

- on Viral Diseases, The Japan-US Cooperative Medical Science Program, Beppu, Oita, Japan (2012.06)
- 11) Tani, H., Iha, K., Fukushi, S., Taniguchi, S., Yoshikawa, T., Saijo, M., Morikawa S.: Characterization of pseudotype VSV possessing New and Old World arenavirus envelope proteins. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan (2012.09)
- 12) Yamamoto, K., Iha, K., Bruce, C., Stuart, D., Taniguchi, S., Fukushi, S., Tani, H., Yoshikawa, T., Ishii, Y., Kyuwa, S., Hewson, R., Saijo, M., Morikawa, S.: Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of viral hemorrhagic fevers caused by arenaviruses. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil (2012.09)
- 13) Tani, H., Iha, K., Fukushi, S., Taniguchi, S., Yoshikawa, T., Saijo, M., Morikawa, S.: Analysis of cell entry of New and Old World arenaviruses using pseudotyped viruses bearing their envelope proteins. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil (2012.09)
- 14) 谷英樹, 伊波興一朗, 谷口怜, 吉河智城, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂: シュードタイプ VSV を用いたルジョウウイルスの細胞侵入機構の解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪 (2012.11)
- 15) 谷口怜, 佐山勇輔, 永田典代, 飯塚愛恵, 谷英樹, 吉河智城, 福士秀悦, 西條政幸, 久和茂, 森川茂: レストンエボラウイルス自然感染カニクイザルにおける免疫応答の解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪 (2012.11)
- 16) 福士秀悦, 新倉綾, 谷英樹, 吉河智城, 伊波興一朗, 谷口怜, 緒方もも子, 西條政幸, 森川茂: 日本のマダニ類における新種のブニヤウイルス (SFTSV) 保有調査と SFTSV 血清学的診断法の開発. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪 (2012.11)
- G 知的財産権の出願・登録状況
現在出願予定はない。

表 1. ナイジェリア住民 271 人を用いた RVFV を用いた中和抗体測定法と RVFV-rNP-IgG-ELISA による抗体陽性・陰性の関係

		RVFV 中和抗体測定 法		計
		陽性	陰性	
RVFV-rNP-IgG-ELISA	陽性	31	8	39
	陰性	3	229	232
計		34	237	271

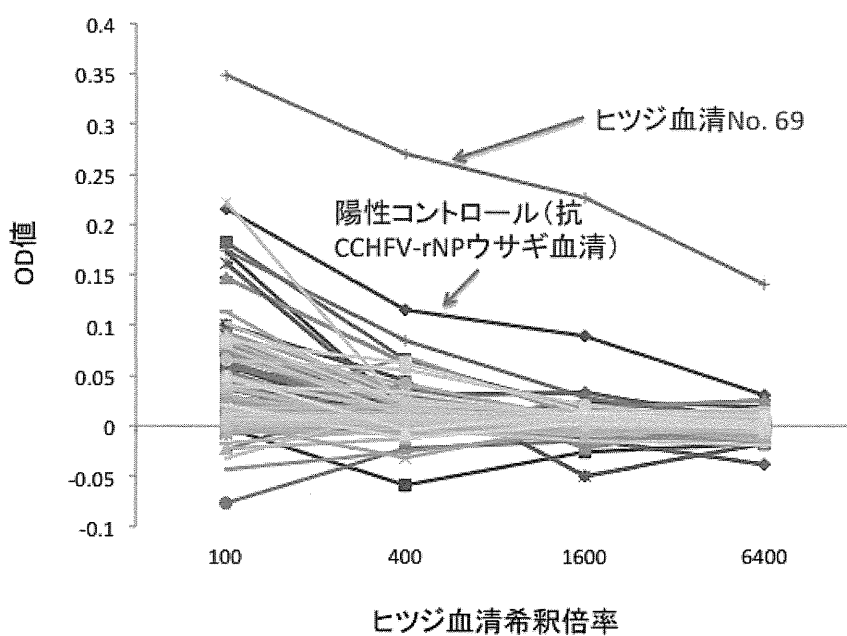


図 1. ヒツジ血清 121 検体の CCHFV-rNP を抗原とした IgG-ELISA における OD 値(100 倍希釈, 400 倍希釈, 1600 倍希釈, および, 6400 倍希釈).

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：国内で分離・同定できないウイルスを網羅的に検出するために、ウイルスの網羅的検出法（Rapid Determination system of Viral nucleic acid sequences; RDV 法）の改良をおこなった。改良 RDV 法を用いて、野生のコウモリから新規ヘルペスウイルスと、野生のイノシシから新規ラブドウイルスを検出し、動物実験系を確立した。また、ウイルス感染臓器からウイルスを網羅的に検出することを目的として、RDV 法とサブトラクション法を組み合わせた方法を開発した。

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 に近いという特徴をもつ。

さらに、本研究では、海外では検出されているが、現在日本で分離・同定されていないウイルス疾患についての検査法の確立をおこなうとともに、国内における感染状況を明らかにした。飼い猫や飼い鳥は伴侶動物としてヒトと密接に暮らしているので、新規ウイルスがヒトに感染する可能性を有するかにすることは重要である。本研究では、このような観点から、新規ウイルスとしてネコモルビリウイルスとトリボルナウイルスを選んで検出系を構築した。

また、フィリピンのコウモリにおいて新規ウイルスを検出するために次世代型シーケンサーを用いた網羅的解析（DNA ウイルス）や、コロナウイルスの特異的検出（RNA ウイルス）を実施した。

研究協力者：遠藤大二、萩原克郎（酪農学園大学獣医学部）、森川茂、西條政幸、酒井宏治（国立感染症研究所）、古谷哲也、大松勉、佐々悠木子（東京農工大学）、前

田健（山口大学農学部）、代田欣二、落合秀治（麻布大学獣医学部）、明石博臣、久和茂、堀本泰介（東京大学農学部）、渡辺俊平（九州大学医学部）、吉川泰弘（千葉科学大学）、鈴木和男（田辺市ふるさと自然観察センター）、舟場正幸（京都大学農学部）、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

国内で分離・同定できないウイルスの中には、既知のウイルスであっても国内で検出手法が確立されていない場合の他に、未知のウイルスであるために検出方法がない場合が想定される。後者の場合には、ウイルスゲノムの情報が無いのでPCRなどの迅速診断法を確立できない。近年、我々は未知のウイルスの迅速・簡便な検出方法として、Rapid Determination system of Viral nucleic acid sequences (RDV 法)を開発し、ヒトや動物、昆虫などから様々な新規・希少ウイルスを検出してきた。RDV 法は特殊な機器を必要とせず、アガロースゲル電気泳動やPCRをおこなえる研究室で実施可能である。RDV 法はウイルスの簡易精製と新しいダイレクトシーケンス法を特徴として、2 日間で新規ウイルスのゲノム塩基配列の一部が判明する。

これまで、RDV 法は主に培養上清などウイルス分離された検体を対象としていたので、細胞や臓器などような宿主の遺伝子が大量に混入している場合には解析不可能であった。しかし、血清を超遠心した後に

RDV 法に移行する手法や、培養細胞中で複製している RNA ウイルスのゲノムをアガロース電気泳動の過程で分取するなどの工夫をおこない、ウイルス分離の培養上清以外にも RDV 法で解析できる検体の対象を広げてきた。後者の方法 (RDV-SF) は比較的感受度良く検出できるが、対象が RNA ウイルスに限られるので、改良の余地を残している。

本研究では、細胞や臓器など、どのような検体であっても、RNA ウイルスだけでなく DNA ウイルスも検出できるように RDV 法を改良することを目的としている。古くから細胞間で特異的に発現する遺伝子を検出する場合には、サブトラクション法が使われてきた。しかし、この方法は最終産物をプラスミドにクローニングして大腸菌を形質転換しなければならない。カルタヘナ条約により、未知のウイルス遺伝子のクローニング実験は文部科学大臣の承認を得たうえでレベル3の実験室でおこなわなければならない。しかし、本研究班のように緊急性を要するウイルスにおいては、できるだけ早いウイルス遺伝子塩基配列の決定が望まれる。一方、RDV 法は新しいダイレクトシーケンス法を特徴としているので、上記のような組み換え DNA 申請の必要がない。そこで、本研究ではサブトラクション法と RDV 法を組み合わせることにより、迅速かつ網羅的なウイルス検出方法の確立を試みた。

近年、ヒトゲノム解読プロジェクトにともない、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。上記の unknown なリードには、細菌などウイルス以外の微生物で、ゲノムの遺伝子配列が決定されていないものも多く含まれていると考えられる。一方、RDV 法においても細菌の遺伝子は数多く検出されている。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。この細菌が流産の原因であったかは不明であるが、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、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。

モルビリウイルス属はパラミクソウイルス科に属し、イヌジステンパー、牛痘、麻疹、小反芻獣疫ウイルスをはじめとする動物やヒトに高い病原性と伝染性を持つ重要なウイルスを含んでいる。ネコ科動物では、イヌジステンパーウイルスが飼いネコや、

ライオン、トラ、ヒョウ、ジャガー、ジャコウネコ、等の野生のネコ科動物に感染することが知られているが、ネコ固有のモルビリウイルスは見つかっていなかった。このような中、2012年4月、香港の野外ネコからネコモルビリウイルス (FmoPV) の遺伝子が検出・分離され、このウイルスがこれまでに発見されたウイルスと異なる新しい種のモルビリウイルスであるという報告がされた。またこの報告では、病理組織検査によるケース・コントロール・スタディーの結果、このウイルスと糸球体腎炎の関係が示唆された。このような状況で、日本における FmoPV の存在の確認とその病原性についての知見が待ち望まれている。

トリボルナウイルスのトリボルナウイルス (ABV) は線胃拡張症 (PDD) のオウムの症例から分離され、PDD の原因が ABV である可能性が示されている。しかしながら、症状を示さない症例もあり、ABV の病原性は未だ不明な点が多い。近年、日本の毛引き症のオウムにおいて ABV の感染1例が確認され、ABV が PDD 以外の病態を示す可能性が示された。さらに、ABV は遺伝子型により分類され、8型が同定されているが、ABV の遺伝子型と病態との関連はほとんど分かっていない。そこで、日本の愛玩鳥での ABV の浸潤状況を調べ、ABV の型別と臨床症状の関連を明らかにしようと試みた。

近年、SRAS コロナウイルスや新型コロナウイルスの出現により、コウモリ由来の人獣共通感染症が注目されている。東南ア

ジアを中心とした地道なコウモリのウイルス感染症を調査することにより、日本に侵入する可能性のある新たなウイルス感染症を予測することも可能になると考えられる。そこで、本研究ではフィリピンにおいてコウモリを捕獲し、保有しているウイルスについて次世代型シーケンサーやPCRを用いた解析を行った。

B. 研究方法

RDV 法バージョン 3.1 :

RDV 法は網羅的なウイルス検出法であるが、バージョン1では6万通りのPCRを実施しなければならなかった。そこで、アンプリコンを作成するためのアダプターやPCRのプライマーを工夫することにより、256通りのPCRで網羅性を保てるように改良した方法をバージョン3.1として発表した (Watanabe et al., 2008)。さらに工夫を重ねることにより、64通りでおこなうバージョン3.1を開発した (図1)。

新規ウイルスの検出 :

紀伊半島において、山口大学・農学部・前田健博士、田辺市・ふるさと自然公園センター・鈴木和男博士らのご協力を得て、野生のコウモリやイノシシを捕獲した。コウモリは脾臓からウイルス分離を試み、イノシシは血清からウイルス分離を試みた。コウモリの採取に関しては、東京大学・農学部・渡辺俊平博士 (現・九州大学)、明石博臣博士らのご協力を得た。新規ウイルスの検出には、RDVバージョン3.1を用い

た。さらに、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。

サブトラクション RDV 法の開発：

サブトラクションは和光純薬の DsDD cDNA Subtraction kit を用いた。ウイルス感染細胞および培養上清から抽出した DNA 群から非感染細胞および培養上清から抽出した DNA 群を引くために、RDV バージョン 3.1 を用いて DNA ライブラリーを作成した。その後、サブトラクションキットを用いて得られた DNA 断片を RDV 法のダイレクトシーケンス技術で解析した (図 2)。

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 3)。

(1) Boiled RDB 法：検体を 100°C で 5 分煮沸後、常温にもどし、10000 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 HaeIII 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お

こなった。

(2) ISOFE CAL 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。

ネコモルビリウイルスに関する採材と検出：

日本における FmoPV の検出のため、山口県、北海道、東京都内の開業獣医、および東京農工大動物病院からネコ尿検体を、また都内の動物検査会社からネコ血液検体、更に麻布大学の代田欣二教授から腎炎ネコの腎臓パラフィン固定ブロックの提供を受け、これら検体中の FmoPV の検出を行った。尿、血液検体からのウイルス特異的核酸の検出には、抽出 RNA を用いた RT-nested PCR による FmoPV RNA L 遺伝子断片 (400 bp product) の増幅を行い、検出の結果はシーケンスにより確認した。腎臓パラフィン固定ブロックから抽出された RNA については、固定時に核酸が 200~300 bp に分断されるため、尿、血液検体からのサンプルよりも短い遺伝子断片 (115 bp) を RT-nested PCR により増幅した。

トリボルナウイルスに関する採材と検出：

体調不良をきたし受診した日本の愛玩鳥 93 個体の糞便より RNA を抽出し、ランダムプライマーにて逆転写を行った後に、トリボルナウイルス特異的プライマーにて

PCR を行った。トリボルナウイルス特異的プライマーは、N 領域に対して MH175: AAR GAR TAY YTI AAY GAR TGY ATG GAY GC および MH170: GGR TTY TCY TTY TTI CTC CAR TAA AAN GC を用い、M 領域に対して MH180: GGC AAG GTA ATY GTC CCT GGA TGG C および MH181: CCA ACA CCA ATG TTC CGA AGC CGA T を用いた (Horie M, 2012)。アガロースゲル電気泳動にて増幅産物を検出し、陽性検体について、ダイレクトシーケンスにて N 領域および M 領域の一部の塩基配列を決定した。Blastn にて ABV の遺伝子型を決定するとともに、ClustalW にて系統樹を作成した。

コウモリ由来ウイルスに関する採材と検出 (DNA ウイルス) :

本研究では、フィリピン共和国ミンダナオ島周辺の 3 地点で捕獲した野生コウモリ (オオコウモリ 4 種 70 頭、ココウモリ 1 種 1 頭、合計 5 種 71 頭) を対象としてウイルス遺伝子の網羅的な検出を試みた。各コウモリから小腸 (71 検体)、肺、(69 検体)、及び血餅 (66 検体) を採取し、Viral Nucleic Acid Kit (Roche) を用いて DNA を抽出し、小腸及び肺はそれぞれ 7 つのサンプルプールに、血餅は 6 つのサンプルプールに分割した。プールごとに Truseq DNA LT Sample Prep Kit (Illumina) を用いてシーケンス用ライブラリーを作製し、Genome Analyzer Iix (Illumina) を用いて網羅的な遺伝子同定を行った。各ライブラリー配列を対象とした

遺伝子解析には CLC Genomics Workbench version 6 を用い、reference とするウイルス遺伝子データは NCBI よりダウンロードしたものを使用し、contig 作成時の minimum length を 500bps とした。

コウモリ由来ウイルスに関する採材と検出 (RNA ウイルス) :

上記と同じ地点で採取したコウモリ 65 個体の腸・肺組織より、High pure viral nucleic acid kit (Roche) を用いてウイルス核酸を抽出した。Super script III (Invitrogen) を用い、ランダムプライマーにて逆転写を行った後に、コロナウイルス特異的プライマーにて PCR を行った。コロナウイルス特異的プライマーは、IN-A: GGT TGG GAT TAT CCT AAR TGT GA および IN-B: TAT AAC ACA CAA CAC CYT CAT CA プライマーペア (Belay ED, 2005, J Inf dis) と IN-2: GGG TTG GGA CTA TCC TAA GTG TGA および IN-4: TAA CAC ACA ACI CCA TCA TCA プライマーペア (Ksiazek TG, 2003, New Eng J Med) を用いた。さらに、Cor-P-R1: CAG GTA AGC GTA AAA CTC ATC および Cor-P-F2: CTA ACA TGC TTA GGA TAA TGG または Cor-P-F3: GCC TCT CTT GTT CTT GCT CGC プライマーペア (Ksiazek TG, 2003, New Eng J Med) を用いて semi-nested PCR または nested PCR を行った。アガロースゲル電気泳動にて増幅産物が認められた場合には、バンドを切り出し、ダイレクトシーケンスにて塩基配列の決定を試みた。

C. 研究結果

RDV 法バージョン 3.1 :

図 1 に方法の概略を示した。cDNA ライブラリーを作成する過程で、従来の平滑末端処理後にアダプターを付加する方法から、左右で異なる制限酵素で切断した後に別々のアダプターを結合させる方法に改良した。このことにより、制限酵素処理時に選択性が増し、最終 PCR 産物(2 次ライブラリー)からダイレクトシーケンスをおこなうときのプライマーセットを 64 通りまで減少させることに成功した。操作性は従来の RDV 法と変わりがなく、2 日間で解析を完了できるが、検出感度はスタート時に 10 万分子の標的 DNA を必要とするので、従来の RDV 法より約 10 倍感度が悪いことがわかった。しかしながら、64 通りの PCR だけで理論上網羅的解析を行うことができるので、このような技術の中で最も簡便な方法であると考えられる。

サブトラクション RDV 法 :

和光純薬のサブトラクションキットでは、左右に別々のアダプターが結合されたアンプリコンを作成する必要がある。それゆえ、RDV 法バージョン 3.1 の 2 次ライブラリーをサブトラクションキットの出発材料として用いることが可能である。また、このキットでは最終産物をクローニングしなければならないので、RDV 法のダイレクトシーケンスを組み合わせた(図 2)。このサブトラクション RDV 法が有用であるかを

確かめるために、ウナギから RDV 法により検出された新規 DNA ウイルス(ウイルスの検出については平成 22 年度文部科学省研究 C 基盤、代表・東海大学・小野信一博士で報告)を用いた。2 つの DNA フラグメントがウイルス DNA の遺伝子配列と一致した。

コウモリの新規ヘルペスウイルス :

コウモリ (*Miniopterus fuliginosus*) の脾臓から初代培養細胞の樹立を試みた際に、3 回目の継代で細胞障害が現れたので、培養上清から DNA を抽出し、ヘルペスウイルスを広く検出できるプライマーセットを用いて PCR をおこなったが、バンドは得られなかった(山口大学・前田健博士)。そこで、RDV 法バージョン 3.1 を用いて解析したところ、Blast 検索で *Tupaia herpesvirus* (GenBank No. AF281817) に相同性のある遺伝子が含まれていることが明らかになった。DNA genome walking などの手法を用いて、glycoprotein B 領域の遺伝子配列を決定し、系統上を作成したところ、ベータヘルペスウイルス群に属することが明らかになったので、Bat betaherpesvirus-2 と命名した(図 4)。さらに同じ地域で疫学的調査をおこなったところ、50 匹のコウモリ中 4 匹の脾臓由来 DNA で PCR 陽性であった。

この結果から、RDV 法バージョン 3.1 は簡便ながらも新規ウイルスを検出できることが明らかになった。

イノシシの新規ラプトウイルス :

イノシシの血清をヒトスジシマカ由来の培養細胞 C6/36 を用いてウイルス分離を試みたところ、接種後 2 週間培養した時点で細胞障害は認められなかったが、陰性対象に比べて細胞の増殖が遅くなっていた（山口大学・前田健博士）。この培養上清をサル腎臓由来の Vero 細胞に接種したところ、3 日目に細胞が円形になるような細胞障害が観察された。培養上清から RNA を抽出して、日本脳炎ウイルスの RT-PCR を実施したが陰性であった。そこで、RDV 法を用いてウイルス遺伝子の検出を試みたところ、ラブドウイルスに近縁であることが明らかになった。RDV 法により得られた遺伝子断片 (T13-3 fragment) をアミノ酸に変換して、代表的なラブドウイルスとのアライメントをおこなった（図 5）。このウイルスを暫定的に、Nishimuro rhabdovirus（ニシムロウイルス）と命名した。

ニシムロウイルスを 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。

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 10000 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 1000 から 10000 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 ug 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 6 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7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7の赤い丸印、図8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9に示すように uncultured bacteria の配列が得られた。

国内におけるネコモルビリウイルスの感染状況：

尿82検体中、5検体（6.1%）が陽性、また血液10検体中、1検体が陽性（10%）と判明し、両方を合わせた陽性率は6.5%（92検体中6検体陽性）であった。また、腎臓ブロックからの検体については、10検体ずつプールした6つのグループのサンプルを検査し、1つのグループが陽性であった。上記のFmoPV陽性ネコ尿検体（5検体）のRT-nested PCR産物はシーケンスされ、FmoPVであることが確認されたが、それら検体間のシーケンスには今回の検出した領域では違いは見られなかった。このシーケンスと香港の野外ネコから分離されたFmoPVの遺伝子配列を系統樹解析した結

果を図10に示す。この結果により、今回の日本国内から検出されたウイルス核酸配列がすでに報告されたFmoPVとともにクラスターを作り、他のモルビリウイルスからは独立した配列であることが分かった。

国内におけるトリボルナウイルスの感染状況

日本の愛玩鳥93個体のうち4個体がトリボルナウイルス陽性であり、陽性率は4.3%であった。トリボルナウイルスの遺伝子型は、ABV-2およびABV-4であった（図11）。今回陽性であった愛玩鳥は、典型的な腺胃拡張症を示す個体もあったが、腺胃の拡張を認めず、痙攣や排泄腔脱といった行動異常の個体もあった。

コウモリ由来DNAウイルスの網羅的検出：

各プールサンプルより得られた contig のうち、既知のウイルス遺伝子に対して相同性を示したものを表1から3に示した。E-valueのカットオフ値はE-5以下とした。小腸DNAサンプルプールのうち、human herpesvirus 6Bに対して相同性を示した contig が2つのサンプルプールで確認された。いずれも、ヒットした contig 数は1本ずつであった。その他は、レトロウイルス又は昆虫ウイルスに相同性を示した。

肺DNAサンプルプールのうち、human herpes virus 6B及びSaimirine herpesvirus 1に対して相同性を示す contig がそれぞれ1つのサンプルプールより確認された。いずれの contig もヒットした contig 数は1本ずつ

であった。

血餅 DNA サンプルプールでは、Saimiriine herpesvirus 2 に対して相同性を示す contig が 2 つのサンプルプールから、Deerpox virus に対して相同性を示す contig が 1 つのサンプルプールから、Goatpox virus に対して相同性を示す contig が 1 つのサンプルから確認された。いずれの contig もヒットした contig 数は 1 本ずつであった。

また、いずれのサンプルプールからもレトロウイルスに対して相同性を示す contig が複数確認されると共に、昆虫ウイルスに対しても相同性を示す contig も複数確認された。

コウモリ由来 RNA ウイルスの検出：

IN-A および IN-B プライマーペアにて PCR を行った場合と、IN-2 および IN-4 プライマーペアで増幅した後に Cor-p-F3 および IN-4 でセミネステッド PCR を行った用いた場合に、バンドを認めた。認められたバンドパターンは 3 通りであった（結果は示さず）。腸由来サンプルではバンドパターン A (320 bp 付近) は 2 個体、バンドパターン B (480 bp, 420 bp, 240 bp 付近) は 1 個体、バンドパターン C (240 bp 付近) は 1 個体であり、肺由来サンプルではバンドパターン A が 1 個体認められた。しかしながら、塩基配列は決定できなかった。

D. 考察

本研究の目的は、ウイルス分離ができない、もしくは同定手段のないウイルスを迅

速に検出する方法を確立することである。

検体は血清や髄液、臓器、あるいはウイルス分離に成功したがウイルスを同定できない培養上清などが想定される。血清・髄液・培養上清については、従来の RDV 法で対応可能である。しかし、臓器などの検体は、宿主遺伝子が大量に含まれるので遺伝子情報のないウイルス核酸だけを選択的に取得することは困難である。

本研究では、まず、ウイルス分離されたが同定のできなかつた培養上清から、RDV 法を用いて 2 種類の新規ウイルスを検出することに成功した。コウモリから検出された新規ベータヘルペスウイルスと、イノシシから分離された新規ラブドウイルスである。両ウイルスとも外見からは健康な動物から分離されたので、宿主動物に対して病原性があるかについては明らかではない。しかし、種を越えて感染するときに病原性が現れるウイルスもあるので、本研究で検出されたこれらの新規ウイルスもその可能性を否定できない。今後、これらの新規ウイルスの PCR の検出系を確立しておくことは重要である。

RDV バージョン 3.1 は、ウイルスの網羅的検出法の中でもっとも簡便な方法である。RDV 法では、目的に応じて様々なバージョンがあるが、バージョン 3.1 は今後、不明検体のスクリーニングに用いる予定である。本研究では、このバージョンはサブトラクションの出発材料として用いられた。バージョン 3.1 の検出感度が 10 万分子と低いので、サブトラクション RDV 法の感度も高く

ないと考えられる。今後は、感度の改良が課題である。

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 に近い感度が得られているが、さらに改良することにより高い感度が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 の領域をシーケ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。

本研究では、香港でのみ報告のある FmoPV が日本のネコにも感染していることを明らかにした。今後、日本における FmoPV 感染率をより正確に調べるため、追加して収集した検体を同様の方法で検査する予定である。また、ネコ培養細胞による FmoPV 日本株の分離を行い、日本分離株の病原性を調べるため、分離ウイルスを用いたネコへの感染実験を予定している。さらに、ネコ腎臓ブロックの FmoPV 検査を進め、FmoPV 感染と腎臓病変に相関があるかを調べる予定である。

トリボルナウイルスは現在までに 9 つの遺伝子型が報告されているが、塩基配列が公開されているのは 1~5 型である。今回用いたプライマーは、公開された配列に基づいて 1~5 型を検出可能なように設計された縮合プライマーである。PCR には 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を用いたため、プライマーの校正が行われる。しかしながら、塩基配列が既知のトリボルナウイルスと大きく異なる場合には検出できない可能性がある。トリボルナウイルス感染は腺胃拡張症の原因であると考えられている。今回の我々の結果は、トリボルナウイルスは腺胃拡張症だけでなく、精神性疾患や末梢神経障害が臨床的に疑われるような行動異常を引き起こすことが示唆された。今回の結果より次世代シーケンサーを用い

た網羅的な遺伝子解析は、野生動物が保有する既知・未知ウイルスについて網羅的な検出が可能であることが改めて示された。

今回の解析では、既に報告されているヘルペスウイルスだけではなくボックスウイルスや昆虫ウイルスに相同性を示す遺伝子が多数確認された。暴露状況等についての詳細については、今後さらに研究を進めて明らかにする必要があるが、昆虫・哺乳類・ヒトに対して感染する可能性を持つウイルスの検出が比較的短時間で可能であった。今後は、解析精度の向上についての検討を進め、より精度の高い検出系の構築を試みていく予定である。

RNA ウイルスについては、コロナウイルスの特異検出をおこなったが陽性個体はなかった。今後、DNA ウイルスと同様に次世代型シーケンサーを用いた網羅的検出を試みる予定である。

E. 結論

本研究において、RDV 法を用いて 2 種類の新規ウイルスの検出に成功した。また、ウイルス感染臓器から未知のウイルスを検出することを想定して、サブトラクション RDV 法を開発した。

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。

本研究では、これまで海外で主に報告されていたネコモルビリウイルスやトリボル

ナウイルスが、日本国内でも比較的多く（5%前後）感染していることを明らかにした。この結果は、新規ウイルスが海外で発見されたときには既に日本でも感染例があると考えた方が良いことを示唆している。このような観点から、本研究において検出されたフィリピンの野生コウモリにおける既知・未知のウイルスも、コウモリの種が同じであれば日本においても検出される可能性を示している。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shumpei Watanabe, Ken Maeda, Kazuo Suzuki, Naoya Ueda, Koichiro Iha, Satoshi Taniguchi, Hiroshi Shimoda, Kentaro Kato, Yasuhiro Yoshikawa, Shigeru Morikawa, Ichiro Kurane, Hiroomi Akashi, and Tetsuya Mizutani. Novel Betaherpesvirus in bats. *Emerg. Infect. Dis.* 16. 986-988. 2010.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Kazuya Shirato, Ken Maeda, Shumpei Tsuda, Kazuo Suzuki, Shumpei Watanabe, Hiroshi Shimoda, Naoya Ueda, Koichiro Iha, Satoshi Taniguchi, Shigeru Kyuwa, Daiji Endoh, Shutoku Matsuyama, Ichiro Kurane, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Yasuhiro Yoshikawa, Hiroomi Akashi and Tetsuya Mizutani. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes.* 44. 40-44. 2011
 8. 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. *J. Virol. Methods.* 68-74. 180. 2012.
 9. Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S. A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. *BMC Vet. Res.* 2012. 18;82.
 10. Taniguchi S, Sayama Y, Nagata N, Ikegami T, Miranda ME, Watanabe S, Iizuka I, Fukushi S, Mizutani T, Ishii Y, Saijo M, Akashi H, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Morikawa S. Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. *BMC Vet Res.* 2012 Oct 11;8(1):189.
 11. Tsuda S, Watanabe S, Masangkay JS, Mizutani T, Alviola P, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Fujii H, Kato K, Horimoto T, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H. Genomic and serological detection of bat coronavirus from bats in the Philippines. *Arch Virol.* 2012 Jul 26.
- 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

図1. RDV ver 3.1の概略図

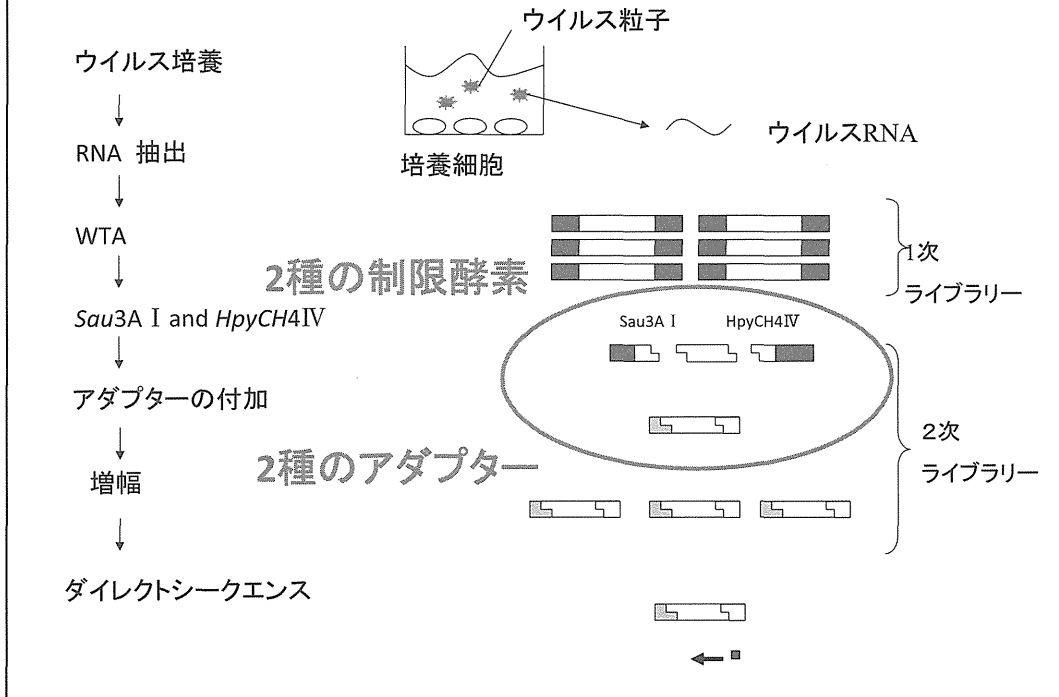


図2. サブトラクションRDVの概略図

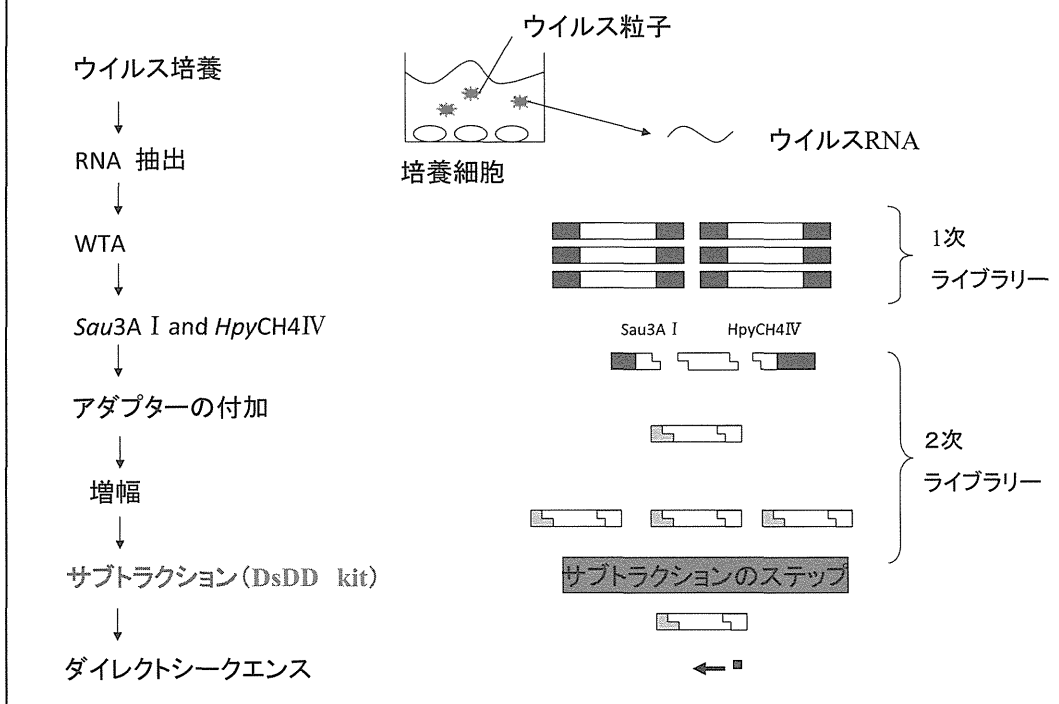


図3. RDB法の概要

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

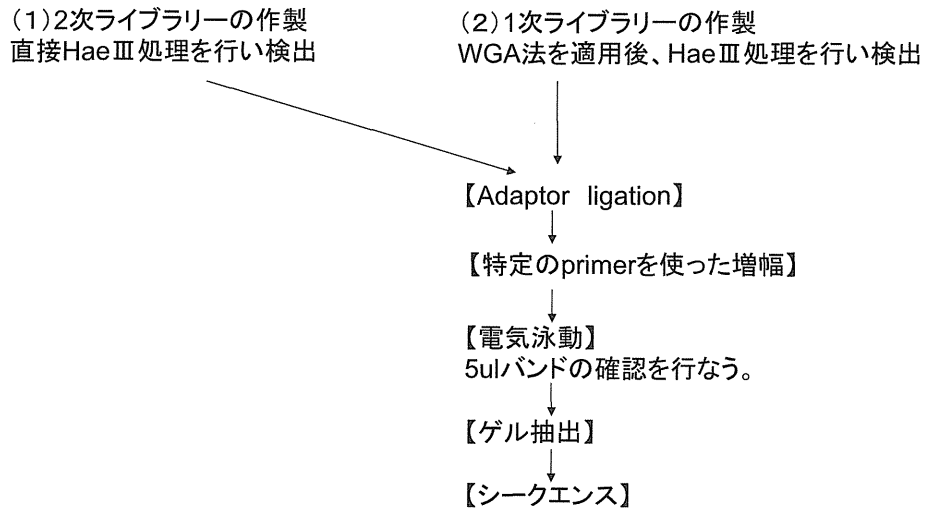


図4. 新規コウモリヘルペスウイルスの系統樹

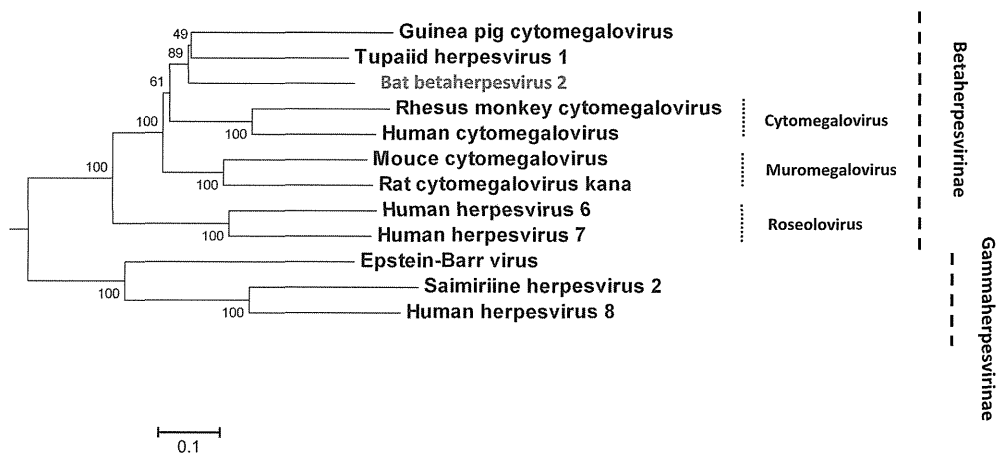


図7. RDB法の最終工程の電気泳動像

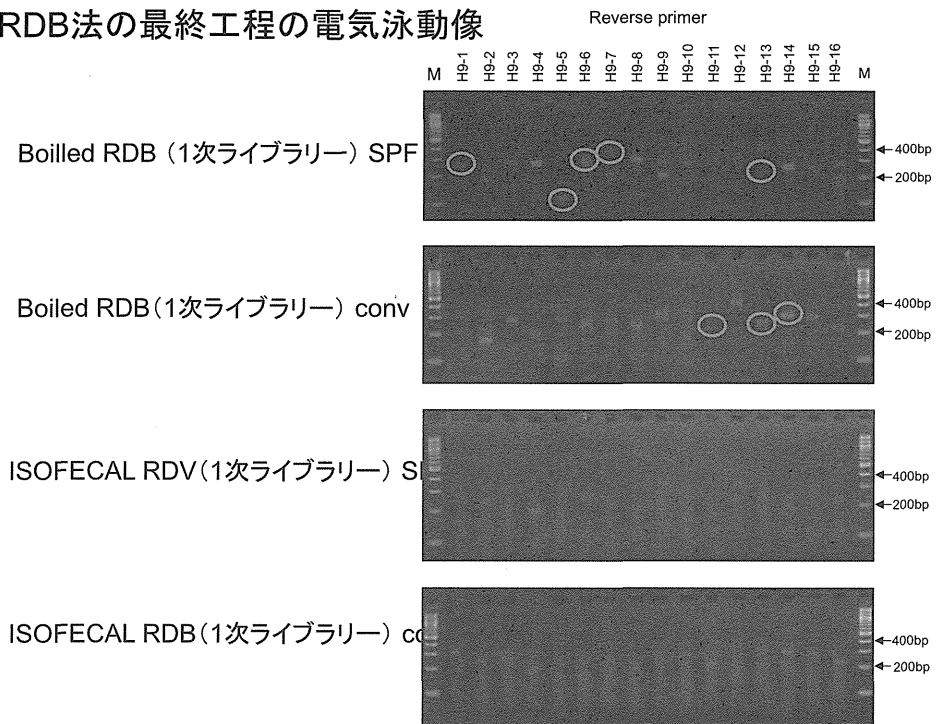


図8. マウス糞便のRDB法により得られた細菌配列

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