

平成 26 年度～平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の確立，
及び細胞培養痘そうワクチンの有効性，安全性に関する研究

分担報告書

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

所属 国立感染症研究所獣医科学部
研究分担者 森川茂

研究要旨： *Lister* 株から低温馴化により LC16 株，LC16m0 株を經由して樹立された安全性の高いワクチン株である LC16m8 株は，継代培養するとプラークサイズのやや大きい LC16m0 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* 遺伝子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。バイオアッセイで得られる MSP の出現頻度やパターンの解析を次世代シーケンス (NGS) 解析により得られた。そこで，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 法を開発した。その結果，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，LC16m8 株と特定の MSP を識別できた。そこで，主要タイプの MSP を特異的に検出する PCR を用いて，LC16m8 株と MSP を混合したスパイク試験を実施した結果，MSP 含有率 0.01～1% まで検出できた。そこで，これらをリアルタイム PCR 化して，ワクチン中の MSP のうち L1，L4，L5 の 3 種の頻度の高い MSP を検出した結果，本 PCR はバイオアッセイよりも遥かに簡便に含有率を算出できた。

研究協力者

朴ウンシル・国立感染症研究・獣医科学部・
研究員

奥谷晶子・国立感染症研究・獣医科学部・
主任研究官

宇田晶彦・国立感染症研究・獣医科学部・
主任研究官

吉河智城・国立感染症研究・ウイルス第一
部・主任研究官

西條政幸・国立感染症研究・ウイルス第一
部・部長

倉根一郎・国立感染症研究・所長

横手公幸・化学及血清療法研究所

金原知美・化学及血清療法研究所

丸野真一・化学及血清療法研究所

新村靖彦・化学及血清療法研究所

A. 研究目的

細胞培養痘そうワクチンの製造株であるワクシニアウイルス LC16m8 株は，*Lister* 株から低温馴化により LC16 株，LC16m0 株を經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プラーク形成能があるのに対し，LC16m0 株と LC16m8 株は 41 ではプラークを形成しない (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 B5 蛋白質が作られないために初代ウサギ腎細胞におけるプラークサイズが小さい。LC16m8 株を継代するとプラークサイズのやや大きい LC16m0 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 LC16m0 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、次世代シーケンス（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 を検出する PCR 法の検討

1) 概要

LC16m8 株のウイルス標本中に含まれる 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（図 1，表 1）。そこで、mutation specific primer PCR 法，RNase H2-dependent PCR 法を検討した。

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 2）。各 MSP を特異的に検出できる条件検討（PCR enzyme，プライマーの長さ， T_m ，cycles 等）し，指摘条件を求めた。MSP と LC16m8 株と段階混合してスパイク試験を行い，有用性を検討した。

3) RNase H2-dependent PCR による MSP の検出法

この方法は，各 MSP 特異的 DNA/RNA hybrid primers (rhPCR 用 primers)，RNase H2 および専用の buffer を PCR enzyme に添加して PCR を行う（図 4）。この方法では，図 4 に示すように本来の primer 領域に 1 塩基の SNP 特異的 RNA を挟んで 4 塩基の matching DNA 塩基，1 塩基の mismatch DNA 塩基からなる (rhPCR 用 primers) を用いて PCR を行う。RNA と相補的な DNA 塩基があると RNase H2 により primer の DNA-RNA 間が切断されて機能的 primer となり DNA 合成反応がおきる。PCR に用いる酵素の 3' 5' exonuclease 活性による影響がない

ため，1) の mutation specific primer PCR による PCR と比較してより特異的に SNP が同定できる特徴を持つ。本法により，非特異反応がより出難い MSP 検出用 PCR 法の確立を試みた。

4) Mutation specific primer を用いた real-time PCR による MSP の検出法

昨年度に L1(267A) specific primer (18mer)，L4(272T) specific primer (18mer) および L5(274ATAC) specific primer (19mer) を用いた PCR により MSP 含率 1~0.01% まで検出できた。それらの primer を用いて，real-time PCR を行い，定量化が可能であるかを検討した。各 MSP を特異的に検出できる条件検討 (real-time PCR enzyme， T_m ，cycles 等) をし，指摘条件を求めた。MSP と LC16m8 株の *b5r* 遺伝子領域を含む plasmid を段階混合してスパイク試験を行った。さらに，細胞培養痘そうワクチン Lot を用いて，MSP 含率を測定し，有効性を検討した。

5) RNase H2-dependent PCR による MSP の検出法

この方法は，各 MSP 特異的 DNA/RNA hybrid primers (rhPCR 用 primers)，RNase H2 および専用の buffer を PCR enzyme に添加して PCR を行う。昨年度に MSP それぞれの rhPCR primer を用いた rhPCR により，40 cycles でも非特異的増殖が認められず，特異性が非常に高いことが確認された。そこで，それらの rhPCR primer を用いて real-time PCR を行い，定性的検出を試みた。1) と同様，MSP と LC16m8 株の B5R 遺伝子領域を含む plasmid を段階混合してスパイク試験を行った。さらに，細胞培養痘そうワクチン Lot を用いて，MSP 含率を測定し，有効性を検討した。

6) ワクチンの各ロット中の MSP 検出

これまでに製造された乾燥細胞培養痘そうワクチンの V01~V14 までの 14 ロットに関して，上記 NAT により MSP を検出し，実用的に用いられるかを検討した。ワクチンの各ロット 3 本を溶解液で溶解して希釈後，半量を用

いた。6,000rpm, 3min 遠心上清を16,000rpm, 2hrs 遠心したウイルス分画(沈渣) SepaGene(エーディア株式会社)を用いてウイルス DNA を抽出した。この DNA を用いて NAT による MSP 検出を行った。

【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

1. 概要

これまでの研究により, MSP は LC16m8 株の *b5r* 遺伝子の 1 塩基欠失を相補するような 1 ないし 4 塩基挿入によることが分かっている。また, MSP に認められる *b5r* 遺伝子の変異には 10 種類ほどあるが, 主要な MSP は 4 ないし 5 種類であり, これらが MSP の 85% 程度をしめる(図 1, 表 1)。このため, 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。種々の PCR 法を検討した結果, mutation specific primer PCR 法が各 MSP を最も効率よく検出できた。そこで, 主要な MSP を構成する L1(267 位に A 挿入), L2(267 位に C 挿入), L4(271 位に T 挿入)及び L5(274 に ATAC の重複で 4 塩基挿入)(図 1, 表 1)の検出を試みた。

2. Mutation specific primer PCR による MSP の検出法

primeSTAR GXL DNA polymerase (Takara)を用いる PCR を行い, L2 の検出が可能だった。しかし, PCR の cycle 数を増やすと, 非特異反応により非 MSP 由来産物も増幅された。そこで, 3' 5' exonuclease 活性の弱い Taq DNA polymerase 由来酵素による illustra puRe Taq ready-to-go PCR beads (GE healthcare) を用いて, 同様の PCR を行った結果, 特異性および感度が向上した。そこで, illustra puRe Taq ready-to-go PCR beads による PCR で主要な MSP を検出するための primers を検討した。その結果, L1(267A), L2(267C)および L4(272T)の MSP 検出に

は長さが 18mer の primer を, L5(274ATAC) の MSP 検出には 19mer の primer を用いた場合に, 最も効率よく MSP が検出できた(図 2)。これらの各 MSP 特異的 PCR は, LC16m8, LC16m0, 他の MSP に対しては 20 から 25cycles の PCR では非特異的増殖が認められず, 特異性が高いことが検証された(図 3)。しかし, 30cycles 以上の PCR では非特異的反応が生じた。

そこで, 各 MSP に特異的な mutation specific primer PCR による MSP 検出感度を検証するために, LC16m8 株 DNA に各 MSP の DNA を種々の割合で混合したサンプルを用いたスパイク試験を実施した。その結果, 20 から 25cycles の PCR では, L1, L2 および L4 型 MSP では, 0.01%の頻度まで検出可能で, L5 型 MSP では 1%の頻度まで検出可能であった(表 2)。

3. RNase H2-dependent PCR (rhPCR) による MSP の検出法

Mutation specific primer PCR では, 実用上十分の感度と特異度で MSP を検出できたが, より精度の高い PCR の開発を試みた。図 4 に示すような L1, L4 および L5MSP 特異的 DNA/RNA hybrid primers (rhPCR 用 primer) で rhPCR を行った。その結果, L1, L4 および L5 特異的 rhPCR とともに LC16m8, LC16m0, 他の MSP に対しては 40cycles でも非特異的増殖が認められず, 特異性が非常に高いことが検証された(図 5)。

4. Mutation specific primer real-time PCR による MSP の検出法

昨年度までの結果から, 強い 3' 5' exonuclease 活性を有する DNA polymerase を用いると, 非特異反応により野生型配列の遺伝子も増幅されることがわかった。一方, 3' 5' exonuclease 活性の弱い酵素は, 野生型配列の非特異的増幅がおきにくかった。そこで, 3' 5' exonuclease 活性の弱い Taq DNA polymerase 由来酵素による SYBR Green Realtime PCR Master mix (TOYOBO)を用いて, real-time PCR を検討した結果, L1(267A)は 18 mer primer で 51 -annealing, L4 (272T)は 18 mer primer で 54 -annealing,

L5 (274ATAC) は 19 mer primer で 54 °C-annealing の条件が、効率よく特異的にそれぞれの MSP を検出できた。

L1 特異的 MSP 検出 real-time PCR では、L1 (267A) と LC16 m8 株の *b5r* 遺伝子を有する plasmid を混合してスパイク試験を行った結果、267A 含有率 0.1% まで検出できた。40 cycles まで非特異的増幅は見られなかった。L4 (272T) も同様、スパイク試験では、272T 含有率 0.01% まで検出でき、40 cycles でも非特異反応は認められなかった。L5 (274ATAC) は 45 cycles まで行った結果、含有率 0.01% まで検出でき、非特異的増幅も見られなかった。この結果を踏まえて、乾燥細胞培養痘そうワクチン株の各ロット中の MSP 含有率を測定した。まず、LC16 m8 株および MSP 株共通に検出する real-time PCR により、検体中のウイルスの DNA copies を測定した(表 3)。また、それぞれ L1、L4、L5 特異的 real-time PCR から各 MSP の検体中の MSP copies 数を算出し、MSP の含有率 (MSP copies 数 / ウイルスの DNA copies) を算出した(表 3)。

その結果、ワクチンのロット 1~5 は MSP 含有率がロット 6 以降よりも高かった(表 3)。ロット 6~14 は 0.2% 以下あるいは検出限界以下であった。この結果は、特にロット 6 以降では MSP 含有率が極めて低く保たれていることを証明するものである。Mutation specific primer による real-time PCR はワクチンの MSP 含有量の測定に有用であると考えられた。なお、L1 特異的 MSP 検出用 real-time PCR では算出された含有率が、これまでバイオアッセイと次世代シーケンサー解析から含有率が既知のロット 3 で 1/10 程となり、他のロットでも比率が低く算出された。L4 と L5 特異的 MSP 検出 real-time PCR では同程度の含有率となった。この理由として考えられるのは、mutation specific primer による real-time PCR では、L1 特異的 MSP 検出用 real-time PCR による L1-MSP の増幅効率が若干他の real-time PCR よりも低いことためであると考えられる。そこで、補正するために L1 含有率の算出値を 10 倍に

すると、ロット 3 では 3 種の MSP 比率が過去にバイオアッセイ、次世代シーケンサーで算出した値に近似することがわかった(表 4)。これにロット 1~7 までの 3 種の MSP 含有率を推定するとロット 1 から 5 が MSP 含有率 0.8 から 2.4%、ロット 6、7 が 0.2% となった。なお、ロット 8 以降は検出限界に近いがそれ以下なので補正等による算出を行わなかった。

補正の不要な L4 特異的 MSP 検出用 real-time PCR を行えば、L4 含有率が全 MSP の 30% 程度(ロット 1~5 の L4 含有率の平均値)であることから、MS 含有率の閾値を定めることにより、定性、定量のいずれの試験としても、バイオアッセイから置き換えることが可能と判断された。

5. RNase H2-dependent PCR (rhPCR) による MSP の検出法

昨年度までに、特異的 primer を用いた rhPCR による MSP 検出は、上記 PCR より精度、感度が高いことがわかった。そこで、rh real-time PCR による MSP 含有率算出を試みた。Rh real-time PCR でも SYBR Green Realtime PCR Master mix (TOYOBO) が適することを確認した。L1 (267A) および L4 (271T) 特異的 rh real-time PCR では、64 °C-annealing、L5 (274ATAC) では 62 °C-annealing で特異的に MSP を検出できた。それぞれ MSP と LC16 m8 の *b5r* 遺伝子を有する plasmid の混合によるスパイク試験では、L1 (267A) は 0.1~1%、L4 (271T) は 1% まで検出できた。しかし、L5 (274ATAC) は増幅効率が悪かった。Standard においても 10^6 copies / μ l 以下は検出できなかった。また、細胞培養痘そうワクチンの lot を用いて、MSP を測定した結果、いずれも検出不可で改善する必要がある。

D. 考察

LC16m8 ワクチンは、quasispecies からなる Lister 株による第 1 世代の calf lymph ワクチンの製造用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 frameshift 変異によることが分かっているが、この欠損を相補するような変異挿入変異が導入されたものは、RK13 細胞等で若干サイズの大きい LC16m0 株様のプラーク形成能を持ち 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上有用であると考えられる。MSP の含有率および MSP の遺伝子型は、バイオアッセイと次世代シーケンサーによる解析でよく一致することが明らかになった。そこで主要な MSP 遺伝子型を検出する PCR による MSP の定量法により、より簡便、迅速に MSP 含有率が求められ品質管理上有用であると思われる。

ただし、さらなる改良が必要である。今後、MSP 含有率が数%程度になるようなウイルス培養条件により、MSP の遺伝子型の含有率のばらつきがどの程度かを検証して本試験法の意義をより明らかにする必要がある。また、各ロットの次世代シーケンスによる MSP 含有率の定量および MSP 遺伝子型の含有率を測定し、その値と実際に MSP ウイルスと LC16m8 ウイルスの特徴の違いを利用して測定した値との相関を調べる必要がある。

E. 結論

本研究で開発された、主要な MSP の変異配列相補配列を 3' 末端に持つ primer を用いる mutation specific primer による real-time PCR が rh real-time PCR よりも優れていた。Mutation specific primer による real-time PCR では、L1 特異的 MSP 検出用 real-time PCR による L1-MSP 増幅率が若干他の real-time PCR よりも低いことから、算出された MSP 含有率は、実際の含有率よりも 1/10 程度になった。そこで、補正するために L1 含有率の算出値を 10 倍にすると、各 MSP 比率、3 種の MSP 比率がこれまでにバイオアッセイ、次世代シーケンサーで算出した値に近似することがわかった。これに基づき各ロットの 3 種の MSP 含有率を推定するとロット 1 から 5 が MSP 含有率 0.8 から 2.4%、ロット 6、7 が 0.2%、ロット 8 以降はそれ以下あるいは検出限

界以下となった。補正の不要な L4 特異的 MSP 検出用 real-time PCR を行えば、L4 含有率が全 MSP の 30%程度(ロット 1~5 の L4 含有率の平均値)であることから、MSP 含有率の閾値を定めることにより、定性、定量のいずれの試験としても、バイオアッセイから置き換えることが可能と判断された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kimura M, Une Y, Suzuki M, Park E-S, Imaoka K and Morikawa S. Isolation of *Brucella inopinata*-like bacteria from White's and Denny's tree frogs. Vector Borne Zoonotic Dis. in press.
- 2) Iizuka I, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Fukushi S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M. A Single Vaccination of Nonhuman Primates with Highly Attenuated Smallpox Vaccine, LC16m8, Provides Long-term Protection against Monkeypox. Jpn J Infect Dis. 2016 Dec22; in press.
- 3) Park ES, Suzuki M, Kimura M, Mizutani H, Saito R, Kubota N, Hasuike Y, Okajima J, Kasai H, Sato Y, Nakajima N, Maruyama K, Imaoka K, Morikawa S. Epidemiological and pathological study of feline morbillivirus infection in domestic cats in Japan. BMC Vet Res. 2016 Oct 11;12(1):228.
- 4) Zamoto-Niikura A, Morikawa S, Hanaki KI, Holman PJ, Ishihara C. *Ixodes persulcatus* ticks as a vector for *Babesia microti* U.S. lineage in Japan. Appl Environ Microbiol. 2016 82(22):6624-6632.
- 5) Arai S, Taniguchi S, Aoki K, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Tanaka-Taya K, Masangkay JS, Omatsu T, Puentespina R Jr, Watanabe S, Alviola P, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Quibod MN,

- Morikawa S, Yanagihara R, Oishi K. Molecular phylogeny of a genetically divergent hantavirus harbored by the Geoffroy's rousette (*Rousettus amplexicaudatus*), a frugivorous bat species in the Philippines. *Infect Genet Evol.* 2016, 45:26-32.
- 6) Uda A, Sharma N, Takimoto K, Deyu T, Koyama Y, Park ES, Fujita O, Hotta A, Morikawa S. Pullulanase Is Necessary for the Efficient Intracellular Growth of *Francisella tularensis*. *PLoS One.* 2016 Jul 22;11(7):e0159740.
 - 7) Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Suzuki T, Nagata N, Hasegawa H, Kawai Y, Uda A, Morikawa S, Shimojima M, Watanabe H, Saijo M. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the Treatment of Infections with Lethal Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus. *mSphere.* 2016 Jan 6;1(1).
 - 8) Arai S, Kang HJ, Gu SH, Ohdachi SD, Cook JA, Yashina LN, Tanaka-Taya K, Abramov SA, Morikawa S, Okabe N, Oishi K, Yanagihara R. Genetic Diversity of Artybash Virus in the Laxmann's Shrew (*Sorex caecutiens*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016 Jul;16(7):468-75.
 - 9) Singh H, Shimojima M, Fukushi S, Fukuma A, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Yang M, Sugamata M, Morikawa S, Saijo M. Serologic assays for the detection and strain identification of Pteropine orthoreovirus. *Emerg Microbes Infect.* 2016 May 11;5:e44.
 - 10) Fukuma A, Fukushi S, Yoshikawa T, Tani H, Taniguchi S, Kurosu T, Egawa K, Suda Y, Singh H, Nomachi T, Gokuden M, Ando K, Kida K, Kan M, Kato N, Yoshikawa A, Kitamoto H, Sato Y, Suzuki T, Hasegawa H, Morikawa S, Shimojima M, Saijo M. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Antigen Detection Using Monoclonal Antibodies to the Nucleocapsid Protein. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Apr 5;10(4):e0004595.
 - 11) Tani H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Morikawa S, Saijo M. Characterization of Glycoprotein-Mediated Entry of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus. *J Virol.* 2016, 12;90(11):5292-301.
 - 12) Hotta A, Fujita O, Uda A, Yamamoto Y, Sharma N, Tanabayashi K, Yamada A, Morikawa S. Virulence of Representative Japanese *Francisella tularensis* and Immunologic Consequence of Infection in Mice. *Microbiol Immunol.* 2016, 60(3):168-76.
 - 13) Kaneyuki S, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurosu T, Morikawa S, Saijo M. Ulcerative lesions with hemorrhage in a patient with severe fever with thrombocytopenia syndrome observed via upper gastrointestinal endoscopy. *Jpn J Infect Dis.* 2016, 69(6): 525-527.
 - 14) Hotta A, Tanabayashi K, Fujita O, Shindo J, Park CH, Kudo N, Hatai H, Oyamada T, Yamamoto Y, Takano A, Kawabata H, Sharma N, Uda A, Yamada A, Morikawa S. Survey of *Francisella tularensis* in Wild Animals in the Endemic Areas in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2016, 69(5):431-4.
 - 15) Ogawa K, Komagata O, Hayashi T, Itokawa K, Morikawa S, Sawabe K, Tomita T. Field and laboratory evaluations of the efficacy of DEET repellent against Ixodes ticks. *Jpn J Infect Dis.* 2016;69(2):131-4.
 - 16) Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Suzuki T,

- Nagata N, Hasegawa H, Kawai Y, Uda A, Morikawa S, Shimojima M, Watanabe H, Saijo M. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the treatment of infections with lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *mSphere*, 1 (1): e00061-15.
- 17) Hotta A, Tanabayashi K, Fujita O, Shindo J, Park CH, Kudo N, Hatai H, Oyamada T, Yamamoto Y, Takano A, Kawabata H, Sharma N, Uda A, Yamada A, Morikawa S. Survey of *Francisella tularensis* in Wild Animals in the Endemic Areas in Japan. *Jpn J Infect Dis.* in press
 - 18) Ogawa K, Komagata O, Hayashi T, Itokawa K, Morikawa S, Sawabe K, Tomita T. Field and laboratory evaluations of the efficacy of DEET repellent against *Ixodes* ticks. *Jpn J Infect Dis.* in press
 - 19) Okutani A, Osaki M, Takamatsu D, Kaku Y, Inoue S, Morikawa S. Draft genome sequences of *Bacillus anthracis* strains stored for several decades in Japan. *Genome Announc.* 2015, 3(3). pii: e00633-15.
 - 20) Sakai K, Hagiwara K, Omatsu T, Hamasaki C, Kuwata R, Shimoda H, Suzuki K, Endoh D, Nagata N, Nagai M, Katayama Y, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Mizutani T, Maeda K. Isolation and Characterization of a Novel Rhabdovirus from a Wild Boar (*Sus scrofa*) in Japan. *Vet Microbiol*, 2015, 179(3-4):197-203.
 - 21) Hamamoto N, Uda A, Tobiume M, Park CH, Noguchi A, Kaku Y, Okutani A, Morikawa S, Inoue S. Association between RABV G Proteins Transported from the Perinuclear Space to Cell Surface Membrane and N-glycosylation of the Sequon at Asn204. *Jpn J Infect Dis.* 2015, 68(5): 387-93.
 - 22) Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Singh H, Suda Y, Shirabe K, Toda S, Shimazu Y, Nomachi T, Gokuden M, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Uramoto M, Osako H, Kida K, Takimoto H, Kitamoto H, Terasoma F, Honda A, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M. Phylogenetic and Geographic Relationships of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in China, South Korea, and Japan. *J Infect Dis.* 2015, 212(6): 889-98.
 - 23) Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H. Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host. *Sci Rep.* 2015, 5:8850.
 - 24) Ching PK, de los Reyes VC, Sucaldito MN, Tayag E, Columna-Vingno AB, Malbas FF Jr, Bolo GC Jr, Sejvar JJ, Eagles D, Playford G, Dueger E, Kaku Y, Morikawa S, Kuroda M, Marsh GA, McCullough S, Foxwell AR. Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines. *Emerg Infect Dis.* 2015, 21(2): 328-31.
 - 25) 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.
 - 26) 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. 2015, 96 (Pt 2): 390-4.

Negative Strand Viruses. Italy, 14-19 June 2015.

2. 学会発表

- 1) Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Fukushi S, Kurosu T, Koyama Y, Uda A, Morikawa S, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, Shimojima M, Saijo M. Therapeutic effects of favipiravir (T-705) against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in a mouse lethal model. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2016, Sapporo (P2-106)
- 2) Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Aiko Fukuma, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo: Analyses of cell entry and fusion mechanisms of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. XVIth International Conference on

- 3) Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Shigeru Morikawa, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo: Development of nucleocapsid protein monoclonal antibody based antigen-capture ELISA for detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. XVIth International Conference on Negative Strand Viruses. Italy, 14-19 June 2015.
- 4) 他

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

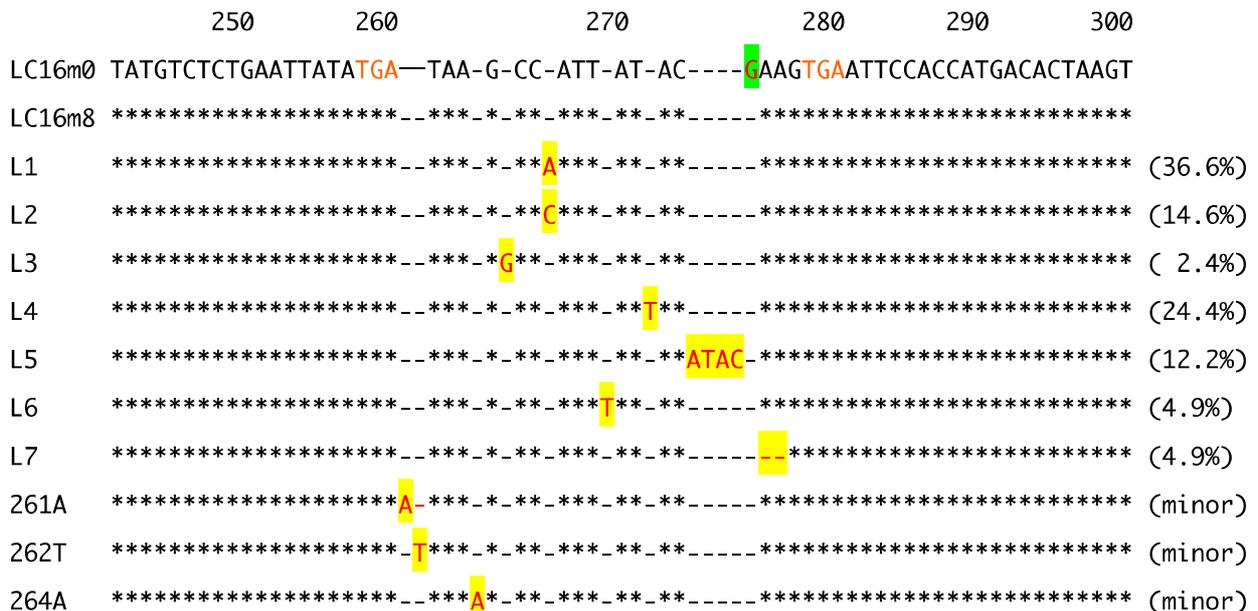


図 1. K1 から得られた MSP の遺伝子型とその出現頻度

注: 262A, 262T, 264A は Vero E6 細胞で継代後に得られた MSP

表 1 . K1 に含まれる MSP のブランク法と次世代シーケンサーによる検出頻度の比較

MSPタイプ	遺伝子型	K1から得られたMSP(%)	K1のMSP (deep seq) (%)
L1	267A	36.6	38.9
L2	267C	14.6	6.6
L3	265G	2.4	4.4
L4	271T	24.4	20.6
L5	274 (4Ins)	12.2	12.8
L6	268T	4.9	12.3
L7	275-6 (2del)	4.9	3.8
	261A	0	0
	262T	0	0
	264A	0	0.8
	270-1 (2del)	0	0.5

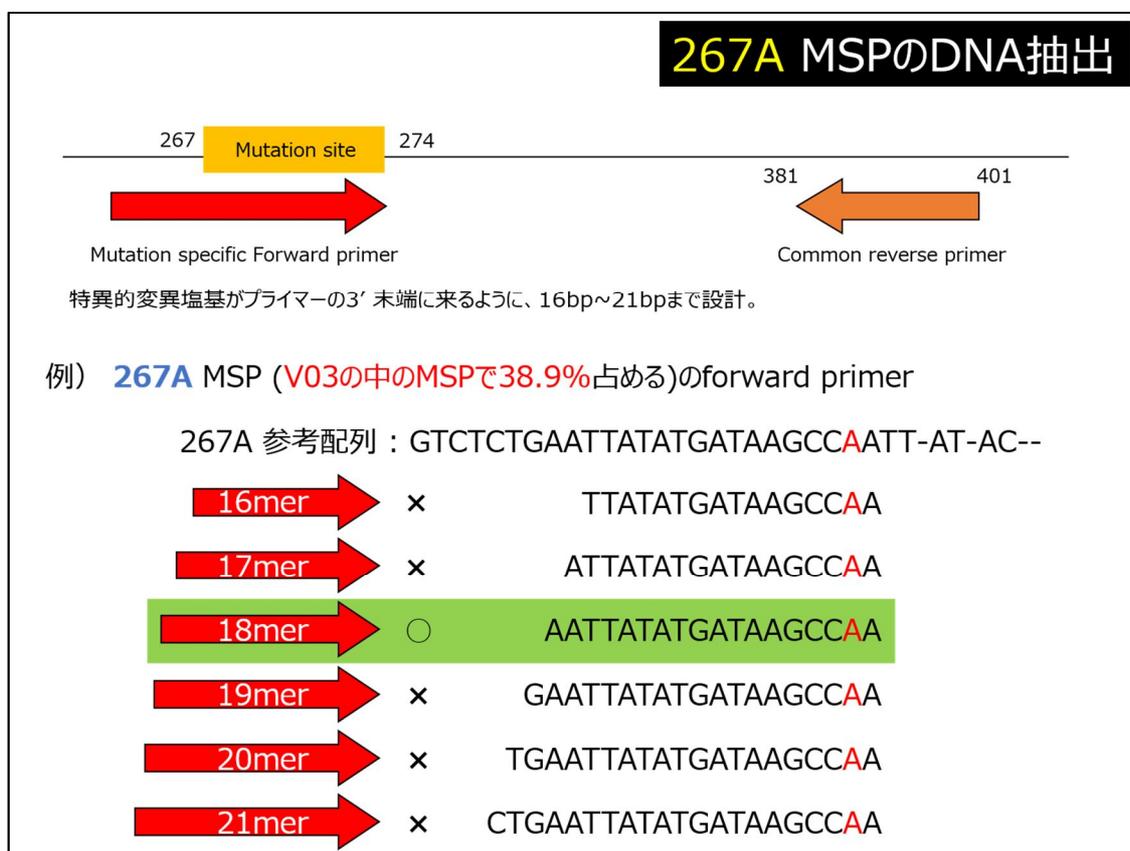


図 2. Mutation-specific primer PCR による L1 型 MSP の検出 . 種々の長さの変異部位特異的 primers を検討した結果 , L1, L2, L4 型 MSP には 18mer primer が , L5 型 MSP には 19mer primer が最適であった .

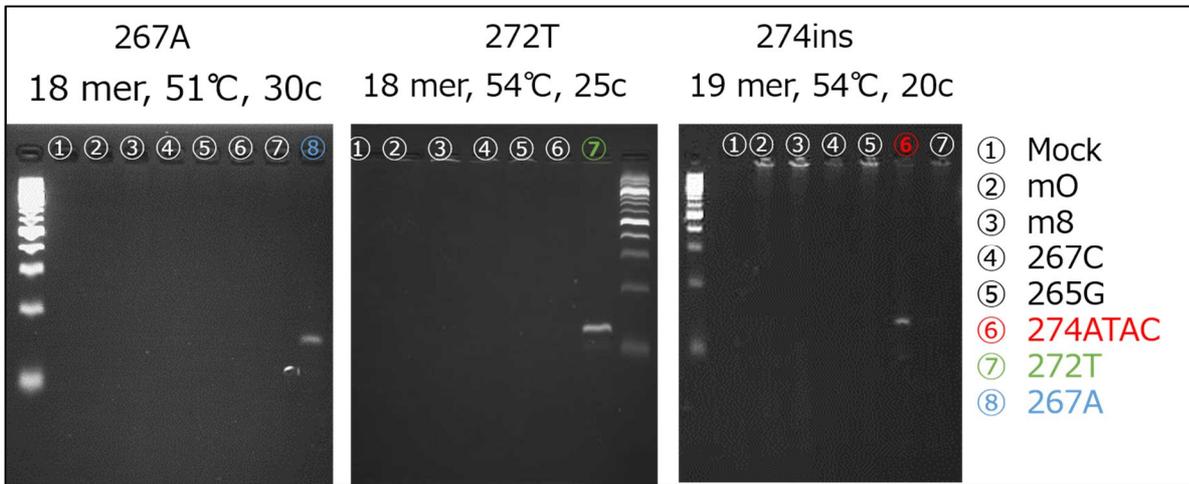


図 3. Mutation specific primer PCR による L1, L4 および L5 型 MSP の特異的検出 . 各 MSP 特異的 PCR は , LC16m8, LC16m0, 他の MSP に対しては 25cycles までは非特異的増殖が認められず , 特異性が高いことが確認された .

表 2. Mutation specific primer PCR による各 MSP 検出のまとめ

MSP	DNA polymerase	Primer	Tm (°C)	Cycles	MSP含率 (%)	検出限度 MSP含率 (%)
267C	PCR RTG beads	18 mer	53	20~30	6.6	0.01
267A	PCR RTG beads	18 mer	51	20~30	38.9	0.01
272T	PCR RTG beads	18 mer	54	25	20.6	0.01
274ATAC	PCR RTG beads	19 mer	54	20	12.8	1

L1, L2, L4 では , 頻度 0.01% でも MSP を検出可能であった .

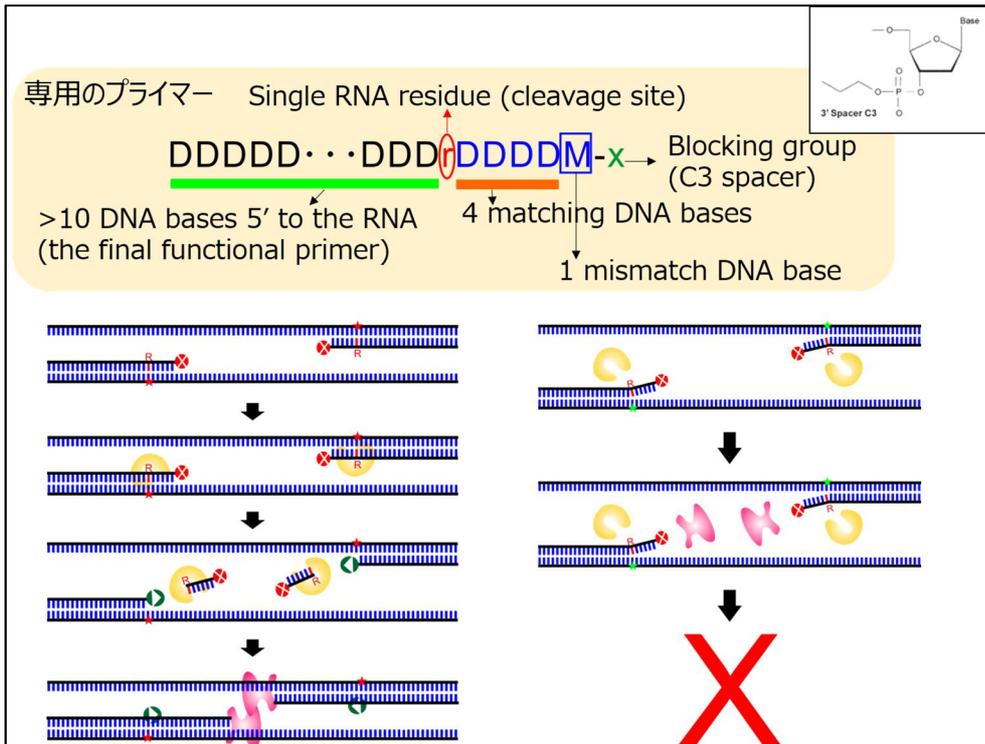


図 4. RNase H2-dependent PCR による MSP の検出 .

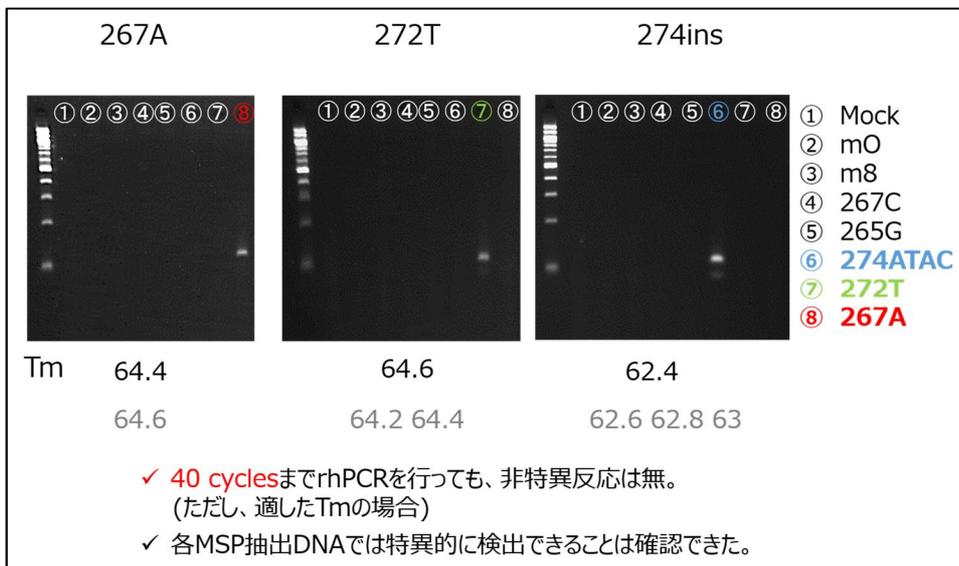


図 5. RNase H2-dependent PCR による L1, L4 および L5 型 MSP の検出 .

表 3. 各ロット中の B5R コピー数, MSL(L1, L4, L5)のコピー数, 推定 MSP 率

		Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7	Lot 8	Lot 9	Lot 10	Lot 11	Lot 12	Lot 13	Lot 14
Total (copies/ μ l)		3.2E+07	1.4E+08	1.2E+08	1.2E+08	1.3E+08	8.4E+07	6.4E+07	1.8E+08	1.7E+08	4.6E+07	3.8E+07	4.6E+07	6.3E+07	8.1E+07
267A	L1	1.0E+04	1.9E+05	6.6E+04	5.5E+04	4.1E+04	1.0E+04	1.0E+04					1.0E+04	1.0E+04	1.0E+04
272T	L4	3.2E+04	8.5E+05	5.3E+05	4.7E+05	5.2E+05	3.2E+04	3.2E+04					3.2E+04	3.2E+04	3.2E+04
274ATAC	L5	1.1E+05	5.5E+05	2.8E+05	3.1E+05	3.1E+05							1.0E+04	1.0E+04	5.0E+04

%	MSP type	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7	Lot 8	Lot 9	Lot 10	Lot 11	Lot 12	Lot 13	Lot 14
267A	L1	0.03	0.14	0.05	0.05	0.03	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.01
271T	L4	0.10	0.62	0.43	0.40	0.41	0.04	0.05	0.02	0.02	0.07	0.08	0.07	0.05	0.04
274ATAC	L5	0.34	0.40	0.23	0.26	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.02	0.08	0.01

sum (%)		0.47	1.16	0.72	0.71	0.68	0.05	0.07	0.02	0.02	0.07	0.11	0.11	0.15	0.06
267A	L1	6.6%	11.9%	7.6%	6.6%	4.7%	24.0%	24.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	19.4%	10.9%	19.4%
271T	L4	20.7%	53.4%	60.2%	56.7%	59.5%	76.0%	76.0%	100.0%	100.0%	100.0%	76.0%	61.2%	34.5%	61.2%
274ATAC	L5	72.7%	34.7%	32.2%	36.7%	35.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	24.0%	19.4%	54.6%	19.4%

Lot 3の以前の次世代データからの推定MSP含有率 (%)

補正率 (MSP%/L1,4,5%)	1.38	0.65	1.59	0.99	0.97	0.94	0.73	0.09	0.02	0.03	0.09	0.15	0.16	0.20	0.09
--------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

表 4. L1 の感度補正(x 10)した場合の MSP 含有率等

	MSP type	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7
sum		0.752	2.402	1.215	1.128	0.971	0.157	0.210
267A	L1	41.2%	57.5%	45.3%	41.7%	33.0%	76.4%	76.2%
271T	L4	13.0%	25.8%	35.6%	35.5%	41.9%	23.6%	23.8%
274ATAC	L5	45.7%	16.7%	19.1%	22.9%	25.1%	0.0%	0.0%

Lot 3の以前の次世代データからの推定MSP含有率

補正率 (MSP%/L1,4,5%)

1.38	1.04	3.31	1.68	1.56	1.34	0.22	0.29
------	------	------	------	------	------	------	------