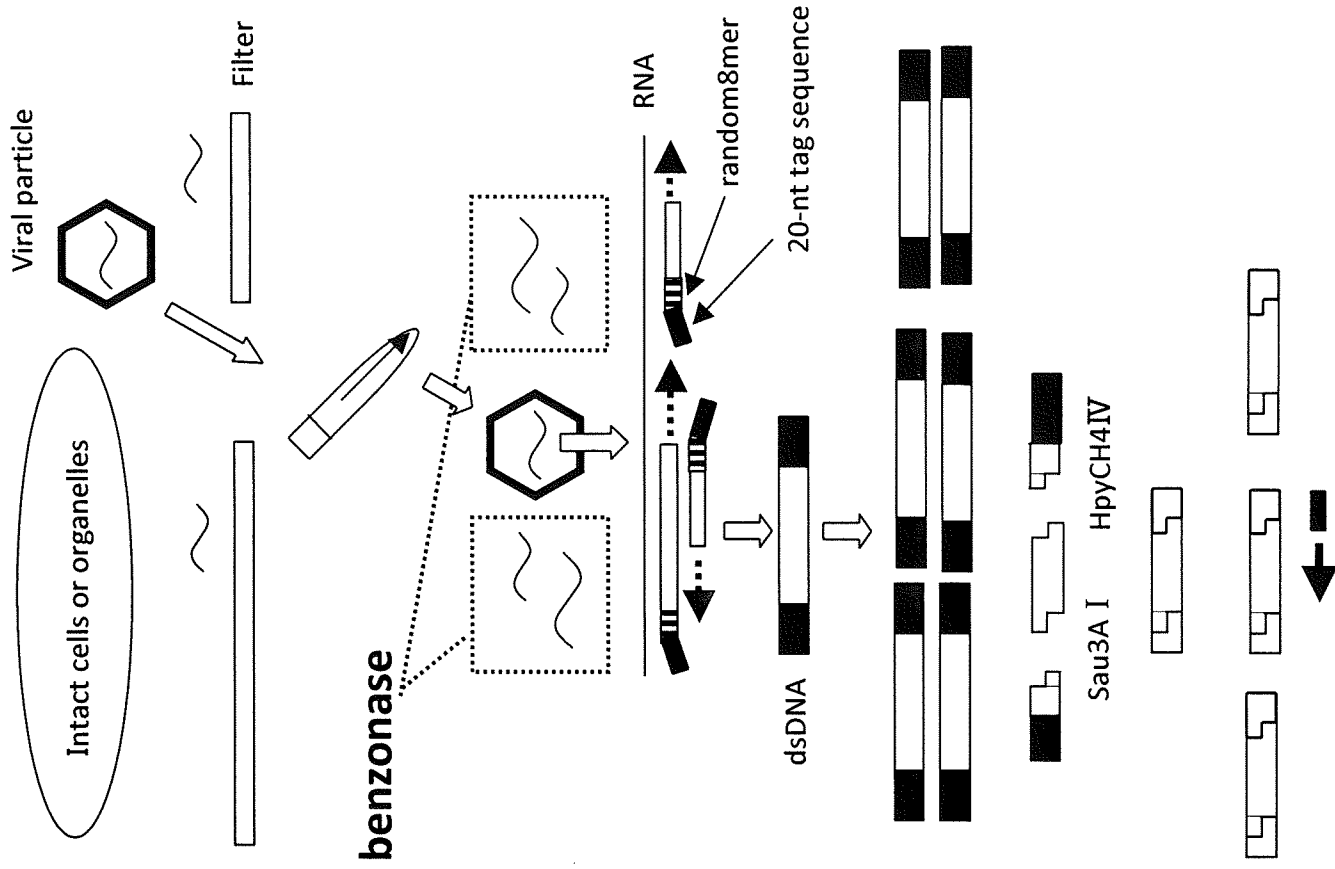


表2. コウモリコロナウイルスの感染実験で得られたRDV法の遺伝子配列

| Type of cDNA fragment | No. of cDNA fragment |
|------------------------|----------------------|
| Coronavirus | 1 |
| Host genomic DNA | 2 |
| Host 28s rRNA | 1 |
| Mitochondrial DNA | 6 |
| Mitochondrial 16s rRNA | 4 |
| Chlamydomonas 26s rRNA | 1 |
| No read | 16 |
| Total | 31 |

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. Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I. :Diagnostic systems for viral hemorrhagic fevers and emerging viral infections prepared in the National Institute of Infectious Diseases. *J. Disaster Res.* 4:315-321, 2009
2. Nakauchi M, Fukushi S, Saijo M, Mizutani T, Ure AE, Romanowski V, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. *Clin Vaccine Immunol.* 2009 Aug; 16 (8) : 1132-8
3. Saijo M, Ami Y, Suzuki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in non-human primates. *J Gen Virol.* 2009 Sep;90(Pt 9):2266-71.
4. Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzuki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Ogata M, Nakauchi M, Kurane I, Mizuguchi M, Morikawa S. Loop-mediated isothermal amplification- based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *J Med Virol.* 2009 Jun;81(6):1102-8. 7.
5. Saito T, Fujii T, Kanatani Y, Saijo M, Morikawa S, Yokote H, Takeuchi T, Kuwabara N. Clinical and immunological response to attenuated tissue-cultured smallpox vaccine LC16m8. *JAMA.* 2009 Mar 11;301(10):1025-33.
6. 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.* 2009; 154(1):153-8.
7. 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 Dec;80(12):2127-33.
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
9. 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.* 2009 Mar 2;134(3-4):227-32.
10. Imai, C., Fujita, K., Shimizu, F., Sugai, A., Yoneda, M. and Kai, C. Comparative and mutational analyses of promoter regions of rinderpest virus. *Virology*, 396: 169-177, 2010.
11. Sugai, A., Kooriyama, T., Sato, H., Yoneda, M. and Kai, C. Epitope mapping of canine distemper virus phosphoprotein by monoclonal antibodies. *Microbiol Immunol.* 53(12):667-74, 2009.

12. Nishimura, T., Kohara, M., Izumi, K., Kasama, Y., Hirata, Y., Huang, Y., Shuda, M., Mukaidani, C., Takano, T., Tokunaga, Y., Nuriya, H., Satoh, M., Saito, M., Kai, C. and Tsukiyama-Kohara, K. Hepatitis C virus impairs P53 via persistent over-expression of 3β -hydroxysterol δ 24-reductase. *J. Biol. Chem.*, in press 2009
13. Saitou, K., Mizumoto, K., Nishimura, T., Kai, C. and Tsukiyama-Kyohara, K. Hepatitis C virus core protein facilitates the degradation of Ku70 and reduces DNA-PK activity in hepatocytes. *Virus Res.* 144, 266-271, 2009.
14. Igarashi, M., Ito, K., Yoshida, R., Tomabechi, D., Kida, H., and Takada, A. (2010) Predicting the Antigenic Structure of the Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Virus Hemagglutinin. *PLoS ONE* 5(1): e8553.
15. Yoshida, R., Igarashi, M., Ozaki, H., Kishida, N., Tomabechi, D., Kida, H., Ito, K., and Takada, A. (2009) Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 5(3):e1000350.
16. Simulundu, E., Mweene, A., Tomabechi, D., Hang'ombe, B., Ishii, A., Suzuki, Y., Nakamura, I., Sawa, H., Sugimoto, C., Ito, K., Kida, H., Saiwana, L., and Takada, A. (2009) Characterization of H3N6 avian influenza virus isolated from a wild white pelican in Zambia. *Arch. Virol.* 154(9):1517-1522.
17. Urata, S., and Yasuda, J.: Regulation of Marburg virus budding by Nedd4.1; a different WW domain of Nedd4.1 is critical for the binding to Marburg and Ebola virus VP40. *Journal of General Virology*, 91, 228-234, 2010.
18. Sakuma, T., Sakurai, A., and Yasuda, J.: Dimerization of tetherin is not essential for its antiviral activity against Lassa and Marburg viruses. *PLoS One*, 4, e6934, 2009.
19. 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.
20. Tegshduuren E, Yoshimatsu K, Taruishi M, Endo R, Shimizu K, Koma T, Yasuda PS, Kariwa H, Arikawa J, and Ishihara C. Studies on the susceptibility of the Japanese grass vole, *Microtus montebelli*, to Tula virus and Puumala virus of the hantaviruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010. in press.
21. Schmidt-Chanasit J, Essbauer SS, Petraityte R, Yoshimatsu K, Tackman K, Contraths FJ, Sasnauskas K, Arikawa J, Thomas A, Pfeffer M, Scharninghausen JJ, Spletstoesser W, Wenk M, Heckel G, and Ulrich RG. Extensive host sharing of Central European Tula virus. *J Virol* 2010. in press.
22. Huong VT, Yoshimatsu K, Luan VT, Tuan LV, Nhi L, Arikawa J, and Nguyen TMN. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in Vietnam: Description of Disease and Implication of Virus and Potential Rodent Hosts. *Emerg Infect Dis* 2010. in press
23. Truong T-T, Yoshimatsu K, Araki K, Lee B-H, Nakamura I, Endo R, Shimizu K, Yasuda PS, Koma T, Taruishi M, Okumura M, Truong U-N, and Arikawa J. Molecular epidemiological and serological studies of hantavirus infection in Northern Vietnam. *J Vet Med Sci* 2009. 71:1357-1363.
24. Mertens M, Wolfel R, Ullrich K, Yoshimatsu K, Blumhardt J, Romer I, Esser J, Schmidt-Chanasit J, Groschup MH, Dobler G, Essbauer SS, and Ulrich RG.