

資料2

PCR Primer一覽表 98/11/15

Name	領域	na		nt	Sequence	
5' UTR PCR						
HRI C1-1	5' UTR	24-43	1st sence	20	5' - A C T C C A C C A T A G A T C A C T C C	-3'
HRI C1-2	5' UTR	246-225	1st antisence	20	5' - A A C A C T A C T C G G C T A G C A G T	-3'
HRI C2-1	5' UTR	63-82	2nd sence	20	5' - T T C A C G C A G A A A G C G T C T A G	-3'
HRI C2-2	5' UTR	188-207	2nd antisence	20	5' - G T T G A T C C A A G A A A G G A C C C	-3'
EnV1 PCR						
HRI C34-1	EnV	1283-1304	1st sence	22	5' - G G G A T A T G A T G A T G A A C T G G T C	-3'
HRI C24-2	EnV	2213-2231	1st antisence	19	5' - A C S C C C C C C A C R T A C A T C C	-3'
HRI C31-1	EnV	1334-1353	2nd sence	20	5' - T A C T C C G G A T C C C A C A A G C C	-3'
HRI C25-2	EnV	2070-2090	2nd antisence	21	5' - T G C T T C C G G A A G C A A T C C G T G	-3'
EnV ² PCR						
HRI C35-1	EnV	2531-2550	1st sence	20	5' - G G A T G A T G C T G C T G A T A G C C	-3'
HRI C27-2	EnV	3302-3321	1st antisence	20	5' - A C C C A A G A T G A T G T C C C C A C	-3'
HRI C36-1	EnV	2564-2583	2nd sence	20	5' - C C T T A G A R A A C C T G G T G G T C	-3'
HRI C28-2	EnV	3273-3292	2nd antisence	20	5' - T G T C Y G C C C C C C A G G T G A T G	-3'
EnV4 PCR						
HRI C32-1	EnV	1813-1832	1st sence	20	5' - G T G C C C G C G T T G C A G G T G T G	-3'
HRI C23-2	EnV	2761-2780	1st antisence	20	5' - C C G C A C G A T G C G G C C A T C T C	-3'
HRI C33-1	EnV	2002-2021	2nd sence	20	5' - T T C A C C A A G A C G T G C G G G G G	-3'
HRI C26-2	EnV	2648-2667	2nd antisence	20	5' - C C T G C C Y T T G A T G T A C C A G G	-3'
EnV5 PCR						
HRI C34-1	EnV	1283-1304	1st sence	22	5' - G G G A T A T G A T G A T G A A C T G G T C	-3'
HRI C23-2	EnV	2761-2780	1st antisence	20	5' - C C G C A C G A T G C G G C C A T C T C	-3'
HRI C31-1	EnV	1334-1353	2nd sence	20	5' - T A C T C C G G A T C C C A C A A G C C	-3'
HRI C26-2	EnV	2648-2667	2nd antisence	20	5' - C C T G C C Y T T G A T G T A C C A G G	-3'
NS5 PCR						
SSPDV	NS5A	6820-6839	1st sence	18	5' - C C G G A T G T G G C A G T G C T C A C	-3'
SASRAW	NS5A	7171-7191	1st antisence	19	5' - G T G C C C A T A T G G G C A A C G C T G	-3'
SSTDV	NS5A	6848-6869	2nd sence	21	5' - T C A C C G A C C C C T C T C A T A T T A C	-3'
SIASPKR	NS5A	7136-7156	2nd antisence	20	5' - G T T T T C G C A G G A T C T C C G C C G	-3'

nested RT-PCR法

血清30 μ l or 100 μ l



核酸抽出



逆転写反応



1st PCR

94°C 2min

94°C 30sec

55°C 30sec

72°C 2min

35cycles

72°C 5min

4°C over night



2nd PCR

94°C 2min

94°C 30sec

55°C 30sec

72°C 2min

30cycles

72°C 5min

4°C over night



電気泳動

資料4

Sequence Primer 一覧表 98/11/15

Name	領域	na		nt	Sequence
5' UTR PCR					
HRI C2-1	5' UTR	63-82	sequence用	20	5' - TTC ACG CAG AAA GCG TCT AG -3'
EnV1 PCR					
HRI C31-1	EnV	1334-1353	sequence用	20	5' - TAC TCC GGA TCC CAC AAG CC -3'
NS5 PCR					
SSTDV	NSSA	6848-6869	sequence用	21	5' - TCA CCG ACC CCT CTC ATA TTA C -3'

資料5

PCR結果 98/11/15

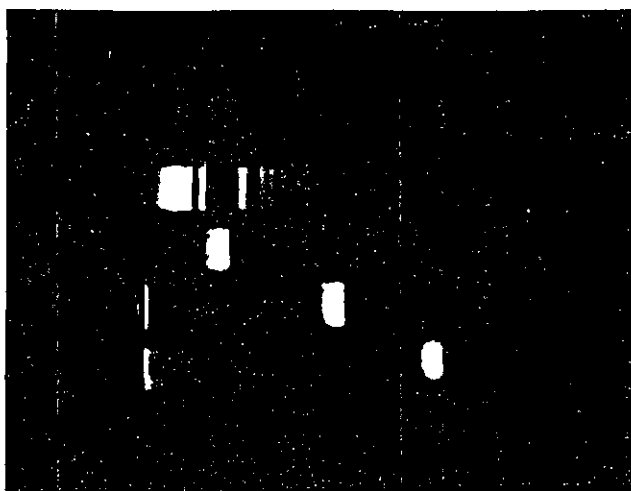
採血日	検体No	発症No	PCR No	5' UTR PCR 検体量 30µl No1	5' UTR PCR 検体量 30µl No2	5' UTR PCR 検体量 30µl No3	5' UTR PCR 検体量 100µl No4	Env1 PCR 検体量 100µl No5	Env1 PCR 検体量 30µl No6	Env2 PCR 検体量 30µl	Env2 PCR 検体量 100µl	Env4 PCR 検体量 100µl	Env5 PCR 検体量 100µl	NSS PCR 検体量 100µl No7	Genotype
1 98.01.08	(donor)	F6872	TK98.01.08-F6872	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2 98.01.08	156826-513(donor)	0000	TK98.01.08-0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3 98.03.11	(donor)	F7589	TK98.03.11-F7589	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
4 98.03.17	(donor)	0000	TK98.03.17-0000	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1b
5 98.04.14	(donor)	F7590	TK98.04.14-F7590	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6 98.07.08	A	F6811	TM98.07.08-F6811	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	1b
7 98.02.03	B 01-372-39	F7633	OK98.02.03-F7633	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2a
8 98.02.23	C 22-709.64	F7634	IM98.02.23-F7634	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2a
9 97.11.10	D 06-820-32	F7635	NN97.11.10-F7635	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	1b
10 98.02.12	E 09.947-12	F7636	MH98.02.12-F7636	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	1b
11 97.10.01	F 15-442-70	F7637	ST97.10.01-F7637	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	1b
12 98.02.24	G 00-169-58	F7638	YO98.02.24-F7638	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1b
13 97.12.01	H 04-986-79	F7639	IY97.12.01-F7639	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	1b
14 98.04.22	I 10.353-67	F7640	OS98.04.22-F7640	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	1b
15 97.12.10	J 00-244-40	F7641	KY97.12.10-F7641	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
16 97.05.16	AT	F5980	AT97.05.16-F5980	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	1b
17 97.04.23	TT	F6416	TT97.04.23-F6416	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2a
18 98.03.24	IT	F6434	IT98.03.24-F6434	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
19	ME	0000	ME-0000	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND

(No1)

資料6

5' UTR PCR

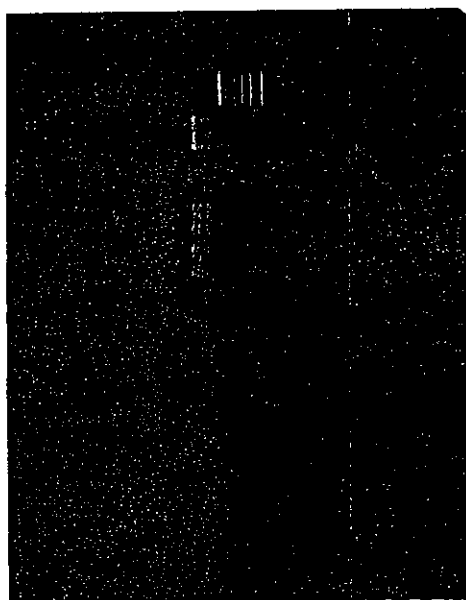
ドナー
■ 98.03.17-0000
ドナー
■ 98.01.08-0000



資料7

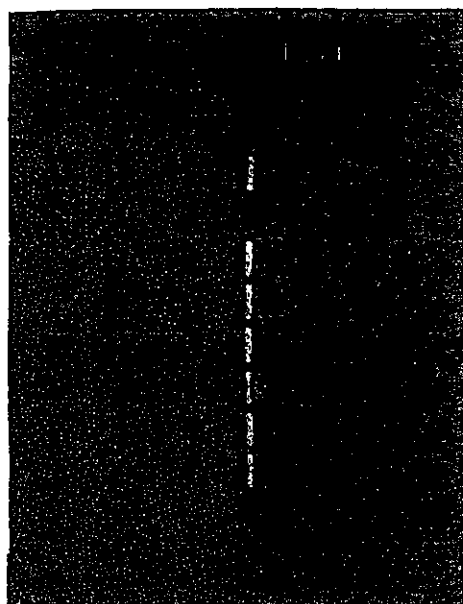
(No2)

5' UTR PCR



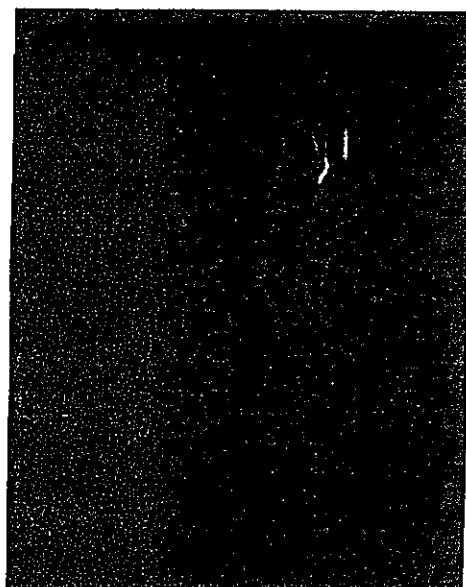
A
■ 98.07.08-F6811
■ 98.01.08-F6872
AT 97.05.16-F5980
TT 97.04.23-F6416
IT 98.03.24-F6434
ME-0000

5' UTR PCR



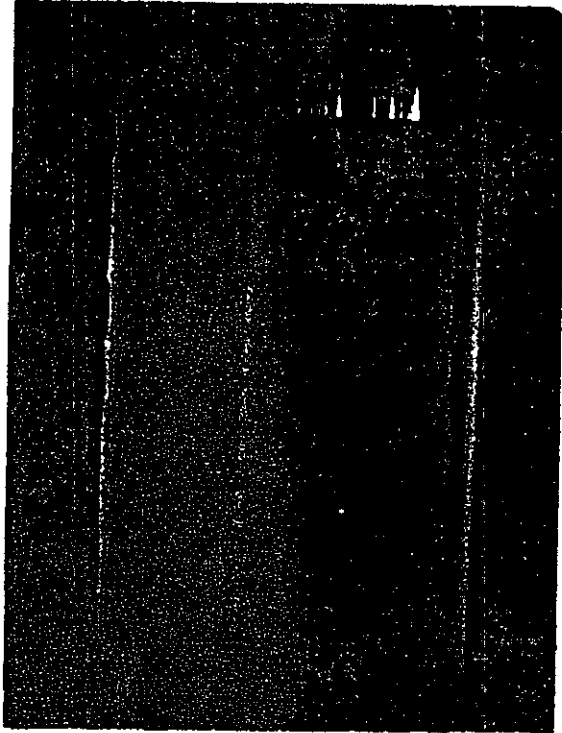
- ドナー
■ 98.03.11-F7589
- ドナー
■ 98.04.14-F7590
- B
■ 98.02.03-F7633
- C
■ 98.02.23-F7634
- D
■ 97.11.10-F7635
- F
■ 98.02.12-F7636
- F
■ 97.10.01-F7637
- G
■ 98.02.24-F7638
- H
■ 97.12.01-F7639
- I
■ 98.04.22-F7640
- J
■ 97.12.10-F7641
- ME-0000

5' UTR PCR

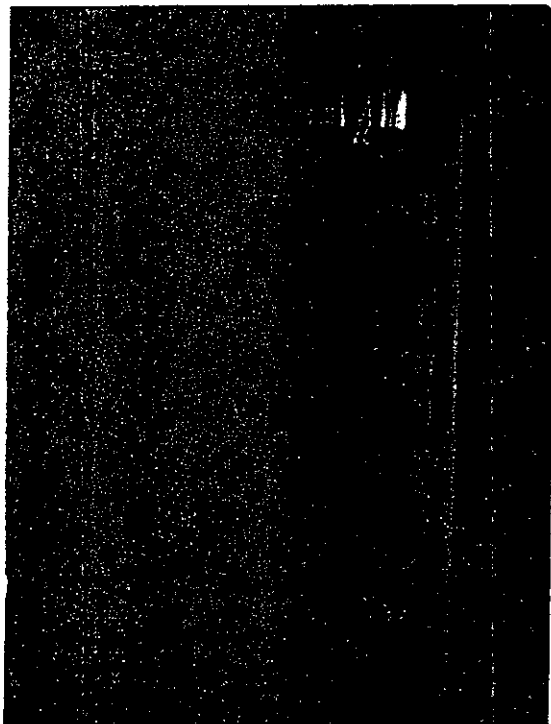


- ドナー
■ 98.03.11-F7589
- ドナー
■ 98.04.14-F7590
- C
■ 98.02.23-F7634
- J
■ 97.12.10-F7641

EnV1 PCR

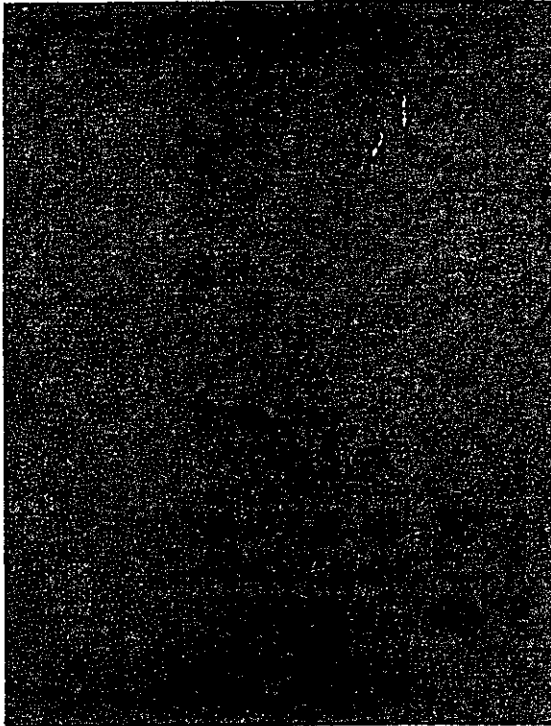


- A
- 98.07.08-F6811
- AT 97.05.16-F5980
- TT 97.04.23-F6416
- IT 98.03.24-F6434
- ME-0000
- 98.03.11-F7589
- 98.04.14-F7590
- 98.02.03-F7633
- 98.02.23-F7634
- 97.11.10-F7635
- 98.02.12-F7636

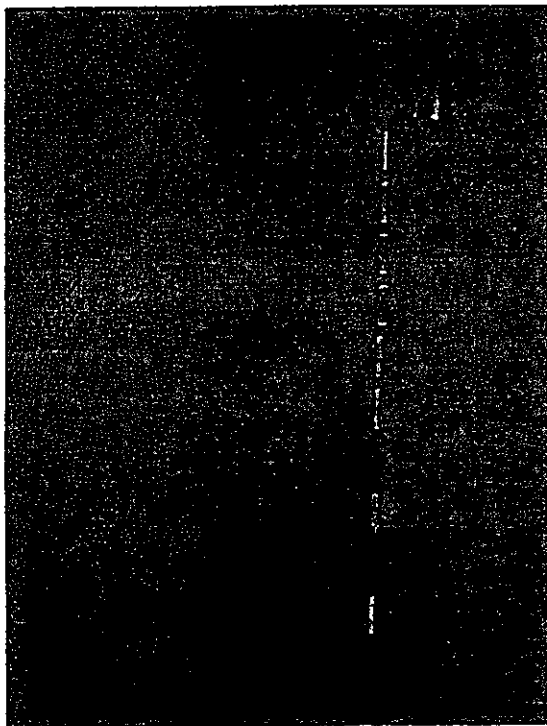


- 97.10.01-F7637
- 98.02.24-F7638
- 97.12.01-F7639
- 98.04.22-F7640
- 97.12.10-F7641

EnV1 PCR

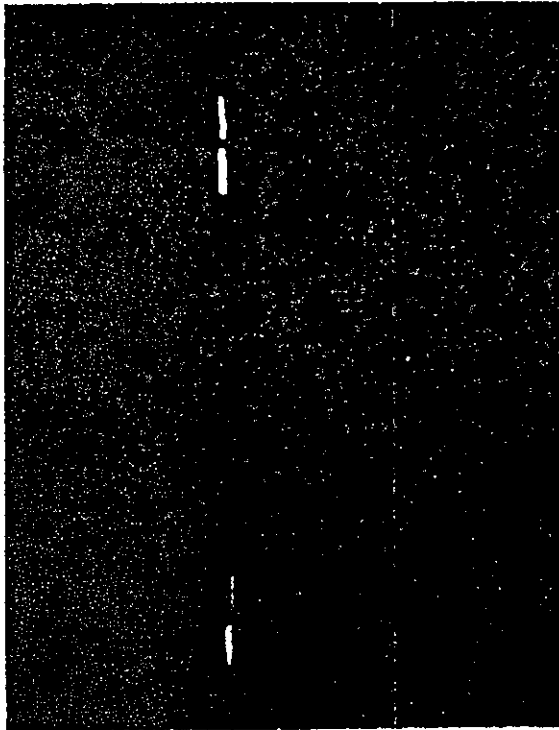


A
98.07.08-F6811
B
98.03.11-F7589
C
98.04.14-F7590

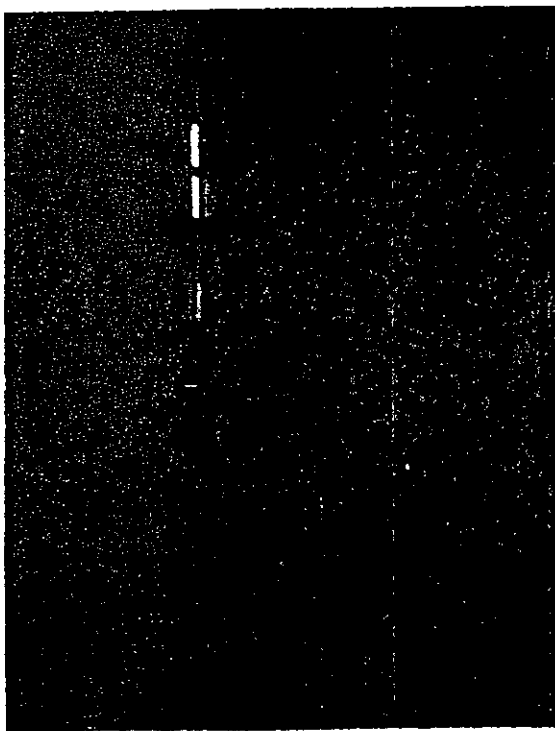


D
97.11.10-F7635
E
98.02.12-F7636
F
97.10.01-F7637
G
98.02.24-F7638
H
97.12.01-F7639
I
98.04.22-F7640
J
97.12.10-F7641
AT 97.05.16-F5980
IT 98.03.24-F6434

NS5 PCR



A
■ 98.07.08-F6811
AT 97.05.16-F5980
TT 97.04.23-F6416
IT 98.03.24-F6434
ME-0000
B
■ 98.03.11-F7589
■ 98.04.14-F7590
■ 98.02.03-F7633
C
■ 98.02.23-F7634
D
■ 97.11.10-F7635
E
■ 98.02.12-F7636



F
■ 97.10.01-F7637
G
■ 98.02.24-F7638
H
■ 97.12.01-F7639
I
■ 98.04.22-F7640
J
■ 97.12.10-F7641

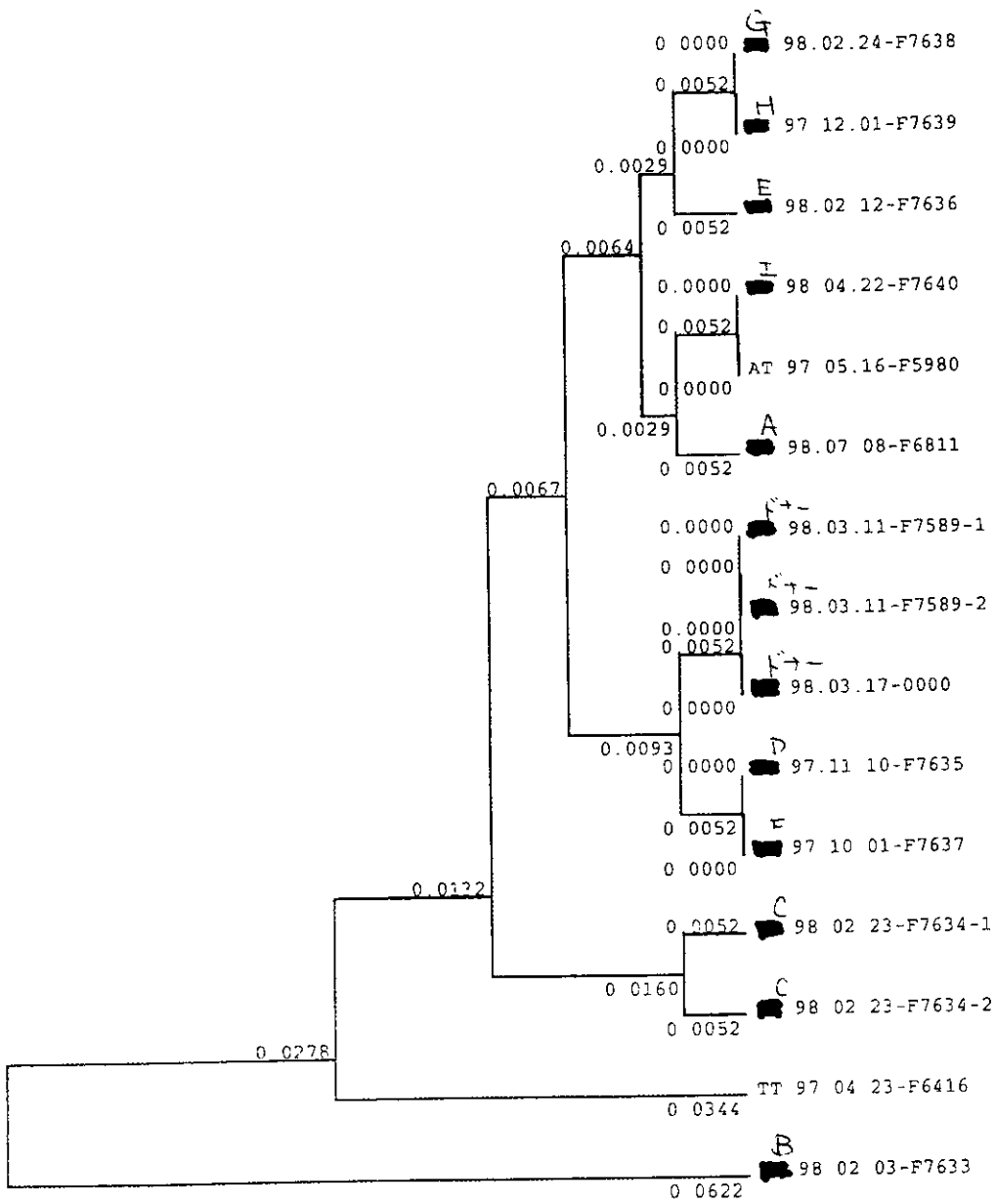
5' UTRの塩基配列

F	98 03 17-0000	1	G	GGGTTG	EWICAGTGTGTAGACGCTCCGCGCCCGCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTC	1	GCGGACCGGTGAGTACCCCGAATTGCCACGA	96
T	98 03 11-F7589-1	1						96
T	98 03 11-F7589-2	1	G					96
A	98 07 08-F681J	1						96
D	97 11 10-F7635	1	G					96
E	98 02 12-F7636	1						96
F	97 10 01-F7637	1						96
G	98 02 24-F7638	1						96
H	97 12 01-F7639	1						96
I	98 04 22-F7640	1						96
AT	97 05 16-F5980	1						96
B	98 02 03-F7633	1						96
C	98 02 23-F7634-1	1						96
C	98 02 23-F7634-2	1						96
TT	97 04 23-F6416	1						96

資料14

5' UTRの系統樹

[GENETYX: Evolutionary tree]
Date 1998 11 15
Method: UPGMA



EnV1の塩基配列

A 98.07.08-F6811 1 ACTUGZFAATCCGCGCCGCTCCCTACTATATCCAGTGGGGGAACTGGGCGAAGCTCTTAAATGTTGATGCTTTCCCGCGGCGGACGGGGTAAAC 100
D 97.11.10-F7635 1 G A T T A C T T C C G T A C T T C . C G . . 100
E 98.02.12-F7636 1 G T T T G T T A T T T A A Y 100
F 97.10.01-F7637 1 G T T T . G T T C T A C 100
G 98.02.24-F7638 1 G T T T T T T C C 100
H 97.12.01-F7639 1 G A T T T T T T A C 100
I 98.04.22-F7640 1 G T T T T T A C 100
AT 97.05.16-F5980 1 G T T A T C T T A A G . . 100
 ***** ** ** ** ** ** ** ** ***** ** ** ** *

A 98.07.08-F6811 101 CTACACGAGGCGGCAAGCCGGCCGACCGCCACAGATTACGTCCTCTTACATCAGGGGGGTCCCAANAATCCAGCTTGTAAACTCCAAAGGFC 200
D 97.11.10-F7635 101 G T G T A G G G G A A A T T C G G C C T G G C G A G A 200
E 98.02.12-F7636 101 G T Y G C G T A G G G C T G T C T C C A T G A T 200
F 97.10.01-F7637 101 G G C T A C A T T G T C C T C C T C A A G T A T T 200
G 98.02.24-F7638 101 C G T W G G G G A A Y G A Y T M A G C C I T C R T A T 200
H 97.12.01-F7639 101 C G I G T R G G G G A T A R G R C Y C A G A C A T G T Y Y G A T T 200
I 98.04.22-F7640 101 C G T T A A G G G T G A G A C C G T G G A G T G G T T C T C A G G R G T G 200
AT 97.05.16-F5980 101 A T A G G G G T C T G A T C G C C A C T A T C A A T A T * 200
 ***** ** ** ** *

A 98.07.08-F6811 201 AGCTGKACATTTACAGGACTCTCTGAAATTCACAGGACTCCCTCAACCCGGTTCCTGCTGCTGTTCTATATACCCCAAGTTCACACTGTCGGGAT 300
D 97.11.10-F7635 201 C C T A A A G C G A A C G G C A C A 300
E 98.02.12-F7636 201 C A Y T C A T T G C T C A G T G T 300
F 97.10.01-F7637 201 C T T T A G C G G 300
G 98.02.24-F7638 201 T C C C T A T Y G C A G 300
H 97.12.01-F7639 201 T T G C R C T C T T A C A Y G C C T Y G A A T 300
I 98.04.22-F7640 201 C C T A G C C T C C A A C G T T G 300
AT 97.05.16-F5980 201 C T C C R T A C G C A T G T * 300
 ***** ** ** *

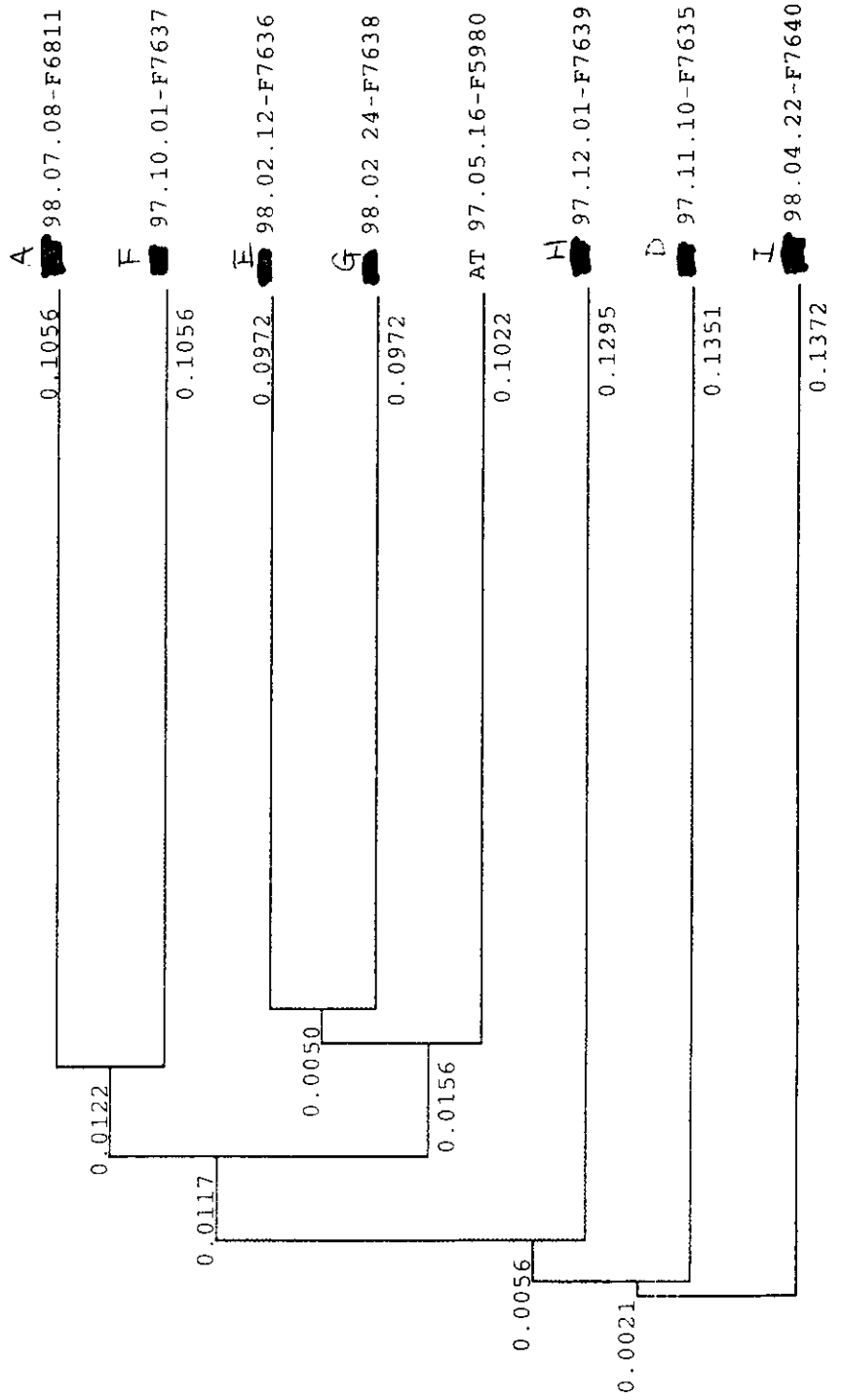
A 98.07.08-F6811 301 GCCCAGAGATWVNGCAGCTCCCGCCCATTCGACAAATGCTGCAAGJNGJGGTCCCAICACATGTCAAAGTGGCANCTCGGAMCA 391
D 97.11.10-F7635 301 T G C T C C C T C C T T C C T C A G A T C 391
E 98.02.12-F7636 301 A C C C C C U A G T T T G I C C Y A A T C 391
F 97.10.01-F7637 301 C C T T C C C U A G T C T G C C C C G T A A C 391
G 98.02.24-F7638 301 G A C T T T G A A Y T C R C A T C A A 391
H 97.12.01-F7639 301 C T T C G Y A C T C C G C C R A Y 391
I 98.04.22-F7640 301 T A C T T T C G A G T C C G R C A A G A C C C 391
AT 97.05.16-F5980 301 R C T T G T A C G A T A C T G G C A A G C C * 391
 ***** ** ** *

EnV1の系統樹

[GENETYX: Evolutionary tree]

Date . 1998 11 15

Method UPGMA



NS5の塩基配列

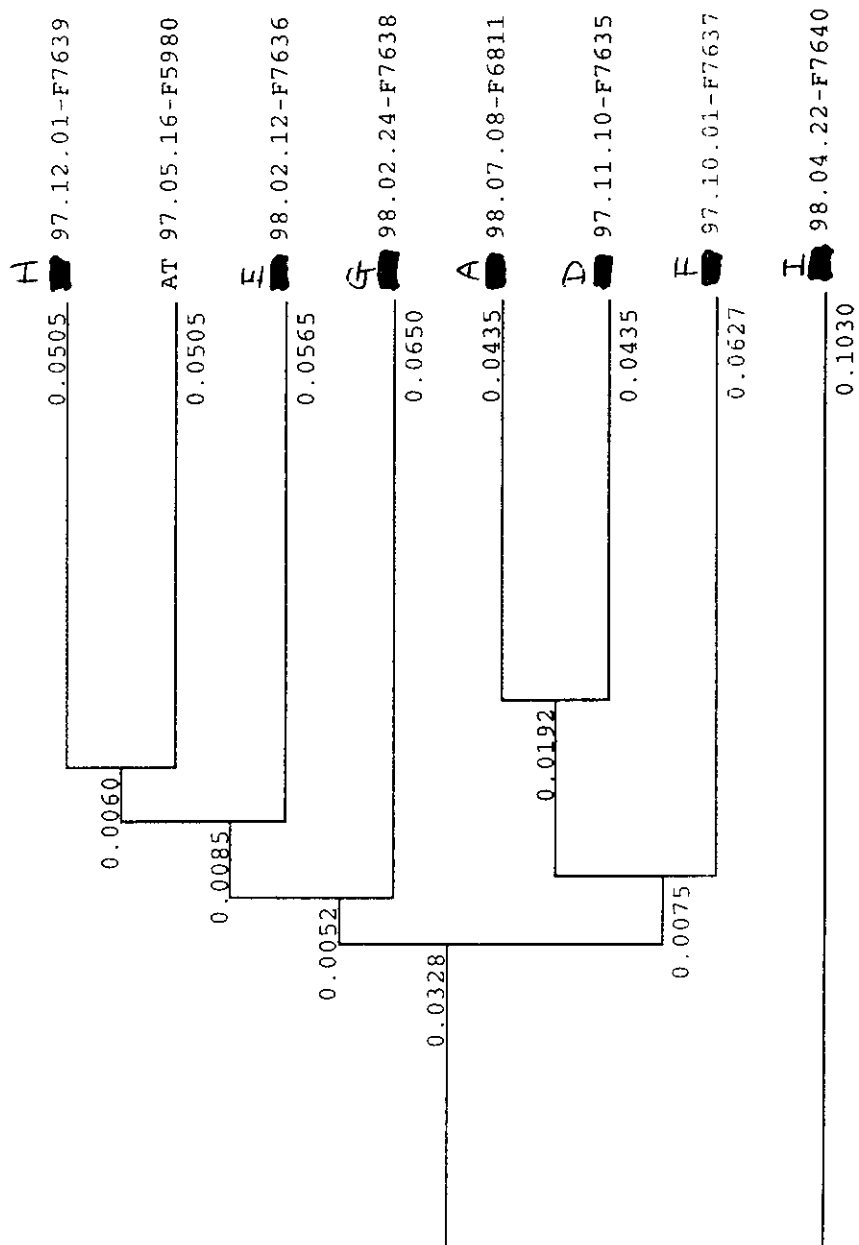
A	98 07 08 F6811	1	TGCGCGAGCCGCTGCCCCCTTTGGCCAGCTCTTCAGCTAGTCACTGGCCCTCCCTTGAAGGCAACATGCCACTGCCCGGTCACGACTCCCCAGA	100
D	97 11 10-F7635	1T.....G.....G.....A.....A.....T.....G.....T.....	100
E	98 02 12-F7636	1C.....C.....C.....G.....G.....A.....A.....T.....G.....T.....	100
F	97 10 01-F7637	1C.....C.....C.....G.....G.....A.....A.....T.....G.....T.....	100
G	98.02 24-F7638	1CC.....Y.....C.....CT.....C.....G.....A.....A.....TIICG.....G.....	100
H	97.12 01-F7639	1C.....C.....C.....T.....CT.....G.....G.....A.....AC.....T.....G.....	100
I	98.04 22-F7640	1CC.....T.....C.....AG.....T.....T.....GG.....T.....ACASS.....K.....T.....G.....	100
AT	97 05 16-F5980	1G.....C.....A.....C.....CT.....G.....G.....A.....AC.....T.....R.....	100
*****				*****
A	98 07 08-F6811	101	CGTUGACCCTATCGAGCCCACTCCTGTGGCCAGGAGATGGGCGGGACATCACCCGGTGGAGTCAAGAGATAAGGTAGTANITCTGGACTCTTTC	200
D	97 11 10-F7635	101T.....C.....C.....G.....G.....R.....C.....	200
E	98.02 12-F7636	101C.....C.....C.....G.....G.....G.....C.....A.....	200
F	97 10 01-F7637	101C.....C.....C.....G.....G.....G.....C.....A.....	200
G	98.02.24-F7638	101Y.....T.....A.....A.....A.....A.....G.....G.....	200
H	97 12.01-F7639	101C.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....G.....	200
I	98 04 22-F7640	101G.....Y.....AS.A.....G.....SK.....A.....C.....G.....W.....	200
AT	97 05 16-F5980	101T.....T.....A.....A.....T.....T.....C.....C.....	200
*****				*****
A	98 07 08-F6811	201	GATCCCGCTTCGAGCCGAGGAGATGAGACGGAANANITCCGTTG	243
D	97 11.10-F7635	201T.....MAGC.....C.A.....G.....C.....	243
E	98 02 12-F7636	201ATTC.....C.....	243
F	97.10 01-F7637	201G.....C.....MA.....CC.....	243
G	98 02.24-F7638	201T.....C.....G.....C.....C.....	243
H	97.12 01-F7639	201C.....C.....G.....G.....G.....C.....	243
I	98.04 22-F7640	201A.....C.....AC.....T.....G.N.....	243
AT	97 05 16-F5980	201AC.....T.....G.N.....	243
*****				*****

NS5の系統樹

[GENETYX: Evolutionary tree]

Date . 1998 11.15

Method. UPGMA



資料15

98.01.08-F6873
ドナー

推定ハプロタイプ DRB1*0901--DQB1*0303, DRB1*0803--DQB1*0601

写真5. DRグループ型判定
(DR8/9)

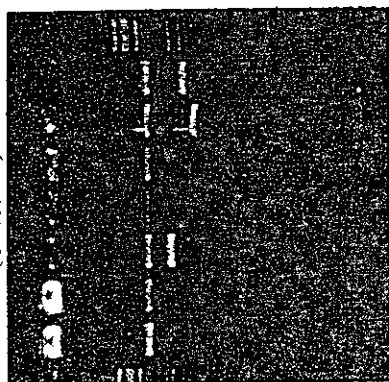


写真6. DR3,5,6,8解析
(DRB1*0803)

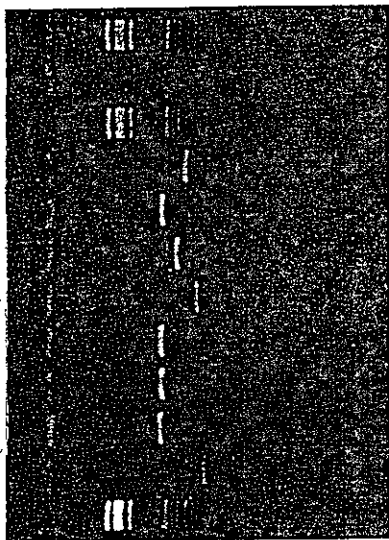
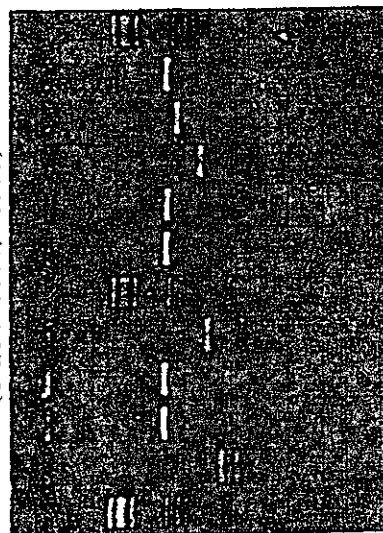


写真4 DQB1解析
(DQB1*0601/0303)



資料16

98.07.08-F6812
A

推定ハプロタイプ DRB1*1501-DQB1*0602, DRB1*1201-DQB1*0301

写真1. DRグループ型判定
(DR 2 / 12)

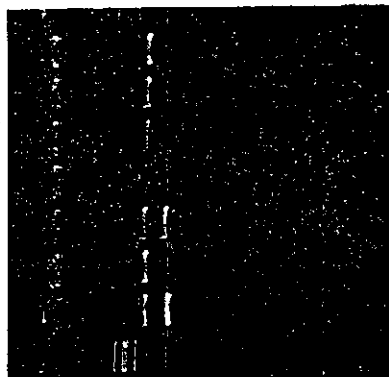


写真2. DR2解析
(DRB1*1501)



写真3. DR3,5,6,8解析
(DRB1*1201)

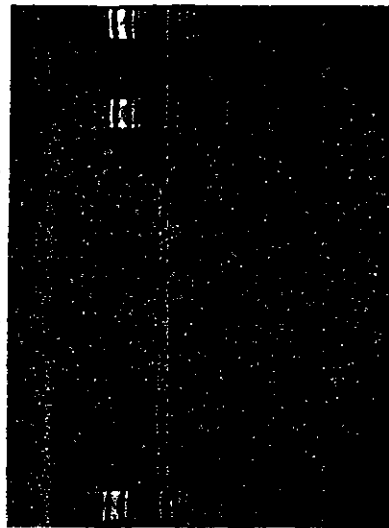


写真4. DQB1解析
(DQB1*0602 / 0301)



(財) 骨髄移植推進財団 殿

骨髄移植ドナーのC型肝炎ウイルス感染経路に関する調査報告書 (No2)

1999年1月29日

聖マリアンナ医科大学 内科学・臨床検査医学

HR I

日野 邦彦 

前回（1998年11月16日報告書提出）に引き続き骨髄移植ドナーがC型急性肝炎に罹患した原因（感染経路）についての調査報告を申し上げます。

1. 対象検体

前回の検体に加えて1998年11月24日新たに^{ドナー}さんの血清を15検体受領しました（1998年3月5日、同3月11日、同3月13日、同3月18日、同3月27日、同3月31日、同4月3日、同4月7日、同4月14日、同4月21日、同4月24日、同4月27日、同4月30日、同5月2日、同5月7日）。

2. 方法

前回同様5' UTR、NS5A領域および新たにenvelop (EnV) 7とEnV10についてnested RT-PCRを行いました（Primer表1参照）。

3. 成績

1) ^{ドナー}さんの検体は1998年3月5日の検体が5' UTR、EnV7、EnV10、NS5Aいずれの領域ともPCR陽性で、1998年3月17日の検体がNS5A領域を除く全ての領域で陽性となりました（写真1～4）。したがって、これらの領域をさらにSequence Primerを用いて塩基の解析を行いました。

2) 対照は誤輸血が疑われた^Aさん、^{ドナー}さんと同時期に入院していた9例のC型肝炎患者さん（^B、^C、^D、^E、^F、^G、^H、^I、^Jの各氏）およびHRIのC型肝炎患者さん3例（TT、AT、STの各氏）、健常人STさんの計14検体について同様の検討を行いました。ただし、^Bさん、^Cさん、TTさんはGenotype2aであったため、明らかに^{ドナー}さん（Genotype1b）と異なるためEnV7、EnV10、NS5AのSequenceの比較は行いませんでした（表2、図1～8）。なお、^Jさんと健常人のSTさんはいずれの領域もPCR（-）でした。

3) Homologyの比較は文献的に全塩基配列が報告されているGenotype1bの3症例（HC-J4-91、HCV-BK.HPCHUMR、HCV-J.HPCJCG）を加えて検討しました。

^{ドナー}さんの1998年3月5日と1998年3月17日の検体は5' UTR、EnV7、EnV10とも塩基のHomologyは100%一致でした。そこで、^{ドナー}さんの各Sequence結果を100%として比較を行いました（表3）。

被検血清の5' UTRのHomologyは93.8%～100%でした。EnV7は91.5%～100%でした。EnV10は83.0%～99.3%でした。NS5Aは84.0%～92.2%でした。検体によって各領域のHomologyは異なっていましたが、いずれの領域も^Dさんは^{ドナー}さんの塩基

と相同性が高い結果でした。

4. 結論

^{ドナー} ████████さんのHCVの一部のSequence結果は^D ████████さんと相同性が高い結果が得られましたが、当然のことながらHomologyのみでは感染源と断定することはできません。他の要因など総合的な調査が必要と考えられます。