

表 17. 第 3 二次グループ内共通 degenerate primer

Primer Set ID	Forward Primer ID	Forward Primer Position	Forward Primer Sequence	Reverse Primer ID	Reverse Primer Position	Reverse Primer Sequence	PCR fragment size	Count of target templates
82	25	3683	ADRKHYMVDNTRAAAGGGGAA	108	4369	AYACWDYCYBYVCTGCCATC	680	44
72	163	3937	DARRGCHGCHTGTGGTGGGC	108	4369	ACACADTCABCVCCTGCCATC	430	44
81	208	3682	HADRKHYMVDNTAAAAGGGGA	108	4369	AYACWDYCYBYVCTGCCATC	680	43
70	163	3937	DARRGCHGCHTGTGGTGGGC	46	4371	CMACACADTCABCACCTGCCA	430	43
80	16	3684	DRKHYMRDNTRAAAGGGGAAG	108	4369	AYACWDYCYBYVCTGCCATC	680	43
80	163	3823	DARRGCHGCHTGTGGTGGGC	29	4451	TYCCYRNNTKYAGACCCCAA	620	42
69	163	4560	DAARGCDGCHTGTGGTGGGC	126	4838	TGTCYCTGWAAYAAACCCGAA	270	42
68	163	3826	DAARGCDGCHTGTGGTGGGC	183	4105	YTGTCYCTGWAATAAACCCGA	270	41
65	113	3977	GGDRWYYCCTAYAATCCCCAA	46	4371	CMACACADYCYACCTGCCA	390	40
66	113	3866	GGDRWYYCCTAYAATCCCCAA	108	4258	ACACADYCYVCCTGCCATC	390	40
61	139	3813	ARGCAGAAGTBATCCAGCAG	108	4369	ACACADYCYVCCTGCCATC	550	40
72	25	3860	ADRKHYMVRBTRAAAGGGGAA	126	4392	TGTCYCTGWAAYAAACCCGAA	530	40

表 18. GenBank から入手した HCV ウイルス塩基配列の一次グループ化(黄色で HCV ゲノム相当データを示す)

一次グループ番号	塩基配列件数	標準サイズ	GenBank 上の Annotation の例
113	7998	542	Hepatitis C virus subtype 1a isolate 44238-Lqz nonfunctional polyprotein gene partial sequence
32	1788	1518	Sequence 63 from Patent WO2005087813
66	1731	850	SID nucleic acids and polypeptides selected from a pathogenic strain of the hepatitis C virus and applications
83	1703	670	Hepatitis C virus strain D78 core protein gene partial cds
102	1350	594	Identification of amino acids in hepatitis C virus nonstructural protein NS3 involved in interaction with the p53 tumor suppressor and its use for medical development
70	1061	802	HCV non-structural region 4
84	922	652	cDNA encoding genes derived from hepatitis C virus
108	809	573	Hepatitis C virus clone TVC73D21 envelope glycoprotein (E2) gene partial cds
177	647	377	Hepatitis C virus isolate UDH253 NS5B gene partial cds
129	442	468	Hepatitis C virus core-E1 RNA for polyprotein partial cds clone: KK20203-14
227	428	278	Hepatitis C virus clone P6LBLc19 E2 protein gene partial cds
116	410	529	Hepatitis C virus isolate P1 clone A5887 polyprotein precursor gene partial cds
164	367	409	Hepatitis C virus subtype 1b clone Cu44 polyprotein gene partial cds
190	358	347	Hepatitis C virus isolate N47 from India core protein gene partial cds
103	332	581	Hepatitis C virus clone 5 polyprotein gene partial cds
182	317	372	Hepatitis C virus isolate 20024L9 E1 glycoprotein gene partial cds
216	311	289	Hepatitis C virus isolate SRB21 5 UTR
78	309	756	Sequence 67 from Patent WO2005087813
121	299	498	Hepatitis C virus isolate C clone 204 serine protease (NS3) gene partial cds
46	256	1179	Hepatitis C virus gene for NS5 partial cds isolate: SR037
2	235	9711	Hepatitis C virus genotype 2 complete genome
142	220	430	Hepatitis C virus isolate QC272 polyprotein gene partial cds
208	213	320	Hepatitis C virus isolate 0558-03 NS5B gene partial cds
207	183	321	Hepatitis C virus isolate 934-00 NS5B gene partial cds
21	173	2055	Hepatitis C virus partial mRNA for NS3/4A protein clone FR_HCVNS3/4A_3a-4NS_32
117	172	528	Hepatitis C virus isolate P2 clone E7800 polyprotein precursor gene partial cds
214	169	294	Hepatitis C virus isolate G2MP083 E2 gene partial cds
199	168	340	Hepatitis C virus isolate QC308 non-structural NS5B gene partial cds
201	162	340	Hepatitis C virus subtype 2a gene 5 noncoding region isolate: K-0041
90	160	642	Sequence 3 from Patent EP1845108
80	159	743	Hepatitis C virus genotype 1 partial gene for polyprotein genomic RNA isolate NG28T1 clone cn
39	157	1356	Hepatitis C virus partial gene for polyprotein (NS5A) genomic RNA isolate patient 3a-4NS_24
101	157	600	Hepatitis C virus non-structural protein 5 domain mRNA partial cds
60	154	946	Hepatitis C virus subtype 1b isolate PatS17-w12 non-structural 5b protein gene partial cds
133	148	447	Hepatitis C virus isolate MAD-O22698 nonstructural protein 5b (NS5B) gene partial cds
172	138	397	Hepatitis C virus isolate CC654C8 envelope protein gene partial cds
173	127	383	Hepatitis C virus isolate N104 from India RNA-dependent RNA polymerase gene partial cds
179	125	375	Hepatitis C virus isolate sy1 NS5b protein gene partial cds
131	122	461	Hepatitis C virus subtype 1a gene for polyprotein (NS5B region) partial cds isolate: tv134

218	122	289	Hepatitis C virus isolate AV3 polyprotein gene partial cds
1	121	11062	HCV VARIANTS
128	119	473	Hepatitis C virus subtype 3a isolate 51775 polyprotein gene partial cds
114	118	533	Hepatitis C virus gene for envelope protein E 1
160	116	419	Hepatitis C virus isolate DON39 NS5B protein (NS5B) gene partial cds
104	104	580	Hepatitis C virus isolate BE02-14-1860 nonfunctional non-structural protein 4b (NS4b) gene partial sequence
110	103	543	Hepatitis C virus subtype 1b gene for polyprotein (NS5B region) partial cds isolate: TV112
3	100	9456	Hepatitis C virus genotype 3 genome
107	97	575	Hepatitis C virus isolate RSA04-55 nonfunctional polyprotein due to mutation genomic sequence
24	93	1899	Vaccine against HCV
109	89	568	Hepatitis C virus subtype 6e gene for polyprotein partial cds isolate: TV366
4	87	9450	Hepatitis C virus subtype 6m isolate C-0208 complete genome
125	86	477	Primer set for detection of HCV
178	85	377	Hepatitis C virus isolate CRM092 NS5B gene partial cds
19	84	2304	cDNA encoding genes derived from hepatitis C virus
169	76	402	Hepatitis C virus isolate G2MP143 NS5B (NS5B) gene partial cds
8	75	7855	Hepatitis C virus isolate TN168-1del polyprotein gene partial cds
126	73	474	Hepatitis C virus strain SZ206 polyprotein gene partial cds
137	72	438	Hepatitis C virus subtype 1b gene for polyprotein (Core/E1 region) partial cs isolate: TAJ81
22	69	2055	Hepatitis C virus subtype 2b isolate cs8 NS3/4a protease gene partial cds
180	68	375	Hepatitis C virus isolate gb9 NS5b protein gene partial cds
167	64	403	Hepatitis C virus isolate RSA-20-94 NS5B (NS5B) gene partial cds
123	54	495	Hepatitis C virus subtype 1b strain 1b57 nonstructural protein 5A (NS5A) gene partial cds
143	54	428	Hepatitis C virus isolate C-0185 clone 20 polyprotein gene partial cds
132	53	460	Hepatitis C virus subtype 6o gene for polyprotein (NS5B region) partial cds isolate: TV48
146	51	424	Hepatitis C virus isolate QC334 polyprotein gene partial cds
151	50	424	Hepatitis C virus isolate QC308 polyprotein gene partial cds
174	49	380	Hepatitis C virus isolate 18 envelope mRNA partial cds
88	47	648	Hepatitis C virus isolate N-IT19-SR NS5A gene partial cds
68	46	818	cDNA encoding genes derived from hepatitis C virus
112	46	543	Hepatitis C virus clone 19_1166 NS3 protease gene partial cds
120	46	500	Hepatitis C virus subtype 2a gene for polyprotein (NS5B region) partial cds isolate: TV63
111	45	543	Hepatitis C virus clone 22_1156 NS3 protease gene partial cds
171	45	400	Hepatitis C virus isolate HCV5UTRMG10 polyprotein gene partial cds
5	44	9400	Hepatitis C virus subtype 1b complete genome
11	42	5955	Hepatitis C virus partial gene for polyprotein genomic RNA isolate Taiwanese
62	42	932	polyprotein [hepatitis C virus HCV Genomic RNA 932 nt]
130	42	465	Hepatitis C virus subtype 6a isolate 51048 polyprotein gene partial cds
170	41	401	Hepatitis C virus isolate C-0046 clone 21 polyprotein gene partial cds
25	38	1830	Hepatitis C virus polyprotein mRNA partial cds
30	36	1611	Hepatitis C virus isolate JV115 nonfunctional polyprotein gene partial sequence
82	36	673	DNA encoding hepatitis C virus antigenic peptide
187	36	356	Hepatitis C virus envelope and non-structural protein hypervariable region (E1-E2/NS1) gene partial cds
192	34	346	Hepatitis C virus isolate 23 envelope mRNA partial cds
196	33	342	Hepatitis C virus partial NS5A gene for non structural protein 5A isolate NR11
206	31	324	Hepatitis C virus gene for polyprotein partial cds strain: KM95_E2_12

23	29	1950	Hepatitis C virus subtype 1b clone Cu-1 polyprotein gene partial cds
26	29	1818	cDNA encoding genes derived from hepatitis C virus
158	27	420	DNA encoding hepatitis C virus antigenic peptide
51	25	1110	Sequence 29 from Patent EP1555270
36	24	1404	Hepatitis C virus isolate Pt20 polyprotein gene partial cds
7	22	8024	Hepatitis C virus replicon pSGR-JFH1 gene for neomycin resistance gene product hepatitis C virus nonstructural protein complete cds
81	22	715	Hepatitis C virus subtype 5a partial gene for polyprotein genomic RNA isolate FrCF123
181	22	372	Hepatitis C virus isolate 20024P7 E1 glycoprotein gene partial cds
118	21	513	Hepatitis C virus subtype 6a strain 6a45 NS5A protein (NS5A) gene partial cds
220	21	288	Hepatitis C virus isolate G2MP140 E2 gene partial cds
138	20	438	Hepatitis C virus subtype 2c gene for polyprotein (Core/E1 region) partial cs isolate: TAJ74
224	20	282	Hepatitis C virus 11/40 polyprotein gene partial cds
135	19	441	E2/NS1=large envelope glycoprotein {patient D} [hepatitis C virus HCV mRNA Partial 441 nt]
99	17	618	Sequence 22 from Patent WO2006134280
203	17	340	Hepatitis C virus isolate RSA02-12 non-structural protein 5b (NS5b) gene partial cds
159	16	419	Hepatitis C virus isolate DON51 NS5B protein (NS5B) gene partial cds
33	15	1504	HCV truncated genome RNA
63	15	921	cDNA encoding genes derived from hepatitis C virus
195	15	342	Hepatitis C virus strain D82 NS5b protein gene partial cds
209	15	318	Hepatitis C virus isolate G2MP041 NS5B (NS5B) gene partial cds
57	14	974	cDNA encoding genes derived from hepatitis C virus
94	14	630	cDNA sequence derived from hepatitis virus
231	14	272	Hepatitis C virus strain 1870-04 NS5B gene partial cds
17	13	2552	Hepatitis C virus gene for structural protein partial cds isolate: HC-J7
31	12	1588	Hepatitis C virus strain D54 deletion mutant polyprotein gene partial cds
67	12	849	cDNA encoding genes derived from hepatitis C virus
69	11	807	cDNA sequence derived from hepatitis C virus
13	10	4129	Hepatitis C virus genotype 2 gene for polyprotein partial cds
43	10	1230	Purified Active HCV NS2/3 Protease
53	10	1084	METHODS FOR THE SIMULTANEOUS DETECTION OF HCV ANTIGENS AND HCV ANTIBODIES
58	10	963	Hepatitis C virus strain QC125 polyprotein gene partial cds
134	10	441	E2/NS1=envelope glycoprotein [hepatitis C virus HCV agammaglobulinemic patient isolate Genomic RNA 441 nt]
20	9	2302	HCV truncated genome RNA
28	9	1683	Hepatitis C virus partial gene for polyprotein (E1/E2) genomic RNA isolate patient 3a-4NS
45	9	1197	Hepatitis C virus strain QC260 5 UTR; and polyprotein gene partial cds
232	9	271	Hepatitis C virus strain 239-01 NS5B gene partial cds
34	8	1431	cDNA encoding genes derived from hepatitis C virus
38	8	1398	DNA encoding the peptide that has HCV antigenic activity
41	8	1293	METHODS FOR THE SIMULTANEOUS DETECTION OF HCV ANTIGENS AND HCV ANTIBODIES
44	8	1227	Hepatitis C virus gene for NS5 protein partial cds isolate: HC-J7
48	8	1154	Hepatitis C virus gene for NS5 partial cds isolate: NE125
77	8	763	cDNA sequence derived from hepatitis virus
85	8	651	Hepatitis C virus partial gene for polyprotein (NS2) genomic RNA isolate patient 3a-4NS
140	8	436	Hepatitis C virus isolate QC310 polyprotein gene partial cds
145	8	424	Hepatitis C virus isolate 2213 polyprotein gene partial cds
86	7	651	Hepatitis C virus partial gene for polyprotein (NS2) genomic RNA isolate patient 1b-4

93	7	630	Sequence 29 from Patent EP1845108
95	7	629	cDNA encoding genes derived from hepatitis C virus
100	7	600	SID nucleic acids and polypeptides selected from a pathogenic strain of the hepatitis C virus and applications
139	7	436	Hepatitis C virus isolate P10-ACS-1985 NS5B protein gene partial cds
185	7	366	Hepatitis C virus isolate S1 non-structural protein 5A gene partial cds
188	7	351	Hepatitis C virus isolate MAD-G20206 from Madagascar envelope polyprotein E1/E2 gene partial cds
200	7	340	Hepatitis C virus strain QC69 non-structural protein NS5B gene partial cds
228	7	277	Hepatitis C virus clone P2PW72c3 E2 protein gene partial cds
61	6	945	Hepatitis C virus partial gene for polyprotein (NS4) genomic RNA isolate patient 3a-3NS
147	6	424	Hepatitis C virus isolate QC327 polyprotein gene partial cds
148	6	424	Hepatitis C virus isolate QC292 polyprotein gene partial cds
191	6	346	Hepatitis C virus isolate HCVNS2-HC9A99966 NS2 (NS2) gene partial cds
16	5	2591	cDNA encoding genes derived from hepatitis C virus
18	5	2433	Hepatitis C virus subtype 3a isolate Ch7 polyprotein gene partial cds
52	5	1084	cDNA encoding genes derived from hepatitis C virus
55	5	1011	Purified Active HCV NS2/3 Protease
91	5	641	cDNA sequence derived from hepatitis virus
97	5	623	cDNA to Hepatitis C virus genomic RNA
183	5	371	An Oligoribonucleotide and an Peptide Nucleic Acid Inhibiting the Action of Hepatitis C Virus
56	4	981	Improved Immunodiagnostic assays using reducing agents
124	4	489	cDNA sequence derived from hepatitis virus
156	4	424	Hepatitis C virus isolate QC78 polyprotein gene partial cds
193	4	345	Optimized Multi-epitope Constructs and Uses Thereof
197	4	340	Hepatitis C virus isolate QC287 non-structural NS5B gene partial cds
215	4	291	Hepatitis C virus isolate G2MP002 E2 gene partial cds
221	4	285	Hepatitis C virus subtype 1a gene for polyprotein (NS5B region) partial cds isolate: TV147
237	4	262	Hepatitis C virus isolate E2-2ac.156#2 polyprotein gene partial cds
10	3	6264	Nucleic acid and gene derived from new HCV strain and replicon-replicating cell using said gene
14	3	3610	Hepatitis C virus strain D88 polyprotein gene partial cds
27	3	1773	Hepatitis C virus genomic RNA modified to be self-replicable
37	3	1398	Hepatitis C virus strain HCVQ4 NSSA (NS5A) gene partial cds
42	3	1290	A nucleic acid construct comprising a full-length genome of human Hepatitis C virus a recombinant cell transfected with the same replicating the full-length virus genome and a process for producing human Hepatitis C virus particles
75	3	781	SID nucleic acids and polypeptides selected from a pathogenic strain of the hepatitis C virus and applications
89	3	645	Vaccine against HCV
136	3	439	An Oligoribonucleotide and an Peptide Nucleic Acid Inhibiting the Action of Hepatitis C Virus
149	3	424	Hepatitis C virus isolate QC269 polyprotein gene partial cds
165	3	408	Hepatitis C virus isolate 57 non-structural protein 5A gene partial cds
198	3	340	Hepatitis C virus isolate QC266 non-structural NS5B gene partial cds
213	3	296	Hepatitis C virus isolate 934 genotype 5 NS5B protein (NS5B) gene partial cds
226	3	279	Hepatitis C virus subtype 6n mRNA for core protein partial cds isolate: MYAN-C68
12	2	4296	cDNA encoding genes derived from hepatitis C virus
49	2	1143	DNA encoding Hepatitis C virus antigen
59	2	948	Optimized Multi-epitope Constructs and Uses Thereof
73	2	783	Hepatitis C virus type 3a partial polyprotein NS4B protein genomic RNA
74	2	783	Hepatitis C virus type 2b partial polyprotein NS4B protein genomic RNA

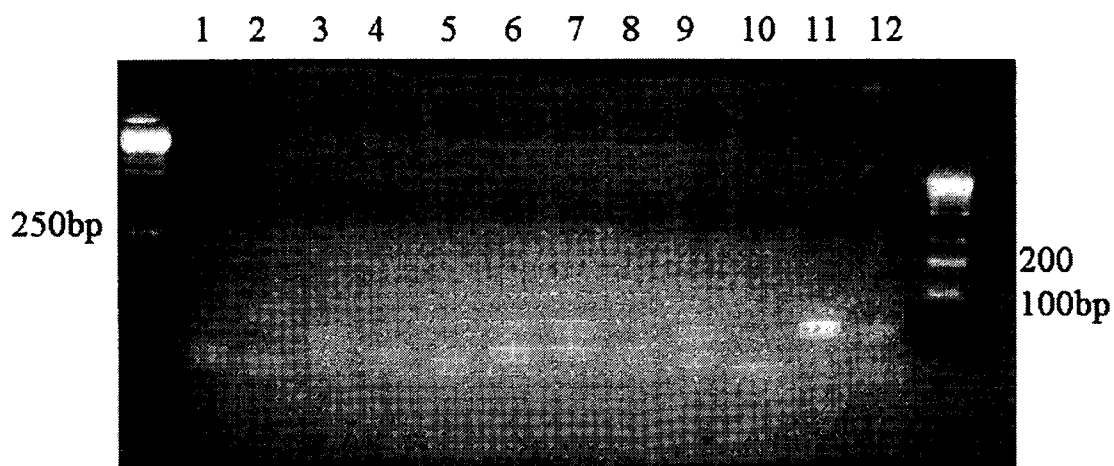
76	2	771	cDNA sequence derived from hepatitis virus
92	2	638	Hepatitis C virus isolate 16 NS5B gene partial cds
96	2	625	SID nucleic acids and polypeptides selected from a pathogenic strain of the hepatitis C virus and applications
98	2	621	Hepatitis C virus isolate ETR4 NS5A protein gene partial cds
119	2	503	cDNA encoding genes derived from hepatitis C virus
122	2	496	SID nucleic acids and polypeptides selected from a pathogenic strain of the hepatitis C virus and applications
127	2	474	Hepatitis C virus subtype 5a partial gene for polyprotein genomic RNA isolate FrCF085
144	2	427	Hepatitis C virus isolate QC153 polyprotein gene partial cds
153	2	424	Hepatitis C virus isolate QC200 polyprotein gene partial cds
155	2	424	Hepatitis C virus isolate QC275 polyprotein gene partial cds
166	2	407	{nonstructural region NS3} [hepatitis C virus HCV F1a isolate Genomic RNA 407 nt]
184	2	366	Hepatitis C virus NS5A gene partial cds strain: JaIFN1
189	2	348	Hepatitis C virus isolate UG-6 polyprotein gene core-E1 junction partial cds
194	2	344	Hepatitis C virus subtype 1a gene for polyprotein (NS5B region) partial cds isolate: VT387
205	2	337	SID nucleic acids and polypeptides selected from a pathogenic strain of the hepatitis C virus and applications
210	2	311	An Oligoribonucleotide and an Peptide Nucleic Acid Inhibiting the Action of Hepatitis C Virus
222	2	285	SID nucleic acids and polypeptides selected from a pathogenic strain of the hepatitis C virus and applications
230	2	273	NS3f3=immunodominant domain [hepatitis C virus HCV host=human mRNA Partial 273 nt]
241	2	255	Hepatitis C virus clone 20 5 UTR
6	1	9357	Hepatitis C virus isolate QC69 polyprotein gene complete cds
9	1	6710	Sequence 28 from Patent EP1555270
15	1	2748	DNA encoding novel proteinase that cleaves between the amino acids 1657 and 1658 of HCV protein
29	1	1664	DNA encoding Hepatitis C virus antigen
35	1	1426	cDNA sequence derived from hepatitis virus
40	1	1353	Hepatitis C virus strain HCV64 NS5A (NS5A) gene partial cds
47	1	1174	DNA encoding Hepatitis C virus antigen
50	1	1120	DNA encoding Hepatitis C virus antigen
54	1	1021	Hepatitis C virus genotype 3a NS5A gene partial cds
64	1	910	DNA encoding Hepatitis C virus antigen
65	1	852	DNA encoding Hepatitis C virus antigen
71	1	795	DNA encoding hepatitis C virus antigenic peptide
72	1	789	Optimized Multi-epitope Constructs and Uses Thereof
79	1	747	Optimized Multi-epitope Constructs and Uses Thereof
87	1	651	A nucleic acid construct comprising a full-length genome of human Hepatitis C virus a recombinant cell transfected with the same replicating the full-length virus genome and a process for producing human Hepatitis C virus particles
105	1	577	Hepatitis C virus isolate 2005TW11003 nonfunctional NS5B gene partial sequence
106	1	576	Hepatitis C virus gene for envelope protein partial cds isolate: ThKF34
115	1	531	SID nucleic acids and polypeptides selected from a pathogenic strain of the hepatitis C virus and applications
141	1	432	cDNA sequence derived from hepatitis virus
150	1	424	Hepatitis C virus isolate QC120 polyprotein gene partial cds
152	1	424	Hepatitis C virus isolate QC136 polyprotein gene partial cds
154	1	424	Hepatitis C virus isolate QC105 polyprotein gene partial cds
157	1	424	Hepatitis C virus strain QC107 polyprotein gene partial cds
161	1	417	Hepatitis C virus isolate sera polyprotein mRNA partial cds
162	1	414	Optimized Multi-epitope Constructs and Uses Thereof

表 19. HCV ゲノム塩基配列のサブグループ間を網羅する degenerate primer

PCR 産物の ゲノム上の 位置	Forward Primer 名	塩基配列	Reverse Primer 名	塩基配列	Size of Products
342 - 456	hev0802F16	TAGACCGTGCA YCATGAGCAC	hev0802R1	ACACCCAAYCTRGGGCCCTG	110
304 - 456	hev0802F11	GCCTGATAGGGYGCTTGC GAG	hev0802R1	ACACCCAAYCTRGGGCCCTG	150
310 - 456	hev0802F17	TAGGGYGCTTGC GAGTGCCCC	hev0802R1	ACACCCAAYCTRGGGCCCTG	140
314 - 456	hev0802F15	GYGCTTGC GAGTGCCCCGGGA	hev0802R1	ACACCCAAYCTRGGGCCCTG	140
150 - 303	hev0802F1	AGCCATAGTGGTCTKCGGAAC	hev0802R2	ACCTCCCGGGGCAC TCGCAAG	150
167 - 303	hev0802F10	GAACCGGTGAGTACACCGGAA	hev0802R2	ACCTCCCGGGGCAC TCGCAAG	130
156 - 303	hev0802F4	AGTGGTCTKCGGAACCGGTGA	hev0802R2	ACCTCCCGGGGCAC TCGCAAG	140
315 - 449	hev0802F18	YGCTTGC GAGTGCCCCGGGAG	hev0802R3	AYCTRGGGCCCTGCGGGCA	130
304 - 449	hev0802F11	GCCTGATAGGGYGCTTGC GAG	hev0802R3	AYCTRGGGCCCTGCGGGCA	140
342 - 449	hev0802F16	TAGACCGTGCA YCATGAGCAC	hev0802R3	AYCTRGGGCCCTGCGGGCA	100
316 - 449	hev0802F12	GCTTGC GAGTGCCCCGGGAGG	hev0802R3	AYCTRGGGCCCTGCGGGCA	130
314 - 449	hev0802F15	GYGCTTGC GAGTGCCCCGGGA	hev0802R3	AYCTRGGGCCCTGCGGGCA	130
131 - 262	hev0802F13	GGMCCCCCTCCCGGGAGAG	hev0802R4	CAAGGCCTTTCGCRACCCAAC	130
132 - 262	hev0802F14	GMCCCCCTCCCGGGAGAGC	hev0802R4	CAAGGCCTTTCGCRACCCAAC	130
167 - 262	hev0802F10	GAACCGGTGAGTACACCGGAA	hev0802R4	CAAGGCCTTTCGCRACCCAAC	90
142 - 262	hev0802F8	CCCGGGAGGCCATAGTGGTC	hev0802R4	CAAGGCCTTTCGCRACCCAAC	120
128 - 262	hev0802F7	CCAGMCCCCCTCCCGGGGA	hev0802R4	CAAGGCCTTTCGCRACCCAAC	130
129 - 262	hev0802F6	CAGMCCCCCTCCCGGGAG	hev0802R4	CAAGGCCTTTCGCRACCCAAC	130
110 - 262	hev0802F5	ATGAGTGTGTRCAGCCTCCA	hev0802R4	CAAGGCCTTTCGCRACCCAAC	150
156 - 262	hev0802F4	AGTGGTCTKCGGAACCGGTGA	hev0802R4	CAAGGCCTTTCGCRACCCAAC	100
130 - 262	hev0802F3	AGMCCCCCTCCCGGGAGA	hev0802R4	CAAGGCCTTTCGCRACCCAAC	130
304 - 452	hev0802F11	GCCTGATAGGGYGCTTGC GAG	hev0802R5	CCAAYCTRGGGCCCTGCGCG	140
342 - 452	hev0802F16	TAGACCGTGCA YCATGAGCAC	hev0802R5	CCAAYCTRGGGCCCTGCGCG	110
315 - 452	hev0802F18	YGCTTGC GAGTGCCCCGGGAG	hev0802R5	CCAAYCTRGGGCCCTGCGCG	130
310 - 452	hev0802F17	TAGGGYGCTTGC GAGTGCCCC	hev0802R5	CCAAYCTRGGGCCCTGCGCG	140
316 - 452	hev0802F12	GCTTGC GAGTGCCCCGGGAGG	hev0802R5	CCAAYCTRGGGCCCTGCGCG	130
314 - 452	hev0802F15	GYGCTTGC GAGTGCCCCGGGA	hev0802R5	CCAAYCTRGGGCCCTGCGCG	130
167 - 310	hev0802F10	GAACCGGTGAGTACACCGGAA	hev0802R6	CTACGAGACCTCCCGGGGCAC	140
342 - 474	hev0802F16	TAGACCGTGCA YCATGAGCAC	hev0802R7	GTYYTTCCKHGTGCGGCACA	130
315 - 474	hev0802F18	YGCTTGC GAGTGCCCCGGGAG	hev0802R7	GTYYTTCCKHGTGCGGCACA	150
316 - 474	hev0802F12	GCTTGC GAGTGCCCCGGGAGG	hev0802R7	GTYYTTCCKHGTGCGGCACA	150
342 - 475	hev0802F16	TAGACCGTGCA YCATGAGCAC	hev0802R9	RGTYTTCCKHGTGCGGCAC	130
316 - 475	hev0802F12	GCTTGC GAGTGCCCCGGGAGG	hev0802R9	RGTYTTCCKHGTGCGGCAC	150
167 - 309	hev0802F10	GAACCGGTGAGTACACCGGAA	hev0802R10	TACGAGACCTCCCGGGGCAC T	140
150 - 309	hev0802F1	AGCCATAGTGGTCTKCGGAAC	hev0802R10	TACGAGACCTCCCGGGGCAC T	150
156 - 309	hev0802F4	AGTGGTCTKCGGAACCGGTGA	hev0802R10	TACGAGACCTCCCGGGGCAC T	150
314 - 471	hev0802F15	GYGCTTGC GAGTGCCCCGGGA	hev0802R11	TTCKHGTGCGGCACACCC	150
316 - 471	hev0802F12	GCTTGC GAGTGCCCCGGGAGG	hev0802R11	TTCKHGTGCGGCACACCC	150
315 - 471	hev0802F18	YGCTTGC GAGTGCCCCGGGAG	hev0802R11	TTCKHGTGCGGCACACCC	150
342 - 471	hev0802F16	TAGACCGTGCA YCATGAGCAC	hev0802R11	TTCKHGTGCGGCACACCC	120
314 - 472	hev0802F15	GYGCTTGC GAGTGCCCCGGGA	hev0802R12	YTTCKHGTGCGGCACACC	150
342 - 472	hev0802F16	TAGACCGTGCA YCATGAGCAC	hev0802R12	YTTCKHGTGCGGCACACC	130
315 - 472	hev0802F18	YGCTTGC GAGTGCCCCGGGAG	hev0802R12	YTTCKHGTGCGGCACACC	150
316 - 472	hev0802F12	GCTTGC GAGTGCCCCGGGAGG	hev0802R12	YTTCKHGTGCGGCACACC	150

163	1	412	SID nucleic acids and polypeptides selected from a pathogenic strain of the hepatitis C virus and applications
168	1	403	Identification of eukaryotic Internal Ribosome Entry Site (IRES)-Elements
175	1	379	NS5 [hepatitis C virus HCV Chinese isolate Genomic RNA 379 nt]
176	1	377	Hepatitis C virus gene for NS4 protein partial sequence
186	1	365	Hepatitis C virus isolate NR1bNULL1 envelope glycoprotein (E2) gene partial cds
202	1	340	Hepatitis C virus subtype 6a gene for polyprotein (NS5B region) partial cds isolate: VT547
204	1	338	Hepatitis C virus isolate UG-4 polyprotein gene core-E1 junction partial cds
211	1	307	Meth1 and Meth2 Polynucleotides and Polypeptides
212	1	304	envelope protein {deletion mutant} [hepatitis C virus HCV LKM-8 isolate host=autoimmune hepatitis type 2 patient Genomic Mutant 304 nt]
217	1	289	Hepatitis C virus subtype 2i gene for polyprotein (NS5B region) partial cds isolate: VT172
219	1	289	SID nucleic acids and polypeptides selected from a pathogenic strain of the hepatitis C virus and applications
223	1	284	cDNA sequence derived from hepatitis virus
225	1	281	DNA encoding hepatitis C virus antigenic peptide
229	1	273	SID nucleic acids and polypeptides selected from a pathogenic strain of the hepatitis C virus and applications
233	1	271	Hepatitis C virus isolate P.PNB19 5 UTR
234	1	268	DNA encoding hepatitis C virus antigenic peptide
235	1	264	Hepatitis C virus partial truncated polyprotein gene E1 and E2 proteins genomic RNA isolate JB47-10
236	1	264	Optimized Multi-epitope Constructs and Uses Thereof
238	1	259	SID nucleic acids and polypeptides selected from a pathogenic strain of the hepatitis C virus and applications
239	1	258	Hepatitis C virus isolate UG-3 polyprotein gene NS5B region partial cds
240	1	255	Hepatitis C virus genotype RF1_2k/1b gene for polyprotein (NS2 region) partial cds isolate: UZ-IDU19

図 13. HCV ゲノム共通 degenerated primer による HCV cDNA 増幅



HCV ゲノム共通 degenerated primer による HCV ゲノムの増幅結果を示す。各レーンは、1 : hcv0802F1- hcv0802R1, 2 : hcv0802F2- hcv0802R2, 3 : hcv0802F3- hcv0802R3, 4 : hcv0802F4- hcv0802R4, 5 : hcv0802F5- hcv0802R5, 6 : hcv0802F6- hcv0802R6, 7 : hcv0802F7- hcv0802R7, 8 : hcv0802F8- hcv0802R8, 9 : hcv0802F9- hcv0802R9, 10 : hcv0802F10- hcv0802R10, 11: hcv0802F11- hcv0802R11 および 12: hcv0802F12- hcv0802R12 primer を用いた PCR 結果を示す。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急研究事業）
分担研究報告書

ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究（H19-肝炎一般-003）

研究課題：ウイルス遺伝子の非特異的増幅方法の確立

分担研究者： 水谷哲也 国立感染症研究所ウイルス第一部
協力研究者： 遠藤大二 酪農学園大学獣医学部
江下優樹 大分大学医学部
佐藤朝光 福岡大学医学部

研究要旨

血液検査において、複数のウイルス遺伝子を同時に非特異的に増幅することにより操作の簡便化と、安価な DNA chip を用いて検出するシステムの構築をおこなった。RNA から cDNA を合成し、cDNA を互いに連結することで長い cDNA を作成した。さらに Phi29 酵素を用いて核酸を増幅する方法を確立し、RDV-RD 法と名付けた。アルブミン mRNA では約 100 分子を効率よく増幅できることが明らかとなった。一方、80 コピーの HBV DNA では約 300 倍増幅した。本法は RNA ウイルスも DNA ウイルスも同時に増幅することが可能である。また、本法では数十から数百分子の遺伝子を網羅的に増幅できることが明らかとなった。

A. 研究目的、

血液検査を行う場合に既知のウイルスを PCR 法により検出するためには、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し、PCR 法を実施する。このように NAT を含むウイルスの増幅や検出方法はすべて既知の塩基配列をもとに開発されている。現在は PCR や NAT など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。しかし、検査すべきウイルスの種類が多くなると、その操作は容易ではなく、検査の費用も膨大になる。そこで、複数のウイルス遺伝子を非特異的に増幅することにより操作の簡便化を行い。増幅後に安価な DNA chip を用いて検出するというシステムの構築を目標とした。

我々はこれまでに、Sigma 社の Whole transcriptome kit を用いたウイルス核

酸の非特異的増幅方法が有効であるとの報告をしてきた (図 14)。しかし、特に 1000 分子以下のウイルス遺伝子の増幅が極端に悪いことが明らかとなった。また、RNA ウイルスと DNA ウイルスを別々に増幅する必要があるので、簡便化の必要があった。そこで、本研究ではさらに新しい方法を開発するにあたり (1) 低コピーでも増幅できるシステムを構築すること、(2) しかも、DNA ウイルスと RNA ウイルスを同時に検出できる系を構築すること、を目標とした。

B. 研究方法

キアゲン社の QuantiTect Whole transcriptome kit をベースに、合成アルブミン mRNA を用いて操作の簡便化と感度の上昇を目標に改良を行った。その結果、図 15 に示すような反応系がもっとも感度良く遺伝子を増幅できることがわかった。すなわち、RNA から cDNA を合成し、その cDNA を互いに (さらに oligo を加えることにより架橋する) 連結することで長い cDNA を作成した。Phi29 酵素は長い DNA を 10000 倍まで増幅できるので、この cDNA は良い基質となりうる。この方法を RDV-RD と名付けた。

C. 研究結果

合成アルブミン mRNA を用いた実験系の検討では、約 100 分子を効率よく増幅できることが明らかとなった。また、この方法を用いて蚊の幼虫から新しいブニヤウ

イルスの遺伝子の一部を検出できた。一方、実際に、80 コピーの HBV DNA を RDV-RD 法で増幅したところ、約 300 倍の増幅が可能であった。

D. 考察

RDV-RD 法は改良前の非特異的増幅方法 (RDV ver1.0, 2.0) と比較して、短時間に低分子のウイルス核酸も増幅できる。また、本法は RNA ウイルスも DNA ウイルスも同時に増幅することが可能である。本法では数十から数百分子の遺伝子を増幅することができるが、血液検査では 10 分子程度を検出できる感度が要求されるので、次年度の目標とする。

E. 結論

新しい遺伝子の増幅法、RDV-RD 法は、ウイルスの遺伝子を効率よく網羅的に増幅することが示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Tetsuya Mizutani, Daiji Endoh, Michiko Okamoto, Kazuya Shirato, Hiroyuki Shimizu, Minetaro Arita, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Koji Sakai, Chang Kwang Limn, Mikako Ito, Reiko Nerome, Tomohiko Takasaki, Koji Ishii, Tetsuro Suzuki, Ichiro Kurane,

- Shigeru Morikawa and Hidekazu Nishimura. Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses. *Emerging Infectious Diseases*. 13. 2007. 322-324.
2. Tetsuya Mizutani, Shuetsu Fukushi, Tsuyoshi Kenri, Yuko Sasaki, Koji Ishii Daiji Endoh, Aya Zamoto, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane and Shigeru Morikawa Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans* *Arch Virol*. 2007. 152:1019-1025.
 3. Ikejiri M, Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Kurane I, Maruyama T. Synthesis and biological evaluation of nucleoside analogues having 6-chloropurine as anti-SARS-CoV agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007. 17:2470-2473.
 4. 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.
 5. Fukushi S, Mizutani T, Sakai K, Saijo M, Taguchi F, Yokoyama M, Kurane I, Morikawa S. Amino acid substitutions in S2 region enhance SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells. *J. Virol*. 81. 10831-10834. 2007.
 6. Saijo M, Georges-Courbot MC, Marianneau P, Romanowski V, Fukushi S, Mizutani T, Georges AJ, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Development of recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever. *Clin Vaccine Immunol*. 2007. 14. 1182-1189.
 7. 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.
 8. 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 (In press)

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

9. Tetsuya Mizutani. Signal Transduction in SARS-CoV-infected cells. (review) In Emerging Infectious Diseases. (S.K. Lai., Eds.) Ed. S. K. Lai, 1102: 86-95. Ann. N.Y. Acad. Sci.2007

10. Tetsuya Mizutani. Characterization of Signaling Pathways in Cells Infected with SARS-CoV. In Host Gene Responses to RNA Viral Infection. Edited by Decheng Yang. World Scientific Publishing. In press

11. Kazuya Shirato and Tetsuya Mizutani. Tumor necrosis factor and carcinoma by hepatitis C and B virus-infection. In Oncogene and Protein. Nova Publication. In press.

12. Tetsuya Mizutani. Review of methods to determine nucleic acid sequences of unknown viruses. Special issue of Indian J. Micorbiol. (in press)

13. 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」第 57 巻 第 2 号, pp. 303-311, 2007

図14. Sigma社の非特異的ウイルス核酸増幅反応

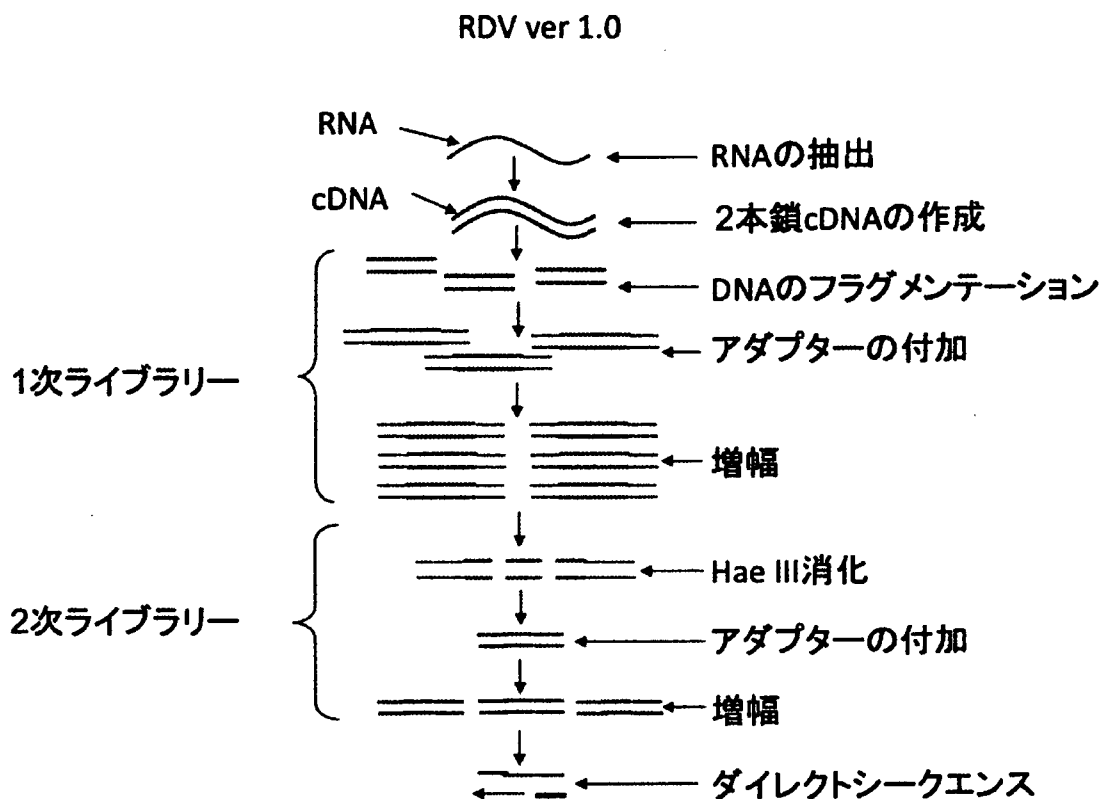
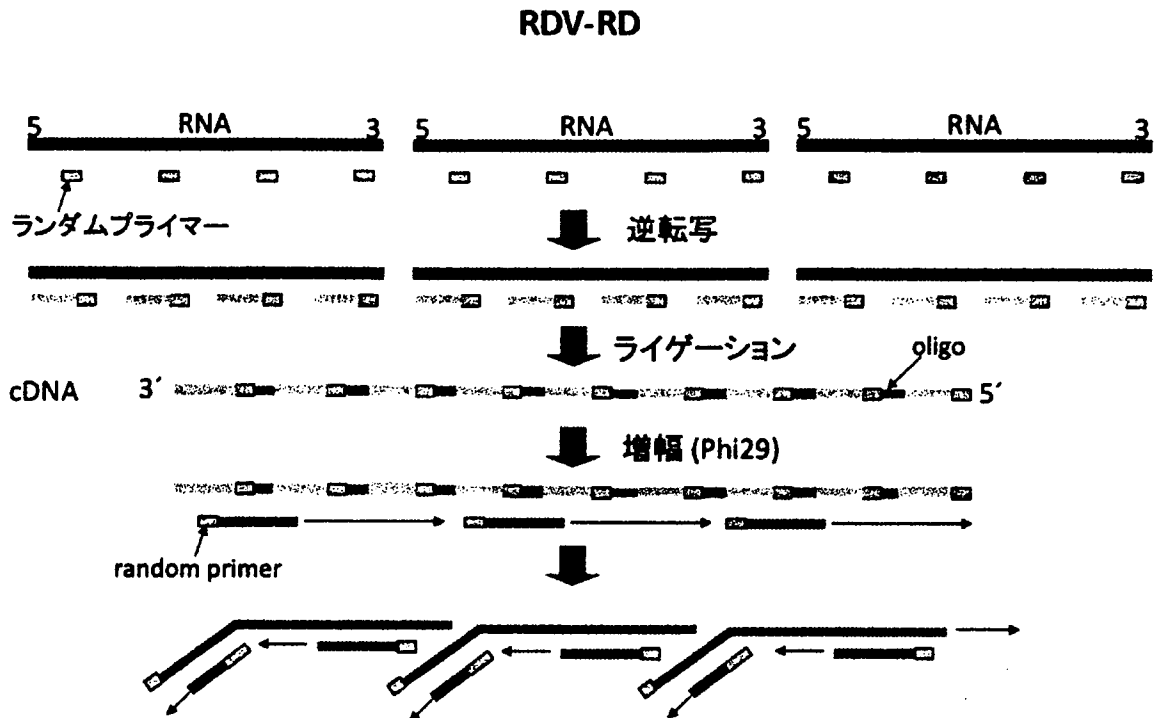


図15. 改良した核酸増幅反応(RDV-RD 法)



厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急研究事業）
分担研究報告書

ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究（H19-肝炎-一般-003）

ウイルス核酸検出のための DNA チップ作製と検出反応条件の検討

分担研究者： 浜口功 国立感染症研究所・血液・安全性研究部
半田誠 慶応義塾大学・医学部・輸血・細胞療法部
研究協力者： 水上拓郎 国立感染症研究所・血液・安全性研究部
滝沢和也 国立感染症研究所・血液・安全性研究部

研究要旨

肝炎をはじめとしたウイルス汚染の有無の検出能は NAT 法の導入により高まり、HBV、HCV、HIV の感染例も激減した。しかしながら、これら以外のウイルスについても今後チェックの必要が求められる。ウイルス核酸に特異的なプライマー（主任研究者、山口の項参照）を用いてウイルス核酸を増幅し、増幅領域を付着させた DNA チップにを用いて、核酸検出を行った。これまでのところ、RNA ウィルスである HCV、および DNA ウィルスの HBV をそれぞれ 100 分子/mL 以上を出発点とした試料に関して DNA チップにより検出できた。

A. 研究目的

肝炎をはじめとしたウイルス汚染の有無の検出能は NAT 法の導入により高まり、HBV、HCV、HIV の感染例も激減した。しかしながら、これら以外のウイルスについても今後チェックの必要が求められる。

NAT 法と同等の感度で、HBV、HCV、HIV 以外の病原体を精度よく検出できる方法の開発を行う。本研究課題では、種々の方法で増幅したウイルス核酸を DNA チッ

プによって一括して、感度よく検出することを目的とする。

B. 研究方法

特異的なプライマーを用いて PCR 増幅する際に、Cy5-dCTP を適量混合させウイルス核酸の蛍光標識を行った。

また各種ウイルス核酸の増幅領域をもとにプローブを設計し、DLC(diamond like carbon) で表面処理を施した 3mm 角チップ上に結合させ DNA チップを作製した。

このチップに標識した PCR 増幅産物を滴下し、40℃、2 時間ハイブリダイズさせ、洗浄後その発光を蛍光スキャナ（富士フイルム社製 FLA-8000）で判定した。

C. 研究結果

上記方法により RNA ウィルスである HCV、および DNA ウィルスの HBV をそれぞれ 100 分子/mL 以上を出発点とした試料に関して DNA チップにより検出できた。（図 16）

D. 考察

出発試料を 1~10000 分子/mL のウィルス核酸について DNA チップ検出をおこなったが、感度よくまた再現性よく検出できたのは 100 分子/mL までであった。100 分子/mL までであればほぼ 100% の検出率が得られたが、10 分子/mL になると急激に検出率が下がってしまった。これはゲノムの抽出および増幅を効率よく行うことで検出レベルも上がってくると考えられる。

E. 結論

本研究により DNA チップを用いて 100 分子程度のウィルス核酸が検出可能となった。

今後さらなる感度の向上と、ウィルス種をふやした検討を行っていく。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Mizukami T, Imai J, Hamaguchi I, Kawamura M, Momose H, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K.: Application of complementary DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety.

Vaccine (in press)

2. Hamaguchi I, Imai J, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K.: Agp and Hpx are useful for pertussis vaccine safety control as vaccine toxicity-related genes.

Vaccine 25: 3355-3364, 2007

3. 大坪寛子、浜口功、山口一成、ヘモビジランスシステムと輸血安全管理 臨床検査 52; 157-161, 2008

4. 水上拓郎、浜口功、山口一成、輸血血液における新興・再興感染症対策 臨床検査 52; 215-219, 2008

2) 学会発表

1. 水上拓郎：ウエストナイルウイルス大量発生時の体制整備． 第 55 回日本輸血・細胞治療学会シンポジウム「危機管理から見た輸血療法」2007年 5月 31-6月 2日 名古屋国際会議場

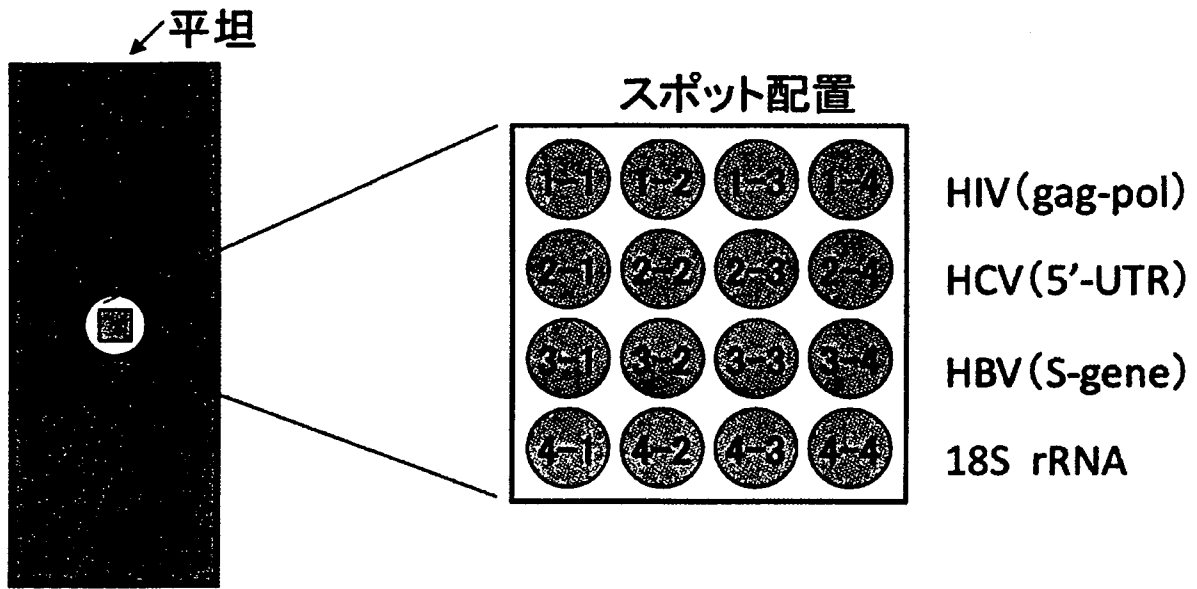
2. 水上拓郎、今井順一、浜口 功、河村未佳、百瀬暖佳、内藤誠之郎、前山順一、益見厚子、倉光 球、滝沢和也、野村信夫、渡辺慎哉、山口一成，網羅的遺伝子発現解析によるパンデミックインフルエンザワクチン(H5N1)の安全性・有効性評価法開発の試み 第 11 回日本ワクチン学会 12月 横浜

3. 浜口 功、今井順一、百瀬暖佳、河村未佳、水上拓郎、内藤誠之郎、前山順一、加藤博史、益見厚子、倉光 球、滝沢和也、水谷哲也、落合雅樹、山本明彦、堀内善信、野村信夫、渡辺慎哉、山口一成、遺伝子発現解析 (QuantiGene Plex) 法を用いたワクチンの新しい安全性評価法確立の試み 第 11 回日本ワクチン学会 12月 横浜

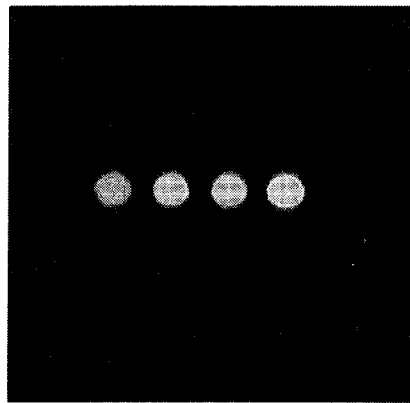
H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

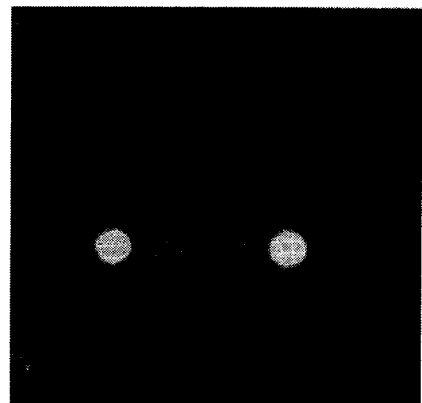
図 16. DNA チップの作製と HCV、HBV 核酸の検出



検出結果 (100コピー)



HCV



HBV

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急研究事業）
厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急研究事業）
分担研究報告書

ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究（H19-肝炎-一般-003）

国内技術を基盤としたウイルス検出用新規核酸増幅法の開発

分担研究者： 古田里佳 大阪赤十字血液センター・研究部
田所憲治 日本赤十字中央血液研究所

研究要旨

輸血用検査の主要部分を海外の検査試薬に依存している現状はリスクマネジメントおよび国内医療経済の観点から問題があると言わざるを得ない。そこで、国内のウイルス感染状況に即時対し得る国産技術を基盤としたウイルス核酸増幅検査を開発するために、(株)タカラバイオ独自開発の核酸増幅システムである一定温度核酸増幅法（ICAN[®]法）を用いた血液ウイルス NAT 開発を試みた。HCV ICAN NAT の構築を行ったところ、1 反応あたり 10 IU の HCV genotype 1b を 82.5%、genotype 2a を 100%検出可能であり、輸血用 NAT として十分な感度が得られた。来年度は、HCV ICAN NAT 特異性の検証ならびに全自動化への対応を検討する。

A. 研究目的

「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査（NAT）の実施に関するガイドライン」においては NAT 品質について厳しい精度が要求されているが、現行の Roche 社キットでは各試薬濃度やプライマー配列等が公表されていないため、上記ガイドラインが要求する品質はメーカーが提供するデータ

をそのまま受け入れて代用する状況である。然るにウイルスは日々進化し、薬剤耐性株等これまでになかった核酸配列が次々と出現していることは確実である。したがって、現時点において流行しているウイルス株を同時進行的に補足し、必要に応じて検査内容に変更を加えながら常にその時点最良の NAT 品質を提供するには、検査技術の内容がオープンに扱え