

表 4. 上野動物園で採集された吸血したアカイエカの吸血源動物の同定結果と飼育場所と採集場所の位置関係から推定した移動距離

吸血源動物	サンプル数	移動距離* (m)
鳥類 (合計)	57	
サンカノゴイ <i>Botaurus stellaris</i>	16	10
オグロヅル <i>Grus nigricollis</i>	6	130
アオサギ <i>Ardea cinerea</i>	5	10
ハシブトガラス <i>Corvus macrorhynchos</i>	5	
ケープペンギン <i>Spheniscus demersus</i>	4	170
ホオカザリヅル <i>Bugeranus carunculatus</i>	3	130
オオワシ <i>Haliaeetus pelagicus</i>	3	40
スズメ <i>Passer montanus</i>	3	
イヌワシ <i>Aquila chrysaetos</i>	2	40
ネパールワシミミズク <i>Bubo nipalensis</i>	2	40
シジュウカラ <i>Parus major</i>	2	
チョウゲンボウ <i>Falco tinnunculus</i>	1	40
ハゲトキ <i>Geronticus calvus</i>	1	
ハゲワシ <i>Gyps africanus</i>	1	
ソリハシセイタカシギ <i>Recurvirostra avosetta</i>	1	
フクロウ <i>Strix uralensis</i>	1	40
アフリカクロトキ <i>Threskiornis aethiopicus</i>	1	90
哺乳類 (合計)	20	
ウシ <i>Bos taurus</i>	15	350
ユーラシアカワウソ <i>Lutra lutra</i>	2	60
ニホンザル <i>Macaca fuscata</i>	1	210
タヌキ <i>Nyctereutes procyonoides</i>	1	100
ホッキョクグマ <i>Ursus maritimus</i>	1	
同定不可	54	
合 計	131	

*飼育場所と採集場所の直線距離によって推定した。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

デングウイルス感染による宿主側応答の解析
Flap 付加プライマーによる節足動物媒介性ウイルスゲノムの増幅とその応用
およびウエストナイルウイルス NS1 検出系開発のための基盤的研究

研究分担者 田島茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官）

蚊によって媒介されるデングウイルスは熱帯・亜熱帯地方で、ウエストナイルウイルスは北米を中心に毎年多くの患者が発生している。これらのウイルスは現在日本には存在しないとされるが、いつ日本に侵入してきてもおかしくない状況である。さらに両ウイルスは感染ヒト血中で比較的高いウイルス血症を呈することから、輸血や臓器移植の際には注意を要する。本事業において我々は献血者や血液製剤がこれらのウイルスに感染しているか否かを判断するための新規方法を開発するための基礎データを得ること目的とし研究を進めてきた。

本研究期間中の成果として、1) マイクロアレイ解析により、日本脳炎ウイルス感染よりもデングウイルス感染の方でより顕著に誘導される遺伝子を抽出した。2) 1)で抽出された遺伝子の1つである補体成分の一つである C1s の誘導についてより詳細に解析した。3) Flap RT-PCR 法が、デングウイルス特異的プライマーでは効果的でない一方で、フラビウイルス共通プライマーやアルファウイルス共通プライマーでは効果的である場合が多いことがわかった。4) Flap RT-PCR 法により、ブタ血清から増幅させた日本脳炎ウイルス溶液中のゲタウイルスを検出し、さらに詳細な遺伝子解析を行った。5) ウエストナイルウイルス NS1 検出系開発に向けた NS1 蛋白の哺乳動物細胞を用いた大量発現系を確立し、NS1 を精製した。

A. 研究目的

米国において輸血や臓器移植によるウエストナイルウイルス感染例が報告されていることから、移植組織におけるフラビウイルス検査は非常に重要である。ウエストナイルウイルスと同じフラビウイルス属に属するデングウイルスは、デング熱およびデング出血熱の原因ウイルスである。世界 100 か国以上で年間数千～1 億人がデングウイルスに感染し、患者数は 4 千万人以上に上

り 2 万人が死亡していると推定されている。デングウイルスは 1～4 型の 4 種の血清型群からなり、ときに以前と異なる型のデングウイルスに感染した場合に、より重篤度の高いデング出血熱に至る可能性が高くなる。これは中和能のないあるいは弱い抗デング抗体により引き起こされる抗体依存的感染増強が主要因と考えられている。ウエストナイルウイルスおよびデングウイルスはともに蚊によりヒトに伝搬される。

これらのウイルスは現在日本には存在しないとされるが、感染蚊、感染動物、あるいは感染したヒトを介して何時日本に侵入してきてもおかしくない状況である。さらに両ウイルスは感染ヒト血中で比較的高いウイルス血症を呈することから、輸血や臓器移植の際には注意を要する。本事業において我々は、献血者や血液製剤がこれらのウイルスに感染しているか否かを判断するための新規方法を開発する上での基礎データを得ること目的とし、1) デングウイルス感染による宿主側応答の解析、2) 高感度ウイルスゲノム検出法の検討、3) ウェストナイルウイルス NS1 検出系開発のための基盤的研究を行ってきた。

B. 研究方法

1) 感染細胞中の遺伝子動態の変化は DNA マイクロアレイ法によりおこなった。ヒト肺癌由来細胞 A549 細胞およびマウス肺癌由来細胞 Hepa 1-6 細胞にデング 1 型ウイルス (NIID02-20 株) および日本脳炎ウイルス (Mie/41/2002 株) を multiplicity of infection が 2 になるように感染させた。感染後 24、48、72 時間後に細胞を回収し全 RNA を抽出した。得られた RNA について、3D-Gene system によりマイクロアレイ解析を行った (マイクロアレイ解析は東レ株式会社に委託した)。得られた遺伝子発現データについてクラスター解析等を行った。また両ウイルス感染細胞での発現上昇が顕著であったものを抽出し、ウイルス間および細胞間で比較した。ヒト A549 細胞において、デングウイルス感染でより顕著な発現上昇が観察された遺伝子 C1s については、新たに遺伝子増幅用プライマーを作製しリアル

タイム RT-PCR 法により発現変化を確認した。さらに培養上清中の C1s は抗 C1s 抗体を使用してウェスタンブロット法により検出した。A549 以外のヒト由来細胞として、ヒト肺癌由来 Huh-7 細胞を使用した。他の血清型のデングウイルスとして、デング 2 型ウイルス (Hu/OPD030NIID)、デング 3 型ウイルス (CH53489)、デング 4 型ウイルス (TVP360) を使用した。ヒト A549 細胞において、日本脳炎ウイルス感染に比べデングウイルス感染でより顕著な発現上昇が観察された遺伝子 C1s について、新たに遺伝子増幅用プライマーを作製しリアルタイム RT-PCR 法により発現変化を確認した。さらに培養上清中の C1s は抗 C1s 抗体を使用してウェスタンブロット法により検出した。日本脳炎ウイルスについてはこれまで使用してきた Mie/41/2002 株に加え、中山株および Mie/40/2004 株も用いた。またウイルス感染細胞としてヒト肺癌由来細胞 A549 株に加え、ヒト単球系細胞 THP-1 細胞も使用した。

2) Flap RT-PCR 法は Afonina らの報告(2007)を参考にした。具体的には従来我々が使用してきたデング 1 型ウイルス検出用プライマー (Ito et al., 2004) の 5'末端側に非ウイルス由来ヌクレオチドを 12 塩基(Flap 配列: 5'-AATAAATCATAA-3') 付加した。鋳型にはデング 1 型ウイルス(NIID02-20 株)を A549 細胞に感染させたのちの培養上清から回収したウイルスゲノム RNA を使用した。また RT-PCR は SYBR Green I を用いた方法によりおこなった。フラビウイルス共通 NS3 領域プライマー (Briese et al. 1999) および NS5 プライマー (Kuno et al. 1998) , およびアルファウイルス共通プライマー

(Pfeffer et al. 1997) の 5'末端側に Flap 付加した。鋳型にはフラビウイルス代表として Dengue 1 型ウイルス(NIID02-20 株)、日本脳炎ウイルス(Mie/41/2002 株)およびヨコセウイルス (Oita-36 株) を、アルファウイルス代表としてチクングニヤウイルス (NRTQ11-01 株)、シンドビスウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルス、およびゲタウイルス(GETV/Kochi/01/2005 株)を使用した。ウイルスゲノム RNA は Vero 細胞に各ウイルスを感染させた後の培養上清より調製した。また RT-PCR は SYBR Green I を用いた方法によりおこなった。結果的にゲタウイルスが検出された Kochi/01/2005 株はもともと分離された日本脳炎ウイルスが増幅されているものとして得られたものである。決定されたゲタウイルス配列は分子系統学的解析に使用した。比較解析に用いた他のゲタウイルス配列は GenBank データベースよりピックアップしてきた。また一部の配列は論文より直接引用した (Wekesa et al. 2001)。

(3) ウエストナイルウイルス NS1 遺伝子は NY99 株のものを使用した。RT-PCR で NS1 領域を増幅後、タンパク質精製時のタグとなる Flag ペプチドコード配列を連結して哺乳動物細胞発現ベクターである pCAGCS に導入した。こうして得られた NS1 発現プラスミドを 293T 細胞に導入し、72 時間後培養上清を回収した。培養上清を 3xFlag アフィニティーカラムに供し、Flag が結合している NS1 蛋白を精製した。

C. 研究結果

1) 2 万以上のプローブを用いた DNA マイクロアレイ解析により、両ウイルス感染細胞

中における遺伝子発現プロファイルを得ることができた。クラスター解析により変動の大きかった遺伝子を分類した。変動の見られた遺伝子および変動の大きさは Hepa 1-6 細胞よりも A549 細胞で顕著であった (図 1)。顕著な増加を示した遺伝子は、1) インターフェロン応答・関連遺伝子 (OAS, Mx, ISGs, IFITs, IFIs, IRFs)、サイトカイン・ケモカイン、TREM/TRIM、STAT、RIG-I などであった。これらの遺伝子の多くは、日本脳炎ウイルス感染細胞の方が早く誘導されてきたが、異なるパターンを示す遺伝子も見られ、それほど単純ではないことが明らかとなった。日本脳炎ウイルス感染よりも Dengue 1 型ウイルス感染でより顕著に発現上昇が観察された遺伝子を抽出した (図 2)。筆頭の PLAT (tissue plasminogen activator; tPA) はすでに Dengue ウイルス感染ヒト上皮細胞から分泌されることが明らかとなっており、さらに Dengue 感染症の重症化過程で血清中の PLAT 量の明らかな増加が観察されている。2 番目に顕著であった補体因子 C1s についてはリアルタイム RT-PCR 法により確かに RNA レベルで発現量の上昇がみられることを確認した。同様の結果は別のヒト細胞(Huh-7)でも確認された。さらに発現上昇は蛋白質レベルでも確認された。次に C1s の誘導が今回用いた Dengue 1 型ウイルス株に特異的でないことを証明するため、他の血清型群の Dengue ウイルスについてもリアルタイム RT-PCR 法およびウエスタンブロット法により調べた (図 3)。先の Dengue 1 型ウイルスでの結果と同様に C1s の RNA レベル、蛋白質レベルでの発現誘導が確認された。C1s が同じフラビウイルスでも日本脳炎ウイルス感染で

はほとんど発現誘導されず、デングウイルス感染で誘導されるのかは不明である。そこで両ウイルスで増殖速度が異なることが原因である可能性を疑い、日本脳炎ウイルス株の中でもプラーク形成が極度に遅い中山株を使用し C1s 遺伝子の誘導を RT-PCR 法及びウエスタンブロットリング法で調べた。すると RNA レベル、蛋白質レベルで C1s の発現誘導が確認された。次にこれまで使用してきた日本脳炎ウイルス株 Mie/41/2002 株とこれと近縁の Mie/40/2004 株を使用し、これまでよりも 10 倍以上低い multiplicity of infection (MOI) で感染させ、C1s 遺伝子の発現を観察した (図 4)。するとデングウイルス程ではないものの明らかな C1s 遺伝子の発現誘導が確認された。実際ヒトなどにデングウイルスが感染する場合、その主な標的細胞は単球系の細胞と考えられている。さらにこれらの細胞は Fc γ レセプターを発現していることから、デング重症化の原因の一つとされる抗体依存性感染増強 (ADE) 時の主標的と考えられている。そこでヒト単球系細胞株 THP-1 にデングウイルスを感染させたときの C1s 遺伝子の発現を調べた。また感染時に感染増強抗体 (4G2) を加えた。増強抗体を加えないと THP-1 中ではデングウイルスはほとんど増えないことが明らかとなった。デングウイルスが増殖できても C1s の特異的な発現上昇は観察されなかった。

2) 通常使用しているウイルス遺伝子検出用プライマーに 12 塩基の非ウイルス由来配列 (Flap 配列) を連結すると、検出感度および増殖量が顕著に増加するとの報告がされた (Afonina, I. et al., *Biotechniques* 43: 770-774, 2007) この報告ではエンテロウイ

ルスおよび水痘ウイルスで感度・増幅量が改善している。そこで我々が保有し、通常ウイルス検出用に使用しているプライマーに Flap 配列を連結した新たなプライマーを合成し、SYBR Green I を用いた RT-PCR 反応を行い従来のプライマーや、ややウイルス特異的配列を短縮したプライマーとの間で増幅感度・増幅量を比較した (図 5、6)。今回 5 パターンについて増幅したが、これまで使用してきたプライマーが最も高感度であった。次に Flap 配列をフラビウイルス共通 NS3 領域プライマーの両方に付加し、デング 1 型ウイルス、日本脳炎ウイルスおよびヨコセウイルスゲノム RNA を鋳型として RT-PCR 反応を行った (図 7)。3 種類すべてのウイルスにおいて、通常のプライマーを用いた場合に比べ Flap 付加プライマーでの増幅量が上昇した。その傾向はヨコセウイルスで顕著であり、増幅量のみならず検出感度においても大幅な改善がみられた。次に Flap 配列をフラビウイルス共通 NS5 領域プライマーの両方に付加し同様に検討した。結果はウイルスごとに異なっていた。デング 1 型ウイルスでは Flap により増幅量が増加したものの、日本脳炎ウイルスやヨコセウイルスでは変化なしかむしろ減少傾向であった。次にアルファウイルス共通 nsP1 プライマーに付加したときの効果を 4 種のウイルスを使用して調べた (図 8)。またこの際、フォワードプライマーは 2 種類使用した。ゲタウイルス、シンドビスウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルスを用いた場合、長断片増幅用のフォワードプライマーに付加すると増幅量および検出感度が顕著に改善された。一方短断片用では長断片に比べ効果が弱いもしくはほとんど効果

はみられなかった。チクングニヤウイルスの場合も長断片用プライマーでのみ効果がみられたが、他の3種のアルファウイルスに比べ改善効果が低かった。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遺伝子型1型株である Kochi/01/2005 株を Vero 細胞を用いて4~5継代したところ、他の日本脳炎ウイルス1型株とは明らかに形態の異なるプラークを形成した。また日本脳炎ウイルス特異的プライマーを用いてウイルスゲノムを増幅したが、プラーク数から算出した感染力価とは異常にかけ離れたコピー数であった。プラークの形態がアルファウイルスのものに類似していたことから、上記のアルファウイルス共通 Flap 付加プライマー等で増幅をこころみたところ、はっきりとした増幅断片が得られた。この断片の塩基配列を決定したところ、ゲタウイルスの Jin-Ju 株と最も高い相同性を示した。これにより本ウイルス溶液にはゲタウイルスが混入していることが明らかとなった(GETV/Kochi/01/2005)。次にゲノム全長の塩基配列を決定し、他のゲタウイルスと比較した(図9)。すでに完全長の明らかになっているゲタウイルス8株の中では、モンゴルで分離された LEIV17741 株と最も高い相同性を示した。日本で分離されたゲタウイルスの1種であるサギヤマウイルスとは異なっていた。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(図10)。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) 今回の研究により、デングウイルス感染により遺伝子発現が変動する遺伝子群を網羅的に抽出することに成功した。顕著発現上昇の見られた遺伝子のほとんどは、すでにインターフェロンにより誘導されること

が明らかな遺伝子であった。これらについてはすでに報告もあり、今回はそれ以上の解析対象とはしなかった。今回はヒト A549 細胞とマウス Hepa 1-6 細胞を用いたが、ヒト細胞の方が、発現が変動する遺伝子の数および変動の大きさが大きかった。これは、A549 細胞の方が両ウイルスの感染・増殖が良いためだと考えられる。また多くの遺伝子で日本脳炎ウイルスの方がデング 1 型ウイルスよりも発現変動が早いかつ大きかった。これは日本脳炎ウイルスの方がデング 1 型ウイルスよりも増殖速度が速いためと考えられる。そのような状況の中でも、デング 1 型ウイルス感染の方がより発現上昇が顕著であった遺伝子も見出された。これらのうちで最も顕著であった PLAT については、すでにデング熱患者でもその上昇は報告されていることから、今回の解析で新たな因子を見出せる可能性があるものと期待している。次いで顕著であった補体因子 C1s については、他の血清型群のデングウイルス株でも誘導が確認された。最近の論文では、補体因子がデング感染症において重要な役割を果たしている可能性が示唆されており、C1s もデングウイルスがコードする非構造蛋白質 NS1 と相互作用し、ウイルス感染による補体経路の活性化に干渉しているとの報告もある。しかし本当に C1s の発現誘導が日本脳炎ウイルスではほとんど起こらないのかを調べるため、プラーク形成が遅い（つまり細胞変性能が弱い）中山株を使用して C1s の発現を観察したところ、誘導させることがわかった。さらにこれまでに使用してきたウイルスも、MOI を 10 倍以上に下げれば、C1s の誘導が起こることが明らかとなった。これより、*in vitro*

では日本脳炎ウイルスのような増殖速度が速いウイルスでは C1s が誘導される前に細胞変性により誘導が抑えられている可能性が示唆された。つまり C1s の誘導は本質的にデングウイルスに特異的な現象でないことが明らかとなった。一方、感染個体内でのデングウイルスの主要標的細胞と考えられている単球系細胞に由来する株化細胞 THP-1 細胞を使用して C1s の発現誘導を調べたが、誘導は確認されなかった。この原因としては、この細胞でのデングウイルス複製効率が非常に悪いことが（放出される感染性ウイルス粒子量が A549 細胞の約 1000 分の 1）考えられる。補体因子はデング感染症の悪性化に関与するとの報告がある。実際のデング患者血中での C1s の量などに関する報告はないが、この研究が端緒となり、そのような解析がされることを望んでいる。また今後は他の誘導蛋白質について詳細な解析を行う予定である。

2) 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。本研究では、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 法デングウイルス特異的プライマーを用いて試みた。しかし結果は従来法に勝るどころか、少々劣る結果となった。また他のウイルス（ポリオーマウイルス）でも同様の結果であったとの話を聞いている（私信）。この方法はすでに条件としてはほぼ最適化されているものには適当でないのかもしれない。次に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当てて 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

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。今回の実験ではさらに、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) DNA マイクロアレイ解析により、日本脳炎ウイルス感染よりもデングウイルス感染の方がより顕著に誘導される遺伝子を抽出することに成功した。しかしその中の一つである補体成分 C1s の誘導が感染条件や株によっては日本脳炎ウイルス感染によっても誘導されることが明らかとなった。

2) Flap 配列をデングウイルス特異的プライマーに付加した場合は効果的でなかったが、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付加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。また Flap 付加アルファウイルス共通プライマーを使って、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

1. Kato, F., Kotaki, A., Yamaguchi, Y., Shiba, H., Hosono, K., Harada, S., Saijo, M., Kurane, I., Takasaki, T., and Tajima, S. Identification and characterization of the short variable region of the Japanese encephalitis virus 3' NTR. *Virus Genes* 44: 191-197, 2012.
2. Yamaguchi, Y., Nukui, Y., Kotaki, A., Sawabe, K., Saijyo, M., Watanabe, H., Kurane, I., Takasaki, T., and Tajima, S. Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein. *Journal of General Virology* 94: 90-96, 2013.
3. 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 Getahvirus 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。「日本脳炎ワクチンの品質管理」臨床とウイルス 第40巻第5号: 297-305, 2012.
2. 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

国際学会

1. Yamaguchi, Y., Kotaki, A., Sawabe, K., Watanabe, H., Kurane, I., Takasaki, T., and Tajima, S. Effects of a single amino acid

substitution (S123N) of the Japanese encephalitis virus E protein on its growth in vitro. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, Japan. Sept., 2011.

国内学会

1. 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 金沢 2011年5月
2. 鎌田龍星、星野啓太、伊澤晴彦、田島茂、高崎智彦、佐々木年則、小林睦生、沢辺京子: イエカ属蚊の初代培養 第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 東京 2011年11月
3. 山口幸恵, 小滝徹, 新井智, 沢辺京子, 倉根一郎, 西條政幸, 高崎智彦, 田島茂. 非構造蛋白質 NS4A に着目した日本脳炎ウイルスの分子疫学的解析. 第47回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 熊本, 2012年5月
4. 田島茂, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦. デングウイルスおよび日本脳炎ウイルス感染細胞における細胞側遺伝子発現動態の網羅的解析. 第19回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 大阪, 2012年11月
5. 田島茂, 山口幸恵, 小滝徹, 新井智, 沢辺京子, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦. 日本脳炎ウイルス NS4A 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, 2012年11月
6. 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

7. 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.

発現上昇遺伝子 TOP 30

A549						HepG2					
D1 24h	D1 48h	D1 72h	JEV 24h	JEV 48h	JEV 72h	D1 24h	D1 48h	D1 72h	JEV 24h	JEV 48h	JEV 72h
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27
28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30

図 1 マイクロアレイ解析により明らかとなった発現上昇遺伝子

DENV-1感染でのみ発現上昇が顕著であった遺伝子 (A549細胞)

Gene	D1 24h		D1 48h		D1 72h		JEV 24h		JEV 48h		JEV 72h	
	Ratio	up	Ratio	up	Ratio	up	Ratio	up	Ratio	up	Ratio	up
CH1032P	5.8	**	35.4	***	22.0	***	1.0		0.8		0.8	
PLAT	2.9	*	30.8	***	14.7	***	0.8		0.8		1.0	
GRI3	1.1		5.0	**	13.9	***	0.8		1.5		1.7	
LCAL3BP	0.8		8.4	***	12.9	***	0.8		1.7		2.6	*
Coru1b399in.acrossor	1.0		6.4	**	10.5	***	0.7		0.9		0.9	
SMOCC1	1.0		5.2	**	10.5	***	0.8		1.1		1.8	
TRAM6	1.1		11.2	***	7.5	**	1.6		1.3		1.8	
TCM2	0.9		7.9	**	6.8	**	0.8		0.8		0.8	
NP_954500.1	1.0		12.6	***	13.9	***	1.5		2.8	*	3.9	*
ASS1	1.3		2.7	*	11.4	***	1.2		2.0	*	3.3	*
SEI32	1.2		14.7	***	11.2	***	3.5	*	2.0		3.1	*
SNAP25	1.2		5.6	**	11.1	***	1.2		2.0		3.1	*
NM_130060	1.0		8.9	***	8.2	***	1.6		1.9		2.2	*
NP_060811	1.1		7.0	**	5.9	**	1.3		1.4		1.6	
GMS1	1.0		6.2	**	5.7	**	1.8		2.3	*	2.9	*
ENGR1	1.1		3.2	*	5.4	**	1.1		2.2	*	1.7	
CEHRP	1.0		5.0	**	5.2	**	0.9		0.9		0.8	
TAC218AAH	1.1		6.4	**	5.0	**	1.1		1.7		1.8	
VF1B	1.6		4.2	**	4.9	**	1.0		0.7		0.7	
LAP3	1.0		5.3	**	4.6	**	1.2		1.1		1.2	
ZNF13B	1.5		3.5	*	4.6	**	0.7		0.7		0.6	
ACH4	1.2		2.8	*	5.2	**	0.7		0.7		0.5	
COB8	1.1		3.8	*	4.4	**	0.8		1.1		1.2	
FH1	1.1		3.4	*	4.2	**	1.0		1.6		1.4	
STAT1	0.8		4.8	**	3.9	*	1.0		1.0		1.6	
CB1	1.2		7.4	**	11.4	***	1.6		3.8	*	4.7	**
AVSH	0.9		0.8		0.5	*	0.7		0.5	*	0.2	*

* CH103SのプロープはDENV-1と結合する可能性が高い。

図 2 DENV-1 感染でのみ発現上昇が顕著であった遺伝子 (ヒト細胞)

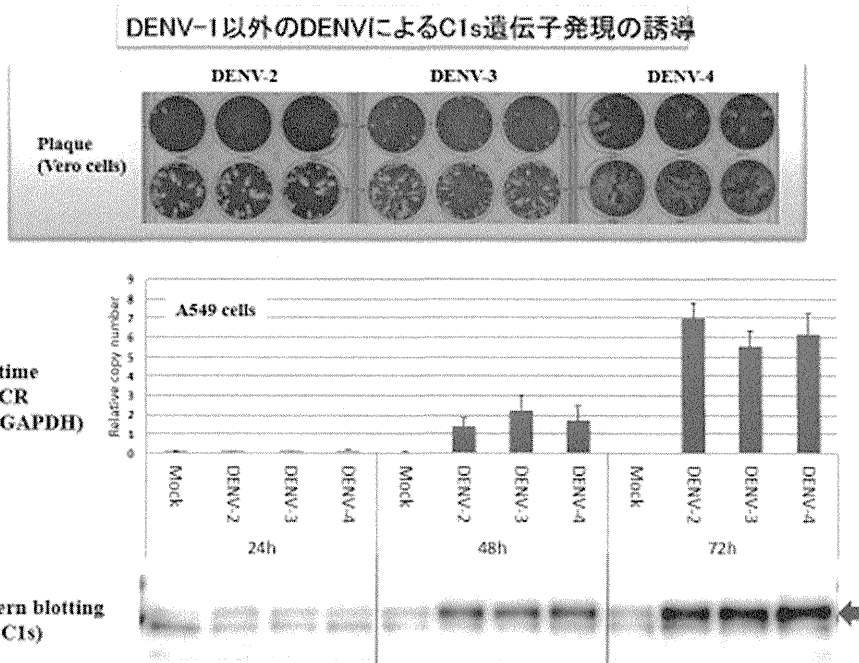


図3 DENV-1以外のDENVによる補体因子C1sの発現誘導

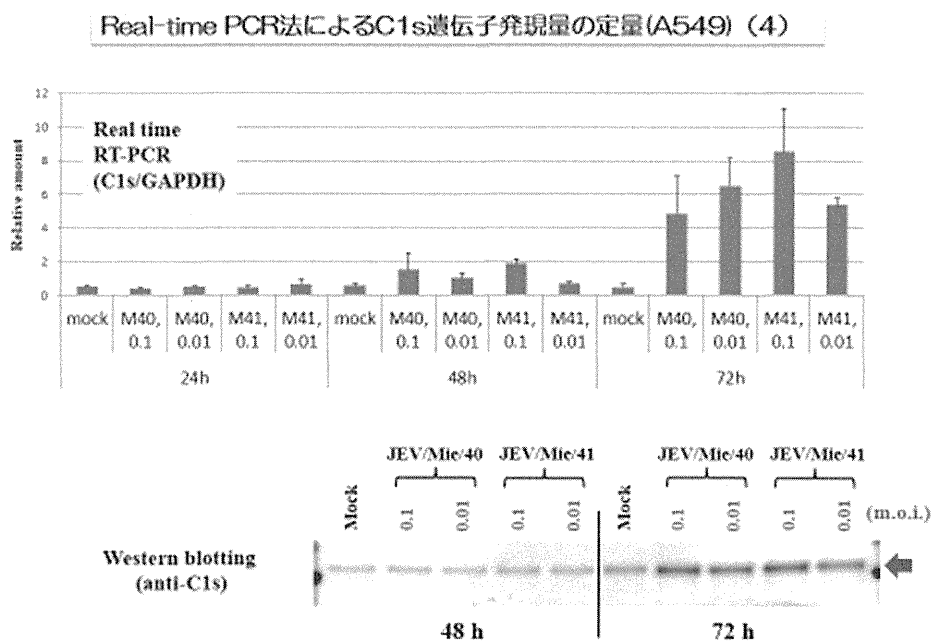
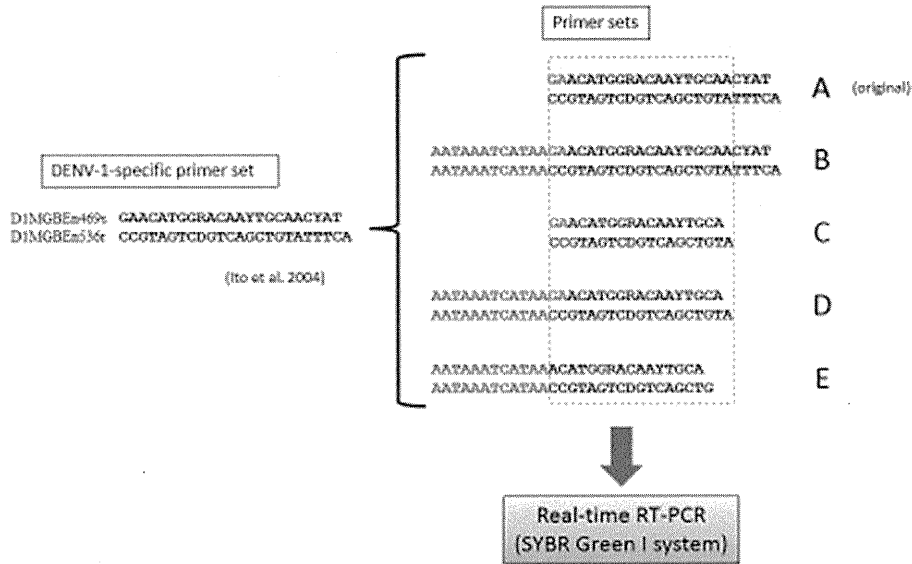


図4 日本脳炎ウイルスによるC1s遺伝子発現誘導

1. デングウイルスゲノム検出用プライマーへの付加効果の検討



Template RNA: serially diluted ($10^1 \sim 10^6$) total RNA of DENV-1-infected A549 cells.

図5 デングウイルス特異的プライマーへの Flap 配列付加

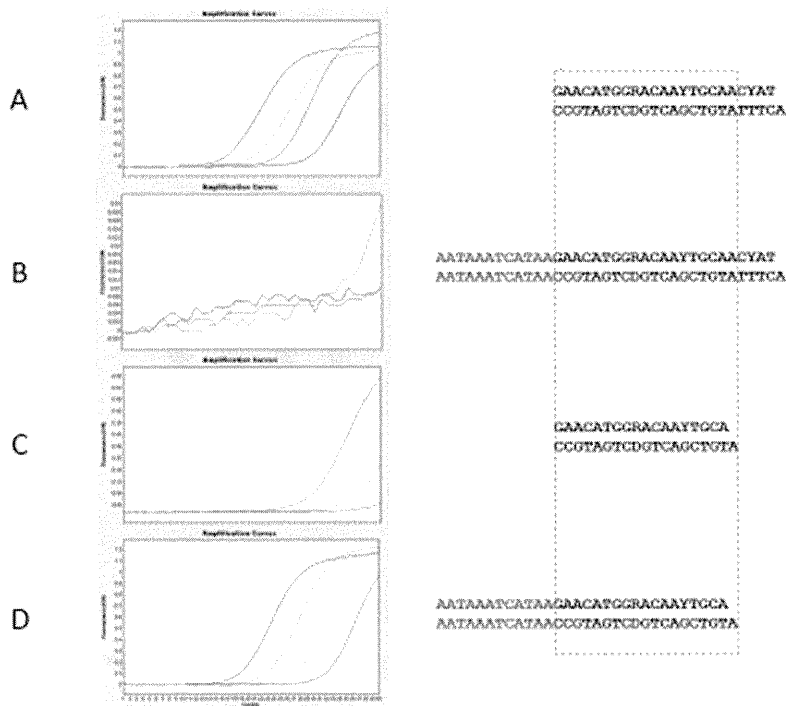


図6 Flap 付加デングウイルス特異的プライマーによる RT-PCR 結果

Summary
(Flavivirus-consensus primer sets)

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

図 7 Flap 配列付加フラビウイルス共通プライマーの検討結果

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 8 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)

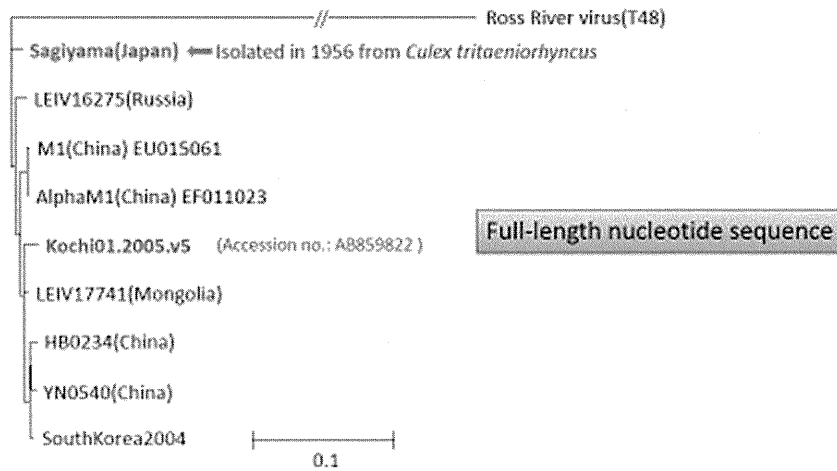


図9 GETV/Kochi/01/2005 の完全長配列を使用した分子系統樹解析

ウエストナイルウイルスNS1蛋白質の発現と精製

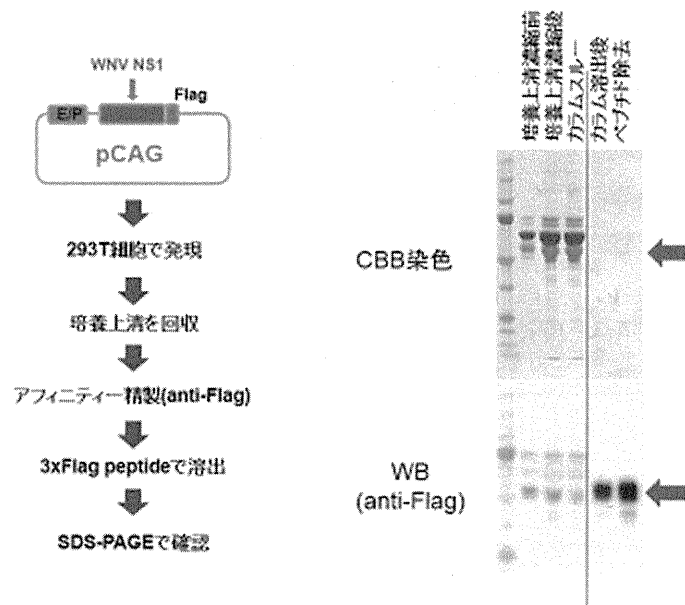


図10 ウエストナイルウイルス NS1 の発現と精製

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(1)	104-10	2013
Baylis SA, Blumel J, Mizusawa S, Matsubayashi K, Sakata H, Okada Y, Nubling CM, Hanschmann KM, HEV 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
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 No. 1		2014
Tsuda, Y. and Kim, K.S.	Ecology of mosquitoes inhabiting a park in urban Tokyo, Japan: density of biting <i>Aedes albopictus</i> and laboratory estimation of the residual longevity.	Medical Entomology and Zoology	63	223-230.	2012
Kato, F., Kotaki, A., Yamaguchi, Y., Shiba, H., Hosono, K., Harada, S., Saijo, M, Kurane, I., Takasaki, T., and Tajima, S.	Identification and characterization of the short variable region of the Japanese encephalitis virus 3' NTR.	Virus Genes	44	191-197	2012

Yamaguchi, Y., Nukui, Y., Kotaki, A., Sawabe, K., Saijyo, M., Watanabe, H., Kurane, I., Takasaki, T., and <u>Tajima, S.</u>	Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein.	Journal of General Virology	94	90-96	2013
Imai, K., Maeda, T., Sayama, Y., M ikita, K., Fujikura, Y., Misawa, K., Nagumo, M., Iwat a, O., Ono, T., <u>Ku rane, I.</u> , Miyahira, Y., Kawana, A. a nd Miura, S.	Mother-to-child transmi ssion of congenital Cha gas disease, Japan.	Emerging Infectious Diseases.	20(1)	146-148	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
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。	シャーガス病における遺 伝子学的診断法の開発と 検討	臨床寄生虫学会 雑誌。	23号	41-45	2013
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	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	日本臨床寄生虫 学会誌	Vol.24-1- 33		2013

