

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
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの特性解析（遺伝子機能解析）品質試験法に関する研究

研究分担者：森川茂（国立感染症研究所 獣医科学部部長）

研究協力者：朴ウンシル、宇田晶彦（同、獣医科学部）吉河智城、西條政幸（同、ウイルス第一部）
倉根一郎（同、副所長）横手公幸、金原知美、丸野真一、新村靖彦（化血研）

研究要旨:細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は、Lister 株から低温馴化により LC16 株、LC16mO 株を経由して樹立された安全性の高いワクチン株である。しかし、LC16m8 株を継代するとブラックサイズのやや大きい LC16mO 型（medium size plaque; MSP）のウイルスが出現する。これまでの解析から、MSP は B5R の一塩基欠失を相補する変異ウイルスであり、その変異のパターンが複数あることが分かっている。これまでにバイオアッセイで得られる MSP 情報と同等の成績が次世代シーケンズ（NGS）解析により得られることを示した。NGS 解析は取得データの処理に比較的時間を要することから、これまでの MSP の変異パターン解析で得られた主要な MSP を定量的に検出可能な PCR 法を開発することを試みた。その結果、MSP 変異配列を識別する MGB-probe を用いるリアルタイム PCR では LC16m8 株と特定の MSP を鑑別できるが、LC16m8 株遺伝子が大量に存在すると、MSP 変異配列特異的 MGB-probe の結合に阻害的効果が生じ、少量の MSP を検出できなくなった。一方、MSP の遺伝子変異特異的配列を 3'末端とする primer を用いた PCR でも LC16m8 株と特定の MSP を識別できた。この方法を SybrG によるリアルタイム PCR へ発展させることにより、主要な MSP 含有率を定量できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は、Lister 株から低温馴化により LC16 株、LC16mO 株を経由して樹立された株である。サルを用いて行われた神経病原性試験により非常に神経毒性が低いことがわかっている。また、1970年代には10万人の子供に接種され、その際に重篤な副反応は確認されなかったことより安全性の非常に高いワクチン株といえる。さらに、自衛隊での成人への種痘にも用いられ安全性がさらに確認されている。Lister 株は 41 以上でも初代ウサギ腎細胞でのブラック形成能があるのに対し、LC16mO 株と LC16m8 株は 41 ではブラックを形成しない（増殖温度感受性）。LC16m8 株は、B5R 遺伝子に 1 塩基欠損があるため、正常な B5R が作られないために初代ウサギ腎細胞におけるブラックサイズが小さい。LC16m8 株を継代するとブラックサイズのやや大きい LC16mO 型のウイルス（medium size plaque; MSP）が出現する。これまでの解析から、これらは LC16mO 型への復帰株ではなく、B5R の一塩基欠失を相補する変異ウイルスであり、その変異のパターンは複数あることが分か

っている。これまでに、次世代シーケンズ（NGS）解析によりバイオアッセイで得られた MSP の情報と同等の成績が得られることを明らかにした。NGS 解析は取得データの処理に比較的時間を要することから、これまでの MSP の変異パターン解析で得られた主要な MSP を、定量的に検出可能な PCR 法を開発し、品質管理に資する情報を提供することを目的とした。

B. 研究方法

1) MSP の性状を保つクローンの配列と出現頻度：
シードウイルスから3代継代して作製したもの（K1）と乾燥細胞培養痘そうワクチン VO7, VO9 を用いた。K1 から Vero E6 細胞で MSP を選択して遺伝子配列を決定した。また、K1 を Vero E6 細胞で継代することにより得られた MSP も同様に解析した。

2) MSP の種類と出現頻度：

これまでの研究から、MSP には LC16m8 株で認められる B5R 遺伝子の 274 位の G 欠損が LC16mO 株型の B5R 遺伝子に復帰したものはなかった。これまでに

得られた MSP の遺伝子変異は、1塩基の duplication による1塩基挿入か、4塩基配列の duplication によるものがある(表1、図 1)。これらの出現頻度は、得られた MSP のクローンの遺伝子配列から算定されたものと、illumina を用いた NGS 解析により得られたものがほぼ一致することから、MSP には L1 から L7 の 7 タイプが大部分を占める考えられる。

3) MSP を検出する PCR 法の検討:

LC16m8 株のウイルスストック中に含まれる MSP の含有率を測定するには、主要なタイプの MSP の含有率を測定すれば良いと考えられる。そこで、以下の PCR 法を検討した。

1) Allele-specific primer PCR による MSP の検出法:

この方法は、SNIP 検出用に開発された PCR で、プライマーの 3' 末端から二番目には変異特異塩基、三番目には不一致塩基を設定した(図2)。

2) Mutation specific primer PCR による MSP の検出法: この PCR では片側のプライマーに MSP の型特異的プライマーを設定した(図3)。

3) MSP 変異部位を含む共通プライマーによる SybrG リアルタイム PCR: これは共通プライマーで増幅した PCR 産物を SybrG 遊離の denature 曲線の違いから検出する方法である(図4)。

4) MGB probe によるリアルタイム PCR: これは、プローブのハイブリに要する部分を 17mer と短く出来るプローブによるリアルタイム PCR で、共通プライマーで増幅し、共通プローブと各 MSP 特異的プローブの 2 つのプローブにより MSP 比率を求める方法である(図5)。

【倫理面への配慮】

ヒト検体、動物は使用していないため該当しない。

C. 研究結果、及び D. 考察

1) MSP の性状を保つクローンの配列と出現頻度:

K1 には、RK13 細胞を用いたプラークサイズの測定法により MSP が 2.5% 程度含まれていることが分かっている。K1 から MSP をプラーククローニングして、これらの B5R の遺伝子配列と出現頻度を算出することにより、MSP の遺伝型と出現頻度が分かっている。MSP には主に 7 遺伝子型があり、それぞれの出現頻度は 2.4% から 36.6% と異なった。NGS による解析では、K1 に含まれる MSP の遺伝子型と出現頻度は 3.8% から 38.9% で、それぞれの遺伝子型と出現頻度はよく一致した(表1)。このことから MSP には主要な 7 タイプがあり、その出現頻度は MSP のタイプにより異なることがわかった。

2) MSP 頻度の定量的 PCR による解析

1) から、幾つかの主要な MSP タイプの含有率を定量的に検出できる PCR を開発すれば、ワクチンの品質管理に応用可能と考えられる。そこで、幾つかの PCR 法を比較検討した。

1) Allele-specific primer PCR による MSP の検出法では、L3, L4 は検出できず L2 は検出できるが PCR サイクルを 20 回以上行くと非特異反応による産物が増幅された。このため、本研究の目的には適さなかった。

2) Mutation specific primer PCR による MSP の検出法では、まず L2 特異的プライマーを作成して検討した。用いるプライマーの長さを 17mer から 22mer まで検討した結果、プライマー長 18mer のプライマーを用いると最も特異度が高かった。そこで、18mer プライマーを用いて LC16m8 株遺伝子に L2 遺伝子を混合した場合、0.01% の L2 型遺伝子が特異的に検出できた。K1, V7, V9 は、NGS 解析では L2 型 MSP が、それぞれ 0.12%, 0.008%, 0.0003% 含まれることが分かっている。これらを対象に L2 特異的 PCR を行うと、K1 では検出できたが V7, V9 では検出できなかった(図3B)。

3) MSP 変異部位を含む共通プライマーによる SybrG リアルタイム PCR は、LC16m8 株と L1, L2, L3 などが鑑別できるが、LC16m8 型 B5R が大部分を占める検体では、MSP 遺伝子型を検出する感度が充分ではなかった(図4B)。

4) MGB probe によるリアルタイム PCR は、それぞれ LC16m8 型、L1, L2, L3, L4 を効率よく特異的に検出できた。しかし、K1 等大部分が LC16m8 型である検体中からの検出効率、Mutation specific primer PCR による MSP の検出法と比較すると劣っていた。

これらの結果から、現時点では Mutation specific primer PCR による SybrG を用いるリアルタイム PCR が最も有望であると考えられる。しかし、MGB probe によるリアルタイム PCR も改良の余地があるため、この両者で、MSP の定量化を可能とするため、条件等の検討を行う予定である。

E. 結論

乾燥細胞培養痘そうワクチンは、quasispecies からなる Lister 株による第 1 世代の Calf lymph ワクチンのワクチニアウイルスから、低温培養により温度感受性株で小ポックサイズを形成する株として選択された LC16m8 株をウサギ初代腎細胞で増殖して製造される。少ポックサイズは B5R 遺伝子の 274 位の G の欠損によることが分かっているが、この欠損を相補する変異が導入されたものが MSP と呼ばれる。MSP の含有率を定量することはワクチンの品質管理のうえでも有用であると考えられる。このためにはリアルタイム PCR による定量法の確立が重要である。

F.研究発表

1 . 論文発表

- 1) Paola Katrina G. Ching, Vikki Carr de los Reyes, Maria Nemia Sualdito, Enrique Tayag, Alah Baby Columna-Vingno, Fedelino F. Malbas, Gilbert C. Bolo, James J. Sejvar, Debbie Eagles, Geoffrey Playford, Erica Dueger, Yoshihiro Kaku, Shigeru Morikawa, Makoto Kuroda, Glenn A. Marsh, Sam McCullough, and A. Ruth Foxwell. Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines. *Emerg Infect Dis.* 2015, 21(5), 21(2):328-31. DOI: 10.3201/eid2102.141433
- 2) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):423-7.
- 3) Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H. Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. *J Gen Virol.* 2014 Oct 15. pii: vir.0.070219-0. doi: 10.1099/vir.0.070219-0.
- 4) David Nadeba Bukbuk, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Koichiro Iha, Aiko Fukuma, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Francis Kasolo, Saka Saheed Baba. Development and Validation of Serological Assays for Viral Hemorrhagic Fevers and Determination of Prevalence of Rift Valley Fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014 Oct 24. pii: tru163. PMID: 25344695
- 5) Eun-Sil Park, Michio Suzuki, Masanobu Kimura, Keiji Maruyama, Hiroshi Mizutani, Ryuichi Saito, Nami Kubota, Tetsuya Furuya, Tetsuya Mizutani, Koichi Imaoka, Shigeru Morikawa. Identification of a natural recombination in the F and H genes of feline morbillivirus. *Virology*, 2014, 468-470: 524-531
- 6) Noriyo Nagata, Masayuki Saijo, Michiyo Kataoka, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Yuko Sato, Naoko Iwata-Yoshikawa, Momoko Ogata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata, and Hideki Hasegawa. Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey. *Int J Clin Exp Pathol* 2014, 7(7):4359-4370.
- 7) Tomoki Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Shoichi Toda, Yukie Shimazu, Koji Yano, Toshiharu Morimitsu, Katsuyuki Ando, Akira Yoshikawa, Miki Kan, Nobuyuki Kato, Takumi Motoya, Tsuyoshi Kuzuguchi, Yasuhiro Nishino, Hideo Osako, Takahiro Yumisashi, Kouji Kida, Fumie Suzuki, Hirokazu Takimoto, Hiroaki Kitamoto, Ken Maeda, Toru Takahashi, Takuya Yamagishi, Kazunori Oishi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, and Masayuki Shimojima. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J. Clin. Microbiol*, 2014 Sep;52(9):3325-33.
- 8) Aya Zamoto-Niikura, Masayoshi Tsuji, Koichi Imaoka, Masanobu Kimura, Shigeru Morikawa, Patricia J. Holman, Haruyuki Hirata, and Chiaki Ishihara. Sika Deer Carrying *Babesia* Parasites Closely Related to *B. divergens*, Japan. *EID*, 2014, 20(8):1398-1400.
- 9) Sunohara M, Morikawa S, Fuse A, Sato I. GATA-dependent regulation of TPO-induced c-mpl gene expression during megakaryopoiesis. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2014;90(4):101-6. PMID: 24815109
- 10) Naoko Iwata-Yoshikawa, Akihiko Uda, Tadaki Suzuki, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa and Noriyo Nagata. Effects of Toll-Like Receptor Stimulation on Eosinophilic Infiltration in Lungs of BALB/c Mice Immunized with UV-Inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus Vaccine. *J. Virol.* 2014, 88(15):8597-8614. DOI: 10.1128/JVI.00983-14.
- 11) Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular stomatitis virus. *J Virol.* 2014, 88(13):7317-7330. DOI:10.1128/JVI.00512-14.
- 12) Yamanaka A, Iwakiri A, Yoshikawa T, Sakai K, Singh H, Himeji D, Kikuchi I, Ueda A, Yamamoto S, Miura M, Shioyama Y, Kawano K, Nagaishi T, Saito M, Minomo M, Iwamoto N, Hidaka Y, Sohma H, Kobayashi T, Kanai Y, Kawagishi T, Nagata N, Fukushi S, Mizutani T, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurane I, Kageyama T, Odagiri T, Saijo M, Morikawa S. Imported case of acute

respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. PLoS One. 2014 Mar 25;9(3):e92777. doi: 10.1371/journal.pone.0092777.

- 13) Uda A, Sekizuka T, Tanabayashi K, Fujita O, Kuroda M, Hotta A, Sugiura N, Sharma N, Morikawa S, Yamada A. Role of Pathogenicity Determinant Protein C (PdpC) in Determining the Virulence of the Francisella tularensis Subspecies tularensis SCHU. PLoS One. 2014 Feb 18;9(2):e89075.
 - 14) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akihiko Uda, Osamu Fujita, Toshio Mizoguchi, Junji Shindo, Chun-Ho Park, Noboru Kudo, Hitoshi Hatai, Toshifumi Oyamada, Akio Yamada, Shigeru Morikawa, and Kiyoshi Tanabayashi. Serosurveillance for Francisella tularensis among wild animals in Japan using a newly developed competitive ELISA. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2014 Apr;14(4):234-9
 - 15) Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, et al. , Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. J Inf Dis., 2014 Mar;209(6):816-27.
2. 学会発表
 1. 堀田明豊、棚林清、山田章雄、森川茂. 国内の医師および獣医師への One Health についての意識調査. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 北海道, 2014 年 9 月
 2. 堀田明豊, 木村昌伸, 中村幸子, 片山敦司, 中下留美子, 坪田敏男, 猪島康雄, 鈴木道雄, 今岡浩一, 棚林清, 藤田修, 山本美江, 宇田晶彦, 森川茂. 2007 年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) に対する抗体調査. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 北海道, 2014 年 9 月.
 3. 堀田明豊、木村昌伸、坪田敏男、中村幸子、片山敦司、中下留美子、猪島康雄、鈴木道雄、今岡浩一、棚林清、藤田修、山本美江、宇田晶彦、森川茂. 「2007 年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) に対する抗体調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 4. 藤田修、宇田晶彦、木村昌伸、藤田博己、今岡浩一、森川茂. 「ニホンジカから採取したマダニ類のウイルス遺伝子保有状況からみた自然界における SFTS ウイルス維持様式の検討」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 5. 森川茂、木村昌伸、堀田明豊、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、野口章、井上智、今岡浩一、前田健. 「野生のシカにおける SFTS ウイルス抗体調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 6. 浜崎千菜美、鍬田龍星、野口慧多、寺田豊、下田宙、高野愛、鈴木和男、森川茂、前田健. 「野生動物における SFTS ウイルス感染の疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 7. 松本苑子、橋野正紀、鈴木尋、高野愛、藤田修、堀田明豊、森川茂、高田伸弘、渡邊健太、清水隆、度会雅久. 「ダニにおける Francisella tularensis の全国的疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 8. 堀田明豊、棚林清、山田章雄、森川茂. 「国内の医師および獣医師への One Health についての意識調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
 9. 加来義浩、奥谷晶子、河合康洋、野口章、濱本紀子、梁瀬徹、加藤友子、新井智、井上智、森川茂. 「国内で分離された未分類のラプトウイルスの遺伝学的解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 10. 新倉綾、森川茂、平田晴之、石原智明. 「北海道のシュルツマダニ Ixodes persulcatus から分離された Babesia microti の性状解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 11. 新井智、池山優、Boldgiv Bazartseren、Boldbaatar Bazartseren、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、森川茂、Yanagihara Richard、大石和徳. 「モンゴルのトガリネズミに確認された遺伝的に異なるハンタウイルスの共循環」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 12. 池山優、新井智、Kang Haeji、大館智志、Taylor Kyle、中田圭亮、雲野明、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、森川茂、Yanagihara Richard、大石和徳. 「Sarufutsu virus ; オオアシトガリネズミに感染を確認した新規ハンタウイルス」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 13. 朴ウンシル、鈴木道雄、木村昌伸、丸山啓二、水谷浩志、斉藤隆一、久保田菜美、古谷哲也、水谷哲也、今岡浩一、森川茂. 「日本のネコにおける新規モルビリウイルス(feline morbillivirus, FMV)の疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
 14. 森川茂、朴ウンシル、今岡浩一、前田健、宇田晶彦. 「SFTS ウイルスの生活環における野生のシカの役割」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日

15. 西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸. 「重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布」 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
16. 前田健、濱崎千菜美、下田宙、鎌田龍星、野口慧多、米満研三、高野愛、鈴木和男、森川茂. 「SFTS ウイルスの生活環における動物の重要性」 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
17. 朴ウンシル、佐藤由子、中島典子、古谷哲也、水谷哲也、今岡浩一、森川茂. 「日本国内ネコにおける新規モルビリウイルス (feline morbillivirus , FMV) の疫学調査」 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
18. 河内健吾、氏家誠、谷英樹、森川茂、田口文広. 「Baculovirus を用いた牛 Torovirus の可溶性 HemagglutininEsterase protein の発現」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
19. 新井智、池山優、Se Hun Gu、Son Truong Nguyen、福井大、大館智志、吉川泰弘、森川茂、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、Richard Yanagihara、大石和徳. 「ベトナムの翼手目由来に確認されたハントウイルスの多様性」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
20. 谷英樹、谷口怜、福間藍子、福士秀悦、森川茂、下島昌幸、西條政幸. 「重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP の細胞融合能と 25-hydroxycholesterol による感染阻害効果」 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
21. 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、江川和孝、下島昌幸、森川茂、西條政幸. 「ワクシニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立」 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
22. Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushima, Aiko Fukuma¹ Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani¹ Tomoyuki Yoshikawa, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in domestic and wild animals in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
23. Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushima, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Masayuki Shimojima¹, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
24. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushima, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Analyses of cell entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus using pseudotype vesicular stomatitis virus system. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
25. Akihiko Uda, Hiroki Kawabata, Shuetsu Fukushima, Yoshiharu Kaku, Masayuki Shimojima, Shuji Ando, Ken Maeda, Hiromi Fujita, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Sawabe Kyoko. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
26. Yu Ikeyama, Satoru Arai, Bazartseren Boldgiv, Bazartseren Boldbaatar, Kazuko Araki, Hiroshi Satoh, Keiko Tanaka-Taya, Shigeru Morikawa, Richard Yanagihara, Kazunori Oishi. Co-circulation of two distinct divergent hantaviruses in Sorex species in Mongolia. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
27. Shigeru Morikawa, Akihiko Uda, Masanobu Kimura, Kawabata, Hiroki, Shuetsu Fukushima, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Shuji Ando, Sawabe Kyoko, Hiromi Fujita, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in animals and ticks in Japan. The 10th China-Japan International Conference of Virology, Changchun, China, Aug25-28 2014.

G.知的財産権の出願・登録状況

なし

図 2. Allele-specific primer PCR による MSP の検出

Allele-specific primer PCRによるMSPの検出法



Primerの3' 末端から二番目には変異特異塩基、三番目には不一致塩基

	Ratio(%)	参考配列	Forward primer 配列
m0		GTCTCTGAATTATATGATAAGCC-ATT-AT-AC-G	
m8		GTCTCTGAATTATATGATAAGCC-ATT-AT-AC--	
L1:267A	36.6 / 38.9*	GTCTCTGAATTATATGATAAGCC A TT-AT-AC--	GTCTCTGAATTATATGATAAGC GAA
L2: 267C	14.6 / 6.6	GTCTCTGAATTATATGATAAGCC C ATT-AT-AC--	GTCTCTGAATTATATGATAAGC GCA
L4: 271T	24.4 / 20.6	GTCTCTGAATTATATGATAAGCC-ATT-AT T AC--	CTGAATTATATGATAAGCCATT AGTA
L5: 274(4ins)	12.2 / 12.8	GTCTCTGAATTATATGATAAGCC-ATT-AT-AC ATAC	ATTATATGATAAGCCATTATAC ATAC
L6: 275-6(2del)	4.9 / 12.3	GTCTCTGAATTATATGATAAGCC-ATT TA T-AC--	CTCTGAATTATATGATAAGCCAT GTA

*MSP中の頻度/deep seq

Common Reverse primer : GGACACGTAACAGTATCATTCCA

図 3. Mutation specific primer PCR による MSP の検出

Mutation specific primer PCRによるMSPの検出法



特異的変異塩基がプライマーの3' 末端に来るように、17bp~22bpまで設計。

例) 267C MSPのforward primer

267C 参考配列 : GTCTCTGAATTATATGATAAGCC**C**ATT-AT-AC--

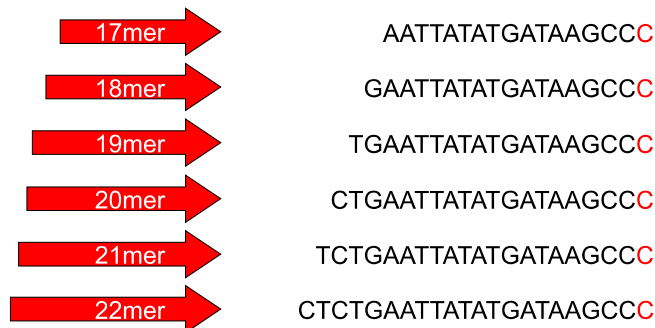
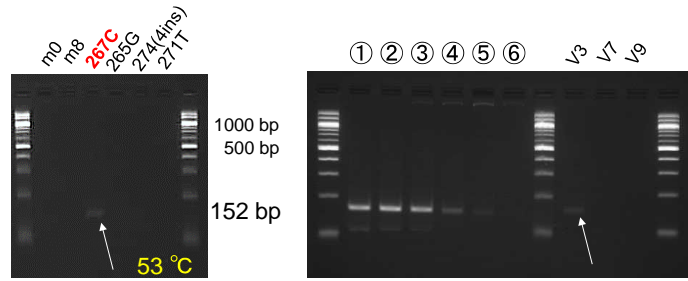


図 3 B. Mutation specific primer PCR による L2 型 MSP の検出

18mer, annealing temperature 53°C, 20~30 cycle PCR反応で特異的陽性確認。



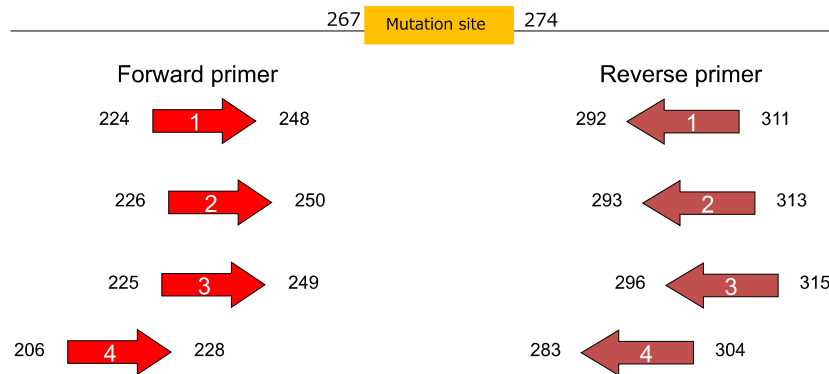
Copynumbers in reactions

Diluted	①	②	③	④	⑤	⑥	V3	V7	V9
267C	1.3E+08	1.3E+07	1.3E+06	1.3E+05	1.25E+04	0	6.40E+04	4.70E+03	0
m8	0	4.5000E+07	4.9500E+07	4.9950E+07	4.9995E+07	5.00E+07	5.2035E+07	4.6944E+07	6.4994E+07
Ratio(%)	100	10	1	0.1	0.01	0	0.12	0.01	0

- " 16~22mer中、18merプライマーでMSP特異的PCRが可能。
- " 54~64°Cまでannealing temperatureを設定して行ったが、特異的な反応まで低下。
- " V3のMSPまでは検出可能であるが、V7、V9のMSP検出にはさらなる検討が必要。
- " 17~18merのプライマーを設計し、major MSPの検出を試みる。

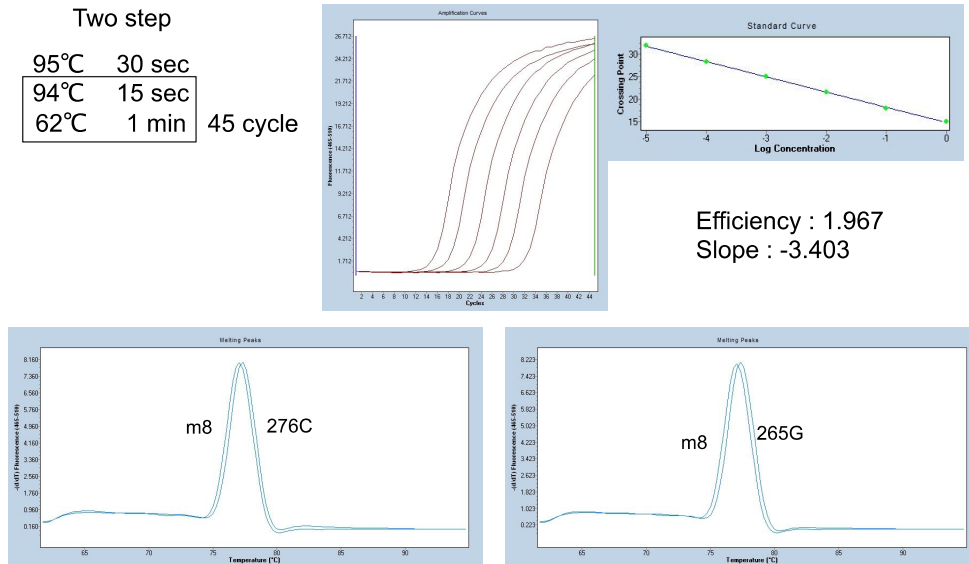
図 4 . MSP 変異部位を含む共通プライマーによる SybrG リアルタイム PCR

Common primer PCR/SybrGによるMSPの検出法



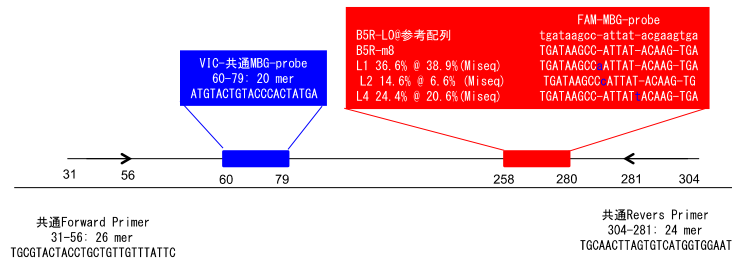
変異領域を挟むように、また、PCR産物のTm値に差があるようにcommon primersをデザイン。リアルタイムの融解曲線解析によりサンプル中の変異株の比率を調べる。

図 4 B. L2, L3 型 MSP の共通プライマーによる SybrG リアルタイム PCR での検出



- ✓ 4組のprimer中Common primer 2を用いたリアルタイムの融解曲線解析で、差が出る。
- ✓ 271Tおよび274(4ins)はm8と融解曲線で差が出ない。
- ✓ V3, V7およびV9でも融解曲線における差は見出せなかった。

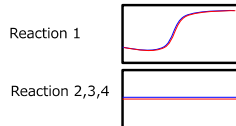
図 5 .MGB-probe によるリアルタイム PCR による MSP の検出



1サンプルに付き以下の4つの反応を行う

組み合わせ	共通 Forward & Revers	VIC 共通MGB-probe	FAM-MGB-probe
Reaction 1	使用	使用	B5R-m8用 FAM-MGB-Probe
Reaction 2	使用	使用	L1 FAM-MGB-Probe
Reaction 3	使用	使用	L2 FAM-MGB-Probe
Reaction 4	使用	使用	L3 FAM-MGB-Probe

サンプル中にB5R-m8が100%の場合の増幅イメージ



サンプル中にB5R-m8が50%、L1が25%、L2が6%の場合の増幅イメージ

