

図3. 各ウイルス型に対する中和・増強活性を示した血清の各群における割合。1:10の血清希釈度で得られた中和・増強活性に基づいた。

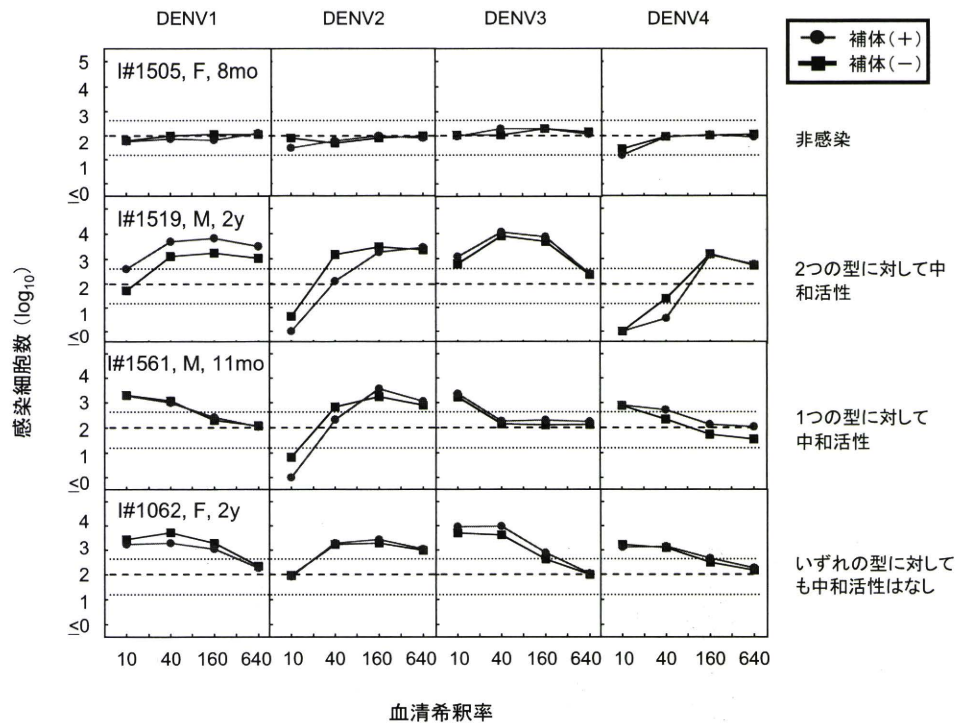


図4. インドネシアの小児(6ヶ月齢から2歳)における各型のウイルスに対する中和・増強活性。補体を含める系(●)と含めない系(■)で行った。破線は陰性対照の値、点線は中和活性および増強活性を判定するボーダーラインを表す。濃度依存性曲線パターンから4群に分類し、その代表的な結果を血清番号、性、年齢とともに示した。

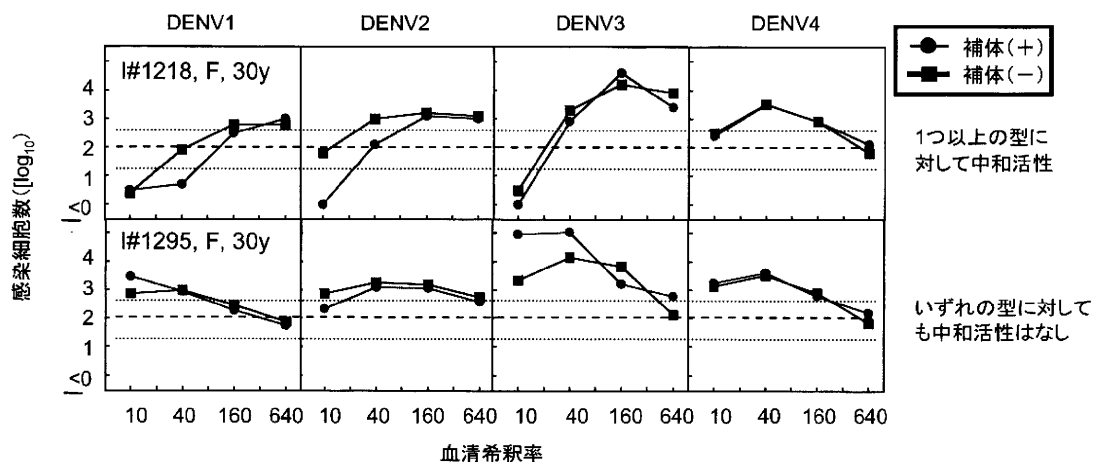


図5. インドネシアの成人（30歳代）における各型にのウイルスに対する中和・増強活性。補体を含める系（●）と含めない系（■）で行った。破線は陰性対照の値、点線は中和活性および増強活性を判定するボーダーラインを表す。濃度依存性曲線パターンから3群に分類し、その代表的な結果を血清番号、性、年齢とともに示した。

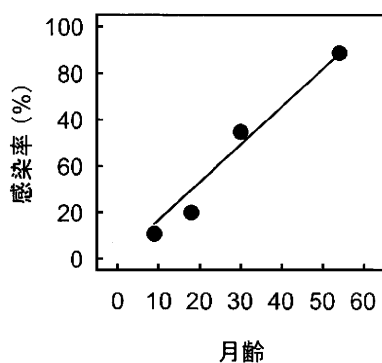


図6. インドネシアの小児（6ヶ月齢から2歳）における月齢依存のデングウイルス感染率。各型に対する中和・増強活性から、何れかの型に対して活性を示したものを感染個体と考え、各年齢における感染率を求めた。

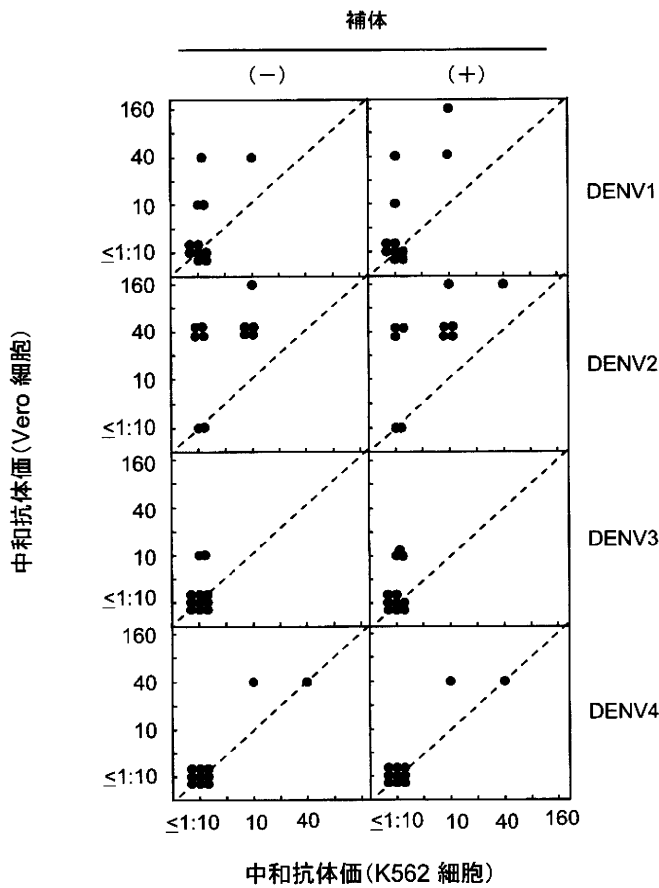


図 7. K562 細胞及び Vero 細胞を用いて得られた中和抗体価 (90%フォーカス減少法) の比較。初感染と考えられる 11 検体 (6-11 ヶ月 : 2 検体、1 歳 : 3 検体、2 歳 : 6 検体) を用い各型のデングウイルスに対して行った。K562 細胞で得られた結果を横軸に、Vero 細胞で得られた結果を縦軸に示す。補体存在下 (右側のパネル) または補体非存在下 (左側のパネル) の条件で行った。

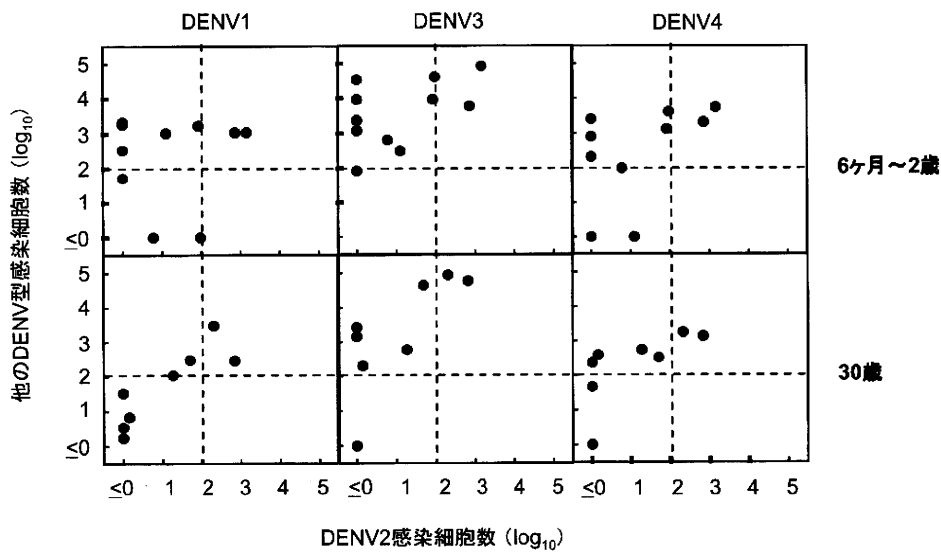


図 8. DENV2 に対する中和・増強抗体の、他の型に対する交差性。補体存在下の 1:10 で得られた結果を比較に用いた。

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究：
フラビウイルスの細胞障害機構に関する解析

分担研究者 竹上 勉 金沢医科大学総合医学研究所分子腫瘍学研究部門 教授

研究要旨：近年では本邦の日本脳炎患者数は年間 10 名に満たない数で推移しているが、国内において日本脳炎ウイルス(JEV)がいなくなったわけではない。分布ウイルス自身の遺伝子タイプの変遷や変異を考えると、JEV の病原性についての解析は継続して行っていくべきものであろう。我々は毎年石川県におけるウイルス媒介野外蚊(コガタアカイエカ)からの日本脳炎ウイルス(JEV)の分離を定点(3 地点)、定時期(8 月末～9 月初)に行い、さらにウイルス病原性についての解析を行っている。過去 5 年の採集蚊の推移をみると 1,759 匹(2005 年)、458 匹(2006 年)、885 匹(2007 年)、990 匹(2008 年)、1336 匹(2009 年)と続き、2010 年は 591 匹であった。ある程度の数値的差異はあるが、全般的に能登地域での蚊の生息数に大きな変化は無いことを示唆している。蚊の破碎液を用いて RT-PCR 法及び培養 Vero 細胞によるウイルス分離を行った。RT-PCR 陽性サンプルは 6 件あり、ウイルス分離を行った結果、2 株(Ishikawa-10(C6)および Ishikawa-10(C9))のウイルス分離に成功した。遺伝子解析の結果、分離 JEV 2 株の遺伝子型はいずれも 1 型であった。遺伝子タイプの違いと病原性の差異を調べるために分離 JEV 2 株と Ishikawa-K05 株(2005 年分離、遺伝子タイプ 1 型)あるいは JaGAr01 株(遺伝子タイプ 3 型)との比較を行った。プラークサイズ及び細胞における増殖性は 3 型 JaGAr01 株の方が 1 型 Ishikawa 株より大きく、高いが、細胞障害性、IFN 誘導性はほぼ同程度であった。JEV の病原性、細胞障害機構解析については感染に対する宿主応答の差異を遺伝子レベルから解析することが必須であり、引き続き宿主応答の解析を行っている。

A. 研究目的

近年では本邦における日本脳炎患者数は年間 10 名に満たない数で推移している。しかしながら、日本脳炎感染者は年間数万人になるとされる国外における流行拡大をみるまでもなく、日本国内での日脳感染動向も注意されるべきである。実際、石川県において 2007 年に 2 名の脳炎患者がでていた。こうした状況の中で、我々は 1998 年以来、石川県における定点、定時期で採取した野外蚊から JEV の分離を試みている。こうした北陸地域における JEV のウイルス分布状況の把握、さらにはウイルス病原性発揮機構の解明は脳炎大流行を抑えるためにも重要な課題と考え、研究目的としている。

B. 研究方法

蚊の採集: 蚊採集のために蚊帳及びドライアイスによる CO₂ 採集法を用いた。蚊帳を張る場所は豚舎に近い稲田(3 地点)で行っている。採集蚊 40 匹を 1 プールとして乳鉢にて PBS を入れ、破碎し、その破碎液は遠心法(10,000 × g、10 分間)にて分画した。

RNA 抽出及び RT-PCR: 蚊分画液を材料として Isogen 試薬を用いて RNA 抽出し、得られた RNA を用いて RT-PCR を行った。RT-PCR では、エンベロープ(E)蛋白、NS4a 蛋白領域、さらに 3' 末端領域の JEV 特異的プライマーを用いた。

ウイルス分離法: ウイルス分離のために培養細胞株 Vero 細胞を用いた。6 穴プレートを用い、5%牛胎児血清入りの MEM 培養液の中で Vero 細胞を継代し、そこに蚊抽出液を吸

着させた。4-5 日間の培養の後、細胞変性の有無でウイルス存在を確認した。培養上清液については、さらに BHK 細胞を用いてウイルスカ価を計測した。

遺伝子解析法: ウイルスゲノムに対応した複数のプライマーを用意し、PCR 産物をプレートにして直接的塩基配列解析法によりヌクレオチド配列を決定した。

遺伝子発現・細胞解析: 感染細胞から抽出された RNA を増幅・標識し、DNA マイクロアレイシステム(Affymetrix)を用いて宿主遺伝子の発現量を調べた。細胞解析にはフローサイトメトリー活用(FACS)を行った。

マウス実験: ウイルスの病原性を調べるためにマウス ICR にウイルスを接種(ip)、生死を観察した。

(倫理面からの配慮について)

組換え DNA 実験については金沢医大組換え DNA 安全委員会への申請許可の下に行い、マウス実験における注意事項は金沢医大動物委員会申請許可等を受けて行っている。

C. 研究結果

過去 5 年間の定点、定時期での野外蚊(コガタアカイエカ)採集結果を見ると、1,000 匹台の野外蚊(1,759 匹(2005 年)、1,458 匹(2006 年)、885 匹(2007 年)、990 匹(2008 年)、1336 匹(2009 年))を採集している。2010 年における採集野外蚊は 591 匹と若干少なめであった。ただし、研究協力者村上の長期間調査(6~10 月)では採集蚊数は必ずしも少ないことはなく、例年と同等であった。RT-PCR によって 6 件の陽性サンプルを得、Vero 細胞を用いたウイルス分離では少なくとも 2 株(Ishikawa-10(C6)及び Ishikawa-10(C9))の新ウイルス株を分離できた。遺伝子解析の結果、分離ウイルスの遺伝子タイプは 1 型であった。新分離ウイルス(Ishikawa-10(C6))の生物活性を調べるために 2005 年分離株 Ishikawa-K05 (遺伝子タイプ 1 型)あるいは JaGAR01 株(遺伝子タイプ 3 型)との比較を行った。プラークサイズ及び細胞における増殖性は JaGAR01 株の方が Ishikawa-10(C6)あるいは Ishikawa-K05 株より大きく、高かった。マウスに対する毒性に差異はないようであった。ウイルス感染細胞への作用については FACS 解析および DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

を行い、1 型と 3 型による感染細胞のアポトーシス誘導および感染細胞における IFN 関連遺伝子発現誘導についてはほぼ同等の作用が認められた。

D. 考察

採集コガタアカイエカからの RNA サンプルでは RT-PCR、ヌクレオチド解析の陽性が 6 プールで認められ、Vero 細胞を用いた分離法で 2 株ウイルス分離に成功した。JEV が北陸地域に広く分布していることは他のデータも含めてみると明らかと言える。今回の分離株 Ishikawa10(C6)と 2005 年に分離したウイルス Ishikawa-K05 株について生物活性等を調査しているが、比較として用いている JaGAR01 株に比べ、病原性は必ずしも低くはない。実際、細胞への障害作用については両株に差は見られず、またウイルス感染に伴う宿主細胞における IFN 経路遺伝子発現誘導への影響に大きな差異はみられなかった。これらの作用はマウスに対する毒性において両株での差異が見られないことと関わるものと推定される。

ここに示した結果は、現在の日本国内において多く分布しているウイルス(遺伝子タイプ 1 型)の毒性が低下していることを必ずしも意味しない。2007 年には日本脳炎患者が石川県において発生している。近い将来起こる可能性のある日本脳炎の感染、流行を防ぐためにはウイルスの遺伝子解析と共に、ウイルス複製制御、病原性の要因解析を行っていく必要があり、引き続き北陸地域分布ウイルスの分離の試み、遺伝子レベルからの解析を継続していくことが重要といえる。低年齢児における JEV ワクチン接種率の低下による抗体陽性者数の減少がある現在、ウイルス病原性解析はウイルス感染防御の目標につながるものと考えられる。

E. 結論

2010 年採集野外蚊 591 匹からの RT-PCR では 6 件の JEV 陽性例があり、Vero 細胞利用分離法の結果 2 株(Ishikawa-10(C6)及び Ishikawa-10(C9))のウイルス分離に成功した。遺伝子解析によっていずれの新分離 JEV 株も 1 型であることが明らかとなった。感染による細胞障害は 2005 年分離の JEV 株(Ishikawa-K05、遺伝子タイプ 1 型)と同様にあり、病原性は必ずしも低

いものではなかった。IFN 経路遺伝子発現誘導も顕著で、こうした宿主応答がウイルス病原性に大きく影響することが再認識された。近年の国内分布日本脳炎ウイルスの病原性変動に注目すべきと考える。

F. 健康危険情報

北陸においても、病原性のある日本脳炎ウイルスを野外蚊が保有し、病原ウイルスが近辺に存在しているという事実には注意が必要であろう。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nukuzuma S, Nakamichi K, Kameoka M, Sugiura S, Nukuzuma C, Miyoshi I, Takegami T: Efficient propagation of progressive multifocal leukoencephalopathy-type JC virus in COS-7-derived cell lines stably expressing Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. **Microbiol Immunol** 54: 758-762, 2010
- (2) Ishigaki Y, Nakamura Y, Takehara T, Nemoto N, Kurihara T, Koga H, Nakagawa H, Takegami T, Tomosugi N, Miyazawa S, Kuwabata S: Ionic liquid enables simple and rapid sample preparation of human culturing cells for scanning electron microscope analysis. **Microscopy Res Tech** (in press), 2010
- (3) Zhang L, Higashi K, Ishigaki Y, Ueda Y, Sakuma T, Takegami T, Oguchi M, Xu K, Ota Y, Nishida H, Tonami H: Assessment of VEGF-D expression measured by immunohistochemical staining and F-18 FDG uptake on PET as biological prognostic factors for recurrence in patients with surgically resected lung adenocarcinoma. **Ann Nucl Med** 24:533-540, 2010

2. 学会発表

- 1) 村上 学、上村 清、及川陽三郎、竹上 勉: 石川県内のドライアイストラップによるコガタアカイエカ採集と日本脳炎ウイルスの分離、第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、東京 (2010. 5)
- 2) Takegami T, Murakami M, Ishigaki Y: Pathogenicity of Japanese encephalitis virus (JEV) and biological activity of JEV protein NS4a, 44th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Sapporo (2010, 7)
- 3) Takegami T, Murakami M, Ishigaki Y: Pathogenicity of Japanese encephalitis virus (JEV) and physiological role of JEV protein NS4a, 1st Asia Pacific Workshop on Neurovirology Seoul (2010, 7)
- 4) 村上 学、竹上 勉: 石川県内の水田近辺で採取したコガタアカイエカ採集と日本脳炎ウイルスの分離(2009-2010 年度)、第 58 回日本ウイルス学会、徳島 (2010, 11)
- 5) 竹上 勉、村上 学、奴久妻聡一: 日本脳炎ウイルスの非構造蛋白 NS4a 変異と宿主応答の差異、第 58 回日本ウイルス学会、徳島 (2010, 11)
- 6) 奴久妻聡一、中道一生、亀岡正典、杉浦重樹、奴久妻智代子、三好勇夫、竹上 勉: HIV-1 Tat は PML 型 JCV の増殖を促進する、第 58 回日本ウイルス学会、徳島 (2010, 11)
- 7) 竹上 勉、村上 学、石垣靖人: 持続感染日本脳炎ウイルスの蛋白 NS4a における変異多発と宿主応答の関わり、第 33 回日本分子生物学会、神戸、(2010, 12)
- 8) 村上 学、竹上 勉: 石川県内豚舎周辺で採取したコガタアカイエカからの JEV 分離(2009~2010)、第 17 回トガ・フラビ・ペステウイルス研究会、東京 (2010, 12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

アルボウイルスの病原性に関する研究

日本脳炎ウイルス感染でのインターフェロン刺激の差異による増殖性の修飾

研究分担者 森田 公一 長崎大学・熱帯医学研究所 教授

研究要旨：アルボウイルスのうちフラビウイルス属の急性感染では、脳炎、出血熱、関節炎など多彩な病原性が現れる。本研究では日本脳炎ウイルス感染による病原発現機序を細胞感染レベル、特にインターフェロン応答に焦点を当て解析を行った。日本脳炎ウイルスはヒトやウマでは重篤な脳炎を起こすことが知られているが、ウイルス増幅動物であるブタでは高いウイルス血漿が見られるが脳炎を発症することはない。この原因を明らかにする第一段階として、本年はブタにおける高いウイルス増殖性のメカニズムを細胞レベルで解析した。その結果、ブタ細胞においてはウイルス感染後、インターフェロンの発現がヒトやサル細胞と比較して遅れており、これがブタ細胞でウイルスが高増殖するもっとも重要な要因であった。この原因としてブタ感染細胞ではインターフェロン刺激のウイルス側要因の1つである dsRNA が細胞質に露出する時期が遅れており、細胞のウイルス検出装置から逃れていることが原因であった。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス（JEV）の病原性を解明する第一段階として、ウイルスがブタにおいて高い増殖性を示す理由を細胞レベルで解析し、そのメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 材料

ブタ培養細胞は PK, PS, ESK, LLC-PK1 細胞を用いた。またヒト細胞としては Hela 細胞、サル細胞としては LLC-KM2 細胞を使用した。日本脳炎ウイルスは Ja0ArS982 株を用いた。また種ウイルスの作製にはヒトスジシマカ培養細胞 C6/36 細胞を用いた。

2) ウイルスの定量

ウイルスの定量にはフォーカス測定とともにリアルタイム RT-PCR 法によりウイルス RNA 量を定量的に測定した。また dsRNA は ELISA 法により測定した。

3) 免疫染色

日本脳炎ウイルス感染細胞をパラホルムアルデヒドで固定したのち NP-40 あるいは Streptolysin-0 で処理し、抗日本脳炎ウイルス抗体、抗 dsRNA 抗体等を用いて免疫染色を実施して共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察することでウイルスタンパク質や dsRNA の細胞内局在を継時的に観察した。

C. 結果

1) フォーカスの大きさとインターフェロン (IFN) 発現との相関

Fig. 1-A に示すようにブタ細胞 (PK 細胞) におけるフォーカスサイズはサル細胞 (ヒト細胞も同じ) LLC-MK2 におけるそれと比較して有意に大きいサイズであった。感染後の IFN 産生を測定したところ PS 細胞では LLC-MK2 細胞より 24 時間遅れて IFN β が発現していた (Fig. 1-B, C)。興味深いことに細胞のインターフェロン産生を抑制する機能を持つウイルス (VSV) では両方の細胞で IFN β の発現抑制が見られた (Fig. 1-D) のに対し、JEV は選択的にブタ細胞においてそのインターフェロン産生を抑制していた。抑制現象は他の 3 つのブタ細胞株のうち 2 つ (PK 細胞と ESK 細胞) においても確認された (Fig. 2)。

2) IFN 活性経路の状況

JEV に感染したブタ細胞における IFN β の活性経路の障害の有無を検討した (Fig. 3) その結果、JEV 感染細胞では IFN β の活性経路が障害されてはいなかった。すなわち、ウイルス成分により積極的にインターフェロンの産生を抑制しているのではないことが確認された。

3) dsRNA の細胞内局在

JEV が感染細胞で産生する成分のうち何が IFN β 産生を刺激するのかについて検討した。その結果ウイルス dsRNA の細胞質内への露出が有効に IFN を刺激することが分かった。(データ未提示) そこで、ブタ細胞とサル細胞で JEV 感染時に細胞質内への dsRNA の露出時期に差異があるかどうかについて検討した (Fig. 4)。その結果、ブタ細胞においてはサル細胞より長時間 dsRNA が ER (粗面小胞体) 中に存在 (隠れて) しており、これにより細胞のウイルス検出システムから発見されず IFN の産生が抑制されていることが判明した。

D. 結論

- 1) 日本脳炎ウイルスはブタ細胞では有意により大きなフォーカス形成を示す。
- 2) これはブタ細胞においてインターフェロンの産生が遅れていることが原因である。
- 3) この機序としてはウイルス dsRNA がブタ細胞では長時間にわたり ER (粗面小胞体) に停滞しており、宿主のウイルス検出システムから逃れていることが出来るためと結論した。

E. 考察

少なくとも細胞レベルでは日本脳炎の感染拡大阻止には IFN β がきわめて有効である。ブタ細胞での高い JEV の増殖には JEV がブタ細胞においてウイルス検出系を長く逃れ、IFN β の発現を抑制出来ることが重要であることが分かった。一方、個体レベルではブタは JEV 感染により高いウイルス血症を示すにもかかわらず、ほとんど病原性を示さず、脳炎を起こすこともなく、コントロールされた感染をしている。今後、そのメカニズムを解明することで JE ウイルスの病原性発現機序を明らかにし、またヒトにおける JEV 感染制御に応用できるものと期待される。

F. 研究発表

1) 論文発表

Inoue S., Alonzo M., Kurosawa Y., Reyes J. Dimaano E., Alera M., Saito M., Oishi K., Hasebe F., Matias R., Natividad F. and Morita K. Evaluation of a dengue IgG-indirect ELISA and a Japanese encephalitis IgG-indirect ELISA for diagnosis of secondary dengue virus infection. Vector-Borne and Zoonotic Diseases Vol.10(2): 143-150, 2010

- Kubo T, Agoh M, Mai le Q, Fukushima K, Nishimura H, Yamaguchi A, Hirano M, Yoshikawa A, Hasebe F, Kohno S, Morita K. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus as a novel molecular method for diagnosis of pandemic influenza in resource-limited settings. *J Clin Microbiol.* Vol.48(3):728-35. 2010
- Nabeshima T and Morita K. Phylogeographic analysis of the migration of Japanese encephalitis virus in Asia. *Future Virology.* Vol.5:343-351. 2010
- Kenta Okamoto, Yushirou Endo, Shingo Inoue, Takeshi Nabeshima, Phan Thi Nga, Posadas H. Guillermo, Fuxun Yu, Do Phuong Loan, Bui Minh Trang, Filipinas F. Natividad, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita. Development of a rapid and comprehensive proteomics-based arboviruses detection system. *J. Virol. Meth.* Vol.167:31-36. 2010
- Daisuke Kato, Shota Era, Ippei Watanabe, Masataka Arihara, Nobuo Sugiura, Koji Kimata, Yasuo Suzuki, Kouichi Morita, Kazuya I.P.J. Hidari, Takashi Suzuki. Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. *Antiviral Research* Vol.88:236-243. 2010
- Michael O Baclig, Leonora TS Gervacio, Lady-Anne C Suarez, Corazon C Buerano, Ronald R Matias, Atsushi Kumatori, Shingo Inoue, Kouichi Morita, Filipinas F Natividad and Futoshi Hasebe, Flow Cytometric Analysis of Dengue Virus-infected Cells in Peripheral Blood. *Southeast Asian Trop Med Public Health,* Vol 41(6): 1352-1358, 2010
- Guillermo Posadas Herrera, Shingo Inoue, Isao Fuke, Yuko Muraki, Cynthia A. Mapua, Afjal Hossain Khan, Maria del Carmen Parquet, Sadao Manabe, Osamu Tanishita, Toyokazu Ishikawa, Filipinas F. Natividad, Yoshinobu Okuno, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita. Development and evaluation of a formalin-inactivated West Nile Virus vaccine (WN-VAX) for a human vaccine candidate. *Vaccine.* Vol.28:7939-7946, 2010
- 2) 学会発表
国際会議における発表
- Daisuke Hayasaka, Yoshiki Fujii, Dihn Tuan Duc, Hitomi Kinoshita, Kazuki Kitaura, Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Kanae Tanaka, Tetsutaro Sata, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita: The mechanism of severe form of Japanese encephalitis virus infection 44th Joint Working Conference on Viral Diseases (Sapporo, Japan. June28-30, 2010)
- Toru Kubo, Le Q. Mai, Masanobu Agoh, Hidekazu Nishimura, Kiyoyasu Fukushima, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita: Development of a panel of RT-LAMP assays for pandemic and seasonal influenza viruses and the possibility of its clinical implementation (July 16, 2010, 9.30~9.40) Workshop on the Influenza Research of J-GRID: The Inaugural Meeting of the Influenza Consortium (Tomy Hall, Hospital Building 8F, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Japan. July 16, 2010)

Kouichi Morita: Rapid and comprehensive arboviruses detection by using nLC-ESI/MS/MS, 14th International Conference on Emerging Infections in the Pacific Rim. Penang, Malaysia October 4-6, 2010

Nguyen Thi Thu Thuy, Nguyen Bao Ngoc, Le Thi Quynh Mai, Nguyen Hoang Quan, Vu Thi Que Huong, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita: Dengue fever (DF)/Dengue Haemorrhagic Fever (DHF) situation in Vietnam. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2010 (Rm GB3, Melia Hanoi Hotel, Vietnam. November 11-12, 2010)

Kenta Okamoto, Hitomi Kinoshita, Maria del Carmen Parquet, Daisuke Kimura, Katsuyuki Yui, Nguyen Thi Thu Thuy, Le Thi Quynh Mail, Futoshi Hasebe, Koichi Morita: Variable susceptibility of erythroid cells to DENV strains in an SDC2-dependnt manner. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2010 (Melia Hanoi Hotel, Vietnam. November 11-12, 2010)

国内会議における発表

久保亨、福島喜代康、西村秀一、井手昇太郎、河野茂、森田公一：新型インフルエンザウイルス特異的 RT-LAMP 法の開発と、その臨床応用の研究。第 84 回日本感染症学会総会・京都市国立京都国際会館、2010 年 4 月 5-6 日

福島喜代康、久保亨、井手昇太郎、江原尚美、齊藤厚、森田公一、河野茂：新型インフルエンザ AH1pdm の遺伝子検査の臨床的検討。第 84 回日本感染症学会総会・京都市国立京都国際会館、2010 年 4 月 5-6 日

早坂大輔、上村将夫、田中香苗、森田公一：日本脳炎ウイルスの準種(quasispecies)による病原性の検討。第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会・東京都新宿区、2010 年 5 月 28-29 日

左一八、須藤豊、神邊友宏、田島茂、高崎智彦、倉根一郎、森田公一、鈴木隆：日本脳炎ウイルスによる硫酸化糖鎖認識。第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会・東京都新宿区、2010 年 5 月 28-29 日

岡本健太、木下一美、Maria del Carmen Parquet、木村大輔、由井克之、長谷部太、森田公一：新規デングウイルス感受性細胞における感染受容体の同定。第 47 回日本ウイルス学会九州支部総会・宮崎市ホテルメリージュ、2010 年 9 月 3-4 日

早坂大輔、上村将夫、ディン テュアン デュク、田中香苗、永田典代、岩田奈緒子、佐多徹太郎、森田公一：日本脳炎ウイルスの株および準種の違いによる重症化の検討。第 47 回日本ウイルス学会九州支部総会・宮崎市ホテルメリージュ、2010 年 9 月 3-4 日

Lyre Anni E. Murao, Kouichi Morita. Defective recognition of Japanese encephalitis virus RNA in porcine cells delays the interferon response to promote viral dissemination. 第 47 回日本ウイルス学会九州支部総会・宮崎市ホテルメリージュ、2010 年 9 月 3-4 日

早坂大輔、藤井克樹、永田典代、ディン・チュアン・デュク、田中香苗、岩田奈緒子、北浦一孝、木下一美、佐多徹太郎、鈴木隆二、森田公一：日本脳炎ウイルス感染における重症化機序の解析。第 58 回日本ウイルス学会学術集会・あわぎんホール（徳島県郷土文化会館）、2010 年 11 月 7-9 日

岡本健太、木下一美、マリア・デル・カルメン・パルケット、木村大輔、由井克之、長谷部太、森田公一：赤芽球系細胞に対するデング2型ウイルスの感受性受容体の同定。第58回日本ウイルス学会学術集会・あわぎんホール（徳島県郷土文化会館）、2010年11月7-9日

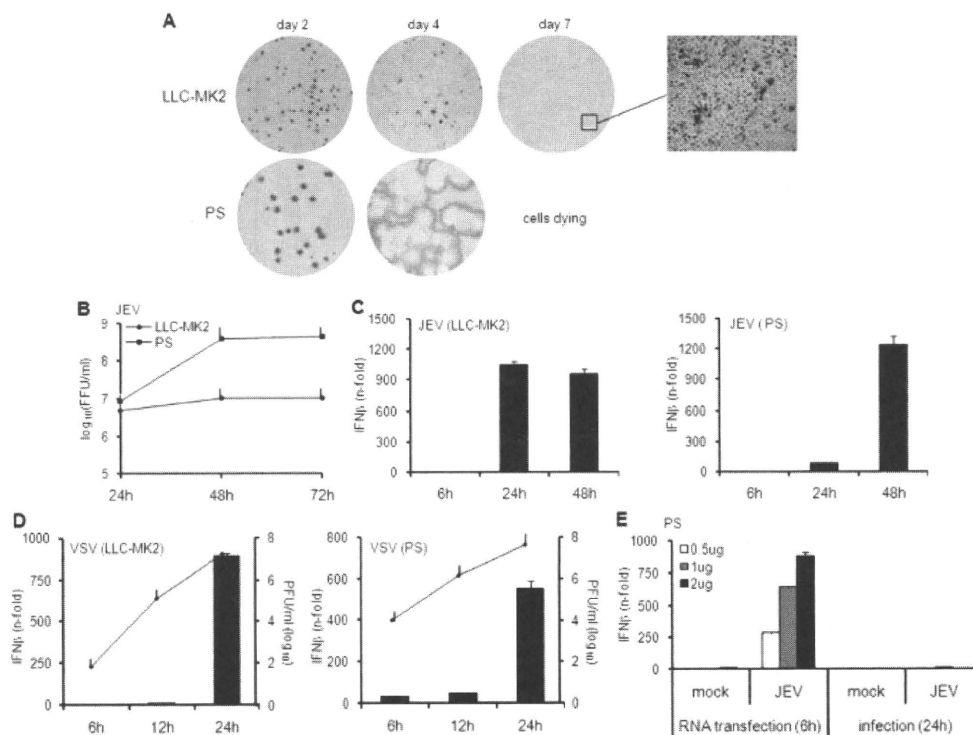
あわぎんホール（徳島県郷土文化会館）・2010年11月7-9日

久保亨、Le. Q. Mai、吾郷昌信、福島喜代康、西村秀一、吉川亮、山口顕徳、平野学、井手昇太郎、河野茂、長谷部太、森田公一：新型および季節性インフルエンザの快速鑑別診断のためのRT-LAMP法パネルの開発と、その臨床応用の研究。第58回日本ウイルス学会学術集会・

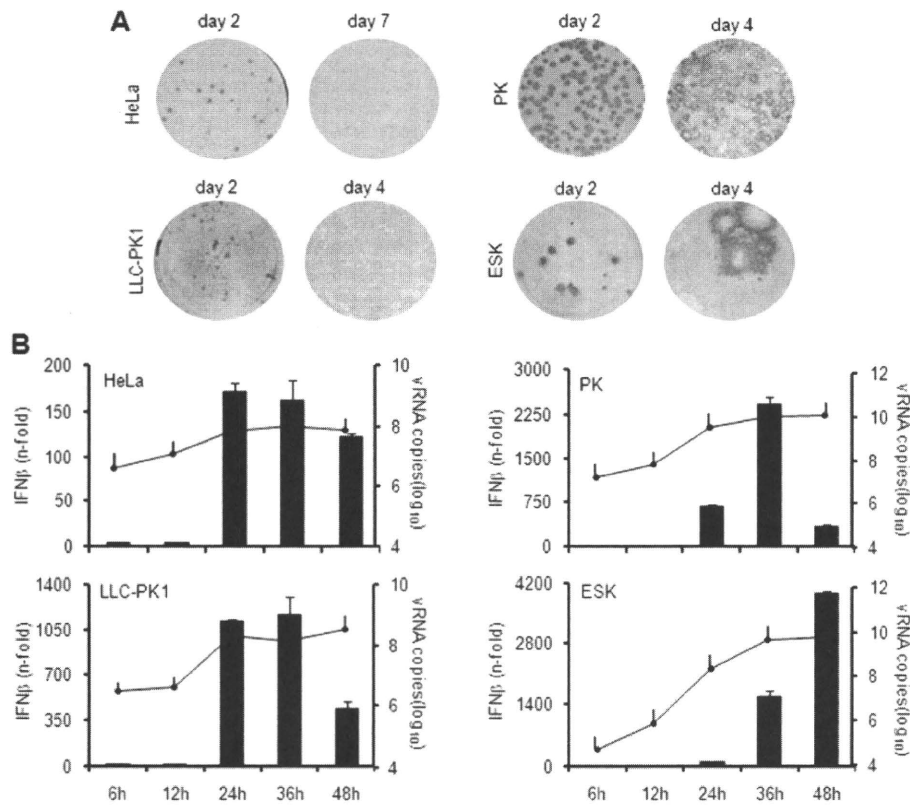
余福勲、岡本健太、早坂大輔、井上真吾、長谷部太、森田公一：Sero-diagnosis of Nipah virus infection by using recombinant Nipah virus nucleocapsid protein expressed by baculovirus system。第58回日本ウイルス学会学術集会・あわぎんホール（徳島県郷土文化会館）2010年11月7-9日

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

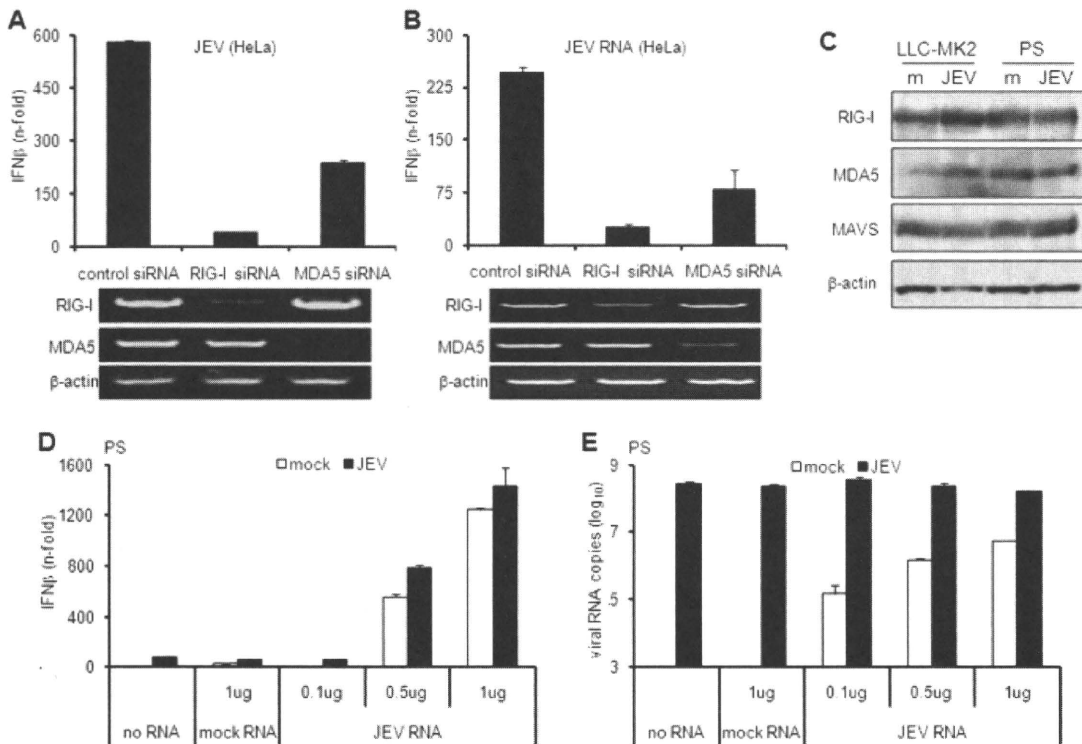
(Fig. 1)



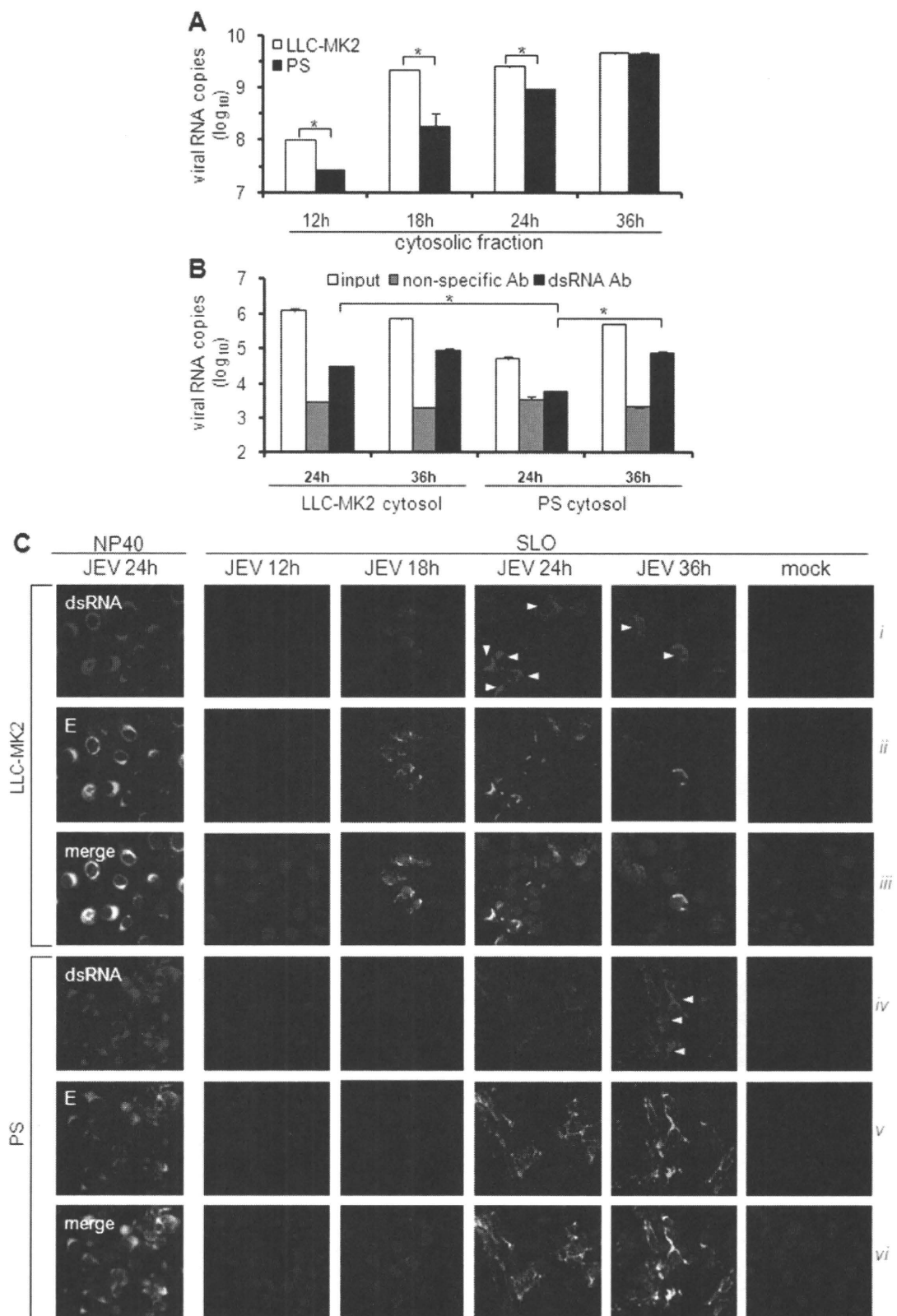
(Fig. 2)



(Fig. 3)



(Fig. 4)



ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

ハンタウイルス感染症の診断法

分担研究者 有川二郎 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨： ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類され、腎症候性出血熱 (HFRS) とハンタウイルス肺症候群 (HPS) の原因ウイルスである。両疾患ともに持続感染したげっ歯類を自然宿主とする人獣共通感染症である。HFRS の流行は中国、極東ロシアや欧州を中心に広くユーラシア大陸全域で、また HPS は南北アメリカ大陸で報告され、公衆衛生上の大きな問題となっている。本研究では、迅速にハンタウイルス感染を検出するための血清診断法の開発、広い範囲のハンタウイルスをカバーする PCR 法の開発、およびアジアにおけるいわゆる不明熱にハンタウイルスが関与しているかどうかについて検討を行う。

A. 研究目的

ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類され、腎症候性出血熱 (HFRS) とハンタウイルス肺症候群 (HPS) の原因ウイルスである。両疾患ともに持続感染したげっ歯類を自然宿主とする人獣共通感染症である。HFRS の流行は中国、極東ロシアや欧州を中心に広くユーラシア大陸全域で、また HPS は南北アメリカ大陸で報告され、公衆衛生上の大きな問題となっている。また、東南アジア諸国では、これまで、タイをはじめベトナム、インドネシア、台湾などで人やげっ歯類にハンタウイルス抗体陽性例が報告され、東南アジア諸国においても流行の存在が示唆されてきたが、感染の状況についての情報はいまだ極めて不足している。

ハンタウイルスのうち、Hantaan virus (HTNV)、Seoul virus (SEOV)、Dobrava virus (DOBV) および Puumala virus (PUUV) の少なくとも 4 つの血清型が HFRS の原因となる。Thailand virus (THAIV) も何らかの疾病の原因となっていることを示す結果も少数例ではあるが得られている。また Sin Nombre virus (SNV) を始めとするアメリカネズミ亜科のげっ歯類によって媒介されるハンタウイルスは HPS の原因ウイルスである。一方、げっ歯類のハンタウイルスの他に、近年、旧食虫類（トガリネズミ類）由来ウイルスについての報告が急増している。古くから知られているのはトツタパラヤンウイルス (TPMV) であるが、その病原性などについては未だ明らかではない。TPMV の

宿主であるスunksは東南アジアを中心に広く分布しており、その浸淫状況の調査ヒトにおける抗体保有率を明らかにすることが重要である。

B. 研究方法

「抗原」：各ハンタウイルス組換え核蛋白(NP)の全長(アミノ酸：全長抗原)あるいはN末端103アミノ酸を大腸菌にpET43.1ベクターを用いてNUSタグとともに発現させ、溶解・精製の後、ELISA抗原とした。

「ELISA」：ELISAは基本的には既報の方法に従った(Araki et al J. Clin Microbiol. 2001)

被検血清および臓器：

(1)ベトナムハイランド由来スunks血清
(2)ベトナムハノイ近郊ハイフォン港由来ラット血清 上記の血清(1)はベトナムの共同研究者であるDr Vu Thy Que Huongによって収集された。(2)は国立感染症疫学研究所との共同研究を通じてハイフォン港検疫所の協力を得て収集した。

(倫理面からの配慮について)

用いた血清(動物血清は)の採血では、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものであり、動物福祉の観点からも問題はないと判断された。

中和試験：

TPMVおよびSEOVを用いて80%フォーカス減少法で測定した。

C. 研究結果

(1)ベトナムハイランド地区におけるTPMV抗体保有率の調査

組換えTPMV核蛋白抗原を作製し、これを用いた血清調査を行った。陽性を示した個体はTPMVに対する中和抗体を測定し、確定診断を行った。その結果GiaLai, Kontumなどのハイランドにおいて継続的にTPMV維持されていることが明らかとなった。

(2)ラットにおけるハンタウイルス持続感染メカニズムの解明

ベトナムハノイのハイフォン港にてSEOV感染ラットを捕獲し、ラット持続感染系に関する解析を行うことを目的とした。抗体陽性率は例年と同様におよそ30%であり、コロニーとして持続的にSEOVを保有していることが示された。PCRでも抗体保有個体の約7割がゲノムを保有していることが示された。この塩基配列は2005年の調査で得られた配列と同一であった。これらの個体から、脾臓細胞を分離保存した。ラットのSEOVに対する細胞性免疫を測定するため、実験動物に感染実験を行いELISPOT assayを行い、実験動物の系統についてエピトープを決定した。

D. 考察

(1)ベトナムに定着したTPMVについて

未だ遺伝子情報はなく、不十分な点も多いが、3年間蓄積した血清で持続的に陽性があったことから、土着のコロニー内でTPMVが維持されていると考えられる。今後、TPMVの多様性を見積もるために、このウイルスの遺伝子配列

を明らかにし、プロトタイプであるインド由来株との相違を明らかにする必要がある。

(2) 昨年度は実験的に SEOV 感染させたラットでの免疫応答の解析を進め、ELISPOT 法を確立した。今年度は野外例の解析を開始し、現在進めている。リアルタイム PCR のシステムもすでに確立し、今後、野外ラットでの ELISPOT による CTL 応答、抗体応答、ゲノム保持量の比較を行うことによって、ウイルスの維持機構の解析を進める。

E. 結論

ハンタウイルスはその宿主によって、ネズミ亜科由来、ハタネズミ亜科由来、新世界ネズミ由来、およびトガリネズミ目（食虫類由来）ウイルスの4つのグループに分けられ、その多様性から診断法はそれぞれについて必要である。また、次々と新規ウイルスが報告されつつあり、近い将来より多くのグループが認められるようになる可能性がある。それらについて情報を収集し、診断法を迅速に準備していくこと、感染制御を目的として病原巣動物におけるウイルス維持機構の解明が公衆衛生対策上必要であると考えられる。

健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tegshduuren, E., Yoshimatsu, K., Taruishi, M., Endo, R., Shimizu, K., Koma, T., Yasuda, S. P., Kariwa, H., Arikawa, J., and Ishihara, C. 2010. Different cross-reactivity of human and rodent sera to Tula virus and Puumala virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **33**:e67-73.
- 2) Schmidt-Chanasit, J., Essbauer, S. S., Petraityte, R., Yoshimatsu, K., Tackman, K., Contraths, F. J., Sasnauskas, K., Arikawa, J., Thomas, A., Pfeffer, M., Scharninghausen, J. J., Spletstoeser, W., Wenk, M., Heckel, G., and Ulrich, R. G. 2010. Extensive host sharing of Central European Tula virus. *J. Virol.* **84**:459-474
- 3) Koma, T., Yoshimatsu, K., Pini, N., Safronetz, D., Taruishi, M., Levis, S., Endo, R., Shimizu, K., Yasuda, S. P., Ebihara, H., Feldmann, H., Enria, D., and Arikawa, J. 2010. Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Sin Nombre, Andes, and Laguna Negra hantavirus infections in humans and rodents. *J Clin Microbiol* **48**:1635-1642.
- 4) Huong, V. T., Yoshimatsu, K., Luan, V. D., Tuan le, V., Nhi, L., Arikawa, J., and Nguyen, T. M. 2010. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Vietnam. *Emerg Infect Dis* **16**:363-365.
- 5) Gamage, D. C., Yasuda, P. S., Nishio, S., Kularatne, S. A., Weerakoon, K., Rajapakse, J., Nwafor-Okoli, C., Lee, R. B., Obayasi, Y., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Tamashiro, H. 2010. Serological evidence of Thailand virus-related hantavirus infection among leptospirosis suspected patients in Kandy, Sri Lanka. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **in press**.

2. 学会発表

1. Arikawa, J. Hantavirus infection as a rodent-borne zoonoses How we learn from nature. VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece May 20-22. 2010
2. Kariwa H, Yoshikawa K, Tanikawa Y, Seto T, Sanada T, Ngonda S, Ivanov LI, Slonova R, Zakharycheva TZ, Yoshimatsu K, Arikawa J,

- Yoshii K, Takashima I. Isolation of amur and Hantaan viruses from wild rodents and the epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in far east Russia. VIII International conference on HFRS,HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel,Athens, Greece May 20-22.2010
- 3 .Yoshimatsu K, Shimizu K, Yasuda S, Endo R, Koma T, Ibrahim IN, Perwitasari D, Yuniato A, Pattamadilok S, Kumperasart S, Luan VD, Huong VTQ, Chandy S, Sridharan G, Ninh T,Kularante S, Rajapakse J, Gamage C, Tamashiro H and Arikawa J. Prevalence of Hantaviruses in Humans and Rodents in Southeast and South Asia. VIII International conference on HFRS,HPS & HANTAVIRUSES Divani Palace Acropolis Hotel,Athens, Greece May 20-22.2010
4. Koma T, Yoshimatsu K, Pini N, Safronetz D, Taruishi M, Levis S, Endo R, Shimizu K, Yasuda SP, Ebihara H, Feldmann H, Enria D and Arikawa J. Development of serotyping ELISAs for new world hantavirus infection. VIII International conference on HFRS,HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel,Athens, Greece May 20-22.2010
- 5.Endo R, Yoshimatsu K, Koma T, Taruishi M, Shimizu K, Yasuda S, Tegshduuren E, Safronetz D, Ebihara H, Feldmann H and Arikawa J. Establishment and evaluation of universal consensus primers for the detection of hantaviruses from all known genetic lineages. VIII International conference on HFRS,HPS & HANTAVIRUSES. Divani Palace Acropolis Hotel,Athens, Greece May 20-22.2010
6. Ibrahim IN, Yoshimatsu K, Perwitasari D, Ariati Y, Shimizu K, Yuniato A, Yasuda S, Arikawa J.Bio-Ecological study on hantaviruses infection among rodents, insectivores and human in thousand islands district and serang district of Indonesia. VIII International conference on HFRS,HPS & HANTAVIRUSES. Divani Palace Acropolis Hotel,Athens, Greece May 20-22.2010
7. Shimakawa Y, Assawasanti K, Pattamadilok S, Ariyoshi K, Yoshimatsu K, Arikawa J. A family cluster of thottapalayam virus or a closely related hantavirus infection in northern Thailand. VIII International conference on HFRS,HPS & HANTAVIRUSES. Divani Palace Acropolis Hotel,Athens, Greece May 20-22.2010
- 8.Sanada T, Kariwa H, Tanikawa Y, Seto T, Miyashita D, Ngnda S, Yoshikawa K, Sanchez-Hernandez C, Romero-Almaraz MdL, Ramos C. Ivanov LI, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I.. Development of diagnostic methods applicable to various hantavirus infections. VIII International conference on HFRS,HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel,Athens, Greece May 20-22.2010
- 9.Schlegel M, Hammerschmidt B, Yoshimatsu K, Groschup MH, Arikawa J, Friedrich R, Petraitye R, Sasnauskas K, Heidemanns K, Siniza S, Giere P, Ulrich RG, Koellner B. Novel tools for hantavirus diagnostics in shrews. VIII International conference on HFRS,HPS & HANTAVIRUSES Divani Palace Acropolis Hotel,Athens, Greece May 20-22.2010
- 10.Yasuda SP, Endo R,Shimizu K, Koma T, Tegshduuren E, Luan VD, Yoshimatsu K, Huong VTQ, Arikawa J. Comparison of the pathogenesis of Seoul virus infection in experimentally infected laboratory rats and naturally infected wild rats. VIII International conference on HFRS,HPS & HANTAVIRUSES, Divani Palace Acropolis Hotel,Athens, Greece May 20-22.2010
11. Shimizu K., Yoshimatsu K., Koma T., Endo R., Yasuda S., and Arikawa J. HANTAVIRUS NUCLEOCAPSID PROTEIN PROMOTES CIS-GOLGI TARGETING OF GLYCOPROTEIN GCXIV International conference on Negative Strand Viruses, June 20-25, 2010, Brugge-Belgium
12. Yoshimatsu K., Shimizu K. and Arikawa J. STUDIES ON SECRETION OF GP OF

HANTAAN VIRUSXIV International conference on Negative Strand Viruses, June 20-25, 2010, Brugge-Belgium

13. Koma T, Yoshimatsu K, Pini N., Safronetz D., Taruishi M., Levis S., Endo R., Shimizu K., Yasuda S., Ebihara H., Feldmann H., Enria D. and Arikawa J. TRUNCATED HANTAVIRUS NUCLEOCAPSID PROTEINS FOR SEROTYPING ANTIGEN XIV International conference on Negative Strand Viruses, June 20-25, 2010, Brugge-Belgium

14. 清水健太、吉松組子、駒貴明、遠藤理香、安田俊平、Erdenesaikhan Tegshduuren、有川二郎：ハンタウイルス Nucleocapsid protein は Glycoprotein Gc のシスゴルジへの局在を促進する 第150回日本獣医学会学術集会、帯広畜産大学、2010.9.16～18

15. 吉田喜香、荏和宏明、真田崇弘、Ngonda Saasa、瀬戸隆弘、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫：メキシコ由来のハンタウイルスに対するモノクローナル抗体の作出と各種ハンタウイルスに対する反応性の検討 第150回日本獣医学会学術集会、帯広畜産大学、2010.9.16～18

16. 真田崇弘、荏和宏明、谷川洋一、Abu Daud Nur Hardy、瀬戸隆弘、永田典代、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫：Puumalaウイルスを感染させたシリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*) の感染動態の解析 第150回日本獣医学会学術集会、帯広畜産大学、2010.9.16～18

17. 清水健太、吉松組子、駒貴明、安田俊平、有川二郎：ハンタウイルスGlycoproteinの細胞内動態に及ぼすNucleocapsid proteinの影響 第58回日本ウイルス学会学術集会、あわぎんホール（徳島県郷土文化会館）、2010.11.7～9

18. 真田崇弘、荏和宏明、永田典代、谷川洋一、Nur Hardy Abu Daud、瀬戸隆弘、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫：Puumalaウイルスを感染させたシリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*) の感染動態の解析 第58回日本ウイルス学会学術集会、あわぎんホール（徳島県郷土文化会館）、2010.11.7～9

19. 安田俊平、吉松組子、遠藤理香、清水健太、駒貴明、有川二郎：ハンタウイルス持続感染メカニズム解明のための実験感染ラットを用いた細胞性免疫測定系の確立 第58回日本ウイルス学会学術集会、あわぎんホール（徳島県郷土文化会館）、2010.11.7～9

20. 吉田喜香、荏和宏明、真田崇弘、Saasa Ngonda、瀬戸隆弘、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫：メキシコの野生げっ歯類が保有するハンタウイルスの抗原性解析 第58回日本ウイルス学会学術集会、あわぎんホール（徳島県郷土文化会館）、2010.11.7～9

21. 駒貴明、吉松組子、永田典代、清水健太、安田俊平、有川二郎：免疫不全マウスを用いたハンタウイルス感染症病態モデルの検討 第58回日本ウイルス学会学術集会、あわぎんホール（徳島県郷土文化会館）、2010.11.7～9

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金・地球規模保健課題推進研究事業
(国際医学協力研究事業)
分担者研究報告書

ハンタウイルス感染症の疫学に関する研究

研究分担者 荻和宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 准教授

研究要旨

ハンタウイルスはげっ歯類を病原巣動物として自然界に分布し、人が感染すると腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)などの重篤な疾病を引き起こす。ハンタウイルスには様々なウイルスが知られているが、遺伝子性状や抗原性状はウイルスごとに大きく異なっている。中国、韓国、ロシア、ヨーロッパ諸国などのユーラシア大陸では HFRS が流行しているのに対し、米国やアルゼンチンなど、南北アメリカ大陸の諸国では HPS が多発している。現在日本でのハンタウイルス感染症の発生はないが、日本海をはさんで我が国のすぐ西隣に位置する極東ロシアでは、毎年 100 から 200 名の HFRS が発生している。しかし、極東ロシアでの HFRS の流行状況の詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、ハバロフスクの近郊で捕獲されたげっ歯類からハンタウイルスを分離して性状を解析するとともに、極東ロシアの HFRS 患者血清について分離株を含む複数のハンタウイルスに対する中和抗体価を測定し、感染ウイルス型の特定を試みた。ハバロフスクの近郊で捕獲されたハントウアカネズミとセスジネズミから、それぞれ Khekhtsir/AP209/2005 (AP209)株と Galkino/AA57/2002 (AA57)株が分離された。これらの分離株の S, M および L 遺伝子の遺伝子解析と免疫血清による交差中和試験の結果から、AP209 株と AA57 株はそれぞれ Amur virus (AMRV) と Hantaan virus (HTNV)であることが判明した。また、ウラジオストック、沿海地方(ウラジオストック以外の地域)とハバロフスク地方で HFRS 患者血清を採取し、それぞれの血清について AMRV AP209 株、HTNV AA57 株および Seoul virus (SEOV) SR-11 株に対する中和抗体価を求めたところ、それぞれの地域で主要な原因ウイルスが異なっていることが判明した。すなわち、ウラジオストック市内で感染した患者の 60% (15/25)は SEOV の感染であり、沿海地方の患者の約 64% (9/14)が AMRV の感染、そしてハバロフスク地方の 34% (11/34)が HTNV の感染であった。

A. 研究目的

ハンタウイルスはげっ歯類および食虫類を自然宿主とする、マイナスイオン鎖の RNA ウィルスで、Hantaan、Seoul、Puumala、Sin Nombre など 30 種類以上のウイルスの存在が

知られている。本ウイルスは人に感染すると腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)などの重篤な疾患を引き起こす。

現在、日本においてはハンタウイルス感染症は発生していないが、日本各地のドブネズミや北海道のエゾヤチネズミがハンタウイルスを保持していることが知られている。一方、我が国と日本海を挟んで西隣に位置する極東ロシアでは年間 100 から 200 名の HFRS 患者の発生が報告されている。しかしながら、その流行様式の詳細についてはほとんど明らかにされていない。

そこで、本研究ではげっ歯類からハンタウイルスを分離して、分離株のウイルス性状を解析した。さらに極東ロシアの HFRS 患者の血清について、分離株を含む複数のウイルス株に対する中和抗体価を測定し、極東ロシアの HFRS の流行状況、特にどのウイルス型が主要な HFRS の原因となっているかについて調査を行った。

B. 研究方法

1. 極東ロシアにおける野生げっ歯類の捕獲

2002 年と 2005 年に極東ロシアのハバロフスク市郊外 (Khekhtsir と Galkino) で野生げっ歯類の疫学調査を行い、合計 152 匹のげっ歯類を捕獲した。捕獲した動物からの採血は、採材時まで生存していた個体についてはエーテル麻酔後心臓採血を行い、既に死亡していたものについては開胸後、採血用濾紙 (TOYO) を心臓や肺に押し付けて血液を吸収することにより採血を行った。また、捕獲された野鼠全例から肺、脾臓、肝臓および心臓を採材し、ドライアイスで凍結後、使用時まで -80°C で保存した。

2. 極東ロシアの HFRS 患者血清

HFRS 患者の血清検体として、1998 年から 2000 年に極東ロシアの沿海地方で臨床

的に HFRS と診断された患者の血清と、1965 年から 1998 年に極東ロシアのハバロフスク地方で臨床的に HFRS と診断された患者の血清を用いた。沿海地方の HFRS 患者の血清については、都市部であるウラジオストク市内で発生した患者の血清と、過疎地域であるウラジオストク市以外の沿海地方で発生した患者の血清とに分けて解析した。

3. IFA による野生げっ歯類の血清における抗ハンタウイルス抗体の検出

AMRV、HTNV、SEOV および Puumala virus (PUUV) を感染させた Vero E6 細胞を 24 穴スライドに捲き、冷アセトンで固定したものを抗原スライドとした。PBS で 2 倍階段希釈したげっ歯類血清を各ウエル $15\mu\text{l}$ ずつ載せ、 37°C で 1 時間反応させ、PBS で洗浄した。ハントウアカネズミ (*Apodemus peninsulae*) とセズジネズミ (*A. agrarius*) の血清サンプルについては 1,000 倍に希釈した Alexa-488 蛍光色素標識抗マウス IgG (Molecular Probes Inc.) を各ウエルに $20\mu\text{l}$ ずつ載せて 1 時間反応させた。洗浄後、緩衝グリセリン液 [PBS:グリセリン=1:9] を載せてカバーガラスで封入し、蛍光顕微鏡下で観察した。細胞質内に顆粒状の蛍光が散在するものについて抗体陽性とした。

4. RT-PCR による野生げっ歯類の肺および培養細胞からのハンタウイルス遺伝子の検出

げっ歯類の肺と培養細胞から、Isogen (ニッポンジーン) を用いて RNA を抽出し、ランダムプライマー (Invitrogen) と Superscript II (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として Platinum Taq DNA Polymerase High