

## 感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究

所 属 パルマビーズ研究所  
研究者 薄井 貢

### 分担研究者

- (1) 国立感染症研究所感染病理部 阿部賢治
- (2) 東京大学大学院医学研究科 牛島廣治

### 要旨

感染症領域における新しい遺伝子診断技術として、特異的に自己集合する一対の DNA プローブ（以下、Honey Comb Probe:HCP）を応用し、感染症の診断に適した新しい検出系を確立した。また、臨床検体における HCP の有用性を確認した。

### 1. 研究目的

我々は、従来の DNA ポリメラーゼ反応を基盤とした PCR 法とは全く異なる核酸増幅法（シグナル増幅法）を応用した新しい遺伝子診断システムを開発した。この核酸増幅法は、サーマルサイクラーや酵素を必要とせず 2 本の DNA プローブだけで目的とする遺伝子のシグナルを増幅して検出する画期的な方法（本技術）である。本研究では、本技術のシグナル増幅に必要な特異的に自己集合する一対の HCP をデザインし、感染症特異的に自己集合する一対の HCP を用いて、感染症領域における原因微生物の遺伝子診断の確立とポイント・オブ・ケア・テクノロジー（以下、POCT）としてのシステム開発を目的に研究を行なった。診断の対象は迅速な診断が必要とされる MRSA、結核菌、血液媒介性の肝炎ウイルス、HIV および下痢症ウイルスとした。

### 2. 研究方法

#### (1) 本研究に用いた HCP のデザインと自己集合反応

3 つの領域からなる互い違いに相補的な配列をもつ一対の HCP を作製した。この HCP は、中央の領域は相補的な配列であるが、その両側の領域はそれぞれ相補鎖が反対になるようにデザインされている。3 つの領域はそれぞれ相補的な配列を持つため、反応温度に依存した自己集合反応（以下、Probe alternation link self-assembly reaction : PALSAR 法）により特異的に増幅して高分子な自己集合体を形成することが可能である。

#### (2) PALSAR 法に適した HCP のデザインに関する研究

PALSAR 法の反応効率を向上させるために、一対の HCP が互い違いに交差してハイブリダイゼーションする時の分岐点における塩基配列の必要条件について研究した。

#### (3) HCP を用いた PALSAR 法による検出の応用

①HBV DNA を目的遺伝子とし、HCP のデザインを試みた。次にターゲットとして HBV の遺伝子と同じ配列をもつオリゴヌクレオチドを作製し、HCP による HBV DNA 検出の基礎とした。また、HBV 感染者における HBV ゲノタイプを同定することは、臨床上、または感染経路を推察する上で重要である。現在ゲノタイプ同定には複雑な手段が必要であり、大量の臨床検体解析には適していない。そこで HCP を用いてより簡便で高感度な HBV ゲノタイプピング法の開発を目標に、基礎検討として PCR 法による診断系の確立を試みた。

②下痢症ウイルスはいまだ発展途上国における乳幼児死亡の主要な原因であり、早期診断が切望されている。また下痢症ウイルスの疫学を知ることは遺伝子診断において重要であり、迅速、低コスト、高感度、簡便な遺伝子診断システムの構築が望まれている。本研究では、RNA 型遺伝子であるノロウ

イルス (NV) を対象に RT-PCR 法により増幅を行った検体について、ライゲーションを用いた HCP による NV の検出を行い、特異性と検出感度の向上、簡便化を検討した。

#### (4) HCP を用いたライゲーション反応による目的遺伝子の検出

HCP はその中央領域が切断されていた場合、反応温度にかかわらず PALSAR 法による自己集合体の形成は認められない。本研究ではこの HCP の性質を利用して新しい遺伝子診断技術の開発を検討した。目的遺伝子と相補的な塩基配列を有する HCP の 1 箇所を切断した HCP を作製し、この切断された HCP を目的遺伝子とハイブリダイゼーションさせ、耐熱性リガーゼ酵素を用いてライゲーション反応を行い 1 本に連結させた後、自己集合反応により高分子産物を形成させた。目的遺伝子が存在しない場合は、ライゲーション反応により HCP の連結が行なわれないため HCP は切断されたままであり、自己集合による高分子産物の形成は確認されないことから、この性質を利用して新しい遺伝子診断技術の開発を試みた。

##### MRSA の検出

MRSA の PBP 遺伝子を対象として HCP のライゲーションによる検出を行った。さらに、検出の特異性を向上させるための検討も行った。

##### ① HCP のライゲーションによる検出

中央の領域を切断した HCP とリガーゼにより、MRSA の PBP 遺伝子の検出を行った。

##### ② ライゲーションによる検出に適した HCP の探索

検出効率を向上させるために、HCP による自己集合体の形成効率の高い HCP を探索した。これまで使用していた HCP の MRSA の PBP 遺伝子と相補性のある HCP の 3 つの領域のうち中央の領域を 1 塩基ずつ移動させて HCP を作成し、一定温度で加温することにより自己集合体を形成させた後アガロースゲル電気泳動で検出、比較検討した。

##### ③ ライゲーション反応の効率

ライゲーション反応で用いるリガーゼ酵素による非特異的な反応を回避するために、HCP の末端を修飾したプローブをデザインした。基礎検討として、修飾 HCP の自己集合体の形成をアガロースゲル電気泳動で確認した。

#### (5) POCT を考慮した核酸抽出

POCT を考慮した PALSAR 法の検出システムに適した、検体からの核酸の抽出方法の探索を開始した。

### 3. 研究成果

#### (1) HCP のデザインと自己集合反応

HCP と検出用に中央の領域を切断した HCP をデザインした。至適温度で反応させると、HCP は特徴的な自己集合体を形成するが、検出用にデザインした中央の領域が切断された HCP は、特徴的な自己集合体の形成が見られなかった。

#### (2) PALSAR 法に適した HCP のデザインに関する研究

互い違いに交差してハイブリダイゼーションする時の分岐点における塩基配列を G(グアニン)と C(シトシン)にデザインした HCP は、最も効率良く自己集合反応が行われ、他の塩基に比べ低い温度、短時間、低プローブ濃度でも効率的に自己集合体を形成することが確認された。

#### (3) HCP を用いた PALSAR 法による検出の応用

##### ① HBV

HBV DNA を目的遺伝子とし、HBV の S gene, X gene から HCP をデザインした。S gene は保存安定性が高いことから、X gene は、高い検出感度を得られることからこの領域を選択した。さらに、HCP を用いたゲノタイピング法の基礎検討として、PCR 法による高感度な HBV ゲノタイピング法を開発を検討した。ゲノタイプ特有の PCR プライマーをデザインするために、データベース由来の HBV 株と世界 13 カ国から独自に収集した HBV 陽性患者血清 100 例をもとにゲノタイプを同定して multi-alignment を作製、各ゲノタイプ間で保存された塩基配列の探索を行った。HBV ゲノタイプ A~F 株の multi-alignment から各ゲノタイプ特異的な配列が確認され、この特異的配列をもとに PCR プ

ライマーをデザインし、nested-PCR法により各国由来のHBV感染血清1168検体のゲノタイプ解析を行った。また、40例についてこのPCRゲノタイプング成績と分子系統樹の結果を比較したところ、両者は完全に一致し特異性が確認された。

## ② NV

RNA型遺伝子であるノロウイルス(NV)を対象にRT-PCR法により増幅を行いHCPのライゲーションによる検出を行った。ロタウイルス陰性下痢症患者由来の水様便78検体についてNVのスクリーニングを行い、29検体のNV陽性の検体が得られた。さらにそのNV陽性検体について希釈限界試験を行ったところ、各検体ともに10~1000倍希釈までシングルPCRによるNV RNAの検出が確認された。この検体について特異性と検出感度を向上させる目的でHCPを作製し、ライゲーションを用いたNV RNAの検出を検討している。

## (4)HCPを用いたライゲーション反応による目的遺伝子の検出

### MRSAの検出

#### ①HCPのライゲーションによる検出

中央の領域を切断したHCPとリガーゼにより、MRSAのPBP遺伝子の検出を行い、目的遺伝子であるPBP遺伝子があるときのみ、HCP特有の自己集合体の形成が確認された。

#### ②ライゲーションによる検出に適したHCPの探索

HCPの自己集合体形成効率の高いHCPを探索したところ、これまで使用していたHCPに比較して自己集合体形成効率が高いHCPが得られた。

#### ③ライゲーション反応の効率

HCPの末端を修飾したプローブをデザインし、修飾HCPの自己集合体の形成をアガロースゲル電気泳動で確認したところ、5'側、3'側の修飾によっては、立体障害がおり自己集合体の形成が阻害された。また、修飾したHCPのうちRNAを付加したキメラHCPと基本HCP(未修飾)を用いて、LCR反応(EP0439182)を行い比較検討した。RNAを付加したキメラHCPでも、目的遺伝子の検出が確認された。未修飾HCPに比べて10倍高い検出感度であった。

## (5)POCTを考慮した核酸抽出

POCTを考慮したPALSAR法の検出システムを構築するために、選出された分離膜のうち米国C社が現在開発中の簡易核酸抽出システムを検討した結果、血球(リンパ球)および細菌等からの核酸抽出には適していたが、血清中のウイルスの核酸抽出では、膜(メンブレンフィルター)を通過してしまい抽出が困難であった。また、血漿分離用に開発されたろ紙を主成分とする分離膜を用いた核酸抽出実験では、ウイルスの補足が困難であった。

以上の成績から今年度は、チューブ内壁にあらかじめターゲット遺伝子を補足するプローブを固定化させたXtraAmp(ジーエルサイエンス社)を使ってその有用性を検討する。

## 4. 考察・まとめ

HCPのデザインは、3つの領域が互い違いに相補的となるような配列をもつプローブ対から形成され、反応温度に依存した自己集合反応(PALSAR法)により特異的に増幅して高分子な自己集合体を形成することが可能である。

本技術を応用した遺伝子診断技術の開発は、従来の遺伝子増幅法とは異なり特殊な装置を必要とせず、一定温度で完了し、しかも酵素等を用いないためコストを低く抑えることができる。また、阻害物質の影響を受けにくいと考える。

本研究では、このHCPを用いてライゲーション反応を応用した検出方法と組み合わせて、迅速な診断が必要とされるMRSA、結核菌、血液媒介性の肝炎ウイルス、HIV、下痢症ウイルスを対象に臨床診断上有用性の高い病原遺伝子の探索、HCPの基礎検討、検出系の確立を行なっている。

HBVを対象とした検討では、6つの異なる各ゲノタイプ特異的なプライマーをデザインし、PCR法による簡便で迅速、高感度なHBVゲノタイプング法を開発することができた。この方法を多数の臨床検体に応用した結果、その有用性が確認された。今後はこの成果を用いて、型特異的なHCPのデザイン

を行い、PALSAR 法による特異性と簡便性にすぐれた HBV ゲノタイピング法の確立を目指したい。

NV を対象とした検討では、増幅を行った検体を用いて HCP による特異性向上と NV 検出の簡便化の基礎検討をおこなっている。この成果は、RNA ウイルスをターゲットとした今後の展開に期待ができると考える。

また、HCP のデザインにおける基礎検討は、より反応効率を高めた HCP のデザインに成功し、以後各遺伝子に対応した HCP の作製に貢献した。

さらに、HCP を用いたライゲーション反応による目的遺伝子の検出では、ライゲーションによる反応産物の確認と検出に適した HCP が検討され実験系の構築が進められた。今後、検出系の確立にともない、HCP の自己集合体を粒子として捕らえる検出方法も考慮したい。核酸抽出に関しても、PALSAR 法に適した核酸抽出方法の選出を急ぎたい。

PALSAR 法は操作性がシンプルであることから、POCT として携帯性に優れた遺伝子診断システムの開発が可能である。この HCP を用いて感染症領域における原因微生物の簡便な遺伝子診断技術を確立し、同時に POCT としてのシステム開発も進め、将来的には、発展途上国における遺伝子診断技術の普及にも貢献したいと考える。

## 5. 研究発表

- 1) Minako Hijikata, Kenji Abe, Khin Maung Win, Yohko Shimizu, Naoto Keicho and Hiroshi Yoshikura: Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 54: 244-245, 2001
- 2) William Ampofo, Nicholas Nii-Trebi, Justina Ansah, Kenji Abe, Hideo Naito, Simeon Aidoo, Victor Nuvor, James Brandful, Naoki Yamamoto, David Ofori-Adjei and Koichi Ishikawa: Prevalence of blood-borne infectious diseases in blood donors in Ghana. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 3523-3525: 2002
- 3) Kenji Ito, Takumi Kajiura and Kenji Abe: Effect of ethanol on antigenicity of hepatitis B virus envelope proteins. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 55: 117-121, 2002
- 4) Yi Jin, Kenji Abe, Yuko Sato, Kiyoshi Aita, Hiroshi Irie, Junji Shiga: Hepatitis B and C virus infection and p53 mutations in human hepatocellular carcinoma in Harbin, Heilongjian Province, China. *Hepatology Research* 24: 379-384, 2002
- 5) Morio Mikuni, Mitsuhiro Moriyama, Naohide Tanaka, Kenji Abe, Yasuyuki Arakawa: SEN virus infection does not affect the progression of non-A to -E liver disease. *Journal of Medical Virology* 67: 624-629, 2002
- 6) Yoko Iwaki, Naoto Aiba, Huy Thien Tuan Tran, Xin Ding, Shigeki Hayashi, Yasuyuki Arakawa, Tetsutaro Sata and Kenji Abe: Simian TT virus (s-TTV) infection in patients with liver diseases. *Hepatology Research* (in press)
- 7) Makoto Hirano, Xin Ding, Huy TT Tran, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, Tetsutaro Sata, Shin Nakamura and Kenji Abe: Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various non-human primates- evidence of widespread infection among Japanese monkeys. *Japanese Journal of Infectious Diseases* (in press)
- 8) 阿部賢治:「新世紀の感染症学(上)」. TT ウイルス感染症. *日本臨床* 61 巻 増刊号 2, 254-260, 2003
- 9) Wang QH, Kakizawa J, Wen L, Simizu M, Nishio O, Fang Z, Ushijima H. Genetic Analysis of the Capsid Region of Astroviruses. *J Med Virol* 64:245-255, 2001.
- 10) Jonassen CM, Jonassen TO, Saif YM, Snodgrass DR, Ushijima H, Shimizu M, Grinde B. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J Gen Virol*. 82:1061-1067, 2001.
- 11) Adhikary AK, Numaga J, Kaburaki T, Kawashima H, Kato S, Araiike M, Miyata K, Simizu H, Suzuki E, Yagyu F, Ushijima H. Rapid detection and typing of oculopathogenic strain of subgenus D adenoviruses by fiber based PCR and restriction enzyme analysis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 42(9):2010-2015, 2001.
- 12) Kudo S, Zhou Y, Cao XR, Yamanishi S, Nakaya S, Ushijima H. Molecular characterization in the VP7, VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 4 (G4) isolated in Japan and Kenya. *Microbiol Immunol* 45(2):167-171, 2001.

- 13) Zhou Y, Supawadee J, Khawan C, Tonusin S, Peerakome S, Kim B, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Akatani K, Maneekarn N, Ushijima H. Characterization of human rotavirus serotype G9 isolated in Japan and Thailand 1995 to 1997. J Med Virol 65:619-628, 2001.
- 14) Yagyu F, Ikeda Y, Sugiura W, Wongkhomthong SA, Masuda M, Ushijima H. Differentiation of serotypes B and E of human immunodeficiency virus type 1 by polymerase chain reaction using novel env gene primers. J Virol Methods 10:11-20, 2002.
- 15) 神野英毅、杜山理子、牛島廣治:新しいウイルス検査法 ウイルス感染症対策 Infection Control 10(3), 2001
- 16) 牛島廣治:母子保健統計、国際保健医療学 日本国際医療学会編:25-31, 2001 杏林書院  
中込治、中田修二、大石功、川本義尋、大瀬戸光明、栄賢司、武田直和、田中智之、牛島廣治:  
カリシウイルス科ウイルスの名称と使用方法についてのワーキンググループの提案 臨床とウイルス  
28(5):339-347, 2001
- 17) 牛島廣治:下痢症ウイルス研究の現状と最近の進歩 小児感染免疫 13(1):53-57, 2001
- 18) 西村修一、牛島廣治:ロタウイルス感染症、小児疾患の診断治療基準小児内科 33:338-339, 2001
- 19) 牛島廣治 新興・再興感染症. 周産期医学 32(7):991-994, 2002
- 20) 牛島廣治 ノーウオークウイルスの分子疫学 日本臨床 P. 1143-1147, 2002
- 21) 山崎英次、牛島廣治:ワクチンによる感染防御 小児内科 34:26-30, 2002
- 22) 牛島廣治:A群ロタウイルスの迅速診断、感染性胃腸炎 総合臨床 51(11):2954-2958, 2002
- 23) 牛島廣治:下痢症ウイルスによる脳症、ウイルス感染に伴う脳炎・脳症 臨床とウイルス、  
30(4):242-248, 2002
- 24) 沖津祥子、牛島廣治:ロタウイルス(予防) 小児科臨床 55(12):2363-2368, 2002
- 25) 牛島廣治 学校伝染病と対策 今日の治療指針 2003 P. 896-897 医学書院
- 26) 牛島廣治:ロタウイルス胃腸炎、新世紀の感染症学 61:156-161, 2003 日本臨床

6. 知的所有権の習得状況

なし