

いた。また部分的 nsP1 領域や E2 領域で比べた際にも類似した結果が得られた。GenBank には登録されていないもの、部分的に塩基配列が決定されている株が 7 株 (1960 年代 1 株、1970 年代 3 株、1980 年代 3 株) 見つかった (Wekesa et al. 2001)。これらの配列も含めて部分的 nsP1 配列の分子系統樹解析を行ったところ、70~80 年代の株と今回の株が比較的近縁であることがわかった。継代過程で、Kochi/01/2005 液に含まれるゲタウイルスと日本脳炎ウイルスがどのように変化してきたかを調べるため、2 継代目から 5 継代目までのウイルス液についてリアルタイム RT-PCR 法でウイルスゲノム数を、プラーク形成法により感染力価を調べた。継代が進むにつれて日本脳炎ウイルスゲノム数が顕著に減少するのに対し、ゲタウイルスゲノム数は増加傾向にあった。また感染力価はゲタウイルスではやはり増加傾向が見られたが、日本脳炎ウイルスは 3 継代目までは測定できたが、それ以降ではプラークが検出されなかった。以上より、Kochi/01/2005 には日本脳炎ウイルスとゲタウイルスの両方が混ざっており、継代により日本脳炎ウイルスが排除される傾向にあることがわかった。また両ウイルスがブタに接種される生ワクチン株とは異なることも確認した。

(3) ウエストナイルウイルス NS1 cDNA と Flag 配列を組み込んだ pCAGCS を 293T 細胞にトランスフェクトし、72 時間後の上清を回収した。上清より 3xFlag アフィニティーカラムにより NS1 を精製した。精製後に抗 Flag 抗体により発現を確認した。現在精製産物を蓄積させており、近いうちにマウスへの免疫ができるよう予定を立てている。

D. 考察

(1) 迅速かつ高感度な病原体検出法は、血液製剤の安全性確保と安定供給のために非常に有用である。本年度は昨年続き、現行の RT-PCR 法をさらに高感度にする可能性のある Flap RT-PCR 法を試みた。昨年は Dengue ウイルス特異的プライマーに適用したが効果が認められなかった。そこで今回は幅広いウイルスを検知可能である共通プライマーに焦点を絞り、Flap 配列の有効性を検討した。フラビウイルス、アルファウイルス合わせて 3 種類のプライマーセットに適用したが、すべてにおいて改善効果が確認された。しかし改善効果は同じ属のウイルスであっても異なる場合もあった。フラビウイルス共通プライマーについては、NS3 領域を標的にしたものでは今回使用した 3 種のフラビウイルスのいずれにおいても改善効果がみられたが、NS5 領域のものでは、1 種では効果的であったが他の 2 種では変化なしかむしろ悪化した。アルファウイルス共通プライマーについてもウイルス種によって効果があるもの、ほとんどないものと分かれた。このように Flap 配列の効果は同じプライマーでも標的のウイルス種によって結果が異なることが明らかとなった。今後今回の共通プライマーを用いる際には、「Flap あり」と「Flap なし」の両方を用いるのが良いかと思う。

(2) 今回の実験で、これまで日本脳炎ウイルス液と認識していた Kochi/01/2005 が、すでに日本脳炎ウイルスはマイノリティであり、ゲタウイルスがマジョリティであることが明らかとなった。両ウイルスの遺伝子配列から、これらのウイルスは生ワクチン

に由来するものでなく、各々これまでに報告のない株であることが確認された。よって、ブタ血清より日本脳炎ウイルスを分離する際、そのブタが日本脳炎ウイルスとゲタウイルスに共感染していた可能性が高い。ゲタウイルスは日本脳炎ウイルスと非常に似た感染サイクルを有し、また過去にブタ血清から分離された事例もある。ブタ血清から日本脳炎ウイルスを分離する際、細胞変性効果と遺伝子検出だけで日本脳炎ウイルスと判断するのは危険であることがわかった。今後はプラーク形態や、アルファウイルス共通プライマーによるアルファウイルス存否の確認が必要であろう。

(3) これまでに哺乳動物培養細胞からのウエストナイルウイルス NS1 の発現と分泌を確認し、その培養上清から NS1 を分離精製することが可能であることを示してきた。今後精製した NS1 を用いてモノクローナル抗体の作製、さらには検出系の開発と進めていきたいと考えている。

E. 結論

(1) Flap 配列をフラビウイルス共通プライマーおよびアルファウイルス共通プライマーに連結することにより検出感度および増幅量が改善される例が多く見出された。

(2) 2005 年に高知県のブタ血清から分離された日本脳炎ウイルス溶液にゲタウイルスも存在することが確認された。このウイルスの完全長ゲノムの塩基配列を決定し、分子系統学的解析を行った（論文投稿中）。

(3) ウエストナイルウイルス感染症の診断ツール開発のため、同ウイルスの NS1 の大量調製を行った。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

論文発表（英文）

1. Tajima, S., Kotaki, A., Yagasaki, K., Taniwaki, T., Moi, M.L., Nakayama, E., Saijo, M., Kurane, I., and Takasaki, T. Identification and amplification of Japanese encephalitis virus and Getahvirs propagated from a single porcine serum sample: a case of coinfection (submitted).

日本語総説

1. 白鳥（田島）茂、高崎智彦。「わが国と世界の日本脳炎の現状と問題点」小児内科予防接種 Q&A 改訂第 3 版 第 45 巻増刊号 432-437、2013.

学会発表

国内学会

1. 田島茂、小滝徹、谷ヶ崎和美、小林大介、谷脇妙、沢辺京子、高崎智彦。Flap 配列を付加したフラビウイルス共通プライマーおよびアルファウイルス共通プライマーの評価とゲタウイルス検出の実例について。第 20 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、神戸、2013 年 11 月

2. 田島茂、小滝徹、谷ヶ崎和美、林昌宏、西條政幸、高崎智彦。製造株と異なる遺伝子型のウイルスに対する日本脳炎ワクチンの中和能の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし.

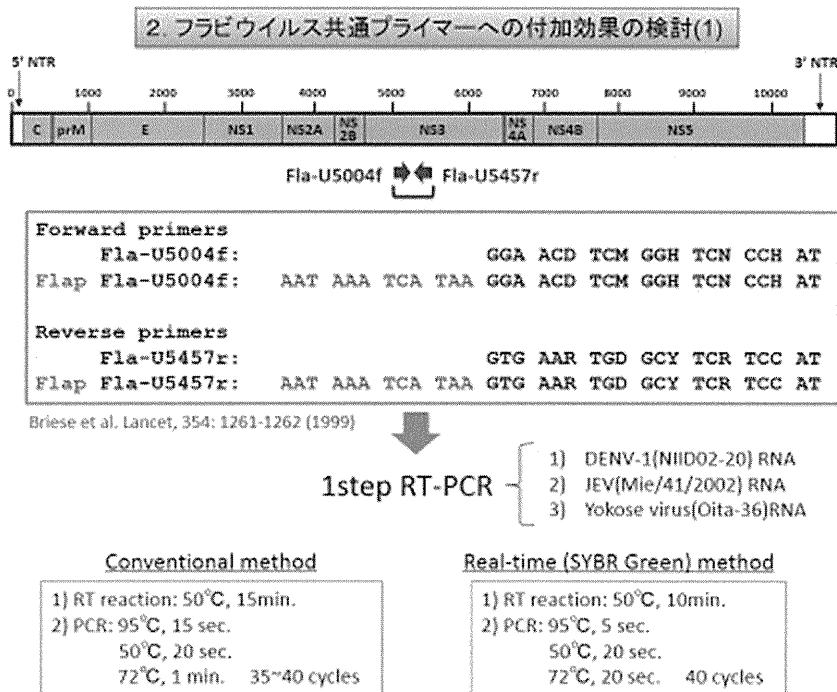


図1 フラビウイルス共通 NS3 プライマーへの Flap 配列付加

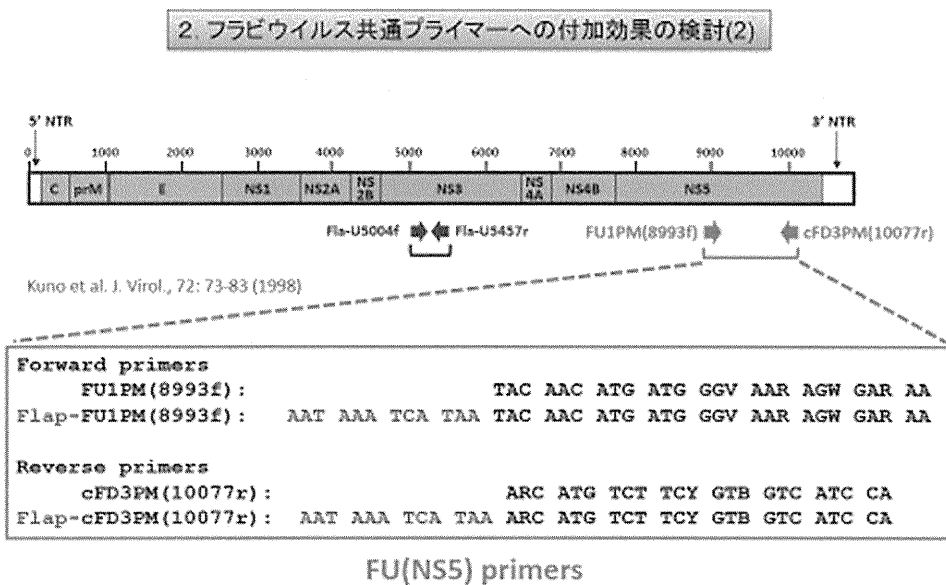


図2 フラビウイルス共通 NS5 プライマーへの Flap 配列付加

Summary
(Flavivirus-consensus primer sets)

	NS3	Flap-NS3	NS5	Flap-NS5
Dengue type 1 virus	++	+++	++	+++
Japanese encephalitis virus	++	+++	++	+
Yokose virus	±	++	++	++ or +

図3 (表) Flap 配列付加フラビウイルス共通プライマーの検討結果

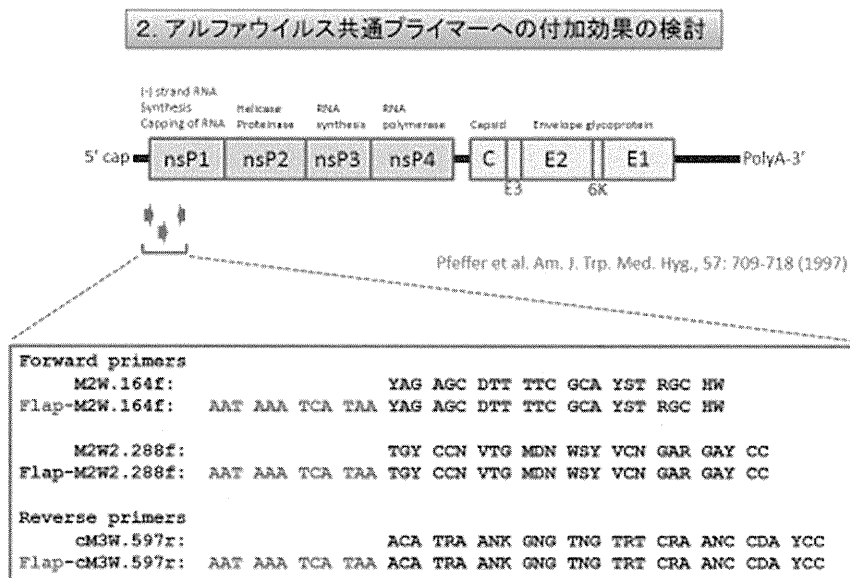


図4 アルファウイルス共通プライマーへの Flap 配列付加

Summary
(Alphavirus-consensus nsP1 primer set)

	L	Flap-L	C	S	Flap-S
GETV	+	+++	+++	++	++
SINV	+	+++	+++	+	++
VEEV	+	+++	+++	+	++
CHIKV	+	++	++	++	++

Effect of the flap sequence on RT-PCR may depend on the nucleotide sequence of the template RNA

図5 (表) Flap 配列付加アルファウイルス共通プライマーの検討結果

Phylogenetic analysis of getah viruses (1)

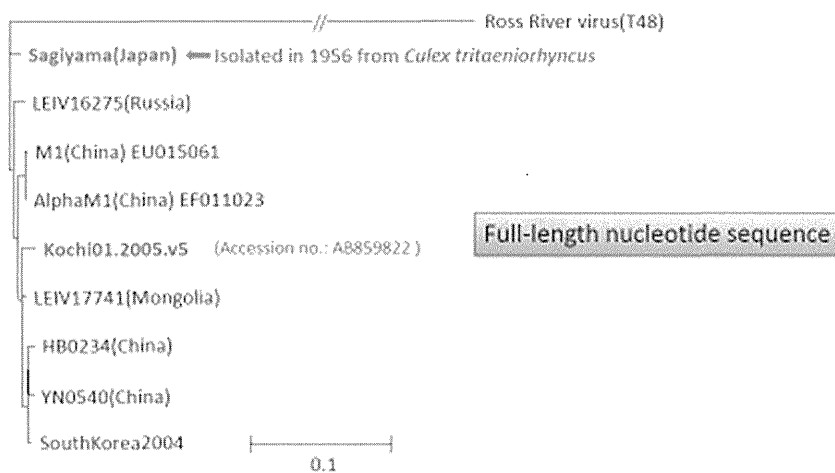
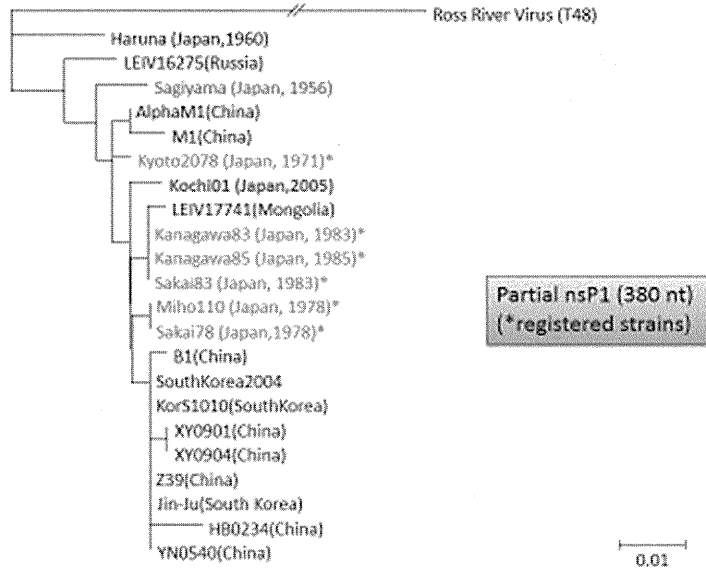


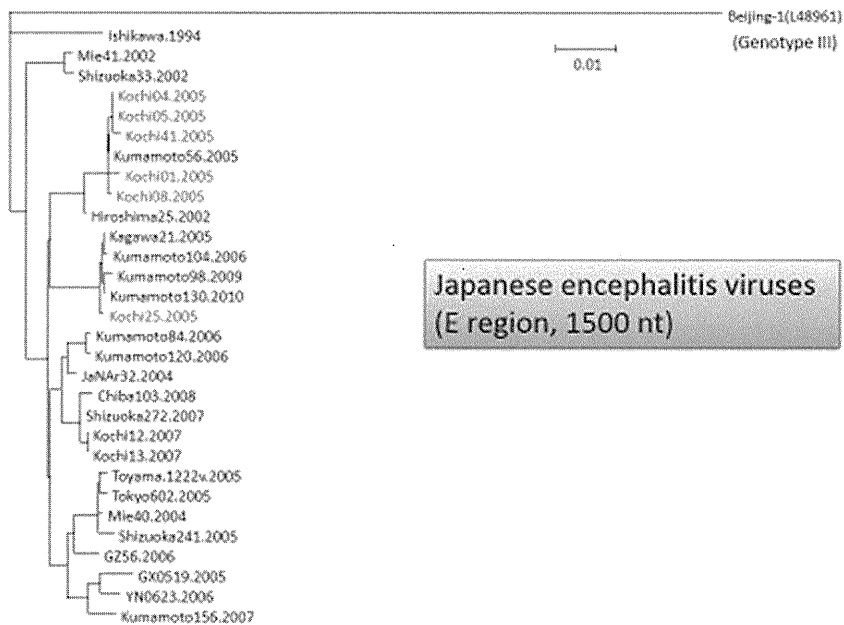
図6 GETV/Kochi/01/2005 の完全長配列を使用した分子系統樹解析

Phylogenetic analyses of getah viruses (4)



*Wekesa et al., Veterinary Microbiology 83: 137-146 (2001)

図 7 GETV/Kochi/01/2005 の部分的 nsP1 配列を使用した分子系統樹解析



No JEV strain with nucleotide sequence identical to JEV/Kochi/01/2005 was found

図 8 JEV/Kochi/01/2005 の E 領域配列を使用した分子系統樹解析

The relative amount of viral genome in 2 times- to 5 times-passaged Kochi/01/2005

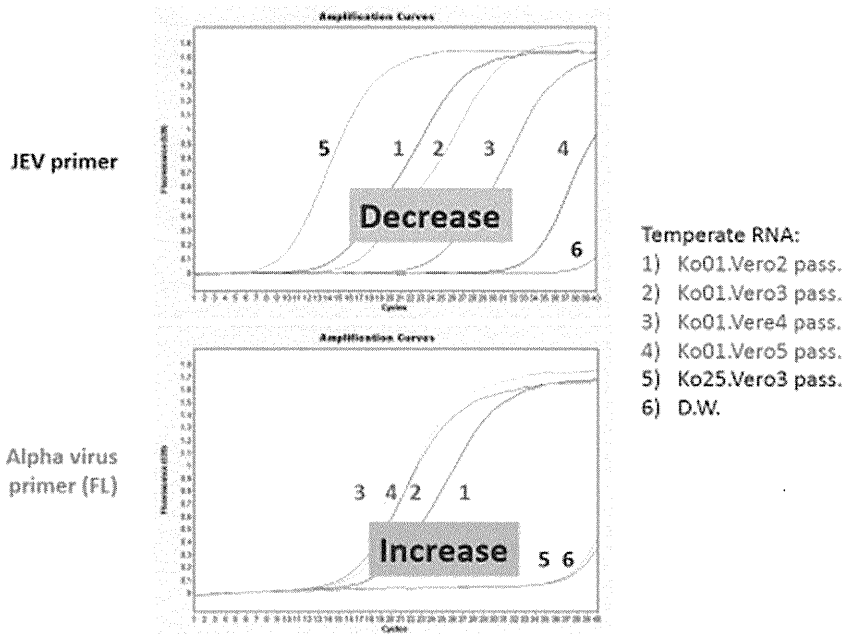


図9 各継代数の Kochi/01/2005 の JEV および GETV ゲノムコピー相対数の変化

ウエストナイルウイルスNS1蛋白質の発現と精製

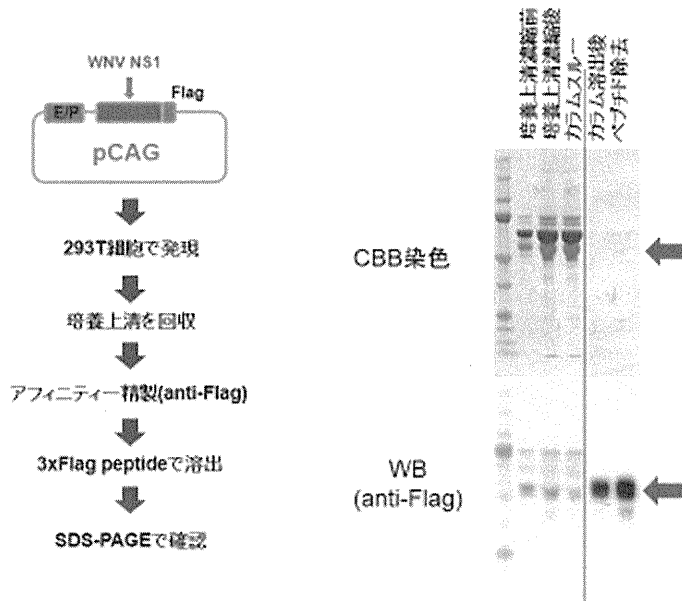


図10 ウエストナイルウイルス NS1 の発現と精製

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
Krayukhina E,Uchiyama S,Nojima K,Okada Y,Hamaguchi I, and Fukui K	Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity.	J.Biosci Bioeng	115	104-10	2013
Baylis SA,Blumel J, Mizusawa S,Matsubayashi K,Sakata H,Okada Y,Nubling CM, Hanschmann KM, H EV collaborative Study Group.:	World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA.	Emerg.Infect. Dis.	19(5)	729-735	2013
Imai, K., Maeda, T., Sayama, Y., Mikita, K., Fujikura, Y., Misawa, K., Nagumo, M., Iwata, O., Ono, T., Kurane, I., Miyahira, Y., Kawana, A. and Miura, S.:	Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, Japan.	Emerging Infectious Diseases.	20(1)	146-148	2014
Kazuo Imai, Takuya Maeda, Yusuke Sayama, Kei Mikita, Yuji Fujikura, Kazuhisa Misawa, Morichika Nagumo, Osamu Iwata, Takeshi Ono, Ichiro Kurane, Yasushi Miyahira, Akihiko Kawana, and Sachio Miura	Mother-to-Child Transmission of Congenital Chagas Disease, Japan	Dispatch	Vol.20 Number 1		2014
岡田 義昭	輸血用血液における病原体不活化技術の現状と新規技術の開発。	検査と技術	42 巻	4-7	2014

<p>今井一男、前田卓哉、三木田馨、吉川幸尾、佐山勇輔、小野岳史、岩田理、武田晋作、宮平靖、川名明彦、三浦左千夫.</p>	<p>シャーガス病における遺伝子学的診断法の開発と検討.</p>	<p>臨床寄生虫学会雑誌</p>	<p>23号</p>	<p>41-45</p>	<p>2013</p>
<p>前田卓哉、南雲盛親、佐山祐輔、三沢和央、今井一男、藤倉雄二、河野修一、原悠、叶宗一郎、三木田馨、小野岳史、宮平靖、川名明彦、三浦左千夫</p>	<p>ベンズニダゾールにより治療を行ったシャーガス病の2症例：</p>	<p>日本臨床寄生虫学会誌</p>	<p>Vol.24</p>	<p>1-33</p>	<p>2013</p>

