

厚生労働科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究
分担研究報告書

5' -Flap 付加 primer を用いた高感度診断評価システムの開発

研究分担者 西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部長）

研究協力者 林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部第三室長）

伊藤（高山）睦代（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）

木下（山口）一美（国立感染症研究所ウイルス第一部流動研究員）

研究要旨

近年ヒトおよび動物の移動の多様化に伴い新興・再興ウイルス感染症が問題となっている。我が国においても狂犬病、チクングニア熱等の輸入感染症の発生が報告されている。迅速にこれら輸入症例に対応するためには迅速で高感度の診断評価システムが求められる。したがってこれまでに多くのウイルスにおいてその迅速診断法の開発が行われてきた。ところで近年 5' -Flap 付加 primer 法を用いることにより診断法の感度の向上が報告された。そこで本研究においてリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、狂犬病ウイルス (RV)、チクングニアウイルス (CHIKV) に対する既知のプライマーを用いた 5' -Flap 付加 primer 法の検討を行った。その結果 LCMV 特異的プライマーに 5' -Flap 付加 primer 法を用いたときその感度の向上が観察された。しかしながら RV, CHIKV に対してはその効果は認められなかった。Flap 配列の付加によるプライマー感度の向上のメカニズムは不明であるが、既存のプライマーに対するその効果の検討は有用であることが示唆された。

A. 研究目的

世界のヒトおよび動物の交流・移動の多様化に伴い近年新興・再興ウイルス感染症が問題となっている。我が国においても狂犬病、チクングニア熱等の輸入感染症の発生が問題となっている。これまでに様々なウイルス特異的遺伝子検出法として定量的 RT-PCR 用プライマーの開発が行われているが、ウイルス遺伝子は常に変化しており、ウイルス遺伝子検出用プライマーの開発・感度・精度の向上は常に求められている。ところで近年 5' -Flap 付加 primer が開発された。これは既存のウイルス特異的遺伝子検出用 primer の 5' 端に Flap 配列 (AATAAATCATAA) を付加することにより、その感度を上昇させる方法である。そこで本研究の目的は 5' -Flap

付加 primer を用いた定量的 RT-PCR (qRT-PCR) 法を確立し、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)、狂犬病ウイルス (RV)、チクングニアウイルス (CHIKV) の遺伝子検出に応用し、より高感度診断評価システムを開発することである。

LCMV はアレナウイルス科に属する。アレナウイルス科のウイルスには旧世界アレナウイルスとして LCMV やラッサウイルス等が、新世界アレナウイルスとして南米出血熱ウイルス等が分類されている。LCMV の感受性動物はマウス、ヒト、ハムスター、モルモット、イヌ、ブタ、サル類等の動物種である。これまでのところヒトにおける LCMV の日本での発生は報告されていない。

狂犬病は代表的な人獣共通感染症の 1 つである。現在も世界 150 以上の国と地域で発生しており、アジア、アフリカを中心に年間 55,000 人以上の死者が推計されており、狂犬病が疑われた動物に咬まれたヒトの約 40%が 15 歳以下の子供である。RV は、ラブドウイルス科のリッサウイルス属に分類される一本鎖の(-) RNA ウイルスであり、エンベロープを有す、直径約 60nm、長さ約 180nm の弾丸型ウイルスである。日本においては 1957 年以降ヒトでの国内発生例は報告されていないが、1970 年にネパールから 1 例、2006 年にフィリピンから 2 例の輸入症例が報告されている。

CHIKV はトガウイルス科のアルファウイルス属、セムリキ森林熱ウイルス血清型群に分類されるエンベロープを有す球状の一本鎖(+)RNA ウイルスである。ヒトにおける潜伏期間は 2-12 日で多くは不顕性感染に終わる。CHIK 熱の主な症状は発熱、全身倦怠、リンパ節腫脹、浮腫、頭痛、筋肉痛、一過性の発疹、亜急性の関節炎である。また出血傾向(鼻出血・歯肉出血)や悪心・嘔吐をきたすこともあるためデング熱・出血熱の鑑別疾患である。関節炎は特に指関節、手根関節、趾関節、足関節に多発する。輸入症例としてこれまでに 35 例が報告されている。

これらウイルスに対してこれまでに開発された特異的プライマーを用いて、5' -Flap 付加 primer を用いた qRT-PCR 法の開発を検討する。

B. 研究方法

ウイルス RNA の抽出: LCMV および RV のウイルスの RNA を High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いて抽出した。抽出方法はメーカーのマニ

ュアルに従った。

Flap 付加 LCMV 特異的プライマーの設計: 既に報告されている LCMV 特異的プライマー: GP-F (CATTCACCTGGACTTTGTCAGACTC), GP-R (GCAACTGCTGTGTTCCCGAAAC) (J Virol Meth 147(1):167-176, 2008) を用いて Flap 付加 LCMV 特異的プライマー: flap-GP-F (AATAAATCATAACATTCACCTGGACTTTGTCAGACTC), flap-GP-R (AATAAATCATAAGCAACTGCTGTGTTCCCGAAAC) を設計した。

Flap 付加 RV 特異的プライマーの設計: これまでに我々の開発した RV 特異的プライマー: RVH-NF2 (ACTTCCGTTCACTAGGCTTG), RVH-NR2 (GACCCATATAGCATCCAACAA) を用いて Flap 付加 RV 特異的プライマー: flap-RVH-NF2 (AATAAATCATAAACTTCCGTTCACTAGGCTTG), flap-RVH-NR2 (AATAAATCATAAGACCCATATAGCATCCAACAA) を設計した。

Flap 付加 CHIKV 特異的プライマーの設計: これまでに我々の開発した CHIKV 特異的プライマー: 10572f (CGCAGGAAGACCAGGACAA), 10798r (CCGCTCTTACCGGTTTG) を用いて Flap 付加 CHIKV 特異的プライマー: Flap-10572f (AATAAATCATAACGCAGGAAGACCAGGACAA), Flap-10798r (AATAAATCATAACCGCTCTTACCGGTTTG) を設計した。

qRT-PCR 法: 各ウイルス特異的プライマーおよび Flap 付加特異的プライマーを用いた RT-PCR 法により特異的な遺伝子断片の増幅を観察した。RT-PCR 反応には LightCycler 1.5 (ST300) システム (Roche Applied Science) を用いた。増幅遺伝子は SYBR Green

I を用いて検出した。

C. 研究結果

Flap 付加 LCMV 特異的プライマーの検討: まず 1×10^4 PFU/sample のウイルスから RNA を抽出し、標準 RNA を作製した。次に標準 RNA を用いて LCMV 特異的プライマー-GP-F, GP-R の標準曲線を作製した (図 1)。さらに LCMV 特異的プライマー-GP-F, GP-R および Flap 付加 LCMV 特異的プライマー-flap-GP-F, flap-GP-R を用いて qRT-PCR を実施し、LCMV の標準 RNA に対する各プライマーの増幅効率を比較検討した。その結果 flap-GP-F および flap-GP-R を用いた場合、Flap 配列を付加しない場合と比較して蛍光強度が約 36% 増強した (図 2)。さらに蛍光の立ち上がりのサイクル数を示す Crossing Point (CP) 値の短縮が認められた (図 2, 表 1)。これらデータを解析し、比較検討した結果、標準 RNA : 1×10^{-1} PFU/sample の濃度において Flap 配列を付加した場合 CP 値は 30.22 であったのに対し Flap 配列を付加しない場合は検出不可能であった。したがって Flap 配列を付加したことによって LCMV 特異的プライマーの増幅感度が上昇したことが示唆された (表 1)。またこのとき Flap 配列の有無にかかわらず T_m 値は 83.66°C であった。

Flap 付加 RV 特異的プライマーの検討: まず 1×10^5 FFU/sample のウイルスから RNA を抽出し、標準 RNA を作製した。次に標準 RNA を用いて RV 特異的プライマー-RVH-NF2, RVH-NR2 の標準曲線を作製した (データ非表示)。さらに RV 特異的プライマー-RVH-NF2, RVH-NR2 および Flap 付加 RV 特異的プライマー-flap-RVH-NF2, flap-RVH-NR2 を用いて

qRT-PCR を実施し、RV の標準 RNA に対する各プライマーの増幅効率を比較検討した。その結果 Flap 配列付加の有無にかかわらず CP 値に大きな差は観察されなかった (表 2)。またこのとき Flap 配列の有無にかかわらず T_m 値は 82.26°C であった。

Flap 付加 CHIKV 特異的プライマーの検討: 合成 CHIKV RNA を標準 RNA として使用した。次に標準 RNA を用いて CHIKV 特異的プライマー-10572f, 10798r の標準曲線を作製した (データ非表示)。さらに CHIKV 特異的プライマー-10572f, 10798r および Flap 付加 CHIKV 特異的プライマー-flap-10572f, flap-10798r を用いて qRT-PCR を実施し、CHIV の標準 RNA に対する各プライマーの増幅効率を比較検討した。その結果 Flap 配列付加の有無にかかわらず CP 値に大きな差は観察されなかった (表 3)。またこのとき Flap 配列の有無にかかわらず T_m 値は 82.27°C であった。

D. 考察

本研究においてこれまでに確立されている LCMV, RV および CHIKV の検出用 qRT-PCR 用プライマーを用いて Flap 配列を既存のプライマーの 5' 端に付加することによるその増幅効率への効果を検討した。その結果 12bp の Flap 配列を既存の qRT-PCR プライマーに付加しても qRT-PCR 反応が阻害されることはなく、 T_m 値も全てのプライマーにおいて Flap 配列の有無にかかわらず影響を受けないことが観察された。またさらに LCMV 増幅プライマーに Flap 配列を付加することによって CP 値の短縮が認められ、感度の向上が観察された。しかしながら RV および CHIKV 特異プライマーに Flap 配列を付加し

でも CP 値の短縮および感度の向上は観察されなかった。すべての Flap 配列付加プライマーを用いた qRT-PCR 反応においてプレートにおける蛍光強度の増強が認められた。これは 12bp の Flap 配列を付加することによって増幅産物の分子量が増加したことに起因することが示唆された。

E. 結論

感染症の発生時においてその感染拡大を防止するために感染初期における迅速診断法の開発は必須である。したがってこれまでに多くのウイルスに対する様々な qRT-PCR 用特異的プライマーが開発されてきた。しかしながらより高感度および高精度の診断法の開発は今後も必須である。本研究において検討した Flap 配列は LCMV 特異的プライマーの 5' 端に付加することによってその増幅効率を向上させた。Flap 配列の RV および CHIKV 特異的プライマーにおける検討結果より、Flap 配列の付加が常にプライマーの増幅効率を向上させるわけではないことが明らかになったが、そのメカニズムは不明なため、既存のプライマーの Flap 付加の有効性を検討することは有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

特記事項なし

H. 学会発表

伊藤 (高山) 睦代, 中道一生, 山口 (木下) 一美, 王 麗欣, 林 昌宏, 西條政幸. Establishment of the in vitro test for

residual virulent rabies virus in inactivated rabies vaccines. 第 11 回狂犬病研究会. 東京都, 2012 年 4 月.

C.K. Lim, M.L. Moi, A. Kotaki, M. Saijo, I. Kurane, T. Takasaki. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2011. The 9th Japan-China International Conference of Virology. Sapporo, Japan. June 12-13, 2012.

C.K. Lim, A. Kotaki, T. Omatu, M.L. Moi, I. Kurane, M. Saijo, T. Takasaki. A Rapid Non-nested Reverse Transcriptase-PCR Assay for Vertebrate Flavivirus Subgroups Using a Novel Universal Single Primer Pair Based on a Conserved Region of NS5 Gene Sequences. The XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM). Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27, 2012.

中道 一生, 井上直樹, 倉根一郎, 林 昌宏, 西條政幸: 進行性多巣性白質脳症が疑われた患者の脳脊髄液におけるヘルペスウイルスの出現プロファイルの解析, 第 17 回日本神経感染症学会総会 (京都市) 2012 年 10 月 19-20 日.

林 昌宏, 網 康至, 藤井克樹, 北浦一孝, モイ メンリン, 白井顕治, 小滝 徹, 須崎百合子, 森川 茂, 西條政幸, 鈴木隆二, 倉根一郎, 高崎智彦: マーモセットを用いたチクングニアウイルスの霊長類モデルの検討, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪市) 2012 年 11 月 13-15 日.

垣内五月, 木下(山口)一美, 伊藤(高山)睦代, 西村秀一, 林昌宏, 西條政幸: 造血幹細胞移植病棟にみられたパラインフルエンザウイルス 3 型感染症流行の分子疫学的解析, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪市) 2012 年 11 月 13-15 日.

伊藤(高山)睦代, 中道一生, 林昌宏, 山口(木下)一美, 垣内五月, 王麗欣, 倉根一郎, 西條政幸: 乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン国家検定法における 3Rs の導入, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪市) 2012 年 11 月 13-15 日.

山口(木下)一美, 中道一生, 伊藤(高山)睦代, 林昌宏, 倉根一郎, 西條政幸: LAMP 法を用いた PML 患者の脳脊髄液中の JC ウイルスの検出および定量試験, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪市) 2012 年 11 月 13-15 日.

中道一生, 林昌宏, 西條政幸: 進行性多巣性白質脳症患者の脳脊髄液中に検出された JC ポリオーマウイルスの経時的なゲノム変異パターンの解析, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪市) 2012 年 11 月 13-15 日.

M. L. Moi, C. K. Lim, M. Saijo, T. Takasaki, I. Kurane. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using Fc γ R-expressing cells. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) 61st Annual Meeting. Atlanta, Georgia USA. November 11-15, 2012.

I. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

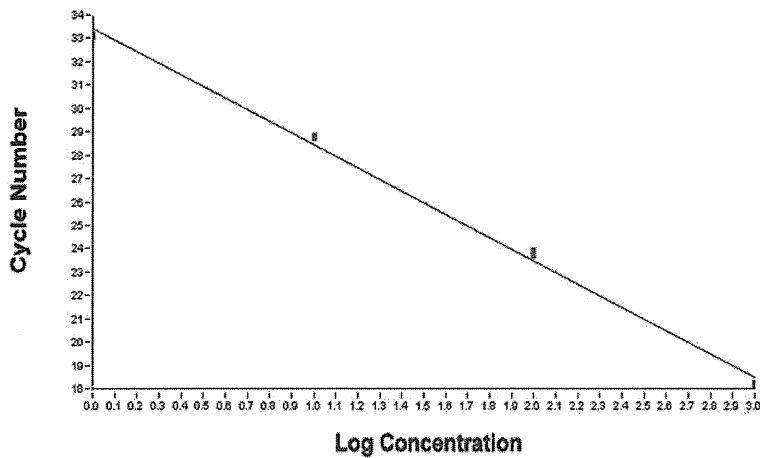


図 1. LCMV 検出用 qRT-PCR の標準曲線 . LCMV 特異的プライマー GP-F, GP-R の LCMV 特異的断片に対する増幅標準曲線を $1 \times 10^0 \sim 10^3$ PFU/sample のウイルス RNA を用いて作製した . その結果濃度依存性の直線的な標準曲線を得た .

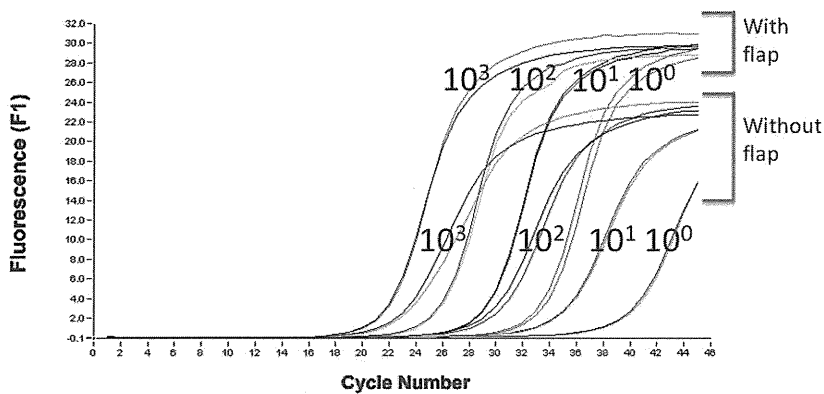


図 2. Flap 付加 LCMV プライマーを用いた qRT-PCR 法の検討 . LCMV 特異的プライマー GP-F, GP-R および 5' -Flap 付加プライマー flap-GP-F および flap-GP-R を用いてその増幅能の検討を行った . その結果 5' -Flap 付加プライマーにおいて CP 値の短縮と蛍光強度の増強が観察された .

表1. Flap付加LCMVプライマーを用いたqRT-PCR法の検討

Template	PFU par sample	CP	
		w/o Flap	w Flap
LCMV	10 ³	18.18	17.29
	10 ²	23.81	21.19
	10 ¹	28.76	24.10
	10 ⁰	33.11	27.37
	10 ⁻¹	nd	30.22
	10 ⁻²	nd	nd

表2. Flap付加RVプライマーを用いたqRT-PCR法の検討

Template	FFU par sample	CP	
		w/o Flap	w Flap
RV	10 ³	10.88	11.56
	10 ²	16.09	17.07
	10 ¹	19.79	21.05
	10 ⁰	23.16	24.86
	10 ⁻¹	26.65	27.68
	10 ⁻²	28.61	28.90

表3. Flap付加CHIKVプライマーを用いたqRT-PCR法の検討

Template	RNA copies par sample	CP	
		w/o Flap	w Flap
CHIKV	10 ⁵	17.57	17.14
	10 ⁴	20.23	20.37
	10 ³	25.00	23.21
	10 ²	26.37	27.77
	10 ¹	29.88	30.11
	10 ⁰	29.57	31.01

厚生労働科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究
分担研究報告書

フラビウイルス共通迅速診断法による増幅産物の解析

研究代表者 倉根一郎 (国立感染症研究所副所長)

研究協力者 林 昌宏 (国立感染症研究所ウイルス第一部第三室長)

高崎智彦 (国立感染症研究所ウイルス第一部第二室長)

西條政幸 (国立感染症研究所ウイルス第一部長)

研究要旨

フラビウイルスはこれまでに約 70 種類以上報告されており、その流行地域も重なることがあるためフラビウイルスの迅速な鑑別が重要である。これまでに我々はフラビウイルス共通迅速診断法を開発し様々なフラビウイルスを 1×10^{-2} から 1×10^1 (PFU/ml) の感度で検出できることを報告した。本研究ではフラビウイルス共通プライマーによる増幅断片の塩基配列を決定し、その系統樹解析を行った。その結果フラビウイルス共通プライマーによる増幅産物は各ウイルスに特異的であり、その増幅産物の塩基配列を決定することによりサンプル中のフラビウイルスを同定できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでに世界では 70 種類以上のフラビウイルスが報告されており、世界の亜寒帯地域から熱帯地域にかけて広く分布する。その内ヒトに脳炎を起こすウイルスとして東アジアから南アジアにおいて分布する日本脳炎ウイルス、南アジアから南北アメリカ大陸に分布するウエストナイルウイルス、北米に分布するセントルイス脳炎ウイルス、オーストラリアを中心に分布するクンジンウイルス、マレーバレー脳炎ウイルス、ヨーロッパからロシアにかけて分布するダニ脳炎ウイルスが知られている。またヒトに出血熱を起こすウイルスとして世界の熱帯・亜熱帯に広く分布するデングウイルス 1-4 型、アフリカ、中南米に分布する黄熱ウイルス等が知られている。我が国では特に流行地からのデング輸入症例が年々増加傾向にあり、日本にも媒介蚊が存在するため我が国への侵淫の可

能性が危惧されている。フラビウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に属するエンベロープを有する (+) 一本鎖 RNA ウイルスである。複数のフラビウイルスが同一地域で流行している可能性は常にあるため迅速なフラビウイルス診断法の確立が求められている。

我々はこれまでにフラビウイルスの迅速診断法を開発し、患者サンプルにおいて応用できることを報告した。そこで本研究の目的は本迅速診断法において検出されるウイルスゲノムの増幅産物の解析・評価を行うことである。

B. 研究方法

ウイルスと培養細胞: 迅速診断法の感度の検討にはデングウイルス (DEN)、日本脳炎ウイルス (JE)、ウエストナイルウイルス (WN)、クンジンウイルス (KUN)、セントルイス脳炎

ウイルス (SLE), マレーバレー脳炎ウイルス (MVE), 黄熱ウイルス (YF), ロシア春夏脳炎ウイルス (RSSE), ポワッサンウイルス (POW), ランガットウイルス (LGT), ネギシウイルス (NEG), ヨコセウイルス (YOK) を供試した。ウイルスの力価測定にはサル腎由来の Vero 細胞を用いた (American Type Culture Collection)。

ウイルス RNA の抽出: 各フラビウウイルスの RNA を High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いて抽出した。抽出方法はメーカーの用意したマニュアルに従った。

デングウイルス特異的プライマーを用いた TaqMan RT-PCR 法: デング熱疑い患者血清から RNA を抽出した。デングウイルス特異的プライマーを用いたリアルタイム RT-PCR 法は伊藤ら (J. Clin. Microbiol. 42(12): 5935- 5937, 2004) の方法により実施した。TaqMan RT-PCR 反応によるデングウイルス特異的な遺伝子断片の増幅を観察した。

フラビウウイルス共通プライマーを用いた RT-PCR 法: フラビウウイルス共通プライマー FVX7f および FVX12r を用いた RT-PCR 法により特異的な遺伝子断片の増幅を観察した。さらに検出された増幅産物について塩基配列解析を行い, 検出された遺伝子断片の同定を行った。

フラビウウイルス共通プライマーによる増幅産物の塩基配列解析と系統樹解析: フラビウウイルス共通プライマーによる増幅産物の塩基配列をダイレクトシークエンス法により解析した。またフラビウウイルス共通プ

ライマーによる増幅産物の塩基配列の相同性を Clustal W を用いて解析し, MEGA5.0 を用いて系統樹を作製した。

C. 研究結果

各フラビウウイルスに対するフラビウウイルス共通プライマーの評価: DEN, JE, WN, KUN, SLE, MVE, YF, RSSE, POW, LGT, NEG, YOK ウイルスに対するフラビウウイルス共通プライマーの効果を検討した結果全てのフラビウウイルスにおいて増幅産物が得られた。

患者血清を用いた迅速診断法の評価: 国立感染症研究所ウイルス第一部第二室で 2008 年から 2009 年にかけて実験室診断されたデング輸入症例患者血清を用いてフラビウウイルス迅速診断法の評価を行った。その内 40 検体において増幅産物の塩基配列を解析しその配列を得た。

フラビウウイルス共通プライマーによる増幅産物における系統樹解析: フラビウウイルス共通プライマーによって増幅された産物およびこれまでにデータベースに登録されている既知のフラビウウイルスのフラビウウイルス共通プライマーによるターゲット配列による系統樹解析を行った。その結果フラビウウイルス共通プライマーによる各ウイルスの増幅産物は既知の各ウイルスのターゲット配列とクラスターをそれぞれ形成した (図 1)。このことはフラビウウイルス共通プライマーのターゲット配列が各ウイルス特異的であり, フラビウウイルス共通プライマーの増幅産物の塩基配列を決定することにより, 検体中のフラ

ビウイルスを同定することが可能であることを示唆する。

D. 考察

これまでに我々はフラビウイルスを迅速に検出するためにフラビ共通迅速診断法を確立した。フラビウイルスは同一地域に複数のフラビウイルスが流行している場合があり、例えばデングウイルスは日本脳炎ウイルスや黄熱ウイルス、ウエストナイルウイルスと流行域が重なる。またデングウイルスの流行地域においては鑑別診断としてアルファウイルス属のチクングニアウイルス (CHIKV) によるチクングニア熱が流行している。本迅速診断法により非常に多くの種類のフラビウイルスを高感度に検出することが可能であり、その増幅産物の塩基配列は各ウイルスに特異的であることが示された。したがって本法はフラビウイルスの迅速診断および鑑別において有用な手法と成り得ることが示唆された。

E. 結論

フラビウイルス感染症の特異的治療法は確立されていない。特にデング出血熱、日本脳炎、ウエストナイル脳炎、ダニ媒介性脳炎、黄熱等はひとたび発症するとその致死率は高く重篤な疾患である。フラビウイルスの動向にはヒト、蚊、ダニ、気候、環境等の要因が複雑に関わり、その状況の予測は困難であるため迅速な診断法の開発は世界の公衆衛生の向上に貢献することが期待される。

F. 健康危険情報

フラビウイルスは世界各地に分布している。なかでもデングウイルスは世界の熱帯・亜熱帯に分布しており、通年にわたり存在する。デング熱の発生状況は媒介蚊の活動と深く関係し、その流行状況は常に変化するため渡航者は訪問国の状況を把握することが求められる。したがって迅速診断法による流行状況の把握は我が国の防疫において重要である。

G. 研究発表

特記事項なし

H. 学会発表

C.K. Lim, M.L. Moi, A. Kotaki, M. Saijo, I. Kurane, T. Takasaki. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2011. The 9th Japan-China International Conference of Virology. Sapporo, Japan. June 12-13, 2012.

C.K. Lim, A. Kotaki, T. Omatu, M.L. Moi, I. Kurane, M. Saijo, T. Takasaki. A Rapid Non-nested Reverse Transcriptase-PCR Assay for Vertebrate Flavivirus Subgroups Using a Novel Universal Single Primer Pair Based on a Conserved Region of NS5 Gene Sequences. The XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM). Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27, 2012.

中道 一生, 井上直樹, 倉根一郎, 林 昌宏, 西條政幸: 進行性多巣性白質脳症が疑われた患者の脳脊髄液におけるヘルペスウイルスの出現プロファイルの解析, 第17回日本神

経感染症学会総会（京都市）2012年10月19-20日。

林 昌宏，網 康至，藤井克樹，北浦一孝，モイメンリン，白井顕治，小滝 徹，須崎百合子，森川 茂，西條政幸，鈴木隆二，倉根一郎，高崎智彦：マーモセットを用いたチクングニアウイルスの霊長類モデルの検討，第60回日本ウイルス学会学術集会（大阪市）2012年11月13-15日。

伊藤（高山）睦代，中道一生，林 昌宏，山口（木下）一美，垣内 五月，王 麗欣，倉根一郎，西條政幸：乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン国家検定法における3Rsの導入，第60回日本ウイルス学会学術集会（大阪市）2012年11月13-15日。

山口（木下）一美，中道一生，伊藤（高山）睦代，林 昌宏，倉根 一郎，西條 政幸：LAMP法を用いたPML患者の脳脊髄液中のJCウイ

ルスの検出および定量試験，第60回日本ウイルス学会学術集会（大阪市）2012年11月13-15日。

M. L. Moi, C. K. Lim, M. Saijo, T. Takasaki, I. Kurane. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using Fc γ R-expressing cells. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) 61st Annual Meeting. Atlanta, Georgia USA. November 11-15, 2012.

I. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし



図 1. フラビウイルス共通プライマーによる増幅産物の系統樹解析：フラビウイルス断片の塩基配列をダイレクトシーケンシングの結果、各クラスターを形成した。(カッコ内は共通プライマーにより決定した増幅産物の系統番号、§は本研究において解析された増幅産物)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kaku Y., Noguchi A., Hotta K., Yamada A., Inoue S.	Inhibition of rabies virus propagation in mouse neuroblastoma cells by an intrabody against the viral phosphoprotein.	Antiviral Res.	91	64-71	2011
Kaku Y., Noguchi A., Marsh G.A., Barr J.A., Okutani A., Hotta K., Bazartseren B., Fukushi S., Broder C.C., Yamada A. and Inoue S., Wang L.-F.	Second generation of pseudotype-based serum neutralization assay for Nipah virus antibodies: Sensitive and high-throughput analysis utilizing secreted alkaline phosphatase.	J. Virol. Methods	179	226-232	2012
Kaku, Y., Noguchi, A., Marsh, A.G., Barr, A.J., Okutani, A., Hotta, K., Bazartseren, B., Broder, C.C., Yamada, A., Inoue, S., and Wang, L.-F.	Antigen capture ELISA system for henipaviruses using polyclonal antibodies obtained by DNA immunization.	Arch. Virol	157	1605-1609	2012
Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y	Young Japanese women after traveling to Southeast Asia	Intern Med.	49 (5)	491-495	2010
倉田季代子, 貫井義久, 島田裕之, 井上幸久, 吉村信行, 堀野敦子	ベトナムから帰国後空洞病変で発症し, 再燃時多発肺結節を認めたメリオイドーシスの1例	日本呼吸器学会雑誌	Vol. 49, No. 6	443-448	2011

Kenri T, <u>Horino A</u> , Matsui M, Sasaki Y, Suzuki S, Narita M, Ohya H, Okazaki N, Shibayama K.	Complete genome sequence of Mycoplasma pneumoniae type 2a strain 309, isolated in Japan	J Bacteriol.	Mar;194(5)	1253-1254	2012
Kenri T, Ohya H, <u>Horino A</u> , Shibayama K	Identification of Mycoplasma pneumoniae type 2b variant strains in Japan	J Med Microbiol	Nov;61(Pt 11)	1633-1635	2012
Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iizuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T.	Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection.	Mod Pathol	25	1-13	2012
Ablordey A, Amissah DA, Aboagye IF, Hatano B, Yamazaki T, Sata T, Ishikawa K, Katano H	Detection of Mycobacterium ulcerans by the loop mediated isothermal amplification method	PLoS Negl Trop Dis		6:e1590	2012
Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T.	Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam	Mod Pathol	23-Nov	doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]	2012
片野晴隆、佐藤由子、佐多徹太郎、長谷川秀樹	病原体の同定. 病理解剖マニュアル	病理と臨床	30	269-277	2012

Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S.	Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008.	J Virol	87	1105-1114	2013
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.	8	189	2012
Nakano M., Yamasaki E., Ichinose A., Shimohata T., Takahashi A., Akada K. J., Nakamura K., Moss J., Hirayama T., and Kurazono H.	<i>Salmonella</i> enterotoxin, Stn, regulates membrane composition and integrity.	Disease Models and Mechanisms	5	515-521	2012
Sashida H, Sasaoka F, Suzuki J, Fujihara M, Nagai K, Fujita H, Kadosaka T, Ando S, Harasawa R	Two Clusters among <i>Mycoplasma haemomuris</i> Strains, Defined by the 16S-23S rRNA Intergenic Transcribed Spacer Sequences.	J Vet Med Sci. (in press)			
Gaowa, Ohashi N, Aochi M, Wurutu, Wu D, Yoshikawa Y, Kawamori F, Honda T, Fujita H, Takada N, Oikawa Y, Kawabata H, Ando S, Kishimoto T	Rickettsia in ticks, Japan	Emerging Infectious Diseases	19	338-340	2013
Sakamoto N, Nakamura-Uchiyama F, Kobayashi K, Takasaki T, Ando S, Iwabuchi S, Ohnishi K	Murine Typhus with Shock and Acute Respiratory Failure in a Japanese Traveler after Returning From Thailand.	J Travel Med.	20	50-53	2013
安藤秀二	ペストコントロール技術セミナー「怖いダニ類媒介性感染症～地域毎の情報を発信することが大事」	ペストコントロール	160	27-31	2012

安藤秀二	リケッチア	平松啓一監修, 中込治, 神谷茂編集, 標準微生物学	11	318-324	2012
------	-------	----------------------------	----	---------	------

