

200831008A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 山口一成
平成21（2009）年3月

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 山口一成
平成21(2009)年3月

研究組織

研究代表者

山口一成 国立感染症研究所・血液・安全性研究部

研究分担者

高橋孝喜 東京大学・医学部附属病院・輸血部

半田 誠 慶応義塾大学・医学部・輸血・細胞療法部

田所憲治 日本赤十字中央血液研究所

高松純樹 名古屋大学・医学部附属病院・輸血部

大戸 斉 福島医科大学・医学部附属病院・輸血・移植免疫部

紀野修一 旭川医科大学・臨床検査・輸血部

浜口 功 国立感染症研究所・血液・安全性研究部

古田里佳 大阪赤十字血液センター・研究部

水谷哲也 国立感染症研究所・ウイルス一部

目次

I. 総括研究報告

マイクロアレイを用いた病原体検出システムの構築 (山口一成、浜口功、半田誠)	5
表 1 : ウイルス特異的 Degenerate プライマーセット	13
表 2 : ウイルス検出用プローブ一覧	14
図 1 : スポット配置とプローブ ID	15
図 2 : 特異的プライマーによるウイルス核酸の増幅	16
図 3 : 同時抽出した DNA-RNA ウイルス核酸の増幅	17
図 4 : マイクロアレイによるウイルス核酸の検出	18
表 3 : NAT (TMA Assay) による血漿中のウイルス核酸の検出	19
図 5 : 蛍光標識オリゴを用いた変異株に対するバリデーション	20

II. 分担研究報告

1. ウイルス株間共通プライマーを用いた信頼性の高いウイルス検出法の検討 (遠藤大二)	21
表 1 : 塩基配列のコードと degeneracy	31
表 2 : HCV Genotype 共通プライマー設計対象ウイルスゲノム塩基配列	32
表 3 : CoCoMo プログラムによって予想された HCV Genotype 共通プライマーセット	33
表 4 : HCV ウイルス Genotype 共通検証用ゲノムフラグメント	37
表 5、表 6 :	38
表 7 : HBV Genotype 共通プライマー設計対象ゲノム塩基配列	39
表 8 : HBV Genotype 共通プライマー	40
表 9 : HBV 共通プライマー検証用ゲノムフラグメント	42
表 10 : HBV ゲノムフラグメント合成用オリゴマー	43
表 11 : HIV Genotype 共通プライマー設計対象ゲノム塩基配列	44
表 12 : HIV Genotype 共通プライマー	45
表 13、表 14 :	51
表 15 : HEV Genotype 共通プライマー設計対象ゲノム塩基配列	52
表 16 : HEV Genotype 共通プライマー	53
表 17、18 :	55
表 19、20 :	57
表 21 : Human ParvovirusB19 用プライマー設計対象ゲノム塩基配列	58
表 22 : Human ParvovirusB19 用プライマー	59
図 1 : CoCoMo プログラムの模式図	61

図 2、3 :	64
図 4 :HCV OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅	65
図 5 :HBV ゲノム断片の OE-PCR	66
図 6 : HBV OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅	67
図 7 :HIV-1 ゲノム断片の OE-PCR	68
図 8 :HIV-1 OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅	69
図 9、10 :	70
2. ウイルス遺伝子の非特異的増幅法の確立 (水谷哲也)	72
図 1 :	77
図 2 :	78
図 3 :	79
3. 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 (古田里佳、田所憲治)	80
4. 肝炎ウイルスと院内感染及び潜伏肝炎ウイルス再活性化の研究 (紀野修一、大戸齊、高橋孝喜、高松純樹)	83
別添 1 :輸血後感染症検査要請者に関する個別調査票	101
別添 2 :輸血業務に関する総合的アンケート調査結果報告書	103
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	121
IV. 研究成果の別刷	126

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

総括研究報告書

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）

マイクロアレイを用いた病原体検出システムの構築

研究代表者：	山口一成	国立感染症研究所・血液・安全性研究部
研究分担者：	浜口功	国立感染症研究所・血液・安全性研究部
	水谷哲也	国立感染症研究所・ウイルス1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：	遠藤大二	酪農学園大・獣医学部
	中島龍生	日本パーカーライジング広島工場
	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

血液製剤を含む輸血用血液による感染症の伝播を防止するために、これまで病原体に対する抗体を用いた血清学的検査が広く行われてきたが、抗体産生までに生じる検出困難な期間（Window period）が問題となってきた。そこで、新たに核酸増幅検査（NAT）が導入され、HIV、HCV、HBV においては Window period を著しく減少することができた。しかし、いまだ感染検体がスクリーニングをすり抜けることを完全に阻止するまでには至っていない。NAT による検出限界以下の極めて低量のウイルス保持者（低ウイルス血症：HBV）が存在し、輸血後のウイルス再活性化が問題視されることもあり、病原体検出感度の向上は重要な課題である。また、今後も増加すると予想される変異体やバリエーションに対して既存の検出系で対応するには限界があり、SARS のような未知の病原体が出現した場合は必要なスクリーニングが行えないことも考えられる。世界的規模で人間の地域間移動が激しくなる中であって、新興、あるいは再興感染症に対しても迅速に対応できる検出系の確立は急務である。

本研究において、検体中のウイルス核酸をウイルス特異的な Degenerate primer を用いて PCR で増幅と標識を行い、増幅領域内配列の一部を標的とするオリゴヌクレオチドを固定した DNA Chip 上で検出するためのマイクロアレイシステムを構築した。現在までに、血漿検体中の HIV、HCV、HBV のウイルス核酸に対して、NAT を用いた場合と同等以上（5～8IU/Reaction）の検出感度で検出することができた。

A. 研究目的

NATにおいてWindow periodにあるウイルスを検出するために、より高感度な検出システムの構築が必要である。そこで、微量なウイルス核酸をウイルス特異的なプライマーを用いて増幅することにより、検出感度を向上させるとともに、Degenerate primerによってウイルスの変異体に対する選択性を高めることを目指した。増幅された各ウイルス核酸はDNA Chip上に固定した検出プローブにより同時に検出することにより、複数の病原体を一括して検出できるシステムとして構築する。また、検出用プローブは多数存在するウイルスの変異株 (Genotypes / Subtypes) に対応することができるように設計する。

本研究課題ではHIV、HCV、HBVについて、このマイクロアレイ検出システムを用いて、既存のNATによるウイルス検出限界と同等以上の感度で検出することを目的とした。また、システムの簡素化を行うためにはRNAウイルスとDNAウイルスを同時に取り扱えることが望ましい。そこで、RNAウイルスとDNAウイルスを同時に取り扱えるシステムにすることを模索した。

B. 研究方法

I. マイクロアレイ

1) 標準品

標準検体として ACCURUN 315 HIV-RNA positive quality control (Subtype B,

2.1×10^5 copies/ml, Sera Care Life Sciences)、ACCURUN 305 HCV-RNA positive quality control (Subtype 1b, 1.7×10^5 IU/ml)、ACCURUN 305 HBV-DNA positive quality control (Subtype A, 8.1×10^6 IU/ml) から、希釈検体 (10^5 IU/ml) を調整し、 -80°C にて保存した。

2) 核酸抽出

RNA 抽出

HIV、HCV-RNA は High Pure Viral RNA Kit (Roche) 添付のプロトコールに従い、希釈検体 $200 \mu\text{l}$ (2×10^4 IU 相当) を poly A Carrier RNA $4 \mu\text{l}$ ($20 \mu\text{g}$) を加えた Binding Buffer $400 \mu\text{l}$ に加え、よくボルテックスし、室温で10分間静置した後、軽くスピンドウンした。検体液を High pure filter tube に移し、 $8,000 \text{ G}$ で15秒間遠心した。Collection tube を交換し、Inhibitor Removal Buffer $500 \mu\text{l}$ を filter tube に加えて、 $8,000 \text{ G}$ で1分間遠心した。Collection tube を交換し、Wash Buffer $450 \mu\text{l}$ を加え、 $8,000 \text{ G}$ で1分間遠心した。同様にもう一度Washを行った後、 $13,000 \text{ G}$ で10秒間遠心した。Collection tube を交換し、Elution Buffer $50 \mu\text{l}$ を加えて、 $8,000 \text{ G}$ で1分間遠心し、Total RNA を溶出した。遠心には卓上微量遠心機 MiniSpin (eppendorf) を用いた。吸光度測定により Total RNA を確認した。

DNA 抽出

HBV-DNA は High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) 添付のプロトコールに従い、希釈検体 200 μ l (2 \times 10⁴IU 相当) を poly A Carrier RNA 2 μ l (10 μ g) と Proteinase K 50 μ l を加えた Binding Buffer 200 μ l に加え、よくボルテックスし、72 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした後、軽くスピンドウンした。検体液を High pure filter tube に移し、8,000 G で 15 秒間遠心した。Collection tube を交換し、Inhibitor Removal Buffer 500 μ l を filter tube に加えて、8,000 G で 1 分間遠心した。Collection tube を交換し、Wash Buffer 450 μ l を加え、8,000 G で 1 分間遠心した。同様にもう一度 Wash を行った後、13,000G で 10 秒間遠心した。Collection tube を交換し、Elution Buffer 50 μ l を加えて、8,000 G で 1 分間遠心し、Total RNA を溶出した。遠心には卓上微量遠心機 MiniSpin (eppendorf) を用いた。吸光度測定により Total DNA を確認した。

RNA-DNA 同時抽出

High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume kit (Roche) 添付のプロトコールに従い、希釈検体 2.5ml (HIV、HCV、HBV 各 5,000IU 相当) を poly A Carrier RNA 15 μ l (75 μ g) と Proteinase K 250 μ l を加えた Binding Buffer 2.5ml に加え、よくボルテックスし、70 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした後、Binding Buffer 1ml に加え、よくボルテックスし、軽くスピン

ダウンした。検体液を High Pure Extender Assembly に移し、4,000 G で 5 分間遠心した。High Pure Extender Assembly から High Pure Filter Tube を取り外し Collection tube にセットし、Inhibitor Removal Buffer 500 μ l を filter tube に加えて、8,000 G で 1 分間遠心した。Collection tube を交換し、Wash Buffer 450 μ l を加え、8,000 G で 1 分間遠心した。同様にもう一度 Wash を行った後、13,000G で 10 秒間遠心した。Collection tube を交換し、Elution Buffer 50 μ l を加えて、8,000 G で 1 分間遠心し、Total RNA を溶出した。遠心には卓上微量遠心機 MiniSpin (eppendorf) を用いた。

3) cDNA 合成

SuperScript III RT cDNA synthesis kit (Invitrogen) 添付のプロトコールに従い、Total RNA 溶液 8 μ l (3200IU 相当) に 50ng/ μ l Random primer 1 μ l、10mM dNTP mix 1 μ l を加え、65 $^{\circ}$ C で 5 分間処理し、氷上で 1 分間放置した後、逆転写反応液 (10 \times RTbuffer 2 μ l、25mM MgCl₂ 4 μ l、0.1M DTT 2 μ l、RNase out (40U/ μ l) 1 μ l、SuperScript III RT (200U/ μ l) 1 μ l) を加えて、25 $^{\circ}$ C で 10 分間、50 $^{\circ}$ C で 50 分間、85 $^{\circ}$ C で 5 分間反応した。この反応液に RNase H 1 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間処理した。逆転写反応にはサーマルサイクラー iCycler (Bio-Rad) を使用した。

4) Degenerate primer

データベースに登録された HIV、HCV、HBV の全てのウイルスゲノム配列を収集し、コンピューターによるアラインメントとクラスタリングの解析を行なった後、Cordination of Common Motifs (CoCoMo) Algorithm に基づいて各ウイルスに特異的なプライマーの設計を行なった (表 1)。

5) ウイルス検出用プローブ

HIV、HCV、HBV の各ウイルス特異的プライマーによる増幅領域を基に 32~38mer の検出用プローブを設計した (表 2)。合成されたプローブ用オリゴヌクレオチドをスライドガラス上の DLC (diamond like carbon) 表面処理を施したチップ (3mm×3mm 角) に固定した (図 1)。

6) 蛍光標識合成オリゴヌクレオチド

HIV、HCV、HBV の各ウイルス変異株のゲノム配列と完全に一致するように、ウイルス検出用プローブの標的となるオリゴヌクレオチドを合成した。合成オリゴヌクレオチドの 5' 末端側には蛍光色素 Cyanine 3 を修飾した。蛍光測定は、FLA-8000 (富士フイルム社) により 532nm (解像度 10 nm) の蛍光検出により判定を行った。

7) PCR

サンプルのウイルス DNA は SUPERase[®] In RNase Inhibitor (Ambion) 1U/μl

を添加した Ultra pure distilled water (Gibco) を用いて希釈し、1,000IU~1IU の希釈系列を調整した。

Amplitaq Gold LD (Applied Biosystems) 検体液から得られた cDNA 2μl に 10× Gene Amp PCR buffer 5μl, 2mM dNTP mix 10μl, 25mM MgCl₂ 5μl, Forward Primer (50μM) 0.5μl, Reverses Primer (50μM) 0.5μl, AmpliTaQ Gold LD 0.25μl, DW 26.75μl を加えて、96°C 9 分間加熱した後、94°C 1 分間、55°C 1 分間、72°C 5 分間を 70 サイクル行った。各 PCR 産物を 3% -agarose gel で電気泳動し、増幅確認を行った。

Green GoTaq (Promega) 検体液から得られた cDNA 2μl (160IU 等量) に 5× Green GoTaq Flexi Buffer 10μl, 10mM PCR Nucleotide Mix 1μl, 25mM MgCl₂ 2μl, Forward Primer (50μM) 0.5μl, Reverses Primer (50μM) 0.5μl, GoTaq Polymerase (5U/μl) 0.25μl, DW 33.75μl を加えて、96°C 5 分間加熱した後、94°C 30 秒間、55°C 30 秒間、72°C 1 分間を 50 サイクル行った。各 PCR 産物を 3% -agarose gel で電気泳動し、増幅確認を行った。

8) マイクロアレイ

Labeling

検体液から得られた cDNA 2μl (160IU 相当) に 2×GoTaq Master mix 10μl, 1mM Cy5-dCTP 0.5μl, Forward Primer (50μM) 0.5μl, Reverses Primer (50μM)

0.5 μ l, GoTaq Polymerase (5U/ μ l)
0.25 μ l, DW 8 μ l を加えて、95°C 2 分間
加熱した後、95°C 30 秒間、55°C 30 秒間、
72°C 30 秒間を 40~50 サイクル、72°C 7
分間行った。

Hybridization

Hybridization Buffer 1 μ l と Sample
DNA 2 μ l を混ぜ合わせ DNA Chip 上に滴下
する。ハイブリオープン内で 50°C、2 時
間ハイブリダイズさせ、Washing Buffer
で 2 回洗浄する。遠心により乾燥 (1~
2min) した後、蛍光スキャナー、FLA-8000
(富士フイルム社) により 635nm (解像度
10 nm) の蛍光検出により判定を行った。

II. NAT

1) 検体の調整

検体として ACCURUN 315 HIV-RNA
positive quality control (Subtype B, 2.1×10^5
copies/ml, Sera Care Life Sciences)、
ACCURUN 305 HCV-RNA positive
quality control (Subtype 1b, 1.7×10^5 IU/ml)、
ACCURUN 305 HBV-DNA positive
quality control (Subtype A, 8.1×10^6 copies
/ml) を、ヒト陰性血漿 (HIV, HCV, HBV)
を用いて段階希釈し、10,000~1 IU/ml の
希釈系列を調整した。

2) TMA Assay

検出には、PROCLEIX ULTRIO System
(Chiron) を用いた。TTU (Ten Tube Unit) に
Internal control を加えた TCR (Target

Capture Reagent) を 400 μ l 分注入し、
500 μ l の HIV、HCV、HBV の各陰性キャ
リブレーター、陽性キャリブレーター、
コントロール、サンプルを加え、ボルテ
ックスでよく攪拌する。TTU ラックごと
60°C 20 分間インキュベートする。TTU
ラックごと室温で 15 分間放置し、TCS
(Target Capture system) 磁性分離部にセッ
トし、10 分間放置した後、TCS で溶液を
吸引する。各 TTU に Wash solution を 1ml
注入し、20 秒間ボルテックスでよく攪拌
する。TTU ラックごと TCS にセットし 5
分間放置する。もう一度 TCS で溶液を吸
引し、Wash solution を 1ml 注入し、20 秒
間ボルテックスでよく攪拌する。TTU ラ
ックごと TCS にセットし 5 分間放置した
後、TCS で吸引し溶液を取り除く。
各 TTU に 75 μ l の Amp Reagent を注入し、
200 μ l の Oil を注入し、20 秒間ボルテッ
クスでよく攪拌する。TTU ラックごと
60°C 10 分間インキュベートする。TTU
ラックごと 41.5°C 10 分間インキュベ
ートした後、Enzyme Reagent を 25 μ l 素早
く注入し、41.5°C 60 分間インキュベ
ートする。100 μ l の Probe Reagent を注入し、
20 秒間ボルテックスでよく攪拌した後、
62°C 15 分間インキュベートする。250 μ l
の加水分解試薬を加えて、20 秒間ボルテ
ックスでよく攪拌した後、62°C 10 分間イ
ンキュベートする。TTU ラックごと 19~
27°C の水中で 10 分間冷却し、ルミノメ
ーター (PROCLEIX HC+, カイロン社) の専
用フォルダーに TTU を移動する。

蛍光を測定し、データを収集した。陰性、陽性の判定は TMA Data Reduction software (DRS)を用いて行なった。

C. 研究結果

1. ウイルス核酸増幅条件の検討

標準検体のウイルス核酸を段階希釈することにより、1回のPCR反応液中に1~10,000IUのウイルス核酸が存在するように調整した希釈系列を用いてPCRによる増幅条件を検討した。DNA polymeraseとしてAmpliTaQ Gold LD (Applied Biosystems, 70 サイクル)、あるいはGo Taq (Promega, 50 サイクル)を用いることにより、10IU/Reactionにおいて電気泳動のバンドによる確認が可能な量(0.1~1 μ g)まで増幅することができた(図2)。増幅効率ではAmpliTaQ Gold LDの方が高いが、Go Taqのほうが特異性においては良好な結果が得られた。また、増幅に要する時間を比較すると、AmpliTaQ Gold LDが9時間以上かかるのに対し、Go Taqでは2時間半で終了するため、判定までの時間を短縮するためには有利である。

2. RNA-DNA ウイルスの同時検出条件の検討

DNA ウイルスと RNA ウイルスを個別に抽出、増幅するのは作業ステップが増え、検出システムとして煩雑になってしまう。そこで、High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume kit (Roche)を用いてDNA ウイルスと RNA ウイルスを同時に抽出し、

PCRにより増幅することを試みた(図3)。その結果、各ウイルスを個別に抽出した場合に比べ、増幅効率が悪く安定しない傾向にあった。特に100IU以下では電気泳動により確認されるPCR産物のバンドが著しく減衰した。DNA ウイルスと RNA ウイルスを同時に増幅する際、RNA ウイルスのcDNA合成において複数のウイルスゲノムが混在することが、後のPCRによる核酸増幅行程に影響している可能性もあり、今後、RDV-RD (Rapid Determination of Viral Genome-RNA/DNA) 法等のPCR以外の方法でごく微量なウイルス核酸を増幅する方法も検討する必要がある。

3. マイクロアレイによるウイルス核酸の検出

本システムのDNA Chip上には各ウイルス毎に特異的プライマーにより増幅される領域内の複数の特定配列を標的とした32~38merのオリゴヌクレオチドが固定されている。そこで、標準検体のウイルス核酸の希釈系列(HIV:160~1.6IU、HCV:136~1.3IU、HBV:100~1IU)を用いて各ウイルスの検出用プローブの検出限界を測定した。その結果、各ウイルスの検出用プローブは、対応したウイルス核酸のみを特異的に検出することができた。

(図4)最低検出限界はPCR反応液中にHIVで1.6IU、HCVで6.8IU、HBVで1IUであり、再現性を保証できる範囲はHIVで8IU、HCVで6.8IU、HBVで5IUまでであった。同一の標準検体のウイルス核酸

の希釈系列を Chiron 社の NAT システムを用いて検定した結果、検出限界

(IU/ml, 95% confidence interval) は HIV で 10IU、HCV で 100IU、HBV で 100IU であった (表 3)。一般的に NAT における有効な検出限界は HIV で 30IU、HCV で 10IU、HBV で 15IU とされ、全ての変異株をカバーするには HIV で 100IU、HCV で 30IU、HBV で 100IU が限界とされていることから、このアレイシステムによるウイルス検出能力は NAT 検査と同等以上の精度を持っていることが示された。

4. 合成オリゴを用いた変異体株の検出

HIV、HCV、HBV のウイルス検出用プローブが各ウイルスの変異株を全て検出することができるのかを、変異株のゲノム配列を基に末端に蛍光標識を加えるように合成したオリゴヌクレオチドを用いて試験した。その結果、反応液中に 100 femto mol の合成オリゴヌクレオチドを加え試験した全ての変異株について、検出用プローブと結合し、シグナルが検出できることを確認した (図 5)。また、合成オリゴヌクレオチドが検出用プローブと同一の配列であった場合、HIV で 100 atto mol、HCV で 10 atto mol、HBV で 10 atto mol での検出が可能であった。

D. 考察

本研究のマイクロアレイシステムによって、HIV、HCV、HBV の各ウイルス核酸を

高感度 (10IU/Reaction 以下) で検出することができた。しかし、ウイルス核酸の抽出から cDNA 合成 (RNA ウイルス) への行程、また PCR による核酸の増幅と標識行程、更に DNA Chip 上での反応行程と、それぞれの行程において鋳型となるウイルス核酸の一部を取り反応系に加えるため、開始地点での検体中のウイルス核酸量が極端に少ない場合には、検出能力が著しく低下してしまう可能性がある。これに対する解決策の一つとして、開始時にシステムに持ち込む検体量自体を増やすことが考えられる。Roche 社の High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume kit を用いれば、最大 2.5ml までの検体をシステムに持ち込むことができ、開始地点のウイルス核酸量を 10 倍程度上げることができる。また、各行程における反応を検体中のウイルス核酸全量を用いて行なうことができれば、増幅時に 6 倍程度多くのウイルス核酸を利用できる。そのためには 1 チューブで全ての反応行程が行なえるシステムの構築が理想である。同様にできる限り各行程を簡素化するために同一検体中の RNA ウイルスと DNA ウイルスを同時に抽出、増幅する方法を確立することも課題の一つである。また、マイクロアレイのシグナル読み取り能力を向上させることも十分に増幅できない微量なウイルス核酸を検出するための有効な手段であると考えられる。

また、DNA Chip 上の各ウイルス検出用プローブはほぼ全ての変異株に対応する

ことが可能であることが示唆され、標的核酸との結合能力が非常に高いと予想される。この DNA Chip 上には 100 スポット程度のプローブを置くことができるため、今後、更に多くの病原体に対応するプローブを追加していく際、各プローブに非特異的に交差するシグナルが出ないかには注意を払う必要がある。

E. 結論

本研究によって同一検体中の複数のウイルス核酸を 1 枚の DNA Chip 上で検出することが可能となった。このシステムでは必要に応じて DNA Chip 上の病原体検出用のプローブを追加、修正していくが容易であり、新規の病原体に迅速に対応することが期待できる。現在、HEV (E 型肝炎ウイルス)、WNV (ウエストナイルウイルス)、PvB19 (パルボウイルス B19) に対応する Degenerate primer と検出用プローブを設計し、本システムによる検出能力の検証を行っている。最終的には医療・検査機関において使用することを想定した安全、簡便、迅速な検出システムとして、自動化に向けた模索を行っている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

該当なし

2) 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1. ウイルス特異的 Degenerate プライマーセット

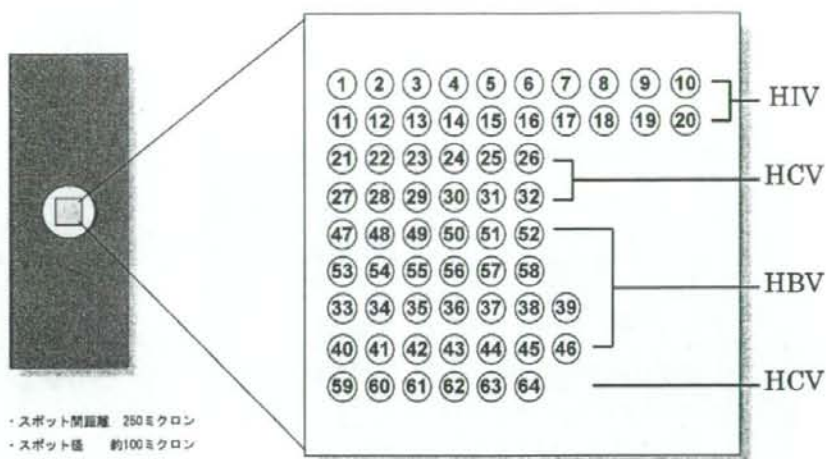
Primer set	Forward Primer	Forward Primer Sequence	Reverse Primer	Reverse Primer Sequence	増幅産物サイズ (bp)		
HIV	1	HIV-1F	ACAATTWTAHRGAAAAAGGGG	HIV-1R	YTGTCTCTGWAATAAACCCGA	142	
	2	HIV-2F	RARAGGGGGGATTGGGGGGTA	HIV-2R	AYACWYCRKYVCTGCCATC	282	
	3	HIV-3F	DAARGCDGCHTGTGGTGGGC	HIV-3R	TGTCYCTGWAAYAAACCCGAA	311	
	4	HIV-4F	ACAATTTTAAAGAARARGGG	HIV-4R	CTGTCTCTGWAAYARACCCGR	142	
HCV	1	HCV-1F	CCCAGGAGAGCCATAGTGGTC	HCV-1R	ACACCCAACTRGGGCCCTG	351	
	2	HCV-2F	CAGGWCCCCCCTCCGGGAG	HCV-2R	ACACCCAACTRGGGCCCTG	364	
	3	HCV-3F	GCCTGATAGGGYCTTGGGAG	HCV-3R	TTCKHGTGTYGGCAGACCC	203	
	4	HCV-4F	YCCGSGAGAGCCATAGTRGTC	HCV-4R	ACACCCAMHYKNGGCCCYTR	351	
	7	HCV-7F	GAAGCGYCTAGCCATGGCGT	HCV-7R	TGCACGGTCTACGAGACCTCC	269	
	HBV	1	HBV-1F	AYTAYMAAGGTATGTTGCCG	HBV-1R	GGAAAGCYCTRGAACCACTG	266
		2	HBV-2F	ACCTCTCTYTAGGGGCTCTCC	HBV-2R	CCAATTTATGCCTACAGCCTC	270
3		HBV-3F	GTGCWCTCGCTTCACTCTG	HBV-3R	CCAATTTATGCCTACAGCCTC	219	
4		HBV-4F	TCATMTWCCCKTTCATCCTGC	HBV-4R	GGAAAGCYCTRGAACCACTG	320	
5		HBV-5F	RYATTWYCTGTTGGTGGCTC	HBV-5R	GAGAGAAGTCCACCAGGATC	223	
6		HBV-6F	GAVTCTVGCYWCCTGGGTGGG	HBV-6R	GAYCTTGTCTGCGAGGCGAG	312	
7		HBV-7F	AYTAYCAAGGTATGTTGCCG	HBV-7R	GGAAAGCCCKRGMACCACTG	266	

PCRによるウイルス核酸の増幅、及びCy5標識に用いたプライマー。HIV-1RとHIV-2R、HBV-1RとHBV-4R、HBV-2RとHBV-3Rは同じ配列であるが、プライマーセットの番号に合わせて通し番号で表記した。塩基表記 M: A/C, R: A/G, W: A/T, S: C/G, Y: C/T, K: G/T, V: A/C/G, H: A/C/T, D: A/G/T, B: C/G/T, N: A/T/C/G。

表 2. ウイルス検出用プローブ一覧

NO.	ID	sequence (5'-3')	Primer set
1	IF1-1	GGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAGAATAGT	HIV set1 or 4 Sense
2	IF1-2	GGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGA	
3	IF1-3	GTAGACATAATAGCAACAGACATACAAAGTAAAG	
4	IF1-4	CAGACATACAAACTAAAGAATACAAAAACAAATTAC	
5	IF1-5	CAAAAATTCAAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGG	
6	IR1-1	ACTATTGTTCCCTGCACGTACCCCGCAATGCC	HIV set1 or 4 Antisense
7	IR1-2	TCTGTTGCTATTATGCTCTACTATTCTTTCCGC	
8	IR1-3	CTTTAGTTGTATGCTGTGTTGCTATTATGCTAC	
9	IR1-4	GTAATTTGTTTTTTGTAATCTTTAGTTTGTATGTGTG	
10	IR1-5	CCCTGTAATAAACCGGAAAAATTTGAAATTTTG	
11	IF3-1	AATCAAGCAGGAATTTGGAATCCCTACAATCCC	HIV set3 Sense
12	IF3-2	TGGAATCCCTACAATCCGCAAGTCAAGGAGTAGTAGAATC	
13	IF3-3	CAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAGAATTAAG	
14	IF3-4	AAGAAAATATAGGAGAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATC	
15	IF3-5	CTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATT	
16	IR3-1	GGGATTGTAGGAATTCAAAATTCCTGCTTGATT	HIV set3 Antisense
17	IR3-2	GATTCTACTACTCCTTGACTTTGGGGATTGTAGGGAATCCCA	
18	IR3-3	CTTTAATCTTTATCATAGATTCTACTCTCTGACTTTG	
19	IR3-4	GATGTCAGCCTGATCTTACCTGTCCTATAATTTCTT	
20	IR3-5	AATTGGGATGAATGCTGCAATTTGCTAGTCTGCTGTTAAG	
21	CF1-1	AACCGGTGAGTACACCGGAATGCCAGGAC	HCV set1 or 4 Sense
22	CF1-2	TTTCTGGATCAACCGGTCAATGCCGAGATTGGGGG	
23	CF1-3	TGCCCGGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGG	
24	CF1-4	AACAAAGTAAACCAACCGGTGCCACAGGA	
25	CF1-5	ACGTCAAGTTCCCGGTTGGCGGTCAAGTCGTT	
26	CF1-6	TCAGATCGTTGGTGGAGTTACTTGTGGCGGCGAG	
27	CR1-1	GTCCTGGCAATTCGGGTGACTCACCGGTT	HCV set1 or 4 Antisense
28	CR1-2	CGCCCAATTCGCAAGGATTGAGCGGGTTGATCGAAGAAA	
29	CR1-3	CCCAACACTACTCGGCTAGCAGTCTTCCGGGGGCA	
30	CR1-4	TCCTGTGGCGACGGTGGTGTACGTTTGT	
31	CR1-5	AACGATCTGACCGCCACCGGAACTTGAGGT	
32	CR1-6	CTGCGGGCAAGAAGTAAACTCCACCAACGATCTGA	
33	BF23-1	TCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTCCGTTGCACCTT	HBV set2 or 3 Sense
34	BF23-2	ACCTCTGCACGTTGCATGGAGACCACCGTGAA	
35	BF23-3	TGAACGCCATCAGATCCTGCCAAGGTCTTACATAAG	
36	BF23-4	GACCACCGTGAAGGCCGATGAGATCCTGGCCAAAGGTCTTAC	
37	BF23-5	ATGTCAACGACCGGACCTTGAAGCCTACTTCAAAGAC	
38	BF23-6	ACTGTGTGTTAAAGACTGGGAGGAGCTGGGGGAG	
39	BF23-7	AGGAGATTAGGTTAAAGGCTTTTGTATTAGGAGGC	
40	BR23-1	AAGTGCACACGGACCGGCAATGAGAAGGCACAQA	HBV set2 or 3 Antisense
41	BR23-2	TTACCGGTGGTCTCCATGCAACCGTGCAGAGGT	
42	BR23-3	CTTATGTAAGACCTTGGGAGGATCTGATGGGGGTTCA	
43	BR23-4	GTAAGACCTTGGGAGGATCTGATGGGGGTTCAACGGTGGTC	
44	BR23-5	GTCTTTGAAGTAGGCCTCAAGGTCCGTTGACAT	
45	BR23-6	CTCCCGCAGTCTCCGAGTCTTAAACACACAGT	
46	BR23-7	GCCTCCTAATACAAGACCTTTAACTAATCTCCT	
47	BF4-1	CTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTCTTCTTGG	HBV set4 or 7 Sense
48	BF4-2	CTTCTGGATTATGAAGGTATGTTGCCCGTTTGTGCTC	
49	BF4-3	TGTCCTCTAATCCAGGATCAACAACCAAGTAC	
50	BF4-4	ATTCCCATCCCATCGTCTGGGCTTTGGAAAAATAC	
51	BF4-5	CCTATGGGAGTGGGCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTC	
52	BF4-6	GTGCGTTTCTGTTGGCTGAGTTACTAGTGCATTTGTTGAG	
53	BR4-1	CCAGAAGAACCACAAAGAAGATGAGGCATAGCAG	
54	BR4-2	GAGGACAAACGGGCAACATACCTTGATAATCCGAGAAG	
55	BR4-3	GTAAGGTTGTTGTTGATCTGGAATTAAGGACACA	
56	BR4-4	GGTATTTTGGGAAAGCCAGGACGATGGATGGGAAAT	
57	BR4-5	GAGCCAAAGAAAGCGGACTGAGGCCCACTCCCATAGG	
58	BR4-6	CTGAACAAATGGCACTAGTAACTGAGCCAAAGAGAACCAGAC	
59	CF2-1	AGAGCCATAGTGTCTCCGGAACCGGTGAGTACACCGGA	HCV set7 Sense
60	CF2-2	CTAGCCGAGTAGTGTGGGTCGCGAAAGGCTTG	
61	CF2-3	GCGAAAGGCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCT	HCV set7 Antisense
62	CR2-1	TCGGGTACTCACCGGTTCCCGACAGCACTATGGCTCT	
63	CR2-2	CAAGGCTTTCCCAACCCAAAGGCTACTCGGCTAG	
64	CR2-3	AGCACCGTATGAGGCAAGTACCAAGGCGCTTGGC	

HIV、HCV、HBV の各ウイルス核酸検出用プローブ。特異的プライマーによって増幅される領域内のウイルスゲノム配列を標的とした 32~38mer の合成オリゴヌクレオチドである。



		Column									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Row	1	IF1-1	IF1-2	IF1-3	IF1-4	IF1-5	IR1-1	IR1-2	IR1-3	IR1-4	IR1-5
	2	IF3-1	IF3-2	IF3-3	IF3-4	IF3-5	IR3-1	IR3-2	IR3-3	IR3-4	IR3-5
	3	CF1-1	CF1-2	CF1-3	CF1-4	CF1-5	CF1-6				
	4	CR1-1	CR1-2	CR1-3	CR1-4	CR1-5	CR1-6				
	5	BF4-1	BF4-2	BF4-3	BF4-4	BF4-5	BF4-6				
	6	BR4-1	BR4-2	BR4-3	BR4-4	BR4-5	BR4-6				
	7	BF23-1	BF23-2	BF23-3	BF23-4	BF23-5	BF23-6	BF23-7			
	8	BR23-1	BR23-2	BR23-3	BR23-4	BR23-5	BR23-6	BR23-7			
	9	CF2-1	CF2-2	CF2-3	CR2-1	CR2-2	CR2-3				

図1.スポット配置とプローブID

スライドガラス上に固定されたウイルス核酸検出用プローブの配置とプローブID。
 3mm×3mm 角のチップに 100 個のスポットを置くことができる。

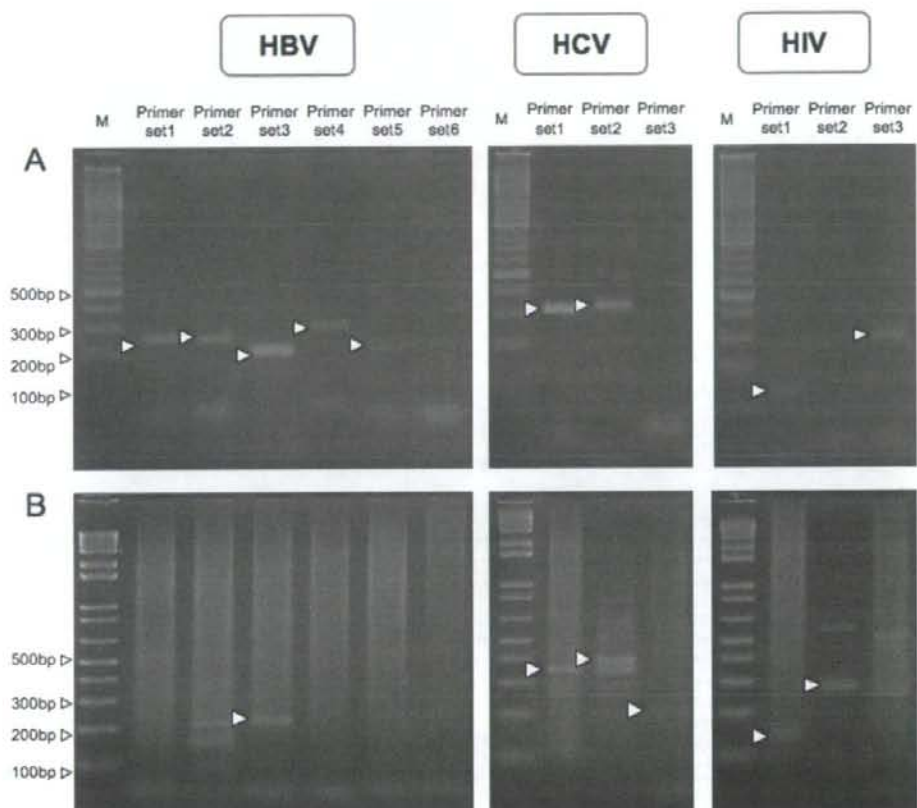


図2.特異的プライマーによるウイルス核酸の増幅

標準検体 (ACCURUN positive quality control) から調整したウイルス核酸 10IU を Template に各ウイルスに特異的な複数のプライマーセットを用いて、プライマーのテストと、PCR 条件の検討を行った。A: DNA 合成酵素に Go Taq を用いて 50 cycle の PCR を行った。B: DNA 合成酵素に AmpliTaq Gold LD を用いて 70 cycle の PCR を行った。反応後 PCR 産物を 5 μ l 泳動し核酸増幅の確認を行なった。

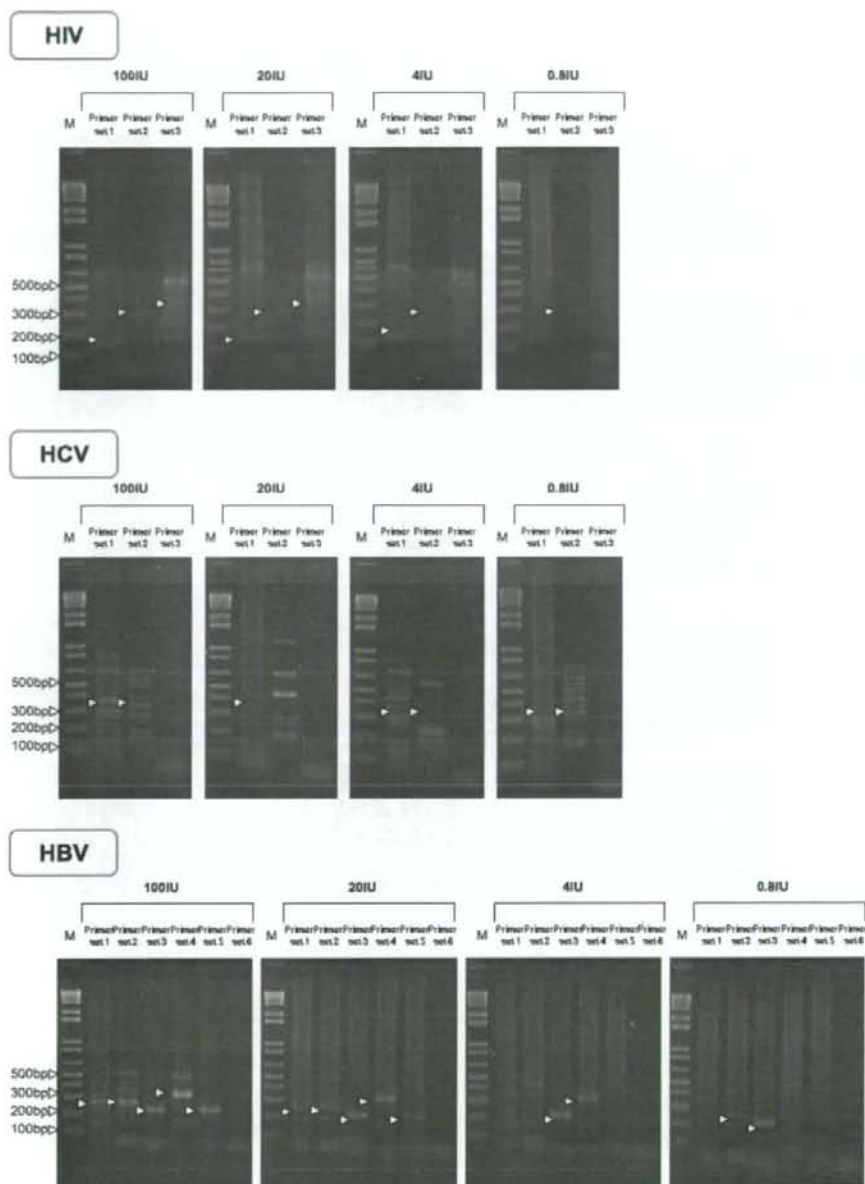


図 3. 同時抽出した DNA-RNA ウイルス核酸の増幅

High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume kit(Roche)を用いて HIV、HCV、HBV の核酸抽出を同時に行い、続けて逆転写反応を行なったウイルス核酸 10IU を Template に PCR を行なった。DNA 合成酵素には AmpliTaq Gold LD (Applied Biosystems)を用いて 70 cycle の PCR を行い、反応後 PCR 産物を 5 μ l 泳動し核酸増幅の確認を行なった。

HBV		HCV		HIV	
IU*	Genotype: A	IU*	Genotype: 1b	IU*	Genotype: B
100		136		160	
50		68		80	
10		13		16	
5		6.8		8	
1		1.3		1.6	

* IU = IU/Reaction

図 4. マイクロアレイによるウイルス核酸の検出

標準検体から調整したウイルス核酸の希釈系列を用いて各ウイルスの検出用プローブの検出限界をマイクロアレイにより測定した。特異的プライマーでの PCR によって Cy5 標識されたウイルス核酸を DNA Chip 上に滴下し 50°C、2 時間ハイブリダイズを行った。

表 3. NAT(TMA Assay)による血漿中のウイルス核酸の検出

	HBV	HCV	HIV
IU	Reactive	Reactive	Reactive
100 IU	100%	100%	100%
10 IU	50%	50%	100%
1 IU	50%	25%	50%
0 IU	0%	0%	0%

ヒト陰性血漿中に標準検体を加えた希釈系列を調整し、Chiron社のNATシステムを用いて Reactive(陽性)/Non-Reactive(陰性)の判定を行なった。IU;IU/ml。