

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

チクングニアウイルス遺伝子型間共通迅速診断法の開発

担当責任者 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）
藤本 嗣人（国立感染症研究所感染症情報センター第四室長）
小長谷 昌未（国立感染症研究所感染症情報センター）
ギジェルモ ボサダス・エレラ（国立感染症研究所ウイルス第一部第三室）
高崎 智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室長）
倉根 一郎（国立感染症研究所副所長）

研究要旨

チクングニア熱の流行域は近年急速に拡大している。チクングニア熱はチクングニアウイルス (CHIKV) によって発症する熱性疾患であり、特に高齢者において重篤な経過をとる。チクングニアウイルスはトガウイルス科アルファウイルス属に分類される一本鎖の+鎖 RNA ウイルスである。チクングニアウイルスにはアジア型、中央・東・南アフリカ型、西アフリカ型の遺伝子型が存在する。チクングニアウイルスは蚊によって媒介され、都市部においてはヒト-蚊-ヒトの感染環を形成する。その主たる媒介蚊はヒトスジシマカやネッタイシマカ等のヤブカ属の蚊である。日本には媒介蚊であるヒトスジシマカが広く生息しており、チクングニアウイルスが日本に侵入する可能性は否定できない。したがって急性期患者の迅速な把握は防疫上重要である。そこでより迅速かつ全ての遺伝子型のウイルスを検出することを目的とした RT-PCR 法の開発を行った。その結果、アジア型および中央・東・南アフリカ型のチクングニアウイルスを検出できる特異性の高い Real time RT-PCR 法を開発したので報告する。

A. 研究目的

近年蚊によって媒介されるチクングニア熱 (Chikungunya fever) の流行域の拡大が報告されている。チクングニア熱は 1952 年にアフリカのタンザニアでデング熱様疾患として初めて報告された人獣共通感染症であり、時に激しい関節痛、発疹、悪寒、頭痛、悪心、嘔吐、筋肉痛を伴うウイルス性急性熱性疾患である。また近年のチクングニア熱の特徴は死亡例を含む重篤な症例が報告されていることである。チクングニア熱の原因ウイルスはトガウイルス科アルファウイルス属に分類されるチクングニアウイルス (Chikungunya virus: CHIKV) である。チクングニアウイルスは昆虫媒介性ウイルスで

あり、その媒介蚊はネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) や日本にも広範囲に生息するヒトスジシマカ (*A. albopictus*) などのヤブカ属の蚊である。

チクングニアウイルスにはアジア型、中央・東・南アフリカ型、西アフリカ型の 3 つの遺伝子型が存在する。近年の中央・東・南アフリカ型のチクングニア熱の流行は 2004 年にケニア沿岸において確認され、インド洋諸島、インド、東南アジアに急速にその流行域を拡大した。またアジア型の流行が 2013 年末よりカリブ海諸国で報告され、2014 年には米国フロリダ州、メキシコ、エル・サルバドル、コスタリカ、ベネズエラにその流行域が拡大した。

これまでに我々は RT-PCR 法, リアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子検出法, IgM 捕捉 ELISA 法, 50%プラーク減少法を用いた中和法による診断法を用いた検査体制を確立した. 日本には媒介蚊であるヒトスジシマカが広く生息しており, チクングニアウイルスが日本に侵淫する可能性は否定できない. また, チクングニアウイルスの感染環は森林部では主に霊長類と蚊の間で形成されているが, 都市部ではヒト-カ-ヒトの感染環が形成される. したがって防疫上チクングニア熱の急性期患者の迅速な把握が必須である. そこで我々は現在のチクングニアウイルス遺伝子検出系である RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR 法に比較してさらに迅速且ついずれの遺伝子型のウイルスも検出可能な RT-PCR 法の開発を試みたので報告する.

B. 研究方法

ウイルス: チクングニアウイルス S27 株, BaH306 株, SL10571 株, SL11131 株, MAL09 株, R109 株より High pure viral RNA kit (ロシュ)を用いてウイルス RNA を抽出し供試した. またサギヤマウイルス, ヴェネズエラ馬脳炎ウイルス, 東部馬脳炎ウイルス, シンドビスウイルス, セムリキ森林熱ウイルス, デングウイルス 1 型, 2 型, 3 型, 4 型, 日本脳炎ウイルス, ウエストナイルウイルスより同様にウイルス RNA を抽出し供試した. さらにチクングニア熱患者血清よりウイルス RNA を抽出し用いた. 陰性対照としてヒト全血由来核酸を用いた.

合成チクングニアウイルス RNA を用いた RNA コピー数の検討: チクングニアウイルスの E1 蛋白質領域をプラスミドベクター pcDNA3.1 にクローニングし, 目的 RNA を合

成した. 得られた合成 RNA の吸光度と分子量からコピー数を算出しリアルタイム PCR 法において検量線を作製した.

プライマーの設計: チクングニアウイルスの構造タンパク質コーディング領域にセンスプライマー 8 種類, アンチセンスプライマー 7 種類を設計し検討した.

RT-PCR 法: サンプルに遺伝子検出マーカー SYBR green I を添加し, 温度条件 48 60 秒, 95 60 秒, [95 4 秒, 68 4 秒, 68 4 秒] で 45 サイクル反応した. RT-PCR 反応には Hyper PCR UR MK-IV (トラスト, 兵庫県加西市)およびライトサイクラー 96 システム(ロシュ)を用いた. RT-PCR 反応により得られた増幅産物を 470nm の波長のシグナルおよびゲル電気泳動用にて検出した.

C. 研究結果

プライマーの設計とプライマーペアのチクングニアウイルスに対する特異性の検討:

チクングニアウイルスの構造タンパク質である E1 領域にセンスプライマー 8 種類アンチセンスプライマー 7 種類を設計し様々な組み合わせを検討したところ, センスプライマー-CHIK10572f 及びアンチセンスプライマー-CHIK10798 r の組み合わせを用いて温度条件 48 60 秒, 95 60 秒, [95 4 秒, 68 4 秒, 68 4 秒]で 45 サイクル反応させた(図 1). その結果チクングニアウイルス中央・東・南アフリカ型ウイルスである S27 株およびアジア型株である BaH306 株を増幅した.(図 2A).

プライマーペア CHIK10572f / CHIK10798 r のチクングニアウイルス RNA に対する感度の検討: チクングニアウイルスの E1 蛋白質領

域をプラスミドベクター-pcDNA3.1 にクローニングし, 目的 RNA を合成した. 得られた合成 RNA の吸光度と分子量からコピー数を算出しリアルタイム RT-PCR 法における検出感度を検討した. 10^5 の合成 RNA を 10 倍階段希釈し, 各コピー数におけるプライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r の反応を検討した結果チクングニアウイルスに対して 1 RNA コピー/サンプルの検出感度を示した (図 2A). さらに RNA の検出においては定量性が認められた (図 2B).

近年の流行株に対するプライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r の検討: プライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r の近年の流行株であり, 中央・東・南アフリカ型である MAL09 株およびアジア型である R109 株に対する反応性を検討した. その結果のチクングニアウイルス MAL09 株, および R109 株においても目的産物の増幅が認められた (図 3A).

急性期患者血清に対するプライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r の検討: スリランカからの輸入症例患者血清に対するプライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r の反応性を検討した結果同一患者由来の急性期血清 (2 病日) においては目的産物が検出されたが回復期血清 (8 病日) の患者血清においては目的産物が検出されなかった (図 3B). また 2 病日患者血清より分離されたチクングニアウイルス SL10571 株および SL11131 株に対しても同様に目的産物が検出された (図 3B).

プライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r の特異性の検討: プライマーペア CHIK10572f/

CHIK10798 r の特異性を検討するために他のアルファウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス, シンドビスウイルス, ゲタウイルス, 東部ウマ脳炎ウイルス, ベネズエラ馬脳炎ウイルス, サギヤマウイルスおよびフラビウイルスであるデングウイルス 1 型 2 型 3 型, 4 型, 日本脳炎ウイルス遺伝子型 1 型, 遺伝子型 3 型, ウエストナイルウイルスに対する反応性を検討した. その結果プライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r はいずれのウイルスとも反応せず, チクングニアウイルスに対して特異的に反応した (図 4). またプライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r のヒト血液由来核酸に対する反応性を検討したところ非特異反応は観察されなかった (図 4).

D. 考察

これまでに我々はチクングニア熱の実験室診断法として RT-PCR 法, リアルタイム RT-PCR 法 (TaqMan 法) を用いた遺伝子検出法, IgM 捕捉 ELISA 法, 50% プラーク減少法を用いた中和法による診断法を確立した. しかしながら既存の RT-PCR 法では 1 時間以上の時間を要する. そこで我々はより迅速に反応が終了するリアルタイム RT-PCR 法によるチクングニアウイルスの診断系を確立した. 本 RT-PCR 法の第一の特徴はその迅速性である. 本 RT-PCR 法においては RT 反応から融解曲線解析を終了するまで約 15 分で終了する. またその後の反応産物のアガロースゲルでの解析およびシーケンスでの遺伝子配列の確認も可能であるためチクングニアウイルスの遺伝子型の解析も容易である. チクングニアウイルス E1 タンパク質領域において保存されている配列を基にプライマーペア CHIK10572f/CHIK10798 r を設計した. その結

果プライマーペア CHIK10572f/CHIK10798 r はチクングニアウイルスを特異的に検出し、さらに感度が1 RNA コピー/サンプルであった。さらにプライマーペア CHIK10572f/CHIK10798 r を用いて様々なウイルス株に対する増殖性を検討したところアジア型およびアフリカ型の両遺伝子型のウイルスに対して増幅産物が得られた。西アフリカ型のウイルスについてはその増幅能を確認できなかったが、CHIK10572f および CHIK10798 r の配列は遺伝子型間で保存されているため、西アフリカ型に対してもプライマーペア CHIK10572f/CHIK10798 r は有効であると期待される。

チクングニアウイルスはヒトにおいて高いウイルス血症を呈するため、ヒト-カ-ヒトの感染環を形成する。したがって急性期のチクングニア熱患者を迅速に診断することは、感染拡大を予防するために重要である。よって迅速に患者血清からチクングニアウイルスを検出できる本 RT-PCR 法は臨床検体への応用が可能である。今後は本診断系の感度の向上、特異性の確認を行い、診断系としての信頼性の向上をめざす。

E. 結論

チクングニア熱の治療法は確立されておらず、チクングニアウイルスの動向にはヒト、蚊、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り、日本においても媒介蚊であるヒジシマカが生息することからチクングニアウイルスの我が国への侵入は予断を許さない。急速な輸送手段の発達とネッタイシマ蚊、ヒトスジシマ蚊の分布拡大、熱帯雨林地域への人口拡張により世界の熱帯・亜熱帯地域、特に東南アジアにおいてチ

クングニア熱は今後も流行が続くことが予想される。本研究において我々は遺伝子診断の迅速性の向上を目的として迅速な real time RT-PCR 診断系の確立を行ったところチクングニアウイルスを特異的に検出するプライマー候補を得た。本診断系は15分前後で完了し、デングウイルス、他のアルファウイルス及びヒト由来検体においても非特異反応が観察されなかったため、迅速診断系として期待される。

F. 健康危険情報

2007年初頭に2例のスリランカからの輸入症例が日本で初めて確認されて以来、2014年12月までに日本において70例を超える輸入症例が確認されている。温帯地方であるイタリアでは2007年に、フランスでは2010年にそれぞれチクングニア熱の国内流行が報告されており、このときの媒介蚊は日本にも生息するヒトスジシマカであったため、日本においてもチクングニアウイルスの侵淫の可能性は否定できない。現在モインドおよび東南アジア地域を中心にチクングニア熱の流行は拡大しており、さらに2014年7月にはアメリカでその流行が確認されたため、早期の防疫体制の確立が求められる。チクングニア熱の流行地域に渡航する場合はカに吸血されにくい服装や忌避剤の使用等の予防対策が必須である。チクングニア熱は平成23年2月に「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）において4類感染症に指定されており、今後ともその動向の把握が求められる。ワクチンが実用化されていない現在、旅行先におけるチクングニア熱の流行状況を把握し、蚊対策に十分考慮すると共に、医療機関、地域住民、

行政、研究機関の一層の協力体制を確立するために今後も関係各機関にこれまでの成果を提供する。

G. 研究発表

1. 論文発表

[雑誌]

- 1) 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* (in press).
- 2) Nagata N, **Saijo M**, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Ogata M, Kurane I, Morikawa S, Sata T, Hasegawa H. Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey. *Int J Clin Exp Pathol* 15;7(7):4359-70, 2014.
- 3) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, **Saijo M**, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains and prediction of patient survival based on viral load. *J Clin Microbiol* 52(9):3325-33, 2014.
- 4) Hiraki T, Yoshimitsu M, Suzuki T, Goto Y, Higashi M, Yokoyama S, Tabuchi T, Futatsuki T, Nakamura K, Hasegawa H, **Saijo M**, Kakihana Y, Arima N, Yonezawa S. Two autopsy cases of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) in Japan: A pathognomonic histological feature and unique complication of SFTS. *Pathol Int* 64(11):569-75, 2014.
- 5) Bukbuk DN, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Iha K, Fukuma A, Shimojima M, Morikawa S, **Saijo M**, Kasolo F, Baba SS. Development and validation of serological assays for viral hemorrhagic fevers and determination of the prevalence of Rift Valley fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 108(12):768-73, 2014.
- 6) 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* 67(6):423-7, 2014.
- 7) 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* 88(13):7317-30, 2014.
- 8) Moi ML, Ami Y, Shirai K, Lim CK, Suzaki Y, Saito Y, Kitaura K, **Saijo M**, Suzuki R, Kurane I, Takasaki T. Formation of Infectious Dengue Virus–Antibody Immune Complex In Vivo in Marmosets (*Callithrix jacchus*) After Passive Transfer of Antidengue Virus Monoclonal Antibodies and Infection with Dengue Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg* (in press).
- 9) Moi ML, Takasaki T, **Saijo M**, Kurane I. Determination of antibody concentration as the main parameter in a dengue virus antibody-dependent enhancement assay using FcγR-expressing BHK cells. *Arch Virol* 159(1):103-116, 2014.
- 10) Tajima S, Kotaki A, Yagasaki K, Taniwaki T, Moi ML, Nakayama E, **Saijo M**, Kurane I, Takasaki T. Identification and amplification of Japanese encephalitis virus and Getah virus propagated from a single porcine serum sample: a case of coinfection. *Arch Virol* 159(11):2969-2975, 2014.
- 11) 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* 9(3):e92777, 2014.

- 12) 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. *Journal of Infectious Diseases* 209(6) :816-827, 2014.
 - 13) Nakamichi K, Lim CK, **Saijo M**. Stability of JC virus DNA in cerebrospinal fluid specimens preserved with guanidine lysis buffer for quantitative PCR testing. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(4):307-10.
 - 14) Nakamichi K, Tajima S, Lim CK, **Saijo M**. High-resolution melting analysis for mutation scanning in the non-coding control region of JC polyomavirus from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Virol.* 2014 Jul;159(7):1687-96.
 - 15) Shirai S, Yabe I, Kano T, Shimizu Y, Sasamori T, Sato K, Hirotsu M, Nonaka T, Takahashi I, Matsushima M, Minami N, Nakamichi K, **Saijo M**, Hatanaka KC, Shiga T, Tanaka S, Sasaki H. Usefulness of ¹¹C-methionine-positron emission tomography for the diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol.* 2014;261 (12):2314-8.
 - 16) Ohara H, Kataoka H, Nakamichi K, **Saijo M**, Ueno S. Favorable outcome after withdrawal of immunosuppressant therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy after renal transplantation: case report and literature review. *J Neurol Sci.* 2014; 15;341(1-2):144-6.
2. 学会発表
- 1) **西條政幸**. 日本における重症熱性血小板減少症候群とダニ媒介性脳炎の流行. 第19回日本神経感染症学会総会. 金沢, 2014年9月4-6日.
 - 2) 三浦義治, 岸田修二, 中道一生, **西條政幸**, 桁丈基弘, 水澤英洋, 山田正仁. 近年の日本国内発症進行性多巣性白質脳症患者の特徴について. 第19回日本神経感染症学会総会. 金沢, 2014年9月4-6日.
 - 3) 三條伸夫, 喜納里子, 能勢裕里江, 石橋哲, 穴戸-原由紀子, 中道一生, **西條政幸**, 前原健寿, 江石義信, 水澤英洋. メフロキン治療が有効な進行性多巣性白質脳症における脳の病理学的特徴. 第19回日本神経感染症学会総会. 金沢, 2014年9月4-6日.
 - 4) 山本詞子, 石井一弘, 本間晋介, 岡田克典, 中道一生, **西條政幸**, 玉岡晃. 肺移植術後に発症した進行性多巣性白質脳症の60歳女性例. 第19回日本神経感染症学会総会. 金沢, 2014年9月4-6日.
 - 5) **西條政幸**, 伊藤(高山)睦代, 森本金次郎, 垣内五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, 林昌宏. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染症に対する非増殖型組換え狂犬病ワクチンの開発. 第19回日本神経感染症学会総会. 金沢, 2014年9月4-6日.
 - 6) 中道一生, 林昌宏, **西條政幸**. 日本における進行性多巣性白質脳症の実験室サーベイランスおよびその発生動向の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014年11月10-12日.
 - 7) 伊藤(高山)睦代, 林昌宏, 森本金次郎, 垣内五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, **西條政幸**. 非増殖型組換え狂犬病ウイルスを用いたアレナウイルスに対するワクチンの開発. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014年11月10-12日.
 - 8) Moi ML, 白石健二, 網康至, 宮田幸長, 林昌宏, 須崎百合子, 北浦孝一, **西條政幸**, 鈴木隆二, 倉根一郎, 高崎智彦. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014年11月10-12日.
 - 9) 林昌宏, 司馬肇, 細野邦明, **西條政幸**, 倉根一郎, 高崎智彦. Fc R 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン被接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強能の検討. 齋藤悠香, Moi ML, 竹下望, 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014年11月10-12日.
 - 10) **西條政幸**, 吉河智城, 福士秀悦, 谷秀樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Singh H, 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. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
- 11) 福士秀悦、永田典代、岩田奈織子、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、下島昌幸、**西條政幸** . 若齢および高齢マウスにおける重症熱性血小板減少症群ウイルスの感染感受性の解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
 - 12) 下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、谷口怜、**西條政幸** . プラークを形成する SFTS ウイルスによる中和抗体価測定 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
 - 13) 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群ウイルス GP の細胞融合能と 25-hydroxycholesterol による感染障害効果 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
 - 14) 川岸崇裕、金井祐太、谷英樹、下島昌幸、**西條政幸**、松浦善治、小林剛 . 高病原性コウモリ由来レオウイルスのリバースジェネティックス系の確立 . 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
 - 15) 山口幸恵、林昌宏、伊藤(高山)睦代、垣内五月、堀谷まどか、田島茂、高崎智彦、倉根一郎、渡邊治雄、**西條政幸** . 日本脳炎ウイルスの神経侵襲性決定に關与する炎症性サイトカインの解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
 - 16) 林昌宏、van den Braak W、堀谷まどか、伊藤(高山)睦代、山口幸恵、垣内五月、**西條政幸** . Expression of rabies virus glycoprotein G by using recombinant baculovirus. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
 - 17) 中山絵里、小滝徹、谷ヶ崎和美、林昌宏、**西條政幸**、高崎智彦 . チクングニア熱の輸入症例の報告および血清学的診断法の開発 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
 - 18) 田島茂、谷ヶ崎和美、小滝徹、中山絵里、Moi ML、林昌宏、**西條政幸**、倉根一郎、高崎智彦 . 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

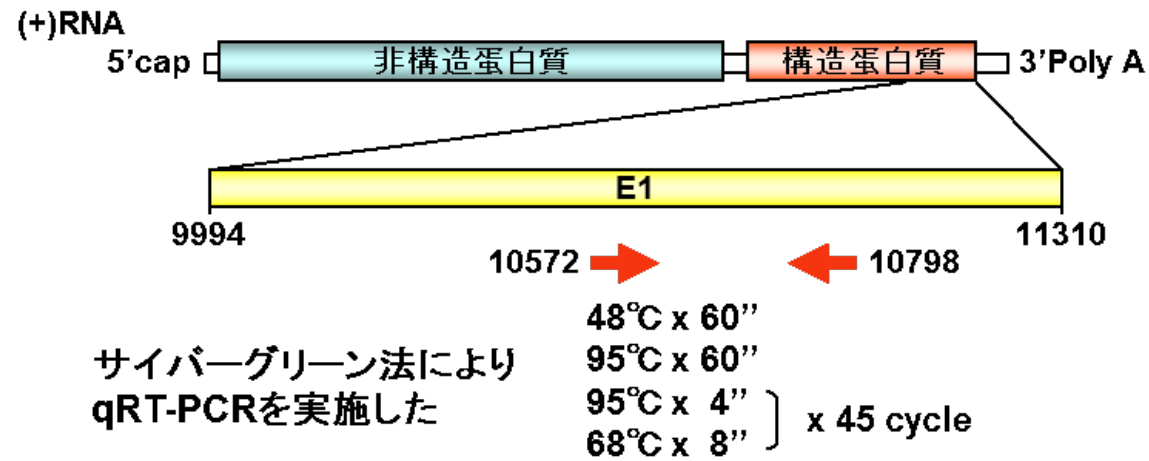


図 1 .CHIKV 検出用リアルタイム RT-PCR 用プライマーの設計：CHIKV 10 株のアライメント結果より E1 領域の保存領域に特異的プライマーを設計した。

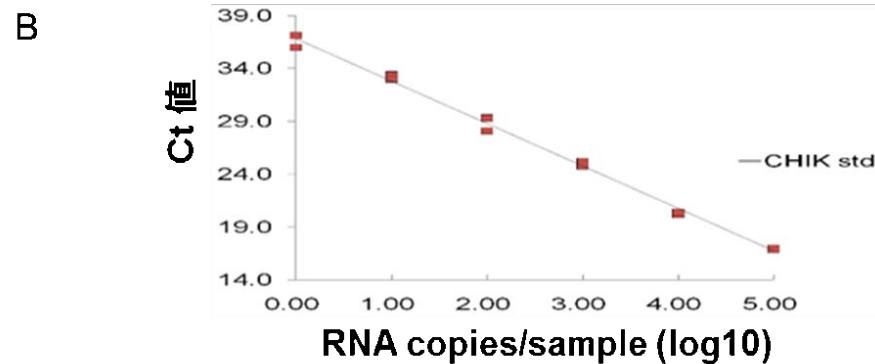
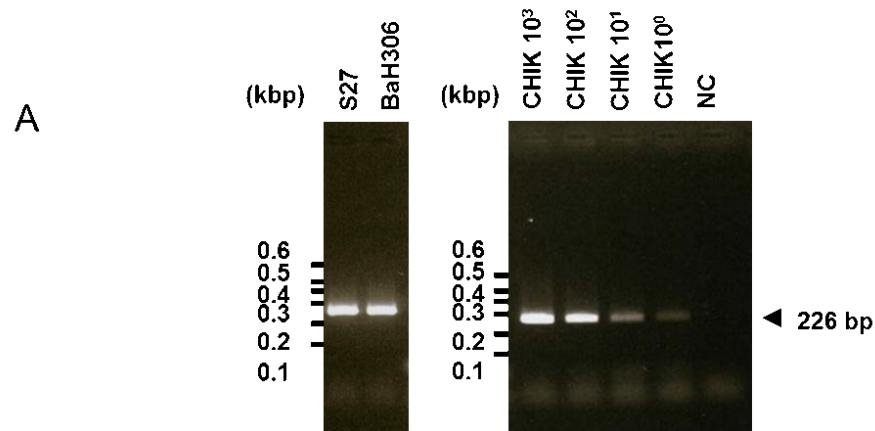


図 2 . CHIKV 検出用リアルタイム RT-PCR の感度および定量性の検討：リアルタイム RT-PCR による検討の結果 CHIKV プロトタイプである S27 株および BaH306 株に対して特異的増幅を示し、RNA コピー数依存的に標的遺伝子の増幅が確認された (A)、設計したプライマーによる RT-PCR の増幅産物は定量性を示した (B)

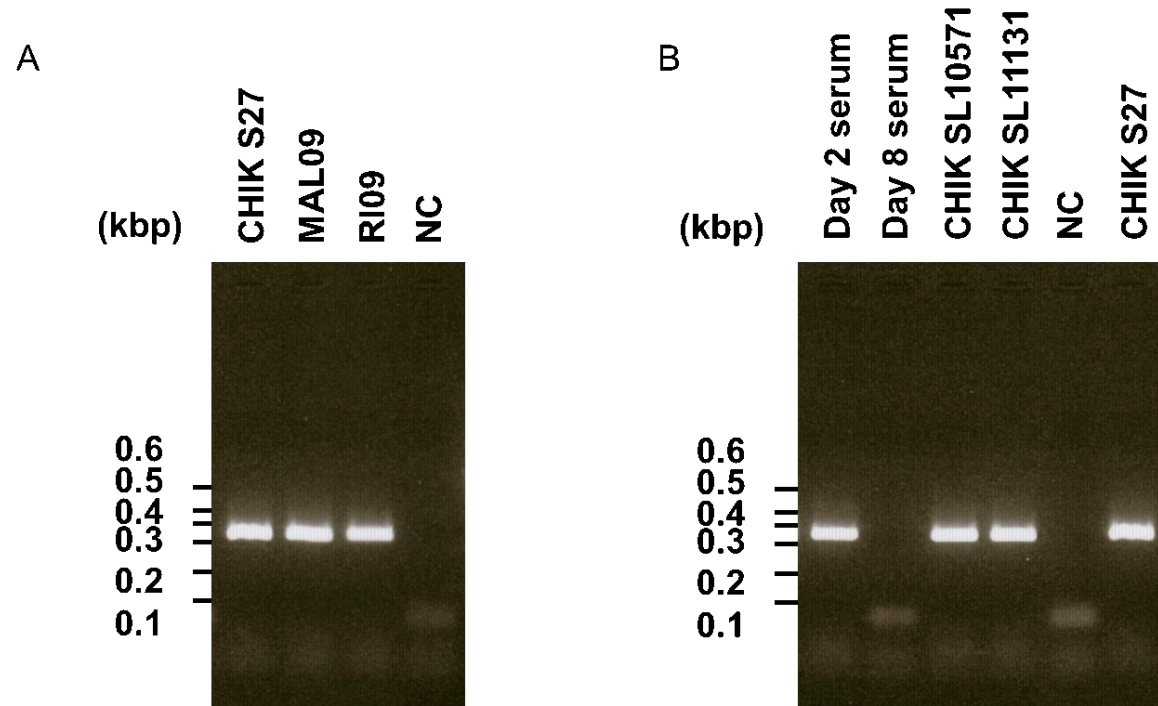


図 3 .CHIKV 検出用リアルタイム RT-PCR 用プライマーの臨床検体と分離株に対する反応性および特異性の検討：プライマーペア CHIK10572f / CHIK10798r はマレーシア (ML09 株)、インドネシア (RI09 株) からの輸入症例からの分離株に対して特異的増幅が確認された (A)、またプライマーペア CHIK10572f / CHIK10798r は急性期患者血清中のチクングニアウイルスおよび、患者血清より分離された SL10571 株、SL11131 株に対しても反応性を示した (B)。

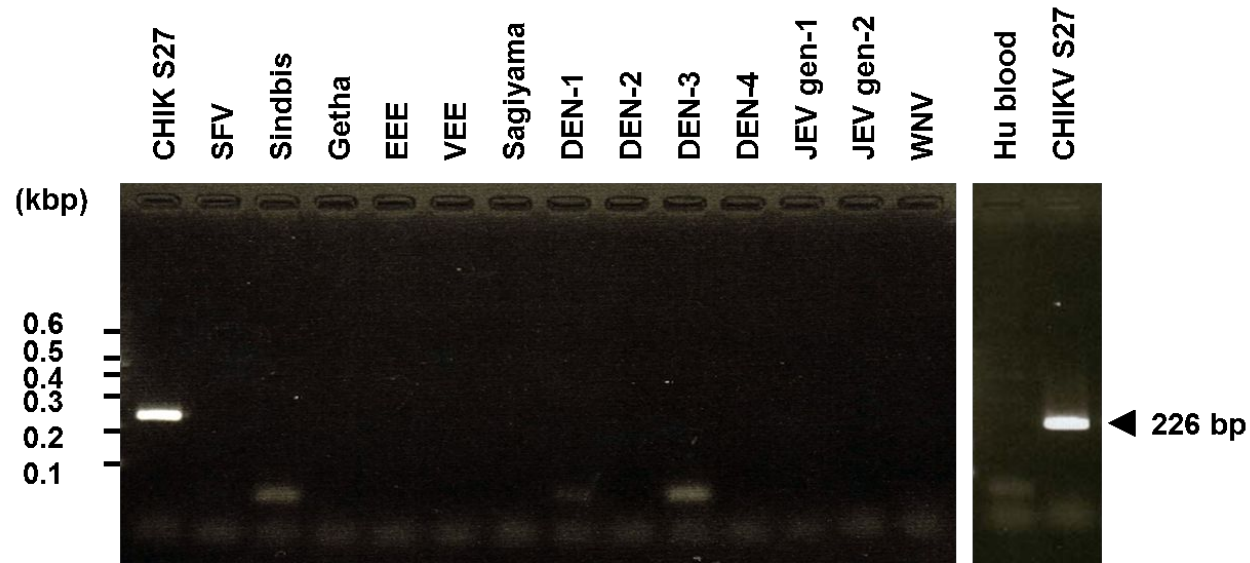


図 4 . CHIKV 検出用 qRT-PCR 用 プライマー の 特異性 の 検討 : プライマー ペア CHIK10572f / CHIK10798r は 他 の アルボ ウイルス の うち、ア ルファ ウイルス である セム リキ 森林 熱 ウイルス、シンドビス ウイルス、ゲ タ ウイルス、東 部 ウマ 脳 炎 ウイルス、ベ ネ ズ エ ラ 馬 脳 炎 ウイルス、サ ギ ヤ マ ウイルス お よ び フ ラ ビ ウイルス である デ ン グ ウイルス 1 型、2 型、3 型、4 型、日 本 脳 炎 ウイルス 遺 伝 子 型 1 型、遺 伝 子 型 3 型、ウ エ ス ト ナ イ ル ウイルス に 対 して 反 応 性 を 示 さ な か っ た . また 健 常 ヒ ト 血 液 由 来 拡 散 に 対 して も 非 特 異 反 応 を 示 さ な か っ た .