

200933003A

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21年度 総括研究報告書

研究代表者 浜口 功

平成22（2010）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

ウイルス肝炎感染予防体制の確立に関する総合研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 浜口 功

平成22（2010）年3月

研究組織

研究代表者

浜口 功 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・臨床検査・輸血部

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

山口一成 国立感染症研究所・血液・安全性研究部

紀野修一 旭川医科大学病院・臨床検査・輸血部

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 (浜口功、半田誠、山口一成)—————	6
表 1: ウイルス特異的 Degenerate プライマーセット —————	14
表 2: ウイルス検出用プローブ一覧 —————	15
表 3: 人工合成オリゴヌクレオシドの作製 —————	16
表 4: 人工合成オリゴヌクレオシド配列 —————	17
図 1: 人工合成オリゴヌクレオシドを用いた変異株に対するバリデーション —————	22
図 2: スポット配置とプローブ ID、及び精度管理用コントロール —————	23
図 3: マイクロアレイによるウイルス核酸の検出 —————	24
図 4: 複数ウイルス核酸の同時検出 —————	25

II.分担研究報告

1. ウイルス種・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開発 (遠藤大二)—————	26
表 1: 塩基配列のコードと degeneracy —————	38
表 2: HIV-5,HIV-6 および HIV-7 共通検出プライマー設計対象とした遺伝子群 —————	39
表 3: プライマー設計対象クラスターごとの CoCoMo プログラムによる設計プライマー数 —————	40
表 4: HIV-5,HIV-6 および HIV-7 遺伝子群の第 6 クラスターから予想された最適プライマー	
表 5: ヒトアデノウイルスプライマー設計用の DNA polymerase 遺伝子を選択したゲノムデータ —	41
表 6: ヒトアデノウイルスの各亜属に含まれる血清型 —————	43
表 7: ヒトアデノウイルス A,B1,D および E 各亜種から予想された亜種共通プライマーセット	
表 8: ヒトアデノウイルス亜種共通プライマーセットのうち、適用範囲の最大だったプライマー によって増幅されるヒトアデノウイルス血清型—————	44
表 9: ヒトアデノウイルス共通プライマーの PCR 試験用鋳型合成用オリゴマー —————	45
図 1: CoCoMo プログラムの模式図 —————	46
図 2: degenerate プライマーの高速 Homology 検索モジュール(Estimate) —————	48
図 3: OE-PCR 法の概念図	
図 4: HIV-5,HIV-6 および HIV-7 ウイルス遺伝子群のクラスターとプライマー設計対象グループ —	49
図 5: HIV-5,HIV-6A,HIV-6B および HIV-7 の major capsid protein を合成するための OE-PCR 結果—————	50
図 6: HIV-5,HIV-6A,HIV-6B および HIV-7 の major capsid proteinOE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅	
図 7: ヒトアデノウイルス DNA polymerase 遺伝子の相同性に基づくグループマップ —————	51
図 8: ヒトアデノウイルス DNA polymerase 遺伝子断片を合成するための OE-PCR 結果	
図 9: ヒトアデノウイルス DNA polymerase 遺伝子 OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅 —————	52

2. ウイルス種・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開発 (水谷哲也)	53
図 1: 集積型カートリッジの特徴	60
図 2: バイオチップ読取装置	
図 3: 集積型カートリッジシステムの使用イメージ	
図 4: 集積型カートリッジによる自動ハイブリの結果	61
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)	62
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、大戸斉、 高橋孝喜、高松純樹)	65
図 1: 平成 20 年度調査の回答施設数と病床数	69
図 2: アンケート回答施設の病院規模	
図 3: 感染症検査に関する院内マニュアル (平成 20 年度)	70
図 4: 感染被害救済制度の説明 (平成 20 年度)	
図 5: 輸血前後検査・輸血前検体保管に関する説明と同意 (平成 20 年度)	
図 6: 輸血前検査の実施状況 (平成 20 年度)	
図 7: 輸血後検査の実施状況 (平成 20 年度)	
図 8: 輸血前検査の実施状況 (平成 16 年度、平成 17 年度、平成 18 年度)	
図 9: 遡及調査ガイドラインに沿った輸血前検査の実施状況	71
図 10: 輸血前検査を行っていない理由	
表 1: 輸血前検査に採用している検査項目	
表 2: 輸血前検査として実施している項目の組み合わせ (平成 20 年度)	
表 3: 輸血前検査実施に関する取り組み (平成 20 年度)	
図 11: 全輸血患者に対する輸血検査の実施率	72
表 4: 輸血前感染症検査の保険請求について	
図 12: 輸血前検体保管の実施状況	
図 13: 輸血前検体の凍結保管期間	73
表 5: 輸血前検体の採取・保存方法	
図 14: 輸血後検査の実施状況	
表 6: 輸血後検査の採用検査項目	
表 7: 輸血後検査として実施している項目 (平成 20 年度)	74
図 15: 全輸血患者に対する輸血後検査実施率	
表 8: 輸血後検査を受検して貰うための取り組み (複数回答)	
図 16: 輸血後検査実施に最も効果的と考える取り組み	75
表 9: 輸血後検査の保険請求	
表 10: 輸血前検査と輸血後検査の将来	

別添 1 : ウイルス肝炎感染症防止体制の確立に関する総合研究	81
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	95
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	144
IV. 研究成果の別刷	145

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急研究事業）
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： 浜口功 国立感染症研究所・血液・安全性研究部
研究分担者： 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
山口一成 国立感染症研究所・血液・安全性研究部
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

輸血用血液を介した感染症の伝播を防止するため、現在、HIV、HCV、HBV、といった一部のウイルスに関しては抗体測定、NAT 検定、TaqMan-PCR 等の検出法を用いてスクリーニングが行われ、輸血による感染の伝播が抑制されている。しかし、感染症を引き起こす病原体のほとんどが検査されておらず、また依然として感染初期の検出が困難な期間（Window period）が問題とされている。感染検体がスクリーニングをすり抜けることを阻止するために、より高感度な病原体検出システムを開発することは重要な課題である。同時に、今後流行が危惧されている血液を介した新興・再興感染に対しても、迅速に対応できる検出システムの確立が急務となっている。

本研究では独自のプログラムにより網羅的に設計された Degenerate プライマーを用いることで、PCR により効率よく病原体核酸を増幅し、DNA Chip 上に固定化した検出用プローブとハイブリダイズさせることで高感度に病原体核酸を検出できるマイクロアレイシステムを開発した。本年度は、前年度までに作製した HIV、HCV、HBV に PvB19、WNV を加えた5つのウイルス検出用マイクロアレイを作製した。合成オリゴヌクレオシドを鋳型として検証した結果、Degenerate プライマーは全てのウイルス変異株の核酸を増幅することが可能であった。また、検出用プローブを複数組み合わせることにより、全てのウイルス変異株をマイクロアレイによって検出できることも示唆された。同様に、血漿検体中から調整した市販標準品のウイルス核酸を用いて検出感度を評価した結果、一般的に行われている NAT 検査と同等、またはそれ以上（1PCR 反応液中に 2-10IU/cp）の検出感度を得ることができた。また、各ウイルス核酸の増幅産物を混ぜた合わせた状態で検出を行っても、それぞれの増幅産物は交差することなく、目的のウイルスを検出することができた。それらの結果から本研究のマイクロアレイシステムが1枚のDNA-chip 上で複数の病原体を同時に検出することができることが証明された。本研究のシステムを応用すれば、今後、新規の病原体に対する検査が必要となった際、迅速に検出系を構築することが可能になると期待される。

A. 研究目的

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によるスクリーニングが行われてきた。しかし、抗体産生までに生じる検出困難な期間（Window period）の存在が問題とされていた。そこで、新しい技術としてウイルスの核酸増幅法（NAT）による検査が導入されたことにより、エイズウイルス（HIV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、B型肝炎ウイルス（HBV）といった一部のウイルスについては、輸血を介する感染の伝播が著しく減少した。しかし、いまだ感染血液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。特にHBVにおいては、NATによる検出限界以下の極めて低量のウイルス保持者が存在し、輸血後にウイルスが再活性化するのではないかと問題視されていることもあり、より高感度なウイルス検出システムの構築は重要な課題である。

本研究に使用しているウイルス検出用のマイクロアレイシステムは、検体中のウイルス核酸を特異的 Degenerate プライマーを用いて効率良く増幅し、DNA Chip 上に固定された増幅領域内配列を標的とする高感度なウイルス検出用プローブによって検出することができるよう設計されており、前年度においては血漿検体中の HIV、HCV、HBV のウイルス核酸を一般的な NAT を用いた場合と同等以上の検出感度（1PCR 反応液中に 5～8IU/cp）で検出することができた。

そこで本年度の研究課題として、新

たにヒトパルボウイルス B19（human Parvovirus B19 : PvB19）とウエストナイルウイルス（West Nile virus : WNV）を対象に加えた 5 つのウイルス検出用システムとして開発を行った。本年度のウイルス検出システムも前年と同様に、最終的に対象ウイルスを既存の病原体検出システム、特に NAT によるウイルス検出限界と同等、またはそれ以上の感度で検出することを目標とした。また同時に 1 枚の DNA-chip 上で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ことを目指した。

検出用プローブは多数存在するウイルスの全ての変異株に対応することができるように設計した。そこで、プライマー結合配列を含む合成オリゴヌクレオシドを鋳型として、ウイルス特異的 Degenerate プライマーと検出用プローブが全ての変異株に対応することが可能であるかを検証した。

加えて、検出システムとしての精度向上を図るために、内部標準（Internal Control）と精度管理用（Quality Control）プローブの 2 つの精度管理用コントロールを置き、検出システムの信頼性の向上を目指した。

B. 研究方法

1) 標準品

標準検体として SeraCare 社製 ACCURUN 315 HIV-RNA positive Quality control (Subtype B, 2.1×10^5 copies/ml)、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)、及び Zeptomtrx 社製 Parvovirus B19 NATtrol (1×10^6 IU/ml)、West Nile virus NATtrol (Strain NY 2001-6263, 5×10^5 cp/ml) を使用し、日本赤十字社より分与された陰性血漿 (HIV-, HCV-, HBV-) または、SeraCare 社製の脱繊維素処理済みヒト血漿 (Basematrix53) を用いて、希釈検体 (10^5 IU/ml) を調整し、 -80°C にて保存した。

検査時には、同様の血漿を用いて検体のウイルス濃度が $10,000\text{IU} \sim 1\text{IU/ml}$ となる一次希釈系列を調整した。また、サンプルの核酸抽出時には内部標準 (Internal Control) として 5ng の Human 18S ribosomal RNA 配列の増幅断片を加えた。

2) 核酸抽出

RNA 抽出

HIV、HCV、WNV-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 等量) 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、 8000G 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、 8000G で 1 分間遠心した。Collection tube を交換し、Wash Buffer $450 \mu\text{l}$ を加え、 8000G で 1 分間遠心した。同様にもう一度 Wash を行った後、 13000G で 10 秒間遠心した。Collection tube を

交換し、Elution Buffer $50 \mu\text{l}$ を加えて、 8000G 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。抽出された RNA は SUPERase[•]In RNase Inhibitor (Ambion) $1\text{U}/\mu\text{l}$ を添加した Ultra pure distilled water (Gibco) を用いて希釈し、 $5,000\text{IU} \sim 2\text{IU}/\mu\text{l}$ の二次希釈系列を調整した。

DNA 抽出

HBV、PvB19-DNA は High Pure Viral Nucleic 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 等量) を poly A Carrier RNA $2 \mu\text{l}$ ($10 \mu\text{g}$) と Proteinase K $50 \mu\text{l}$ を加えた、Binding Buffer $200 \mu\text{l}$ に加え、よくボルテックスし、 72°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、 8000G 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、 8000G で 1 分間遠心した。Collection tube を交換し、Wash Buffer $450 \mu\text{l}$ を加え、 8000G で 1 分間遠心した。同様にもう一度 Wash を行った後、 13000G で 10 秒間遠心した。Collection tube を交換し、Elution Buffer $50 \mu\text{l}$ を加えて、 8000G 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。抽出された DNA は RNA と同様に RNase Inhibitor を添加した Distilled water を用いて希釈し、 $10,000\text{IU} \sim 1\text{IU}/\mu\text{l}$ の二次希釈系列を調整した。

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 $5 \mu\text{l}$ (2,000~2IU/cp 当量) に $50\text{ng}/\mu\text{l}$ Random primer $1 \mu\text{l}$ 、 10mM dNTP mix $1 \mu\text{l}$ を加え、 65°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 $2 \mu\text{l}$ 、 25mM MgCl_2 $4 \mu\text{l}$ 、 0.1M DTT $2 \mu\text{l}$ 、RNase out ($40\text{U}/\mu\text{l}$) $1 \mu\text{l}$ 、Superscript III RT ($200\text{U}/\mu\text{l}$) $1 \mu\text{l}$) を加えて、 25°C で10分間、 50°C で50分間、 85°C で5分間反応した。この反応液に RNase H $1 \mu\text{l}$ を加え、 37°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 (BIORAD) を使用した。

4) Degenerate プライマー

データベースに登録された HIV、HCV、HBV、PvB19、WNV 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、PvB19、WNV の各ウイルス特異的プライマーによる増幅領域を基に 30~42mer の検出用プローブを設計した (表2)。また同時に、検出系の精度管理 (Quality control) のための、30~34mer の対象配列を持たないオリゴヌクレオシドを設定した。合成されたプローブ用オリゴヌクレオシドをスライドガラス上に DLC (diamond like

carbon) 表面処理を施したチップ ($3\text{mm}\times 3\text{mm}$ 角) に固定した (図2A)。

6) 人工合成オリゴヌクレオシド

HIV、HCV、HBV、PvB19、WNV の各ウイルス変異株の鋳型 DNA として使用するため、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シドを設定した (表3、表4)。鋳型オリゴヌクレオシドの合成は Prime Star PCR kit (Takara-bio) を用いた、Overlap-extension PCR (OE-PCR; HIV、HBV、PvB19、WNV) 法および、Invitrogen 社のカスタム DNA 合成サービス (HCV) への委託により行った。OE-PCR は DNA works 2 プログラム (Hoover and Lubkowski, 2002) に基づいて設計された、19~60mer のオリゴヌクレオシドからなる6から8つの断片を2ステップの PCR より結合、伸長するもので。初めの PCR により、 $5\times$ PrimeSTAR Buffer (Mg^{2+} plus) $10 \mu\text{l}$ 、 $1\times$ dNTP Mixture (2.5mM) $4 \mu\text{l}$ 、 2pmol の各 Oligomer、および PrimeSTAR HS DNA Polymerase ($2.5 \text{U}/\mu\text{l}$) $0.5 \mu\text{l}$ に Distilled water を加えて $50 \mu\text{l}$ とし、 98°C で10秒、 60°C で5秒、 72°C で10秒で30サイクル行い、一次鋳型を作製した。続けて、1st-PCR 産物 $1 \mu\text{l}$ を取り、 $5\times$ PrimeSTAR Buffer (Mg^{2+} plus) $10 \mu\text{l}$ 、 $1\times$ dNTP Mixture (2.5mM) $4 \mu\text{l}$ 、 20pmol 5' 端の Oligomer、 20pmol 3' 端の Oligomer および PrimeSTAR HS DNA Polymerase ($2.5 \text{U}/\mu\text{l}$) $0.5 \mu\text{l}$ に Distilled water を加えて $50 \mu\text{l}$ とし、再度 98°C で10秒、 60°C で5秒、 72°C で

10秒で30サイクル行い、プライマー評価用の鋳型オリゴヌクレオシドを合成した。作製したオリゴヌクレオシドの分子量は Multina202 chip electrophoresis system (Shimazu) を用いて測定した。

7) Micro-array

DNA-labeling PCR

検体液から得られた DNA 10 μ l (1,000~1IU 等量)に 5 \times Green GoTaq Flexi Buffer 5 μ l, 10mM Cy-5/ Cy-3 dCTP 0.5 μ l, PCR Nucleotide Mix (2.5mM dATP, dGTP, dTTP, 0.25mMdCTP) 1 μ l, Forward Primer (50 μ M) 0.5 μ l, Reverse Primer (50 μ M) 0.5 μ l, GoTaq Polymerase (5U/ μ l,) 0.25 μ l, DW 7.25 μ l を加えて、95 $^{\circ}$ C 2分間加熱した後、95 $^{\circ}$ C 30秒間、55 $^{\circ}$ C 30秒間、72 $^{\circ}$ C 30秒間を50サイクル行った。PCRには GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用した。

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。

ハイブリオーブン内で 50 $^{\circ}$ 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-、FLA-8000 (富士フイルム社)により Cy3 は 532nm (解像度 10 nm)、Cy5 は 635nm (解像度 10 nm) の蛍光検出によりシグナルの判定を行った。

C. 研究結果

1. マイクロアレイによるウイルス変異株の検出

本研究の検出システムを用いて、標的とした HIV、HCV、HBV、PvB19、WNV 各ウイルスの全ての変異株を検出することができるかを検証するために、検出用プローブ配列に対する人工合成オリゴヌクレオチドを作製し、マイクロアレイによる検出法を試験した。人工合成オリゴヌクレオチドは各ウイルスの変異株のゲノム配列を基に、検出用プローブ領域内の配列が重複しているものを除いた、HIV: 14タイプ、HCV: 9タイプ、HBV: 8タイプ、PvB19: 6タイプ、WNV: 10タイプを作製し、PCR 反応液中に 1ng の合成オリゴヌクレオチドを加え、マイクロアレイによる検出が可能であるかを試験した。

まずはじめに、ウイルス特異的に設計された Digenerete プライマーが変異株の各ウイルスゲノムを増幅可能であるかの検証を行った (図1左パネル)。その結果、HIV の Genotype G と K に対して増幅効率が低かったものの、その他の変異株に対しては効率良く増幅することができた。またその他の4つのウイルス (HCV、HBV、PvB19、WNV) に関しては、Digenerete プライマーが全ての変異株のウイルスゲノムを効率良く増幅することが可能であった。

続けて、ウイルスゲノムの増幅産物を各ウイルスの検出用プローブで検出できるかを検証した (図1右パネル)。前年度までの結果を基に、試験にはそれぞれ HIV: 20スポット、HCV: 7スポット、HBV: 12スポット、PvB19: 6スポット、WNV: 8スポットのプロー

ブを使用した。その結果、全てのウイルスの変異株が、複数あるプローブのいずれかのスポットによって検出することが可能であった。特にそのうち、HIVの3つのプローブは全ての変異株を検出することができた。同様にその他のウイルスにおいては、HCVで5つ、HBVで5つ、PvB19で6つ、WNVで4つのプローブが全ての変異株を検出することが可能であった。

2. 検出システムの精度向上

これまで行ってきた研究結果を基に、HIV、HCV、HBV、PvB19、WNVの各ウイルスゲノムを変異株を含めて感度良く検出できると思われるプローブ（HIV：20スポット、HCV：7スポット、HBV：12スポット、PvB19：6スポット、WNV：8スポット）を選択し、5つのウイルス検出用プローブを1枚のDNA-chip上に再配置した（図2A, 2B）。合わせて、検出システムとしての精度向上を図るために、2つの精度管理用コントロールを追加した。1つ目は、検体からの核酸抽出、逆転写反応、増幅のステップが正常に行われているかを確認するための内部標準（Internal Control）であり、検体にHuman 18S ribosomal RNAのcDNA増幅断片を加えることとした（図2C, 2D）。HIVを増幅した場合、PCRによる増幅産物を3%ゲル電気泳動により確認するとHIVの増幅産物のバンドが確認できなくなる2IU以下においても、Internal Controlの増幅産物はバンドとして検出できることを確認した。2つ目は、増幅産物が検出用プローブと適切にハイブリダ

イズしているかの確認を行うためのもので、精度管理用（Quality control）プローブとして、全く対象配列を持たないオリゴヌクレオチドを全ての検出用プローブと一緒にスポットした。またこのQuality control用プローブは検出用プローブのスポット状態を確認するためにも使用する（図2E）。

3. マイクロアレイシステムによるウイルス核酸の検出感度

本研究のウイルス検出システムを使用した際の実際のウイルス検出能力を評価するために、市販の標準品

（SeraCare社製 ACCURUN：HIV、HCV、HBV、及び Zeptomatrix社製の NAT trol：PvB19、WNV）を用いて、各ウイルスに対する検出感度を測定した。検体から抽出したウイルス核酸を段階希釈した二次希釈系列を用いて、最終濃度として1回のPCR反応液中に1,000、100、20、10、5、2、1IU/cp当量のウイルス核酸が含まれるように調整した。PCRによる増幅とDNAの蛍光標識を行った後、ハイブリダイズを行い、各ウイルスの検出用プローブが検出できる限界濃度を測定した（図3）。その結果、ウイルス濃度が100 IU/cp以上の場合、各ウイルス検出用プローブによって全てのウイルスを確実に検出することができた（Data not shown）。また、各ウイルス検出プローブの最低検出限界は1PCR反応液中にHIV（B）では5cp、HCV（1b）：2IU、HBV（A）：1cp、PvB19：1IU、WNV（NY 2001-6263）：5cpであり、十分な再現性を保証できる範囲はHIV：10cp、HCV：5IU、HBV：2cp、PvB19：2IU、WNV：

5cp までであった。この結果から、このシステム全体としてのウイルス検出感度は 1 PCR 反応液中に 2-10 IU/cp であることが示された。

4. 複数ウイルスの同時検出

独自のプログラムにより設計された HIV、HCV、HBV、PvB19、WNV の各ウイルス特異的な Digenerate プライマーを使用することによって、ウイルスゲノムを効率良く特異的に増幅することができた (図 4A)。そこで、各ウイルスの増幅産物を混ぜ合わせたものをサンプルとして用い、1 枚の DNA-chip 上で 5 つのウイルスの同時検出が可能であるかを検証した。5 つのウイルスのうち、任意の 1 つのウイルスを除いた、4 つのウイルスを混ぜあわせたものをハイブリダイズし、シグナルの検出感度に影響しないかを確認した。その結果、各ウイルスの検出用プローブは、クロスハイブリダイズすることなく対応したウイルス核酸のみを的確に検出することができ、検出感度の低下も見られなかった (図 4B)。

D. 考察

本年度の研究において、前年度までに作製された HIV、HCV、HBV の検出システムを改良するとともに、新たに PvB19 と WNV を加えた検出システムを構築することができた。本年度の研究結果から本研究のマイクロアレイを用いた検出システムが各ウイルス核酸を高感度 (1PCR 反応液中に 10IU/cp 以下) に検出する能力を持っていることが確認された。また同時に、このシステム

に用いた新規 Digenerate プライマーと検出用プローブが、それらのウイルスの変異株に対しても網羅的に対応することができることを提示した。一般的に行われている NAT 検査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。これは、既存の NAT 検査における Window period をカバーしうる十分な検出感度であるといえる。

これまでに残った問題として、本検出システムでは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鑄型となるウイルス核酸の一部を取り出して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するという課題があった。若干のプロトコールの変更により検体のロスを減らすことができたが、低濃度における検出感度の改善は見られなかった。これに対する解決策の一つとして、開始時の検体容量を増やし、システムに持ち込める核酸量を増やすことを検討したが、現時点で市販されている Large scale 用の核酸抽出 kit では十分な結果が得られなかったため、今後販売される新たな kit の活用を検討する必要がある。また、検体のロスを減らし、可能な限り各行

程を簡素化するためにも、RNA ウイルスと DNA ウイルスのどちらであっても 1 チューブ内で全ての反応行程が行なえるようなシステムを開発していくことも今後の検討課題である。

ハードウェアとしての改善として、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検出感度を向上するための有効な手段として検討しているが、同時にバックグラウンドとシグナルとの正確な識別を行い、陽性/陰性判定のための適切なカットオフ値を規定するためには、国際標準品か国内標準品、もしくはそれらに相当する標準品を用いた、より厳密な精度管理が重要となる。

E. 結論

本年度の研究によって、新規ウイルス検出システムの骨格がほぼ完成した。本研究において開発されたウイルス検出システムは、既存の病原体検出システムと比較しても優れて有用性が高いものであることが提示できた。そこで、本研究の成果を基に昨年末、特許出願の申請を行った。今後も企業等を交えた共同研究を進め、検出システムの更なる改良を行い、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、研究成果を社会に還元していくことを目指したい。

F. 健康危険情報

該当なし

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

特許名称：「複数の遺伝子型を有する HIV、HCV、HBV、PvB19 及び WNV の 5 種類のウイルスの網羅的な検出方法、ウイルス検出用プライマーセット、マイクロアレイ及びウイルス検出用キット」、出願番号：特願 2009-283366、提出日：H21. 12. 14、発明者：中島龍生，浜口功，滝澤和也，水谷哲也，遠藤大二

表 1. ウイルス特異的 Degenerate プライマーセット

Target-pathogen	Primer Name	Primer Sequence (5'-3')	GenBank Accession No - Position (nt)		Gene	Amplicons (bp)
HIV	hiv-4F	ACAATTTTAAAAGAARARGGG	NC_001802	4323 - 4343	Integrase	142
	hiv-4R	CTGTCTGCTGWAAARACCCGR		4444 - 4464		
HCV	HCV-7F	GAAAGCGYCTAGCCATGGCGT	D90208	59 - 327	5'-UTR	269
	HCV-7R	TGCACGGTCTACGAGACCTCC		307 - 327		
HBV	hbv-7F	AYTAYCAAGGTATGTTGCCCG	X70185	450 - 470	S	266
	hbv-7R	GGAAAGCCCKRCGMACCACTG		695 - 715		
PvB19	PvB19-1F	AGTGGTGGTGAAAGCTCTGAA	NC_000883	2148 - 2168	NS1	122
	PvB19-1R	TCTCCTGAACTGGTCCCG		2252 - 2269		
WNV	WNV-1F	GGHTGTTGGTATGGNATGGA	NC_009942	3451 - 3590	NS1	141
	WNV-1R	CTCCTGGGTGRCCAAGAAC		3573 - 3591	NS2A	
IC	IC-5F	TCGAAGACGATCAGATACCGT	M10098	1147 - 1157	18s rRNA	129
	IC-6R	ATACTCCCCCGGAACC		1259 - 1275		

PCRによるウイルス核酸、及びICの増幅用いたプライマー（平成21年度）。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

ID	Name	sequence (5'-3')	Target	Tm (°C)*
1	IF1-1	GGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGT	HIV primer set1_Sense	78.33
2	IF1-2	GGGAAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGA		65.99
3	IF1-3	GTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAG		62.86
4	IF1-4	CAGACATACAACTAAAGAATTACAAAACAAATTAC		65.66
5	IF1-5	CAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGG		71.04
6	IR1-1	ACTATTCTTTCCCTGCATGTACCCCCCAATCC	HIV primer set1_Anti-sense	78.33
7	IR1-2	TCTGTGTCTATTATGTCTACTATTCTTTCCCC		65.99
8	IR1-3	CTTTAGTTTGTATGTCTGTTGTCTATTATGTCTAC		62.86
9	IR1-4	GTAATTTGTTTTTGTAAATCTTTAGTTTGTATGCTG		65.66
10	IR1-5	CCCTGTAATAAACCCGAAAATTTTGAATTTTTG		71.04
11	IF3-1	AATCAAGCAGGAATTTGGAATTCCTACAATCCC	HIV primer set3_Sense	75.66
12	IF3-2	TGGAATTCCTACAATCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATC		78.38
13	IF3-3	CAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAAGAATTAAG		68.74
14	IF3-4	AAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATC		73.58
15	IF3-5	CTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATT		73.58
16	IR3-1	GGGATTGTAGGAATTCCAAATTCCTGCTTGATT	HIV primer set3_Anti-sense	75.66
17	IR3-2	GATTCTACTACTCCTTGACTTTGGGGATTGTAGGGAATCCA		78.38
18	IR3-3	CTTTAATCTTTTATTCATAGATTCTACTACTCCTTGACTTTG		68.74
19	IR3-4	GATGTTGAGCCTGATCTCTTACCTGCTCTATAATTTCTT		73.58
20	IR3-5	AATTGTGGATGAATCTGCCATTTGTACTGCTGTCTTAAG		73.58
21	CF1-1	AACCGGTGAGTACCCGGAATGGCAGGAC	HCV primer set1_Sense	77.46
22	CF1-2	TTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCG		88.14
23	CF1-3	TGCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGG		85.30
47	BF4-1	CTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGG	HBV primer set4_Sense	75.27
48	BF4-2	CTTCTGGATTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCCTC		77.84
49	BF4-3	TGTCCTCTAATTCAGGATCAACAACAACCAAGTAC		73.16
50	BF4-4	ATTCCCATCCCATCGTCTGGGCTTTCCGAAAATACC		84.11
51	BF4-5	CCTATGGGAGTGGGCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTC		83.69
52	BF4-6	GTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAG		80.06
53	BR4-1	CCAGAAGAACCAACAAGAAGATGAGGCATAGCAG	HBV primer set4_Anti-sense	75.27
54	BR4-2	GAGGACAAACGGGCAACATACCTTGATAATCCAGAAG		77.84
55	BR4-3	GTACTGGTTGTTGTTGATCCTGGAATTAGAGGACA		73.16
56	BR4-4	GGTATTTTCCGAAAGCCCAGGACGATGGGATGGGAAT		84.11
57	BR4-5	GAGCCAAGAGAACCGGACTGAGGCCCATCCCATAGG		83.69
58	BR4-6	CTGAACAAATGGCACTAGTAACTGAGCCAAGAGAACCGGAC		80.06
59	CF2-1	AGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACCCGGA	HCV primer set4_Sense	86.12
60	CF2-2	CTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTG		81.47
61	CF2-3	GCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCT		81.68
65	CR2-1	TCCGGTGTACTCACCGTTCCGCAGACCACTATGGCTCT	HCV primer set4_Anti-Sense	86.12
68	PvB19F-1	GGCGCCTGGAACACTGAGACCCCGCCTCTAGTAC	PvB19 primer set1_Sense	84.65
69	PvB19F-2	GGCGCCTGGAACACTGAAACCCCGCCTCTAGTAC		84.30
70	PvB19F-3	GAACTCAGTGAAAGCAGCTTTTCAACCTCATCACTCC		77.89
71	PvB19R-1	GTACTIONAGAGCGGGGGTCTCAGTGTTCAGGGCGCC	PvB19 primer set1_Anti-sense	84.65
72	PvB19R-2	GTACTIONAGAGCGGGGGTTCAGTGTTCAGGGCGCC		84.30
73	PvB19R-3	GGAGTGATGAGGTTGAAAAAGCTGCTTTCAGTGGTTC		77.89
74	WNVF-1	ATGATTGATCCTTTTCAGCTGGGCCTTCTGGT	WNV primer set1_Sense	76.55
75	WNVF-2	ATGATTGACCTTTTTCAGTGGGCCTTCTGGTCCG		79.87
76	WNVF-3	ATGATTGATCCTTTTTCAGCTGGGCCTTCTGGT		76.55
77	WNVF-4	ACGCCGACATGATTGATCCTTTTTCAGTGGGCCT		81.41
78	WNVF-1	ACCAGAAGGCCAGCTGAAAAGGATCAATCAT	WNV primer set1_Anti-sense	76.55
79	WNVF-2	CGACCAGAAGGCCAAGCTGAAAAGGATCAATCAT		79.87
80	WNVF-3	ACCAGAAGGCCAAGCTGAAAAGGATCAATCAT		76.55
81	WNVF-4	AGGCCAAGCTGAAAAGGATCAATCATGTCGGCGT		81.41
82	IC-1	GTCGTAGTTCGACCATAAACGATGCCGACCGG	Internal Control (IC)	81.27
83	IC-2	GGCGATGCGGCGGCTTATCCCATGACCC		86.04
84	IC-3	CCGCCGGCAGCTTCCGGGAAACCAAAGTCTTTG		86.89
85	IC-4	TCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATTCGACCC		78.14
86	QC	TTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGG	Quality control prob (QC)	68.77
87	Anti-QC	CCCATATCGTTTCATAGCTTCTGCCAA	Antisense-QC	68.77

* Calculate the melting temperature (Tm) using online software NetPrimer provide for PREMIER Biosoft International.

表 3.人工合成オリゴヌクレオシドの作製

Pathgen	GenBank Accession No. - Amplifying region (nt)	Length (bp)	Genotypes/Subtypes	Methods
HIV	NC_001802 4153 - 4464	312	14	OE-PCR ^a
HCV	D90208 59 - 327	269	9	Custom DNA ^b
HBV	X70185 450 - 715	266	8	OE-PCR ^a
PvB19	NC_000883 2143 - 2278	136	6	OE-PCR ^a
WNV	NC_009942 3445 - 3599	155	10	OE-PCR ^a

a: 変異株の遺伝子配列に対する鋳型として 19-60mer のオリゴヌクレオシド断片から Overlap-extension PCR 法により伸長した。 b: オリゴヌクレオシド合成を Invitrogen 社のカスタム DNA 合成サービスに委託した。配列は表 5 を参照のこと。

表4. 人工合成オリゴヌクレオシド配列

HIV核酸合成領域		
Genotype_Accession No	5'-	Sequence -3'
1:A1_U51190	TAAGGCAGCCTGTTGGTGGGCAGGTATCCAACAAGAATTTGGGAT	TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAAATCATAGGGCAGGTAAGAGATCAAGCTGAACAC CTTAAGACAGCAGTACAATGGCAGTATTCATTCACAATTTTAAAA GAAAAGGGGGATTGGGGGATACAGTGCAGGGGAAAGAATAATA GACATAATAGCAACAGATATACAAACTAAAGAATTACAAAACAAA TTACAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG
2:A2_AF286237	TAAAGCAGCCTGTTGGTGGGCAAATGTTAAACAGGAATTTGGTAT	CCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAG AATTAAGAAAAATCATAGGGCAGGTAAGGGAGCAAGCTGAACATC TTAAGACAGCAGTACAATGGCAGTGTTCATTCACAATTTTAAAA AAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAATAG ACATAATAGCATCAGACTTACAAACTAAAGAATTACAAAACAAA TACAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTGTACAGGGACAG
3:B_U88826	TAGGGCCGCTGTTGGTGGGCGGAATCAAGCAGGAATTTGGAAT	TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAAATCATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATC TTAAGACAGCAGTACAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAA AAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAAGTAG ACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAACAAA TACAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG
4:C_U46016	TAAAGCAGCCTGTTGGTGGGCAGGTATTCAACAGGAATTTGGAAT	TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAAATCATAGGGCAGGTAAGAGAACAAGCTGAGCAC CTTAAGACAGCAGTACAATGGCAGTATTCATTCACAATTTTAAAA GAAGAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAATA GATATAATAGCATCAGACATACAGACTAAAGAACTCCAAAACAAA TTTTAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGAGACAG
5:D_K03454 X04414	TAAGGCCGCTGTTGGTGGGCAGGTATCAAAACAGGAATTTGGAAT	TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAAATCATAGGACAGGTAAGAGATCAAGCTGAACATC TTAAGACAGCAGTACAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAA AAGAAGGGGGATTGGGGATACAGTGCAGGGGAAAGAATAATAG CATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAACAAA ATAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGAGACAG
6:F1_AF005494	TAAGGCAGCTTGTGGTGGGCAGGTATCCAGCAGGAATTTGGAAT	TCCCTACAACCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAGCTAAAGAAAAATCATAGGACAGATAAGAGATCAAGCTGAACAT CTTAAGACAGCAGTCCAAATGGCAGTATTCATTCACAATTTTAAAA GAAAAGGGGGATTGGGGGATACAGTGCAGGGGAAAGAACAATA GACATAATAGCAACAGACATACAAACTAGAGAATTACAAAACAAA TTATAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG
7:F2_AJ249236	TAAGGCAGCCTGTTGGTGGGCAGGTATCCAGCAGGAATTTGGAGT	TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAAATCATAGGACAGATAAGAGATCAAGCTGAACATC TTAAGACAGCAGTCAAATGGCAGTATTCATTCACAATTTTAAAA AAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAATAG ACATAATAGCAACAGATATACAAACTAAAGAATTACAAAACAAA TACAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTTCAGGGACAG
8:G_K03455	AAAGGCAGCATGTTGGTGGGCAAATATCACACAGGAATTTGGAAT	TCCCTACAATCCCCAAAGCCAAGGAGTAGTGAATCTATGAATAAC GAATTAAGAAAAATCATCGGACAGGTTGGAGATCAAGCTGAACAT CTTAAGACAGCAGTACAGATGGCAGTATTCATTCACAATTTTAAAA GAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAATA GACATAATAGCATCAGATATACAAACTAAAGAATTACAAAACAAA TTATAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG
9:H_AF005496	TAAGGCAGCCTGTTGGTGGGCAGATATCCAACAGGAATTTGGGAT	TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAGATCATAGGGCAGGTAAGAGACCAAGCAGAACAC CTTAAGACAGCAGTACAATGGCAGTATTCATTCACAATTTTAAAA GAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAATA GACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAACAAA TTTCAACATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG

表4. 人工合成オリゴヌクレオシド配列 (続き)

10:J_AF082394	GAAGGCAGCCTGTTGGTGGGCAGATATCAAGCAGGAATTTGGAAT TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAATCATAGGACAGGTAAGAGAACAAGCTGAACAC CTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATACACAATTTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGATACAGTGCAGGGGAAAGAATAATA GACATAATAGCAACAGACATACAACTAGAGAATTACAAAAACAA TTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG
11:K_AJ249235	TAAGGCAGCCTGTTGGTGGGCAGATATCAAGCAGGAATTTGGAAT TCCCTACAATCCCCAAAGCCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAATCATAGGACAGGTAAGGGAGCAGGCTGAACAT CTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATTCACAATTTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGAGAGAGAATAATA GATATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAA TTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG
12:N_AJ006022	AAAAGCAGCCTGTTGGTGGGCAAATATCAAACAGGAATTTGGGAT ACCCTACAATCCTCAAAGTCAGGGAGCAGTAGAGTCCATGAATAA AGAATTAAGAAAATTTATAGGACAAATCAGAGATCAAGCAGAACAT CTAAAGACAGCAGTCAAATGGCGGTTTTCATTCAAAATTTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACACTGCAGGGGAAAGAATAATA GACATAATAGCAACAGACATACAGACAACAAATTTACAAACACAA TTTTAAAAGTTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGAGACAG
13:O_L20587	GAAGGCTGCATGTTGGTGGGCCAACATACAACATGAGTTTGAAT ACCATAAATCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAAGCCATGAATAAC GAATTAATAATCAATTATACAGCAGGTGAGGGACCAAGCAGAACAC TTAAGAACAGCAGTACAAATGGCAGTATTTGTTTACAATTTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACACTGCAGGAGAAAGGATAATA GACATAATAGCATCACAATACAAACAACAGAATTACAAAAACAA TTTTAAAATTTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGAGACAG
14:U_EF029069	TAAGGCAGCCTGTTGGTGGGCAGGTATCAAGCAGGAATTTGGAAT TCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAATCATAGGACAGGTAAGAGATCAAGCTGAACAT CTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTCTTCATTCAAAATTTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAATA GACATAATAGCAACAGACATACAACTACAGAATTACAAAAACAA TTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG

HCV核酸合成領域

Genotype_Acesion No.	5'-	Sequence	-3'
1: 1a_AF009606		GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGTCGTCAGCCTCC AGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGG TGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGTCCTTTCTTGGATA AACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTG CTAGCCGAGTAGTGTGGTFCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCT GATAGGGTGCTTGCAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCA	
2: 2a_D00944		GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGTCGTCAGCCTCC AGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGG TGAGTACACCGGAATTGCCCGGAAGACTGGGTCTTTCTTGGATA AACCCACTCTATGCCCGTCAATTGGCGTGCCCCGCAAGACTG CTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCT GATAGGGTGCTTGCAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCA	
3: 3a_D17763		GAAAGCGCCTAGCCATGGCGTTAGTACGAGTGTGTCGTCAGCCTCC AGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGG TGAGTACACCGGAATCGCTGGGGTACCGGGTCTTTCTTGGAGC AACCCGCTCAATACCCAGAAATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTCA CTAGCCGAGTAGTGTGGTFCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCT GATAGGGTGCTTGCAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCA	
4: 4a_Y11604		GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGTCAGCCTCC AGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTTCCGAACCGGT GAGTACACCGGAATCGCCGGGATGACCGGGTCTTTCTTGGATA AACCCGCTCAATGCCCGAAATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGC TAGCCGAGTAGTGTGGTFCGCGAAAGGCCTTGCGGTACTGCCTG ATAGGGTGCTTGCAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCA	

表4. 人工合成オリゴヌクレオシド配列(続き)

5. 6b_D84262	GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCC AGGCCCCCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTAGTCTGCGGAACCGGT GAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTCCATTGGAT CAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGAC TGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCCTTGTGGTACTG CTGATAGGGTCTTGCAGTGCCTCCCGGAGGTCTCGTAGACCGTGC CA
6. 6k_D84264	GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCC AGGACTCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTAGTCTGCGGAACCGGT GAGTACACCGGAATTGCCAGGATGACCGGGTCTTCTTGGATCA ACCCGCTCGATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGATTGC TAGCCGACTAGTGTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCTG ATAGGGTCTTGCAGTGCCTCCCGGAGGTCTCGTAGACCGTGC
7. 6p_EF424626	GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCC AGGATCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGT GAGTTCACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTCTTGGATCA AACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTG CTAGCCGAGTAGTGTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCT GATAGGGTCTTGCAGTGCCTCCCGGAGGTCTCGTAGACCGTGC
8. 6t_EF632070	GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCC AGGACCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGG TGAGTACACCGGAATTGCCAGGATGACCGGGTCTTCTTGGATC AACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTG CTAGCCGAGTAGTGTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCT GATAGGGTCTTGCAGTGCCTCCCGGAGGTCTCGTAGACCGTGC
9. 7a_EF108306	GAAAGCGTCTAGCCATGACGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCC AGGACCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGG TGAGTACACCGGAATTGCCGGAAAGACTGGGTCTTCTTGGATC AATCCACTCTATGCCCGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTG CTAGCCGAGTAGTGTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCT GATAGGGTCTTGCAGTGCCTCCCGGAGGTCTCGTAGACCGTGC

HBV核酸合成領域

Genotype_Accession No.	5'- Sequence -3'
1:A_X02763	ATTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCAAC AACCAACCAGTACGGGACCATGCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCA AGGCAACTCTATGTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGAT GGAAATTGCACCTGTATTCCATCCCATCGTCTGGGCTTTCGCAA AATACCTATGGGAGTGGGCTCAGTCCGTTTCTCTGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCC
2:B_D00329	ACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCATC AACCACCAGCACGGGACCATGCAAGACCTGCACAACCTCCTGCTCA AGGAACTCTATGTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTATGGAT GGAAACTGCACCTGTATTCCATCCCATCATCTGGGCTTTCGCAA AATACCTATGGGAGTGGGCTCAGTCCGTTTCTCTGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCC
3:C_X04615	ACTACCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTACTTCCAGGAACATC AACTACCAGCACGGGACCATGCAGAACCTGCACGATTCCTGCTCA AGGAACTCTATGTTCCCTCTTGTGCTGTACAAAACCTTCGGAC GGAAACTGCACCTGTATTCCATCCCATCATCTGGGCTTTCGCAA GATTCCTATGGGAGTGGGCTCAGTCCGTTTCTCTGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCC
4:D_X65259	ACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTTC AACCAACCAGCACGGGACCATGCAGAACCTGCACGACTCCTGCTCA AGGAACTCTATGTTCCCTCCTGTTGCTGTACAAAACCTTCGGAC GGAAATTGCACCTGTATTCCATCCCATCATCTGGGCTTTCGCAA AATTCCTATGGGAGTGGGCTCAGCCCGTTTCTCTGGCTCAGTTT TACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCC