

1. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Sugimoto Y and Mochizuki M. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. *Br J Haematol*. Jul 31, 2010 [Epub ahead of print].
2. Nagasawa M, Ogawa K, Nagata K, Shimizu N. Serum granulysin as a possible biomarker of NK cell neoplasm. *Br J Haematol*. **148**(5):812-814, 2010.
3. Zhang Y, Ohyashiki JH, Shimizu N, Ohyashiki K. Aberrant expression of NK cell receptors in Epstein-Barr virus-positive gammadelta T-cell lymphoproliferative disorders. *Hematology*. **15**(1):43-47, 2010.
4. Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, Shimizu N, Komano J. Dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci*. **101**(4):876-881, 2010.
5. Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. *J Gen Virol*. **91**(Pt1):42-50, 2010.
8. Chan KK, Shen L, Au WY, Yuen HF, Wong KY, Guo T, Wong ML, Shimizu N, Tsuchiyama J, Kwong YL, Liang RH, Srivastava G. Interleukin-2 induces NF-kappaB activation through BCL10 and affects its subcellular localization in natural killer lymphoma cells. *J Pathol*. **221**(2):164-74, 2010.
10. Yajima M, Imadome KI, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Yamamoto N, Fujiwara S. T Cell-Mediated Control of Epstein-Barr Virus Infection in Humanized Mice. *J Infect Dis*. 2009 Oct 15. [Epub ahead of print]
11. Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, Watanabe A, Guo Y-M, Iwamoto K, Yamashita J, Saitoh H, Kameoka Y, Shimizu N, Ichinohasama R, Sawada K. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood*. **114**: 3265-3275, 2009.
12. Moriai S, Takahara M, Ogino T, Nagato T, Kishibe K, Ishii H, Katayama A, Shimizu N, Harabuchi Y. Production of Interferon- γ -Inducible Protein-10 and Its Role as an Autocrine Invasion Factor in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma Cells. *Clin Cancer Res*. **15**(22):6771-6779, 2009.
13. Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri Y, Okita H, Morio T, Shimizu N, Fujimoto J. and Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology*. **128**:405-419, 2009.
14. Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes Infect*. **11**(3):429-433, 2009.
15. Ono Y, Terashima K, Liu A, Yokoyama M, Yokoshima K, Mizukami M, Watanabe K, Mochimaru Y, Furusaka T, Shimizu N, Yamamoto N, Ishiwata T, Sugisaki Y, Yagi T, Naito Z. Follicular dendritic cell sarcoma with microtubuloreticular structure and virus-like particle production *in vitro*. *Pathol.Int*. **59**: 332-344, 2009.
16. Takahashi H, Sugita S, Shimizu N, Mochizuki M. A high viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in ocular fluids in a HLA-B27 negative acute anterior uveitis patient with psoriasis. *Japanese Journal of Ophthalmology*. **52**(2):136-138, 2008.
17. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami, Morio T, Sugamoto Y and Mochizuki M. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *British Journal of Ophthalmology*. **92**(7):928-932, 2008.

18. Kido S, Sugita S, Horie S, Miyanaga M, Miyata K, **Shimizu N**, Morio T and Mochizuki M. Association of varicella zoster virus load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. *British Journal of Ophthalmology* 92(4):505-8. 2008.

19. Nakamura H, Ishii C, Suehiro M, Iguchi A, Kuroda K, Shimizu K, **Shimizu N**, Imadome K, Yajima M and Fujiwara S. The latent membrane protein 1 (LMP1) encoded by Epstein-Barr virus induces expression of the putative oncogene Bcl-3 through activation of the nuclear factor-kappaB. *Virus research*, 131(2):170-179, 2008.

20. Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, **Shimizu N**, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S. A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *Journal of Infectious Diseases*. 198(5):673- 82, 2008.

21. Kanno H, Watabe D, **Shimizu N**, Sawai T. Adhesion of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lines to cultured endothelial cells stimulated with inflammatory cytokines. *Clinical Experimental Immunology*. 151:519-527, 2008.

22. 鴨居功樹、杉田直、木戸さやか、堀江真太郎、菅本良治、望月 學、森 浩士、宮永将、宮田和典、**清水則夫**：皮膚症状を伴わない水痘帯状 疱疹ウイルス前部ぶどう膜炎の 3 例、*臨床眼科*、62:1067-1071, 2008.

2. 学会発表

国内学会発表

1. 小川学、杉田直、井上静、望月學、片山未来、渡邊健、**清水則夫**、森尾友宏：ヘルペスウイルスの関与が疑われるぶどう膜炎に対する眼内液 PCR 検査の有用性の検討、第 114 回日本眼科学会、2010 年 4 月 15 日-18 日、名古屋

2. 小川学、杉田直、井上静、**清水則夫**、赤尾信明、望月學：PCR 法を用いたアカント・アメーバ角膜炎の補助診断、第 21 回臨床寄生虫

学会、2010 年 6 月 19 日、東京

3. 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、市川紗弓、**清水則夫**、中村浩幸、伊藤守、山本直樹、藤原成悦：EB ウイルス関連血球貪食症候群モデルマウスの作製と解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7 日-9 日、徳島

4. 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、市川紗弓、**清水則夫**、中村浩幸、伊藤守、山本直樹、藤原成悦：EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスの作製と解析、第 7 回 EB ウイルス研究会、2010 年 7 月、札幌

5. 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、中川温子、新井文子、市川紗弓、森尾友宏、大賀正一、大石勉、**清水則夫**、山本直樹、藤原成悦：EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスの政策と病態発現解析、第 20 回 EB ウイルス感染症研究会、2010 年 3 月 19 日、東京

6. 満生紀子、遠藤明史、青木由貴、小野敏明、高木正稔、梶原道子、長澤正之、峯岸志津子、落合 央、**清水則夫**、森尾友宏、水谷修紀：当科で施行した造血幹細胞移植患者における網羅的 PCR 法による経時的ウイルス、第 32 回日本造血細胞移植学会総会、2010 年 2 月 19 日-20 日、浜松

7. 清水一史、渡辺 哲、佐々木 裕、芝田敏克、井口晃史、下平義隆、田中寅彦、黒田和道、**清水則夫**、山本直樹、山本樹生：重度免疫不全 NOG マウスにおけるインフルエンザウイルス感染：強毒変異ウイルスの出現、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25 日-27 日、東京

8. 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、**清水則夫**、中村浩幸、渡辺哲、寺嶋一夫、山本直樹、藤原成悦：EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスの作製と解析、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25 日-27 日、東京

9. 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、**清水則夫**、山本直樹、藤原成悦：EBV 感染ヒト化 NOG マウスモデルにおける T 細胞応答、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25 日-27 日、東京

10. 塩田節子、林田みどり、平山知子、湯華民、森康子、渡辺健、**清水則夫**、平田誠、亀

岡洋祐、古江(楠田)美保、水澤博、増井徹、小原有広:ヒトヘルペスウイルス-6(HHV-6)ゲノムが検出されたヒト臍帯静脈内皮細胞由来の細胞株 HUV-EC-C での HHV-6 の存在様式、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25 日-27 日、東京

11. 杉田 直、堀江真太郎、山田由季子、望月學、渡邊 健、片山未来、**清水則夫**:感染性眼内炎の眼内液を用いた細菌 Broad-range 定量 PCR システムの有用性の検討、第 113 回日本眼科学会総会、2009 年 4 月 19 日、東京

12. **清水則夫**、森尾友宏:造血幹細胞移植後微生物モニタリングシステムの改良と普及に向けて、厚生労働科学研究免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントの QOL を視野に入れた成績の向上に関する研究」班平成 22 年度第 2 回班会議(谷口班)、2009 年 1 月 29 日-30 日、東京

13. 今留謙一、矢島美彩子、**清水則夫**、中川温子、川野布由子、藤原成悦:NOG マウスを用いた慢性活動性 EB ウイルス感染症モデルの作製、第 5 回 EB ウイルス研究会、2008 年 7 月 18 日、鳥取

14. 鴨居功樹、杉田直、菅本良治、高瀬博、望月學、**清水則夫**、渡邊健:硝子体液の定量 PCR で診断できた細菌および真菌混合感染による遅発性眼内炎の 1 例、第 42 回日本眼炎症学会、2008 年 7 月 4 日、福岡

15. 山本紗也香、杉田直、二神百合、堀江真太郎、望月學、**清水則夫**、森尾友宏:角膜病変を伴わない HSV-1 関連虹彩毛様体炎の 3 症例、第 42 回日本眼炎症学会、2008 年 7 月 4 日、福岡

16. 宮永将、杉田直、**清水則夫**、森尾友宏、宮田和典、望月學:サイトメガロウイルスによる虹彩炎と角膜内皮炎の臨床像比較、第 62 回日本臨床眼科学会、2008 年 10 月 26 日、東京

17. 山本紗也香、杉田直、森尾友宏、**清水則夫**、望月學:帯状疱疹に伴う角結膜炎の涙液中 VZV-DNA 量および眼所見、第 62 回日本臨床眼科学会、2008 年 10 月 26 日、東京

18. **清水則夫**:再生医療とウイルス安全性確保、第 8 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム、2008 年 12 月 12 日、東京

国際学会発表

1.Ogawa M, S. Sugita S, **Shimizu N**, Morio T, Mochizuki M. Use of Human Herpes Virus (HHV) PCR Assays to Detect Viral DNA in Ocular Fluids of Patients with Herpetic Eye Diseases. ARVO 2010, May 2-6, 2010. Fort Lauderdale, Florida.

2. Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakagawa A, Kawano F, Ichikawa S, Miura O, Ito M, **Shimizu N**, Yamamoto N, Fujiwara S. A xenotransplant model of chronic active EB virus infection by use of NOG mice. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus & Associated Diseases, Sept 2010, Birmingham, UK.

4. Sugita S, **Shimizu N**, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Takase H, Sugamoto Y, Mochizuki M. Use of broad-range quantitative polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis. 10th International Ocular Inflammation Society Congress, Prague, May 30-Jun 2, 2009.

5. Fox CP, Long HM, Lowe C, **Shimizu N**, Rowe M. LMP2A AS A TARGET FOR T CELL RECOGNITION IN EBV-ASSOCIATED T AND NK CELL TUMOURS EBV Association General meeting, November 2008, Guangzhou, China.

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

平成 20～22 年度厚生労働科学研究・再生医療実用化研究事業
再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・
安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究
総合研究報告書

細胞治療の有効性・毒性検証システムの開発に関する研究

研究分担者 加藤俊一 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 教授
研究協力者 持田讓治 東海大学医学部外科学系整形外科学 教授
佐藤正人 東海大学医学部外科学系整形外科学 准教授
酒井大輔 東海大学医学部外科学系整形外科学 講師
安藤 潔 東海大学医学部内科学系血液内科学 教授
宮地勇人 東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学 教授
中村雅登 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 教授
八幡 崇 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 講師
中村嘉彦 東海大学医学部付属病院細胞移植再生医療科 室長補
佐藤忠之 東海大学伊勢原校舎教育研究支援センター 技師補
小林広幸 東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学 教授

研究要旨

東海大学においては医学部と付属病院を橋渡しする形で再生医療の実施体制を構築している。基礎的研究は再生学センター、臨床応用のための細胞処理と品質評価は細胞移植再生医療科セルプロセッシング室、細胞の安全性は細胞移植再生医療科安全性評価室、臨床研究の進捗管理は総合臨床研究センターが担当する形で有機的な連携を図っている。

品質評価システムとしてマウス皮下にヒトの組織を再構築するアッセイ系、安全管理システムとして各種ウイルスならびにマイコプラズマのリアルタイム PCR アッセイを実施し、発癌性否定試験として超免疫不全マウスを用いた少数の細胞による短期間アッセイシステムを開発中である。

3年の研究期間中に実施中の再生医療に関する臨床研究の1つである椎間板再生プロジェクトについての臨床研究体制と結果について報告するが、GMP に準拠した細胞処理を実施するためには膨大な書類作成と保管を必要とし、管理業務を担当する人員の確保が大きな課題となる。

A. 研究目的

細胞製剤を用いた再生医療においては体外における細胞の調製や培養のプロセスの安全性と品質管理が大きな課題となっている。

東海大学において細胞製剤の安全性の確

保と新しい品質評価システムについての検討を行うために、再生医療の基盤整備を行うことを本分担研究の目的とした。

B. 研究方法

1. 椎間板再生医療の基盤的研究

2002年に設置された再生医学センターにおいて整形外科の持田讓治教授・酒井大輔講師を中心とするグループが椎間板の再生に関する基礎的研究を行い、骨髄間葉系細胞(MSC)と髄核細胞を隔膜共培養する形の細胞培養系を開発した。

2. 培養髄核細胞の品質評価

体外で培養した髄核細胞由来の細胞が所期の目的どおりに髄核細胞としての性格を保持し、正常に機能するかどうかを評価する方法として、酒井大輔講師が考案した方法(①細胞表面マーカーによる細胞分化の評価、②コロニー形成法による増殖能力の評価、③超免疫不全マウス皮下移植による椎間板構造再構築の確認など)にて、付属病院細胞移植再生医療科セルプロセッシング室の加藤俊一室長(平成22年度は佐藤正人室長)・中村嘉彦室長補佐らなどにより品質評価を行った。

3. 培養髄核細胞の安全性評価

1) 培養細胞の腫瘍形成否定試験

中村雅登教授らは培養細胞の腫瘍形成性否定試験としてヒト化マウスを用いて少数の細胞により短期間でアッセイできる系の開発を試みた。

2) 感染性因子否定試験

安藤潔教授、宮地勇人教授らを中心として、培養細胞中に諸種のウイルス(HBV、HCV、HIV、HTLV-1、HSV-1,-2、VZV、CMV、EBV、HHV-6、ParvoB19)、細菌、マイコプラズマなどの感染性因子が混入あるいは増殖していないことを証明するために、リアルタイムPCR法、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン定量測

定などを日本薬局方に準じて実施した。

4. 臨床研究

持田讓治教授を中心とする整形外科グループは厚生労働省のヒト幹細胞臨床研究審査委員会において承認を受け、2009年に椎間板再生臨床研究を開始した。

臨床研究の進捗管理については持田讓治教授と総合臨床研究センターの小林広幸教授により行われた。

5. 書類管理

このような品質評価や安全性評価の業務については綿密な研究計画とSOP(作業手順書)に基づいて実施し、その記録は詳細に記述して厳格に保管した。

また、作業工程毎に定められた試料の保存も厳重に行われた。

6. 倫理的事項

本研究は国の定めるヒト幹細胞の臨床研究に該当することから、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成18年7月制定)に則り、また動物実験に関しては平成17年改正の動物愛護法に基づき適正な研究を行った。

C. 研究結果

1. 椎間板再生臨床研究

9例の椎間板変性疾患患者において体外培養髄核細胞による治療を実施した。主要評価項目は安全性の確認であるが、現在まで問題となる有害事象の発生はない。

2. 品質評価

体外で骨髄間葉系細胞と隔膜共培養された髄核細胞は髄核細胞に特徴的な表面マーカーを維持しつつ旺盛な増殖能力を維持して

いることがすべての症例において確認された。

3. 安全性の確保

培養前後の検体において検査したウイルス、細菌、マイコプラズマのいずれも検出されず、エンドトキシンも限界以下であり、感染性因子の混入はなかった。

4. 資料と試料の保管

一連の作業工程の資料についてはそれぞれの担当者により作業記録が作成され、作業工程毎に定められた試料の保存も実施された。

このような GMP 準拠の作業と管理には膨大な時間と労力が必要であった。

E. 結論

東海大学で GMP 基準に準じて実施されている椎間板再生医療プロジェクトにおける細胞治療の有効性・毒性検証システムについて報告した。GMP に準拠した細胞処理を実施するためには膨大な書類作成と保管を必要とし、管理業務を担当する人員の確保が大きな課題となる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 原著論文

1. 加藤俊一: 臍帯血移植の今後、*総合臨床*.57:632-638,2008.

2. Kawase T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Kato S, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima Y. Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplant compared with unrelated bone marrow

transplant in adult patients with acute leukemia. *Bone Marrow Transplant*.113:1631-1638,2008

3. Yabe M, Ishiguro H, Yasuda Y, Takakura I, Matsuda S, Shimamura K, Kato S, Yabe H. Yabe M, Ishiguro H, Yasuda Y, Takakura I, Matsuda S, Shimamura K, Kato S, Yabe H. *Bone Marrow Transplant*.41:93-84,2008

4. Yasuda Y, Yabe H, Inoue H, Shimizu T, Yabe M, Yogo Y, Kato S. Progressive multifocal leukoencephalopathy after allogeneic bone marrow transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr Int*.50: 238-240, 2008.

5. Narimatsu H, Miyakoshi S, Yamaguchi T, Kami M, Matsumura T, Yuji K, Murashige N, Kusumi E, Kodama Y, Komatsu T, Sakamaki H, Kouzai Y, Okada M, Osugi Y, Kobayashi R, Inoue M, Takahashi S, Kai S, Kato K, Inoue-Nagamura T, Taniguchi S, Kato S. Chronic graft-versus-host disease following umbilical cord blood transplantation: retrospective survey involving 1072 patients in Japan. *Blood*.112:2579-2582, 2008.

6. Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, Takanashi M, Isoyama K, Kato K, Takahashi S, Taniguchi S, Miyamura K, Aoki K, Hidaka M, Nagamura F, Tojo A, Fang X, Kato S. Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*.42:241-251, 2008.

7. Yoshimi A, Kojima S, Taniguchi S, Hara J, Matsui T, Takahashi Y, Azuma H, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kato S. Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 14:1057-1063, 2008.

8. Yahata T, Muguruma Y, Yumino S, Sheng Y, Uno T, Matsuzawa H, Ito M, Kato S, Hotta T, Ando K. Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem Cells*. 26:3228-3236, 2008.

9. Yahata T, Muguruma Y, Yumino S, Sheng Y, Uno T, Matsuzawa H, Ito M, Kato S, Hotta T, Ando K. HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: Implications for molecular mechanism. *Blood*.

113:2851-5858, 2008.

10. Oda M, Isoyama K, Ito E, Inoue M, Tsuchida M, Kigasawa H, Kato K, **Kato S**. Survival after cord blood transplantation from unrelated donor as a second hematopoietic stem cell transplantation for recurrent pediatric acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*. **89**(3):374-82, 2009.

11. Yazaki M, Atsuta Y, Kato K, **Kato S**, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Kouzai Y, Kobayashi T, Inoue M, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Azuma H, Takanashi M, Kai S, Nakabayashi M, Saito H; Japan Cord Blood Bank Network. Incidence and risk factors of early bacterial infections after unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. **15**(4):439-46, 2009.

12. Isoyama K, Oda M, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kigasawa H, Kobayashi R, Mimaya J, Inoue M, Kikuchi A, **Kato S**. Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children with AML in Japan. *Bone Marrow Transplant*. 2009 May 11.

13. Kudo K, Ohga S, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Hasegawa D, Nagatoshi Y, **Kato S**, Ishii E. Improved outcome of refractory Langerhans cell histiocytosis in children with hematopoietic stem cell transplantation in Japan. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Sep 21.

14. Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Inoue M, Tabuchi K, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, **Kato S**, Hara T. Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatr Blood Cancer*. **54**(2):299-306, 2010.

15. Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, **Kato S**, Kawase T, Muramatsu H, Morishima Y, Koderu Y. Tacrolimus/Methotrexate versus cyclosporine/methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia who received bone marrow

transplantation from unrelated donors: results of matched pair analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. **15**(12):1603-8, 2009. Epub 2009 Oct 4.

16. Yabe H, Yabe M, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, **Kato S**. Rapid improvement of life-threatening capillary leak syndrome after stem cell transplantation by bevacizumab. *Blood*. **115**(13):2723-4, 2010.

17. Hishizawa M, Kanda J, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, **Kato S**, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. *Blood*. **116**(8):1369-76, 2010. May 17. [Epub ahead of print]

18. Tomita Y, Yasuda Y, Hyodo H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Hattori K, Matsumoto M, Inoue H, Yabe H, Yabe M, Shinohara O, Kojima S, Minemura T, **Kato S**. High incidence of fatty liver and insulin resistance in long-term adult survivors of childhood stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Jun 21 [Epub ahead of print]

19. Takanashi M, Atsuta Y, Fujiwara K, Kodo H, Kai S, Sato H, Kohsaki M, Azuma H, Tanaka H, Ogawa A, Nakajima K, **Kato S**. The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. *Blood*. **2116**(15):2839-46, 2010. Jul 13. [Epub ahead of print]

20. Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Arakawa S, **Kato S**, Yabe H. Therapy-related myelodysplastic syndrome of recipient origin in a juvenile myelomonocytic leukemia patient 17 years after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Sep 27. [Epub ahead of print]

21. Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Suganuma E, Sugiyama N, **Kato S**, Yabe H. Alternative donor marrow transplantation in children with aplastic anemia using low-dose irradiation and fludarabine-based conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Oct 18. [Epub ahead of print]

22. 渡辺修大、足立壮一、堀部敬三、永利義久、加藤剛二、田淵 健、吉見礼美、加藤俊一、矢部普正：小児急性骨髄性白血病第一寛解期での HLA 一致同胞間骨髄移植における GVHD 予防 (MTX 単独 vs. CyA 群) の比較、*日本小児血液学会雑誌*、24：32-36,2010.

2. 著書

1. 加藤俊一. 移植造血幹細胞のソース(骨髄移植、末梢血幹細胞移植、臍帯血移植について).「Annual Review 2009 血液」、中外医学社、2009、pp28-35.

2. 加藤俊一. 日本移植学会の倫理指針.「腎移植のすべて」高橋公太編集、2009,pp506-507

3. 加藤俊一、矢部普正編.「小児の造血細胞移植」、医薬ジャーナル社、東京、2010、pp1-107.

4. 加藤俊一編集.「よくわかる造血細胞移植コーディネート」2010、pp1-2.

H. 知的財産権の出願・登録状況

4. 特許取得

特許:第 4437335 号

名称:「ヒト未分化造血幹細胞およびその分離方法ならびに分離装置」

発明者:加藤俊一、中村嘉彦

取得日:平成 22 年 1 月 15 日

5. 実用新案登録

なし

6. その他

なし

平成 20～22 年度厚生労働科学研究・再生医療実用化研究事業
再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・
安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究
総合研究報告書

再生医療に応用できるウイルスの網羅的検出法の確立

研究分担者 浜口 功 国立感染症研究所血液安全性研究部 部長
研究協力者 水谷哲也 国立感染症研究所ウイルス一部 主任検査官
野島清子 国立感染症研究所血液安全性研究部 研究員

研究要旨

再生医療や細胞医療製剤におけるウイルスの混入や活性化の検出・測定は安全性の面から非常に重要である。我々は未知のウイルスの核酸を迅速に決定する方法として、**Rapid Determination system of RNA/DNA viral sequences (RDV 法)**を開発し発表してきた。この方法は培養上清や血清を対象として、わずか 2 日間の作業でウイルスゲノムの一部の塩基配列を決定できる方法である。初年度は我々の開発した方法でヒトに限らず新しいウイルスを検出できるかについて検討した。次年度は既知のウイルスについても、DNA ウイルス 23 種類、RNA ウイルス 47 種類をコンベンショナル PCR 法で検出できる系を確立した。3 年目は再生医療に即した検体を用いて、既知・未知のウイルスの検出を試みた。

A. 研究目的

再生医療や細胞医療製剤においてウイルスの混入や活性化の検出・測定は安全性の面からも非常に重要である。この場合、すでに知られているウイルス（既知のウイルス）とまだ同定されていないウイルス（未知のウイルス）の存在が考えられる。近年、ヒトで新しいウイルスの発見が相次いで報告されている。この数年の間に報告されたヒトボカウイルスやカルジオウイルスは新しいウイルスである。このように、ヒトにおいてもまだ未同定のウイルスは多数存在していると考えられる。我々は未知のウイルスの核酸を迅速に決定する方法として、**Rapid Determination system of RNA/DNA viral sequences (RDV 法)**を開発し発表して

きた（水谷ら、Emerg. Infect. Dis. 2007）。この方法は培養上清や血清を対象として、わずか 2 日間の作業でウイルスゲノムの一部の塩基配列を決定できる方法である。しかも、新しく開発したダイレクトシーケンシング法の採用により、DNA の組換え申請を行わなくてもよいという利点がある。

そこで、本研究では再生医療関連の検体について、既知および未知のウイルスを網羅的に検出する方法の確立を目指し、1 年目は RDV 法を出発材料として RNA ウイルスとして数百コピーのウイルスが存在していれば未知・既知のウイルスを検出できるように改良した方法をすでに開発していたので、この方法を用いて新規ウイルスを検出できるか検討することを目的とした。ま

た、次年度には既知のウイルスについては、DNA ウイルス 23 種類、RNA ウイルス 47 種類をコンベンショナル PCR 法で検出できる系を確立することを目的とした。最終年度は、これらの方法を組み合わせて臨床検体を解析することを試みた。

さらに、近年、シークエンステクノロジーの発展により次世代型シークエンサーによる遺伝子の網羅的解析が盛んになってきた。そこで、本研究においても、ロシュ社の FLX を用いた解析をおこなった。

B. 研究方法

ウイルスの網羅的検出法 (RDV 法) : RDV 法 ver4.0 は、アルブミン遺伝子のような短い RNA でも効率良く増幅でき、しかも数百分子の遺伝子を検出できる感度の良い方法である (図 1)。本方法の特徴は、RNA から cDNA を作成した後にライゲーションにより見掛け上長い遺伝子を作ることにある。短い遺伝子は Phi29 の基質になり難いので、この操作により長い cDNA が効率良く増幅することになる。タイ国のデング流行地域である Phasicharoen、Banghunthian、Bangbon、Jomthong という 4 つの場所から蚊の幼虫を採集し、4 齢幼虫まで育った *Aedes aegypti* を使用した。約 50 匹の幼虫をプールしてそれぞれナンバリングし、ホモジネートし、低速遠心した。上清を 0.22 μ m の Millipore Millex-GV (Millipore, MA, USA) によりろ過後、C6/36 細胞と共に 8 日間培養し、9 日目に CPE を観察した。CPE の最も強く現れた Number 12 を RDV 法 ver4.0 に適用した。また、サイトメガロウイルス (NATtrol 社 : 50,000 コピー/ml) を材料に検出感度について検討した。ウイルスを希釈し、2,000, 200,

20 コピーを出発材料として RDV 法をおこなった。

コンベンショナル PCR 検出系の確立 : 既知のウイルスの検出については、2007 年度に川崎病の原因探索の目的で構築した既知のウイルスの PCR システムをベースにしたが、この時点で 24 種類のウイルスを検出するシステムであったので、その 3 倍のウイルスを検出できることを目的とした (DNA ウイルス 23 種類、RNA ウイルス 47 種類)。研究室において使用している PCR プライマーや信頼できる論文に報告されているプライマーなどを用いることにした。PCR の反応は、GoTaq PCR システム (プロメガ社) を用い、一部のウイルスを除いて 94 度 30 秒、55 度 30 秒、72 度 30 秒で 40 サイクルおこなった。検体に対して、すべての PCR をおこなうのではなく、症状から考えられるウイルスについての検査をおこなった。HHV6 および HHV7 については、より詳しい解析をおこなった。

次世代型シークエンサーによる解析 : DNA をタカラバイに送付し、ロシュ社の Genome Sequencer FLX System による受託解析を実施した。

C. 研究成果

1. RDV 法による新規ウイルスの検出 : RDV 法において、電気泳動による増幅産物の確認を行った結果、100—700bp の cDNA の 161 個のバンドが検出された。これらバンドのうち、149 個の明瞭なバンドを切り出し、ダイレクトシークエンスによって塩基配列の決定を行った。その結果、143 個の cDNA の塩基配列を決定した。塩基配列を決定した cDNA は blastx によって相同性

検索を行った。4 個の cDNA が rice stripe virus (RSV; GenBank accession number EF141327) の RNA ポリメラーゼに低い相同性を示した (図 2)。RSV 様ウイルスは蚊の幼虫を採集した土地の名から Phasicharoen virus 1 (PhaV 1) と名付けた。4 つの RSV 様配列は 37 アミノ酸からなり、それぞれが互いに高い相同性を示していた。また、RSV の他にブニヤウイルス科の Uukuemi virus (UUKV) (accession number D10759) や Rift Valley fever virus (RVFV) (accession number Z30318) にも相同性を示した。RSV 様配列からプライマー (P1-3 and P2-2; 図 3) を設計し、Number 12 の RNA に RSV 様配列 (PhaV 1 配列) が存在することを PCR で確認した。また、このとき、PhaV 1 配列が C6/36 細胞の DNA と RNA 由来でないことも確認した (図 3)。次いで、PhaV 1 を継代することによりその感染性を検討した (図 4)。C6/36 細胞で培養した Number 12 の上清を新しい Vero 細胞と C6/36 細胞 (2nd passage) に継代した。5 日間の培養後、その上清を RNA 抽出し、プライマー (P1-3 and P2-2) を使って PCR を行った。また、10 日間の培養後の上清に対しても同様の操作を行った。その結果、Vero 細胞では PhaV 1 配列は検出できなかったが、C6/36 細胞で 10 日間培養後 PhaV 1 配列を検出することができた。引き続き、C6/36 細胞への継代と 10 日間の培養を繰り返し (3rd passage; total 20 days and 4th passage; total 30 days)、細胞とその上清を RNA 抽出し、PCR を行った。PhaV 1 の継代を 4 回繰り返した細胞と上清の両方で、PhaV 1 配列が検出された。2 回継代後、培養上清から抽出した RNA から cDNA を作成し、Genomiphi で増幅後、次世

代型シーケンサー (ロシュ社の FLX) でシーケンスをおこなった。その結果、約 600 塩基の contig が得られ (図 5)、系統樹を作成した結果、ブニヤウイルス科に属する新しいウイルスであることがわかった (図 6)。

2. RDV 法の検出感度：サイトメガロウイルスを用いた場合に 20 コピーのウイルスでも検出できることを確認した (RDV-D バージョンを使用：図 7、8)。多くの DNA ウイルスのゲノムは数十キロ塩基以上なので、DNA ウイルスに比べると短い RNA ウイルスより感度が良いと考えられた。

3. コンベンショナル PCR の検体への応用：70 種類のウイルスについてはスクリーニングの目的で specific primer や degenerate primer を合成した。研究室においてすべてのセットについてバリデーションをおこなっているわけではないが、公立昭和病院から研究室に検査依頼のあった検体でウイルスの検出を確認できた。検体 KS-P では、エンテロウイルスおよびライノウイルス検出用 PCR でバンドを検出し、両バンドについて塩基配列を決定したところ、コクサッキーウイルス B4 に核酸で 92–96% 相同性のある配列が得られた (アミノ酸では 100% 一致)。その他の RNA ウイルスは陰性であった。検出されたウイルスが疾患の原因になるか否かは今後の更なる解析が必要である。

4. 再生医療関連検体の解析：東京医科歯科大学および国立感染症研究所において倫理委員会で承認された研究計画に従って実施した。検体は、東京医科歯科大学医学部付

属病院・細胞治療センターにおいて膀胱癌 (#1) および移植ドナー (#2) の血球を培養して得られた DNA を出発材料とした。

コンベンショナル PCR では、CMV, HSV1/2, EBV, VZV, HHV6, HHV7, HHV8, アデノ随伴ウイルス 2, 同 5, 同 13, WU ポリオーマウイルス、パルボウイルス B19, パピローマウイルス 16, 同 18, 同 31, 同 52, TTV, JCV, HBV, ボカウイルス, アデノウイルス、他に、広くヘルペスウイルス、アデノウイルス、ポリオーマウイルスを検出できるプライマーセットを用いた PCR を実施したが、すべて陰性であった。

一方、次世代型シーケンサーによる解析については、#1 と #2 で、解析総リード数が 40,430 および 39,756、また、解析総塩基数がそれぞれ 13,392,476 および 13,164,201 であり良好に解析された。それぞれのリードは、NCBI の GenBank において相同性検索をおこない、トップヒットしてくる遺伝子を表示した。その結果、内在性のレトロウイルスについては両検体ともに検出されていたが、その他のウイルスは陰性であった。しかしながら、この解析においては、GenBank に登録されている遺伝子と相同性をもたない、いわゆる unknown と表示される遺伝子が約 200 ほどあり、この中に未知の病原微生物の遺伝子断片が含まれている可能性を否定できない。

RDV 法については、現在実施中である。

D. 考察

1. RDV 法の検討：RDV 法を用いて蚊から新しいウイルスを検出することに成功した。このウイルスは既存のブニヤウイルスの塩基配列をもとにプライマーをデザインし、

PCR をおこなっても増幅できない。本法を用いることにより、ヒトの検体においても新しいウイルスを発見できると期待される。また、RDV 法を用いるとヘルペスウイルスのようにゲノムの長いウイルスを PCR と同程度の感度で検出できることが証明された。どのような検出系を用いても、ウイルスゲノムの長さ、形状、GC 含有量などにより検出感度は異なる。RDV 法においても同様であり、今後、さまざまなウイルスを用いて感度を検討する必要がある。

2. コンベンショナル PCR の検討：既知のウイルス検出については、本研究ではコンベンショナル PCR を用いた。リアルタイム PCR や LAMP 法の方が、迅速、簡便かつ定量的にウイルスを検出できることが知られている。しかし、検出されたウイルスの塩基配列を知り、変異までも検討することが重要である。この理由から、手間のかかるコンベンショナル PCR を選び、系を構築した。その一方で、やはり迅速性も重要であると考えられるので、リアルタイム PCR や LAMP の系を確立する必要があるかもしれない。

3. 再生医療関連検体の解析：本研究では、ウイルスの網羅的検出法とコンベンショナル PCR 法を用いて、臨床検体を培養した後抽出した DNA についての解析を実施した。

RDV 法は現在解析中であり、この報告書に記載することはできなかったが、コンベンショナル PCR や次世代型シーケンサーを用いた解析をおこなうことができた。今回の 2 検体については、どちらからもウイ

ルスの遺伝子は検出できなかった。しかし、内在性レトロウイルスの遺伝子断片は多数検出されていた。一方、どの遺伝子とも相同性を持たない遺伝子断片も多数見つかったので、今後はこれらについて Genome walking などをおこない、更なる核酸情報を得て、微生物のゲノムの一部であるかについて検討を加えていきたい。

E. 結論

今年度の研究において、再生医療や細胞医療製剤のウイルス検出について、コンベンショナルPCRを用いたウイルスのスクリーニングや、RDV法・次世代型シーケンサーを用いた網羅的解析法の手順が確立された。

F. 健康危害情報

該当なし

G. 研究発表

1. Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi M, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, **Mizutani T**. Isolation of a novel adenovirus from a fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). *Emerging Infectious Diseases*. **14**:347-349, 2008.
2. Watanabe S, **Mizutani T**, Sakai K, Kato K, Tohya Y, Fukushi S, Saijo M, Yoshikawa Y, Kurane I, Morikawa S, Akashi H. Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). *J. Clin. Virol.* **43**:56-59, 2008.
3. Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, **Mizutani T**, Iizuka I, Sakai K, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains. *Jpn. J. Infect Dis.* **61**:140-142, 2008.

4. 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*. **4**:e4219, 2009.

5. 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.* **154**:153-158, 2009.

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

7. Shirato K, **Mizutani T**. Viral Proteins, Host Cell Proteins, and Manipulation of the Cell Cycle by Viruses. In *Progress in cell growth process research*. (edited by T. Hayashi) *Nova Publishers*. pp135-147, 2008.

8. 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.* **134**:227-232, 2009.

9. Shirato K, **Mizutani T**. Replication, Transcription, and Translation of Coronaviruses. In *Viral Genomes*. (edited by Zhi Freng and Ming Long) *Nova Publishers*. pp.159-167, 2009.

10. **Mizutani T**. Signaling pathways of SARS-CoV in vitro and in vivo. In *Molecular Biology of the SARS-Coronavirus* (Edited by Sunil K Lai) *Springer*. pp305-332, 2010.

11. 水谷哲也 : 「川崎病ウイルス病因説」 アクチュアル小児科診療 -Actual Series of

- Clinical Pediatrics. 「川崎病のすべて」(総編集:五十嵐隆、専門編集:石井正浩) 中山書店 pp30-31, 2009.
12. **Mizutani T.** 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*. pp321-344, 2009.
13. 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.
14. 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.* **90**:2266-2271, 2009.
15. Watanabe S, Ueda N, Iha K, Masangkay J. S, Fujii H, Alviola P, **Mizutani T**, Maeda K, Yamane D, Walid A, Kato K, Kyuwa S, Tohya Y, Yoshikawa Y, Akashi H. Detection of a new bat gammaherpesvirus in the Philippines. *Virus Genes.* **39**:90-93, 2009.
16. 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.* **16**:1132-1138, 2009.
17. Satho T, Dieng H, **Mizutani T**, Eshita Y, Miyata T, Talukder P, Kashige N, Hassan Ahmad A, Miake F. 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**:13-18, 2009.
18. **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、p239-244, 2009.
19. **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、p821-822, 2009.
20. **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、pp410-413.
21. Watanabe S, Maeda K, Suzuki K, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Shimoda H, Kato K, Yoshikawa Y, Morikawa S, Kurane I, Akashi H, **Mizutani T**. Identification of a novel betaherpesvirus in bats using a rapid determination system for viral RNA sequences (RDV). *Emerg. Infect. Dis.* **16**:986-988, 2010.
22. Itagaki T, Abiko C, Ikeda T, Aoki Y, Seto J, Mizuta K, Ahiko T, Tsukagoshi H, Nagano M, Noda M, **Mizutani T**, Kimura H. Sequence and phylogenetic analysis of Safford cardiovirus from children with exudative tonsillitis in Yamagata, Japan. *Scandinavian J. Insect Dis.* **42**:950-952, 2010.
23. Watanabe S, Masangkay J S, Nagata N, Morikawa S, **Mizutani T**, Fukushi S, Alviola P, Omatsu T, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Fujii H, Tsuda S, Endoh M, Kato K, Tohya Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H. Bat Coronaviruses and Experimental Infection of Bats, the Philippines. *Emerg. Infect. Dis.* **16**:1217-1223, 2010.
24. Tsukagoshi H, Masuda Y, **Mizutani T**, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura h. Sequence and phylogenetic analyses of Safford cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Japanese J Infect Dis.* **63**:378-380, 2010.
25. Watanabe S, **Mizutani T**, Sakai K, Iizuka I, Shiota T, Sayama Y, Tsuda S, Kato K, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Akashi H. Development of a method to detect viral RNA sequences from cultured cells by combining size fraction and a rapid determination system for viral RNA sequences (RDV). *J. Vet. Sci. Tech.* 2010. 1. 1000103 (open access)
26. Isawa H, Kuwata R, Hoshino K, Tsuda Y, Sakai K, Watanabe S, Nishimura M, Satho T,

Kataoka M, Nagata N, Hasegawa H, Bando H, Yano K, Sasaki T, Kobayashi M, **Mizutani T**, Sawabe K. Identification and molecular characterization of a new nonsegmented double-stranded RNA virus isolated from Culex mosquitoes in Japan. *Virus Res.* 255:147-155, 2011.

27. Sayama Y, Eshita Y, Yamao T, Nishimura M, Satho T, Srisawat R, Komalamisra N, Rongsriyam Y, Sakai K, Fukushi S, Saijo M, Oshitani H, Kurane I, Morikawa S, **Mizutani T**. Prevalence of Phasi Charoen Virus in Female Mosquitoes. *J. Parasitology and Vector Biology.* In press.

28. **Mizutani T**, Sayama Y, Nakanishi A, Ochiai H, Sakai K, Wakabayashi K, Tanaka N, Miura E, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Ono S. Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Virology.* 2010. In press.

29. 小田 新、甘利昭一郎、生田陽二、内山健太郎、吉田知広、滝有希子、大場邦弘、野田絵理、河野寿夫、**水谷哲也**:ダニの経口摂取によるアナフィラキシー (Oral Mite Anaphylaxis)の一家族例、日本小児救急医学会雑誌 (in press)

30. **水谷哲也**、木村博一:「ボカウイルス」臨床ウイルス学必携、羊土社(2010年12月刊行予定)

31. **水谷哲也**:「コロナウイルス」臨床ウイルス学必携、羊土社、2010年12月刊行予定

32. **水谷哲也**:「網羅的遺伝子解析法」臨床ウイルス学必携、羊土社、2010年12月刊行予定

33. **水谷哲也**:「未知・既知のウイルスの網羅的検査法」in 医薬品の品質管理とウイルス安全性、文光社、2011年6月刊行予定

34. **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、pp410-413.

35. **水谷哲也**:「原因不明疾患における感染因子の網羅的解析 —川崎病との関わり—」Progress in medicine ライフサイエンス社、30: 1883-1886, 2010.

36. **水谷哲也**:「エマージングウイルスと未定のウイルスの探索」(特集:ウイルスの今日の意味)化学療法の領域、9月号予定 医薬ジャーナル社、26 No.9:pp1747-1755, 2010.

37. 池 郁生、Franck BOURGAD、大沢一貴、高木利一、佐藤 浩、森川 茂、酒井宏治、**水谷哲也**、西條政幸、倉根一郎、滝本一広、山田靖子、Jean JAUBERT、Marion BERARD、中田初美、平岩典子、目加田和之、高倉 彰、伊藤豊志雄、小幡裕一、吉木 淳、Xavier MONTAGUTELI:「輸入マウスに感染していたリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス」、獣医畜産新報 文永堂出版、Vol. 63, No. 3, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

謝 辞

本研究は、大分大学医学部・江下優樹、福岡大学医学部・佐藤朝光、国立感染症研究所ゲノム解析センター・黒田誠、関塚剛史、公立昭和病院・小児科・大場邦弘、国立感染症研究所・血液安全性研究部・野島清子、国立感染症研究所・ウイルス第1部・水谷哲也の協力によりおこなわれた。

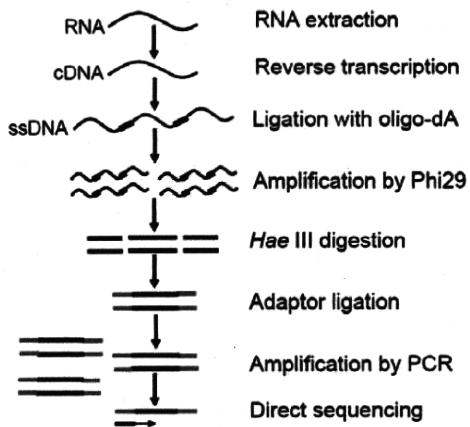
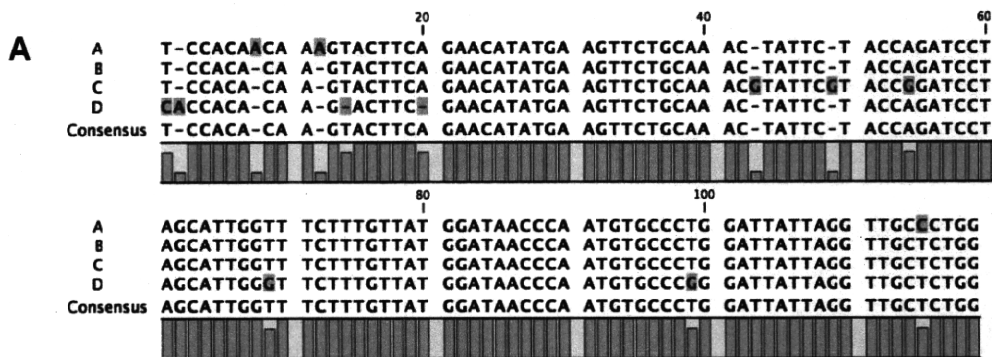


図1. RDV ver4.0の概略図



B

RSV-like fragment	16	YEVLQITLPDPSIGFFVMDNPMCPGLLG	99
		YE L DP GFF MDNP C GLLG	
RSV (EF141327)	5371	YETLLKNSYDPALGFFLMDNPKCAGLLG	5454
RSV-like fragment	7	FRTYEVLQITLPDPSIGFFVMDNPMCPGLLG	99
		F Y L DPS GF MD P GL G	
UUKV (D10759)	3824	FLEYIKLVSEIKDPSLGYFLMDHPFGSGLSG	3916
RSV-like fragment	43	DPSIGFFVMDNPMCPGLLG	99
		DP GFF DNP GL G	
RVFV (Z30318)	8133	DFGLGFFLLDNPYACGLG	8077

図2. RSV様塩基配列(A)とアミノ酸配列の相同性(B)

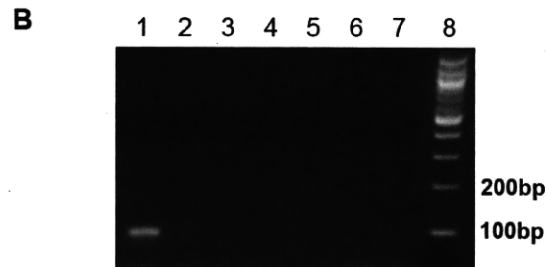
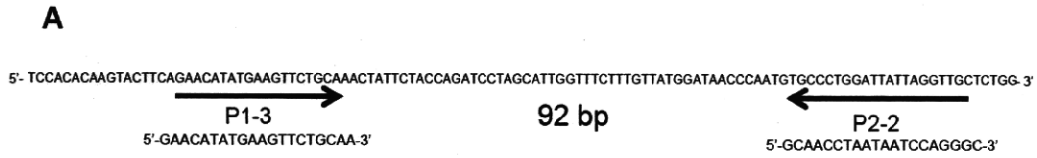


図3. プライマーのデザイン(A)とPCRによるPhaV1の検出(B)
 (B)レーン1はNumber12のRNA、レーン2から7はmock infectionの細胞や培養上清から抽出したRNA

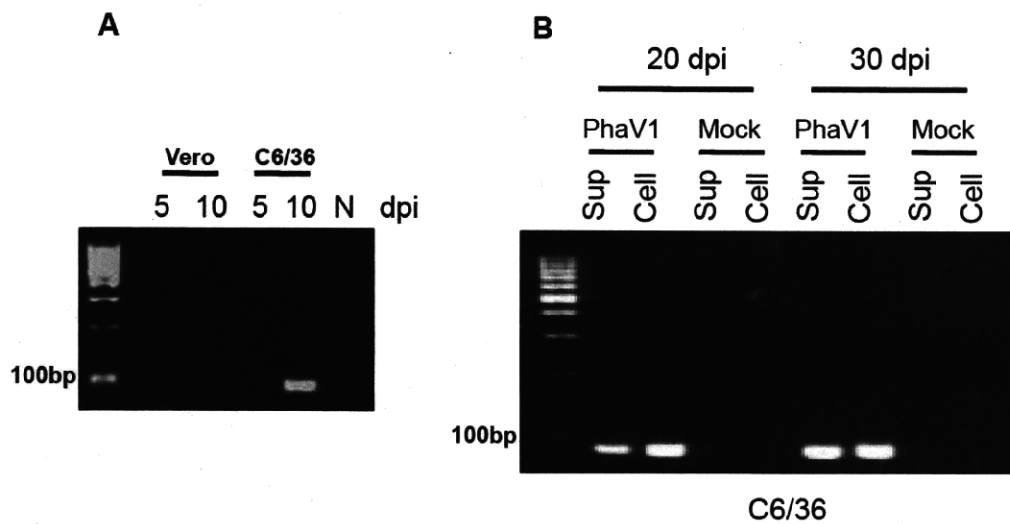


図4. PhaV1の感染性

(A)サル腎臓Vero細胞と蚊のC6/36細胞で最大10日間培養、
 (B)C6/36細胞で最大30日間培養して、PCRをおこなった

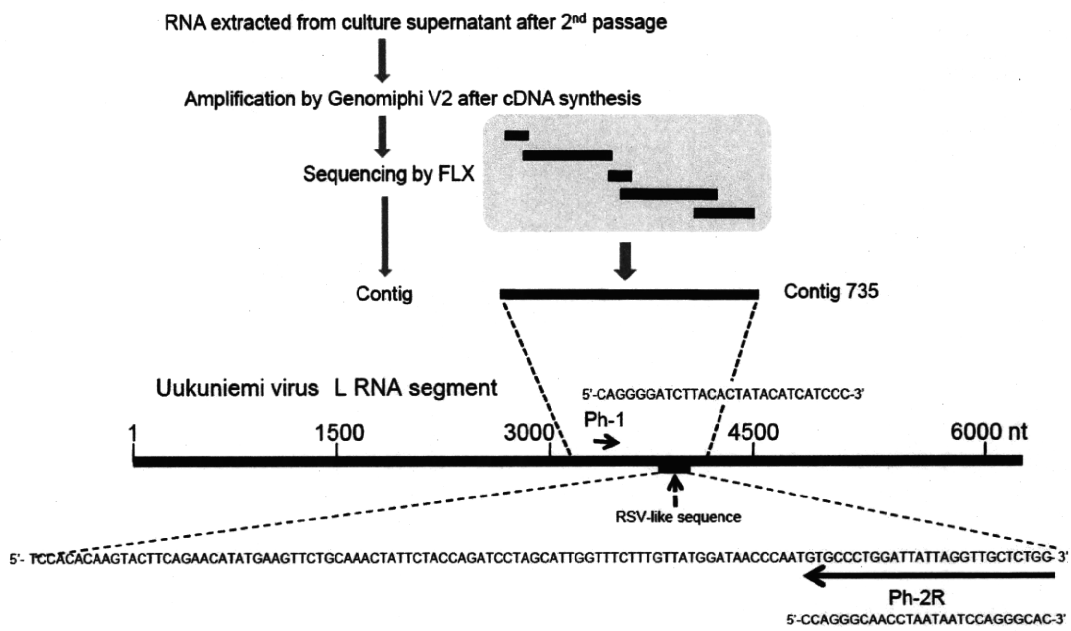


図5. 次世代型シーケンサーを用いたPhaV1遺伝子の伸長

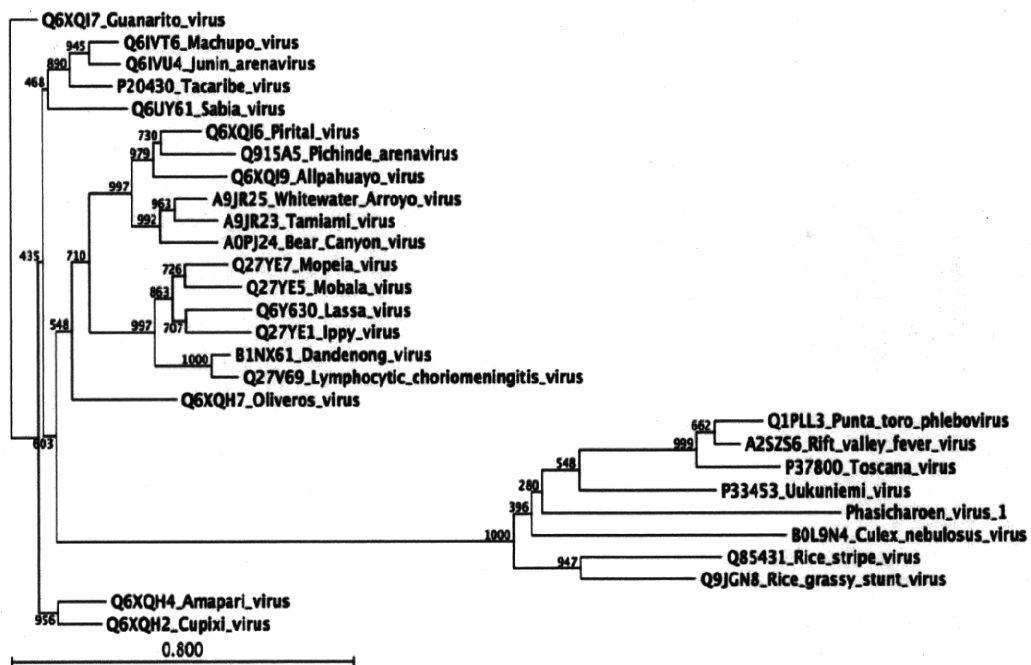
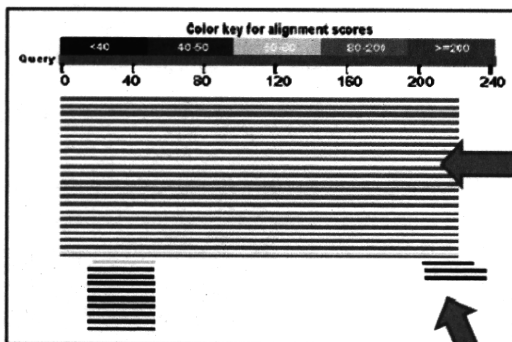


図6. PhaV1の系統樹

BLAST Basic Local Alignment Search

```

GGGGCTGTTCTGGGACCGGTCGGACGGCAGGCGGGTCTAGACCGAGGCAANCAAC
GTGGGACGGGGTGAATAATGGAGCACTTCGGGGCGCTGGAGCGGGGTACGG
TGTAGGTTGCTTCTCTGTTTGGCTGGCTCTGTCAGTACCGCGGTTGTCGGCTGAG
AGTGTGCTCAATGATGGATCGGCTGGGGTCTGGGGAATCGCGGCGCGCATTA
    
```



```

>tp1|D820034.6| TPA_inf: human herpesvirus 5 strain AD169 substrain varE, complete genome
Length=230290
Features in this part of subject sequence:
  Spanned protein US24
Score = 401 bits (444), Expect = 9e-109
Identities = 227/227 (100%), Gaps = 0/227 (0%)
Strand=Plus
Query 1  GCGGGTCTGTTCTGGGACCGGTCGGACGGCAGGCGGGTCTAGACCGAGGCAANCAAC 66
Sbjct 214224  GCGGGTCTGTTCTGGGACCGGTCGGACGGCAGGCGGGTCTAGACCGAGGCAANCAAC 216165
Query 61  AGCTGTGACAGAGCTGTGAATAATGGAGCACTTCGGGGCGCTGGAGCGGGGTACGG 120
Sbjct 216166  AGCTGTGACAGAGCTGTGAATAATGGAGCACTTCGGGGCGCTGGAGCGGGGTACGG 216105
Query 121  GGTGTAGGTTGCTTCTCTGTTTGGCTGGCTCTGTCAGTACCGCGGTTGTCGGCTGAG 180
Sbjct 216106  GGTGTAGGTTGCTTCTCTGTTTGGCTGGCTCTGTCAGTACCGCGGTTGTCGGCTGAG 216045
Query 181  CTGGAGTGTGCTCAATGATGGATCGGCTGGGGTCTGGGGAATCGCGGCGCGCATTA 222
Sbjct 216046  CTGGAGTGTGCTCAATGATGGATCGGCTGGGGTCTGGGGAATCGCGGCGCGCATTA 214000
    
```

D820034.6	TPA_inf: human herpesvirus 5 strain AD169 substrain varE, complete genome	401	401	100	9e-109	100%
FJ027562.1	human herpesvirus 5 strain AD169 substrain varE, complete genome	401	401	100	9e-109	100%
AF148969.1	human herpesvirus 5 strain AD169-94C isolate, complete sequence	401	401	100	9e-109	100%
X04890.1	human cytomegalovirus (HCMV) short unique region, short repeats, and part of long repeat	401	401	100	9e-109	100%
X17403.1	human cytomegalovirus strain AD169 complete genome	401	401	100	9e-109	100%
00294662.1	human herpesvirus 5 strain HNC93, complete genome	398	398	100	4e-107	99%
00221874.1	human herpesvirus 5 strain HRI1, complete genome	398	398	100	4e-107	99%
AT46884.2	human herpesvirus 5 strain Toledo genome, partial sequence	398	398	100	4e-107	99%
AT68480.1	human herpesvirus 5 strain F19-94C isolate, complete sequence	398	398	100	4e-107	99%
AF148967.1	human herpesvirus 5 strain Toledo-94C isolate, complete sequence	398	398	100	4e-107	99%
AF148968.1	human herpesvirus 5 strain 2001, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
00480044.1	human herpesvirus 5 strain HNC20, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
00399663.1	human herpesvirus 5 strain 357, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
00221874.1	human herpesvirus 5 strain T940-E clone T940-94C1, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
EF99821.1	human herpesvirus 5 strain T940-E clone T940-94C1, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
AF148966.1	human herpesvirus 5 strain T940-E clone T940-94C1, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
AF148965.1	human herpesvirus 5 strain T940-E clone T940-94C1, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
00221874.1	human herpesvirus 5 strain T940-E clone T940-94C1, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
0012041.1	human herpesvirus 5 strain T940-E clone T940-94C1, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
0012041.1	human herpesvirus 5 strain T940-E clone T940-94C1, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
FJ012289.1	human herpesvirus 5 strain T940-E clone T940-94C1, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
AT313197.2	human herpesvirus 5 strain T940-E clone T940-94C1, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
AF148964.1	human herpesvirus 5 strain T940-E clone T940-94C1, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
AF148963.1	human herpesvirus 5 strain T940-E clone T940-94C1, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
FJ012289.1	human herpesvirus 5 strain T940-E clone T940-94C1, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
FJ012289.1	human herpesvirus 5 strain T940-E clone T940-94C1, complete genome	392	392	100	5e-106	99%
U27770.2	herpesvirus 1 strain ATCC 49-2243 genomic sequence	50	50	100	0.007	89%
U27770.2	herpesvirus 1 clone 38620 T3	50	50	100	0.007	89%
AF067366.1	herpesvirus 1 clone 38643 T3	50	50	100	0.007	89%
AF067367.1	herpesvirus 1 clone 38630 T3	50	50	100	0.007	89%
U27802.2	herpesvirus 1 clone C16246, complete sequence	50	50	100	0.007	89%
U27802.2	herpesvirus 1 clone 3826 T3	50	50	100	0.007	89%
AF067346.1	herpesvirus 1 clone 38646 T7	50	50	100	0.007	89%
U27917.1	herpesvirus 1 clone 38646 T7	50	50	100	0.007	89%
AL018888.1	Simulium callidum strain 1021 complete chromosome	42	42	100	1.0	82%
D0012294.1	Poliovirus cellulosum strain 5a cellulosum biosynthesis gene cluster, complete sequence	42	42	100	1.0	82%
A064412.1	Poliovirus cellulosum strain 5a cellulosum biosynthesis gene cluster, complete sequence	42	42	100	1.0	82%

図7. RDV法で得られた遺伝子配列の一例。サイトメガロウイルスをRDV法で解析して得られた遺伝子配列を GenBank の blast を用いて、相同性のあるウイルスを検索した。サイトメガロウイルスが数多くヒットした。

CMV AD169 strain 230290bp

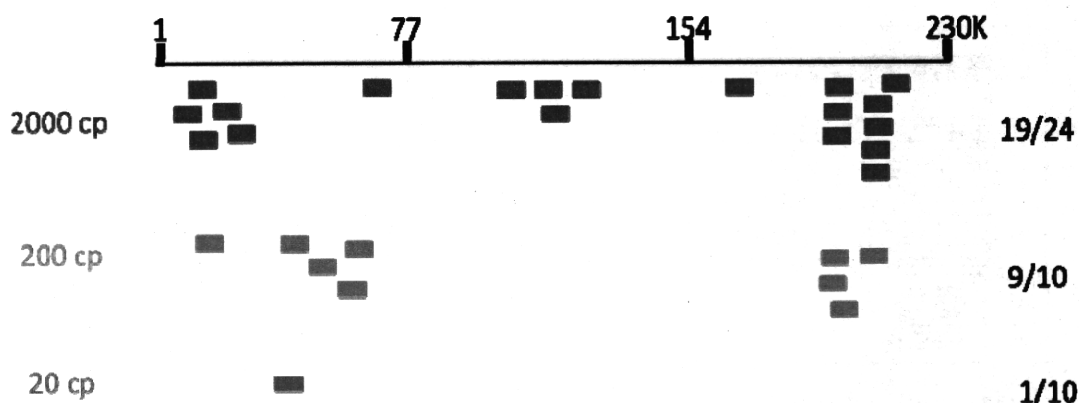


図 8. RDV 法で得られたサイトメガロウイルスのゲノムへのマップ。それぞれの出発材料のウイルスコピー数で得られた配列をサイトメガロウイルスのゲノムにマップした。20 コピーでは 1 遺伝子だけ得られたが、RDV 法の最終段階で解析する遺伝数を増やすと、検出感度は上昇すると考えられる。

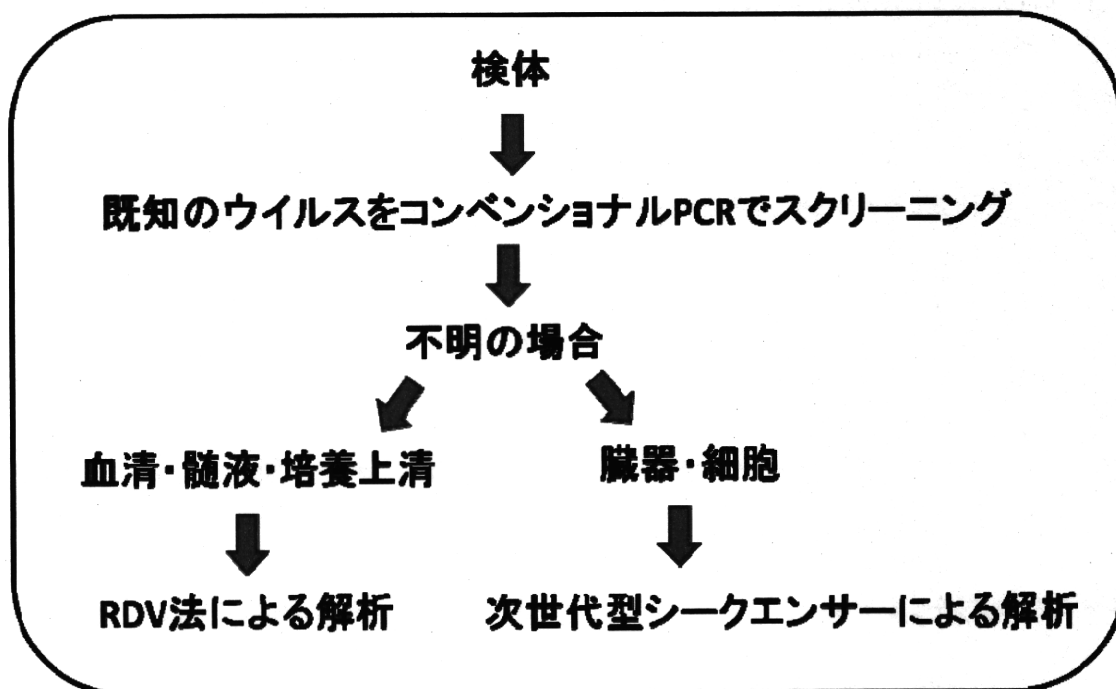


図9. 不明検体の感染症研究所におけるストラテジー