

本土で分離された EV71 分離株の分子疫学的解析およびウイルス学的解析は、きわめて重要である。本研究では、中国 CDC および感染研ウイルス第二部とのあいだの疫学および実験室診断技術に関する情報共有体制を基盤として、EV71 分離株の分子疫学的解析およびウイルス学的解析を行う。

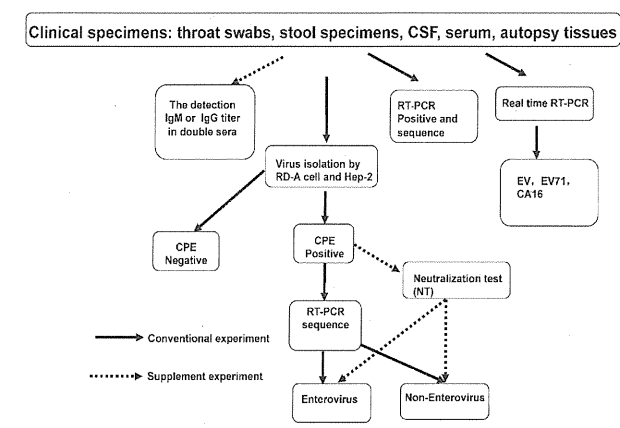
## B. 研究方法

中国における手足口病流行および病原体サーベイランスに関する最新情報は、中国 CDC 側研究分担者である Dr Xu Wenbo および研究協力者である Dr Zhang Yong から情報提供を受けた。

中国では、手足口病は、2008 年 5 月より、全国レベルのサーベイランスによる全数届出対象疾患となり、2008～2012 年の期間で、約 720 例の手足口病症例が報告された。手足口病報告例のうち、約 3.7% について実験室診断が行われた。手足口病実験室診断は、中国国内エンテロウイルス実験室ネットワークにおいて実施されており、咽頭拭い液や糞便等の臨床検体を用いた、培養細胞を用いたウイルス分離、RT-PCR 法、あるいは real-time PCR 法による遺伝子検出が行われている。中国における手足口病実験室診断フローの概要を以下に示す(図 1)。

図 1

HFMD Cases Flow Chart for Laboratory Identification



現在、中国で分離された病原体の外国研究機関への分与は困難であり、今回の共同研究においても、中国で分離された EV71 株の分与を受けることは出来なかった。感染研ウイルス第二部では、現在中国で伝播している EV71 株(遺

伝子型 C4)と分子系統学的な近縁な遺伝子型 C4 株を含む、これまで報告されている全ての遺伝子型の EV71 標準株パネルを作成し、遺伝子解析、および、受容体特異性・抗原性等のウイルス学的性状の解析を行った。

## C. 研究結果

### 1) 中国で分離された EV71 株の分子疫学解析

手足口病サーベイランスにより得られた中国全土の EV71 分離株の分子疫学的解析を行い、1996～2012 年にかけて中国で検出された EV71 分離株のほとんどが遺伝子型 C4 に属することが確認された。中国の EV71 分離株の、より詳細な系等解析によると、中国の遺伝子型 C4 は、C4a と C4b に細分類される。遺伝子型 C4b 株は、1998～2004 年にかけて深圳や上海等中国の一部地域で検出され、台湾やタイでも近縁株が報告されているが、中国では 2005 年以降検出されていない。遺伝子型 C4a 株は、遺伝子型 C4b 株と入れ替わるように、2003 年以降出現し、現在中国全土で、ほぼ唯一の EV71 遺伝子型として広範に伝播している。2007 年以降、中国では重症 EV71 感染症症例からの EV71 検出事例が増加しているが、これらの近年の重症例には遺伝子型 C4a 株が関与している。中国で分離された遺伝子型 C4 の EV71 株と分子系統学的に近縁な EV71 分離株は、中国本土以外の、台湾、日本、ベトナム(2011～2013 年)、カンボジア(2012 年)等でも近年報告されており、ベトナムおよびカンボジアでは、死亡例を含む EV71 感染症重症例の流行に関与している。

### 2) 異なる EV71 遺伝子型株のウイルス学的性状の解析

現在報告されている 11 種類の EV71 遺伝子型 A、B1～B5 および C1～C5 について、標準ウイルス株を収集した。従来、当室で、研究・検査等に使用し、論文として報告済みの EV71 標準株以外の標準株については、研究目的での分与についての了解を得た上で、台湾 CDC、韓国 CDC、オランダ RIVM、山形衛研等から分与を受けた。新たにウイルスストックを調整するとともに、ウイルス力価やカプシド領域の塩基配列、EV71 特異的受容体結合性等、基本的ウイルス学的性状を解析し、EV71 遺伝子型標準株パネルを調整し、中国 CDC へ分与した。EV71 標準株パネル中、日本で分離された C4 株(75-Yamagata 株)

は、現在、中国本土で伝播している C4 株と分子系統学的に近縁であることから、遺伝子型 C4 標準株として受容体特異性等ウイルス学的性状の解析に用いた。

EV71 分離株には、リンパ球特異的宿主受容体 PSGL-1 に結合する株、結合しない株が存在する。Jurkat 細胞を用いた PSGL-1 依存性増殖の解析により、EV71 標準株パネルでは、EV71 プロトタイプ株 (BrCr-A 株)、Nagoya-B1 株、02363-C1 株等が、PSGL-1 非結合株 (Non-PB 株) と同定された (表 1)。また、C7-Osaka-B4 株、KED005-C1 株等が PSGL-1 結合株 (PB 株) であることが明らかとなった。中国本土で伝播している C4 株と分子系統学的に近縁である 75-Yamagata-C4 株は PB 株と同定された。PB 株および Non-PB 株の EV71 のカプシド領域のアミノ酸配列のアライメントにより、多くの PB 株では VP1-98E/145G がみられ、一方、Non-PB 株では VP1-98K/145E が多く認められることが明らかとなり、VP1-98/145 は、PSGL-1 受容体結合性を規定する重要なアミノ酸であることが示唆された。感染性クロン由来 PB 株および Non-PB 株を用いたその後の解析により、PSGL-1 受容体結合性を規定する主要なアミノ酸は VP1-145 であること、VP1-145G あるいは VP1-145Q を有する EV71 株は PSGL-1 に結合すること、また、VP1-145E を有する EV71 は PSGL-1 に結合しないことが明らかとなった。EV71 結晶構造では VP1-145 はウイルス表面で VP1-244 リシンと隣接し、リシン側鎖の向きに影響すると推測された。VP1-145 のアミノ酸の種類がスイッチとなり VP1-244 リシン側鎖の向きを変え、PSGL-1 結合性を制御すると考えられる。

表 1 異なる遺伝子型の EV71 標準株の PSGL-1 受容体結合性

Strain (genogroup)	PSGL-1-binding	VP1-98	VP1-145
BrCr (A)	Non-PB	K	R
Nagoya (B1)	Non-PB	E	E
Taiwan (B1)	Non-PB	E	E
02363 (C1)	Non-PB	K	E
209-VN (C5)	Non-PB	K	E
11316 (B2)	PB	E	Q
SK-EV006 (B3)	PB	E	G
C7/Osaka (B4)	PB	E	G
2972-Yamagata (B5)	PB	E	G
KED005 (C1)	PB	E	G/Q
1095 (C2)	PB	E	G
KOR-EV71-01 (C3)	PB	K/E	E
75-Yamagata (C4)	PB	E	Q

### 3) EV71 カプシド VP1 amino acid polymorphism とウイルス学的性状の関連性

異なる受容体特異性を有する EV71 標準株パネルを用いた解析により、PSGL-1 受容体結合性を規定する主要なアミノ酸は VP1-145 であることが明らかとなった。現在、多くの EV71 分離株のカプシド VP1 遺伝子情報が、データベースに報告されているため、ウイルス学的性状に寄与する可能性が高いアミノ酸部位の VP1 amino acid polymorphism を解析した。データベース上の EV71 分離株のカプシド塩基配列解析によると、VP1-145E を有する EV71 株の頻度をもっとも高く、VP1-145G あるいは VP1-145Q も認められたが、VP1-145E と比較すると検出頻度は低かった (表 2)。以上の結果から、Non-PB 株の頻度が高いものの、VP1-145G あるいは VP1-145Q を有する PB 株も、ある程度の頻度で認められることが明らかとなった。VP1-145 は、VP1 領域の中では、高頻度の変異により多様性を有するアミノ酸部位であり、アミノ酸多様性と受容体特異性の関連性について、今後の検討が必要とされる。中国で近年分離されている EV71-C4 株のほとんどは VP1-145E を有しており、中国の EV71 株の多くは Non-PB 株であることが示唆される。しかし、頻度は低いものの、VP1-145G/Q 株の検出も報告されおり、VP1-145 の多様性とその意義について、さらなる解析が必要とされる。

表 2 データベース上の EV71 株における PSGL-1 受容体結合部位 (VP1-98/VP1-145) の amino acid polymorphism (1701 株)

98	145					
	G	Q	E	R	K	A
E	156	155	1209	2	5	5
K	0	0	161	1	0	0
Q	0	0	2	0	0	0
N	0	0	1	0	0	0
G	0	0	1	0	0	0

#### D. 考察および今後の研究方針

1990年代後半以降、東アジア地域で、小児急性死症例を含む重症 EV71 エンテロウイルス感染症の大規模な流行が多発し大きな社会問題となっているが、中国本土では、2008年以來、多数の死亡例を含む手足口病流行が報告されている。中国で近年伝播している EV71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、ほぼすべての EV71 株が、中国本土固有の遺伝子型 C4 に属することが明らかとなった。中国で分離された遺伝子型 C4 の EV71 株と分子系統学的に近縁な EV71 分離株は、中国本土以外の、台湾、日本、ベトナム等でも近年報告されている。他の地域では、異なる遺伝子型の流行・伝播が頻繁に認められるのに対し、中国本土で検出される EV71 株は、ほとんどすべて遺伝子型 C4 しか検出できない点は、中国で伝播している EV71 の分子疫学的特徴と考えられる。

PSGL-1 受容体結合性を規定する主要なアミノ酸は VP1-145 であり、VP1-145 のアミノ酸の種類がスイッチとなり VP1-244 リシン側鎖の向きを変え、PSGL-1 結合性を制御することが明らかとなった。VP1-244 リシンは、ほとんどの EV71 分離株で保存されているが、VP1-145 は高頻度に変異し、高度のアミノ酸多様性を有している。我々は最近、VP1-98/145 が EV71 中和抗体結合に関与する主要な抗原エпитープのひとつであることを明らかにした。このことは、EV71 遺伝子型に反映されない、ひとつ、あるいは、数個のカプシドアミノ酸変異により、抗原性や受容体特異性等 EV71 のウイルス学的性状が大きく変化することを示唆している。中国では現在、数施設により、不活化 EV71 ワクチン開発が進められている。一部のワクチン候補については、現在、臨床試験が終了し、近い将来の導入が期待されている。EV71 の遺伝的・ウイルス学的多様性および抗原性の違いについての解析が、今後のワクチン開発・導入にとって重要となる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shimizu H, Nakashima K. Surveillance of hand, foot, and mouth disease for a vaccine. *Lancet Infect Dis*. (in press) 2014
- 2) Yasui Y, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Kanou K,

- Kobayashi M, Konagaya M, Fujimoto T. A Case of Atypical Hand-Foot-and-Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6: Differential Diagnosis from Varicella in a Pediatric Intensive Care Unit, *Jpn J Infect Dis* 66, 564-566, 2013
- 3) Lee H, Cifuentes JO, Ashley RE, Conway JF, Makhov AM, Tano Y, Shimizu H, Nishimura Y, Hafenstein S. A Strain-Specific Epitope of Enterovirus 71 Identified by Cryo-Electron Microscopy of the Complex with Fab from Neutralizing Antibody. *J Virol*; 87(21): 11363-11370. 2013
- 4) Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, Kataoka C, Wakita T, Bergelson JM, Shimizu H. Enterovirus 71 Binding to PSGL-1 on Leukocytes: VP1-145 Acts as a Molecular Switch to Control Receptor Interaction. *PLoS Pathog*;9(7):e1003511. 2013
- 5) Hovi T, Paananen A, Blomqvist S, Savolainen-Kopra C, Al-Hello H, Smura T, Shimizu H, Nadova K, Sobotova Z, Gavrilin E, Roivainen M. Characteristics of an Environmentally Monitored Prolonged Type 2 Vaccine Derived Poliovirus Shedding Episode that Stopped without Intervention. *PLoS One*;8(7):e66849. 2013
- 6) Kobayashi M, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Enomoto M, Okabe N, Kanou K, Konagaya M, Oishi K, Fujimoto T. Clinical manifestations of coxsackievirus a6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan. *Jpn J Infect Dis* 66, 260-261, 2013
- 7) Burns CC, Shaw J, Jorba J, Bukbuk D, Adu F, Gumede N, Pate MA, Abanida EA, Gasasira A, Iber J, Chen Q, Vincent A, Chenoweth P, Henderson E, Wannemuehler K, Naeem A, Umami RN, Nishimura Y, Shimizu H, Baba M, Adeniji A, Williams AJ, Kilpatrick DR, Oberste MS, Wassilak SG, Tomori O, Pallansch MA, Kew O. Multiple Independent Emergences of Type 2 Vaccine-Derived Polioviruses during a Large Outbreak in northern Nigeria. *J Virol* 87: 4907-4922, 2013
- 8) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Oxysterol-binding protein (OSBP) family I is the target of minor enviroxime-like compounds. *J Virol* 87: 4252-4260, 2013
- 9) Khamrin P, Thongprachum A, Kikuta H, Yamamoto A, Nishimura S, Sugita K, Baba T, Kobayashi M, Okitsu S, Hayakawa S, Shimizu H, Maneekarn N, Ushijima H. Three clusters of Saffold viruses circulating in children with diarrhea in Japan. *Infect Genet Evol* 13: 339-343, 2013
- 10) Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J Virol* 87: 701-705, 2013

- 11) 清水博之: 手足口病の大規模流行と原因ウイルス. 日本医事新報 4673, 56-57, 2013
- 12) 清水博之: 東アジア地域を中心とした手足口病流行の現状、感染症 43, 50-51, 54-59, 2013

## 2. 学会発表等

- 1) Shimizu H. Hand, Foot, and Mouth Disease and infectious agent surveillance in Japan. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013
- 2) Shimizu H. Molecular Epidemiology and Virulence (viral) factors of EV71. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013
- 3) Shimizu H. Current status of hand, foot, and mouth disease outbreaks and EV71 infection in Japan and Asian countries, The 7th China-Korea-Japan Forum on Communicable Disease Control and Prevention, Beijing, China, 25 November, 2013
- 4) 有田峰太郎、小島宏建、長野哲雄、岡部隆義、脇田隆字、清水博之: OSBP ファミリー-I は minor enviroxime 様化合物の標的である. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市、11 月 10~12 日, 2013
- 5) 西村順裕、Hyunwook Lee、Susan Hafenstein、片岡周子、脇田隆字、Jeffrey M. Bergelson、清水博之: エンテロウイルス 71 と受容体 PSGL-1 との結合: VP1-145 は受容体特異性を制御する分子スイッチである. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市、11 月 10~12 日,

- 2013
- 6) 潮田和佳、小谷治、岩田奈織子、鈴木忠樹、中島典子、長谷川秀樹、清水博之、永田典代: コクサッキーウイルス B2 実験室株脳内接種後のマウスにおける水頭症の発症機序. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市、11 月 10~12 日, 2013
- 7) 飯塚節子、清水博之: RD-A 細胞を用いた Human enterovirus A の分離. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市、11 月 10~12 日, 2013
- 8) 片岡周子 西村順裕 鈴木忠樹 小谷治 岩田奈織子 永田典代 網康至 清水博之: エンテロウイルス 71 のカニクイザルにおける病原性の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市、11 月 10~12 日, 2013
- 9) 小谷治、Naeem Asif、鈴木忠樹、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代: 新生仔マウスを用いた Saffold virus 小脳継代株の作出とその病原性の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市、11 月 10~12 日, 2013
- 10) 小谷治、Naeem Asif、鈴木忠樹、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、細見卓司、塚越博之、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代: 新生仔マウスを用いた Saffold virus(SAFV)患者由来株の病原性の比較解析. 岐阜市、9 月 20~22 日, 2013
- 11) 清水博之: アジアにおける手足口病とエンテロウイルス感染症流行の現状. 第 87 回日本感染症学会学術講演会・第 61 回日本化学療法学会総会合同学会、シンポジウム「世界的視野でみる感染症疫学とその対策」. 横浜市、6 月 5 日, 2013

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と  
共同研究体制の強化に関する研究

レジオネラおよび肺炎球菌の分子疫学

研究分担者	倉 文明	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	前川純子	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	常 彬	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨：レジオネラ症の主要起因菌である *Legionella pneumophila* について、分子疫学的手法である sequenced based typing (SBT) 法は有用である。SBT 法は結果が ST 型で示されるので、菌株間の異同の確認が容易で、データベース化され、世界規模でのデータが蓄積してきている。日本、中国両国の分離株についても SBT 法による比較が可能である。

肺炎球菌の分子疫学解析に用いる方法は Multi Locus Sequencing Type (MLST) である。

A. 研究目的

レジオネラ症はレジオネラ属菌を起因菌とした呼吸器感染症で、日本では入浴施設においてしばしば集団感染事例が起きる。諸外国ではホテルの給湯設備や、空調の冷却塔水などによる集団感染事例が報告されている。レジオネラ症の感染源を明らかにするためには患者から分離された菌株と感染源と推測される環境水から分離された菌株の異同を確認する必要がある。Sequence Based Typing (SBT) 法はレジオネラ症の主要な起因菌である *Legionella pneumophila* の遺伝子型別法だが、デジタルデータであるため、年代、場所を超えた比較が容易であるため近年広く普及している。今年度も引き続き、日本各地の環境から分離された *L. pneumophila* 血清群 1 株の

SBT を行った。

肺炎球菌は肺炎などの呼吸器感染症において最も高頻度に分離される病原細菌のひとつであり、临床上極めて重要な細菌である。本来であれば菌が検出されない場所(血液や脳脊髄液など)から菌が検出される病態(髄膜炎、菌血症など)を特に侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) と呼ぶ。2013 年 4 月に 7 価肺炎球菌結合型ワクチンが定期接種 (A 類) の対象となったことを踏まえ、同時期から IPD が感染症法に基づく感染症発生動向調査において 5 類全数届出疾患となった。肺炎球菌の構成成分である莢膜は複合多糖体で構成され、これによって血清型が決定される。2011 年現在では、肺炎球菌は 93 種類の血清型に分離された。近年、同一血清型の肺炎球菌を分類するため、

Multi Locus Sequencing Type (MLST) 法が広く使われている。我々は昨年度に引き続き、本年度は小児および成人侵襲性感染症患者から分離された肺炎球菌それぞれ 141 株と 34 株の MLST を調べた。

## B. 方法

EWGLI (European Working Group for Legionella Infections)の方法 (<http://www.ewgli.org/>) に従って、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部の領域の塩基配列に基づく型別 (SBT) を行い、遺伝子型を決定した<sup>1,2)</sup>。*flaA* は鞭毛 (flagellin)タンパク質、*pilE* は IV 型線毛(type IV pilin)タンパク質、*asd* はスレオニン生合成系酵素であるアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(aspartate-b-semialdehyde dehydrogenase)、*mip* は宿主マクロファージへの感染に寄与する(macrophage infectivity potentiator)タンパク質、*mompS* は主要外膜タンパク質(major outer membrane protein)、*proA* は亜鉛メタロプロテアーゼ(zinc metalloprotease)、*neuA* は N-アシルノイラミン酸シチジルトランスフェラーゼ (*N*-acetylneuraminate cytidyltransferase)をそれぞれコードする遺伝子である。7 遺伝子の遺伝子型が決まった分離株を EWGLI のデータベース<sup>3)</sup>に登録すると、新しい遺伝子型の組み合わせについては ST (sequence type)ナンバーが付与される。

肺炎球菌の血清型は、Statens Serum Institut 製血清を用い莢膜膨潤法により決定した。MLST では、分離株の 7 つ Housekeeping gene (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*) の配列を決

定し、<http://spneumoniae.mlst.net> にて検索を行い、Sequence type (ST) を決定した。7 つ遺伝子のうち、5 つ以上の遺伝子は同じである場合、同一の Clonal Complex (CC) に分類する。

## C. 研究結果

今年度解析した *L. pneumophila* 血清群 1 分離株の遺伝子型別の結果を表 1 に示した。冷却塔水 (12 株中 11 株)、浴槽水 (10 株中 1 株)、噴水 (7 株中 4 株)、シャワー (2 株中 2 株)、給湯水 (3 株中 1 株) のいずれの由来からも ST1 株が分離された。土壌由来株 2 株はいずれも ST1 ではなかった。したがって ST1 の頻度は由来により異なっていた。

175 株肺炎球菌のうち、7 株はデータベースに登録されていない新規 ST タイプであった。肺炎球菌は血清型によって、違った ST 型を示すことが多く見られた。昨年度の報告に比べ、多様な ST 型がみられた(表 2)。小児および成人由来肺炎球菌の間に ST 型の違いが見られなかった。昨年と同様に、世界中多くの地区から分離される ST 型 (血清型 3 型の ST180、15A 型の ST63、19F 型の ST236、22F 型の ST433 など) は日本での分離も見られた。欧米や韓国などで 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) が導入された以後に分離率の増加が見られた ST320 型 19A 肺炎球菌<sup>4)</sup>は日本国内からも多数が分離された (11 株)。

## D. 考察

日本のレジオネラ症の半数近くの感染源が入浴施設と推定されているが、言い換えれば、

半数以上は感染源が不明であり、入浴施設以外の感染源についても注意を払う必要がある。今年度解析した環境分離株の遺伝子型の多くは臨床分離株からも見出されるものであり、レジオネラ症の感染源となる危険があり、十分な衛生管理が必要である。

SBT 法は、データベース化が容易であり、異なる時期、場所での結果の比較が可能である。2014年2月7日現在、レジオネラ SBT データベースに 8,300 株の *L. pneumophila* の遺伝子型が登録されているが、そのうち日本由来の分離株は 513 株、中国由来の分離株は 288 株となっており、特にこの 1、2 年の中国からの登録数は増えている。中国からの登録のほとんどは環境分離株で、臨床分離株は香港からの登録のみであったが、今年度は初めて中国 CDC から 3 株の臨床分離株の遺伝子型の登録があった。

肺炎球菌感染において、最も重要な病原因子が莢膜であるため、血清型別は疫学調査には不可欠な方法となっている。しかし、MLST 解析は同一血清型を示す肺炎球菌をさらに分類できる方法で、得られた ST 型は肺炎球菌の遺伝情報を示し、異なる地域や時期に分離された肺炎球菌の違いを比較できる再現性の良い方法である。また、肺炎球菌においては、MLST 法は結合型ワクチン導入後の Capsular switching (ワクチンに含まれる血清型の肺炎球菌の莢膜遺伝子が非ワクチン血清型の遺伝子と置き換わる現象)<sup>4)</sup> を観測できる有効な方法である。中国においても 2009 年に PCV7 ワクチンが導入されていたが、侵襲性感染症を含む肺炎球菌感染症の実態およびワクチンの効果が不明である。中国側の肺

炎球菌感染症由来株の血清型と共に MLST の疫学調査および日本の分離株との比較は今後取り組んでいく課題である。

## E. 結論

SBT (MLST) 法により、分離株の遺伝子型別・比較が容易に行えるようになった。データベースも完備しているため、世界各国の菌株との比較が容易である。

## 謝辞

今回解析した分離株を分与くださった縣邦雄・井上浩章 (アクアス株式会社)、江川武・佐々木林子 (文京保健所)、内田順子 (香川県環境保健研究センター)、林 千尋 (尼崎市立衛生研究所)、(敬称略) の諸氏に感謝いたします。

## F. 参考文献

- 1) Gaia, V, Fry, NK, Afshar, B, Lück, PC, Meugnier, H, Etienne, J, Peduzzi, R, and Harrison, TG. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 43:2047-52.
- 2) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. 2007. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acylneuraminate cytidylyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J. Clin. Microbiol.

- 45:1965-8.
- 3) [http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)
- 4) Pillai DR, Shahinas D, Buzina A, Pollock RA, Lau R, Khairnar K, Wong A, Farrell DJ, Green K, McGeer A, and Low DE. 2009. Genome-wide dissection of globally emergent multi-drug resistant serotype 19A *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Genomics* 10:642.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Otsuka T, Chang B, Wada A, and Okazaki M. 2013. Molecular epidemiology and serogroup 6 capsular gene evolution of pneumococcal carriage in a Japanese birth cohort study. *J. Med. Microbiol.* 62:1868-1875.

Ueno M, Ishii Y, Tateda K, Anahara Y, Ebata A, Iida M, Mizuno F, Inamura S, Takahata K, Suzuki Y, Chang B, Wada A, Sugita M, Tanaka T, Nishiwaki Y. 2014. Changes in *Streptococcus pneumoniae* Serotypes in the Nasopharynx of Japanese Children after Inoculation with a Heptavalent Pneumococcal Conjugate Vaccine. *J. Infect. Dis.* 67:40-43.

Kanatani JI, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, and Watahiki M.

2013. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads by sequence-based typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(13):3959-3966.

Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, and Watahiki M. 2013. Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group of clinical isolates in Toyama prefecture, Japan. *J. Infect. Chemother.* 19:644-52,

##### 2. 学会発表

Amemura-Maekawa J, Koyano M, Yamazaki T, Murai M, Ohnishi M, and Kura F. Identification of *Legionella pneumophila* subspecies in clinical and environmental isolates in Japan using the microplate DNA-DNA hybridization method. *Legionella 2013 (the 8th International Conference on Legionella)*, Melbourne, Australia, Oct.-Nov. 2013.

Kanatani J-I, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Amemura-Maekawa J, Kura F, Sata T, Watahiki M. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads by sequence-based typing. *Legionella 2013*



(the 8th International Conference on *Legionella*), Melbourne, Australia, Oct.-Nov. 2013.

of legionellosis in Japan, Jan 2008 - Dec 2012. *Legionella* 2013 (the 8th International Conference on *Legionella*), Melbourne, Australia, Oct.-Nov. 2013.

Kura F, Amemura-Maekawa J, Ohnishi M, Saito T, Kinoshita H, Yoshikura H, Sunagawa T, and Ohishi K. *Epidemiology*

NIIB番号	由来	分離年	遺伝子型ST	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>
NIIB0425	冷却塔水	2004	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB2978	冷却塔水	2011	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB2979	冷却塔水	2011	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB2980	冷却塔水	2011	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB2981	冷却塔水	2012	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB2982	冷却塔水	2012	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB2983	冷却塔水	2012	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB2984	冷却塔水	2012	59	7	6	17	3	13	11	11
NIIB2985	冷却塔水	2012	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB2987	冷却塔水	2012	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB2988	冷却塔水	2012	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB2989	冷却塔水	2013	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB2974	浴槽水	2011	1544	6	10	19	12	19	4	6
NIIB2975	浴槽水	2012	642	2	10	3	10	9	14	6
NIIB2976	浴槽水	2012	2	6	10	19	3	19	4	9
NIIB2977	浴槽水	2011	1545	3	10	1	6	9	9	9
NIIB3019	浴槽水	2013	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB3022	浴槽水	2013	22	2	3	6	10	2	1	6
NIIB3023	浴槽水	2013	137	6	10	21	6	9	4	9
NIIB3073	浴槽水	2013	138	10	12	7	3	16	18	6
NIIB3074	浴槽水	2013	137	6	10	21	6	9	4	9
NIIB3075	浴槽水	2013	1624	2	10	3	6	9	4	38
NIIB3005	噴水	2006	48	5	2	22	27	6	10	12
NIIB3006	噴水	2006	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB3007	噴水	2006	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB3008	噴水	2006	954	3	6	1	10	14	11	6
NIIB3009	噴水	2007	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB3010	噴水	2007	127	3	13	1	10	14	9	11
NIIB3011	噴水	2007	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB0119	土壌		1543	2	10	5	47	18	14	6
NIIB0208	土壌	1982	593	2	3	40	13	2	1	6
NIIB3018	シャワー	2013	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB3079	シャワー	2013	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB1238	給湯水	2006	1077	3	6	1	1	14	11	1
NIIB1790	給湯水	2006	1	1	4	3	1	1	1	1
NIIB2238	給湯水	2007	142	2	10	3	13	9	4	18



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）  
分担研究報告書

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の  
強化に関する研究（H23-新興-指定-020）

Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS: 重症発熱性血小板減少症)の  
実験室診断法に関する研究

研究分担者 森川 茂 (国立感染症研究所獣医科学部)

研究要旨： SFTS (severe fever with thrombocytopenia syndrome ; 重症熱性血小板減少症候群) ウイルスは 2011 年に中国で同定された新規ブニヤウイルスで、2013 年 1 月には本ウイルスに感染した国内初の SFTS 患者が報告された。このウイルスは中国において、フタトゲチマダニやオウシマダニからウイルス遺伝子が検出されておりマダニ媒介性のウイルスである可能瀬が示唆されている。しかし 2013 年 4 月の段階において、国内の SFTS ウイルスを保持するダニ種、陽性率、個体あたりのウイルス量、季節性変動性、陽性マダニの国内分布等は全く不明であった。そこで、本研究ではマダニにおける SFTS ウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法の確立するための陽性コントロールプラスミドの構築と、反応試薬の選択を目的とし検討を行った。

研究協力者：宇田晶彦、木村昌伸、加来義浩、野口章、今岡浩一（同獣医科学部）、福士秀悦、福岡藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸（同ウイルス第 1 部）

A. 研究目的

SFTS (severe fever with thrombocytopenia syndrome ; 重症熱性血小板減少症候群) ウイルスは 2011 年に中国で同定された新規ブニヤウイルスである。このウイルスに感染したヒトの症状は、発熱、消化器症状、血小板減少、白血球数減少等の特徴とし、年齢が高いほど重症例と死亡率が高くなる傾向がある。2013 年 1 月に日本国内において初めての SFTS 患者が確認され、現在では RT-PCR 法による患者の診断検査体制が全国に整備されている。

中国においてフタトゲチマダニ (5.4%)

およびオウシマダニ (0.6%) から SFTS ウイルス遺伝子が検出されたが、一方で蚊等の昆虫からはこのウイルス遺伝子が検出されなかった事から、SFTS はマダニ媒介性の感染症であると考えられている。また、ヤギ (80%)、ヒツジ (70%)、ウシ (60%)、イヌ (38%) 等の動物からウイルス抗体が検出されており、マダニと動物間でウイルスが保持されている可能性が示唆されている。しかし動物からヒトへの感染は報告されておらず、ヒトへの感染はマダニによる刺咬が主因であると考えられている。

2013 年 4 月の段階において、国内の SFTS ウイルスを保持するダニ種、陽性率、個体あたりのウイルス量、季節性変動性、陽性マダニの国内分布等は全く不明であった。そこで、本研究ではマダニにおける

SFTS ウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法の確立するための陽性コントロールプラスミドの構築と反応試薬の選択を目的とした。

## B. 研究方法

### 陽性コントロールプラスミドの構築

SFTS ウイルス YG1 株を感染した Huh7 細胞の培養上清から、IsogenII を用いてウイルスゲノム RNA を精製した。得られた RNA を鋳型とし、ウイルスの S セグメントを増幅する pSFTS-S-22s および pSFTS-S-541a プライマー（表 1）と Invitrogen SuperScript III One-Step RT-PCR System with PlatinumTaq (Life Technologies) で増幅し得られた 520 bp の DNA 断片をプラスミドベクターに挿入した（図 2）。このプラスミドを用いて大腸菌 DH5a を形質転換し、カナマイシンを含む LB 寒天培地で選択後、カナマイシンを含む LB 培地で培養した。得られた菌体は遠心を用いて集菌し、NucleoBondXtra Midi (Macherey-Nagel) でプラスミドを精製した。

2 種類の制限酵素サイト (BamHI, EcoRV) と TaqMan プローブサイトから成る DNA 断片を挿入する為に、得られたプラスミドを鋳型とし PrimeSTAR Max Premix (Takara) と変異導入用プライマー (pSFTS-S-mut-s および pSFTS-S-mut-a : 表 1 および図 1) を用いて PCR を行い、ライゲーション処理を無しに大腸菌 DH5a (TOYOBO、Competent high DH5a) を形質転換し、カナマイシンを含む LB 寒天培地で選択後、カナマイシンを含む LB 培地で培養した。得られた菌

体は遠心を用いて集菌し、NucleoBondXtra Midi (Macherey-Nagel) を用いてプラスミドを精製した（図 2）。

### リアルタイム RT-PCR

SFTS ウイルスを検出するためのリアルタイム RT-PCR 試薬は TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Takara) および RNA-direct Realtime PCR Master Mix (Toyobo) を使用し、各々の推奨反応条件に改良を加え施行した。TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit を使用する際には 42°C 5 分間の RT 反応、95°C 10 秒間の熱変性後、50 サイクルのシャトル PCR (95°C 5 秒、60°C 35 秒) を行った。RNA-direct Realtime PCR Master Mix を使用する場合には、95°C 30 秒間の熱変性、61°C 20 分間の RT 反応、95°C 30 秒間の熱変性後、50 サイクルのシャトル PCR (95°C 5 秒、64°C 60 秒) を行った。このリアルタイム RT-PCR には SFTSV-S2-237 プライマー、SFTSV-S2-400a プライマー、SFTSV-S2-317MGB プローブ（表 1）を用いて増幅した。

### リアルタイム RT-PCR の増幅産物の特異性確認試験

制限酵素処理を行わない場合にはリアルタイム RT-PCR 反応液 3 $\mu$ l を電気泳動しウイルス由来増幅産物 (164bp) およびプラスミド由来増幅産物 (201bp) を識別した。制限酵素処理を行う場合には反応液反応液 3 $\mu$ l を 10 unit の制限酵素 (BamHI または EcoRV) と付属の緩衝液を添加しトータル 20 $\mu$ l の反応液で 37°C 1 時間インキュベ

ト後、4%アガロースゲルでウイルス由来増幅産物（164bp）およびプラスミド由来増幅産物（126+75bp）を確認した。

シーケンス解析を行うために、リアルタイム RT-PCR 反応液 5 $\mu$ l に 1/40 希釈した *illustraExoProStar* (GE ヘルスケア社) を添加し 37°C 1 時間インキュベート後、80°C 15 分間酵素変性処理を行った。得られたサンプルの中から 2 $\mu$ l を鋳型とし、*BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (GE ヘルスケア社) を用いてシーケンスサンプルを作製、*Sephadex G-50 Superfine* で精製、乾燥後 *Hi-Di Formamide* (GE ヘルスケア社) で溶解しシーケンスサンプルとした。シーケンス解析は *Applied Biosystems 3130* ジェネティックアナライザを用いた。

### C. 研究結果

#### 陽性コントロールプラスミドの構築

リアルタイム RT-PCR のコピー数を算出するために陽性コントロールプラスミドの構築を試みた。最初に構築したプラスミドはリアルタイム RT-PCR で増幅するウイルスの塩基配列 164bp を含む 520bp をプラスミドベクターに挿入した (図 2 左)。しかしながら、このプラスミドを陽性コントロールが増幅して得られた塩基配列と、ダニに含まれる SFTS ウイルス由来の増幅産物の塩基配列は一致するためコンタミネーションを識別することが困難である。そこで、新規の陽性コントロールプラスミドではリアルタイム RT-PCR で増幅する領域に、2 種類の制限酵素サイト (BamHI : GGATCC、EcoRV : GATATC) と TaqMan プローブ配列 (ggctaagcagttggtggtgcaggatg) を含

む配列を挿入した。この結果、リアルタイム RT-PCR による増幅がウイルス由来の PCR 産物か、プラスミドのコンタミか否かが迅速に判定可能となった (図 2 右)。

#### 電気泳動によるコンタミネーションの判定法の確認

最初に作出したプラスミド (旧陽性コントロールプラスミド) とウイルス由来の PCR 増幅産物のサイズは両者ともに 164 bp であり、電気泳動によるコンタミ識別は不可能であった (図 3)。一方で新プラスミド由来の PCR 増幅産物のサイズ (201 bp) はウイルス由来の増幅産物 (164 bp) よりも 37bp 大きく、4%アガロースゲルによる電気泳動でコンタミ識別が可能となった。更に新プラスミドの増幅産物は BamHI (157 および 44 bp) または EcoRV (126 および 75 bp) 制限酵素によって消化されるが、ウイルス由来の増幅産物には両制限酵素サイトは存在しない為、制限酵素処理を行っても 164 bp のままであるのでコンタミネーションを容易に判定可能となった (図 3)。

#### 2 色法リアルタイム RT-PCR によるコンタミネーションの判定法の確認

新しい陽性コントロールプラスミドを用いたリアルタイム RT-PCR 法では、反応液にウイルス配列と相補する FAM 標識 MGB プローブ (SFTSV-S2-317MGB) と陽性コントロールプラスミドと特異的に相補する HEX 標識 TaqMan プローブ (PosiContTaqman) を同時に添加すると、ウイルス由来増幅産物では FAM 標識 MGB プローブしか増幅されないが、プラスミド

由来増幅産物では FAM 標識 MGB プローブおよび HEX 標識 PosiContTaqman probe の増幅が認められ、コンタミネーションをリアルタイム RT-PCR 反応中にモニタリング可能となった (図 4)。

#### シーケンス解析によるコンタミネーションの判定の確認

リアルタイム RT-PCR 反応終了後の反応液をシーケンス解析する為に illustraExoProStar キットで処理を行った。このキットに含まれる大腸菌由来のエキソヌクレアーゼ I (Exo I) は PCR 産物中の過剰なプライマーなどの一本鎖 DNA を特異的に消化し、バクテリア由来の熱感受性アルカリフォスファターゼ (BAP) は PCR 産物に含まれる未反応 dNTPs のリン酸基を除去して dNTPs を不活性化する。これらの酵素は 80°C で容易に失活するので、酵素熱変性処理済み溶液をシーケンシングの鋳型としてそのまま使用した。アンチセンスプライマーを用いてシーケンス反応を行うと、プラスミド由来の増幅産物では 37bp の挿入配列が確認されるので、容易にコンタミネーションの判定を行うことが可能であった。

#### リアルタイム RT-PCR に用いるプライマーおよび MGB プローブの選定

ダニにおける SFTS ウイルスを効率よく特異的に検出する為に、ウイルスゲノム L セグメントに対して 4 種類のプライマーと 2 種類の MGB プローブ、M セグメントに対しては 8 種類のプライマーと 2 種類の MGB プローブ、S セグメントに対しては 8 種類のプライマーと 4 種類の MGB プロー

ブを設計した。様々な組合せでプライマーおよび MGB プローブの特異性及び検出効率を検討しするために、各セグメントの増幅領域を含む 520bp をプラスミドベクターに挿入し、リアルタイム RT-PCR 反応液に  $10^6$  コピー添加し増幅効率を検討した。この結果、S セグメントを標的にしたプライマー・MGB プローブセットが最も検出効率が高く、次いで L セグメント (S セグメントに対する増幅効率最高値: 1/110)、M セグメント (S セグメントに対する増幅効率最高値: 1/396) を標的としたプライマー・MGB プローブセットだった。これらの S セグメントを標的としたプライマー・MGB プローブセットの中で、最も増幅効率と特異性の高かった SFTSV-S2-237s センスプライマー、SFTSV-S2-400a アンチセンスプライマー、SFTSV-S2-317MGB プローブの組合せをダニからの SFTS ウイルス検出用のリアルタイム RT-PCR に用いる事とした。

#### リアルタイム RT-PCR 法に用いる増幅試薬の選択

SFTS ウイルスを検出するためのリアルタイム RT-PCR 試薬は TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Takara) および RNA-direct Realtime PCR Master Mix (Toyobo) を各々の推奨反応条件に改編を加え施行した (図 5)。両試薬の性能比較検討を行うにあたり同一のプライマー (SFTS-S2-237s、SFTS-S2-400a) と  $10^3$  から  $10^1$  コピー/反応に段階希釈した陽性コントロール用プラスミドを用意し解析を行った (図 6)。この結果、TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit では確実に 10 コピーに希釈し

た陽性コントロールプラスミドを検出することができたが、40 サイクル以降で鋳型を添加していない陰性コントロールでも偽増幅が観察された。一方で、RNA-direct Realtime PCR Master Mix 場合には陰性コントロールの義増幅は観察されないが、10 コピーに希釈した陽性コントロールプラスミドで 1/3 の割合で増幅が見られなかった。これらの結果から RNA-direct Realtime PCR Master Mix はやや増幅効率は劣るが非特異増幅が見られないことから、ダニサンプルの SFTS ウイルス検出に適していると推測された。

#### D. 考察

マダニ媒介性の SFTS（重症熱性血小板症候群）は、2013 年初頭に国内の患者が初めて確認された新興ウイルス感染症である。SFTS 患者発生を受けて、このウイルスを持つ動物やウイルス感染を媒介するマダニの国内分布を調査する為の SFTS ウイルス検出用検査法の確立は急務であった。一般的にウイルス感染症の確定診断にはウイルス分離が必要であったが結果判定までに数日必要であることから、近年では PCR 法を利用してウイルス遺伝子を迅速に検出する事で数時間で検査結果が得られるようになった。それらの PCR 法の中でも各ウイルス遺伝子の極めて特徴的な塩基配列に相補するよう設計されたプライマーとプローブを組合せたリアルタイム PCR は、信頼性と迅速性を兼ね備えた手法としてウイルス診断に汎用されつつある。SFTS 患者では血中のウイルス量が極めて高く、conventional RT-PCR で十分の感度で SFTS ウイルス遺伝子を検出できた。しかし、中国 CDC の

Porf. Mifang Liang、Porf. Li-Dexin らとの協議で、マダニのウイルス量は極めて低いことから、高感度で特異的なリアルタイム RT-PCR が必要であることが分かった。そこで、本研究では、マダニにおける SFTS ウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法の確立と、その際の陽性コントロールプラスミドの構築を目的とした。様々な検討の結果、RNA-direct Realtime PCR Master Mix（Toyobo）とウイルス特異的なプライマー・MGB プローブセット（表 1）を用いる事でダニが保持する SFTS ウイルスを迅速かつ特定的に検出できる可能性を明らかにした。また、2 種類の制限酵素サイトと TaqMan プローブサイトを含む 37bp の DNA 断片を挿入した陽性コントロールプラスミドを用いればコンタミネーションが迅速かつ簡単に判定できる事を明らかにした。今後本研究で確立したプロトコルを用いて日本国内の SFTS 陽性ダニの種、ウイルス陽性率、個体あたりのウイルス量、ウイルス陽性ダニの季節性変動性、国内分布等を調査に行う。本リアルタイム RT-PCR 法は、複数の機器で非特異反応が全く出ないこと、高感度にマダニからの遺伝子検出ができることを確認しており、特に流行地などの地方衛研などでマダニの調査が可能になると考えられる。

#### E. 結論

2013年に初めて患者が確認された SFTS の病原ウイルスを持つマダニを調査するための、SFTS ウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法を確立、改善した。陽性コントロールもコンタミが確認している系に改良された。今後のマダニの調査に有用である。

## F. 健康危険情報

SFTS は、2013 年に国内で患者が確認され、その後さかのぼり調査で 12 名、2013 年 3 月からの患者が 40 名確認されている。国内では複数種のマダニから SFTS ウイルス遺伝子が検出されている。

### 1. 論文発表

- 1) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* 2013 Nov 14. in press
- 2) 下島昌幸、福士秀悦、谷 英樹、吉河智城、森川 茂、西條政幸：日本における重症熱性血小板減少症候群、ウイルス 63: 7-12, 2013.

- 3) 森川 茂：重症熱性血小板減少症候群、*獣疫学雑誌*17(2)142-143, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) 前田健、高橋徹、奥田優、水谷哲也、山岸拓也、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスの分離・同定 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20~22 岐阜大学
- 2) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、井上智、今岡浩一、柳井徳麿、下島昌幸、西條政幸、前田健 動物の SFTS ウイルス抗体調査 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20~22 岐阜大学
- 3) Nguyen Dung、下田宙、濱崎千菜美、寺田農、野口慧多、鋏田流星、高野愛、森川茂、前田健 飼育犬から重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスと交差する抗体の検出 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20~22 岐阜大学
- 4) 谷口怜、福士秀悦、Joseph Masangkay、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからの SFTS ウイルスと交差する抗体の検出 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20~22 岐阜大学
- 5) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、安藤秀二、川端寛樹、高野愛、前田健、藤田博己、澤邊京子、西條政幸、森川茂 マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出



- 第 156 回日本獣医学会学術集会  
2013.9.20～22 岐阜大学
- 6) 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、宇田晶彦、谷口怜、福間藍子、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の確定診断に使用されているコンベンショナル PCR の評価、及びリアルタイム定量 PCR との比較 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
- 7) 福間藍子、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、下島昌幸、森川茂、前田健、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の血清学的診断法の開発 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
- 8) 西條政幸、高橋徹、前田健、水谷哲也、大松勉、吉河智城、谷英樹、福士秀悦、下島昌幸、福間藍子、緒方もも子、鈴木忠樹、中島典子、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、山岸拓也、倉根一郎、森川茂 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された 11 名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
- 9) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、福間藍子、加来義浩、朴ウンシル、谷英樹、吉河智城、井上智、今岡浩一、下島昌幸、西條政幸、前田健 SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
- 10) 谷口怜、福士秀悦、Joseph Masangkay, 渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
- 11) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、井上智、安藤秀二、前田健、西條政幸、森川茂 マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
- 12) 谷英樹、下島昌幸、福間藍子、谷口怜、吉河智城、福士秀悦、森川茂、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP を外套したシェードタイプ VSV の作製 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
- 13) 高橋徹、亀井敏昭、前田健、水谷哲也、下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、森川茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠樹、永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大石和徳、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の日本における初症例 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
- 14) 前田健、濱崎千菜美、久保翔太郎、遠藤泰之、寺田農、鋤田流星、高野愛、下田宙、森川茂 国内飼育犬から重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスに対する抗体の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. 本研究で用いた合成オリゴ DNA のリスト

Primer & probe name	Sequence (5'→3')
リアルタイム RT-PCR に用いたプライマーおよびプローブ (ウイルス増幅サイズ: 164 bp、陽性コントロールプラスミド: 201 bp)	
SFTSV-S2-237s	GCAACAAGATCGTCAAGGCATCAGG
SFTSV-S2-400a	TGCTGCAGCACATGTCCAAGTGG
SFTSV-S2-317MGB (FAM 標識)	CTGGTTGAGAGGGCA
PosiContTaqman (HEX 標 識)	CATCCTGCACCACCAACTGCTTAGCC
陽性コントロールプラスミド構築のためのプライマー(増幅サイズ: 520 bp)	
pSFTS-S-22s	GGAAAGACGCAAAGGAGTGATCATGTC
pSFTS-S-541a	CAGGGTCTTCGTTGTGGCTTCAG
陽性コントロールプラスミドに 37 bp の挿入配列を導入する為のプライマー	
pSFTS-S-mut-s	CGGCTAAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGATATCGGGTCTAAGAGGTTGATG
pSFTS-S-mut-a	CCAACTGCTTAGCCGGATCCAGAGTTTGACATTTTCCCTG

図 1. 陽性コントロールプラスミドに 37 bp の挿入配列を導入する為のプライマーの位置

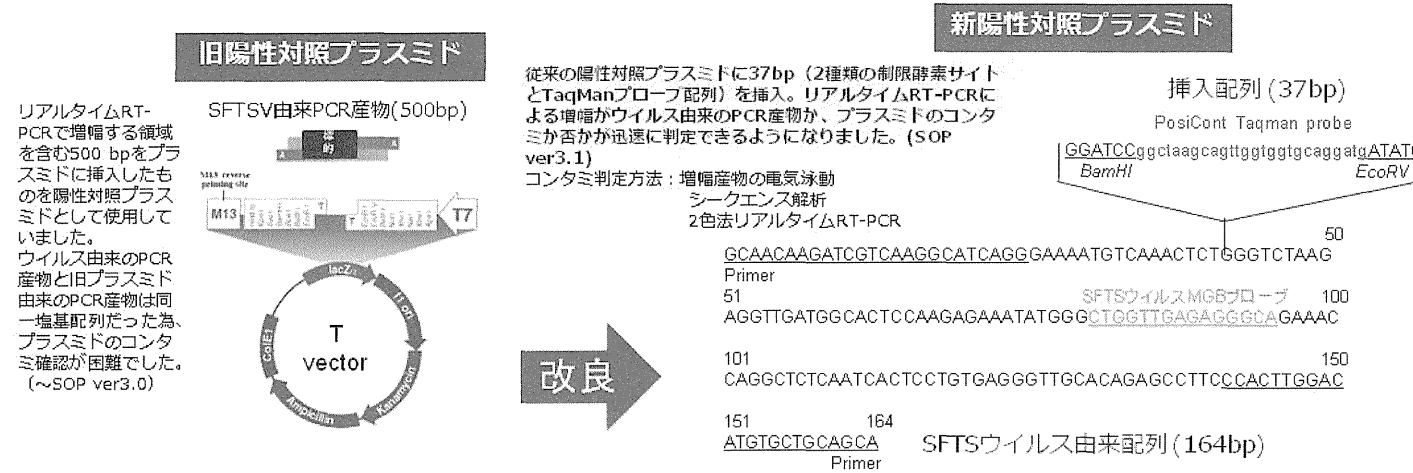
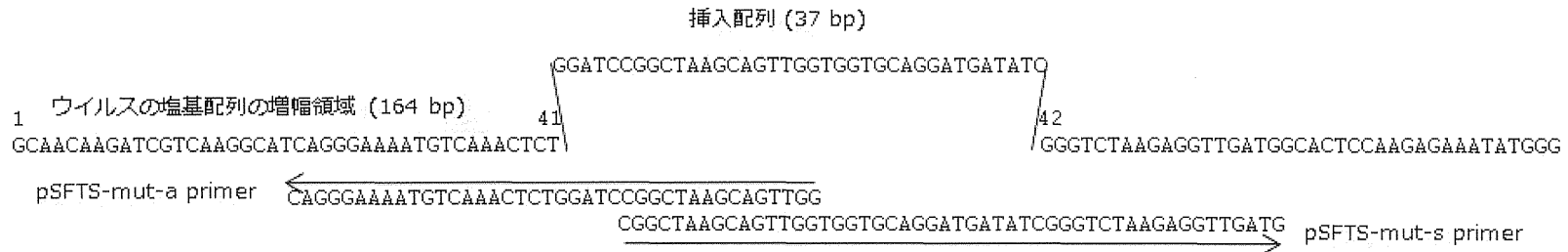


図 2. 陽性コントロールプラスミド構築の概要