

double-stranded RNA interferon activation, and dissemination of Japanese encephalitis virus in cultured cells. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Alexander E Gorbalenya, Chris Lauber, Jelle J Goeman, Phan Thi Nga, Maria del Carmen Parquet, Manmohan Parida, Takeshi Nabeshima, Fuxun Yu, Takashi Ito, Eric J Snijder, Kouichi Morita: The largest RNA virus genomes evolved by wavelike expansions of three major coding regions. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Basu Dev Pandey, Yogendra Shah, Kishor Pandey, Takeshi Nabeshima, Ichiro Kurane, Kouichi Morita: Emergence of dengue in Kathmandu, Nepal. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Fuxun Yu, Kenta Okamoto, Kouichi Morita: Establishment of a cell line stably expressing Japanese encephalitis virus PRM-E protein and application for IGM capture ELISA. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Toru Kubo, Hidekazu Nishimura, Hiroyuki Moriuchi, Kouichi Morita: Developing a panel of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assays for comprehensive detection of causing viruses in pediatric severe pneumonia. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Daisuke Hayasaka, Yoshiki Fujii, Noriyo Nagata, Dihn Tuan Duc, Yuki Takamatsu, Kazutaka Kitaura,

Kanae Tanaka, Tetsutaro Sata, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita: Multiple mechanisms of severe disease following Japanese encephalitis virus infection. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Shota Era, Kazuya I.P.J Hidari, Ippei Watanabe, Kiyoshi Ikeda, Kouichi Morita, Takashi Suzuki: Small carbohydrate inhibitor targeting dengue virus E protein. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Katsuki Ekawa, Kazuya I.P.J Hidari, Kouichi Morita, Takashi Suzuki: Biochemical properties of N-linked Glycosylation of dengue virus NS1 protein. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Mya Myat Ngwe Tun, Kyaw Zin Thant, Shingo Inoue, Yae Kurosawa, Yee Yee Lwin, Sanda Lin, Kay Thi Aye, Pe Thet Khin, Tin Myint, Khin Htwe, Kouichi Morita: Dengue primary infections observed among dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome cases in upper Myanmar. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Futoshi Hasebe, Takeshi Nabeshima, Kenta Okamoto, Toru Kubo, Takashi Tsunoda, Guillermo Posadas Herrera, Thuy Thi Thu Nguyen, Yen Thi Nguyen, Mai Thi Quynh Le, Kouichi Morita: Characterization of dengue 1 epidemic strains proliferated in Hanoi, Vietnam in 2009. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Futoshi Hasebe, Takashi Tsunoda, Takeshi Nabeshima, Kenta Okamoto, Toru Kubo,

Posadas-Herrera Guillermo, Nguyen Thi Thu Thuy, Dang Thi Dinh, Pham Hoai Linh Ly, Nguyen Bao Ngoc, Nguyen Hoang Le, Ataru Tsuzuki, Nguyen Thi Yen, Tran Vu Phong, Le Thi Quynh Mai and Kouichi Morita: Characterization of dengue 1 epidemic strains in Hanoi, Vietnam in 2009, Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe, Japan, January 11-12, 2012

Kouichi Morita, Kenta Okamoto, Shingo Inoue, Takeshi Nabeshima, Posadas H. Guillermo, Fuxun Yu, Nguyen Thanh Thuy, Bui Minh Trang, Vu Sinh Nam, Phan Thi Nga, Le Q. Mai, Nguyen Tran Hien, Filipinas F. Natividad, Futoshi Hasebe: Rapid and comprehensive identification of virus strains by using LC tandem-MS method. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe, Japan, January 11-12, 2012

Phan Thi Nga, Bui Minh Trang, Do Phuong Loan, Nguyen Viet Hoang, Do Quang Ha, Vu Thi Que Huong, Huynh Thi Kim Loan, Hoang Minh Duc, Vu Sinh Nam, F. Hasebe and K. Morita: Circulation of Nam Dinh and Banna viruses in Viet Nam, 1964-2011. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe, Japan, January 11-12, 2012

Nguyen Tien Huy, Tran Thi Ngoc Ha, Lyre Anni Murao, Nguyen Thi Phuong Lan, Tran Thi Thuy, Ha Manh Tuan, Cao Thi Phi Nga, Vo Van Tuong, Tran Van Dat, Mihoko Kikuchi, Michio Yasunami, Kouichi Morita, Vu Thi Que Huong and Kenji Hirayama: Cell-free Circulating DNA: a Novel Biomarker in

Dengue Virus Infection. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe, Japan, January 11-12, 2012

国内会議における発表

早坂大輔、藤井克樹、永田典代、堀 朋子、辻百衣璃、北浦一孝、田中香苗、佐多徹太郎、鈴木隆二、森田公一・日本脳炎ウイルス感染後の重症化に関わる IL-10 応答, 第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 石川県金沢市, 2011年5月20-21日

江良翔太、左 一八、渡邊一平、池田 潔、杉浦信夫、木全弘治、森田公一、鈴木 隆: デングウイルス E タンパク質機能を阻害する低分子誘導体, 第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 石川県金沢市, 2011年5月20-21日

左 一八、田島 茂、高崎智彦、倉根一郎、森田公一、鈴木 隆・病原性の異なる日本脳炎ウイルス株の硫酸化糖鎖認識・第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 石川県金沢市, 2011年5月20-21日

村木優子、杉浦正明、福家功、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信、東 雍、森田公一・ウエストナイルワクチンのマウス及びサルにおける免疫原性, 第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 石川県金沢市, 2011年5月20-21日

吉川 亮、井上真吾、岡本健太、鍋島 武、比嘉由紀子、前川芳秀、森田公一、吾郷昌信・長崎県下のブタ、イノシシにおける日本脳炎ウイルスの侵淫状況, 第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 石川県金沢市, 2011年5月20-21日

早坂大輔、北浦一考、永田典代、青木康太郎、藤井克樹、鈴木隆二、森田公一: 日本脳炎ウイルス

感染後の免疫病原性による重症化、・第 52 回日本熱帯医学会大会、第 26 回日本国際保健医療学会学術大会 合同大会・東京都・2011 年 11 月 4 日～6 日

NGWETUN MYAMYAT、早坂大輔、森田公一：  
The Pathogenic mechanisms of Tick-Borne Encephalitis Virus by using IL-10 knock-out mice、・第 52 回日本熱帯医学会大会、第 26 回日本国際保健医療学会学術大会 合同大会・東京都・2011 年 11 月 4 日～6 日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

(表1) Dengue-consensus (DC) RT-LAMP primer の塩基配列

Primer	Genome position	Length (bp)	Sequence
Forward outer (F3)	10484-10500	17	GGAAGCTGTACGCATGG
Backward outer (B3)	10677-10693	17	CTGTGCCTGGAATGATG
Forward inner primer (FIP)	10562-10578 (F1c)	41	TACAGCTTCCCCTGGTG -TTTT-
(F1c + TTTT + F2)	10513- 10531 (F2)		GTGGTTAGAGGAGACCCCT
Backward inner primer (BIP)	10596-10615 (B1c)	44	AGAGGTTAGAGGAGACCCCC-TTTT-
(B1c + TTTT + B2)	10652-10671 (B2)		GAGACAGCAGGATCTCTGGT
Loop Backward (LB)	10631-10651	21	AGCATATTGACGCTGGGAGAG

(表2) 評価に用いたデングウイルス株

Serotype	Strain	GenBank accession No.
Dengue 1	Hawaii	X76219 AF426119
	99St-12A	GU377286
Dengue 2	00St-22A	AY786374, GU377287
	ThNH-7/93	AF022434
	16681	NC_001474
Dengue 3	SLMC50	GU377288
	BDH02-01	AY496871
	BDH02-02	AY496872
	BDH02-03	AY496873
	BDH02-04	AY496874
	BDH02-05	AY496875
	BDH02-06	AY496876
	BDH02-07	AY496877
Dengue 4	BDH02-08	AY496878
	SLMC318	GU377289
	No.17	AY550909

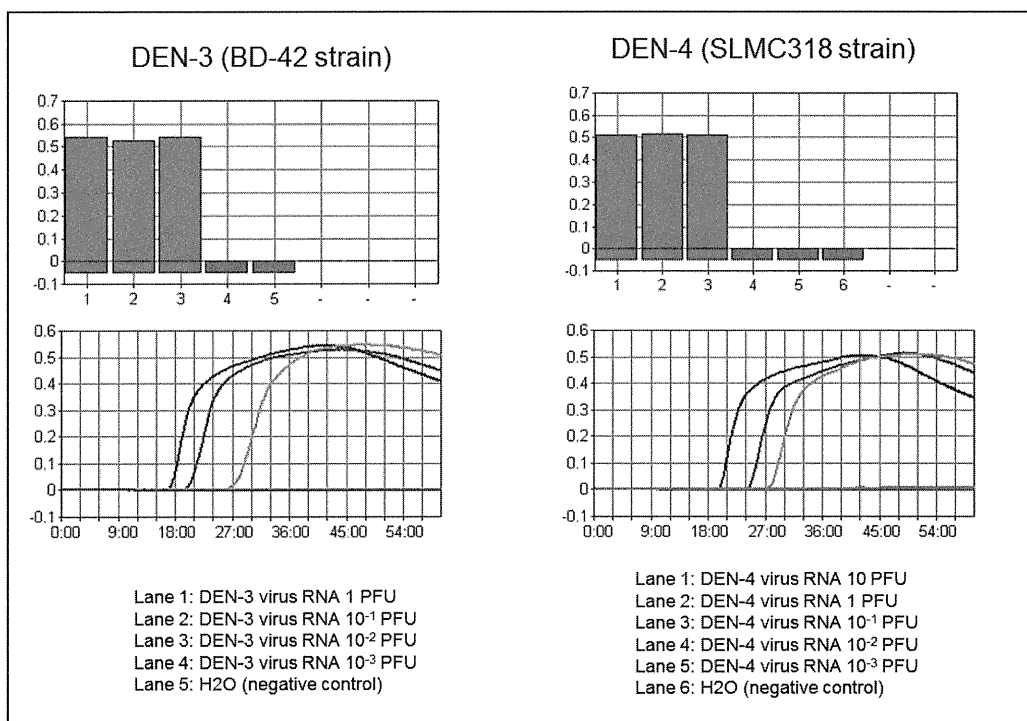
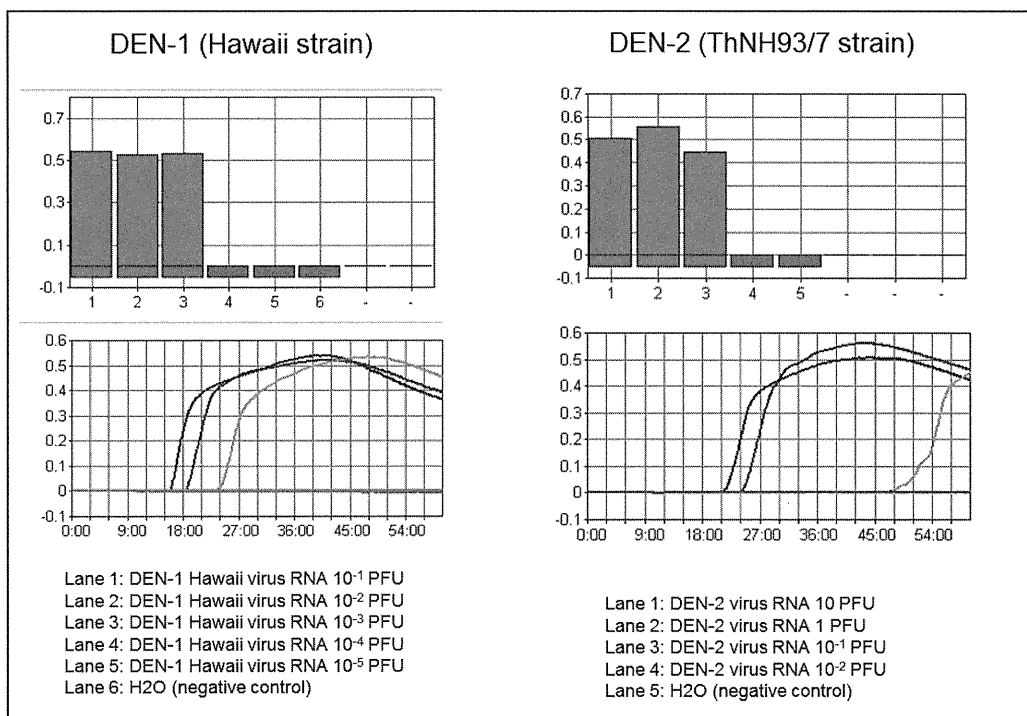
(表 3) Consensus RT-LAMP 法と Conventional RT-PCR 法によるデングウイルス遺伝子検出の感度比較

Serotype	Strain	Sensitivity by	
		RT-LAMP (PFU)	RT-PCR (PFU)
Dengue 1	Hawaii	0.001	0.01
	99st-12A	0.01	1
Dengue 2	00St-22(A)	0.1	0.1
	ThNH-7/93	0.1	0.1
	16681	10	10
Dengue 3	SLMC50	10	1
	BDH02-01	1	1
	BDH02-02	0.01	1
	BDH02-03	0.001	0.01
	BDH02-04	1	1
	BDH02-05	0.1	1
	BDH02-06	0.001	0.01
	BDH02-07	1	0.1
	BDH02-08	0.1	0.1
	Dengue 4	SLMC318	0.01
No.17		10	1

(表 4) 2006 年～2009 年にバングラデシュで採取されたデング感染疑い患者血清を用いた Consensus RT-LAMP 法によるデングウイルスの検出

Year	No of sample	No. (%) of DENV positive sample	No. (%) of isolated DENV by serotype			
			DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
2009	42	5 (11.9)	1 (2.4)	3 (7.1)	1 (2.4)	0 (0)
2008	88	6 (6.8)	0 (0)	3 (3.4)	3 (3.4)	0 (0)
2007	21	3 (14.3)	0 (0)	1 (4.8)	2 (9.5)	0 (0)
2006	126	11 (8.7)	0 (0)	2 (1.6)	9 (7.1)	0 (0)

(図1) DC-RT-LAMPによるデングウイルス遺伝子の検出 (デング1~4型)



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）  
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」  
(H23-新興一般-010)  
分担研究報告書

簡便 RT-LAMP 法を用いた媒介蚊からのウイルスゲノム検出

分担研究者	江下優樹	大分大学医学部感染予防医学講座 准教授
研究協力者	Lucky R. Runtuwene	大分大学医学部感染予防医学講座 大学院博士課程 1 年
	Raweewan Srisawat	タイ国、マヒドン大学熱帯医学部医昆虫学講座 科学者
	Narumon Komalamisra	タイ国、マヒドン大学熱帯医学部医昆虫学講座 准教授
	Bouasy Hongvanthong	ラオス共和国マラリア・寄生虫・昆虫センター センター長
	Arthur E. Mongan	インドネシア共和国マナド州サムラトランギ大学医学部 准教授
	今田美穂子	慶応大学医学部熱帯寄生虫学講座 助教
	森田公一	長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野 教授
	杉本千尋	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 国際協力・教育部門 教授
	高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス 1 部 室長
	倉根一郎	国立感染症研究所 副所長

研究要旨

感染蚊からウイルスゲノムをRT-LAMP法で検出する条件を実験室内および感染症流行地で検討した結果は昨年報告した。今回は、RT-LAMP法の簡便化を図るために、(1)蚊からRNAを精製することなく増幅産物を得る方法、(2)UVライトによる目視検査での擬陽性の低減方法について検討した。その結果、(1)では、RT-LAMPの反応時間を所定の時間より短くすることにより、目視検査で陰性と陽性を区別することができた。また(2)では、長波長のUVライトを用いることにより、目視検査による陰性と陽性をより明確に区別できた。なお、反応時間が長くなると、陰性コントロールが擬陽性を示すことがあるので、試験サンプルの判定の際は、陽性・陰性コントロールとの発色比較が必要であることがわかった。今回の結果から、RNAの精製過程を省略しても目的の増幅産物が得られること、さらに携帯型の長波長UVライトを使用することによって、設備の整っていない流行地においても、より簡便な前処理で迅速なRT-LAMP法が実施可能と思われる。

A. 研究目的

デング熱流行地でデングウイルスに感染した媒介蚊の動態を把握して早期に駆除することは、患者発生を未然に防ぐ方策にもつながる。この目的のためには、採集した蚊からのウイルスゲノム検出を迅速に行う必要がある。RT-PCR 法より迅速な診断を求めた際に近年開発された RT-LAMP 法の検討が必要となり、既に媒介蚊への RT-LAMP 法の応用は昨年確立している。しかしながら、本

方法を更に簡便化する方法を検討して、感染流行地により適した方法を確立することを目的とした。そのために、RNA 精製過程の省略、および蛍光目視での陽性判定を携帯型ブラックライトで可能かどうかの 2 点について調べた。

B. 研究方法

1. 材料および方法

供試蚊： 久留米産と大阪産のヒトスジシマカ *Aedes albopictus*、およびタイ国産ネッタイシマ

カ *Aedes aegypti* 雌成虫を使用した。

蚊乳剤の作製： 2%MEM を希釈液として、蚊 1 個体を乳剤にした。その後、低速遠心した上澄み液を原液として試験に用いた。

供試ウイルス： 国立感染症研究所より分与されたチクングニアウイルスを用いた。

試験方法： 蚊の乳剤原液にウイルス液を所定量加えた後、10 倍希釈系列を準備して蚊乳剤とウイルスの混合液を準備した。

RT-LAMP 法： 栄研科学（株）の RNA 増幅試薬キット（RT-LAMP）のプロトコールに従ってウイルス混合の蚊乳剤を含む反応液に、蛍光・目視検出試薬を加えて、63°C で 45 分間反応させた。

RT-PCR 法： Invitrogen 社の One-step RT-PCR 試薬を用いて所定の方法に準じて反応を行った。

（倫理面への配慮）

なし

## C. 研究結果

### 1. RT-LAMP 法による蚊乳剤中のウイルスゲノム検出

反応液中に、 $1.5 \times 10^4$  PFU $\sim$  $1.5 \times 10^0$  PFU のウイルス力価を含む蚊乳剤のいずれにおいても、RT-LAMP 法の目視で蛍光を観察した。また、チクングニアウイルスを含む陽性コントロールでも同様な蛍光を観察した。しかし、陰性コントロールでは蛍光が認められなかった。これらの反応液を、アガロース電気泳動で確かめたところ、目視検査で蛍光が認められた反応液の全てに特異的なラダー状のバンドが観察された（図 1）。しかし、陰性コントロールでは特異的なバンドは認められなかった。

### 2. RT-PCR 法による蚊乳剤中のウイルスゲノム検出

反応液中に、 $1.5 \times 10^4$  PFU $\sim$  $1.5 \times 10^0$  PFU のウイルス量を含む蚊乳剤のいずれにおいて、RT-PCR 産物の有無を調べるためにアガロース電

気泳動を行った。その結果、蚊乳剤の濃度が高い反応液では、PCR 産物の増幅は認められなかった（図 1）。この傾向は、2 種類のヒトスジシマカ間、ヒトスジシマカとネッタシマカ間でも同様に観察された。蚊乳剤の濃度が薄くなると、ウイルス量も少なくなったが、蚊乳剤とウイルス液の濃度がより希釈された反応液中では特異的な増幅が RT-PCR で認められた。ちなみに、陽性コントロールの反応液に加えたウイルス量は最も濃度の高い  $1.5 \times 10^4$  PFU である。

## D. 考察

蚊から総 RNA を精製しないで、蚊乳剤を RT-PCR 反応液に加えた場合、阻害効果があることが既に知られている。今回の試験でも同様な結果が得られた。しかし、RT-LAMP 法では、RT-PCR で得られたような阻害は認められることなく、目的の増幅産物を得ることができた。

従来の RT-PCR では耐熱性の Taq DNA polymerase が酵素として反応に使われている。それに対して、RT-LAMP では *Bst* DNA Polymerase が使われている。*Bst* DNA Polymerase の特性としては、耐熱性及び鎖置換型 DNA ポリメラーゼ活性を有し、鋳型となる二本鎖 DNA の水素結合を自ら解離しつつ、新しい DNA 鎖を合成する酵素である。鎖置換型 DNA ポリメラーゼであることから、二本鎖 DNA の解離を必要としないため、60 から 65°C の一定温度での DNA 合成が可能で、また DNA の二次構造による合成阻害を受けない。本酵素の特性により特異的な増幅反応が蚊乳剤でも生じたと考えられる。

蚊乳剤を用いた RT-LAMP 法では、目視検査が同様にを行うことが可能であった。このことは、RT-PCR のように電気泳動による結果を待つことなく判定する事ができる利点がある。

今回の結果から、蚊乳剤の精製を省略することが出来ることから、感染症流行地での簡便検査が可能となった。



## E. 結論

(1) 供試蚊のホモジネートの上澄み液に所定量のチクングニアウイルス液を加えた後、2万倍に希釈したものを試験材料として、RT-LAMP法を実施した。その結果、蚊乳剤からRNAを精製しなくてもRT-LAMP法で目的の増幅産物を得ることが出来た。

(2) (1)と同じ蚊ホモジネートを用いて、RT-PCRを行ったところ、2万倍希釈では特異増幅は認められなかった。しかし、さらに希釈すると特異増幅が認められた。このことから、蚊ホモジネート中には、RT-PCRでの増幅を阻害する物質があることがうかがえた。

(3) RT-LAMPの増幅は、蛍光・目視検出試薬で観察したところ、陽性サンプルの蛍光は63℃の反応時間30～45分頃がピークとなった。その後も反応を継続すると、陰性コントロールの反応チューブでも自家蛍光を示した。

(4) 蛍光・目視検出試薬を反応液に加えた際は、長波長のブラックライトが有効であったことから、携帯用の市販品を見つけることが出来たので、フィールド調査には有効であろう。アガロース電気泳動で増幅産物の確認をして、RT-LAMPに特異的なラダーバンドを得た。

(4) 感染症の流行地でRT-LAMP法を行う場合は、反応試薬中に、蚊ホモジネート、蛍光・目視検出試薬などを加えて、30～45分後に携帯型の長波長ブラックライトを用いて陽性の有無を調べる事が可能となった。採集した蚊乳剤の準備からウイルスゲノムの検査の所要時間は30～45分となり、より早い時期に確定可能となった。今後、蚊体内からのウイルスゲノム検出のための迅速な方法として応用可能であると考えられた。

## F. 健康危険管理情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Yuki Eshita, Junko Higashihara, Masayasu Onishi, Masaaki Mizuno, Jun Yoshida, Tomohiko Takasaki, Hidekatsu Yoshioka, Naoji Kubota and Yasuhiko Onishi (2011): Mechanism of the introduction of exogenous genes into cultured cells using DEAE-Dextran-MMA graft copolymer as a non-viral gene carrier. II. Its thixotropy property. J. Nanomed. Nanotech. 2:105. doi:10.4172/2157-7439.1000105.

(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 (2011): Prevalence of Phasi Charoen virus in female mosquitoes. Journal of Parasitology and Vector Biology, 3(1): 19-21.

(3) Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Theerawit Phanphoowong, Tomohiko Takasaki, Lucky Ronald Runtuwene, Ichiro Kurane, Hironari Narita, Yuki Eshita (2011): Present status of the insecticide susceptibility of *Aedes* mosquitoes in Thailand. Journal of Japanese Red Cross Toyota College of Nursing, 6(1): 31-37.

(4) Juan Sun, Xiaohui Ouyang, Yuki Eshita, Yan Wu, Erping Qin, Heping Ma, Zhifang Liu, Hailin Wang, Teer Ba, Shuwei Yang and Jiang Bian (2011): The role of the food additives in regulation of vacuolation induced by VacA in AGS cells. Journal of Alternative Medicine Research, 3(1):115-124.

(5) Kasem Somthana, Yuki Eshita, Ratchanok Kumsisri, Paron Dekumyoy, Jitra Waikagul, Thareerat Kalambaheti and Yaowapa Maneerat (2011): Roles of partially purified antigens

from *Gnathostoma spinigerum* larvae on antibody production by human B cell culture, 42(4): 772-781.

## 2. 学会発表

(1) 鳥羽聡史、甲斐直子、阿南栄一朗、岡 宏亮、横山 敦、大谷哲史、石井 寛、岸 建志、白井 亮、時松一成、平松和史、山田健太郎、アハメド・カムルディン、江下優樹、西園 晃、門田淳一 (2011) : 当科で経験したデング熱の一症例。大分感染症研究会 第48回例会。2011年3月24日。大分東洋ホテル, 大分市。大分感染症研究会 第48回例会プログラム。

(2) Lucky R. Runtuwene, Atsushi Yamanaka, Eiji Konishi, Yoshihiro Makino, Yutaka Suzuki, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2011) : Novel method using mice to infect *Aedes aegypti* with dengue virus type 2. 第63回日本衛生動物学会大会、2011年4月14日(木)・16(土)、国立感染症研究所、一橋記念講堂 東京都。Med. Entomol. Zool., 62 (大会特集号):74, 2011.

(3) 江下優樹, Lucky R. Runtuwene, 高崎智彦, Raweevan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Bouasy Hongvanthong, Boualy Kheokhampavanh, Bounpone Sidavong, Kham Thong, Silivanh Chanthavong, Khambang Silavong, Kalounna Keokenechanh, Hongkham Keomanila, 牧野芳大, 成田弘成, 牛島廣治, Arthur E. Mongan, 前田龍一郎, 森田公一, 杉本千尋, 倉根一郎 (2011) : RT-LAMP 法を用いた蚊からのデングウイルスゲノムの迅速検出。第63回日本衛生動物学会大会、2011年4月14日(木)・16(土)、国立感染症研究所、一橋記念講堂 東京都。Med. Entomol. Zool., 62(大会特集号):75, 2011.

(4) 青木千春、瀬戸陽子、大塚 靖、福田昌子、江下優樹、高岡宏行 (2011) : 大分大学医

学部感染予防医学講座で経験した東洋眼虫のヒト寄生症例について。第64回日本寄生虫学会南日本支部大会・第61回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2011年11月3日(土)・4(日)、宮崎県宮崎市 宮崎市民プラザ。第64回日本寄生虫学会・第61回日本衛生動物学会南日本支部合同大会プログラム講演要旨:17, 2011. Med. Entomol. Zool., 63(2), 2012.

(5) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2011) : Whole transcriptome analysis of *Aedes aegypti* 14 days post-dengue infection using RNA-seq. 第64回日本寄生虫学会南日本支部大会・第61回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2011年11月3日(土)・4(日)、宮崎県宮崎市 宮崎市民プラザ。第64回日本寄生虫学会・第61回日本衛生動物学会南日本支部合同大会プログラム講演要旨:22, 2011. Med. Entomol. Zool., 63(2), 2012.

(6) 江下優樹, ルッキー R. ルントウエネ, 川島秀一, 鈴木 穰, 菅野純夫, 中井謙太, 前田龍一, 杉本千尋, 高崎智彦, 倉根一郎 (2011) : デングウイルス感染蚊の網羅的トランスクリプトーム解析。第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京都新宿区、国立感染症研究所 共用第一会議室、第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会・プログラムプログラム講演要旨:5, 2011.

## 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

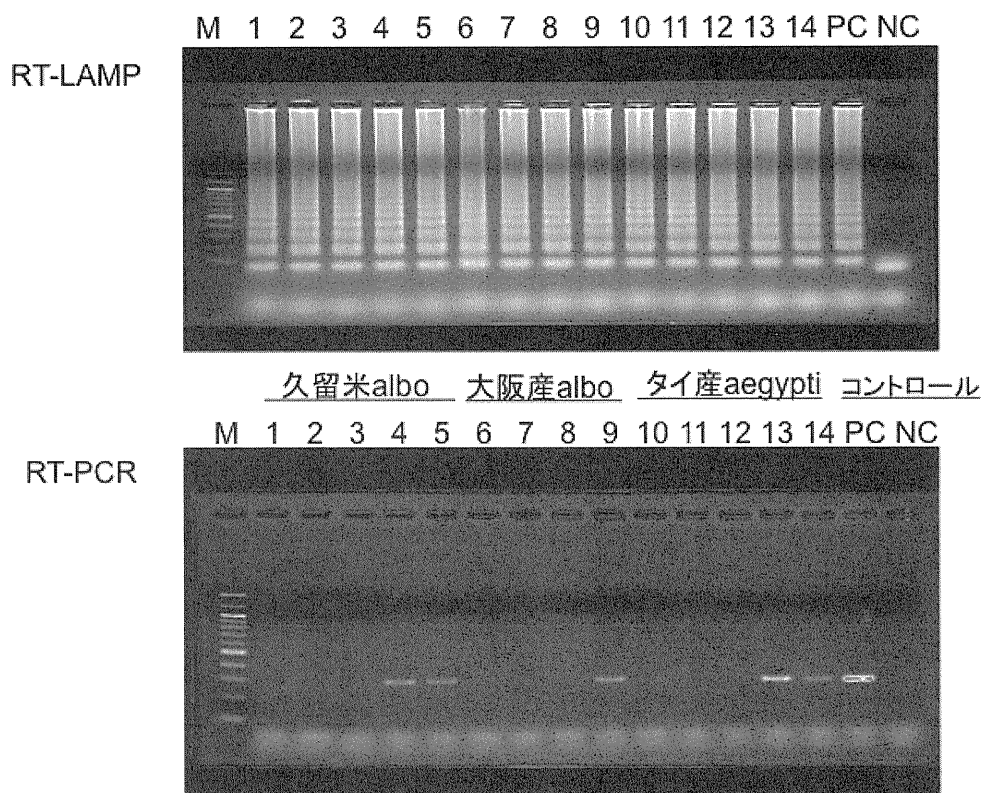


図1. 蚊乳剤を鑄型にして、RT-LAMPおよびRT-PCRでのチクングニアウイルスゲノム検出。  
 (PC: 陽性コントロール、NC: 陰性コントロール、レーン1,6,10:  $1.5 \times 10^4$ PFU/Rx ~レーン5,14:  $1.5 \times 10^0$ PFU/Rx)

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）

「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する  
総合的対策の確立に関する研究」（H23－新興－一般－010）

### 分担研究報告書

#### 抗体依存性感染増強(ADE)現象を応用した高効率 デングウイルス分離法に関する研究

研究分担者 高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部室長）

研究協力者 モイメンリン、林昌宏、田島茂

（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

#### 研究要旨

フラビウイルス特にデングウイルスの分離率を高めるために、これまでに確立したデングウイルス血清学的検査法(抗体依存性感染増強 (ADE) アッセイ法)を応用することでより効率の良いウイルス分離に使用可能であることを、デング熱患者血清を用いて明らかにした。抗体依存性感染増強活性を有する単クローン抗体(mAb4G2)の存在下で、Fc $\gamma$ RIIA 発現 BHK-21 細胞を用いて患者血清からウイルス分離を実施した。感染した Fc $\gamma$ RIIA 発現 BHK-21 細胞上清を回収し、RT-PCR を用いて測定した力価を非 Fc $\gamma$ RIIA 発現細胞 (BHK 細胞、C6/36 細胞) と比較した。患者血清をウイルス分離に用いて、感染増強抗体存在下の Fc $\gamma$ RIIA 発現 BHK-21 細胞上清のウイルス力価は他の細胞より高力価であった。50 検体中 16 検体では、他の非 Fc $\gamma$ RIIA 発現細胞より分離されなかった。しかし、その 16 検体中 7 検体(44%)が ADE アッセイにて分離された。以上の結果より、感染増強抗体の存在下での Fc $\gamma$ RIIA 発現 BHK-21 細胞は、他の細胞と比較し高率にデングウイルスを分離でき、ウイルス分離検査に有用なツールであることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

デング熱・出血熱は、東南アジア、南アジア、中南米を中心として熱帯・亜熱帯地域の広域に拡大しており、年間約 1 億人がデング熱を発症し、25 万人が致死性の高いデング出血熱を発症すると推定されている。デングウイルスワクチンおよび治療開発のための基盤となるウイルス性状解析、ワクチン・治療効果の評価をするためには、感染性を有する

ウイルスの使用が不可欠である。また、分離ウイルスの病原性の解析は、サーベイランスの上でも貴重な情報をもたらすこともある。デングウイルス感染症の実験室診断法としては、病原体診断法(RT-PCR 法、ウイルス分離など)と血清学的な診断法がある。遺伝子検査法(RT-PCR)、抗体診断法および抗原診断法は、ウイルス分離法より利便性が高いとともに短時間で検査が終了する。一方、ウイルス分離

法は、もっとも信頼性が高くウイルス性状・病原性などの解析が可能となることがメリットである。しかし、ウイルス分離法では、①検出率（分離率）が低い ②数日間の培養が必要であることが欠点である。我々は、致死性の高いデング出血熱の発症機序の一要因とされている ADE 現象を *in vitro* において把握できる Fc $\gamma$ RIIA 発現 BHK-21 細胞を用いた ADE アッセイを確立した。ADE 現象は、ウイルスが感染増強抗体の存在下で効率よく Fc $\gamma$ R 発現細胞に感染し、増殖する現象である。本研究では、この ADE 現象に着目し、これまでに確立した ADE アッセイ法がデングウイルス分離に応用できるかを検討した。

## B. 研究方法

**ウイルスと細胞培養：**デングウイルス増殖試験においては DENV-1(NIID01-44 株), DENV-2(TLC30 株), DENV-3 (CH53649 株), DENV-4(TVP360 株)を用いた。患者血中のウイルス分離には、ヒト Fc $\gamma$  受容体(Fc $\gamma$ RIIA)発現 BHK-21 細胞、BHK-21 細胞およびヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞を用いた。

**ウイルス増殖試験：**デングウイルスの増殖試験は Fc $\gamma$ RIIA 発現 BHK-21 細胞、BHK-21 および C6/36 細胞を用いた。デングウイルス 10 倍階段希釈(100PFU/dose-0.1PFU/dose)を行った。次に、ADE 活性を有する単クローン抗体である 4G2 抗体(1.5mg/ml)を 10 倍希釈後、1:10<sup>2</sup>-1:10<sup>5</sup> 倍階段希釈を行った。希釈した抗体とウイルスを混合後、37°C、1 時間吸着反応を行った。各ウイルス-反応液を Fc $\gamma$ RIIA 発現 BHK-21 細胞および Fc $\gamma$ RIIA 非発現 BHK-21 ならびに C6/36 細胞に接種し、37°C (28°C/C6/36)、1 時間吸着後、0.5ml 培養液

(10%FBS, MEM)を加え、37°C (28°C/C6/36)で 5 日間培養した。ウイルス増殖は RT-PCR 法にて定量した。

**ウイルス分離：**急性期のデング熱患者血清 50 検体からウイルス分離を実施し、培養上清中のウイルス量をリアルタイム RT-PCR により定量した。血清を 10 倍希釈後(45 $\mu$ l)、5 $\mu$ l の 100 倍希釈した抗体および同量の培地と混合後、37°C、1 時間反応を行った。各ウイルス-反応液を Fc $\gamma$ RIIA 発現 BHK-21 細胞および Fc $\gamma$ RIIA 非発現 BHK-21 に接種し、37°C、1 時間吸着後、0.5ml 培地(10%FCS, MEM)を加え、37°C で 5 日間培養した。

次に、10 $\mu$ l, 2 $\mu$ l および 0.3 $\mu$ l 患者血清を C6/36 細胞に接種し、1ml 培地(2%FCS, MEM, NEAA)を加え、28°C で 5 日間培養した。細胞上清にあるウイルス遺伝子は RT-PCR 法にて定量した。

## C. 研究結果

感染増強活性を有する mAb4G2 は、1:10<sup>1</sup>-1:10<sup>5</sup> のいずれの 10 倍階段希釈においてもウイルスの増殖を増強させた。ウイルス増殖は、抗体の希釈率が 1:10<sup>3</sup> 倍の条件下でウイルス力価(DENV1-4)がもっとも高いことから、検体を用いたウイルス分離実験においてはこの条件下で行った。

次に、デング熱患者から選択した 50 検体を用いて Fc $\gamma$ RIIA 発現 BHK-21 細胞、BHK-21 および C6/36 細胞にて細胞間におけるデングウイルス分離の効率を検討した。34 検体においてはいずれの方法を用いてもウイルスが分離された。16 検体においてはウイルスが感染増強抗体の非存在下および非 Fc $\gamma$ RIIA 発現 BHK-21 細胞、C6/36 細胞にて分離されなかつ

た。その 16 検体中 7 検体においては、Fc<sup>3</sup>RIIA 発現 BHK-21 細胞を用いた ADE アッセイにてウイルスが分離された。

#### D. 考察

Fc<sup>3</sup>RIIA 発現 BHK-21 細胞を用いて、感染増強現象を応用しうる新規ウイルス分離法を確立した。この診断法を用いてデング熱患者血清からウイルス分離を検討した。その結果、ウイルスは、感染増強抗体の非存在下と比較し、感染増強抗体および Fc<sup>3</sup>R の存在下でウイルス力価が 10-1000 倍高いことが認められた。また、非 Fc<sup>3</sup>RIIA 発現 BHK-21 細胞および C6/36 細胞を用いてウイルス分離がされなかった 16 患者検体のうち、7 検体が Fc<sup>3</sup>RIIA 発現 BHK-21 を用いた ADE アッセイにて分離された。興味深いことに、再感染患者 2 例は感染増強抗体の非存在下で、Fc<sup>3</sup>R 発現細胞にてウイルスが分離された。再感染患者の血清に存在する感染増強活性を有する抗体が感染を増強させた可能性が考えられる。今後、再感染の患者血清においては更なる検討が必要である。

#### E. 結論

デング熱患者血清を用いて、これまでに確立した ADE アッセイを用いたウイルス分離法の有用性を検討した。現在広く用いられている非 Fc<sup>3</sup>RIIA 発現細胞(Vero 細胞, BHK 細胞, C6/36 細胞)によるウイルス分離法よりウイルス分離効率が高い場合があることから、他の方法によるウイルス分離が不可能な場合においては有用である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I.: Detection of higher levels of dengue viremia using Fc<sup>3</sup>R-expressing BHK-21 cells than Fc<sup>3</sup>R negative cells in secondary infection but not in primary infection. *Journal of Infectious Diseases*, 203(10):1405-14 (2011)
2. Moi ML, Lim CK, Tajima S, Kotaki A, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. : Dengue virus isolation relying on antibody-dependent enhancement mechanism using Fc<sup>3</sup>R-expressing BHK cells and a monoclonal antibody with infection-enhancing capacity. *Journal of Clinical Virology* 52(3):225-30 (2011).
3. Ujiie M, Moi ML, Takeda N. Dengue maculopathy in a traveler. *Am J Trop Med Hyg*. 85(6):965-6 (2011)
4. Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I. Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viremia and demonstration of protective immunity. *J Gen Virol*. 92:2272-80 (2011)
5. T. Tomohiko, A. Kotaki, S. Tajima, T. Omatsu, F. Harada, C.K. Lim, M.L. Moi, M. Ito, M. Ikeda, I. Kurane. Demographic virological features of imported dengue fever/dengue hemorrhagic fever cases in Japan from 2006 to 2009. *Dengue Bulletin*, in press.

6. M.L. Moi, C.K. Lim, K.B. Chua, T. Takasaki, I. Kurane. Dengue virus infection- enhancing activity in serum samples with neutralizing activity as determined by using Fc<sup>3</sup>R-expressing cells. PLoS Neglected Tropical Diseases, 6(2):e1536. 2012

US-Japan Cooperative Medical Science Program, California, USA, 2011年6月

2) 国内学会  
なし

5. モイメンリン, 高崎智彦, 岩越一, 坂本光男, 小林謙一郎, 氏家無限. アフリカからのデング熱輸入症例. Infectious Agents Surveillance Report, 32 (6), 164 – 165 (2011)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし

6. モイメンリン. クロアチアにおけるデング熱の流行. Infectious Agents Surveillance Report, 32 (6), 165 – 167. (2011)

2. 実用新案登録  
なし

7. モイメンリン, 高崎智彦. デング熱・デング出血熱. 小児感染症学. 508 – 511 (2011)

3. その他  
なし

2. 学会発表

1) 国際学会

1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using Fc<sup>3</sup>R-expressing BHK-21 cells than Fc<sup>3</sup>R negative cells in serum samples from patients with secondary infection but not in those with primary infection. IV International Congress on Virology, Sapporo, Japan, 2011年9月

2. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection: revisit of antibody response and viremia in dengue patients using Fc<sup>3</sup>R-expressing BHK cells. 45<sup>th</sup> Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases,

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）  
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する  
総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究報告書

コモンマーモセットを用いた節足動物媒介性ウイルス感染モデル系および解析系の確立

分担研究者	鈴木 隆二	国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 室長
研究協力者	伊藤 恒敏	東北大学医学系大学院発生生物学
	松谷 隆治	和歌山県立医科大学免疫学
	鈴木 さつき	日本歯科大学生命歯学部
	藤井 克樹	国立感染症研究所ウイルス第一部
	北浦 一孝	国立感染症研究所ウイルス第一部
	白井 颯治	国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨： 近隣諸国で流行が認められているデングウイルス、チクングニアウイルスがヒトに感染すると、急性熱性疾患、出血熱、関節炎などの疾病を伴い、本邦においても地球環境の変化によりその感染拡大が懸念されている。しかしながらマウスにおいてデングウイルス、チクングニアウイルスの感染が成立しないため、ヒトで認められるような発症モデルを作成、解析することが困難であり、よりヒトに近い動物を用いた系の作成が急務である。したがって本研究では、新世界猿に属する小型の霊長類であるコモンマーモセットを用いた感染モデル系を確立し、感染時の病態を評価するための免疫学的解析における基盤整備を目的とした。

#### A. 研究目的

デングウイルス（DEV）は、蚊の吸血によりヒトへ感染し、発熱のみならず致死的な出血熱などの疾病を起こすことがある。本邦では過去に東南アジアから侵入した DEV が、ヒトスジシマカによって媒介され、西日本を中心に多数の感染者を発生させた経緯があるため、再興感染症として監視が必要である。またチクングニアウイルス（CHIKV）は、発熱、筋肉痛、関節痛を主症状とする急性の発疹性熱性疾患である。DEV と同様にヤブカ属の媒介によりヒトへの感染が成立し、アフリカと東南アジアで流行しており、地球温暖化に伴って感染症媒介昆虫の生息域が拡大することで、本邦侵入に伴う感染症の流行が懸念される。しかしながら、DEV、CHIKV 共にマウスにおいて感染が成立しない。したがって発症メカニズムやワクチン開発に必要な情報が不足しているため、霊長類をベースとした発症モデルの作成、病態解明等の基礎的研究は急務である。

コモンマーモセットは新世界猿に属する小型の霊長類であり、非ヒト霊長類モデルとして生理学、神経学等の研究で利用されている。他

の霊長類モデル動物と比べて小型で多産であることから、本動物において感染モデル系を確立することは有用である。そして感染時の病態を評価するために、免疫学的解析の基盤整備も平行して進めなければならない。しかし現時点において、本動物における免疫学的情報は限定されている。ウイルス感染時の病態を解明するためには、抗体産生の有無だけでなく、病理組織学的評価、経時的な炎症性サイトカインの変化、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）および T 細胞を中心とした細胞性免疫の挙動を評価することは重要である。したがって本研究では、多数の研究協力者および研究施設と連携（図 1）し、コモンマーモセットを用いた節足動物媒介性ウイルス感染モデル系および解析系の確立を目的とした。

#### B. 研究方法

(1) コモンマーモセットにおける免疫解析ツールの確立(国立病院機構相模原病院臨床研究センター、和歌山県立医科大学)：感染実験によって得られたサンプルにおける免疫学的評価を実施するための基盤整備を行う。具体的に



は、Real-time PCR によるサイトカイン等の発現解析系、コモンマーモセット MHC 解析系、コモンマーモセット TCR レパトア解析系、個体識別系の確立から構成される。T 細胞における特異的抗原認識は、T 細胞受容体 (TCR) と病原性ウイルス由来ペプチドを提示した抗原提示細胞上の MHC 分子との相互作用により開始される (図 2 左)。マーモセットはマウスのような近交系が確立した動物とは異なるため、MHC 分子における遺伝子アレルを正確に同定することで、個体間におけるウイルス感受性の差異について考慮することが可能となる。したがって図 2 右に示すような手順により MHC および TCR の解析を進める。これら解析系の確立は、感染実験に先立って健常コモンマーモセットより採取された血液および臓器を使用する。

(2) コモンマーモセットにおける標準臓器・組織アトラスの作成 (東北大学・日本歯科大学) : コモンマーモセットにおける病理学的評価を実施するためには、正常組織における基礎的情報が必要になる。したがって標準臓器・組織アトラス作成のため、感染実験に先立って健常コモンマーモセットより組織を採取し、組織標本を作製する。

(3) DEV、CHIKV 感染モデル系の確立 (国立感染症研究所) : コモンマーモセットにおける DEV および CHIKV の感染実験を実施し、感染モデル系として最適な条件等を確立する。感染成立の有無については、抗体産生、体温、血液生化学的評価、炎症性サイトカインの評価等を上述した解析系を交えながら総合的に判断する。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所および各関連施設における実験動物委員会のガイドラインにしたがって実施した。

### C. 研究結果

(1) Real-time PCR によるサイトカイン等の発現解析系 : ウイルス感染に伴う炎症性サイトカインの変化を検出するため、免疫関連の細胞表面抗原および炎症性サイトカイン、それらの数値を補正するためのハウスピーキング遺伝子に対する特異的プライマーを設計した (図 3)。うち 4 つの遺伝子 (CD14、IL-1a、IL-1b、IL-12b) は本実験によって同定したものである。

(2) MHC 解析系の確立 : 現在 MHC におけ

る解析は、図 4 に示すように、30 頭のコモンマーモセットを用いて *Caja-G* 遺伝子の同定が進められている。これらの解析には膨大なゲノムデータのシークエンスおよび解析が必要になるため、次世代シークエンサーおよびそれに対応した専用のソフトウェアにより、コモンマーモセットにおける MHC プロタイプを決定し、最終的に感染実験に供するコモンマーモセットの選別に寄与するものとなる。

(3) TCR レパトア解析系の確立 : TCR レパトア解析を確立するために、まずコモンマーモセットにおける TCR 遺伝子を同定する必要があった。これまでに TCR における  $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖可変領域 (TRAV、TRBV) 遺伝子の同定が完了した。TCR  $\beta$  鎖遺伝子は過去に他のグループで報告された遺伝子群とオーバーラップした TCR ファミリーも含まれたが、Adaptor-Ligation mediated PCR (AL-PCR) によって増幅された TCR 遺伝子に対して 1000 クローンに及ぶシークエンス解析を実施した結果、最終的に 35 の新規 TRAV 遺伝子、21 の新規 TRBV 遺伝子を同定した。これによりコモンマーモセットでは、各 35 種類の TRAV および TRBV 遺伝子が発現することが確認された (図 5)。現在これらの情報を基に、TCR レパトア解析系を構築するため、既にヒトおよびマウスにおいて確立された TCRV レパトア解析法を参考にしながら、コモンマーモセット TCRV 遺伝子配列に検出用 DNA プロンプの選定を進めている。

(3) コモンマーモセットにおける標準臓器・組織アトラスの作成 : 採取された全身の臓器に対して、HE 染色および免疫学的染色手法を用いて、他の動物との差異について現在解析中である。

(4) DEV、CHIKV 感染モデル系の確立 : DEV および CHIKV をコモンマーモセットに感染させるため、最適なウイルス量や投与経路についての検討を実施している。予備実験の段階で、両ウイルス共に皮下接種において、ウイルス投与コモンマーモセットから抗体が検出されたことと合わせて、CHIKV では Real-time PCR において CD3、CD8、TNF  $\alpha$  の経時的な変化が脾臓において観察された (図 6)。

### D. 考察

本研究では、コモンマーモセットを用いて非ヒト霊長類ウイルス感染モデル系を作成する

ことにある。さらに感染モデル系を評価するための免疫学的解析系についても開発を進めている。これまでの研究により、免疫関連遺伝子に対する Real-time PCR 系の確立により、感染動物における抗体産生の有無以外に、T 細胞の挙動および炎症性サイトカインの増加についても解析が可能になった。CHIKV 感染コモンマーモセットにおける CD3、CD8、TNF $\alpha$  の経時的な変化は、これまでマウスでは不可能であったウイルス感染が、コモンマーモセットにおいて成立したことを示唆するものである。MHC および TCR レパトア解析系は開発中であるため、感染サンプルに対して評価を行える段階にないが、今後は投与量および頭数を揃えることで、感染が成立する個体における MHC ハプロタイプの解析、また局所における炎症部位で浸潤する T 細胞の抗原特異性を探るために TCR レパトア解析が役立つものと思われる。炎症像やリンパ球浸潤を特定するためにも、正常組織との比較による病理学的解析、免疫組織学的が必要になる。

#### E. 結論

本研究により、マウスでは感染が成立しないウイルスに対して、非ヒト霊長類感染モデル動物としてコモンマーモセットに注目した結果、Real-time PCR 系によって感染の成立が確認された。今後コモンマーモセットにおける免疫学的解析ツールを充実させることで、感染時の病態に対する情報が得られるものと思われる。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Matsutani T, Fujii Y, Kitaura K, Suzuki S, Tsuruta Y, Takasaki T, Ogasawara K, Nishimoto N, Kurane I, Suzuki R.: Increased positive selection pressure within the complementarity determining regions of the T-cell receptor  $\beta$  gene in New World monkeys.  
Am J Primatol. 2011 Oct;73(10):1082-92.

Fujii Y, Matsutani T, Kitaura K, Suzuki S, Itoh T, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I. : Comprehensive analysis and

characterization of the TCR alpha chain sequences in the common marmoset.

Immunogenetics. 2010 Jun;62(6):383-95.

##### 2. 学会発表

北浦一孝, 松谷隆治, 藤井克樹, 白井颯治, 鈴木さつき, 高崎智彦, 小笠原康悦, 西本憲弘, 倉根一郎, 鈴木隆二 : 新世界ザルにおける T 細胞受容体  $\beta$  鎖遺伝子の CDR3 領域における正の選択

第 40 回日本免疫学会学術集会 (東京) 2011 年 11 月 27-29 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

コモンマーマセットを用いた  
節足動物媒介性ウイルス感染モデル系および解析系の確立  
組織図

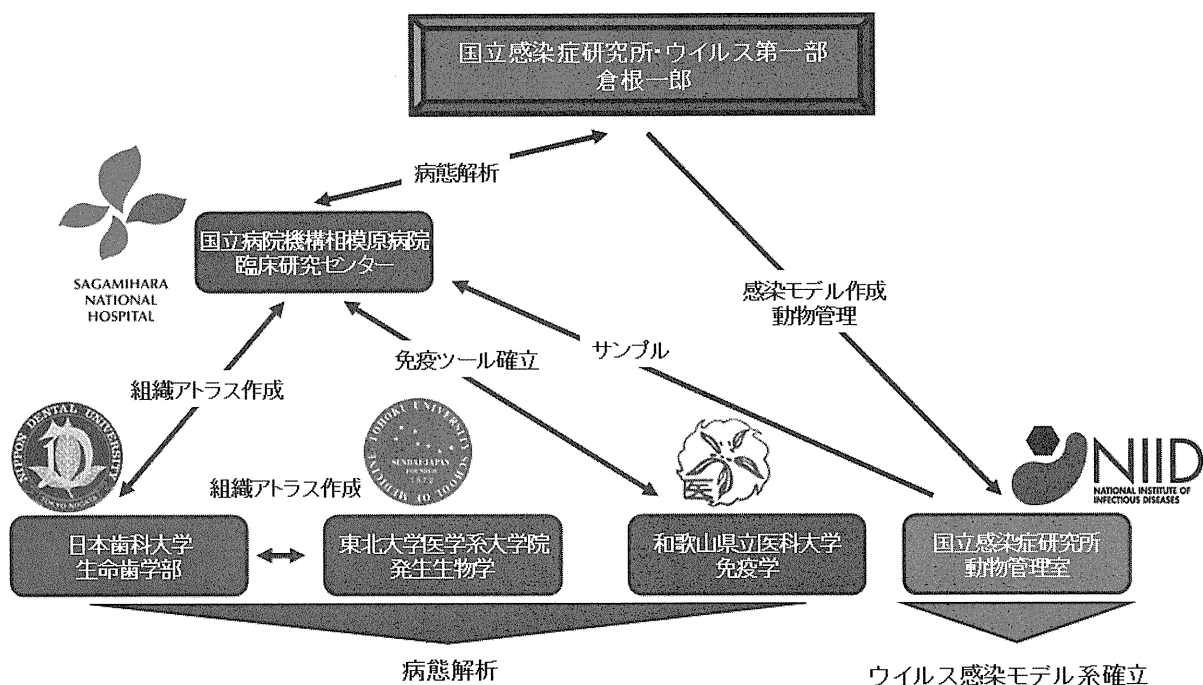


図 1. 本研究における組織図

Antigen recognition by TCR

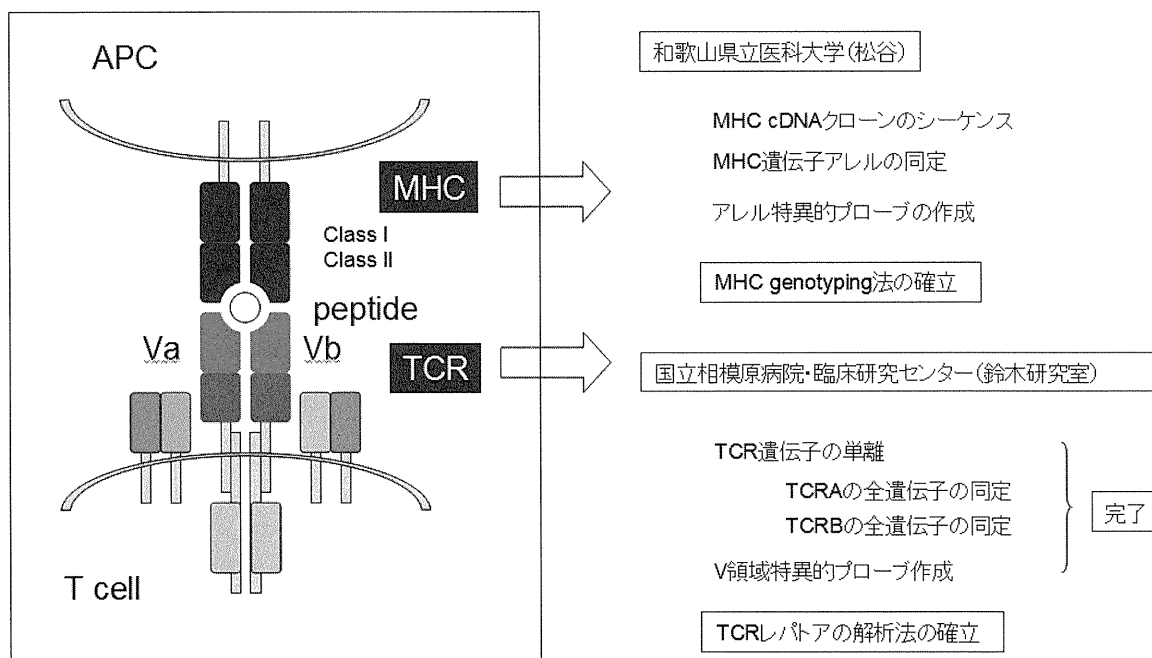


図 2. TCR における抗原認識機構およびマーマセットにおける TCR、MHC 解析手順

既にプライマーを設計し測定可能な遺伝子

Target	GenBank	備考	Target	GenBank	備考
GAPDH	DD279474		IL-1a	AB539803	新規登録
$\beta$ -actin	DD279463		IL-1b	AB539804	新規登録
HPRT	DD289567		IL-2	DQ826674	
CD3e	DQ189218		IL-4	EF493341	
CD4	AF452616		IL-5	DQ658152	
CD8a	DQ189217		IL-6	DQ658153	
CD14	AB539802	新規登録	IL-10	DQ658154	
CD20	DQ189220		IL-12b	AB539805	新規登録
CD25	DQ520834		IL-17a	EF534212	
CD28	EF534209		IL-17f	EF613223	
CD34	AB097501		INF- $\gamma$	FJ598593	
CD80	EF534214		TNF- $\alpha$	DQ520835	
CD86	EF534211				

\* 新規登録:我々が塩基配列を特定してGenBankへ登録したもの

図 3. コモンマーマセツト免疫関連遺伝子における検出可能遺伝子の一覧