



図 5. 蛍光標識合成オリゴを用いた変異株に対するバリデーション

Cy3 標識された合成オリゴヌクレオチドを用いて HIV、HCV、HBV の各ウイルス検出用プローブの変異株に対する検出能力をマイクロアレイにより評価した。

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方法の検討

研究協力者 遠藤 大二 酪農学園大学獣医学部放射線学教室

研究要旨：コストの抑制し、検査対象を増加可能で信頼性の高い共通性の高い、輸血血液の核酸検査方法として、新たなプライマー設計技術を用いた PCR 法を検討した。本年度は、前年度において開発した degenerate プライマーの設計プログラムを改善し、対象範囲を広げるとともにプライマーの実験的検証を実施した。すなわち、ウイルスの塩基配列上におけるプライマー適正位置の探索方法にギャップ 4 塩基 motif の探索を導入し、HCV, HBV, HIV1 用の degenerate プライマーを再設計するとともに、HEV, Human Parvovirus B19 virus, West Nile virus のプライマーを新たに設計した。加えて、プライマーを検証するための多種の遺伝子型のウイルスゲノム断片を合成するための OE-PCR 法を、より迅速・低コストするためのプログラムを開発し、それによって作成したウイルスゲノム断片を用いて設計された degenerate プライマーによる PCR 法が高い感度を持つことを示した。

A. 研究目的

輸血血液のウイルス検査は、現在 NAT 法が用いられているが、新興および再興感染症など発生や、その他の社会的要求によって、検査対象病原体が変化する場合を想定する必要がある。また、血液検査は、検体数が膨大であるため、検査コストや信頼性について、独自に検討を進めていく必要がある。安全体制にイニシアティブを持つという点では、国内の研究組織が独自に開発した検査方法・システムを持つことが望ましい。本研究グループでは、HCV、HBV および HIV1 などの主要な病原体を事例として、血液中のウイルスの検査システムを独自に開発してきた。

前年度より対象としてきたウイルスはいずれも、多くの Genotype が報告されており、かつ、持続的に新しい遺伝子変異株が分離されている。また、HCV および HIV1 では、10 万件以上の塩基配列が報告されているが、プライマーの自動設計をコンピュータに実施させた場合には、塩基配列の増大に伴い、計算時間が莫大になるということが前年度の研究などから示された。従って、Genotype を網羅したプライマー設計のためには、大量のデータを分析・整理して、対象とする塩基配列を限定した上、計算効率の高い方法選択する必要がある。

種々のウイルスのプライマー設計か

ら、混合塩基を含むオリゴマー (degenerate プライマー) がプライマーとして有効であることが報告されてきた。分担者らは、多数の対象塩基配列から対象配列に共通する degenerate プライマーを設計する方法として 6~10 塩基程度のパターン (motif) を選択し、それらを起点として degenerate プライマーを設計するプログラム (Coordination of Common Motifs, CoCoMo アルゴリズム) を開発し、計算効率が高く、共通性の高いプライマーが設計されることを示した。しかしながら、CoCoMo アルゴリズムでは、対象塩基配列間で共通する 6~8 塩基の motif が存在することが必須になるため、相同性が低くなることにより、急速にプライマーの設計効率が減少し、HIV1 などでは、共通プライマーの設計範囲が限定されてしまうことが問題点として挙げられた。

本年度においては、CoCoMo アルゴリズムを原型として、相同性が比較的低い対象ウイルス群でのプライマー設計効率を改善した方法を開発した。そのため、検索する motif をギャップ入りとし、塩基配列を整列させ、さらにプライマーの評価モジュールを導入した。結果として前年度よりも広い範囲のウイルスに共通するプライマーを算出することが可能となった。

設計されたプライマーの実用性を検討するためには、増幅対象となる塩基配列を持つ DNA を用いた PCR 反応が実施された。本研究で対象とするウイルスは多岐にわたっており、既知のウイルス全てを鋳型として準備することは

難しかったため、連結オリゴマー PCR (OE-PCR) 法を用いてプライマーの鋳型となるウイルスゲノム領域を合成した。加えて、一部のウイルスについては、抽出されたウイルス RNA を用いた、RT-PCR も実施された。

これらの試行により、多種の血液中ウイルスに対応可能な PCR 法の設計方法を開発・検証することを、本研究の目的とする。

B. 研究方法

1. 塩基配列の記載方法

塩基配列および degenerate 配列は、Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) による Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences, Recommendations 1984 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html>) に従った。

塩基の縮重性 (degeneracy) は表 1 に従い、積算縮重値 Sd は塩基配列内の全ての degenerate nucleotide の積算縮重値 (degeneracy) を積算した。例えば、ATRYBNCC の場合、degeneracy は $2 \times 2 \times 3 \times 4 = 48$ とした。degeneracy の指標としては、degeneracy と等しい値を得るための 2 の指数も用いた。

2. プライマー設計プログラム群の開発環境

CoCoMo アルゴリズムを実施するためのコンピュータとしては、64bit CPU (Athlon64) および 2G バイトのメモリ

一を搭載したDOS/V仕様パーソナルコンピュータを用いた。プログラムを稼働するためのオペレーティングシステムとしては、Linux (Ubuntu8.04)を用いた。

開発言語としては、Ruby 1.86を、同言語のバイオインフォーマティクス用の拡張モジュールとしては biorubyを、データベースとの接続モジュールとしてはMySQL/Rubyを使用した。鋳型上の6~12塩基のmotifの出現頻度を累計するためのgasソフトをコンパイルおよび稼働するためには、gcc Cコンパイラを使用した。

複数のウイルスの塩基配列を整列させるためには、MAFFTプログラム(MAFFT version 6,

<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>)を用いた。

元遺伝子データ、処理過程の一時データ、予測プライマー塩基配列、位置情報および方向等の付随情報を格納するためのデータベースにはMySQL 5.0 (<http://dev.mysql.com/>)を使用した。

3. 対象ウイルスデータ

各ウイルスの既知のゲノム塩基配列データは、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)よりダウンロードし、biorubyによりMySQLのテーブルに格納した。

4. 2008年度版CoCoMoアルゴリズム (CoCoMo Ver3)の構成

CoCoMo Ver3ではdegenerateプライマーを設計するために下記の順で処理を実施した。

①ウイルスゲノム配列のアライメント(図1A)

テーブルに格納されたデータを、MAFFTプログラムによりアライメントした。アライメント上では、相同性を持つ配列が再構成された配列上で同じ位置にくるように配置され、相同位置までの塩基配列が不足する場合には、“—”の記号(ギャップ)が挿入され、位置の調整が行われた。結果として、“—”の記号を加えて5'端からカウントしたアライメント上での塩基の位置は共通配列上の位置を示すように調整された。

②共通ギャップmotifの検索(図1B)

探索対象とするmotifは、前年度は連続する6~7塩基としたが、このように規定して、旧世界アテナウイルス共通motifを探索した場合、対象ウイルスに共通して存在し、かつアライメント上での共通位置に局在する6塩基motifは非常に少なく、それらのmotifを起点として設計されたプライマーはほとんど見出すことができなかった。そのため、アライメント上の同一位置に存在しながら多数のウイルスに共通して存在するmotifとして、一塩基を検索対象から外したギャップモチーフを用いることとした。このモチーフはATNGCのように4塩基はmotifとしてウイルスゲノム上での位置を探索する対象とするが、中央の1塩基はNに示すようにどのような塩基でも探索上許容することとした。すなわち、ATNGCというギャップモチーフを探索した場合、ウイルスゲノム上のATCGC, ATAGC, ATGGCおよびATTGCの配列が探索対象となる。

このギャップ motif について、全ての対象ウイルスゲノム上での位置を特定しその位置を比較した。すべての対象ウイルス上に存在し、アライメント上での位置が 20 塩基以内であるようなギャップ motif を選択し、共通ギャップ motif とした。

③ degenerate flanking 配列の算出 (図 1C)

前ステップにおいて抽出された共通ギャップ motif について、その 5' 側の 16 塩基を各ウイルスゲノムから抽出し、対象ウイルスで共通する degenerate 配列と degeneracy を算出した。このステップで degeneracy が 1,024 を超える場合には、当該ギャップ motif はプライマー予測対象から外した。

このステップで degeneracy が 1,024 以下と予測された flanking 配列とギャップ motif の連結した配列をプライマー候補 1 とした。

④ プライマー候補 1 の仮想 PCR (図 1D)

個々のプライマー候補 1 については、ギャップ記号が挿入されているアライメント上での位置が記録されているが、元の対象配列ではその位置が記録されていない。そのため、全てのプライマー候補 1 について元配列上の位置と方向を記録した。

続いて、位置の記録を基に、各プライマー候補 1 の 3' 方向 100~600 塩基の範囲について探索プライマーと反対方向のプライマー候補 1 が存在した場合、二本のプライマー候補を PCR 産物を生成するセットとして記録した。PCR プライマーセットの記録にあたって、

セットの候補に使われたプライマー候補 1 を別に保存し、使用されなかったプライマー候補は候補から棄却した。結果として、プライマー候補 1 の一部のみが次段階のプライマーとしてリストに残った。

⑤ PCR に寄与すると予測されたプライマー候補 1 の伸長 (図 1E)

PCR に寄与すると予測されたプライマー候補 1 について、再度標的ゲノム上での 5' 隣接配列を 5 塩基取得してプライマー候補に連結し、プライマーの全長を 26 塩基とした。このことにより、プライマー候補はいずれも 63°C 以上のアニーリング温度を持つことが算出され、後にプライマーのアニーリング温度を 63°C に統一する作業が可能となった。この段階のプライマーをプライマー候補 2 とした。

⑥ 忌避配列を含むプライマー候補 2 の棄却 (図 1F)

CCCCC などの同一塩基の連続または CTCT などのヒトゲノム上に多数存在するリピート配列を含むプライマー候補 2 は、PCR に実際に使用した場合に、非特異的 PCR 産物を生成する可能性が高いため、プライマー候補から棄却した。

⑦ プライマー候補 2 による仮想 PCR (図 1G)

対象ウイルスゲノム上のプライマー候補 2 の位置は、プライマー候補 1 の時点で算出されているが、この位置を基に、④で示した仮想 PCR を実施した。④と同なしく、仮想 PCR の対象となったプライマー候補のみをリストに残し、他を候補から棄却した。

⑧ プライマー候補 2 の塩基長の

調整(図 1H)

プライマー候補 2 について、最近接塩基対法(Nearest Neighbor method)に基づいてアニーリング温度を算出した(http://www.genosys.jp/whatsnew/tm/tm_syosail.html)。プライマー候補 2 が degenerate プライマーである場合は、可能なプライマー塩基配列全てについてアニーリング温度を算出し、平均値を当該プライマーのアニーリング温度とした。アニーリング温度が 64℃を越える場合、各プライマーの 5' 端の 1 塩基を除いた配列について、アニーリング温度を再計算した。5' 端からの塩基の除去は、アニーリング温度が 64℃となるまで繰り返された。結果として、長さは異なるがアニーリング温度が同一のプライマーセット候補がリストに残り、これをプライマー候補 3 とした。

⑨ プライマー候補 3 の評価(図 1I)

プライマー候補 3 について、セルフダイマーの形成とヘアピン構造の形成について、塩基配列内の相補配列を探索することにより予測した。セルフダイマーの形成とヘアピン構造については、アニーリング温度も算出し、セルフダイマーについては 20℃以上ヘアピン構造については 16℃以上が予測された場合、それらの構造が安定で、PCR に使用した場合に副次産物が大量に形成されることが予測されるため、候補から棄却した。これらの棄却の対象とならなかったプライマー候補をプライマー候補 4 とした。

⑩ プライマー候補 4 による仮想 PCR(図 1J)

プライマー候補 4 について④に述べ

た方法で計算上の PCR 産物の形成を予測した。プライマー候補 4 は、いずれかの PCR 産物の形成に関与することが⑧で明らかであるため、PCR を形成する二本のプライマー候補 4 をプライマーペア候補とした。

⑪ プライマーペア候補の評価(図 1K)

リストされた各プライマーペア候補についてプライマーダイマーの形成とそのアニーリング温度を予測した。アニーリング温度が 20℃を越える場合、当該ペアをプライマーペアリストから棄却した。この時点でリストに残ったプライマーおよびプライマーペアを最終的なプライマーセットとした。

各プライマーセットについては、プライマーの配列と forward および reverse プライマーの degeneracy、ゲノム上の平均位置、PCR 産物の平均サイズ、および forward および reverse プライマーの degeneracy の合計値を記録した。

⑫ プライマーペアの順位づけ

①から⑩の過程を通じてリストに残ったプライマーセットについて、degeneracy の合計値の低い順に順位を付けた。続いて、同一の合計 degeneracy を持つプライマーセットについては、PCR 産物の平均サイズが低い順に順位を付け、高い順位のを鋳型のゲノム断片を合成し、検証実験を行う合成プライマー候補とした。

5. プライマー検証のためのウイルスゲノム断片の合成

① DNA 合成用連結オリゴマー設計

プログラム(図2)

設計されたプライマーの増幅効率を検討するためには、プライマーの鋳型となる種々のウイルス断片が必要となるが、実験室では入手および取り扱いが困難なウイルスも存在するため、連結するオリゴマーをアニーリングおよびPCRすることにより100~400塩基程度のDNA断片を合成した(OE-PCR法)。OE-PCR法に用いる19~60塩基のオリゴマーは、基本的にはDNA Works2プログラムに基づいて設計された(図2、

<http://mell.nceiferf.gov/dnaworks/dnaworks2.html>)。本研究では、多数のゲノム断片を合成する必要があったため、OE-PCRのためのオリゴマーを設計するプログラムを、Hoover

とLubkowskiの方法(Hoover and Lubkowski, 2002)に従い作成した。

すなわち、合成対象となる塩基配列の5'端からアニーリング温度が70℃と予測される長さの塩基配列を第一オリゴマーとして設定し、続けて、第一オリゴマーの3'端からアニーリング温度が60℃となるように第二オリゴマーとの重複領域を設定した。続けて第一オリゴマーと相補的で第一オリゴマーとの重複部分を含めた配列長が55塩基程度のオリゴマーを設計し、第二オリゴマーとした。さらに、この第二オリゴマーの5'端からアニーリング温度が60℃となるように第三オリゴマーとの重複領域を設定した。このオリゴマーを追加する作業を対象塩基配列の5'端まで繰り返した。

設定されたオリゴマーは、全て依頼合成され、OE-PCR反応に用いられた。

②OE-PCR反応

OE-PCRは、3'→5' exonuclease 活性を持つ耐熱性DNA polymerase (PrimeStar HS)により実施された。

すなわち、5×PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μl、1×dNTP Mixture (2.5 mM) 4 μl、2 pmol の各 Oligomer、およびPrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μl) 0.5 μl と滅菌蒸留水を up to 50 μl となるように混合し、[98℃ 10 sec - 60℃ 5 sec - 72℃ 10sec]の条件で30 サイクル反応し、一次鋳型を作成した。続けて、5×PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μl、1×dNTP Mixture (2.5 mM) 4 μl、20 pmol 5' 端の Oligomer、20 pmol 3' 端の Oligomer および PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μl) 0.5 μl と滅菌蒸留水を up to 50 μl となるように混合し、[98℃ 10 sec - 60℃ 5 sec - 72℃ 10sec]の条件で30 サイクル反応し、プライマー検証用鋳型を作成した。

プライマー検証用鋳型は、10⁹~1 copy になるように純水で希釈され、degenerate プライマーの鋳型として使用された。

6. degenerate プライマーによる PCR

OE-PCR 反応により作成されたウイルスゲノム断片を鋳型とした degenerate プライマーによる PCR は、GoTaq Green PCR Mix (プロメガ)によって実施された。反応条件としては、タッチダウン PCR 法を用いた。

すなわち、2×GoTaqMix (Mg²⁺ plus) 12.5 μl、50 pmol の各 degenerate プライマー、OE-PCR で作成された鋳型 DNA

に滅菌蒸留水を 25 μ l となるように混合し、反応溶液とした。

反応は 95°C 1 min の後、[94°C 30 sec — 67°C 30 sec — 72°C 60 sec] の反応を一回おこない、続けて、[94°C 30 sec — 66°C 30 sec — 72°C 60 sec] の反応を一回行った。このように各回アニーリング温度を 1°C ずつ下げつつ 10 サイクルの反応を実施した。

続けて、[94°C 30 sec — 55°C 30 sec — 72°C 60 sec] の反応条件で 20 サイクルの反応をした。

7. マイクロチップゲル電気泳動

メーカーの手順書に従い、PCR 反応後の反応溶液を機器にセットし、分析した。本報告では、100~400 塩基の PCR 産物が分析対象となったため、分離緩衝液として DNA-500 Separation buffer (島津) を、マーカーとして DNA-500 marker for MultiNA (島津) を用いた。

C. 研究結果

3-1. HCV

Genotype 1-6 に分類される Subtype ウイルスゲノム 24 件の塩基配列データ (表 2) を元にプライマーを設計した。ギャップ motif の局在に基づく CoCoMo アルゴリズムによる分析結果として 150 種のプライマーが予測された (表 3)。degeneracy が低く、増幅産物のサイズが比較的小さいプライマーセットを選択し、degenerate プライマーの鋳型となるゲノムフラグメントを予測した (表 4) とし、相同性の高さから 8 個のグループに分けることができた。各グ

ループについて、OE-PCR によりゲノムフラグメントを合成するため、オリゴマーを設計した (表 6)。

OE-PCR の結果全ての合成ゲノムフラグメントについて、バンドが確認された (図 3)。これらのバンドの PCR 産物を定量後、 $10^9 \sim 1$ copy となるように純水で希釈し、degenerate プライマーにより増幅試験を実施したところ、全ての Genotype について、予想されたサイズのバンドが 1 copy の鋳型についても観察された (図 4)。

3-2. HBV

Genotype A~H に分類される 8 件の塩基配列データ (表 7) を元にプライマーを設計した。ギャップ motif の局在に基づく CoCoMo アルゴリズムによる分析結果として 1000 種以上のプライマーが予測された (表 8)。degeneracy が低く、増幅産物のサイズが比較的小さいプライマーセットを選択し、degenerate プライマーの鋳型となるゲノムフラグメントを予測した (表 9)。それらの配列に基づき各 Genotype について、OE-PCR によりゲノムフラグメントを合成するため、オリゴマーを設計した (表 10)。

OE-PCR の結果全ての合成ゲノムフラグメントについて、バンドが確認された (図 5)。これらのバンドの PCR 産物を定量後、 $10^9 \sim 1$ copy となるように純水で希釈し、degenerate プライマーにより増幅試験を実施したところ、全ての Genotype について、予想されたサイズのバンドが 1 copy の鋳型についても観察された (図 6)。

3-3. HIV-1

Genotype A~H に分類される 8 件の塩基配列データ (表 11) を元にプライマーを設計した。ギャップ motif の局在に基づく CoCoMo アルゴリズムによる分析結果として 1000 種以上のプライマーが予測された (表 12)。degeneracy が低く、増幅産物のサイズが比較的小さいプライマーセットを選択し、degenerate プライマーの鋳型となるゲノムフラグメントを予測した (表 13)。それらの配列に基づき各 Genotype について、OE-PCR によりゲノムフラグメントを合成するため、オリゴマーを設計した (表 14)。

OE-PCR の結果、全ての合成ゲノムフラグメントについて、バンドが確認された (図 7)。これらのバンドの PCR 産物を定量後、 $10^9 \sim 1$ copy となるように純水で希釈し、degenerate プライマーにより増幅試験を実施したところ、Genotype A~G についてはゲノムフラグメント 10^5 copy まで、Genotype H についてはゲノムフラグメント 10^9 copy まで、予想されたサイズのバンドが観察された (図 8)。

3-4. HEV

GenBank 上に登録されている Genotype 1-4 HEV、Avian HEV および Swine HEV のゲノム塩基配列をダウンロード後、ホモロジーの高い配列をグループ化したところ 15 件の配列に集約された (表 15) ため、これらの塩基配列を元に degenerate プライマーを設計した。ギャップ motif の局在に基づく CoCoMo アルゴリズムによる分析結果として 1000 種以上のプライマーが予測された (表 16)。

続けて、degeneracy が低く、増幅産物のサイズが比較的小さいプライマーセットを選択し、degenerate プライマーの鋳型となるゲノムフラグメントを予測した (表 17)。それらの配列に基づき各 Genotype について、OE-PCR によりゲノムフラグメントを合成するため、オリゴマーを設計した (表 18)。

OE-PCR の結果、全ての合成ゲノムフラグメントについて、バンドが確認された (図 9)。これらのバンドの PCR 産物を定量後、 $10^9 \sim 1$ copy となるように純水で希釈し、degenerate プライマーにより増幅試験を実施したところ、ID 1, 150, 335, 756, 1142, 1567, 1568 および 2095 の鋳型についてはゲノムフラグメント 10^5 copy まで、ID 335, 533 および 1731 の鋳型についてはゲノムフラグメント 10^7 copy まで、予想されたサイズのバンドが観察された (図 10)。

3-5. West Nile virus

GenBank 上に登録されている West Nile virus のゲノム塩基配列をダウンロード後、ホモロジーの高い配列をグループ化したところ 10 件の配列に集約された (表 19) ため、これらの塩基配列を元に degenerate プライマーを設計した。ギャップ motif の局在に基づく CoCoMo アルゴリズムによる分析結果として 1000 種以上のプライマーが予測された (表 20)。

3-6. Human Parvovirus B19

GenBank 上に登録されている Human Parvovirus B19 のゲノム塩基配列をダウンロード後、ホモロジーの高い配列

をグループ化したところ7件の配列に集約された(表21)ため、これらの塩基配列を元に degenerate プライマーを設計した。ギャップ motif の局在に基づく CoCoMo アルゴリズムによる分析結果として1000種以上のプライマーが予測された(表22)。

D. 考察

本研究では、前年度に開発した CoCoMo プライマー設計アルゴリズムを進展させ、相同性の比較的低いウイルスグループにも適用可能なプログラムを開発した。プログラムの新興・再興感染症への適用の可能性を検討するために、HCV, HBV, HIV-1, HEV, West Nile virus および Parvovirus B19 についてそれぞれ共通プライマーを設計した。前年度の方法では、6塩基 motif について配列および位置が一致ものを探索するが、HIV-1 や HEV などでは配列とおよその位置が一致する motif は見いだされずプライマーは設計されなかったのに対し(結果示さず)、本年度は、対象ウイルスグループのすべてについて共通プライマーが設計された。

degenerate プライマーを motif の局在を基に予測するプログラムは、前年度に初期バージョンが開発され、相互にホモロジーが高いウイルス集団に対して有効な設計が行われた(CoCoMo Ver1)。degenerate プライマーの設計プログラムは、一般的に対象配列数が増えるごとに、また、それぞれの長さが増大するごとに、級数的に計算時間が増大するが、motif の局在に基づく CoCoMo Ver1 は、多数の配列に対しても、

計算時間の増大を抑えて短時間でプライマー設計を可能にした。このことから、motif に基づくプライマー設計という方法は、有効性の高い方法であることが示唆された。

本年度においては、前年度に開発した方法(CoCoMo Ver1)を改善して、アミノ酸配列を、効率よくプライマー設計につなげるアルゴリズムを検討した。その結果、コドンとの同調が可能な1塩基のギャップを含む4塩基の motif が、有効な探索用 motif として考案された(CoCoMo Ver3)。

本年度改善されたプログラムは、前年度に比べて、多様性の高いウイルス群に対する設計効率が高かった。この効率の高さは、ウイルス間共通のギャップ motif が多数存在することと関係していると考えられる。本年度用いたギャップ motif は2組の2塩基の固定塩基の motif に、1塩基の自由塩基を加えたものであるが、2塩基一致の後1塩基は相異を許容するという探索方法は、コドンの縮重のパターンと一致しており、アミノ酸コードの変化を伴わないサイレントな変異の影響を受容するデザインとなっている。そのため、アミノ酸配列が一致する蛋白質レベルでの保存領域で、多くプライマー設計用の motif が検出されたものと考えられる。

ギャップ motif は、2アミノ酸残基のウイルス間の一致に伴って検出されてしまうため、多数の同一配列のギャップ motif が記録され、適切な選択を行わなければ、プライマーの予測には莫大な計算時間が必要になる。そのため、本年度は、motif 選定過程にホモロ

ジーに基づくアライメント(整列)過程を導入した。複数の候補から、精度と計算時間の短さから MAFFT プログラムが選定された。このプログラムの導入により、多数のギャップ motif 一致点から、ウイルス塩基配列上の相同領域を示すギャップ motif 一致点を選択することが可能となった。続けて、仮想 PCR を実施することにより、プライマーとして有効な配列が効率良く選択された。

本年度は、アニーリング温度の算出についても高速のプログラムを整備した。その結果、設計されたプライマー候補についての熱力学的な評価が可能となり、一般的なプライマー設計プログラムと同等の性能をプログラム内に持つに至った。

今回、CoCoMo Ver3 プログラムにより設計されたプライマーについては、HCV および HBV では 1 copy までの検出感度が示された(図 4 および 6)。それに対して HIV-1 および HEV では、感度は $10^7 \sim 10^5$ にとどまった。これらの双方のウイルスについて、プライマーは多数予測されたため、今後も継続して感度の高いプライマーを探索することにより、感度の高い検出法を設計できる可能性はある。それらの試験データは、感度と degeneracy や鋳型配列との関係

などを推測するための基礎データとして有用であることが期待される。

HEV, West Nile virus および ParvoB19 virus については、報告されている Genotype や subtype が必ずしもプライマー設計に有効ではなかった、本年度は、それらの設計のためにホモロジーが高い分離株をひとつのグループとして、プライマーの設計を行った。結果として、PCR 試験が行われた HEV では良好な結果が得られなかったが、今後の検討によって改善が得られた場合、ホモロジーに基づくグループ分けとその自動化が、プライマー設計上重要な方法になることが予測される。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 著作権を設定し、公表予定のプログラムコード：省略

8. 図表

表1 塩基配列のコードと degeneracy

コード	意味	コードの由来	degeneracy
G	G	Guanine	1
A	A	Adenine	1
T	T	Thymine	1
C	C	Cytosine	1
R	G or A	puRine	2
Y	T or C	pYrimidine	2
M	A or C	aMino	2
K	G or T	Keto	2
S	G or C	Strong interaction (3 H bonds)	2
W	A or T	Weak interaction (2 H bonds)	2
H	A or C or T	not-G, H follows G in the alphabet	3
B	G or T or C	not-A, B follows A	3
V	G or C or A	not-T (not-U), V follows U	3
D	G or A or T	not-C, D follows C	3
N	G or A or T or C	aNy	4

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

Accession	Geno type	Sub type	Definition	Length
AF271632	1	1a	Hepatitis C virus subtype 1a clone pHCV-1/SF9 A complete genome	9618
AB435162	1	1b	Hepatitis C virus subtype 1b genomic RNA complete genome hiroshima acute hepatitis clone: HCV-KT9	9621
AM910652	1	1g	Hepatitis C virus subtype 1g complete genome	9490
AF177036	2	2a	Hepatitis C virus subtype 2a strain HC-J6CH clone pJ6CF complete genome	9711
AF238486	2	2b	Hepatitis C virus subtype 2b strain MD2b-1 complete genome	9416
EU204645	3	3a	Recombinant Hepatitis C virus S52/JFH1 complete genome	9684
FJ393024	5	5a	Recombinant Hepatitis C Virus SA13/JFH1 complete genome	9669
EU246930	6	6a	Hepatitis C virus strain D9 polyprotein gene complete cds	9376
EF424629	6	6c	Hepatitis C virus subtype 6c isolate Th846 complete genome	9459
DQ314805	6	6e	Hepatitis C virus subtype 6e isolate GX004 complete genome	9468
DQ835764	6	6f	Hepatitis C virus subtype 6f isolate C-0046 complete genome	9454
DQ314806	6	6g	Hepatitis C virus subtype 6g isolate HK6554 complete genome	9462
DQ835762	6	6i	Hepatitis C virus subtype 6i isolate C-0159 complete genome	9458
DQ835769	6	6j	Hepatitis C virus subtype 6j isolate Th553 complete genome	9454
DQ278891	6	6k	Hepatitis C virus subtype 6k isolate KM45 complete genome	9440
EF424628	6	6l	Hepatitis C virus subtype 6l isolate 537796 complete genome	9453
DQ835763	6	6m	Hepatitis C virus subtype 6m isolate C-0208 complete genome	9450
DQ835768	6	6n	Hepatitis C virus subtype 6n isolate D86/93 complete genome	9447
EF424627	6	6o	Hepatitis C virus subtype 6o isolate QC227 complete genome	9450
EF424626	6	6p	Hepatitis C virus subtype 6p isolate QC216 complete genome	9453
EF424625	6	6q	Hepatitis C virus subtype 6q isolate QC99 complete genome	9463
EF632069	6	6t	Hepatitis C virus isolate TV241 complete genome	9460
EF589161	4	4f	Hepatitis C virus subtype 4f strain IFBT88 polyprotein gene partial cds	9304
DQ516083	4	4d	Hepatitis C virus subtype 4d isolate 24 polyprotein gene complete cds	9300

表3 CoCoMo プログラムによって予測された HCV Genotype 共通プライマーセット

Pair ID	Primer ID (Forward)	塩基配列(Forward)	平均位置 (Forward)	Primer ID (Reverse)	塩基配列 (Reverse)	平均位置 (Reverse)	予想サイズ	プライマーの degeneracy 指数 ¹
1	120	CGATAGTGGTCTGCCGAACCGGTGA	129.9583	157	TAGCRGTCTYCGGGGGCACGCCCA	236.2083	106.25	2
2	87	GGGAGRSOCATAGTGTCTGCCGAA	122.9583	157	TAGCRGTCTYCGGGGGCACGCCCA	236.2083	113.25	2
3	140	GGAAATYRCCRGRAHQACHGGGTCT	181.9583	202	GGCCTTSGCRACDDAAARCTACTC	284.2083	102.25	3
4	137	ATYRCCRGRAHQACHGGGTCTCTTC	184.9583	188	GTACDACAAGGCCTTSGCRACCCA	273.2083	108.25	4
5	99	CCCTCCCGGGAGRSOCATAGTGGT	114.9583	142	GCCCAAATBDCRCRCAYWAGHGG	216.2083	101.25	7
6	283	AGTGCCCGGGAGGTCTCGTAGMCC	302.2083	347	TCTGDCRCRCRCYGGRAACTTDAC	413.2083	111	8
7	87	CCTCCAGMYCCCTCCCGGGAG	102.9583	142	GCCCAAATBDCRCRCAYWAGHGG	216.2083	113.25	8
8	285	GYGCTTGCRAGTGCCCGGGAGGTG	293.2083	347	TCTGDCRCRCRCYGGRAACTTDAC	413.2083	120	8
9	283	AGTGCCCGGGAGGTCTCGTAGMCC	302.2083	359	VGADACTCCRCRCYGGRAACTTDAC	431.2083	129	8
10	285	GYGCTTGCRAGTGCCCGGGAGGTG	293.2083	359	VGADACTCCRCRCYGGRAACTTDAC	431.2083	138	8
11	283	AGTGCCCGGGAGGTCTCGTAGMCC	302.2083	374	CACCCAANCKNGGGCCCTGGCGGG	461.2083	159	8
12	283	TTGCRAGTGCCCGGGAGGTGTGGT	297.2083	338	GRAACTTDACRTYDKWGGRCRCG	398.2083	101	10
13	285	GYGCTTGCRAGTGCCCGGGAGGTG	293.2083	338	GRAACTTDACRTYDKWGGRCRCG	398.2083	105	10
14	112	CTGGGAAACGGTGAGTWCACCGGA	139.9583	184	RACCCAACRCCTACTGGGCTAGCRGT	254.2083	114.25	10
15	288	GCCTGGGAGGTCTCGTAGMCCGTG	305.2083	375	GCACACCAANCKNGGGCCCTGCG	464.2083	159	12
16	305	CTCGTAGMCCGTGCAHCATGAGCAC	317.2083	359	VGADACTCCRCRCYGGRAACTTDAC	431.2083	114	14
17	305	CTCGTAGMCCGTGCAHCATGAGCAC	317.2083	374	CACCCAANCKNGGGCCCTGGCGGG	461.2083	144	14
18	305	CTCGTAGMCCGTGCAHCATGAGCAC	317.2083	370	GCACACCAANCKNGGGCCCTGCG	465.2083	148	14
19	380	GHTACBTRYDCCGGCAGGGGCC	433.2083	457	CNABRASNGGATRTAYCCAYGAG	746.2083	313	14
20	305	CTCGTAGMCCGTGCAHCATGAGCAC	317.2083	344	CVRCGATCTGDCRCRCYGGRAA	419.2083	102	15
21	420	GGGCRGGDTGGYTBCTSTCHCCBCG	611.2083	457	CNABRASNGGATRTAYCCAYGAG	746.2083	135	15
22	380	GHTACBTRYDCCGGCAGGGGCC	433.2083	446	WRTCGATGACYTRCCMANRTTVCG	698.2083	285	15
23	380	GHTACBTRYDCCGGCAGGGGCC	433.2083	450	DARNCCRCWNGTNADGGWRTCGATG	715.2083	282	15
24	351	THAAGTYCCRGYGGYGGHCAGAT	398.2083	446	WRTCGATGACYTRCCMANRTTVCG	698.2083	300	15
25	351	THAAGTYCCRGYGGYGGHCAGAT	398.2083	450	DARNCCRCWNGTNADGGWRTCGATG	715.2083	317	15
26	358	GYGGYGGHCAGATGVBGGYGAAGT	410.2083	457	CNABRASNGGATRTAYCCAYGAG	746.2083	336	15
27	420	GGGCRGGDTGGYTBCTSTCHCCBCG	611.2083	450	DARNCCRCWNGTNADGGWRTCGATG	715.2083	104	16
28	380	GHTACBTRYDCCGGCAGGGGCC	433.2083	435	NRTTVCGNGAYYKHYGCCGGGRTG	680.2083	247	16
29	351	THAAGTYCCRGYGGYGGHCAGAT	398.2083	435	NRTTVCGNGAYYKHYGCCGGGRTG	680.2083	282	16
30	358	GYGGYGGHCAGATGVBGGYGAAGT	410.2083	446	WRTCGATGACYTRCCMANRTTVCG	698.2083	288	16
31	358	GYGGYGGHCAGATGVBGGYGAAGT	410.2083	450	DARNCCRCWNGTNADGGWRTCGATG	715.2083	305	16
32	351	THAAGTYCCRGYGGYGGHCAGAT	398.2083	455	SNGGDATRTAYCCAYGAGRTCCG	740.2083	342	16
33	425	GNTGGCRGGDTGGYTBCTSTCHCC	608.2083	457	CNABRASNGGATRTAYCCAYGAG	746.2083	138	17
34	380	GHTACBTRYDCCGGCAGGGGCC	433.2083	430	KHYGCCGGGRTCDKTBGGSCCCCA	668.2083	235	17
35	358	GYGGYGGHCAGATGVBGGYGAAGT	410.2083	435	NRTTVCGNGAYYKHYGCCGGGRTG	680.2083	270	17
36	351	THAAGTYCCRGYGGYGGHCAGAT	398.2083	430	KHYGCCGGGRTCDKTBGGSCCCCA	668.2083	270	17
37	340	CHDHCCGCGYCCMHMRGAYTHAA	377.2083	446	WRTCGATGACYTRCCMANRTTVCG	698.2083	321	17
38	420	GGGCRGGDTGGYTBCTSTCHCCBCG	611.2083	448	RNCCRCWNGTNADGGWRTCGATGAC	713.2083	102	18
39	425	GNTGGCRGGDTGGYTBCTSTCHCC	608.2083	450	DARNCCRCWNGTNADGGWRTCGATG	715.2083	107	18

40	305	CTCGTAGMCCGTGCAHCATGAGCAC	317.2083	389	CNGARGTYTTHCKHRYGGCGGCAC	485.2083	168	18
41	380	GTHTACBTRYTDCCGGCAGGGGCC	433.2083	416	CDCGVGGDGASAGVARCCAHCYGC	629.2083	196	18
42	351	THAAGTTYCCRRGGYGGYGGHCAGAT	398.2083	416	CDCGVGGDGASAGVARCCAHCYGC	629.2083	231	18
43	420	GGGCRGGDTGGYTBCTSTCHCCBGG	611.2083	477	DRAAGATAGARAARGAGCAACCRGG	857.2083	246	18
44	420	GGGCRGGDTGGYTBCTSTCHCCBGG	611.2083	474	MARNADRAAGATAGARAARGAGCAA	862.2083	251	18
45	358	GYGGYGGHCAGATCGYBGGYGGAGT	410.2083	430	KHYGCCGGGRTCDKTBGGSCCCCA	668.2083	258	18
46	390	GGGGCCCNMGNTTGGGTGTGCGCGC	452.2083	457	CNABRASNGDATRTAYCCAYGAG	746.2083	294	18
47	340	CHDHCCGYCGYCCWMMHRGAYGTHAA	377.2083	435	NRTTVCGNGAYYKHYYGGGGGRTG	680.2083	303	18
48	380	GTHTACBTRYTDCCGGCAGGGGCC	433.2083	473	AGCAACCRGGNARRTTBCKGTTGG	842.2083	409	18
49	331	GAGCACRMWCCWAAACCBCAAAGA	336.2083	374	GACCCAAHCKNGGGCCCGTGGCGGG	461.2083	125	19
50	331	GAGCACRMWCCWAAACCBCAAAGA	336.2083	370	CGCACACCCGAANCKNGGGCCCGTGG	465.2083	129	19
51	442	CNCGBAAYNTKGGYARRGTATCGA	680.2083	477	DRAAGATAGARAARGAGCAACCRGG	857.2083	177	19
52	442	CNCGBAAYNTKGGYARRGTATCGA	680.2083	474	MARNADRAAGATAGARAARGAGCAA	862.2083	182	19
53	438	MHGAYCCCCGCRDMRRTCNCGBAA	662.2083	477	DRAAGATAGARAARGAGCAACCRGG	857.2083	195	19
54	438	MHGAYCCCCGCRDMRRTCNCGBAA	662.2083	474	MARNADRAAGATAGARAARGAGCAA	862.2083	200	19
55	433	NHVBTGGGGCCVAMHGAYCCCCGG	648.2083	477	DRAAGATAGARAARGAGCAACCRGG	857.2083	208	19
56	433	NHVBTGGGGCCVAMHGAYCCCCGG	648.2083	474	MARNADRAAGATAGARAARGAGCAA	862.2083	214	19
57	358	GYGGYGGHCAGATCGYBGGYGGAGT	410.2083	416	CDCGVGGDGASAGVARCCAHCYGC	629.2083	219	19
58	390	GGGGCCCNMGNTTGGGTGTGCGCGC	452.2083	446	WRTCGATGACYTTRCCMANRTTVCG	698.2083	248	19
59	390	GGGGCCCNMGNTTGGGTGTGCGCGC	452.2083	450	DARNCCROWNGTNADGGWRTCGATG	715.2083	263	19
60	340	CHDHCCGYCGYCCWMMHRGAYGTHAA	377.2083	430	KHYGCCGGGRTCDKTBGGSCCCCA	668.2083	291	19
61	326	HCATGAGCACRMWCCWAAACCBCA	332.2083	416	CDCGVGGDGASAGVARCCAHCYGC	629.2083	297	19
62	340	CHDHCCGYCGYCCWMMHRGAYGTHAA	377.2083	451	ARNCCROWNGTNADGGWRTCGATG	714.2083	337	19
63	351	THAAGTTYCCRRGGYGGYGGHCAGAT	398.2083	407	KDGSYTSBGAYSGYTCHARGTYTT	500.2063	102	20
64	425	GNTGGGCRGGDTGGYTBCTSTCHCC	608.2083	448	RNCROWNGTNADGGWRTCGATGAC	713.2083	105	20
65	340	CHDHCCGYCGYCCWMMHRGAYGTHAA	377.2083	389	CNGARGTYTTHCKHRYGGCGGCAC	485.2083	108	20
66	458	THGCCGAYCTCRTGGRTAYATHCC	722.2083	477	DRAAGATAGARAARGAGCAACCRGG	857.2083	135	20
67	458	THGCCGAYCTCRTGGRTAYATHCC	722.2083	474	MARNADRAAGATAGARAARGAGCAA	862.2083	140	20
68	380	GTHTACBTRYTDCCGGCAGGGGCC	433.2083	415	AVCCDCGVGGDGASAGVARCCAHC	632.2083	198	20
69	390	GGGGCCCNMGNTTGGGTGTGCGCGC	452.2083	435	NRTTVCGNGAYYKHYYGGGGGRTG	680.2083	228	20
70	351	THAAGTTYCCRRGGYGGYGGHCAGAT	398.2083	415	AVCCDCGVGGDGASAGVARCCAHC	632.2083	234	20
71	425	GNTGGGCRGGDTGGYTBCTSTCHCC	608.2083	477	DRAAGATAGARAARGAGCAACCRGG	857.2083	249	20
72	340	CHDHCCGYCGYCCWMMHRGAYGTHAA	377.2083	416	CDCGVGGDGASAGVARCCAHCYGC	629.2083	252	20
73	425	GNTGGGCRGGDTGGYTBCTSTCHCC	608.2083	474	MARNADRAAGATAGARAARGAGCAA	862.2083	254	20
74	401	TGGGTGTGCGGCRRYDMQDAARAC	464.2083	457	CNABRASNGDATRTAYCCAYGAG	746.2083	282	20
75	458	THGCCGAYCTCRTGGRTAYATHCC	722.2083	503	GNSHCCARTTWCATGATRTCCCA	1307.208	585	20
76	459	CNWGYGNYTHGCCGAYCTCRTGGG	713.2083	477	DRAAGATAGARAARGAGCAACCRGG	857.2083	144	21
77	459	CNWGYGNYTHGCCGAYCTCRTGGG	713.2083	474	MARNADRAAGATAGARAARGAGCAA	862.2083	149	21
78	380	GTHTACBTRYTDCCGGCAGGGGCC	433.2083	410	TNSCRTANAGRGGCCADGSRANCC	587.2083	154	21
79	414	CHTGGCCYCTNTAYGNAAYGARGG	578.2083	457	CNABRASNGDATRTAYCCAYGAG	746.2083	168	21
80	351	THAAGTTYCCRRGGYGGYGGHCAGAT	398.2083	410	TNSCRTANAGRGGCCADGSRANCC	587.2083	189	21
81	390	GGGGCCCNMGNTTGGGTGTGCGCGC	452.2083	430	KHYGCCGGGRTCDKTBGGSCCCCA	668.2083	216	21
82	358	GYGGYGGHCAGATCGYBGGYGGAGT	410.2083	415	AVCCDCGVGGDGASAGVARCCAHC	632.2083	222	21
83	401	TGGGTGTGCGGCRRYDMQDAARAC	464.2083	446	WRTCGATGACYTTRCCMANRTTVCG	698.2083	234	21
84	401	TGGGTGTGCGGCRRYDMQDAARAC	464.2083	450	DARNCCROWNGTNADGGWRTCGATG	715.2083	251	21
85	380	GTHTACBTRYTDCCGGCAGGGGCC	433.2083	467	CKGTTGCRWARTTNAYSCCRTCYTC	824.2083	391	21

86	390	GGGGCCCNMGNTTGGGTGTGGCGGC	452.2083	477	DRAAGATAGARAARGAGCAACCRGG	857.2083	405	21
87	390	GGGGCCCNMGNTTGGGTGTGGCGGC	452.2083	474	MARNADRAAGATAGARAARGAGCAA	862.2083	410	21
88	459	CNWGYGGNYTHGCCGAYCTORTGGG	713.2083	503	GNSHCCARTTCWKCATCATRTCCCA	1307.208	594	21
89	340	CHDHCCGYCYCCWMHRGAYGTHAA	377.2083	388	TYTTHCKHRYYGCCGACACCCAA	479.2083	102	22
90	414	CHTGGCCYCTNTAYGSHAAYGARGG	578.2083	446	WRTCGATGACYYTRCCMARNTTVCG	698.2083	120	22
91	414	CHTGGCCYCTNTAYGSHAAYGARGG	578.2083	450	DARNCRCROWGNADGGWRTCGATG	715.2083	137	22
92	358	YGGYGGHAGATCGYBGGYGGAGT	410.2083	410	TNSCRTANAGRGCCADGSRATANCC	587.2083	177	22
93	390	GGGGCCCNMGNTTGGGTGTGGCGGC	452.2083	416	CDGCGVGGDGASAGVARCCAHCCYGC	629.2083	177	22
94	420	GGGCGGDTGGYBCTSTCHCCBCG	811.2083	467	CKGTTGCRWARTTNAYSCORTCYTC	824.2083	213	22
95	401	TGGGTGTGCGCRRYDMGDAARAC	464.2083	435	NRTTVCGNGAYYKHYGCCGGGRTC	880.2083	216	22
96	326	HCATGAGCACRMWCCWAAACBCA	332.2083	410	TNSCRTANAGRGCCADGSRATANCC	587.2083	255	22
97	340	CHDHCCGYCYCCWMHRGAYGTHAA	377.2083	415	AVCCDGGVGGDGASAGVARCCAHCC	632.2083	255	22
98	324	TGAGCACRMWCCWAAACBCAAAG	335.2083	415	AVCCDGGVGGDGASAGVARCCAHCC	632.2083	297	22
99	468	ARGAYGSRNTNAYTYGCAACMG	809.2083	503	GNSHCCARTTCWKCATCATRTCCCA	1307.208	498	22
100	414	CHTGGCCYCTNTAYGSHAAYGARGG	578.2083	435	NRTTVCGNGAYYKHYGCCGGGRTC	880.2083	102	23
101	442	CNCGBAAYNTKGGYARRGTCTCGA	680.2083	467	CKGTTGCRWARTTNAYSCORTCYTC	824.2083	144	23
102	331	GAGCACRMWCCWAAACBCAAAGA	336.2083	389	CNGARGYTTTHCKHRYYGCCGGAC	485.2083	149	23
103	438	MHGAYCCCGGCRDRRTTGNCGBAA	682.2083	467	CKGTTGCRWARTTNAYSCORTCYTC	824.2083	162	23
104	380	GTHTACBTRYDCCGGCAGGGGGC	433.2083	413	DNCCYCTRTTNSCRTANAGRGCCA	596.2083	163	23
105	433	NHVBTTGGGSCCVAMHGAYCCCGG	648.2083	467	CKGTTGCRWARTTNAYSCORTCYTC	824.2083	176	23
106	351	THAAGTTYCCRRGGYGGYGGHAGAT	398.2083	413	DNCCYCTRTTNSCRTANAGRGCCA	596.2083	198	23
107	401	TGGGTGTGCGCRRYDMGDAARAC	464.2083	430	KHYGCCGGGGRTCDKTBGGSCCCCA	668.2083	204	23
108	340	CHDHCCGYCYCCWMHRGAYGTHAA	377.2083	410	TNSCRTANAGRGCCADGSRATANCC	587.2083	210	23
109	331	GAGCACRMWCCWAAACBCAAAGA	336.2083	416	CDGCGVGGDGASAGVARCCAHCCYGC	629.2083	293	23
110	401	TGGGTGTGCGCRRYDMGDAARAC	464.2083	477	DRAAGATAGARAARGAGCAACCRGG	857.2083	393	23
111	401	TGGGTGTGCGCRRYDMGDAARAC	464.2083	474	MARNADRAAGATAGARAARGAGCAA	862.2083	398	23
112	492	YTNCYGGTGTCTCYTTYTATCT	838.2083	503	GNSHCCARTTCWKCATCATRTCCCA	1307.208	469	23
113	349	HAAAGTTYCCRRGGYGGYGGHAGATC	399.2083	407	KDGSYTSBGAYSQYTCNGARGTYTT	500.2083	101	24
114	458	THGCCGAYCTORTGGRTAYATHCC	722.2083	467	CKGTTGCRWARTTNAYSCORTCYTC	824.2083	102	24
115	401	TGGGTGTGCGCRRYDMGDAARAC	464.2083	416	CDGCGVGGDGASAGVARCCAHCCYGC	629.2083	165	24
116	390	GGGGCCCNMGNTTGGGTGTGGCGGC	452.2083	415	AVCCDGGVGGDGASAGVARCCAHCC	632.2083	180	24
117	358	YGGYGGHAGATCGYBGGYGGAGT	410.2083	413	DNCCYCTRTTNSCRTANAGRGCCA	596.2083	186	24
118	425	GNTGGGCRGDDTGGYBCTSTCHCC	608.2083	467	CKGTTGCRWARTTNAYSCORTCYTC	824.2083	216	24
119	326	HCATGAGCACRMWCCWAAACBCA	332.2083	413	DNCCYCTRTTNSCRTANAGRGCCA	596.2083	264	24
120	414	CHTGGCCYCTNTAYGSHAAYGARGG	578.2083	477	DRAAGATAGARAARGAGCAACCRGG	857.2083	279	24
121	414	CHTGGCCYCTNTAYGSHAAYGARGG	578.2083	474	MARNADRAAGATAGARAARGAGCAA	862.2083	284	24
122	459	CNWGYGGNYTHGCCGAYCTORTGGG	713.2083	467	CKGTTGCRWARTTNAYSCORTCYTC	824.2083	111	25
123	390	GGGGCCCNMGNTTGGGTGTGGCGGC	452.2083	410	TNSCRTANAGRGCCADGSRATANCC	587.2083	135	25
124	412	SNMARCCHGGNTAYSCHTGGCCYCT	563.2083	457	CNABRASNGGDATRTAYCCAYGAG	748.2083	183	25
125	340	CHDHCCGYCYCCWMHRGAYGTHAA	377.2083	413	DNCCYCTRTTNSCRTANAGRGCCA	596.2083	219	25
126	331	GAGCACRMWCCWAAACBCAAAGA	336.2083	415	AVCCDGGVGGDGASAGVARCCAHCC	632.2083	296	25
127	390	GGGGCCCNMGNTTGGGTGTGGCGGC	452.2083	467	CKGTTGCRWARTTNAYSCORTCYTC	824.2083	372	25
128	458	THGCCGAYCTORTGGRTAYATHCC	722.2083	498	TCATRTCCANGCCATBCKRTGNCC	1292.208	570	25
129	431	CNHVBTTGGGSCCVAMHGAYCCCGG	647.2083	462	NCCNABRASNGGDATRTAYCCAYG	748.2083	101	26
130	412	SNMARCCHGGNTAYSCHTGGCCYCT	563.2083	446	WRTCGATGACYYTRCCMARNTTVCG	698.2083	135	26
131	412	SNMARCCHGGNTAYSCHTGGCCYCT	563.2083	450	DARNCRCROWGNADGGWRTCGATG	715.2083	152	26

132	401	TGGGTGTGCGCGCRRYDMGDAARAC	464.2083	415	AVCCDCGVGGDGASAGVARCCAHC	832.2083	168	26
133	331	GAGCACRMWCCWAAACCBAAAGA	336.2083	410	TNSCRTANAGRGGCCADGSRANCC	587.2083	251	26
134	519	GNMGRCAYYTVATHHTYTGCAITC	4502.083	522	YYTCCCARAABTVARRTGRTCYTG	5009.083	507	26
135	459	CNWGYGGNYTHGCCGAYCTCRTGGG	713.2083	498	TCATRTCCCGANGCCATBCKRTGNCC	1292.208	579	26
136	412	SNMARCCCHGNTAYSCHTGGCCYCT	563.2083	435	NRTTVCGNGAYYKHGCGGGGRTG	680.2083	117	27
137	401	TGGGTGTGCGCGCRRYDMGDAARAC	464.2083	410	TNSCRTANAGRGGCCADGSRANCC	587.2083	123	27
138	390	GGGGCCCNMGNTTGGGTGTGCGCGC	452.2083	413	DNCCYTCRTTNSCRTANAGRGGCCA	596.2083	144	27
139	401	TGGGTGTGCGCGCRRYDMGDAARAC	464.2083	467	CKGTTGCRWARTTNAYSCCRTCYTC	824.2083	360	27
140	468	ARGAYGGSRTNAAIYWGCAACMG	809.2083	498	TCATRTCCCGANGCCATBCKRTGNCC	1292.208	483	27
141	412	SNMARCCCHGNTAYSCHTGGCCYCT	563.2083	430	KHYGCCGGGRTCDKTBGGSCCCCA	668.2083	105	28
142	414	CHTGGCCYCTNTAYGSNAAAYGARGG	578.2083	467	CKGTTGCRWARTTNAYSCCRTCYTC	824.2083	246	28
143	331	GAGCACRMWCCWAAACCBAAAGA	336.2083	413	DNCCYTCRTTNSCRTANAGRGGCCA	596.2083	260	28
144	412	SNMARCCCHGNTAYSCHTGGCCYCT	563.2083	477	DRAAGATAGARAARGAGCAACCRGG	857.2083	294	28
145	412	SNMARCCCHGNTAYSCHTGGCCYCT	563.2083	474	MARNADRAAGATAGARAARGAGCAA	862.2083	299	28
146	492	YTNCCYGGTGTGCTYTYTCTATCT	838.2083	498	TCATRTCCCGANGCCATBCKRTGNCC	1292.208	454	28
147	497	CYTTYTCTATCTTYHTNYTKGCHCT	851.2083	503	QNSHCCARTTGWKCATCATRTCCCA	1307.208	456	28
148	401	TGGGTGTGCGCGCRRYDMGDAARAC	464.2083	413	DNCCYTCRTTNSCRTANAGRGGCCA	596.2083	132	29
149	412	SNMARCCCHGNTAYSCHTGGCCYCT	563.2083	467	CKGTTGCRWARTTNAYSCCRTCYTC	824.2083	261	32
150	497	CYTTYTCTATCTTYHTNYTKGCHCT	851.2083	498	TCATRTCCCGANGCCATBCKRTGNCC	1292.208	441	33

1: degeneracy を 2 の指数で示した値。黄色の行は OE-PCR ゲノムフラグメントを用いた検証対象のプライマーセットを示す

表4 HCV ウィルス Genotype 共通プライマー検証用ゲノムフラグメント

Temp late ID	Geno type	Sub-type	塩基配列
1	1	1a	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGGAAAGGCC
2	1	1b	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGGAAAGGCC
3	1	1g	CCGGAATCGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAAATTTGGGGCTGCCCCCGAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGGAAAGGCC
4	2	2a	CCGGAATTGCCGGGAAGACTGGGTCCTTTCTTGGATAAACCCACTCTATGCCCGCCATTGGGGCTGCCCCCGAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGT TGGGTCGGAAAGGCC
5	2	2b	CCGGAATTACCGGAAGACTGGGTCCTTTCTTGGATAAACCCACTCTATGCCCGCTCATTTGGGGCTGCCCCCGAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGT TGGGTCGGAAAGGCC
6	3	3a	CCGGAATTGCCGGGAAGACTGGGTCCTTTCTTGGATAAACCCACTCTATGCCCGCCATTGGGGCTGCCCCCGAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGT TGGGTCGGAAAGGCC
7	4	4d	CCGGAATCGCCGGATGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCGCTCAATGCCCGAAATTTGGGGCTGCCCCCGAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGGAAAGGCC
8	4	4f	CCGGAATTGCCGGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCGCTCAATGCCCGAGATTGGGGCTGCCCCCGAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGT TGGGTCGGAAAGGCC
9	5	5a	CCGGAATTGCCGGGAAGACTGGGTCCTTTCTTGGATAAACCCACTCTATGCCCGCCATTGGGGCTGCCCCCGAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGT TGGGTCGGAAAGGCC
10	6	6a	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGAAGACTGCTAGCCGAGTAG CGTTGGGTCGGAAAGGCC
11	6	6p	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTG TGGGTCGGAAAGGCC
12	6	6q	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTG TGGGTCGGAAAGGCC
13	7	6c	CCGGAATTGCCAGGATGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTG TGGGTCGGAAAGGCC
14	8	6e	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATYAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGGAAAGGCC
15	8	6f	CCGGAATTGCCAGGATGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCGCTCAGTGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGGAAAGGCC
16	8	6g	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGGAAAGGCC
17	8	6i	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGGAAAGGCC
18	8	6j	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGGAAAGGCC
19	8	6k	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGCSAAAGGCC
20	8	6l	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGGAAAGGCC
21	8	6m	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCCTCTCATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGGAAAGGCC
22	8	6n	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCCTCTCATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGGAAAGGCC
23	8	6o	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGGAAAGGCC
24	8	6t	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGT TGGGTCGGAAAGGCC

表5 HCV ウイルス人工ゲノムフラグメントのグループ分け

人工遺伝子 No	genotype	合成 subtype	subtype
1	1	1a	1a, 1b, 1g
2	2	2a	2a, 2b
3	3	3a	3a
4	4	4d	4d
5	4	4f	4f
6	6	6a	6a
7	6	6c	6c, 6p, 6q
8	6	6e	6e

表6 HCV ゲノムフラグメント合成のための OE-PCR オリゴマー

人工遺伝子 No	Primer 名	Sequence	オリゴマー長
1	HCVgr1.1	CCGGAATTGCCAGGACG	17
	HCVgr1.2	GTTTATCCAAGAAAGGACCCGGTCGTCCTGGCAATTCCGG	40
	HCVgr1.3	CCGGGTCTTTCTTTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGA	40
	HCVgr1.4	GTCTTGCGGGGGCACGCCAAATCTCCAGGCATTGAGCGG	40
	HCVgr1.5	GTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCG	40
	HCVgr1.6	GGCCTTTCGCGACCCAACACTACTCGG	27
2	HCVgr2.1	CCGGAATTGCCAGGACG	17
	HCVgr2.2	GTTTATCCAAGAAAGGACCCGGTCGTCCTGGCAATTCCGG	40
	HCVgr2.3	CCGGGTCTTTCTTTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGA	40
	HCVgr2.4	GTCTTGCGGGGGCACGCCAAATCTCCAGGCATTGAGCGG	40
	HCVgr2.5	GTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCG	40
	HCVgr2.6	GGCCTTTCGCGACCCAACACTACTCGG	27
3	HCVgr3.1	CCGGAATTGCCGGGAAGAC	19
	HCVgr3.2	GGGTTTATCCAAGAAAGGACCCAGTCTTCCCGGCAATTCCG	41
	HCVgr3.3	TGGGTCTTTCTTTGGATAAACCCACTCTATGCCCGGCCAT	40
	HCVgr3.4	CAGTCTTGCGGGGGCACGCCAAATGGCCGGGCATAGAGT	40
	HCVgr3.5	TGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCG	40
	HCVgr3.6	GGCCTTTCGCAACCCAACGCTACTC	25
4	HCVgr4.1	CCGGAATCGCCGGGATGA	18
	HCVgr4.2	GGTTTATCCAAGAAAGGACCCGGTCATCCCGGCATTCCG	40
	HCVgr4.3	CCGGGTCTTTCTTTGGATAAACCCGCTCAATGCCCGGAAAT	40
	HCVgr4.4	AGTCTTGCGGGGGCACGCCAAATTCGGGCATTGAGCG	40
	HCVgr4.5	GTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCG	40
	HCVgr4.6	GGCCTTTCGCGACCCAACACTACTCGG	27
5	HCVgr5.1	CCGGAATTGCCGGGAAGAC	19
	HCVgr5.2	GGGTTTATCCAAGAAAGGACCCAGTCTTCCCGGCAATTCCG	41

	HCVgr5.3	TGGGTCTTTCTTGGATAAACCCACTCTATGCCCGGCCAT	40
	HCVgr5.4	CAGTCTTGCGGGGCACGCCAAATGGCCGGCATAGAGT	40
	HCVgr5.5	TGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGTTGCG	40
	HCVgr5.6	GGCCTTTGCAACCCAACGCTACTC	25
5	HCVgr6.1	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGTC	25
	HCVgr6.2	GAGCGGGTTTATCCAATGAAAGGACCCGGTCGTCCTGG	40
	HCVgr6.3	CCATTGGATCAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCG	40
	HCVgr6.4	CGGCTAGCAGTCTTGCGGGGCACGCCAAATCTCCAGGC	40
	HCVgr6.5	CGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGTTGCGAAAGGC	40
	HCVgr6.6	GGCCTTTGCAACCCAACG	19
6	HCVgr7.1	CCGGAATTGCCAGGATGACCGGG	23
	HCVgr7.2	GAGCGGGTTAATCCAAGAAAGGACCCGGTCATCCTGGCA	40
	HCVgr7.3	CTTTCTTGATTAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGC	41
	HCVgr7.4	CTAGCAGTCTGCGGGGGCACGCCAAATCTCCAGGCATT	40
	HCVgr7.5	CCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAA	40
	HCVgr7.6	GGCCTTTGCGGACCCAACACTACT	24
7	HCVgr8.1	CCGGAATTGCCAGGACGACCGG	22
	HCVgr8.2	GAGCGGGTTATCCAAGAAAGGACCCGGTCGTCCTGGCAAT	40
	HCVgr8.3	CCTTTCTTGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGC	40
	HCVgr8.4	CTAGCAGTCTGCGGGGGCACGCCAAATCTCCAGGCATT	40
	HCVgr8.5	CCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAA	40
	HCVgr8.6	GGCCTTTGCGGACCCAACACTACT	24

表 7 HBV Genotype 共通プライマー設計対象ゲノム塩基配列

Accession	Genotype	Definition	Length
AP007263	A	HBV genotype A DNA complete genome isolate: HB-JI444AF	3221
FJ386688	B	Hepatitis B virus isolate S1632 complete genome	3215
EU833891	C	Hepatitis B virus isolate 14 complete genome	3215
AY945307	D	Hepatitis B virus complete genome	3182
AP007262	E	HBV genotype E DNA complete genome isolate: HB-JI411F	3212
AB365453	F	Hepatitis B virus DNA complete genome isolate: BOL584	3227
AP007264	G	HBV genotype G DNA complete genome isolate: HB-JI444GF	3248
AP007261	H	HBV genotype H DNA complete genome isolate: HB-JI260F	3218