

トピックス

2. 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

水谷 哲也

国立感染症研究所ウイルス第1部

新興ウイルス感染症のアウトブレイクに備えて、RNAウイルスの網羅的検出法を開発した。ゲノム核酸を均一に増幅する技術(Whole genome amplification)と核酸のライブラリーを2度作成することによる感度上昇、さらに新しく開発したダイレクトシーケンス法を組み合わせることにより、血清や培養上清を対象とした新しい検出方法を構築できた。この方法をRapid Determination System of Viral RNA Sequences(略してRDV法)と名付けた。RDV法はわずか2日間でRNAウイルスゲノムの塩基配列の一部を決定することが可能であり、バイオテロなどにも有用かもしれない。RDV法はSARSコロナウイルスや西ナイルウイルスなどの新興ウイルスを感染培養上清から効率良く検出することができた。また、ヒトの臨床検体や蚊媒介性ウイルスの同定にも応用可能であることを示した。RDV法はRNAウイルスだけではなく、DNAウイルスにも適用でき、RDV法を用いてコウモリの新しいアデノウイルスやヘルペスウイルスを同定することにも成功した。このトピックスでは、RDV法の工程を説明し、基礎的データや応用例を示すと共に、本法の将来的な展望についても言及したい。

はじめに

2002年SARSウイルスは種の壁を越え、国境を越えて世界中に大きな脅威を与えた。西ナイルウイルスは1999年突如米国に上陸し、瞬く間に全米に広まり土着のウイルス性疾患になってしまった。また、1980年に世界保健機構(WHO)により天然痘の根絶宣言は出されたが、未だこのウイルスがテロリストに使われる恐怖は根強く残っている。これらの新興・再興感染症に立ち向かうためには、迅速な診断法を確立する必要がある。

既知のウイルスをPCR法により検出する場合には、GenBankなどから遺伝子の塩基配列の情報を得てプライマーを設計する。現在はPCRの技術も進歩しているので、数十分で数コピーのウイルスの遺伝子でも検出できる。では、今ここに、新興ウイルス感染症が疑われる検体がある場合にどのような方法を用いて原因を突き止めれば良いの

うか?有効な方法のひとつは電子顕微鏡写真を撮ることである。SARSコロナウイルスは電子顕微鏡写真で王冠をもつウイルス様粒子が見つかったことが同定の決め手のひとつになった。しかし、ウイルスの形からは塩基配列がわからないのでPCRなどの診断系を構築することができない。次に有効と考えられる方法は、既知のウイルスを検出できるようなシステム(ELISAやPCR)を用いて片端から検査していくことである。しかし、この方法でもウイルス種を特定できない場合、すなわち未同定のウイルスの可能性が高い場合、多くの研究者が思いつく方法はランダムプライマーで増幅してプラスミドにクローニングすることであろう。実際にランダムプライマーを用いた増幅系を構築してみると感度が相当悪いので、実際に用いることができるのはウイルス量が非常に多いケースに限定されてしまうことがわかる。また、後述するように、未同定のウイルスを合法的にクローニングするには様々な手続き(時間)や施設を必要とする。このように考えていくと、現実の問題として、我々は未同定のウイルスを同定する有効な手段を持ち合わせていないことに気がつく。いや、この手の論文をPubMedで検索すればいくつも見つかるはずなので、その方法を真似れば良いという考え方もあるかもしれない。しかし、自分の手に馴染んでいない方法は、感度やコツがわかっていないので絶えず不安がつきまとうはずである。たとえば、その方法で新しいウイルスの遺伝子情報が得られ

連絡先

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1
 国立感染症研究所ウイルス第1部
 TEL : 0425-61-0771
 FAX : 0425-65-3315
 E-mail : tmizutan@nih.go.jp

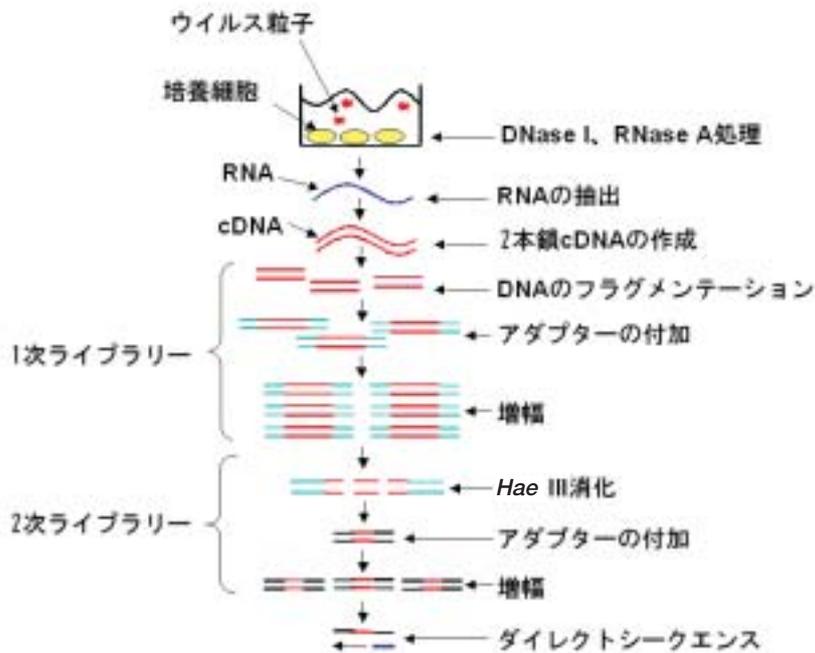


図1 RDV法のプロトコール

1. ウイルス粒子外に存在する細胞由来のDNAやRNAをRNase AとDNase I処理により分解する。2. 分解しきれなかったDNAについては、Agilent Total RNA Isolation Mini Kitにより除去しながら、RNAを抽出する。3. このRNAをランダムプライマーでSuperscript IIIを用いてcDNAを作成する。さらにRNase Hを添加することにより2本鎖cDNAを合成する。4. Whole Genome Amplification Kitを用いて1次ライブラリーを作成する。増幅はキットで推奨されているTaqポリメラーゼではなく、AmpliTaq Gold LDを用いている。5. Hae III消化とアダプター結合による2次ライブラリーを作成する。6. ダイレクトシーケンスにより迅速に塩基配列を決定する。

なかった場合に、そもそもウイルス量が少なかったからなのか？ウイルスの種類がその方法に適していなかったのか？がわからない。つまり、検出感度が明らかにされており、ウイルス検出において実績のある方法で、さらにいくつかの実験例（経験）を自分で持っている方法が新興ウイルス感染症のアウトブレイク時に役立つと考えられる。そこで我々は、既存の全ゲノム均等増幅の技術を吟味して増幅効率の良い方法を選出し、独自に開発したダイレクトシーケンスの方法をこれに組み合わせることにより、迅速なRNAウイルス検出方法を開発した¹⁾。

RDV法の開発

我々は網羅的RNAウイルス検出方法の開発当初、次の目標を掲げて新しいウイルス検出システムを構築した。1. ウイルス特異的なプライマーを用いないで、非特異的な増幅により遺伝子断片を増幅すること。2. 最終的にはウイルスの核酸のみが増幅されてくる系を構築すること。3. 迅速に全ての反応が終わり、ウイルスの塩基配列を決定できること。4. ウイルスの核酸はクローニングしないで、ダイレクトシーケンスによって遺伝子の塩基配列を決定すること。

その結果、ゲノム核酸を均一に増幅する技術（Whole genome amplification）と核酸のライブラリーを2度作成して感度を上げることにより、血清や培養上清を対象とした新しい検出方法を構築できた¹⁾。この方法をRapid determination system of viral RNA sequence（略してRDV法）と呼んで、後述のように様々な検体からウイルスの遺伝子断片の塩基配列を決定することに成功している。名称はRNAウイルスの検出法であるが、DNAウイルスの検出も可能であり、細菌の検出にも取り組んでいる。

RDV法の簡単な手順（図1）と特徴

1. ウイルス粒子外に存在する細胞・組織由来のDNAやRNAはヌクレアーゼ処理を施すことにより、効率よく分解する。
2. 更に分解できなかったDNAについては、特殊なRNA抽出法（Agilent Total RNA Isolation MiniKit; Agilent Technology）により除く。
3. 逆転写酵素（Superscript III; Invitrogen）とRNase Hを組み合わせることにより、2本鎖cDNAを合成する。
4. Whole genome amplification技術（Whole Genome

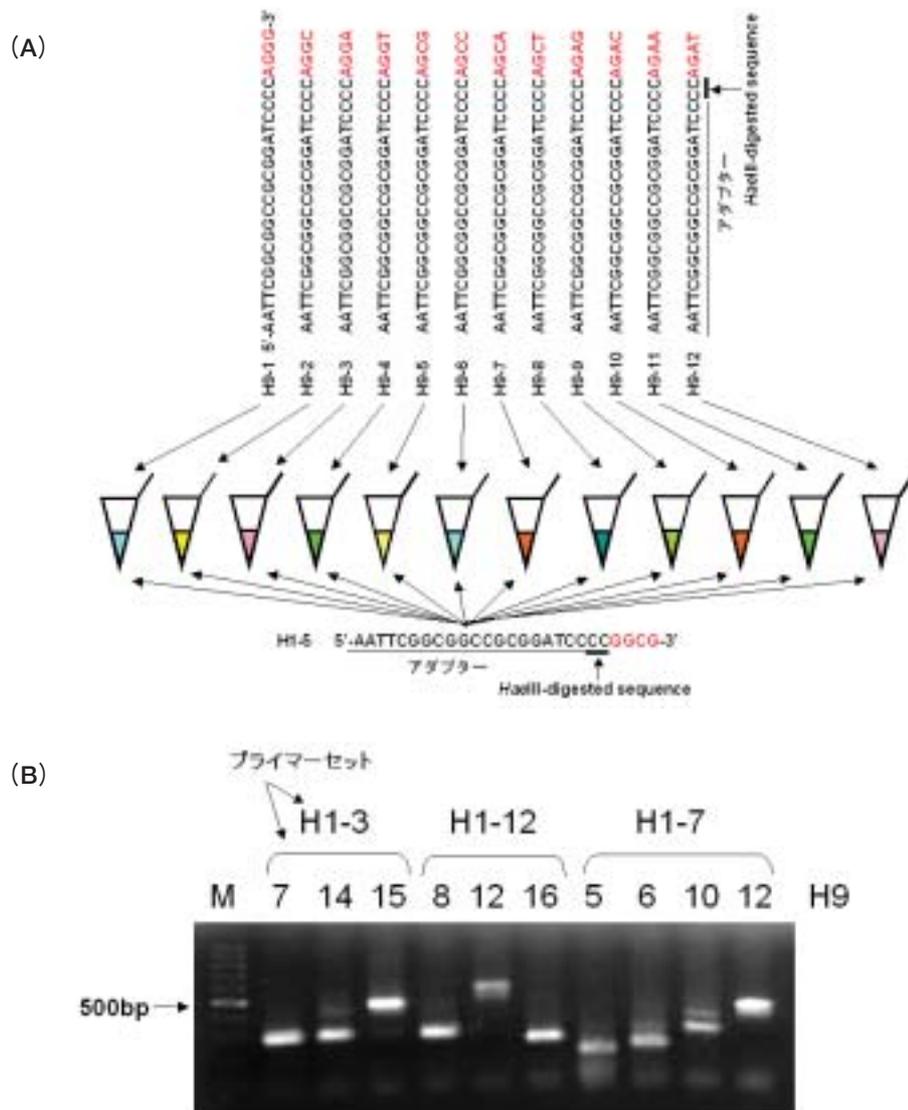


図2 新しいダイレクトシーケンスの方法

プライマーは、アダプター配列に *Hae* III の切り残りの CC と 4 つの塩基を組み合わせたものを設計した。この 4 つの塩基の組み合わせは自由であるが、できるだけ T_m 値が高くなるようにした。A のようなプライマーセットで最終増幅し、電気泳動で 1 つか 2 つのバンドとして得られたもの (B) から DNA を精製し、どちらか片方のプライマーでダイレクトシーケンスを行なう。

Amplification Kit; Sigma Aldrich) を用いた増幅 (1 次ライブラリー) を行なう。

5. *Hae* III 消化とアダプター結合による 2 次ライブラリーの作成する。
6. ダイレクトシーケンスにより迅速に塩基配列を決定する (図 2)。

これらの操作により、RNA 抽出からわずか 2 日間でウイルスゲノムの遺伝子断片の塩基配列が得られる。

実は、このような網羅的なウイルス核酸の検出方法は少なからず報告されている。ほとんどは、Sequence-independent single-primer amplification²⁾ (SISPA) や

Representational Difference Analysis³⁾ (RDA) を原法にした改良方法である。後で気がついたことであるが、RDV 法も SISPA の一部の技術を利用していた。しかし、これらの報告されている方法の検出感度は 100 万コピー程度と低く、しかもどのウイルスに対してもこの感度で検出できるかは定かではない。さらに、今まで報告されているすべての方法は最終アンプリコンをクローニングして塩基配列を決定しなければならないので、1 週間近い (しばしばそれ以上) 時間を要することになる。特に組換え DNA に関してカルタヘナ条約に参加している日本では、未同定のウイルスをクローニングする場合には文部科学大臣への申請書

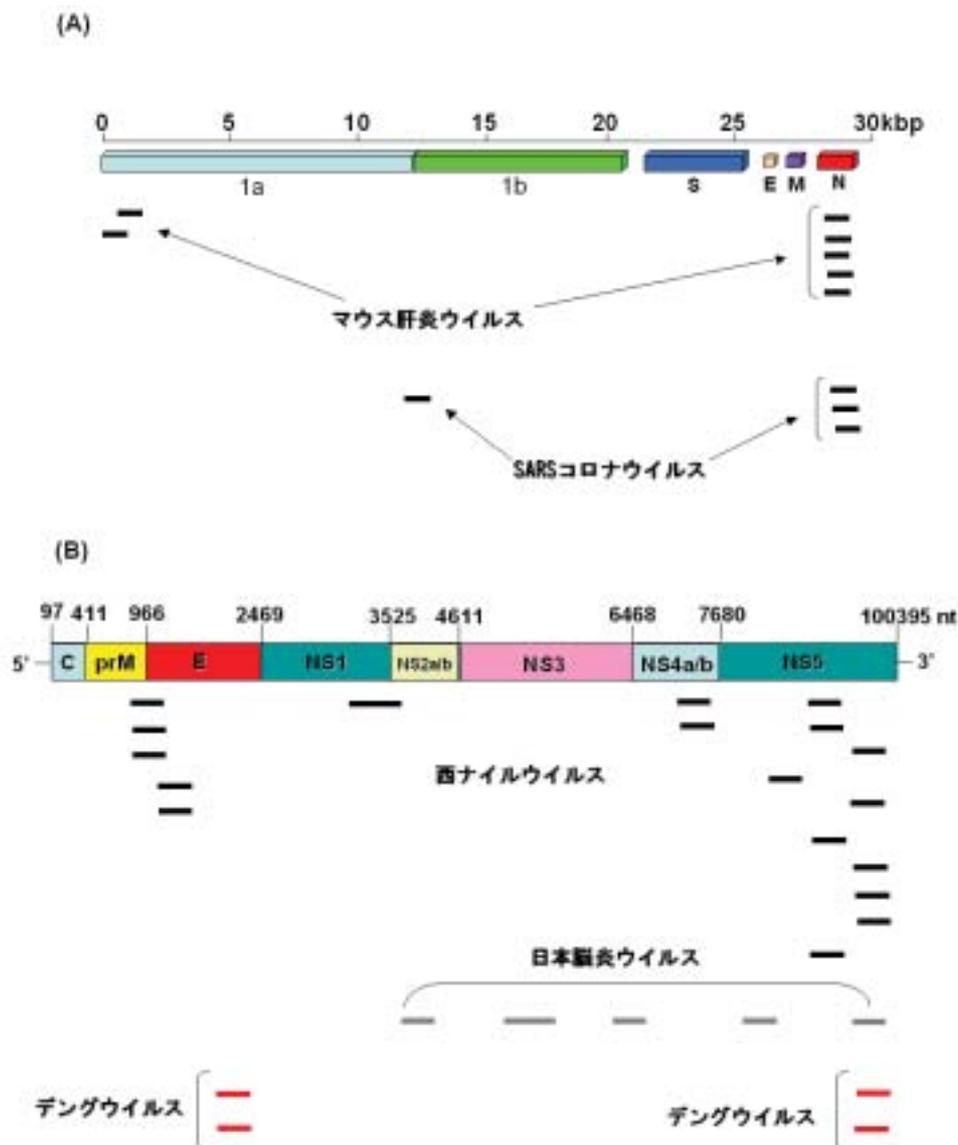


図3 RDV法によるウイルス検出の例

(A) SARS コロナウイルスとマウス肝炎ウイルス、(B) 西ナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルス

類を作成し承認されるまでに数ヶ月を費やさねばならない。さらに、高度なバイオセーフティーレベル (BSL) の実験室での実施が要求される。このように、新興ウイルス感染症のアウトブレイクが起こってから書類申請をおこなうのでは、迅速な対応は無理である。一方、我々が報告した RDV 法はダイレクトシーケンスによる塩基配列を特徴としているので、低い BSL の実験室で迅速に簡単にウイルスの塩基配列が得られることになる。RDV 法の感度はおよそ 1000 から 10 万コピーと見積もっている (ウイルスゲノムが長い DNA ウイルスは低コピーでも検出できる)。上述のような類似の方法よりも感度は優れていると考えられるが、数コピーのウイルスゲノムやウイルスの転写産物を検出で

きるほどの感度は無いので、日々改良に励んでいる。

RDV 法によるウイルス検出例

我々は RDV 法を開発後、国立感染症研究所で保有しているウイルスを用いて、実際にこれらのウイルスを同定できるかについての評価をおこなった¹⁾ (図3)。いずれのストックウイルスでも培養細胞で増幅された上清 10-100ul (10 の 6 乗 PFU 前後) を使用した。まず、著者が近年研究してきた SARS コロナウイルスやマウス肝炎ウイルス (MHV) では、解析したアンプリコンの半数以上がウイルスの遺伝子配列と一致していた (図3A)。これらのコロナウイルスでは、特にヌクレオキャプシド蛋白質をコードし

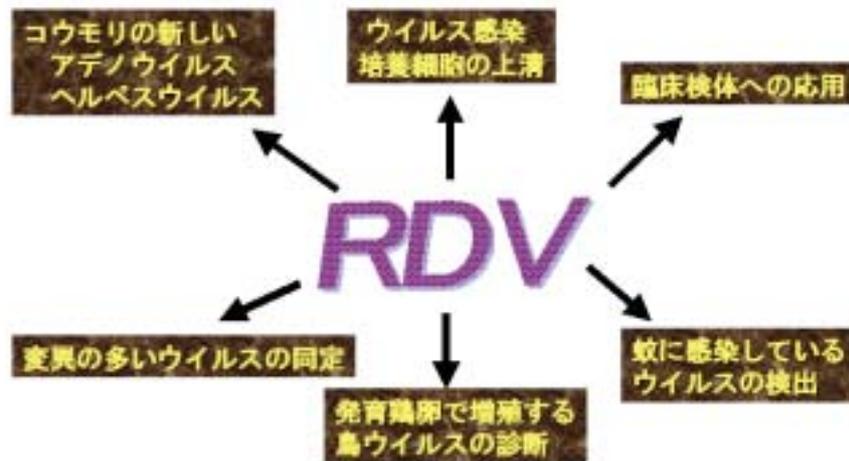


図4 RDV法の応用例

ている領域にアンプリコンが集中していた。感染細胞中ではこの領域の mRNA (SARS コロナウイルスでは mRNA9, MHV では mRNA7) が最も大量に転写されることがわかっている。興味深い。さらに我々は、西ナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルスなど、フラビウイルスについても同様の検討を行なった¹⁴⁾ (図 3B)。これらのウイルスでも RDV 法により効率よくウイルス遺伝子と一致するアンプリコンを得ることできた。フラビウイルスを蚊の培養細胞 (C6/36 細胞) で増殖させた培養上清のアンプリコンでは、蚊の遺伝子と一致するものがいくつか取れてきた。この結果はヒトの血清などを扱う場合に、ヒトの遺伝子情報が得られてしまうことになるので、個人情報保護法の観点からも注意が必要なことがわかった。他に、これらの実験結果から明らかになったことは、ウイルス感染により細胞死が認められる場合にはリボゾーマル RNA のアンプリコンが得られることが多いことである。RDV 法では培養上清に直接 RNase A を添加して、ウイルス粒子外の RNA を分解するステップがあるが、リボゾーマル RNA は結合蛋白質に守られてヌクレアーゼ耐性になっていると考えられる。一方、宿主細胞のゲノム DNA は DNase I 処理や RNA 抽出キット (Agilent Total RNA Isolation Mini Kit) により高率に除去されているようである。抽出された RNA 溶液中にウイルス RNA が非常に少ない場合には、宿主細胞のリボゾーマル RNA のほかに、細菌のリボゾーマル RNA 以外の遺伝子を含んだアンプリコンが得られることが多い。理由は定かではないが、実験操作過程で混入した細菌を検出してしまったか、酵素 (ほとんどが細菌に作られたリコンビナントと考えられる) 溶液に含まれる微量の細菌の遺伝子を検出している可能性が考えられる。細菌から RNA を抽出して RDV 法をおこなうとほとんどはリボゾーマル RNA のアンプリコンであることから、RDV 法で

得られる細菌の遺伝子の情報は酵素に含まれていると考えられる。しかし、これらのウイルスと関係のない遺伝子が混入していることは悪いことばかりではない。結果的には、(偶然であったが) RDV 法は混入遺伝子を利用して検出効率を上げていることがわかった。RDV 法では、数十のプライマーセット (12 - 96 セット) で上記のウイルスを解析した場合、アンプリコンの 50% 以上がウイルスの遺伝子を保有している。しかし、アダプター配列の内側の 4 塩基を利用した選択的増幅方法は、わずか数十のプライマーセットでしかも高率にウイルス遺伝子をヒットすることは不可能である。実際に、アンプリコンを解析してみると、ウイルス遺伝子の両末端にきっちりアダプターが連結していることはむしろ少なく、上記の宿主細胞やバクテリアの混入遺伝子が *Hae* III で切断された断片が重合して、ウイルス遺伝子を挟んでいることがわかる。すなわち、2 次ライブラリー作成時には、ウイルス遺伝子や混入遺伝子が様々な順序で連結したものが用意されており、プライマーセットにより選択的に一部の重合遺伝子が増幅されてくものと考えられる。この現象と SAGE 法 (Serial Analysis of Gene Expression) の技術と組み合わせると、小さい遺伝子の大量解析を構築できるかもしれない。

RDV 法はすべての RNA ウイルスを検出できるのであるか? Respiratory syncytial virus (RSV) を RDV 法で解析すると、ウイルス遺伝子のアンプリコンが得られる確立が非常に低い。色々な理由が考えられるが、RDV 法は制限酵素の *Hae* III で消化する工程があり、AmpliTaq Gold を用いて主に 500bp 以下のアンプリコンを優先的に増幅するので、このような *Hae* III の切断断片が少ない RSV では当然検出感度が悪くなったと考えられる。この経験の後、GenBank に登録されているウイルス遺伝子配列を調べてみると、*Hae* III よりも *Alu* I の切断部位を有するウイルス

が多いことが明らかになったので、最近の RDV 法では *AluI* を用いるようにしている。

臨床検体への応用

仙台医療センターのウイルスセンターでは、6種類の培養細胞を96穴のマイクロプレート上に培養することにより、感染ウイルスの診断をおこなっている。仙台医療センターを受診した風邪症状の小児の咽頭ぬぐい液をこれら培養細胞に接種し、CPEを起す検体の培養上清のうち、PCRによる検査でエンテロウイルスの感染が疑われる検体(VP4領域で増幅できたが、型別に関連するVP1領域では増幅できなかった)について、RDV法をおこなった(仙台医療センター・ウイルスセンター 西村秀一・岡本道子先生との共同研究)。この検体はWHOの推奨する中和抗体パネルでもエンテロウイルスの血清型を特定できなかった。しかし、RDV法によりコクサッキーA14ウイルスにホモロジーの高い遺伝子断片を検出できた¹⁾。本事例では、通常の検査方法で使用されているエンテロウイルスの中和抗体パネルやユニバーサルプライマーを用いたPCR法では血清型の決定が不可能な検体をRDV法により同定できたことに意義があると考えられる。

コウモリの新しいアデノウイルスの発見

近年、SARS コロナウイルス、エボラウイルス、ニパウイルス等がコウモリ由来新興感染症であることがわかってきた。山口大学では、これらコウモリ由来感染症の日本への侵入に備えて、予測・診断法を国内で確立するための研究グループ(山口大学研究推進体)を設立し、基礎研究として各種コウモリ由来培養細胞の樹立を目指している。農学部・前田健先生らは、翼手目大翼手亜目クビワコウモリ的一种であるヤエヤマオコウモリ(英名 Ryukyu flying fox: *Pteropus dasymallus yayeyamae*)を県知事の許可のもと捕獲し、腎臓と脾臓より初代細胞の樹立を試みたところ、脾臓由来初代培養細胞の継代4代目からCPEが出現し、ウイルス(Ryukyu virus 1: RV1)が分離された。そこで、RDV法(DNAウイルスを同定するための改良法: RDV-D法)によりRV1の同定を行ったところ、幾つかの未知の遺伝子配列が得られた。データベースとの遺伝子相同性解析により、イヌアデノウイルスやウシアデノウイルスに近縁であることが示された⁵⁾。さらに、アデノウイルスであることを確認するため、ウイルスのDNAポリメラーゼ領域のアデノウイルス共通プライマーを用いたPCRで特異的バンドを確認した。この増幅断片の塩基配列を決定し、系統樹を作成した結果、Mastadenovirus属に属することが示された。また、ウイルスゲノムを制限酵素切断パターンにより解析した結果、約30kbpであることが推測された。RV1は前田先生らが樹立したキクガシラコウモリ由来培養細胞(BKT1細胞:後述)で細胞変性効果を示したが、

BALB/cマウスの腹腔内にウイルス接種をしても外見上は変化を認めなかった。本研究はコウモリのアデノウイルスとしては初めての報告である。このウイルスにご興味のある先生は前田先生にご連絡いただきたい(kmaeda@yamaguchi-u.ac.jp)。

コウモリの新しいヘルペスウイルスの発見

前田健先生らは、さらに、キクガシラコウモリ(英名 Horseshoe bat: *Rhinolophus ferrumequinum*)を都道府県知事の許可を得て捕獲し、脾臓由来初代培養細胞の樹立を試みたところ、継代3代目よりCPEが出現を確認した。分離されたウイルス(Bat virus 1)はこのコウモリの腎臓由来の培養細胞(BKT1細胞)でもCPEを形成したので、培養上清を用いてRDV法で遺伝子を解析し、FASTA解析を行った結果、既知のウイルスではウマヘルペスウイルス2型と最も相同性が高いことがわかった。さらに、ヘルペスウイルス共通のプライマーセットを用いてPCRならびに増幅断片の塩基配列を決定した結果、ヘルペスウイルス科、ガンマヘルペスウイルス亜科、ラディノウイルスに属する今まで未同定であったヘルペスウイルスであることが示された。本研究はコウモリ由来ヘルペスウイルス分離の最初の報告である(論文作成中)。また、現在、病原性の有無、全ゲノム配列の決定が進行中である。このウイルスやコウモリの細胞にご興味のある先生は前田先生にご連絡いただきたい。

蚊媒介性RNAウイルスの検出

蚊が媒介するウイルスには、西ナイルウイルス、日本脳炎ウイルスなどヒトに重篤な疾病を起すものが少なくない。デングウイルスも、熱帯・亜熱帯地域で公衆衛生上の重要な問題を引き起こすことが知られている。しかし、蚊はウイルスの宝庫と言われるように、まだ知られていないウイルスが潜伏している可能性が極めて高い。そこで我々は、アジアにおけるデングウイルス感染蚊の研究をおこなっている大分大学医学部・江下優樹先生や、福岡大学薬学部・木原悠希・山尾卓也・佐藤朝光先生らと、蚊に感染している未同定のウイルスを探索することを目的にした共同研究をおこなっている。タイでデング熱と臨床診断された患者宅内で、昼間に採集したネッタイシマカメスの93個体のホモジネイトをC6/36細胞に接種し、9日後に回収した培養上清を用いてRDV法をおこなった。DENVの全血清型を検出できるプライマーを用いたRT-PCRにより、8ホモジネイトがDENV陽性であった。C6/36細胞接種後にCPEが観察された4ホモジネイトを混合してRDV法をおこなった。RDV法により得られた16のアンプリコンの塩基配列を決定したところ、3つのアンプリコンがデング4型ウイルス(DENV-4)と高いホモロジーを示した。他の2つのアンプリコンは、ヒトに感染しないCell fusing

agent virus (CFAV) と高いホモロジーを示した。これらのウイルスについては、特異的 PCR プライマーなどを用いて再確認を行った。さらに、DENV-4 と CFAV が 1 個体のネッタイシマカに感染していることも確認できた⁶⁾。このように RDV 法は、蚊が媒介する未同定のウイルスを検出する方法として有力な手法であることが示されたので、現在、タイで採集した蚊の幼虫に感染しているウイルスを探索中である。

鳥由来ウイルスへの応用

北里大学獣医学部・竹原一明先生との共同研究で、野生鴨カモの新鮮糞便から発育鶏卵で分離した HA 陽性検体を材料として、RDV 法によりトリパラミクソウイルスの N, F, HN, L 遺伝子断片を検出することができた。L 遺伝子特異的プライマーにより検体から RT-PCR 増幅産物が得られ、その塩基配列は APMV-6 と高い相同性を示した。この研究では、アンプリコン量を増加させるために、Whole transcriptome amplification kit (Sigma-Aldrich) や Multiplex PCR assay kit (Takara Bio) を用いて RDV 法を改良した (RDV 法 ver2.0)⁷⁾。RDV 法は、培養上清や血清だけでなく、発育鶏卵で増殖させたウイルスについても HI や HA 検査を実施することなく、鳥由来ウイルスを検出できる可能性を示した。

変異が多く PCR プライマーが設計しにくい ウイルスへの応用

理研 BRC で導入マウスがリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) に汚染していたことが判明した例⁸⁾では、これまでに報告されていた検出用プライマーで全てのマウス個体に感染しているウイルスを検出することができず、分離ウイルス (M1) の S 遺伝子の全塩基配列を決定した後に設計したプライマーで再検討した結果、同一系統のマウス全てがウイルスに感染していることが明らかになった。このように、同義置換が非常に多いためにプライマーの設計がしにくい LCMV では、既知のウイルス遺伝子の配列から設計されたプライマーでは検出できないウイルスも相当数存在すると考えられる。LCMV-M1 株感染細胞の培養上清から RDV 法 ver2.0 を用いて効率よくウイルスの遺伝子配列を得ることに成功した (投稿準備中)。RDV 法は非特異的増幅をおこなうので、変異の多いウイルスを検出するのに有効であると考えられる。

RDV 法の展望

遺伝子増幅の研究分野は日々新しい方法が開発されている。近年、特に貴重なサンプルを均等に増幅する技術、非特異的増幅法を手軽におこなうことのできるキットが次々に発売されている。RDV 法では、シグマアルドリッチ社の WGA kit や WTA kit を組み込み、ウイルス種に依らない

増幅が可能になった。しかし、短いウイルスゲノムや 1000 コピー以下のサンプルでは極端に増幅効率が悪くなる。また、最終ステップのダイレクトシークエンスでは、数多くのバンドをゲルから切り出す作業があり短時間で解析できるバンド数は限られてしまう。我々は前者の問題を解決するために、日々キットの反応条件を変えると同時に独自に非特異的増幅法を開発している。それゆえ、数ヶ月後には RDV 法のプロトコールは大きく変わっているかもしれない。後者の解析数に関する問題は、454 社のメガパイロシークエンサーを用いることで解決される見通しである。最近、理化学研究所と大阪大学、国立感染症研究所でこのシークエンサーを使った病原微生物の解析に関する共同研究を開始した。20 万遺伝子を一気に解析することにより、文字通り網羅的な解析が可能になることを期待している。

RDV 法は RNA ウイルスも DNA ウイルスも解析可能であるが、今のところウイルス感染細胞の培養上清など、比較的余分な核酸が含まれていない検体に限られている。この余分な遺伝子の混入が逆に RDV 法の検出に役立っていることは上述した。しかし、できれば、臓器や糞便などからもウイルス遺伝子を釣り上げたいと考えている。近年、酪農学園大学・獣医学部の遠藤大二先生は我々と共同研究で、非特異的な反応を抑えたサブトラクション法を開発した⁹⁾。この方法はサブトラクションの障害になるリボゾーマル RNA に結合しにくいプライマーセットで逆転写反応を始めることに特徴がある。結果を得るまでに 1 週間以上を要するが、有用な方法である。さらに、RDV 法を改良して迅速なサブトラクション法も開発中である (東京大学・農学部 渡辺俊平・明石博臣先生と共同研究)。

RDV 法開発の目的は上述のように、日本で新興・再興ウイルス感染症のアウトブレイクが起こった場合に即座に対応できるシステムを構築することにあるが、さらに、病原微生物が原因と疑われる疾患で、未だに原因がわからないものを解明するためにも貢献できると考えられる。川崎病は年間約 1 万人の小児が罹患するが、いまだ原因がわかっていない。発病時にガンマグロブリンを投与することで軽快することや、疫学的な調査などから感染症が疑われている。ヘルペスウイルスやコロナウイルスなどが原因であるという論文が数多く報告されているが、決め手を欠いたままである。我々は RDV 法の非特異的増幅方法による網羅性の特徴から、(もし、川崎病の原因がウイルスであった場合には) 原因ウイルスを特定できるのではないかと考え¹⁰⁾、川崎富作先生 (川崎病研究センター) や小児科の先生方と RDV 法を川崎病の原因解明に役立てるための計画を進行中である^{*)}。

最後に

RDV 法は多くの先生方のご協力無しには開発できませんでした。この場をかりて深謝いたします。本文中に御名前

を挙げられなかった先生は（敬称略で）、中屋隆明（大阪大学微生物病研究所）、宮田健、鹿志毛信広、見明史雄（福岡大学薬学部）、牛島廣治（東京大学医学部）、Yupha Rongsriyam, Narumon Komalamisra, Rawewan Srisawat, Parichat Lapcharoen, Suchada Sumroiphon（タイ国マヒドン大学）、岩永史朗（神戸大学農学部）、酒井宏治・福士秀悦・西條政幸・緒方もも子・飯塚愛恵、森川茂・林昌宏・根路目令子・伊藤美佳・小滝徹・高崎智彦・倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第1部）、有田峰太郎・清水博之・石井孝司・鈴木哲朗（ウイルス第2部）、白戸憲也・渡辺理恵・田口文広（ウイルス第3部）です。

※）川崎病の研究は（西村・田口先生、感染研ウイルス第1部と）下記の先生方との共同研究です。（敬称略で）
上村茂・梅田陽（昭和大学北部病院）、佐地勉（東邦大学医学部）、小川俊一（日本医科大学付属病院）、石井正浩（北里大学医学部）、寺井勝（東京女子医科大学八千代医療センター）、土屋恵司（日赤医療センター小児科）、尾内喜広（理化研遺伝子多型センター）、鴨下信彦（東京大学医科学研究所）、鮎沢衛（日本大学医学部）、河野寿夫（公立昭和病院小児科）、片野晴隆（感染研病理部）

参考文献

- 1) Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, Nishimura H.: Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses. *Emerging Infectious Diseases*. 13: 322-324, 2007.
- 2) Reyes GR, Kim JP.: Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations. *Mol Cell Probes*. 6:473-481, 1991.
- 3) Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M.: Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, 259:946-951, 1993.
- 4) Mizutani T.: Review of methods to determine nucleic acid sequences of unknown viruses. Special issue of *Indian J. Microbiol.* (in press)
- 5) 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 dasy-mallus yayeyamae*). *Emerging Infectious Diseases* (In press)
- 6) Kihara Y, Satho T, Eshita Y, Sakai K, Kotaki A, Takasaki T, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Lapcharoen P, Sumroiphon S, Iwanaga S, Ushijima H, Endoh D, Miyata T, Sakata A, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T.: Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in the field. *J. Virol. Methods* (In press)
- 7) Sakai K, Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Endoh D, Kurane I, Takehara K, Morikawa S.: An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences for avian RNA virus. *Arch. Virol.* (in press)
- 8) Ike F, Bourgade F, Ohsawa K, Sato H, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Takimoto K, Yamada YK, Jaubert J, Berard M, Nakata H, Hiraiwa N, Mekada K, Takakura A, Itoh T, Obata Y, Yoshiki A, Montagutelli X.: Lymphocytic choriomeningitis infection undetected by dirty-bedding sentinel monitoring and revealed after embryo transfer of an inbred strain derived from wild mice. *Comp Med*, 57: 272-81, 2007.
- 9) Endoh D, Mizutani T, Kirisawa R, Maki Y, Saito H, Kon Y, Morikawa S, Hayashi M.: Species-independent detection of RNA virus by representational difference analysis using non-ribosomal hexanucleotides for reverse transcription. *Nucleic Acids. Res.* 33: e65, 2005
- 10) 水谷哲也 「川崎病の原因に迫る」日本川崎病研究センターニュースレター No.14, pp2, 2007.

Establishment of a system for determination of emerging infectious diseases (RDV method), and its application

Tetsuya MIZUTANI

Virology 1, National Institute of Infectious Diseases,
Gakuen4-7-1, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan.
Tel. +81-425-61-0771, Fax +81-425-65-3315, E-mail tmizutan@nih.go.jp

We developed a new system for detection of viral nucleic acids because rapid detection of pathogens is necessary to prevent potential outbreaks of infectious diseases. This system, named rapid determination of viral RNA sequences (RDV), involves whole-genome amplification and a new direct sequencing technique. Using the RDV system, it is possible to obtain viral nucleic acid sequences within 2 days. The nucleic acid sequences of SARS-CoV and West Nile virus, which represent emerging and re-emerging infectious viruses, were determined from infectious viral culture supernatant by the RDV method. We demonstrated the clinical application of this system in human specimens and its diagnostic usage in mosquitoes. Furthermore, new adenovirus and herpesvirus were found in bats using the RDV method.

