

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：平成19年度 ～ 平成20年度

課題番号：19380179

研究課題名（和文） ウイルスの網羅的検出方法の開発

研究課題名（英文） Development of determination system of viral nucleic acid sequences

研究代表者 水谷 哲也（MIZUTANI TETSUYA）

国立感染症研究所・ウイルス第1部・主任研究官

研究者番号：70281681

研究成果の概要：獣医学領域においては未知のウイルスの感染が疑われる疾患は少なくない。検体導入時に既知のウイルスを検出できるプライマーセットを用いて PCR をおこない、既知のウイルスが検出されない場合には網羅的に検出できる方法（Rapid determination system of viral RNA/DNA nucleic acid sequences：RDV法）を用いて未知のウイルスを検出できるシステムを構築した。本研究では、ウイルスの網羅的検出方法を感度や操作方法を改良しながら、どの研究室でも取り扱えるようなシステム作りを目指した。本研究の成果は、蚊から新しいブニヤウイルス、コウモリからヘルペスウイルスなどの検出に成功したことである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	4,200,000	0	4,200,000
平成20年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,000,000	2,940,000	16,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：ウイルス・網羅的検出方法・迅速・蚊・コウモリなど

1. 研究開始当初の背景

動物や吸血昆虫において、未知のウイルスは数多く存在することが予想されていたが、これらを検出し、遺伝子配列を決定する方法は確立されていなかった。一方、我々はウイルスの網羅的検出方法としてRDV法を開発し、実用化に向けた検討をおこなっていた。開発当初のRDV法は操作が煩雑なために、多くの研究室で簡単に実施できず、改良する必要が

あった。

2. 研究の目的

RDV法をシステム化・簡便化することにより、より多くの研究室で実施できるように改良する。新興ウイルス感染症に対応するための迅速性も重要視した。また、この方法を用いて動物や吸血昆虫から新しいウイルスを検出することを目的とした。

3. 研究の方法

RDV 法の簡便化のためにダイレクトシークエンス時に用いるプライマーセットに改良を加えた。RDV 法をシステム化するために、検体中に存在する既知のウイルスをスクリーニングする目的で degenerate プライマーなどを作成した。これらの方法を用いて、動物や昆虫から新しいウイルスの検出をおこなった。

4. 研究成果

(1) RDV 法の簡便化: RDV 法は 3'末端に 4 塩基のバリエーションを持つプライマーセットの組合せで PCR をおこなった後に、それらのプライマーを用いてダイレクトシークエンスを実施するので、実際の総組合せは 6 万通り以上になる。そこで、本研究ではプライマーセットの総数を減らすことにより簡便さを目指した。具体的には、PCR 前のアダプター結合時の DNA 断片が平滑末端であったのに対して、まず、片側だけを粘着末端にすることにより特異性を持たせた。その結果、256 通りのプライマーセットで網羅性を保てることがわかった (RDV ver3.0: 発表論文 4)。しかし、256 通りの PCR を実施する場合には、96 穴プレートを 3 枚も使用しなければならないので、さらに簡便化するために、DNA の両端を粘着末端に置き換えた。その他、アダプターにも工夫を加えて 64 通りのプライマーセットで行えるように改良した (RDV ver3.1)。このバージョンでは 1 反応中に約 10 万分子の標的遺伝子が必要であることがわかり、高感度で検出する必要のない場合に用いることにした (論文準備中)。

(2) RDV 法の選択: このようにオリジナルの RDV 法を改良することにより、様々な検体に対応できる RDV 法のバージョンを開発した。以下に選択ガイドを示す。

1. RDV ver1.0: オリジナルの RDV 法で RNA ウイルスの検出をおこなう。

2. RDV ver2.0: マルチプレックス PCR を応用し、アンプリコンをできるだけ増やすことにより、ダイレクトシークエンスによる遺伝子配列の情報を得られるようにした。なお、RDV ver2.1 は ver2.0 の操作ステップを少なくした方法である (発表論文 1)。

3. RDV ver3.0, 3.1: 上記 (発表論文 4)

4. RDV ver4.0: 非特異的増幅の前段階でオリゴヌクレオチドを加えて架橋し、Phi29 酵素を用いて増幅する方法に置き換え、感度が上昇した方法 (発表論文 6)。

5. RDV-D: ver1.0 を DNA ウイルス用に改良した方法 (発表論文 3)。

(3) RDV 法で検出できた既知と未知のウイルス: 上記のように RDV 法を改良し、バ

ージョンを上げながら、その都度様々な検体からウイルスの検出を試みた。その成果を記す。

① タイでデング熱患者の家から採取された蚊の成虫を対象に RDV ver2.0 を実施したところ、Dengue virus と Cell fusing agent virus の遺伝子断片を検出することに成功した (発表論文 2)。

② 日本で採取されたコウモリの脾臓初代培養細胞を対象に RDV-D を実施したところ、新しいアデノウイルス (Bat virus-1) を検出できた (発表論文 3)。

③ 日本で採取されたコウモリから同様に RDV ver2.1 で、新しいヘルペスウイルスの検出に成功した (論文未発表のため、このウイルスは命名されていない)。

④ フィリピンで採取されたコウモリからスクリーニング用の degenerate プライマーセットと RDV 法のダイレクトシークエンス技術を用いて、新しいヘルペスウイルス (Hipposideros diadema herpesvirus 1) を検出した (発表論文 7)。

⑤ 日本で飼育されているダチョウの糞について RDV ver2.1 を実施したところ、ダチョウで初めての報告となるレオウイルスの検出に成功した (発表論文 5)。

⑥ 我々はタイでデング熱患者の家から採取された蚊の幼虫を対象に RDV ver4.0 を実施し、新しいブニヤウイルス (Phasi Charoen virus) を検出していた (発表論文 6)。本研究では、さらに、タイのメスの蚊について PCR をおこなったところ、このウイルスを高率に保有していることが明らかとなった。

⑦ その他、黄砂などから GenBank に登録されていない遺伝子配列を得たが、ウイルス分離されていないため、ウイルスゲノムの一部であるか否かは不明である。

(4) 臓器を対象とした RDV 法: 培養上清だけでなく臓器からもウイルスを検出する試みを 2 年間にわたりおこなったが、既存の方法よりもすぐれた方法を確立できなかった。しかし、現在開発途中であるが、ほとんどの RNA ウイルスゲノムが 6kb から 30kb の長さであることに着目して、RNA や cDNA を電気泳動後にそのサイズの領域を抽出してから RDV 法を行うことを検討している。実際に、猫カリシウイルスでおこなったところウイルス由来の cDNA を効率良く回収できた。現在、この方法をさらに改良中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Kouji Sakai, Tetsuya Mizutani, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Daiji Endoh, Ichiro Kurane, Kazuaki Takehara and Shigeru Morikawa. An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences for avian RNA virus. Arch. Virol. 2007. 152: 1763-1765. 査読有り
2. Yuki Kihara, Tomomitsu Satho, Yuki Eshita, Kouji Sakai, Akira Kotaki, Tomohiko Takasaki, Yupha Rongsriyam, Narumon Komalamisra, Raweewan Srisawat, Parichat Lapcharoen, Suchada Sumroiphon, Shiroh Iwanaga, Hiroshi Ushijima, Daiji Endoh, Takeshi Miyata, Akira Sakata, Nobuhiro Kashige, Fumio Miake, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa and Tetsuya Mizutani. Rapid determination of viral RNA sequences in field-collected mosquitoes. J. Virol. Methods. 2007. 146. 372-374. 査読有り
3. Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi M, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani T. Isolation of a novel adenovirus from a fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). Emerging Infectious Diseases 2008, 14: 347-349. 査読有り
4. Shumpei Watanabe, Tetsuya Mizutani, Kouji Sakai, Kentaro Kato, Yukinobu Tohya, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Yasuhiro Yoshikawa, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa, Hiroomi Akashi. Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). J. Clin. Virol. 2008. 43: 56-59. 査読有り
5. Kouji Sakai, Yuichi Ueno, Shuhei Ueda, Kaori Yada, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Kenichiro Mutoh, Kazuki Yoshioka, Masayuki Nakamura, Kazuaki Takehara, Shigeru Morikawa, Tetsuya Mizutani. Novel reovirus isolation from an Ostrich (*Struthio camelus*) in Japan. Vet. Microbiol. 2009. 134. 227-232. 査読有り
6. Yamao T, Eshita Y, Kihara Y, Satho T, Kuroda M, Sekizuka T, Nishimura M, Sakai K, Watanabe S, Akashi H, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Miyata T, Sakata A, Hosokawa M, Nakashima M, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Nakauchi M, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. Novel virus discovery from field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). Arch Virol. 2009. 154. 153-158. 査読有り
7. Shumpei Watanabe, Naoya Ueda, Koichiro Iha, Joseph S. Masangkay, Hikaru Fujii, Phillip Alviola, Tetsuya Mizutani, Ken Maeda, Daisuke Yamane, Azab Walid, Kentaro Kato, Shigeru Kyuwa, Yukinobu Tohya, Yasuhiro Yoshikawa, Hiroomi Akashi. Detection of a new bat gammaherpesvirus in the Philippines. Virus Genes. In press. 査読あり
8. 水谷哲也 新興ウイルス感染症の網羅的検出方法(RDV 法)の確立と応用 「ウイルス」 57. 217-226. 2007. 査読無し

〔学会発表〕(計 13 件)

前田 健、本道栄一、寺川純平、木曾康郎、水谷哲也、遠藤大二、安本 茂「キクガシラ コウモリ由来新規ヘルペスウイルスの分離・同定」第 22 回ヘルペスウイルス研究会、2007 年 6 月(福岡)

前田 健、本道栄一、寺川純平、木曾康郎、水谷哲也、酒井宏治、遠藤大二、「オオコウモリ由来新規アデノウイルスの分離と同定」第 23 回中国四国ウイルス研究会、2007 年 6 月(愛媛)

水谷哲也、西村秀一、酒井宏治、前田 健、清水博之、遠藤大二、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川 茂「新興ウイルス感染症の網羅的検出法の確立と応用」第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月(北海道)

前田 健、本道栄一、安本 茂、遠藤大二、森川 茂、水谷哲也「コウモリ由来ウイルスの分離・増殖のための新規培養細胞の樹立とその利用」第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月(北海道)

河内岳史、柳井徳磨、酒井洋樹、柵木利昭、渡辺俊平、前田 健、水谷哲也、中根利明、中谷隆二、川上博史、浜 夏樹「動物園飼育下オオコウモリの背景病変に関する病理組織学的研究」第 14 回野生動物医学会、2008 年 9 月(神戸)

渡辺俊平、水谷哲也、上田直也、伊波興一朗、加藤健太郎、遠矢幸伸、久和茂、吉川泰弘、明石博臣「コウモリ由来新規ヘルペスウイルス遺伝子の検出」、第 146 回日本獣医学学会学術集会、宮崎、2008 年 9 月

水谷哲也、山尾卓也、江下優樹、木原悠希、佐藤朝光、黒田誠、関塚剛史、西村美保、酒井宏治、福士秀悦、緒方もも子、中内美名、倉根一郎、森川茂「ウイルスの網羅的方法の改良と新しいブニヤウイルスの発見」、第 146 回日本獣医学学会学術集会、宮崎、2008 年 9 月

酒井宏治、水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、上野勇一、上田修平、平井明香、網康至、岡村雅史、中村政幸、竹原一明、山田靖子、倉根一郎、森川茂「網羅的ウイルスゲノム検出方法を用いたダチョウレオウイルスの同定」、第 146 回日本獣医学学会学術集会、宮崎、2008 年 9 月

渡辺俊平、水谷哲也、酒井宏治、福士秀悦、緒方もも子、遠矢幸伸、吉川泰弘、森川茂、倉根一郎、明石博臣「網羅的ウイルスゲノム検出法(RDV 法)の改良」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月

大黒恵理子、水谷哲也、酒井宏治、高崎智彦、中村昇太、中屋隆明「ヒト胃癌由来培養細胞に持続感染しているウイルスの同定」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月

池田正徳、阿部健一、黒木美沙緒、有海康雄、團迫浩方、加藤宣之「抗HCV活性を示すアラキドンサン代謝産物 5-HETE の同定」第 56 回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008 年 10 月。

酒井宏治、網康至、水谷哲也、岩切章、山本正悟、平井明香、須崎百合子、滝本一広、田原口元子、飯塚愛恵、福士秀悦、西條政幸、永田典代、片山紀代、長谷川秀樹、山田靖子、倉根一郎、森川茂「急性呼吸器患者から分離された新型レオウイルスの性状解析及びウスでの感染実験」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月

水谷哲也、山尾卓也、江下優樹、片野晴隆、黒田誠、関塚剛史、渡辺俊平、明石博臣、竹原一明、木原悠希、佐藤朝光、西村美保、酒井宏治、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、中内美名、倉根一郎、森川茂「ウイルスの網羅的検出法(RDV 法)と次世代シーケンサーによる新しいウイルスの発見」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月

〔図書〕(計 3 件)

前田 健:「ウイルスの変異」(p101-107)「ウイルスの不活化」(p107-108)「ウイルスの濃縮と精製」(p108-111)「ウイルスワクチン」(p111-117)「ウイルス剤と化学療法」(p117-120)動物微生物学、明石博臣、木内明男、原澤亮、本多英一編集(朝倉書店)2008

Eshita, Y. 「Pesticide Chemistry. Crop Protection, Public Health, Environmental Safety」Wiley-VCH, Weinheim, p217-225. 2008

Kazuya Shirato and Tetsuya Mizutani. Viral Proteins, Host Cell Proteins, and Manipulation of the Cell Cycle by Viruses. In Progress in cell growth process research. (edited by T. Hayashi) Nova Publishers. 2008. Pp135-147.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷哲也 (MIZUTANI TETSUYA)

国立感染症研究所・ウイルス第1部・主任研究官

研究者番号：70281681

(2) 研究分担者

福士秀悦 (FUKUSHI SHUETSU)

国立感染症研究所・ウイルス第1部・主任研究官

研究者番号：80373398

遠藤大二 (ENDO DAIJI)

酪農学園大学・獣医学部・教授

研究者番号：40168828

前田健 (MAEDA KEN)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：90284273

江下優樹 (ESHITA YUKI)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：10082223

池田正徳 (IKEDA MASANORI)

岡山大学・医学部・准教授

研究者番号：30315767

酒井宏治 (SAKAI KOUJI)

国立感染症研究所・ウイルス第1部・研究官

研究者番号：70515535

(3) 連携研究者

明石博臣 (AKASHI HIROOMI)

東京大学・農学部・教授