

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の
診断等の対応方法に関する研究

分担研究課題：ウイルス性出血熱の実験室診断法の改良に関する研究

研究分担者：西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部部長）

研究要旨： 近年、新種のフィロウイルス（ブンディブギョエボラウイルス）による出血熱の流行や、霊長類以外（ブタ）でのフィロウイルス流行が見つかったことから、新たなフィロウイルス出血熱流行と、動物の種を超えた感染拡大の懸念が深まっている。本研究では、新種のフィロウイルスへの実験室診断法の対応および、フィロウイルス感染経路解明のための高感度検出法の開発を行い、その有用性の評価を行う。平成23年度はブンディブギョエボラウイルスに対応した PCR プライマーを設計し、フィロウイルス遺伝子検出 PCR 法の改良を行った。また、従来のコンベンショナル PCR を改良した Nested PCR および、5'側に Flap 配列を付加したプライマーを用いた TaqMan PCR により、高感度フィロウイルス遺伝子検出法を開発した。

研究協力者：福士秀悦、吉河智城、谷英樹、
森川茂（国立感染症研究所ウイルス第一部）、
高田礼人（北海道大学人獣共通感染症リサ
ーチセンター）

A 研究目的

エボラ出血熱、マールブルグ病の原因ウイルスはフィロウイルス科に属するエボラウイルス、マールブルグウイルスである。これらのウイルスはヒトを含む霊長類に重篤な出血熱を引き起こし、致死率はエボラウイルスの場合、ウイルス種により異なるが 50～90%、マールブルグウイルスでは

25%以上である。2007 年から 2008 年にかけて新種のエボラウイルス、Bundibugyo（ブンディブギョ）エボラウイルス(BEBOV)によるエボラ出血熱がアフリカ東部のウガンダで報告された(図 1)。BEBOV は従来のフィロウイルス用の PCR プライマーでは検出率が非常に低く、塩基配列を比較すると既存のエボラウイルスとは 30%以上の違いがあることから、BEBOV に対応した実験室診断法の開発を行う必要がある。また、2008 年フィリピンの養豚施設のブタで初めてレストンエボラウイルス(REBOV)感染が見つかり、同時期にヒトへの感染も確認された

ことから、REBOV の動物種を超えた感染拡大と連鎖的なヒトの感染流行が懸念されている。このため、フィロウイルスの感染経路を解明するためのフィロウイルス遺伝子高感度検出系の確立も進めていく必要がある。これまでに、研究分担者の高田礼人によりフィロウイルス共通の conventional RT-PCR が開発され BEBOV も検出できることを示しているが、本研究では、これらを含めて従来のフィロウイルス感染症の実験室診断法を改良し、その有用性を評価することを目的とした。今年度は BEBOV に対応した PCR プライマーを従来のフィロウイルス検出用プライマーに追加し、フィロウイルス遺伝子検出 PCR 法の検討を行った。また、PCR 感度を向上させるための修飾プライマー（5'側に Flap 配列を付加したプライマー：Flap プライマー）がフィロウイルス遺伝子検出に応用可能か検討した。改良した PCR 法は 2011 年 11 月にイタリア、ローマで行われた GHSAG ラボネットのワークショップにおいて、フィロウイルス感染細胞由来 cDNA を用いて、その有用性を評価した。

B 研究方法

スタンダード DNA

pKS336 ベクターにクローニングしたマールブルグウイルス(MARV) NP cDNA、レストンエボラウイルス(REBOV) NP cDNA およびザイールエボラウイルス(ZEBOV) NP cDNA (Ikegami et al, 2003, Saijo et al., 2001)、pCAGGS ベクターにクローニングし

たスーダンエボラウイルス(SEBOV) NP cDNA, アイボリーコーストエボラウイルス(CIEBOV) NP cDNA およびブンディブギョエボラウイルス(BEBOV) NP cDNA (北海道大学 高田礼人教授より分与) をコンベンショナル PCR のスタンダード DNA とした。

MARV, REBOV, ZEBOV, SEBOV, CIEBOV および, BEBOV の L 遺伝子の一部を PCR により増幅した産物を TaqMan PCR のスタンダード DNA とした。

ウイルス cDNA

MARV, REBOV, ZEBOV, SEBOV, CIEBOV および, BEBOV 感染細胞から調製した RNA (平成 23 年 11 月、イタリア、GHSAG wet lab ワークショップで使用、Dr Allen Grolla より分与)をランダムプライマーによる逆転写反応で合成し、ウイルス cDNA とした。ウイルス cDNA20 サンプル中 2 サンプルはネガティブコントロールである。

TaqMan PCR

TaqMan PCR はドイツの Bernard-Nocht 研究所から報告されたフィロウイルス L 遺伝子をターゲットとした方法 (Panning et al., 2007)を改良し、BEBOV を検出できるようナリバース Primer Filo-B-BI を追加した(図 2)。

コンベンショナル PCR

コンベンショナル PCR は研究分担者の高田礼人（北大教授）らにより開発されたフィロウイルス NP 遺伝子をターゲットとした方法 (Ogawa et al., 2011) を用いた。さらに、

この PCR 産物を鋳型に nested-PCR (図 3) を行った。

Flap プライマー

Afonina et al (2007)の報告に基づいて、プライマーの 5' 側に Flap 配列 (5'-AATAAATCATAA)を付加し (図 4)、TaqMan PCR に用いた。

C 結果

TaqMan PCR の改良

従来の TaqManPCR 法は新種の BEBOV に対応していなかった。そこで、リバーシ Primer Filo-B-BI を追加し (図 2)、TaqMan PCR を行った。スタンダード plasmid を鋳型に用いた場合、BEBOV が 10^2 コピーまで検出可能であった (図 5)。また、フィロウイルス感染細胞由来 cDNA を用いたところ、20 サンプル中 13 サンプルが陽性であった (図 6)。

コンベンショナル PCR の改良

フィロウイルス NP 遺伝子をターゲットとした方法(Ogawa et al., 2011)に基づき、スタンダード plasmid を鋳型に PCR を行ったところ、BEBOV を含むすべてのフィロウイルスが検出可能であった (図 7)。フィロウイルス感染細胞由来 cDNA を用いたところ、20 サンプル中、6 サンプルが陽性であり (図 8)、TaqMan PCR に比べ、明らかに検出感度が低かった。そこで、検出感度の向上とウイルス種の鑑別を目的として Nested PCR プライマーを次のように設計した (図 3)。ヒトに高い病原性を示すエボ

ラウイルス (ZEBOV, SEBOV, CIEBOV および BEBOV) を同時に検出するプライマー (PCR 産物は 425bp)、MARV および、ヒトに高い病原性を示さないエボラウイルス REBOV を同時に検出するプライマー (PCR 産物は MARV 158bp、REBOV 308bp)。Nested PCR の結果、スタンダード plasmid を鋳型に用いると、それぞれのウイルスを 10^1 コピー程度まで検出可能であった (図 9)。フィロウイルス感染細胞由来 cDNA を用いた場合は 20 サンプル中、16 サンプルが陽性となり、検出感度が向上した。また、PCR 産物のサイズにより、ヒトに高い病原性を示すエボラウイルス、ヒトに高い病原性を示さないエボラウイルス、および MARV の鑑別が可能であった (図 10)。

Flap プライマーを用いた PCR

Flap プライマーを用いた TaqMan PCR により、ウイルス遺伝子の検出感度が高くなる場合がある (Afonina et al, 2007)。上記フィロウイルス検出 TaqMan PCR に Flap プライマーが応用できるかどうか検討した。プライマーに Flap 配列 (5'-AATAAATCATAA)を付加し (図 4) TaqMan PCR を行った。増幅産物がデータ上初めて確認される PCR サイクル数すなわちクロッシングポイント (CP) を比較したところ、Flap プライマーを用いた場合は、用いない場合に比べ、鋳型のコピー数が少なくても検出でき、検出感度が高くなることが明らかになった (図 11)。

D 考察

新種の BEBOV のアウトブレイクの際、患者血液検体を用いてフィロウイルスのグループを広く検出するためのプライマーで検出を試みられた。しかし、非常に低い検出率(29検体中1検体のみ陽性)のため、この出血熱流行がエボラウイルス感染によるものであると確認できるまで長時間を要している。本研究で、従来のフィロウイルス検出用 TaqMan PCR 法に新しいプライマーを追加することにより、BEBOV が検出可能になった。さらに、従来の報告(Panning et al., 2007)では検討されていなかった CIEBOV も本方法により検出可能であった(図5)。したがって、本研究によって改良された TaqMan PCR 法は既存のフィロウイルスすべてを検出する手法として優れているといえる。

コンベンショナル PCR は特殊な機器(ライトサイクラー等)を必要とせず、電気泳動等により簡便にウイルス遺伝子を検出できる点で有用である。フィロウイルス NP 遺伝子をターゲットとしたコンベンショナル PCR は BEBOV を含むすべてのフィロウイルスを検出可能であった。本研究では、検出感度を上げるため、Nested PCR を開発した。Nested PCR プライマーは、PCR 産物のサイズによるウイルス種の鑑別ができるように設計した。その結果、フィロウイルスを高感度に検出できるとともに、PCR 産物のサイズにより、ヒトに高い病原性を示すエボラウイルス、ヒトに高い病原性を示さないエボラウイルス、および MARV の

鑑別が可能となった。

2011 年ヨーロッパのユビナガコウモリから新種のフィロウイルス(Lloviu virus)が検出された。日本あるいはアジア地域のコウモリが Lloviu virus あるいは類似のウイルスを保有するかどうか調査する必要がある。今後、本研究により改良された PCR で Lloviu virus が検出できるかどうか検討する予定である。

Flap プライマーを用いると TaqMan PCR の検出感度が高くなることが明らかになった。Flap プライマーはプライマー領域に SNP がある場合やプライマーが degenerated base (Y や W など)を含む場合に感度が良くなる可能性がある。今後、ラッサウイルス、クリミアコンゴ出血熱ウイルスなど他の出血熱ウイルスの PCR 検出法に応用できるか検討を進めていく予定である。

E 結論

1. 従来の TaqMan PCR を改良することにより、新種のエボラウイルス BEBOV が検出可能となった。
2. 従来のコンベンショナル PCR に、Nested PCR を加えることにより、フィロウイルスを高感度に検出できるとともに、PCR 産物のサイズにより、ヒトに高い病原性を示すエボラウイルス、ヒトに高い病原性を示さないエボラウイルス、および MARV の鑑別が可能となった。
3. Flap プライマーを用いた TaqMan PCR によりフィロウイルスを高感度に検出

可能であった。今後、他の出血熱ウイルスの PCR 検出法に応用できるか検討を進めていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukushi, S., Nakauchi, M., Mizutani, T., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S.: Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *Journal of Virological Methods* 180:68-74, 2012
2. Kennedy, J.S., Gurwith, M., Kenner, J., Morikawa, S., Saijo, M., Yokote, H., Edwards, K., Dekker, C.L., Frey, S, Rogge, PT, Damon, I, Greenberg, R.N.: LC16m8, an attenuated smallpox vaccine, demonstrates comparable and vaccinia variola immune response to Dryvax in a Phase I/II vaccinia-naïve adult trial. *Journal of Infectious Diseases* 204:1395-1402, 2011
3. Taniguchi, S., Watanabe, S., Masangkay, J.S., Omatsu, T., Ikegami, T., Alviola, P., Ueda, N., Iha, K., Fujii, H., Ishii, Y., Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Kurane, I., Kyuwa, S., Akashi, H., Yoshikawa, Y., Morikawa, S.: Reston ebolavirus antibodies in Bats, the Philippines. *Emerging Infectious Diseases* 17:1559-1560, 2011
4. 西條政幸：バイオテロリズムに用いられる可能性のある病原体と国立感染症研究所における対応：出血熱ウイルスと痘瘡ワクチン。日本犯罪学会雑誌 77:63-66,

2011

2. 学会発表

1. Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Yoshikawa-(Iwata), N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Immune responses against EEV and IMV in non-human primates infected with monkeypox virus or vaccinated with a highly attenuated smallpox vaccine LC16m8 and protection from lethal monkeypox. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
2. Lim, C.K., Ami, Y., Fujii, Y., Moi, M.L., Kitaura, K., Kotaki, A., Morikawa, S., Saijo, M., Suzuki, R., Kurane, I., Takasaki, T.: Pathogenesis of epidemic chikungunya virus in nonhuman primates. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
3. Sayama, Y, Fukushi, S, Saito, M, Taniguchi, S., Iizuka, I., Mizutani, T., Kurane, I., Saijo, M.: A serological survey of *reston ebolavirus* infection in swine during epizootic in 2008 in the Philippines. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
4. Taniguchi, S., Watanabe, S., Iha, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Saijo, M., Kurane, I., Kyuwa, S., Akashi, H., Yoshikawa, Y., Morikawa, S.: The detection of reston ebolavirus antibodies in wild bats in the

Philippines. XV International Congress of
Virology, Sapporo, Japan (2011.09)

G 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

図 1. アフリカ東部のウガンダで新興した Bundibugyo(ブンディブギョ)エボラウイルスの分子系統樹上の位置

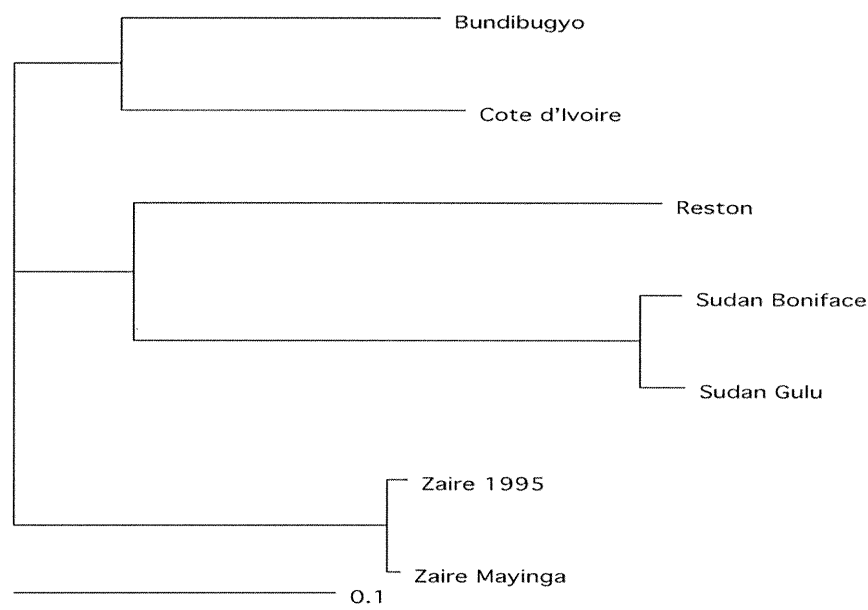


図2) Primer/ Probe design for Ebola/Marburg virus detection targeting the L gene

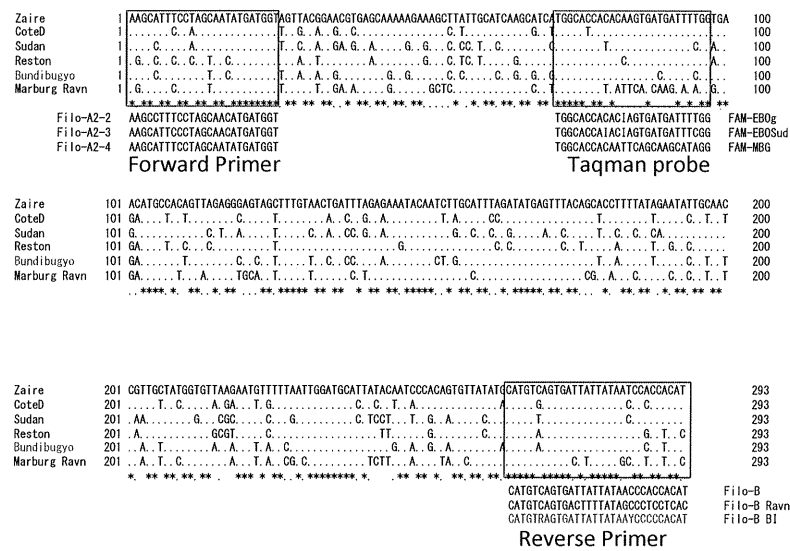


图3)

Nested PCR primers

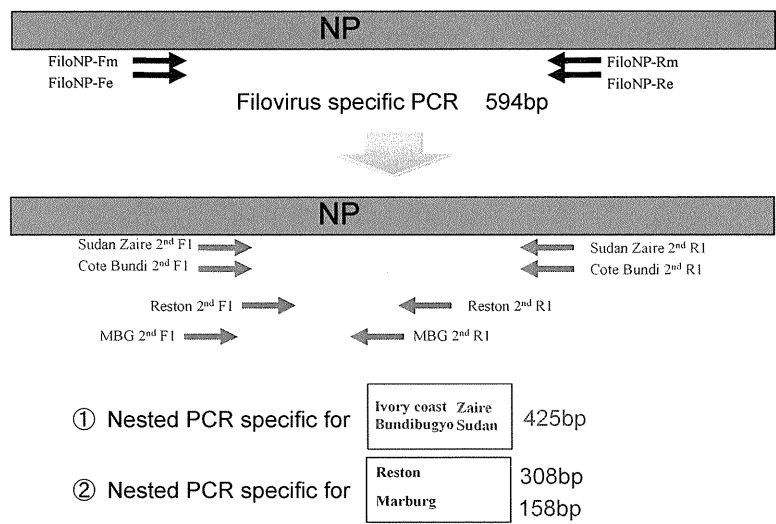


图4)

TaqMan PCR with Flap primers

Filo-A2-2: 5'-AAGCCTTCCTAGCAACATGATGGT-3'
Filo-A2-3: 5'-AAGCATTCCCTAGCAACATGATGGT-3'
Filo-A2-4: 5'-AAGCATTCCTAGCAATATGATGGT-3'

Filo-B: 5'-ATGTGGTGGGTATAATAATCACTGACATG-3'
Filo-B-Ravn: 5'-GTGAGGAGGGCTATAAAAGTCACTGACATG-3'
Filo-B-BI: 5'-ATGTGGGGGRTTATAATAATCACTYACATG-3'



Flap-Filo-A2-2: 5'-AATAAATCATAAAAGCCTTCCTAGCAACATGATGGT-3'
Flap-Filo-A2-3: 5'-AATAAATCATAAAAGCATTCCCTAGCAACATGATGGT-3'
Flap-Filo-A2-4: 5'-AATAAATCATAAAAGCATTCCTAGCAATATGATGGT-3'

Flap-Filo-B: 5'-AATAAATCATAAATGTGGTGGGTATAATAATCACTGACATG-3'
Flap-Filo-B-Ravn: 5'-AATAAATCATAAGTGAGGAGGGCTATAAAAGTCACTGACATG-3'
Flap-Filo-B-BI: 5'-AATAAATCATAAATGTGGGGGRTTATAATAATCACTYACATG-3'

図5)

TaqMan PCRの改良 ブンディブギョエボラウイルスも検出可能

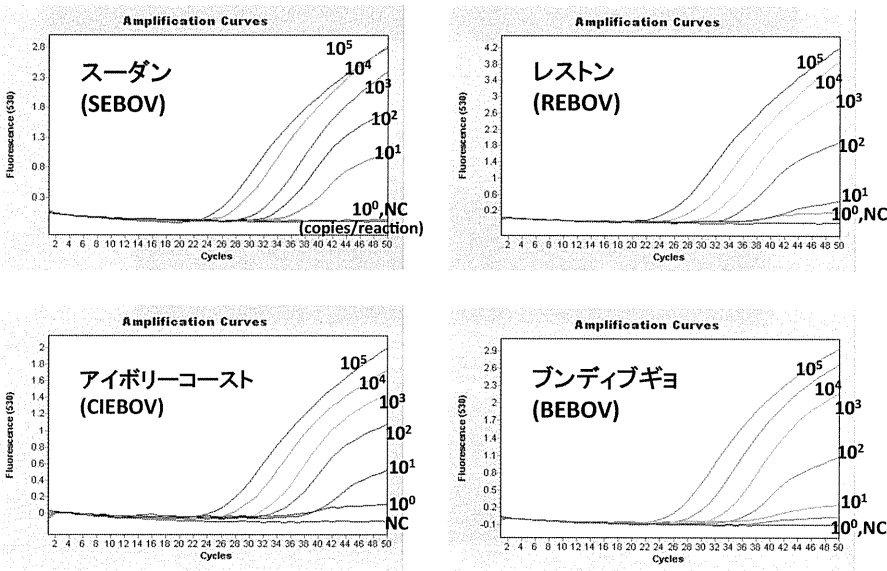


図6)

Results: 13 samples were positive

Sample	CP	concentration		Answers
		copies/reaction	copies/ul sample	
A		(-)	(-)	BEBOV -3
B	39.4	6.93E+01	3.47E+02	CEIBOV -3
C		(-)	(-)	CCHFV
D	28.42	8.69E+02	4.35E+03	REBOV -1
E	28.7	7.09E+02	3.55E+03	MARV -1
F	26.86	2.68E+03	1.34E+04	MARV -3
G		(-)	(-)	SEBOV -5
H		(-)	(-)	ZEBOV -6
I	30.48	1.96E+02	9.80E+02	ZEBOV -2
J	25.68	6.33E+03	3.17E+04	SEBOV -1
K	19.48	5.67E+05	2.84E+06	BEBOV -1
L	19.72	4.76E+05	2.38E+06	CIEBOV -1
M	28.61	7.53E+02	3.77E+03	MARV -2
N		(-)	(-)	CEIBOV -4
O	[23.96]	[2.2e4]	[1.1e5]	ZEBOV -4
P		(-)	(-)	SEBOV -3
Q	32.64	4.23E+01	2.12E+02	REBOV -2
R		(-)	(-)	RVFV
S	27.08	2.30E+03	1.15E+04	SEBOV -2
T	33.39	2.50E+01	1.25E+02	BEBOV -2

図7)

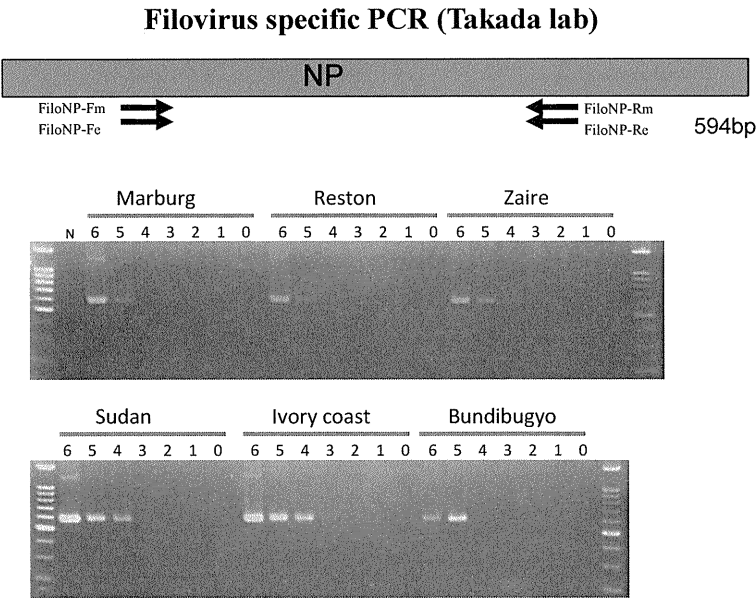
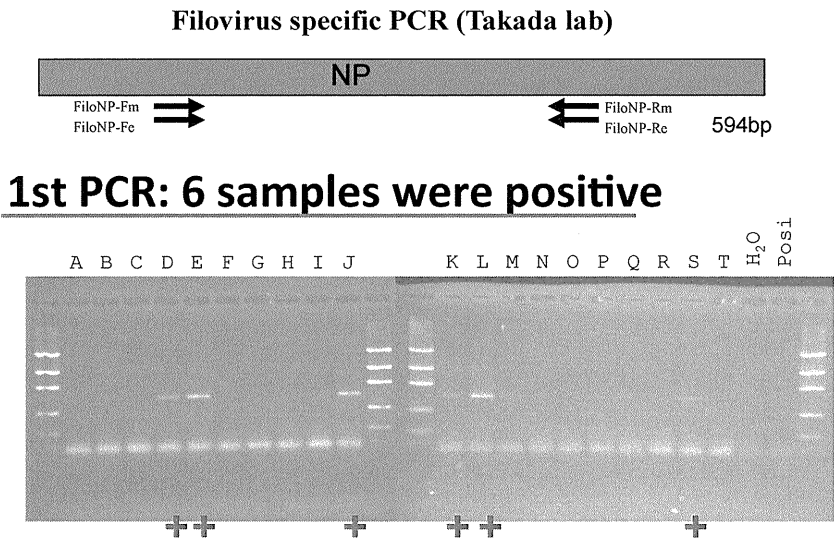


図8)



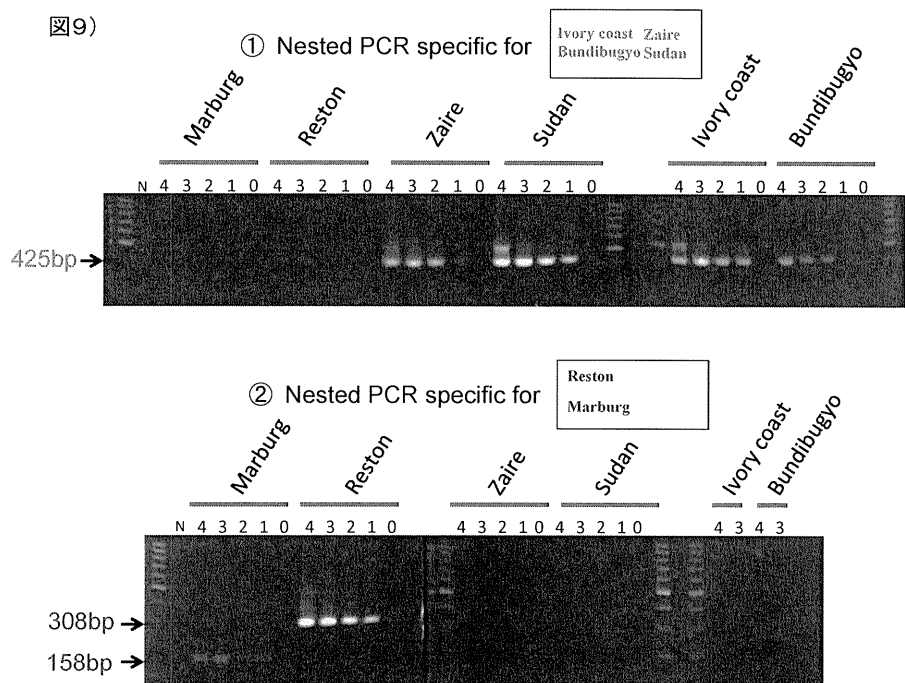
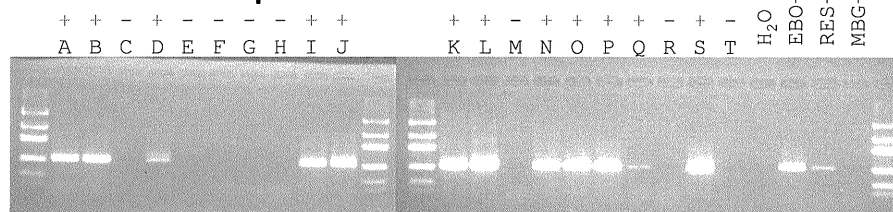


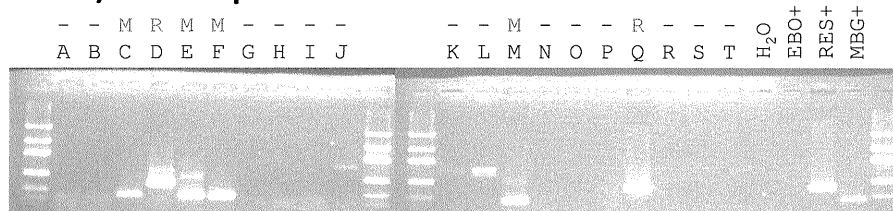
图10)

Nested PCR: 16 samples were positive

Z- S- CI- B-EBOV Specific



REBOV/MARV Specific



11)

TaqMan PCR (w or w/o Flap

standard plasmid				viral cDNA			
Template	copies/reaction	CP		Template	dilution	CP	
		No FLAP	FLAP			No FLAP	FLAP
REBOV	10000	27.04	27.41	BEBOV	-2	32.5	33.32
	100	33.51	35.25		-3	nd	37.88
	10	42.77	41.61	CIEBOV	-3	36.34	35.59
	1	nd	nd		-4	nd	43.2
SEBOV	10000	25.48	28.04	REBOV	-1	25.58	29.65
	100	33.86	35.9		-2	30.3	33.78
	10	38.08	38.46	MARV	-2	31.05	32.97
	1	nd	45.96		-3	37.11	37.49
CIEBOV	10000	29.18	29.75	SEBOV	-2	31.81	32.74
	100	37.72	37.46		-3	39.59	38.65
	10	nd	43.57		-5	nd	45.76
	1	nd	nd	ZEBOV	-2	28.6	29.7
MARV	10000	30.47	32.47		-4	46.67	38.77
	100	40.17	42.05		-6	nd	44.4
	10	nd	47.86	RVFV		nd	nd
	1	nd	nd				

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

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の
診断等の対応方法に関する研究

分担研究課題：変異や新型のウイルス出現に対応可能なウイルス遺伝子検出法の開発

研究分担者：水谷哲也（東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター）

研究要旨：新型ウイルス等の出現に対応可能な網羅的遺伝子検出法の対象を細菌にまで広げることにより、原因不明疾患の診断をより確実にすることを目的として、Rapid Determination system of Bacterial DNA sequences（RDB 法）を確立した。RDB 法は検体を煮沸して細菌 DNA を露出させるので精製過程を省略できるなど、迅速に細菌ゲノムを解析できる。また、検出感度は数十コピーなので nested PCR に近い。さらに、本研究では昨年度に報告した新規ラブドウイルス（ニシムロウイルス）の実験動物系を確立した。

研究協力者：遠藤大二、萩原克郎（酪農学園大学獣医学部）、酒井宏治（国立感染症研究所ウイルス第三部）、前田健（山口大学農学部）、江下優樹（大分大学医学部）、佐藤朝光（福岡大学薬学部）

A. 研究目的

我々は未知や既知のウイルスを網羅的に検出できる方法として RDV 法（Rapid determination system of viral RNA/DNA sequences）を開発し、これまでに未知や稀少ウイルスの検出をおこなってきた。RDV 法は特別な機器を必要としないので、PCR 用サーマルサイクラーがあればどの研究室でも実施できる。また、1 検体あたり数万円で解析可能である。RDV 法はわずか 2 日

間でウイルスの遺伝子断片の塩基配列を決定できるが、ウイルス分離後に RDV 法を用いる場合にはさらに時間を要することになる。

一方、近年、ヒトゲノム解読プロジェクトに伴い、いわゆる次世代型シーケンサーの開発が盛んにおこなわれている。次世代型シーケンサーは数年前まで約 1 億円の高額な機器であったが、現在では卓上型の開発が進み、2000 万円以下でも購入できるようになり、数年後には多くの研究室に導入される可能性がある。RDV 法も次世代型シーケンサーも遺伝子断片をランダム増幅したのちに、ダイレクトシーケンスすることにより塩基配列を決定している。しかしながら、次世代シーケンサーを用

いる場合には3日から1週間の解析日数が必要である。RDV法と次世代型シーケンサーの決定的な違いは、最終的に得られるリード数にある。次世代型シーケンサーでは10万リード以上、RDV法では100リードほどである。しかしながら、リード数が増えれば増えるほど、いわゆる unknown な配列が多くなる。たとえば、我々は次世代型シーケンサーである検体を解析し100万リード中、約7千の unknown なリードが得られたという経験がある。現時点では、これらの unknown のリードが新規のウイルス配列か否かを即時に決定することは難しい。一方、RDV法では得られるリード数が少ないので、unknown なリードも数個以内にとどまることが多い。この場合には、まず、リードの塩基配列からPCR用のプライマーを設計し、出発材料（検体）中にリード配列が存在することを証明する。その後、リード間で long PCR を実施するか、genome walking によりできるだけ塩基配列の情報を得て、ウイルス遺伝子の一部の配列か否かを決定していく。RDV法は改良を重ねて感染臓器などからも直接検出できるようになったが、ウイルス分離後の培養上清を解析することは重要である。Unknown な配列が得られた場合には、培養細胞で何回か継代した培養上清中からもPCRで増幅できることが、ウイルスであることの確信につながると考えられるからである。今後、次世代型シーケンサーの開発が急速に進んでも RDV 法は未知のウイルスを探索する方法として用いられる可能性が高いと考

えられる。

原因不明の疾患はウイルスだけではなく、細菌や原虫などの微生物によって引き起こされる場合もある。すなわち、unknown のリードはウイルス以外のゲノムの可能性を否定できない。我々は過去にウシの流産胎児の抽出液を用いてウイルス分離を試み、フィルトレーションし何度も継代でき細胞傷害が起こるサンプルを RDV 法で解析したが、GenBank にほとんど登録されていない細菌が細胞傷害の原因であったという経験がある。様々な状況から、この細菌が流産の原因であったとは考えにくい、本件を踏まえて疾患の原因をウイルスだけに限定しないという検査姿勢は重要であると考えられる。そこで、本年度は RDV 法を改良して検体中の細菌の検出感度等についての検討をおこなった。また、新規ウイルス検出後もウイルス性状などを解明していくことは重要であるという観点から、昨年度に報告した新規ラブドウイルスのマウス感染実験の解析結果についても報告する。

B. 研究方法

RDB 法（Rapid determination system of bacterial DNA sequences）：

本研究では2つの方法を構築し、検出効率などの検討をおこなった（図1）。

（1）Boiled RDB 法：検体を100℃で5分煮沸後、常温にもどし、10,000 rpm で3分間遠心した培養上清をそのまま解析に用いた。RDV 法と同様に Sigma 社の Whole genome amplification kit（WGA キット）で1

次ライブラリーを作製した後に、制限酵素 *Hae*III 消化・アダプター結合を経て 2 次ライブラリーを作製し、ダイレクトシーケンスする方法と、WGA キットを用いないで直接 2 次ライブラリーを作製する方法の検討を行った。

(2) ISOFEAL RDB 法：ニッポンジーン社の糞便から高純度の DNA を抽出するキットを用いた。この方法においても Boiled RDB 法と同様に 1 次ライブラリーと 2 次ライブラリーから始める 2 つの方法を検討した。

2. 新規ラブドウイルスのマウス感染実験：

昨年度、イノシシの血清から Vero 細胞を用いて分離されたラブドウイルスを超遠心で純化したのちに、6 週齢の CID マウスおよび BALB/C マウスに経鼻・経皮的に接種した (4×10^7 PFU)。接種後 5、10 日後に血清および臓器を採取し、RT-PCR や中和抗体の材料とした。

C. 研究結果

1. RDB 法の確立：

原因不明の疾患からウイルスだけでなく細菌も検出、解析できるように RDV 法を改良した。本実験に先立ち、最も一般的と考えられる細菌である大腸菌を用いて、検出感度を検討した。プラスミドのトランスフォーメーションに用いられる JM109 を希釈していき、上記の Boiled RDB 法を用いてダイレクトシーケンスをおこなった。大腸菌のゲノム配列が得られた最高希釈の培養

液を平板プレートに撒き、コロニー数をカウントしたところ 63 個であった。したがって、この方法の検出感度は数十個であると考えられた。一般に、1 回の PCR の検出感度が 10,000 コピー、nested PCR やリアルタイム PCR では 10 コピーなので、本法の検出感度は nested PCR に近い値が得られたと考えられた。また、ウイルスを検出する場合の RDV 法では約 1,000 から 10,000 コピーの検出感度であり、RDB 法は高感度に細菌を検出できることがわかった。

本研究では Boiled RDB 法を基本的な方法として、糞便から DNA を抽出するキットを用いた比較もおこなった。実験用マウス（コンベンショナルと SPF）の糞便 0.2 μ g を 2 つの方法を用いて抽出したところ、DNA 抽出キットを用いる ISOFEAL RDB 法の方が純度の高い DNA が得られた（図 2 に OD 値や電気泳動像などを示した）。これらの DNA を用いて 1 次ライブラリーからアンプリコンを作製する方法と、2 次ライブラリーから出発する方法の検討をおこなった。図 3 に示すように、Boiled RDB 法のうち、2 次ライブラリーを作製するだけで十分にダイレクトシーケンスできるアンプリコンが得られることがわかった。これらのバンドのうち、10 個の細菌の遺伝子配列が得られた（図 3 の赤い丸印、図 4 に細菌種を示した）。

吸血昆虫の蚊は、デングウイルス、日本脳炎ウイルスなど数多くの人獣共通感染症を引き起こすウイルスを媒介する。しかし、これらの蚊が媒介する細菌についてはそれ

ほど多くの報告がない。そこで、本研究ではタイのデングウイルス感染患者の家の水桶から採取した蚊の幼虫を用いて、RDB法をおこなった。その結果、図5に示すように uncultured bacteria の配列が得られた。

2. 新規ラブドウイルスのマウス感染実験:

昨年度、野生イノシシの血清からウイルス分離され、RDV法により新規ラブドウイルス（ニシムロウイルスと命名）であることが明らかになったウイルスについての性状に関する実験をおこなった。新規ウイルスを SCID と BALB/c マウスに感染させ、5 および 10 日後に血清や臓器を採取し、ウイルスゲノムや中和抗体の有無について検討した。その結果、SCID マウスではウイルスゲノム陽性（肝臓、腎臓、肺、血清）・中和抗体陰性、BALB/c マウスではウイルスゲノム陰性・中和抗体陽性であった。これらマウスには病変が認められなかったが、マウスに感染できるウイルスであることが強く示唆された。本研究では CoCoMo によるラブドウイルスを広範囲で検出できるプライマーの設計もおこない、ニシムロウイルスが検出できることも確認した。

3. 次世代型シーケンサーを用いた新規ウイルスの探索:

ロシュ社のハイスループットパーソナルシーケンサー（次世代型シーケンサー）・GS ジュニアを用いて、ウズラやヒトから培養細胞を用いて分離されたウイルスを検出中であり、来年度に報告予定である。

D. 考察

本研究では、原因不明の検体を解析する手段として、ウイルスだけでなく細菌も検出できる RDB 法を確立した。RDB 法は現時点でも nested PCR に近い感度を得られているが、さらに改良することにより高い感度を得られると考えられる。また、RDB 法は煮沸による細菌ゲノムの露出や 1 次ライブラリー作製工程の省略など、RDV 法よりも速く結果が得られるという特徴がある。細菌の検査では、主に 16S リボゾーマル RNA の領域をシークエンスすることにより細菌種を特定しているが、RDB 法は細菌ゲノムをランダム増幅するために、必ずしも 16S リボゾーマル RNA を検出できるわけではない。そこで、より多くのリードを得て、細菌の特定をおこなう必要があると考えられた。

本研究ではタイのデング熱の患者の家屋から採取された蚊の幼虫について、RDB 法を実施し uncultured bacteria の遺伝子配列が得られた。Mourya らによると、実験的に蚊に日本脳炎ウイルスやデングウイルスを接種させる際に、大腸菌を混入させるとこれらのウイルスに感染する個体が 2 倍以上に増えるという報告がある (Arch. Virol. 2002)。蚊に感染している細菌についてはまだ不明な点が多いことから、今回のような情報を蓄積し、ウイルス媒介生物についての解析を今後もおこなっていきたい。

この 10 年に急速に進歩・普及してきたリアルタイム PCR 法では、特定のウイルスを

2-3 時間で検出できる。また、感度は悪いがイムノクロマト法では 10 分程度で結果が得られる。一方、RDV 法や次世代型シーケンサーのようなランダムシーケンスでは少なくとも 2 日の解析日数を要する。

RDB 法は 1 日で結果が得られるので、ランダムシーケンスによる検査法の中では速い方である。しかしながら、まだ迅速診断法に位置付けるほどの迅速性はない。このようにランダムシーケンス法は緊急対応できるように発展する余地を残しており、RDV・RDB 法も迅速診断に対応できるように改変していきたい。

本研究では新規ラブドウイルス（ニシムロウイルス）に関してさらに研究を進めた。新規ウイルスを検出した場合には、診断法・ワクチン・治療法などに加えてウイルス性状を解析することも重要である。本研究の結果から、BALB/c マウスでは感染が成立した結果、中和抗体が産生した可能性がある。また、SCID マウスでは中和抗体ができず、感染が成立したと考えられる。ニシムロウイルスはこれらのマウスに病原性を有しないが、感染モデル動物の有力な候補となる。今後、本ウイルスがイノシシや近縁のブタに病原性を有することがわかったときに、ワクチンや治療薬の開発をおこなうためこれらのマウスを使用できると考えられる。本研究で設計したラブドウイルスの CoCoMo プライマーは、ニシムロウイルスの遺伝子情報無しにデザインされた。すなわち、ニシムロウイルス発見前のラブドウイルスの遺伝子情報を用いてプライマー

の設計をおこなったのであるが、このプライマーセットはニシムロウイルスを増幅することができ、CoCoMo デザインの信頼性を確認できた。

E. 結論

原因不明の疾患を解明する手段として新たに細菌の網羅的探索法（RDB 法）を開発した。また、昨年度報告した新規ラブドウイルス（ニシムロウイルス）の動物実験系を確立した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.* 2011. 255. 147-155.
2. Yusuke Sayama, Yuki Eshita, Takuya Yamao, Miho Nishimura, Tomomitsu Satho, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Kouji Sakai, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Hitoshi Oshitani, Ichiro Kurane, Shigeru

Morikawa and Tetsuya Mizutani*.

Prevalence of Phasi Charoen Virus in Female Mosquitoes. J. Parasitology and Vector Biology. 2011. 3, 19-21.

3. Tetsuya Mizutani*, Yusuke Sayama, Akira Nakanishi, Hideharu Ochiai, Kouji Sakai, Kouji Wakabayashi, Nozomi Tanaka, Emi Miura, Mami Oba, Ichiro Kurane, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Shin-ichi Ono. Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Virology. 2011. 412. 179-187.
4. Masako Abe, Naoto Ito, Kouji Sakai, Yoshihiro Kaku, Mami Oba, Miho Nishimura, Ichiro Kurane, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Makoto Sugiyama, Tetsuya Mizutani. A novel sapelovirus-like virus isolation from wild boar. Virus Genes. 43, 243-248. 2011.
5. Taniguchi S, Watanabe S, Masangkay JS, Omatsu T, Ikegami T, Alviola P, Ueda N, Iha K, Fujii H, Ishii Y, Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y, Morikawa S. Reston ebolavirus antibodies in bats, the Philippines. Emerg Infect Dis. 17:1559-60. 2011.

H 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

I 謝辞

西條 政幸、森川茂（国立感染症研究所ウイルス第一部）、永田典代（同感染病理部）、西村美保（福岡大学薬学部）

図1. RDB法の概要

Boiled RDBもしくはISOFEAL RDB後に2通りのライブラリー作製法を検討した。

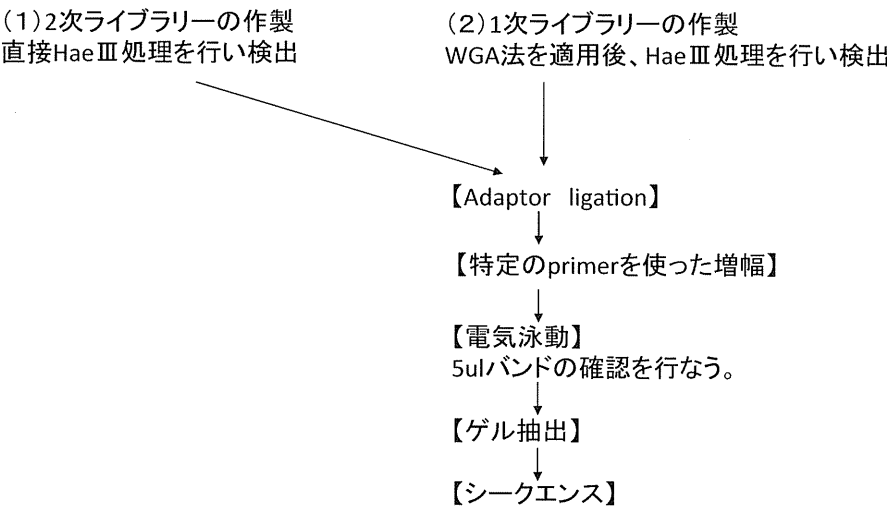


図2. DNA抽出法による純度と電気泳動像の違い

Boiled RDB ①SPF・・・3340ng/μL

260nm:0.668ABS
280nm:0.885ABS
230nm:0.534ABS

②コンベ・・・1725ng/μL

260nm:0.668ABS
280nm:0.885ABS
230nm:0.534ABS

ISOFEAL RDB ③SPF・・・2255ng/μL

260nm:0.451ABS
280nm:0.187ABS
230nm:0.215ABS

④コンベ・・・475ng/μL

260nm:0.095ABS
280nm:0.057ABS
230nm:0.053ABS

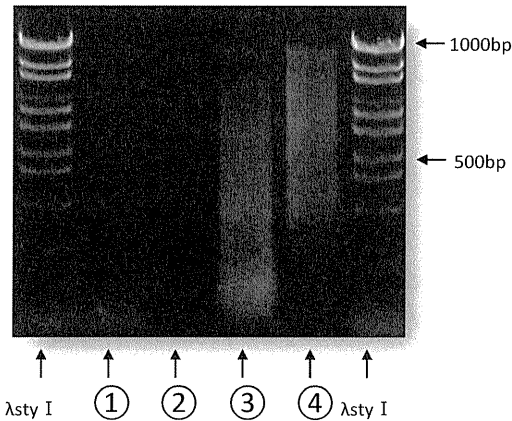


図3. RDB法の最終工程の電気泳動像

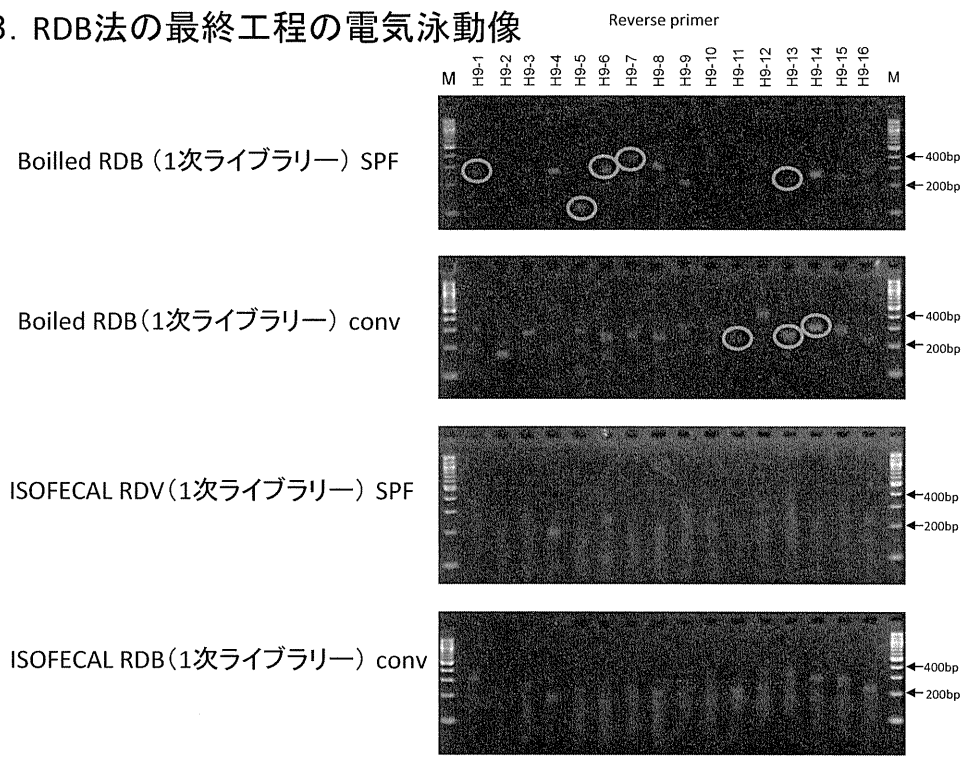


図4. マウス糞便のRDB法により得られた細菌配列

Boiled RDB (1次ライブラリー) SPF

- Pelodictyon luteolum DSM 273
- [Polyangium] brachysporum glidobactin A synthetase gene
- Pseudomonas fluorescens Pf-5
- Magnetospirillum magneticum AMB-1 DNA

Boiled RDB (1次ライブラリー) conv

- Pseudomonas stutzeri A1501
- Gluconobacter oxydans 621H
- Anaeromyxobacter dehalogenans 2CP-C