

## Dengue 4価DNAワクチンがマウスに誘導する中和抗体と感染増強抗体のバランス

研究分担者 小西 英二 (国立大学法人 神戸大学)

**研究要旨** Dengue熱及びDengue出血熱は地球規模の疾患であるが、認可ワクチンはない。防御に重要な中和抗体を誘導できるワクチンが予防に有効であると考えられているが、中和抗体は低濃度では感染増強活性が生じるため、逆に重症化を導く懸念が指摘されるようになってきた。本研究では、中和活性と感染増強活性のバランスを測定できる新しい方法を開発し、Dengue 4 価DNAワクチンがマウスに誘導する抗体を解析した。その結果、ワクチンは感染増強抗体を誘導することが示されたが、補体の存在下では増強活性が消失するか中和抗体に転ずることが明らかにされた。

### A. 研究目的

Dengueウイルス感染症は、熱帯・亜熱帯地域に広く流行し、年間 5 千万から 1 億人の罹患者が推定されている地球規模の蚊媒介性疾患である。しかし、認可ワクチンはなく特異的な治療法も確立されていない。現在の日本では輸入感染症として患者が発生するのみであるが、1942 年～1945 年に大阪・神戸や長崎・佐世保で 10 万人以上の患者が報告され、一旦侵入しウイルスの生活環が形成されると大流行する可能性がある。さらに、Dengueウイルス感染症には 2 種類の病態があり、Dengue熱に加えてDengue出血熱という重症型が存在する。重症化のメカニズムは完全には明らかにされていないが、抗体依存性感染増強 (ADE) が一因と考えられている。

Dengueウイルスには 4 種の型が存在する (Dengue 1 型～4 型ウイルス: DENV1～4 と略記)。初回感染と同じ型の感染に対しては終生防御されることが疫学的に知られており、防御の中心的役割を果たすのは中和抗体と考えられている。しかし、ある型に感染した後、別の型に感染した場合、中和活性をもたない交差性の抗体がADEの機構により重症型のDengue出血熱を導く可能性がある。したがって、Dengueワクチン開発の基本的な考え方として、1 型から 4 型全てに対する中和抗体を誘導

する 4 価ワクチンの開発が不可欠である。

Dengue 4価ワクチンは、弱毒ワクチン及びキメラワクチンの戦略が、世界の中で最も開発が進んでいる。いずれのワクチンも、4種類のウイルスを混合したものである。しかし、感染性のあるウイルスには潜在的に相互の「干渉作用」があるため、混合ワクチンに使用した場合は、4型全てに対する中和抗体が誘導できない可能性がある。事実、ドーズ調整が困難であると言われている。中和抗体レベルに偏りが生じた場合、上記のADEの機構により重症化を導く可能性があるため、Dengueワクチンの場合、「干渉作用」はことさら重要な弊害となる。

我々の教室では、Dengue 4価DNAワクチンを試作した。DNAワクチンにはウイルス感染に見られるような干渉作用は認められず、混合ワクチンに適した戦略と思われる。また、安全・安価であり、開発途上国に導入可能なタイプのワクチンである。これまでこの試作ワクチンが、4型全てに対する中和抗体をマウスに誘導することを示してきた。

一方で、中和抗体は低濃度では感染増強活性を有することも一般的に知られている。そこで、中和抗体を誘導するタイプのDengueワクチンは、同時に増強抗体を誘導する懸念も指摘されるようになってきた。ワクチン接種により防御される期間はあ

るが、やがて重症型の患者を増やす可能性は、デングワクチンの安全性に関わる重大な問題である。しかし、個々のワクチン開発研究において、そのワクチンが増強抗体を誘導するかどうかについては、ほとんど報告がない。

報告が見られない理由の1つは、従来の中和試験や感染増強試験では、それぞれの活性を単独でしか測定できないことである。生体内では中和抗体と増強抗体の両方が含まれるため、中和活性あるいは増強活性の一方を測定しても、全体としてどういう活性があるのかは不明である。また、既存の感染増強試験は煩雑であり、再現性に乏しいことも理由の1つと考えられる。

本研究では、自然感染やワクチンによって誘導された抗体の中和活性及び増強活性という生体内での相反する2つの活性バランスを同時に検出する測定法を開発した。また、その方法を用いてデング4価DNAワクチンを接種したマウスに誘導される抗体の、すべての型に対する中和・感染増強活性を調べた。

## B. 研究方法

**細胞**：Vero 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS) 添加イーグル MEM 培地 (MEM + 10%FBS) で 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。C6/36 細胞は、非不可欠アミノ酸添加 MEM+10%FBS で 28°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。K562 細胞は、10%FBS 及び 1%ペニシリン・ストレプトマイシン添加 RPMI-1640 で 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。K562 細胞は浮遊系の細胞であるが、接着する細胞を選択して継代し、準接着系に馴化させた。

**ウイルス**：DENV2 のニューギニア C 株を用いた。この株を C6/36 細胞に感染させて得られた培養液を抗体依存性感染増強活性の測定に用いた。

**モノクローナル抗体**：DENV2 を免疫原として作製した 10 種類のマウスモノクローナル抗体 (1B3、6D6、9A7、11H4、13A3、15A4、1B6、13F2、10F1、5B10)

を簡便化感染増強試験の評価に用いた。この内、10F1 と市販の 3H5 (DENV2 特異的:ATCC) をマウスの移入実験に用いた。

**ウイルス感染力価測定**：ウイルス感染力価は、Vero 細胞を用いて免疫染色後のフォーカスをカウントし、FFU/ml として表した。免疫染色は、11H4 抗体 (E 蛋白特異的) を用いて、ABC 染色した。

**従来の感染増強試験**：感染細胞率、ウイルス産生量及び感染中心数に基づく方法を用いた。100 µl に調製した 2×10<sup>5</sup> 個の浮遊系 K562 細胞に、10 倍階段希釈した検体 72 µl を加え、さらに 100 µl に調製した 5.4×10<sup>5</sup> FFU の DENV2 を加えて、37°C で 2 時間保温した (全量 272 µl)。136 µl は感染細胞率およびウイルス産生量に基づく方法、残りの 136 µl は感染中心数に基づく方法に使用した。

**感染細胞率に基づく方法**：136 µl の細胞浮遊液を遠心後、細胞を 1 ml の培養液に再浮遊した。培養 40 時間後に一部の細胞を回収し、免疫染色により感染細胞率を求めた。

**ウイルス産生量に基づく方法**：上記の細胞を合計 3 日間培養し、その培養液を回収して、ウイルス力価を測定した。

**感染中心数に基づく方法**：残りの 136 µl の細胞浮遊液は、細胞を洗浄後、24 穴マイクロプレートで 2.5×10<sup>5</sup> 個の Vero 細胞と混合し、さらに 37°C で 3 時間培養した。培養液を取り除き、重曹液 (1%メチルセルロース) で 3~4 日間培養し、免疫染色によりフォーカス数を求めた。(感染細胞数は、136 µl (1×10<sup>5</sup> 個) 中の感染細胞数として表した。)

いずれの従来法も、陰性対照 (抗体を加えていない 3 ウエル) の平均値 + 2×標準偏差 (SD) 以上を示した場合に、増強活性陽性と判定した。

**簡便化感染増強試験**：ポリ-L-リジンでコーティングした 96 穴マイクロプレートを使用した。各ウエルで検体を 36 µl に 10 倍階段希釈し、50 µl に浮遊した 1×10<sup>5</sup> 個の準接着系 K562 細胞を加え、さらに

50  $\mu$ l の  $2.7 \times 10^5$  FFU の DENV2 を加えて、37°C で培養した。24~48 時間後に固定し、免疫染色により感染細胞数を求めた。陰性対照（抗体を加えていない 8 ウエル）の平均値 + 3SD 以上を示した場合に感染増強活性陽性と判定した。用いたウイルスの力価は、マイクロプレート法で陰性対照の感染細胞数が約 100 個になるように調整した。ただし、従来法と比較する実験では、約 1000 個に調整した。中和活性と感染増強活性は補体レベルに依存するため、補体を含む系（以下補体 (+) と記す）と、含まない系（以下補体 (-) と記す）で試験した。

**マウス実験：**デング 4 価 DNA ワクチン（prM 及び E 遺伝子発現プラスミド：各ウイルス型につき 25、5 あるいは 1  $\mu$ g）と DENV2 細胞外粒子（prM/E 発現細胞培養上清から精製：150 ng）を、1 群 5 匹の 6 週令 ICR マウスに 7 週間隔で 2 回、混合投与した。また移入実験では、7 週令の雄 C3H/He マウスにモノクローナル抗体を尾静脈より接種した。採血は眼窩静脈叢から行った。

**中和試験：**Vero 細胞を用いて、50% または 90% プラーク減少法により、血清中の中和抗体価を測定した。

#### （倫理面への配慮）

本研究における動物実験は、神戸大学動物実験委員会により承認された後に実施した。

### C. 研究結果

#### 簡便化増強試験の評価

**従来法との比較：**DENV2 に感染した準接着系 K562 細胞の染色像を図 1 に示す。細胞層の中で感染細胞を明瞭に識別できた。次に、5B10 抗体を用いて従来から用いられている 3 種の感染増強試験と比較した結果、簡便法と従来法から得られた用量依存曲線はほぼ同様のパターンを示した（図 2A）。すなわち、どの測定法でも抗体の  $10^1$  希釈で最小の、 $10^3$  希釈で最大の感染増強活性を示した。また、10 種類の

デング 2 型マウスモノクローナル抗体を用いて比較した結果、簡便法はいずれの従来法とも有意な相関を示し（ $p < 0.001$ ）、また一致率も高く、同等の信頼性を示した（図 2B）。

**中和試験への応用：**上記の実験では、ほとんどすべてのモノクローナル抗体において、 $10^1$  希釈では感染性を検出できなかった。この結果は、簡便法の中和試験への適用性を示唆する。一般的な中和試験法では、ウイルスと抗体を混合後に保温するため、簡便法において保温時間と中和活性の関係を調べた結果、この系では 2 時間で中和が完了したことが示された（図 3A）。そこで、感染増強試験の方法に、37°C で 2 時間の保温操作を加えて、中和試験を行った。

Vero 細胞を用いた中和試験と比較した結果、5B10 抗体の用量依存中和曲線は、K562 細胞を用いた場合と異なった。すなわち、補体非存在下において 50% 減少は、K562 細胞では約  $10^3$  希釈で、一方 Vero 細胞では約  $10^5$  希釈で認められた。また補体存在下では、両細胞において中和活性は上昇し、特に K562 細胞では大きい上昇が認められた。これらの差は、K562 細胞が抗体の増強活性を反映したためと考えられる。

次に、DENV2 に対する 10 種類のモノクローナル抗体を用いて比較した結果、K562 細胞と Vero 細胞で得られた中和抗体価は有意に相関した（ $p < 0.001$ ）。以上の結果から、K562 細胞を用いて、増強活性を有する検体中の中和活性について測定可能であることが示された。

#### デング 4 価 DNA ワクチンが誘導する抗体能動免疫マウスにおける抗体の経時変化

中和抗体は低濃度において増強活性を示すため、低レベルの中和抗体が誘導されるように、種々のドーズ（25、5、1  $\mu$ g）のデング 4 価 DNA ワクチンによりマウスを免疫した。各群のプール血清について中和試験を行った結果、免疫後 3 週目において DENV3 に対して検知できる中和抗

体のみがワクチンの 5 µg 接種群で認められたが、その他の群では認められなかった (図 4A)。2 回目の免疫後 (9 週目) には、すべての 25 µg 群および 5 µg 群で中和抗体が誘導されたが、1 µg 接種群のマウスでは、検知レベル以下あるいは低い中和抗体価であった。したがって、これらの血清は、ワクチンにより誘導される増強活性の試験に適する。

確立された上記の感染増強試験により、 $10^1$ ~ $10^5$  希釈の血清を対象にして、増強および中和活性を調べた。抗体を加えないウイルスのみの対照で得られた感染細胞数を 100 に設定し、平均と SD から計算されたカットオフ値を基準に、活性の有無を判定した。図 4B では、3、6 および 9 週後に、各 DNA ワクチンドーズで得られたマウス血清を対象に、補体 (-) あるいは (+) の条件で、4 種のウイルス (DENV1~4) に対して得られた結果を示す。それぞれのパネルにおいて、上の点線より高い値は中和活性、逆に下の点線より低い値は増強活性を意味する。

補体 (-) の条件では、ワクチン接種後 3 週目に、高いドーズ (25、5 µg) で免疫した群において、すべての型に対して感染増強活性が認められた。そして 6 週目には、この活性は多くの条件 (型、ドーズ) で上昇し、さらに 9 週目には、DENV3 に対する 1 µg 接種群以外、すべてのワクチン接種群において全ての型に対して感染増強活性が認められた (図 2)。Vero 細胞で得られた中和抗体価が高いほど増強活性の程度が高い傾向にあった。一方、補体 (+) の条件下では、上記の増強活性は認められなくなり、6 週目には DENV2 に対し、9 週目には多くの条件で中和活性を示した。以上の結果から、Vero 細胞で測定できる中和抗体を誘導するワクチンにおいて、免疫初期の中和抗体がまだ十分に誘導されていない時期、あるいはドーズが低いために誘導される抗体レベルが低い条件では、感染増強活性が示されることが明らかになった。さらに、中和抗体が十分に

誘導された状態でも、補体 (-) の条件では高い感染増強活性が示された。しかし、それらの高い感染増強活性も、補体 (+) の条件では、中和活性に転じ、少なくとも増強活性は消失することが明らかとなった。

モノクローナル抗体移入後の抗体の経時変化: 次に、ワクチン接種後に時間が経過することにより、抗体レベルが徐々に低下する状態における中和及び感染増強活性の動態を調べるため、DENV2 に対するモノクローナル抗体をマウスに移入して、抗体濃度の低下に伴う中和・感染増強活性の経時変化を調べた。サブクラスによる違いも調べるため、IgG1 の 3H5 抗体、また IgG2a の 10F1 抗体を用いた。まず、移入後のマウス血清中の抗体濃度の推移を DENV2 に対する ELISA 抗体を指標に調べた (図 5A)。その結果、抗体種によって移入直後の抗体量に差が認められたが、その後はほぼ同程度に低下した。

感染増強試験の結果を図 5B に示す。いずれの抗体も、移入直後 (1 時間目) の血清で示された感染増強は、腹水で示された感染増強より低い希釈度でピークが現れた。すなわち、濃度依存性の反応曲線は、腹水からの抗体濃度減少率に比例して、低希釈側 (左) にシフトした。例えば、3H5 抗体を移入したマウスにおいては、移入 1 時間後に採取された血清の低希釈度 ( $10^1$  や  $10^2$  希釈) では中和活性を示した。したがって、ワクチン接種後に中和抗体が誘導された状態を模倣する。一方、この中和活性は、高希釈度 ( $10^3$  や  $10^4$  希釈) では感染増強活性に転じた。すなわち、血清中の抗体濃度が低下することにより、低希釈度でも増強活性を示すようになることが予想される。この予想通り、移入後、血清中の抗体濃度の経時的な減少に比例して、感染増強のピークは低希釈の方へシフトした。そして、10 倍希釈で示される中和活性が徐々に減少した。移入後 12 週 (3H5) および 8 週 (10F1) 目には両活性共にほとんど検出されなくなった。

3H5 抗体は補体存在下でも非存在下でも同様の曲線を示した。これは、この抗体のサブクラスが IgG1 であるために、補体との結合力が弱いからと考えられる。一方、IgG2a サブクラスの 10F1 抗体を移入した場合は、補体存在下においては感染増強活性が消失し、逆に中和活性が認められた。また、その活性は経時的に減少した。

#### D. 考察

デング出血熱の発症機序に関しては諸説あるが、重症化がウイルス血症レベルに関係することは、多くの研究者が認めている。ADE は、ウイルス血症レベルの上昇を引き起こすメカニズムの 1 つである。すなわち、デングウイルスに感受性のある単球やマクロファージ等、Fcγ レセプターを有する細胞が、抗体の媒介によりウイルス感染を増強する。感染増強抗体がウイルス血症レベルを上昇させて重症化を導くのに対して、中和抗体はウイルス血症レベルを低下させ防御に働くため、この相反する 2 つの活性を同時に測定し、そのバランスを求める方法は、ポリクローナルな血清中抗体がトータルな活性として、重症化に関与するのか、防御に働くのかを推定する重要な方法である。

従来の感染増強試験は、主に感染細胞率、ウイルス産生量、感染中心数に基づいた方法であった。これらの測定法は、感染増強活性を感度高く求めることは可能であったが、浮遊培養細胞を用いるため、多くの遠心操作を必要とし、手間と時間を要した。また、培養に数日間を費やした。一方、中和試験は一般的に Vero 細胞のような接着系の細胞で行われる。しかし、これらの細胞は FcγR を有しないため、血清中の中和活性のみが示され、生体内での相反する 2 つの活性バランスを把握することは困難であった。例えば、強い感染増強活性と弱い中和活性を含む血清は、*in vivo* では ADE を引き起こすかもしれないが、Vero 細胞での中和抗体価は陽性を示すことになる。そこで本研究では、FcγR を有する

K562 細胞を準接着系に改良し、簡便に中和・増強活性のバランスを測定する方法を開発した。この方法は、今後の抗体調査や患者の診断として有用であると考えられる。

*In vitro* では中和抗体の希釈により中和活性は増強活性に転じる。このことから、一度感染を受けて中和抗体が誘導されたヒトは時間の経過とともに血中抗体量が低下し、重症化しやすくなると考えられている。これは、疫学的にも証明されている。ワクチン接種においても、投与後のまだ中和抗体が検出されない時期や、抗体が不十分に誘導されたものが 4 つの型の中で 1 つでも生じた場合に感染増強活性が出現する可能性がある。また、中和抗体が誘導されたあとでも、やがて血中抗体量は低下して重症化を招く可能性がある。本研究では、デング 4 価 DNA ワクチンのマウスモデルを用いて解析し、*in vitro* で推定されていたワクチンによる感染増強抗体が実際に *in vivo* で誘導されること、しかし補体の存在下では増強活性が消失するか中和抗体に転ずることを明らかにした。また、モノクローナル抗体を用いた実験では、移入後の経時変化から、*in vitro* での血清希釈と *in vivo* における抗体濃度減少が、概ね比例することが明らかにされた。

中和活性と増強活性のバランスが補体に依存するのは、サブクラスの影響が大きい。IgG1 である 3H5 抗体の活性は補体に依存せず、逆に IgG2a の 10F1 抗体は大きく依存した。この理由は、補体と IgG1 との結合性は弱く、逆に IgG2a との結合性が強いと考えられる。したがって、IgG2a サブクラスが多く含まれるマウス血清は、補体存在下では増強活性を示しにくいことになる。誘導される抗体のサブクラスは、ワクチンの種類や接種経路によって異なるが、一般的に遺伝子導入型のワクチンがタンパクワクチンと比較して Th1 優位の免疫が誘導される。マウスモデルでは、Th1 タイプの免疫応答は IgG2a 抗体、Th2 タイプの免疫応答では IgG1 抗体が主

に誘導されることが知られているが、今回、デング4価DNAワクチン接種マウス血清についてもIgG2aが優位に誘導されていた(結果示さず)。ヒトにおいても、Th1タイプの免疫応答を優位に誘導できる遺伝子導入型のワクチンは、タンパクワクチンに比べてより安全であることが示唆された。

反応系に補体を添加することにより増強活性が消失するか中和抗体に転じたため、補体レベルが正常である健康人においてはデングワクチンが重症化の引き金になる可能性は少ないと考えられた。一方、ワクチンが誘導する中和抗体は、K562細胞を用いた今回の試験により比較すると、通常のワクチン評価に使用されるVero細胞を用いた試験で得られる中和抗体価より、かなり低い活性であることも示された。しかし、25 µg接種群では9週目にはいずれの型に対しても中和活性を示し、これがドーズに依存していることから、ワクチンの免疫原性を上げることにより、解決できる問題と思われる。また、疫学的には一度感染した型には終生免疫を持つことが示されているため、今回の試験で示された低いレベルの中和抗体でも防御できると考えられる。本研究で明らかにされたことはDNAワクチンのみにとどまらず、世界のデングワクチン開発に関係する重要な知見である。

## E. 結論

準接着系K562細胞を用いて中和活性及び感染増強活性という、相反する2つの活性バランスを測定できた。デング4価DNAワクチンはADE抗体を誘導したが、補体が存在すれば消失した。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Konishi E, Sakai Y, Kitai Y,

Yamanaka A: Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, with a small pig population. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80:856-61.

2) Yamanaka A, Konishi E: A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness in mice based on levels of viremia caused by intraperitoneal injection of infected culture cells. *Vaccine.* 2009;27:3735-43.

3) Konishi E, Kitai Y: Detection by ELISA of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein induced in subclinically infected humans. *Vaccine.* 2009;27:7053-8.

4) Konishi E: Status of natural infection with Japanese encephalitis virus in Japan: prevalence of antibodies to the nonstructural 1 protein among humans and horses. *Vaccine.* 2009;27:7129-30.

5) Konishi E, Tabuchi Y, Yamanaka A: A simple assay system for infection-enhancing and neutralizing antibodies to dengue type 2 virus using layers of semi-adherent K562 cells. *J Virol Methods.* 2010;163:360-7.

6) Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Utsumi T, Amin M, Lusida MI, Soegijanto S, Konishi E: Prevalence of Antibodies to Japanese Encephalitis Virus among Pigs in Bali and East Java, Indonesia, 2008. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2010;63:58-60.

7) Konishi E, Kitai Y, Tabei Y, Nishimura K, Harada S: Natural Japanese encephalitis virus infection among humans in west and east Japan shows the need to continue a vaccination program. *Vaccine.* 2010; 10.1016/j.vaccine.2010.01.008

### 2. 学会発表

1) 山中敦史、Eryk Hendrianto、Amor P Ginting、Dian Dwi Sary、Soegeng Soegijanto、小西 英二：インドネシアのデング熱・デング出血熱患者における血清中の総補体価CH50の測定。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

2) 北井 陽子、原田誠也、西村浩一、田部井由紀子、小西 英二：NS1抗体測定による近年の日本脳炎ウイルス自然感染率の調査。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

3) 桑原三和、小西英二：昆虫細胞由来フラビウイルス蛋白の診断およびワクチン抗原への適用。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

4) Atsushi Yamanaka, Yuko Tabuchi and Eiji Konishi: A method to measure both infection-enhancing and neutralizing antibodies against dengue type 2 virus using K562 cell layers. Forty-third Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Science Program, Philadelphia, 2009年7月

5) Atsushi Yamanaka, Yuko Tabuchi, Eryk Hendrianto, Amor P Ginting, Dian Dwi Sary, Soegeng Soegijanto, and Eiji Konishi: Development of a method to measure both infection-enhancing and neutralizing antibodies against dengue virus, and its application to clinical samples. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, 2009年9月

6) Atsushi Yamanaka, Eryk Hendrianto, Amor P Ginting, Dian Dwi Sary, Soegeng Soegijanto, and Eiji Konishi: Relationship between complement activity and disease severity in dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in Indonesia. The International

Joint Forum on Infectious Diseases, Bangkok, 2009年9月

7) 山中敦史、Kris Cahyo Mulyatno、Helen Susilowati、Eryk Hendrianto、Takako Utsumi、Mochamad Amin、Maria Inge Lusida、Soegeng Soegijanto、小西英二：2008年インドネシアのバリ及び東ジャワ州の飼育ブタを対象とした日本脳炎抗体保有状況調査。第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009年10月

8) 田淵裕子、山中敦史、小西英二：準接着系K562細胞を用いたデング2型ウイルスに対する感染増強活性及び中和活性の同時測定法。第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009年10月

9) 山中敦史、Eryk Hendrianto、Amor P Ginting、Dian Dwi Sary、Soegeng Soegijanto、小西英二：インドネシアのデング熱・デング出血熱患者における補体活性と重症化の関係。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

10) 宮川優子、小西英二：デングワクチンがマウスに誘導する中和及び感染増強抗体の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

11) 小西麻由、小西英二：日本脳炎ウイルス抗体をデングウイルス抗体から識別するブロッキングELISA法の確立。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

12) 瀧澤山人、小西英二：デング2型ウイルスによる前免疫がデング4価DNAワクチンの免疫原性に及ぼす影響。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

13) 田淵裕子、山中敦史、小西英二：デング流行地のヒトが保有するデングウイルス感染増強抗体の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

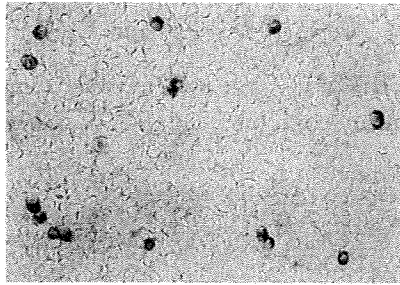


図 1. 感染 K562 細胞層の染色像。準接着系に馴化した K562 細胞を、ポリ-L-リジンでコーティングしたマイクロプレートのウェル内でウイルスと混合し、37℃、24 時間放置した。固定後、ABC 染色を施した。黒く見えるのが感染細胞である。

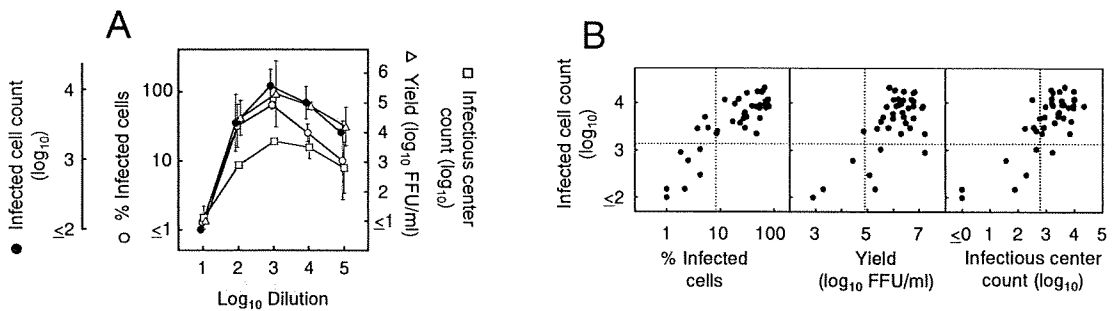


図 2. 簡便化増強試験の従来法との比較。(A) 5B10 抗体を用いた用量依存曲線。(B) 10 種類のモノクローナル抗体を用いた比較。10<sup>2</sup>~10<sup>5</sup> の血清希釈で得られたデータを散布図として表した。点線は、カットオフ値を示す。

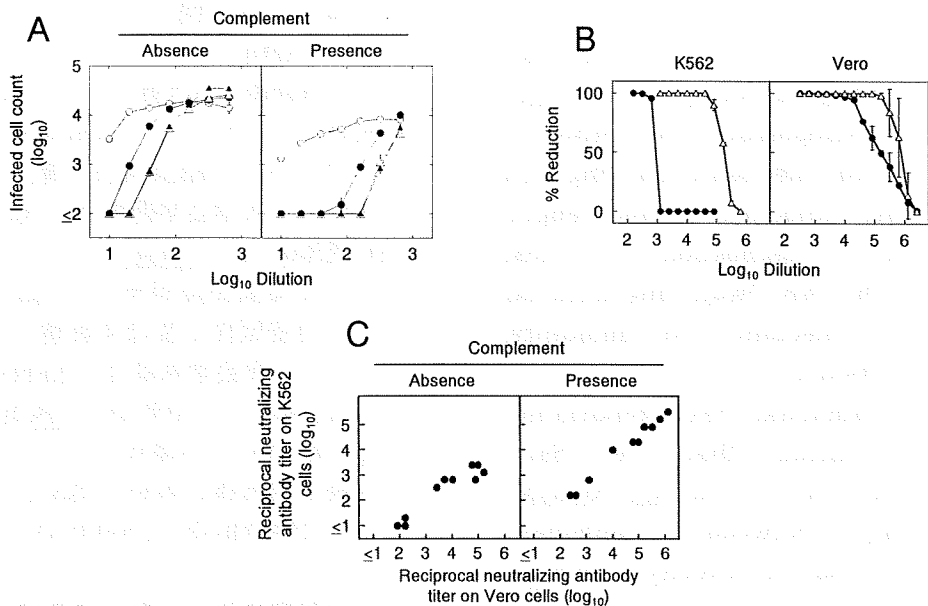
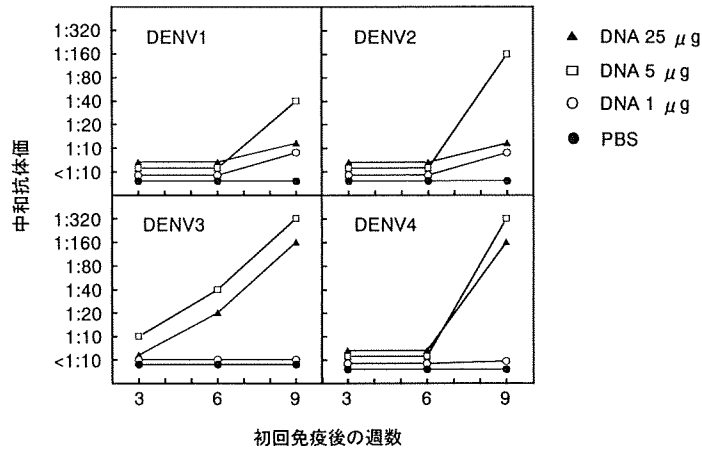


図 3. 簡便化増強試験の中和試験への応用。(A) ウイルス・抗体混合液の保温時間と中和活性の関係。保温時間は、0 (○)、1 (●)、2 (△) および 3 (▲) 時間であった。(B) 5B10 抗体を用いて K562 細胞と Vero 細胞で得られた用量依存曲線。補体存在下 (△) および非存在下 (●) で行なった。(C) 10 種類のモノクローナル抗体を用いて K562 細胞と Vero 細胞で得られた中和抗体価 (50% プラーク減少法) の比較。



A



B

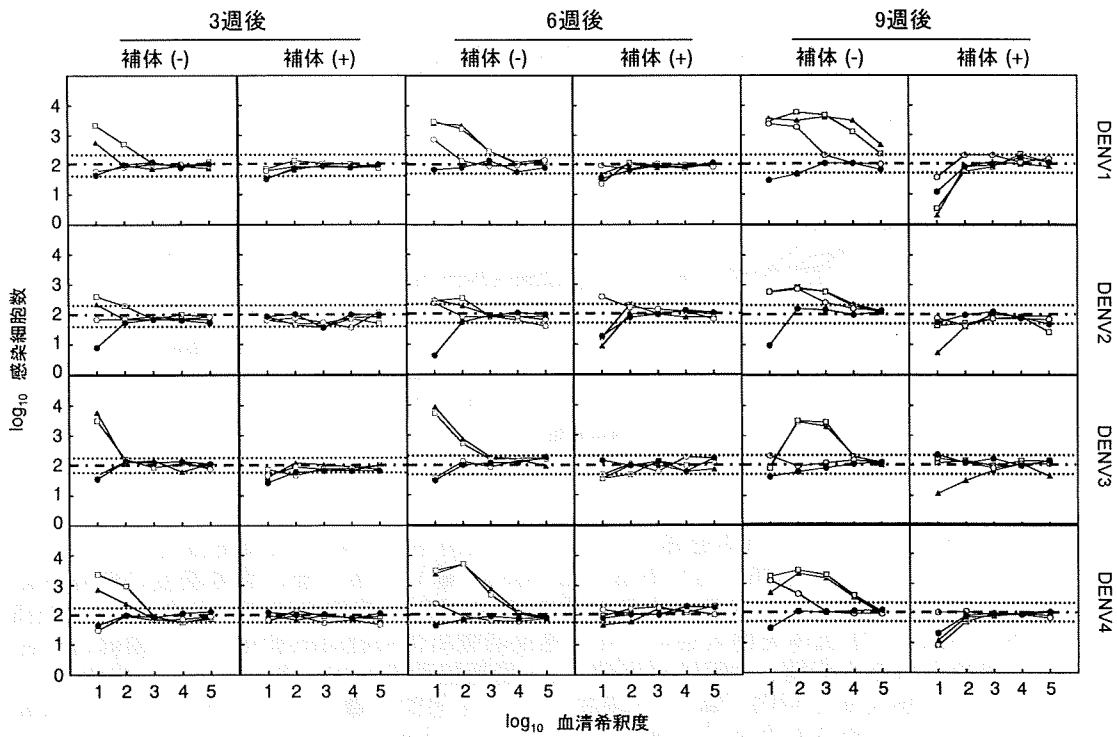


図 4. 能動免疫マウスにおける抗体の経時変化。4 週令の ICR マウス (1 群 5 匹) に、デング 4 価 DNA ワクチンを、各々の型について 25  $\mu$ g (▲)、5  $\mu$ g (□)、1  $\mu$ g (○) を DENV2 細胞外粒子 (150 ng) と混合して、または PBS (●) を、7 週間隔で 2 回投与した。3 週毎に採血し、プール血清を試験に供した。(A) DENV1~4 に対する中和抗体価 (90% プラーク減少法)。(B) 簡便化感染増強試験による中和・増強活性。一点鎖線は対照で求められた平均値、点線は平均値  $\pm$  2  $\times$  標準偏差を示す。

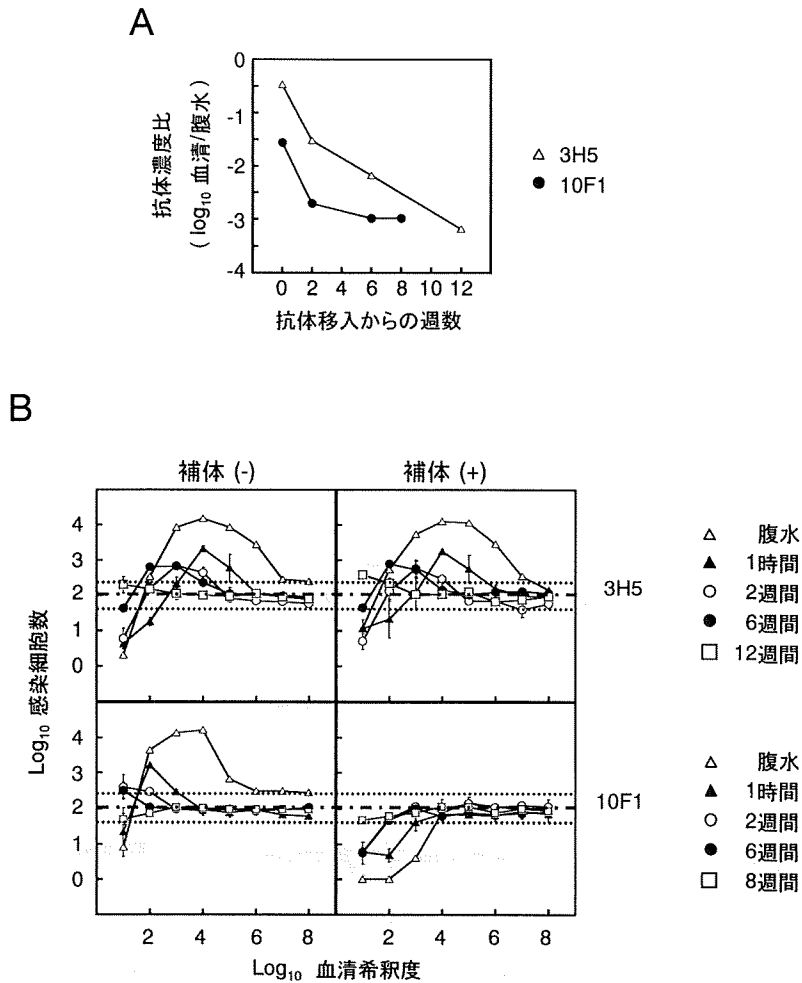


図 5.モノクローナル抗体を移入したマウス血清中の中和・感染増強抗体。(A) モノクローナル抗体 3H5 (△) あるいは 10F1 (●) を移入後の抗体濃度の経時的変化。移入した腹水に対するマウス血清中の DENV2 抗体の比で示した。(B) 3H5 あるいは 10F1 抗体を移入後の中和・感染増強抗体の経時的変化。一点鎖線は対照で求められた平均値、点線は平均値 $\pm 2$ ×標準偏差を示す。移入に用いた腹水 (△) あるいは移入後 1 時間 (▲)、2 週間 (○)、6 週間 (●) 及び 8 あるいは 12 週間 (□) 目に採取された血清で得られたデータを示す。

分担研究報告書

チクングニヤウイルスの迅速診断法の検討

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室長）  
協力研究者 林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）  
藤本嗣人（国立感染症研究所感染症情報センター第四室長）  
小長谷昌未（国立感染症研究所感染症情報センター）  
倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部長）

研究要旨

チクングニヤウイルス (CHIKV) はトガウイルス科アルファウイルス属に分類される RNA ウイルスで、蚊によって媒介され、ヒト→蚊→ヒトの感染環をもつ。その主たる媒介蚊はヤブカ属の蚊である。チクングニヤ熱は、発熱・関節炎・発疹の3主徴が特徴であり、時に出血傾向を呈するため、鑑別疾患としてデング熱があげられる。これまでに RT-PCR 法、リアルタイム RT-PCR 法、IgM 捕捉 ELISA 法、50%プラーク減少法による検査体制を確立しチクングニヤ熱疑い輸入症例の実験室内診断を行い、15 例の輸入症例を確認した。日本には媒介蚊であるヒトスジシマカが広く生息しており、CHIKV が日本に侵入する可能性は否定できない。したがって媒介蚊の CHIKV 感染を可能とするウイルス血症の高い CHIK 熱急性期患者の迅速な把握は必須である。そこで我々は現在の CHIKV 遺伝子検出系である RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR 法に比較してさらにより迅速な Hyper RT-PCR 法の開発を試みたので報告する。

A. 研究目的

チクングニヤ熱は 1952 年にアフリカのタンザニアでデング熱様疾患として初めて報告された発熱、関節痛、発疹を特徴とする熱性疾患であり、2004-2006 年にインド洋諸島で大流行した。その流行はインド、スリランカ、イタリア、マレーシア、タイ、シンガポールに拡大するとともに欧州、米国、アジア、オセアニア諸国において多くの輸入症例が報告されている。インドでは 2005-2009 年に少なくとも 160 万人の症例が報告され、さらに流行はスリランカに拡大し 2006 年から 2009 年にかけて CHIKV 感染症例が推計 57,000 人報告された。さらに CHIKV の流行は東南アジアに拡散し、シンガポール、マレーシア、タ

イでの流行が確認されている。シンガポールでは 2007 年 12 月まで主にインドからの輸入症例が散発していたが、2008 年 1 月に国内症例が初めて報告され、2009 年までに 900 例以上の CHIK 症例が報告されている。またマレーシアでも 2009 年までに 10,000 症例以上の患者が報告された。タイでは 2008 年にマレーシアとの国境地域である南部地方を中心に 2233 症例が報告されたが 2009 年には流行地域がほぼ全土に拡大し 47797 の症例が報告されている。

チクングニヤウイルス (CHIKV) はトガウイルス科アルファウイルス属に分類される RNA ウイルスで、蚊によって媒介され、その主たる媒介蚊はネッタイシマカや日本にも分布

するヒトスジシマカである。チクングニヤ熱は、現在のところ我が国では感染症法や検疫法に定められていない疾患であるため、検査可能な機関が少ない。これまでに我々は RT-PCR 法、リアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子検出法、IgM 捕捉 ELISA 法、50% プラーク減少法を用いた中和法による診断法を用いた検査体制を確立し、これまでにチクングニヤ熱輸入症例の実験室内診断を行い、15 例の輸入症例が確認された。日本には媒介蚊であるヒトスジシマカが広く生息しており、CHIKV が日本に侵入する可能性は否定できない。したがって媒介蚊の CHIKV 感染を可能とするウイルス血症の高い CHIK 熱急性期患者の迅速な把握は必須である。そこで我々は現在の CHIKV 遺伝子検出系である RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR 法に比較してさらに迅速な Hyper RT-PCR 法の開発を試みたので報告する。

## B. 研究方法

ウイルス：チクングニヤウイルス、サギヤマウイルス、ヴェネズエラ馬脳炎ウイルス、東部馬脳炎ウイルス、シンドビスウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、デングウイルスより High pure viral RNA kit (ロシュ) を用いてウイルス RNA を抽出し供試した。また陰性対照としてヒト全血由来核酸を用いた。

合成 CHIKV RNA を用いた RNA コピー数の検討：CHIKV の E1 蛋白質領域をプラスミドベクター-pcDNA3.1 にクローニングし、目的 RNA を得た。得られた合成 RNA の吸光度と分子量からコピー数を算出しリアルタイム PCR 法において検量線を作製した。

プライマーの設計：チクングニヤウイルスの構造タンパク質コーディング領域にセンス

プライマー8種類、アンチセンスプライマー7種類を設計し、検討した(図2)。

Hyper RT-PCR 法：Hyper RT-PCR 用が開発された PCR 機器である Hyper PCR UR MK-IV (トラスト, 兵庫県加西市) を用いた(図1)。遺伝子検出マーカーとして SYBR green I を添加し、470nm の波長のシグナルを検出した。サンプルをプラスチックディスク(直径 12cm, 厚さ 0.9mm) に封入し、温度条件 48°C 60 秒、95°C 60 秒、[95°C 4 秒、68°C 4 秒、68°C 4 秒] で 45 サイクル反応した。

## C. 研究結果

プライマーの設計とプライマーペアの検討：チクングニヤウイルスの構造タンパク質である E1 領域にセンスプライマー8種類アンチセンスプライマー7種類を設計し様々な組み合わせを検討したところ、温度条件 45°C 60 秒、94°C 60 秒、[94°C 6 秒、58°C 6 秒、72°C 6 秒] で 60 サイクル、センスプライマー CHIK10572f 及びアンチセンスプライマー CHIK10798 r の組み合わせにおいて CHIKV に対して特異性が確認された。しかしながら、アガロースゲルにて増幅産物の解析を行ったところサギヤマウイルス、ヴェネズエラ馬脳炎ウイルス、東部馬脳炎ウイルス、シンドビスウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、において非特異バンドが観察された。

RT-PCR の温度条件の検討：そこでさらに特異性を高めるため様々な温度条件を検討した結果、温度条件 48°C 60 秒、95°C 60 秒、[95°C 4 秒、68°C 4 秒、68°C 4 秒] で 45 サイクルの反応条件においてチクングニヤウイルスに対して 10 コピー RNA/サンプルの検出感度を示した。このときフラビウイルスであるデングウイルス、他のアルファウイルス及びヒト

血液由来核酸に対して非特異反応は観察されなかった。またアガロースゲルによる増幅産物の解析においてもチクングニヤウイルスに対して特異的バンドが観察されたが、チクングニヤウイルス以外の他のウイルス由来の核酸抽出産物においては非特異的バンドが確認されなかった (図 3)。

#### D. 考察

これまでに我々は RT-PCR 法、リアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子検出法、IgM 捕捉 ELISA 法、50%ブランク減少法を用いた中和法による診断法を確立した。しかしながら既存の RT-PCR 法では 1 時間以上の時間を要する。そこで我々は Hyper RT-PCR 法によるチクングニヤウイルスの迅速診断系を確立した。Hyper RT-PCR の第一の特徴はその迅速性である。Hyper RT-PCR 法においては RT 反応から融解曲線解析を終了するまで約 15 分で終了する。またその後の反応産物のアガロースゲルでの解析およびシーケンスでの遺伝子配列の確認も可能であるため通常シーケンス解析のできない loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法と異なりチクングニヤウイルスの遺伝子型の解析も容易である。

我々はセンスプライマー 8 種、アンチセンスプライマー 7 種を設計し、様々な組み合わせの特異性および感度を検討した。その過程で Hyper RT-PCR 法はアニーリング温度から熱変性温度までのスピードが迅速なため伸長効率が高く、かつ非特異的な増幅が起きにくいプライマー設計および温度条件の設定が重要であることを確認した。その結果チクングニヤウイルスを特異的に検出し、感度が 10 コピー RNA/サンプルのプライマーペアセ

ンスプライマー CHIK10572f 及びアンチセンスプライマー CHIK10798 r を作成した。今後はより迅速で高感度の反応条件を探索する必要がある。

#### E. 結論

チクングニヤ熱の治療法は確立されておらず、CHIKV の動向にはヒト、蚊、気候、環境等の要因が複雑に関わり、その状況の予測は困難であり、日本においても媒介蚊であるヒジシマカが生息することから CHIKV の我が国への侵入は予断を許さない。急速な輸送手段の発達とネッタシマ蚊、ヒトスジシマ蚊の分布拡大、熱帯雨林地域への人口拡張により世界の熱帯・亜熱帯地域、特に東南アジアにおいてチクングニヤ熱は今後も流行が続くことが予想される。さらに 2010 年 1 月までに日本において 15 例の輸入症例が確認されている。ワクチンが実用化されていない現在、旅行先におけるチクングニヤ熱の流行状況を把握し、蚊対策に十分考慮すると共に、医療機関、地域住民、行政、研究機関の一層の協力体制を確立するために今後も関係各機関にこれまでの成果を提供する。

#### F. 健康危険情報

2007 年初頭に 2 例のスリランカからの輸入症例が日本で初めて確認された。2010 年 1 月までに日本において 15 例の輸入症例が確認されている。現在もインドおよび東南アジア地域を中心にチクングニヤ熱は流行が拡大しており、本邦にも媒介蚊であるヒトスジシマ蚊が生息するため早期の防疫体制の確立が求められる。

G. 研究発表

Lim, C.K., Nishibori, T., Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Tanaka, K., Kurane, I., Takasaki, T. Chikungunya virus isolated from a returnee to Japan from Sri Lanka: Isolation of two sub-strains with different characteristics. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2009. 81(5):865-868.

Lim, C.K., Kurane, I., and Takasaki, T. (2010) Re-emergence of chikungunya virus, pp. 1-22. In Maeda, A. (ed), *Animal Viruses*. Transworld Research Network., Kerala, India.

Aoyama, I., Uno, K., Yumisashi, T., Takasaki, T., Lim, C.K., Kurane, I., Kase, T., Takahashi, K. A Case of Chikungunya Fever Imported from India to Japan, Follow-Up of Specific IgM and IgG Antibodies over a 6-Month Period. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2010. 63(1):65-66.

林 昌宏. チクングニヤウイルス. 臨床と微生物, 36(3): 211-216, 2009

H. 学会発表

C. Lim, T. Nishibori, K. Watanabe, M. Ito, A. Kotaki, I. Kurane., T. Takasaki. Chikungunya Virus Isolated from a Patient Who Came Back to Japan from Sri Lanka: Isolation of two strains with different characteristics. The West Nile virus 2009 National Conference (Savannah, GA, USA) 2009/2/19-20.

林 昌宏. チクングニヤ感染症の診断法. 平成 21 年度希少感染症診断技術研修会 (東京都) 2010 年 2 月 25-26 日

高崎智彦, 林 昌宏. 拡大するチクングニヤ熱の現状と臨床. 平成 21 年度希少感染症診断技術研修会 (東京都) 2010 年 2 月 25-26 日

林 昌宏, 高崎智彦, モイ メンリン, 大松勉, 小滝 徹, 倉根一郎, 東南アジアにおけるチクングニヤ熱疑い患者血清の病原体および血清学的解析. 第 56 回日本ウイルス学会 (東京都) 2009 年 10 月 25-27 日

水野泰孝、氏家無限、竹下望、加藤康幸、金川修造、工藤宏一郎、高崎智彦、林 昌宏、倉根一郎:遅延する関節痛を主訴に来院したチクングニヤ熱の 3 症例. 第 58 回日本感染症学会東日本地方会学術集会 (東京都) 2009 年 10 月 30-31 日

林 昌宏、小滝 徹、高崎智彦、倉根一郎. フラビウイルス感染症迅速診断のための共通プライマーの開発. 第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (北海道) 2009 年 6 月 19-20 日

林 昌宏. チクングニヤ熱検査法. 平成 20 年度希少感染症診断技術研修会 (東京都) 2009 年 2 月 24-25 日

I. 知的財産権の出願・登録状況  
特記することなし

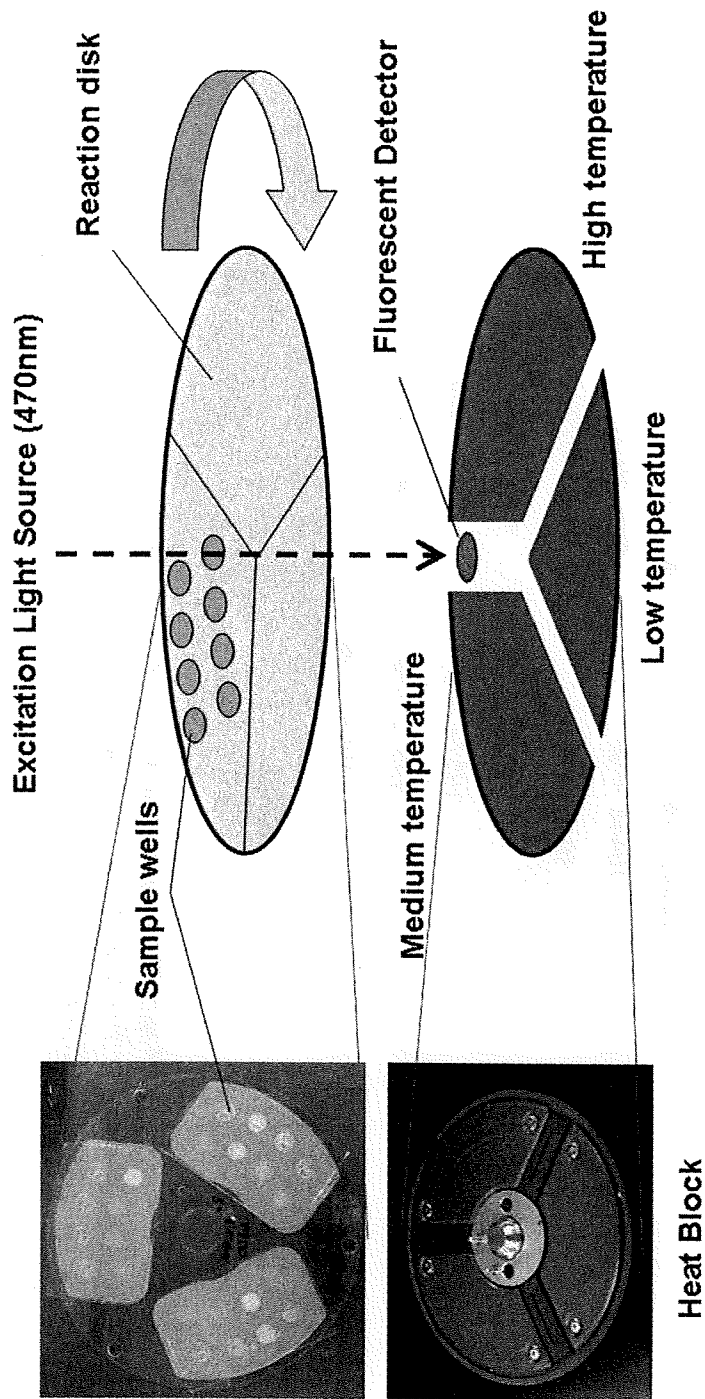


図1. Hyper RT-PCR の構造：機器内の反応容器は通常の反応チューブでなく，プラスチックディスク（直径 12cm，厚さ 0.9mm）を用いた。ディスクには 1 区画 8 つのウェルが 3 区画，それぞれ 3 種類の温度のヒートブロックに接触しながら回転する。ヒートブロックは高温，中温，低温に設定され，ウェル内の反応液の高速な熱交換が可能になるように制御されている。蛍光強度は伸長反応のブロックの次に検出器上を各ウェルが通過する際に計測される。

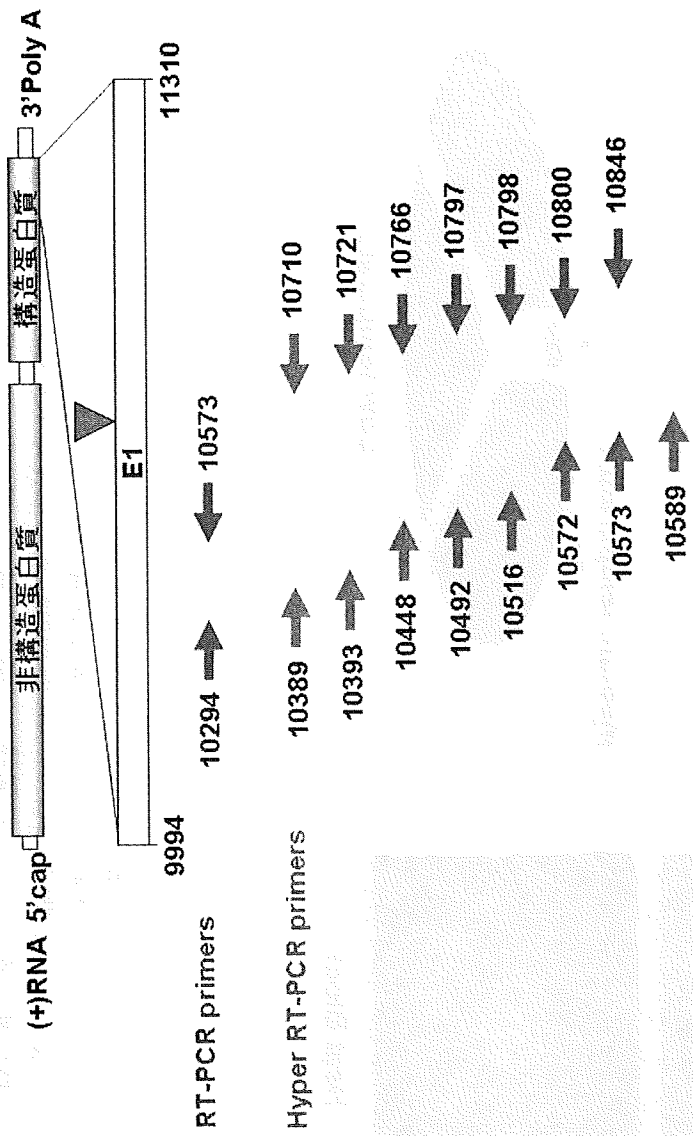


図2. チクングニヤウイルス検出用 Hyper RT-PCR 用プライマーの設計: チクングニヤウイルスの構造タンパク質コーディング領域にセ  
ンスプライマー8種類, アンチセンスプライマー7種類を設計し, 検討した. 標的領域にはチクングニヤウイルスのヒトスジシマカに対  
する親和性に関与すると報告されている E1 タンパク質の 226 番目のアミノ酸領域を含む.



## チクングニアウイルス検出用プライマーの検討

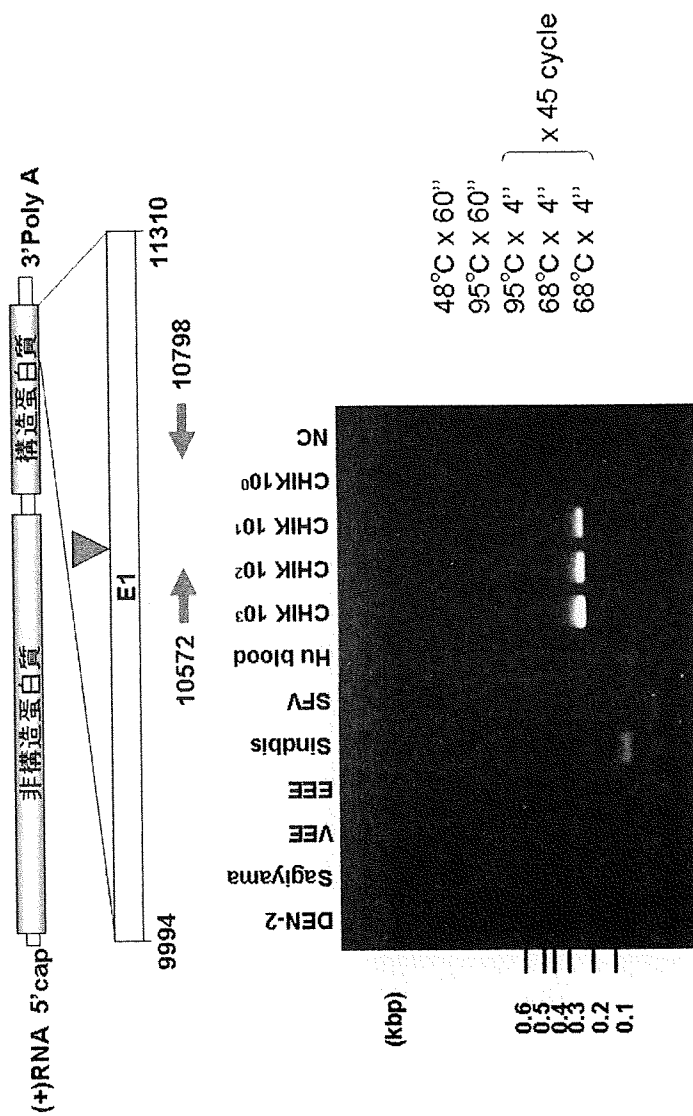


図 3. チクングニアウイルス検出プライマーの検討：設計したプライマーの様々な組み合わせを検討した結果センスプライマー CHIK10572f 及びアンチセンスプライマー-CHIK10798 r の特異性が確認された。このときこれらプライマーを用いることによりフラビウイルスであるデングウイルス、他のアルファウイルス及びヒト血液由来核酸に対して非特異反応は観察されず、さらにチクングニアウイルスに対しては 10 コピー-RNA/サンプルの検出感度を示した。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

チクングニヤウイルス検出法の検討

分担研究者 柴田 伸一郎(名古屋市衛生研究所 主任研究員)

研究協力者 小平 彩里 (名古屋市衛生研究所 研究員)

研究要旨

チクングニヤ熱は、チクングニアウイルスにより引き起こされる熱性疾患で、発熱・関節痛・発疹の3主徴を有し、デング熱との鑑別診断が求められている。これら感染症は、輸入感染症としても注目されている。国内に浸淫していない状況でいち早く進入を検出するには、迅速診断法としての遺伝子診断が合理的と考えられる。我々は、通常のRT-PCR法、TaqMan Probe リアルタイム RT-PCR を用いて、迅速かつ高感度に検出する方法を検証した。その結果、RT-PCR法・TaqMan Probe リアルタイム RT-PCR 共に迅速かつ高感度に検出できる事が判明した。また、新たに設計した複数組のプライマーペアを用い、RT-PCR 法での検出感度をさらに検証した結果、TaqMan Probe リアルタイム RT-PCR を凌ぐ検出感度を示すプライマーペアが見つかった。今回我々が設計したプライマーペアを用いた RT-PCR 法では、TaqMan Probe リアルタイム RT-PCR よりも10倍ほど高感度であった。さらなるメリットとして Genetic Analyzer を用いて塩基配列を決定し、分子疫学的解析にも応用できる可能性がある事が判明した。

A. 研究目的

チクングニヤウイルスは1953年にタンザニアで初めて分離され、以来アフリカやアジアでその流行が報告されている。このウイルスは、ヤブカ属のネッタイシマカ、ヒトスジシマカによる吸血により媒介される。

最近では2005年から2006年にかけてインド洋諸島、インドなどで大流行を起こし、公表患者数170万人以上に達し、レユニオン島では全人口の三分の一にあたる26万人以上が感染し、230人が死亡した。2007年7月から、インドからの輸入感染症と思

われる事例がイタリア北部で発生し254例の発生が報告されている。これらの流行地域はネッタイシマカが分布しておらず、ヒトスジシマカが原因の主流であった。このことは、日本に於いても同じで、ヒトスジシマカが生息している事から、日本にも輸入されると一気に国内に広がる可能性がある。

チクングニヤウイルスはトガウイルス科アルファウイルス属に分類される1本鎖(-)のRNAウイルスである。直径は約70nmでその表面にはエンベロープを有する球状粒子である。

チクングニヤウイルスにより引き起こされるチクングニヤ熱は、発熱・関節炎・発疹の3主徴が特徴であり、時に出血傾向を呈するため、デング熱との鑑別診断が重要である。チクングニヤ熱は、ヨーロッパ・インド・東南アジア諸国では警戒されているウイルス感染症である。近年地球温暖化が叫ばれる中、媒介蚊であるヒトスジシマカの日本における生息域の拡大（北限の上緯度化）が懸念されている。国際交流が盛んな現在、日本においても輸入感染症として、更には国内定着の可能性もあるチクングニヤ熱は注目すべき感染症である。

我々は近年増加しているデング熱症例との鑑別診断のため、さらにはチクングニヤ熱確定診断のため、迅速かつ高感度で診断ができる遺伝子検査法である RT-PCR 法、Real time RT-PCR 法を用い、それぞれの方法による検出効率を確認することを目的とした。

## B. 研究方法

同じ研究班である国立感染症研究所ウイルス1部で調整されたチクングニヤウイルス BH305 株 RNA の4乗~9乗までの10倍希釈列を作成した。

試薬は、TaqMan Probe リアルタイム RT-PCR は、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)、通常の RT-PCR 法は OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて比較を行った。

2 step RT-PCR は逆転写反応 (RT) を pd (N9) (ランダム 9mer TaKaRa Bio)、酵素に SuperScript III (invitrogen) を使用して反応温度を 25°C から 50°C まで 25 分かけ上昇させ、50°C 30 分間の反応を実施後、PCR を EX Taq HS (TaKaRa Bio) を用

いて行った。試薬の調整は、製品に添付の基準に従って調整した。

RT-PCR、PCR の反応条件は、アニーリング温度を Touch Down して実施した (図 1.)。

通常の RT-PCR 法により増幅した PCR 産物の確認は、688bps 以上の PCR 産物にカンしては、E-Gel 48 1% Agarose (Ethidium bromide 含有、invitrogen)、688bps より小さい PCR 産物は、E-Gel 48 2% Agarose (Ethidium bromide 含有、invitrogen) で泳動後、画像撮影装置により撮影し、ドキュメンテーションした。

また、増幅した産物は、ランダムにシーケンスを行ってチクングニヤウイルス BH305 株の遺伝子が増幅されている事を確認した。

TaqManProbe リアルタイム RT-PCR のプライマー、プローブは、同じ研究班の感染研ウイルス1部第2室の情報に基づき実施した。Probe: Taq-Chik638P、Primer: Taq-Chik607F、Taq-Chik672R を合成してもらった。

PCR 用プライマーに関しては、国際 DNA データバンクの一つである DDBJ よりチクングニヤウイルス遺伝子の全長が登録されている 32 本のデータを用いて GeneAnalyssis Ver. 2.0 (Applied Biosystems) で Tm 値が 55~53°C になるように設計した。そのプライマーペアの設定場所を図 2. に示す。従来のスタンダードとして使用されていた Chik10294s、Chik10573c を基準とし、新たに作成したプライマーとも比較検討をした。

今回のプライマー作成に用いたチクング

ニヤウイルス塩基配列データのデータベース Accession Number

EU703761, EU703760, EU703759, EU703762  
EF452494, L37661 (CKGPOLY), EF452493  
EF027141, EF027140, EF210157, EF027138  
EU244823, EF027137, EU564335, EF027135  
EF027136, EF027134, AM258994, AM258993  
EU564334, DQ443544, EF012359, EU037962  
DQ480364, AM258992, AM258991, AM258990,  
AM258995, EF027139, AF490259, NC\_004162,  
AY726732

### C. 研究結果

通常の One step PCR 法, two step PCR 法いずれの RT-PCR 法でも TouchDown PCR 法を導入することにより、非特異バンドは検出されることなく、今回の実験の基準とした Chik10294s, Chik10573c プライマーペアを用いて  $10^7$  希釈まで検出することができた。(図 3) Two Step PCR 法の方が使用 RNA が少ない事になるので、検出感度は実際にはかなり高い事になる。Real time PCR 法でも  $10^7$  希釈まで検出できていた。(図 4)

これらの事から、通常の RT-PCR 法であっても十分な感度を維持できる事が判ったので、今回設計したプライマーを用いて、検出感度を調べた。プライマーペアは、PCR 産物の大きさを考慮し、23組のプライマーペアを用いた。それぞれのプライマーペアの組み合わせは、Chik9979s/Chik10408c 増幅サイズ429bps、Chik9979s/Chik10573cm 増幅サイズ594bps、Chik9979s/Chik10713c 増幅サイズ734bps、Chik9979s/Chik11238c 増幅サイズ1259bps、Chik9979s/Chik11300c 増幅サイズ 1321bps、Chik10025s/Chik10408c 増幅サイズ383bps、

Chik10025s/Chik10573 増幅サイズ548bps、Chik10025s/Chik10713cm 増幅サイズ 688bps、Chik10025s/Chik11238c 増幅サイズ1213bps、Chik10025s/Chik11300c 増幅サイズ1275bps、Chik10225s/Chik10408c 増幅サイズ 153bps、Chik10225s/Chik10573cm 増幅サイズ 318bps、Chik10225s/Chik10713c 増幅サイズ458bps、Chik10225s/Chik11238c 増幅サイズ983bps、Chik10225s/Chik11300c 増幅サイズ 1045bps、Chik10294sm/Chik10573cm 増幅サイズ279bps、Chik10294sm/Chik10713c 増幅サイズ419bps、Chik10294sm/Chik11238c 増幅サイズ944bps、Chik10294sm/Chik11300c 増幅サイズ 1006bps、Chik10389s/Chik10573cm 増幅サイズ 184bps、Chik10389s/Chik10713c 増幅サイズ333bps、Chik10389s/Chik11238c 増幅サイズ903bps、Chik10389s/Chik11300c 増幅サイズ920bps である。それぞれのプライマーペアを用いて、図1. に示したTouchDown PCRを実施、希釈したチクングニヤウイルス由来RNAそれぞれについて増幅の可否を検討した。PCR産物が688bps以上の物は1%のアガロースゲルで(図5.)、それよりもPCR産物が小さくなる物は、2%のアガロースゲルで泳動を行った(図6.)。そしてそれぞれのPCR産物の有無をUV照射下でドキュメンテーション化し確認した。

図5.、図6. で得られた結果をプライマーペア毎に増幅サイズ、希釈限界をまとめたものが表 1 である。このところから通常の RT-PCR 法で増幅する場合プライマーペア Chik10255s /Chik10573cm が、 $10^8$  乗希釈まで検出可能で、TaqMan Probe リアルタイム RT-PCR よりも高感度である事が判った。