

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

Cluster No	Main Product	No. of Predicted Primers	Degeneracy in predicted primers
1	DNA packaging terminase subunit 2	21	13~27
2	Single-stranded DNA-binding protein	52	14~26
3	DNA polymerase catalytic subunit	45	13~24
4	Helicase-primase helicase subunit	110	12~27
5	Nuclear egress lamina protein	29	13~25
6	Major capsid protein	177	8~27

表4 HHV-5, HHV-6 および HHV-7 遺伝子群の第6クラスターから予測された最適プライマー

Pair ID	Forward primer	Average location of forward primer	Reverse primer	Average location of reverse primer	Total degeneracy in primer pair	Average size of PCR product
1	GACGGYGGTTTTCKCT	142	GCRAADCCMGGRTGRAT	152	8	198

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

ID	Accession	Annotation	Subgenus/ Serotype	Nucleotide length	Amino acid length
1	AF534906	Human adenovirus type 1 subgroup C complete genome	1	3171	1056
2	AF532578	Human adenovirus type 11 strain Slobitski complete genome	11	3369	1122
3	X73487	Adenovirus type 12 DNA complete genome	12	3186	1061
4	AY803294	Human adenovirus type 14 strain de Wit complete genome	14	3582	1193
5	FJ822614	Human adenovirus 14 isolate Ad14-303600 complete genome	14	3369	1122
6	AY601636	Human adenovirus type 16 strain ch. 79 complete genome	16	3582	1193
7	AF108105	Human adenovirus type 17 complete genome	17	3276	1091
8	GU191019	Human adenovirus 18 complete genome	18	3576	1191
9	EF121005	Human adenovirus 19 strain C complete genome	19	3276	1091
10	J01917	Adenovirus type 2 complete genome	2	3171	1056
11	AY601633	Human adenovirus type 21 strain AV-1645 complete genome	21	3582	1193
12	FJ404771	Human adenovirus 22 isolate AV-2711 complete genome	22	3531	1176
13	EF153474	Human adenovirus type 26 complete genome	26	3276	1091
14	FJ824826	Human adenovirus 28 strain BP-5 complete genome	28	3531	1176
15	AY599834	Human adenovirus type 3 strain GB complete genome	3	3582	1193
16	AY599836	Human adenovirus type 3 strain NHRC 1276 complete genome	3	3573	1190
17	AM749299	Human adenovirus type 31 complete genome serotype 31	31	3555	1184
18	AY737797	Human adenovirus type 34 strain Compton complete genome	34	3582	1193
19	AY128640	Human adenovirus type 35 strain Holden complete genome	35	3369	1122
20	AY271307	Human adenovirus type 35 strain 35p complete genome	35	3369	1122
21	AY458656	Human adenovirus type 4 strain CL68578 complete genome	4	3066	1021
22	AY594253	Human adenovirus type 4 strain RI-67 complete genome	4	3582	1193
23	AY594254	Human adenovirus type 4 vaccine strain complete genome	4	3582	1193
24	AY599835	Human adenovirus type 4 strain NHRC 42606 complete genome	4	3582	1193
25	AY599837	Human adenovirus type 4 strain NHRC 3 complete genome	4	3582	1193
26	EF153473	Human adenovirus type 48 complete genome	48	3276	1091
27	DQ393829	Human adenovirus type 49 complete genome	49	3276	1091
28	AY601635	Human adenovirus type 5 strain NHRC Ad5FS 7151 complete genome	5	3597	1198
29	AY737798	Human adenovirus type 50 strain Wan complete genome	50	3582	1193
30	FJ169625	Human adenovirus 53 complete genome	53	3498	1165
31	AY495969	Human adenovirus type 7 vaccine strain complete genome	7	3369	1122
32	AY594255	Human adenovirus type 7 strain Gomen complete genome	7	3582	1193
33	AY594256	Human adenovirus type 7 vaccine strain complete genome	7	3582	1193
34	AY601634	Human adenovirus type 7 strain NHRC 1315 complete genome	7	3582	1193
35	GQ478341	Human adenovirus 7 strain GZ08 complete genome	7	3582	1193
36	NC_001460	Human adenovirus A complete genome	A	3570	1189
37	DQ099432	Human adenovirus B strain Guangzhou01 complete genome	B	3501	1166
38	DQ105654	Human adenovirus B strain Guangzhou02 complete genome	B	3501	1166
39	NC_011202	Human adenovirus B2 complete genome	B	3582	1193

40	NC_011203	Human adenovirus B1 complete genome	B	3582	1193
41	NC_001405	Human adenovirus C complete genome	C	3597	1198
42	NC_010956	Human adenovirus D complete genome	D	3531	1176
43	NC_003266	Human adenovirus E complete genome	E	3582	1193
44	NC_001454	Human adenovirus F complete genome	F	3567	1188

表6 ヒトアデノウイルスの各亜属に含まれる血清型

亜属	血清型
A	12, 18, 31
B1	3, 7, 16, 21, 50
B2	11, 14, 34, 35
C	1, 2, 5, 6
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51
E	4,
F	40, 41

表7 ヒトアデノウイルス A, B1, B2, D および E 各亜種から予測された亜種共通プライマーセット

Pair ID	Forward primer	Average location of forward primer	Reverse primer	Average location of reverse primer	Total degeneracy in primer pair	Average size of PCR product
1	GGCATGTAYGCMTCBGC	101	IGGRGGGTCNGCRTC*	286	12	185

I: Inosine 酸塩基ヌクレオチド、全ての塩基と二重鎖が形成される

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

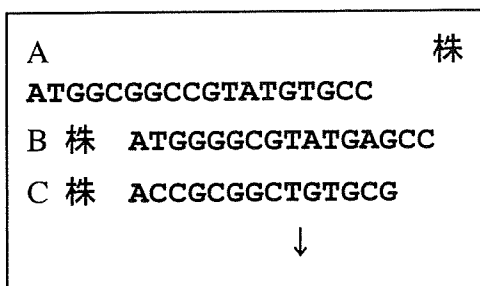
ウイルス種	cc-1	ウイルス種	cc-1
HAdV 1	○	HAdV4	○
HAdV 11	○	HAdV4/NHRC42606	○
HAdV 12	○	HAdV4 /NHRC3	○
HAdV 14	○	HAdV 48	○
HAdV 14/Ad14	○	HAdV49	○
HAdV 16	○	HAdV5	○
HAdV 17	○	HAdV 50	○
HAdV 18	○	HAdV53	○
HAdV 19	○	HAdV 7	○
HAdV 2	○	HAdV7	○
HAdV 21	○	HAdV 7/Gome	○
HAdV 22	○	HAdV 7/NHRC1315	○
HAdV 26	○	HAdV 7 /GZ08	○
HAdV 28	○	HAdV A	◎
HAdV 3	○	HAdV B/Gua01	○
HAdV 3/NHRC1276	○	HAdV B/Gua02	○
HAdV 31	○	HAdVB2	◎
HAdV 34	○	HAdV B1	◎
HAdV 35	○	HAdV C	◎
HAdV 35/35p	○	HAdV D	◎
HAdV 4/CL68578	○	HAdV E	◎
HAdV 4/RI67	○	HAdV F	◎

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

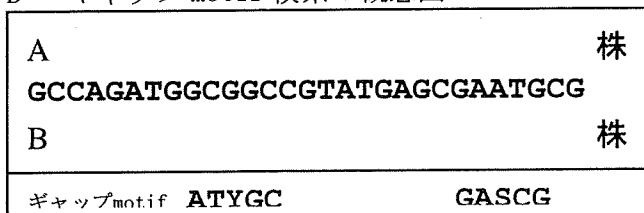
Oligomer name	Sequence	Oligomer length
HAdV_o_dp2_141_t36_1	GCGGCATGTATGCATC	16
HAdV_o_dp2_141_t36_2	GGGGTTAAGGGGAGGACCCCAAGGCATGGGGTGTGTGAGGCCGATGCATACATGCCG	58
HAdV_o_dp2_141_t36_3	CCTCCCCTTAACCCCTATGAGCGGGCATTGGCCGTGCGGCAATGGCAGGTGGCGCTGG	58
HAdV_o_dp2_141_t36_4	ACAAGATTTTTGTCAAAATAATCAATTTTGAAGTGAATTTCCAGCGCCACCTGCC	59
HAdV_o_dp2_141_t36_5	TTATTTTGACAAAAATCTTTGTCTGGCATTCTTACTATAGATGCCGACCCCCAGAGA	57
HAdV_o_dp2_141_t36_6	TCTGGGGGGTCGGCA	15
HAdV_o_dp2_141_t39_1	GTGGCATGTATGCCTCTG	18
HAdV_o_dp2_141_t39_2	GGGTTAAGGGGACTGCCCATGGCATGGGATGGGTGAGTGCAGAGGCATACATGCC	56
HAdV_o_dp2_141_t39_3	CAGTCCCCTTAACCCATATGAGCGCGCACTGGCAGCTCGAGAATGGCAAAATGGCCT	56
HAdV_o_dp2_141_t39_4	TAAATCCTTATCAAAATAGCTGATGGGAGTGGGGTCACTAAGGCCATTTGGCATT	56
HAdV_o_dp2_141_t39_5	AGCATTTTGATAAGGATTTACTTCCGGGAATCTTTACCATGGATGCAGACCCCTCCCGA	59
HAdV_o_dp2_141_t39_6	TCCGGAGGGTCTGCA	15
HAdV_o_dp2_141_t40_1	GTGGCATGTATGCCTCC	17
HAdV_o_dp2_141_t40_2	GGTTAAGAGGGGTGCCCAAGGCATGGGGTGGGTGAGCGCGGAGGCATACATGCCA	56
HAdV_o_dp2_141_t40_3	GCACCCCTTAAACCCCTATGAGCGCGCTGGCAGTTCGAGAATGGCAGATGACCTT	58
HAdV_o_dp2_141_t40_4	AGCAAACTTTGTCAAAATAGCTGATGGTGGCGGGATCAATCAAGGCATCTGCCATT	59
HAdV_o_dp2_141_t40_5	TATTTTGACAAAGATTTGCTACCGGGAATATTACCATAGATGCCGACCCCTCGA	56
HAdV_o_dp2_141_t40_6	TCAGGGGGTCCGCA	15
HAdV_o_dp2_141_t41_1	GCGGCATGTACGCCTC	16
HAdV_o_dp2_141_t41_2	GGTTGAGTGGGGGACCCCATGGCATGGGGTGGGTGAGCGCGGAGGCGTACATGCCG	56
HAdV_o_dp2_141_t41_3	GTCCCCCACTCAACCCATACGAGCGCGCGCTTGGCCCGCGCATGGCAGCAGGGC	56
HAdV_o_dp2_141_t41_4	CGCGCTCGAAGTAGTCTATCTTGCATCCTTGAAGTCTAGCCCTGCTGCCATGC	56
HAdV_o_dp2_141_t41_5	CTACTTCGACCGCGCTGTGCCCGGGTCTTTACCGTGACCGAGACCCCCCGGA	57
HAdV_o_dp2_141_t41_6	TCCGGGGGGTCTGCG	15
HAdV_o_dp2_141_t42_1	GCGGCATGTACGCCTC	16
HAdV_o_dp2_141_t42_2	GGTTGAGGGGCGGACCCCAAGGCATGGGATGAGTGAAGGCGGAGGCGTACATGCCG	56
HAdV_o_dp2_141_t42_3	GTCCGCCCTCAACCCCTACGAGCGAGCGCTGGCCCGCGGAGTGGCAGATGGCC	56
HAdV_o_dp2_141_t42_4	GTTCTTGTCAAAATAATCGATTTTGAAGATGCATCAATCAAGGCATCTGCCACTC	58
HAdV_o_dp2_141_t42_5	GATTATTTGACAAGGAATCTGTCCGGCATCTTACCATCGATGCCGACCCCTCGA	59
HAdV_o_dp2_141_t42_6	TCAGGGGGTCCGCA	15
HAdV_o_dp2_141_t43_1	GCGGCATGTACGCCTC	16
HAdV_o_dp2_141_t43_2	GACTAAGGGGCGTCCCCAAGGCATGGGGTGGGTGAGCGCGGAGGCGTACATGCCG	56
HAdV_o_dp2_141_t43_3	GCACGCCCTTAGTCCCTACGAGCGCGCGTGGCCGTGCGGAATGGCAAGCTTCT	56
HAdV_o_dp2_141_t43_4	TCCGGGTGGAAGTAGCTTATGCAGGTGCCAGATCGTCCAGAGAAGCTTGCATT	56
HAdV_o_dp2_141_t43_5	CTACTTCGACCCGACCTCCTGCCAGGCATCTTACCATCGATGCTGACCCCCCGA	57
HAdV_o_dp2_141_t43_6	TCCGGGGGGTCCGCA	15
HAdV_o_dp2_141_t44_1	GTGGCATGTACGCCTC	16
HAdV_o_dp2_141_t44_2	GATTGAGTGGGAAGCCCAAGGCATGGGATGGGTAAGTGCAGAGGCGTACATGCCA	56
HAdV_o_dp2_141_t44_3	GCTTCCCACTCAATCCCTACGAGCGCGCTAGCCGTCCGAGATTGGGAACAGGCTC	57
HAdV_o_dp2_141_t44_4	CAGGGTGGGATTGAAATAATCAATGGGGTACCAACTTGCAAAAGAGCGTGTCCCAAT	59
HAdV_o_dp2_141_t44_5	TTCAATCGACCCCTGCTGCCGGCATTTTACCATCGAGCGGACCCCCAC	53
HAdV_o_dp2_141_t44_6	GGTGGGGGGTCCGCG	

図1 CoCoMo プログラムの模式図

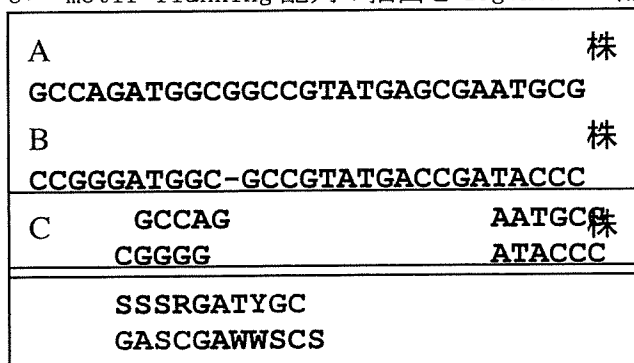
A: 対象配列の整列



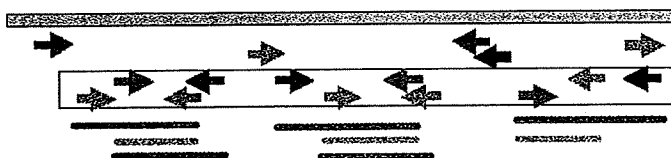
B: ギャップ motif 検索の概念図



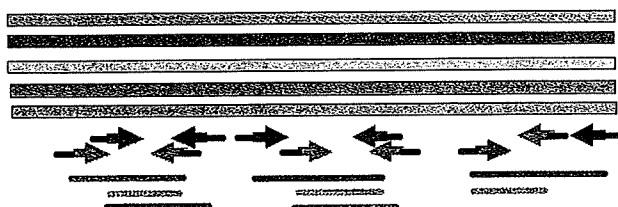
C: motif flanking 配列の抽出と degenerate 配列の決定



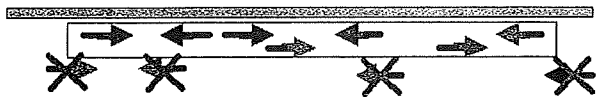
D: プライマー候補1の仮想PCR



E: プライマー候補1の伸長



F: 忌避配列を含む候補の棄却

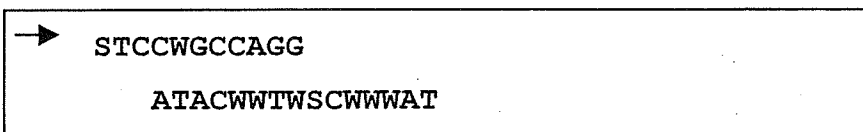


G: プライマー候補 2 による仮想 PCR

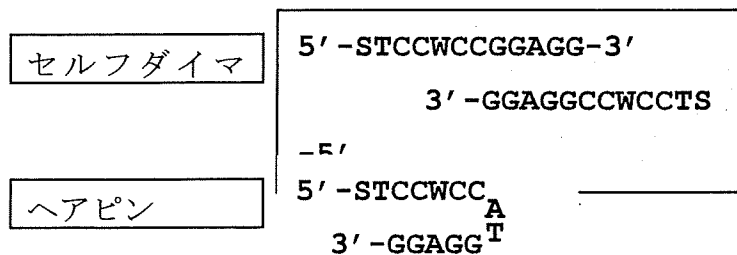


H: プライマー候補 2 の塩基長の調整

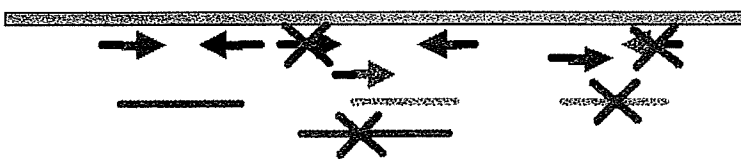
GSSSSTCCWGCCAGG



I: プライマー候補 3 の評価



J: プライマー候補 3 の評価



K: プライマーペア候補 2 の評価

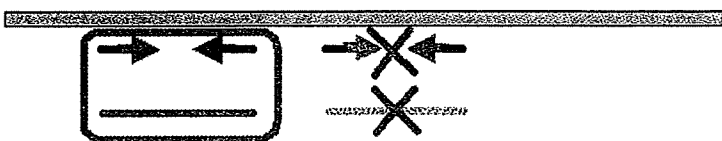
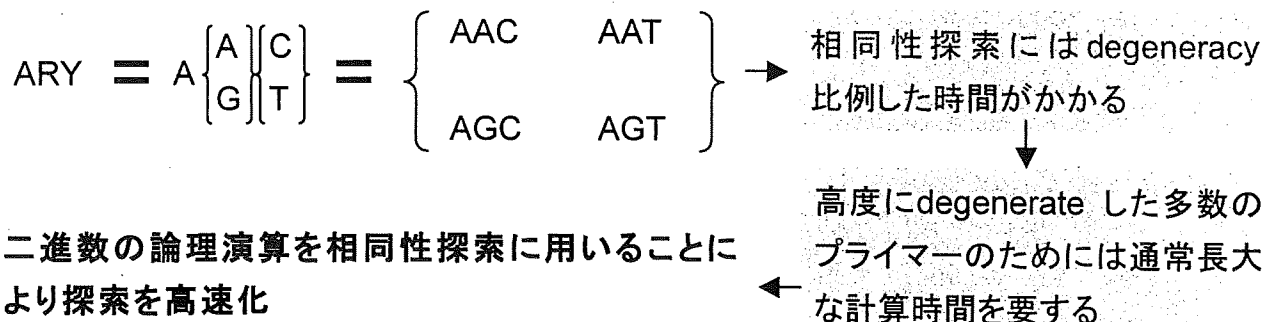


図2 degenerate プライマーの高速 Homology 検索モジュール(Estimate)

A: 相同性検索の問題点



B: 混合塩基の二進数表現

塩基	二進数表現	混合塩基	二進数表現	混合塩基	二進数表現
A	0001	W (A+T)	1001	H (A+C+T)	1011
C	0010	S (G+C)	0110	B (G+T+C)	1110
G	0100	R (A+G)	0101	V (G+C+A)	0111
T	1000	Y (C+T)	1010	D (G+A+T)	1101

C: 二進数表現化された塩基の相同性演算

	塩基	二進数	塩基	二進数	塩基	二進数	塩基	二進数
混合塩基	W	1001	W	1001	H	1011	D	1101
塩基	A	0001	C	0010	C	0010	C	0010
論理積		0001		0000		0010		0000
相同性	50%	1/2	0%	0/2	33%	1/3	0%	0/3

図3 OE-PCR 法の概念図

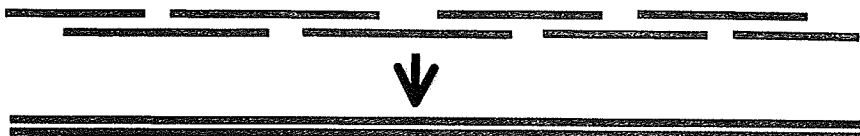
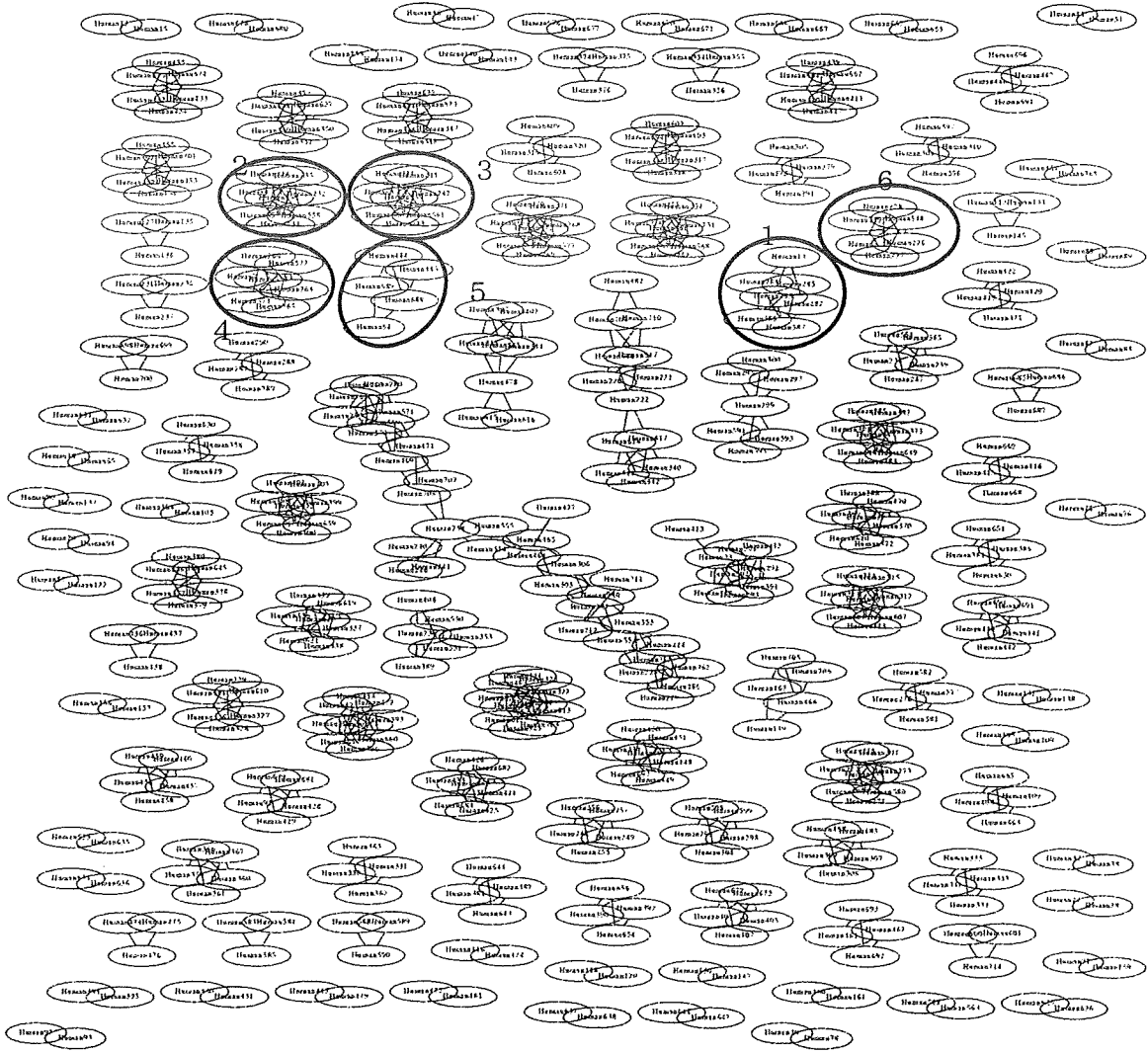
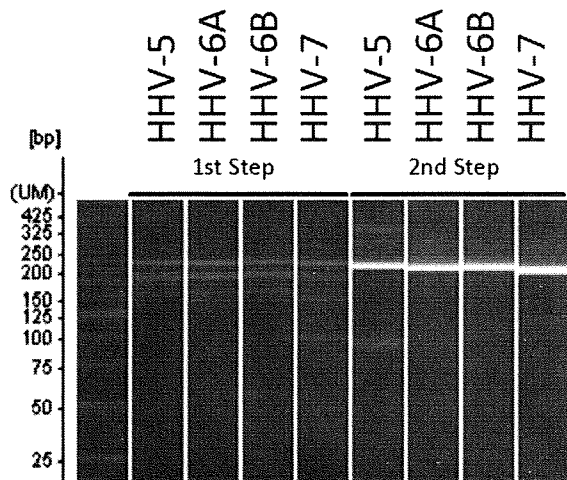


図4 HHV-5, HHV-6 および HHV-7 ウイルス遺伝子群のクラスターとプライマー設計対象グループ



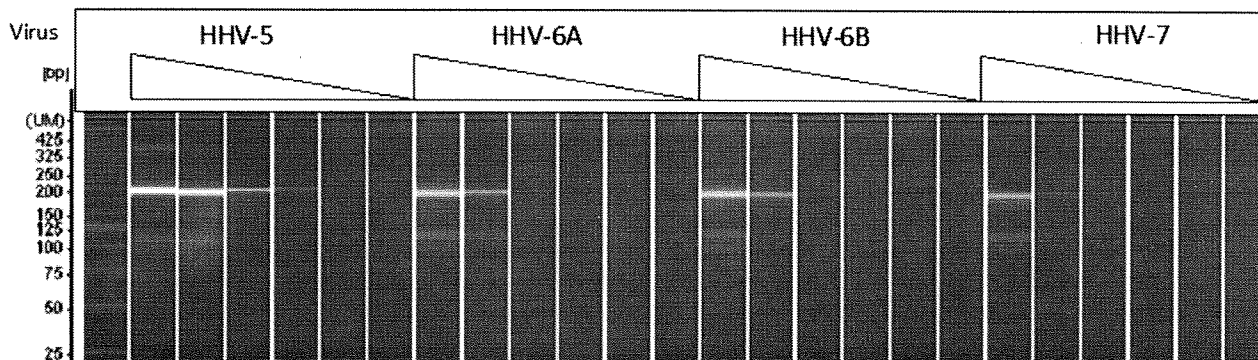
図中の各楕円の点は遺伝子を示し、楕円内にはウイルス名称(Human5, Human6 または Human7)と遺伝子番号が連続して記載されている(たとえば HHV-5 ウイルスの整理番号 11 番の遺伝子は Human511 と記載される)。実際にプライマー設計を試みた 6 つのクラスターを青い円で囲んでいる。

図5 HHV-5, HHV-6A, HHV-6B および HHV-7 の major capsid protein を合成するための OE-PCR 結果



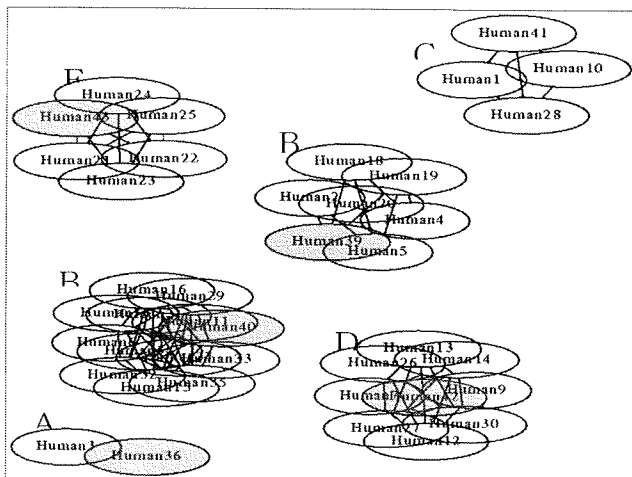
HHV-5, HHV-6A, HHV-6B および HHV-7 の major capsid protein の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントのマイクロチップ電気泳動像。各レーンには、ヘルペスウイルスの種名を示す。PCR 反応は PrimerStarHS キットによって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左にマイクロチップ電気泳動装置が算出したマーカーの位置を示す。

図6 HHV-5, HHV-6A, HHV-6B および HHV-7 の major capsid protein OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅



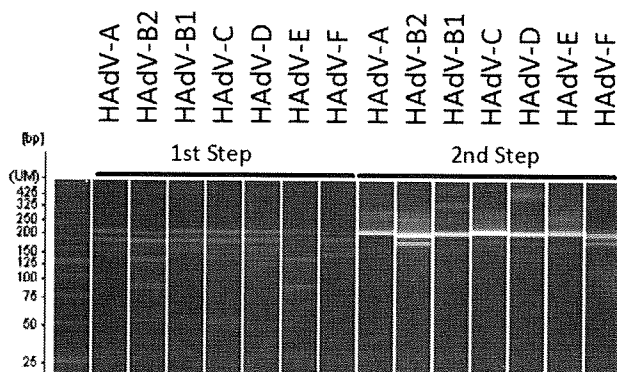
HHV-5, HHV-6A, HHV-6B および HHV-7 の major capsid protein の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントを鋳型として degenerate プライマーで一部を増幅した PCR 産物のマイクロチップ電気泳動像。各レーンの上一段目にヘルペスウイルスの種名を、二段目に OE-PCR 産物の copy 数の序列を示す。三角形の底辺から 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10^1 および 10^0 の OE-PCR 産物が理論的に PCR 反応の鋳型として用いられたことを示す。PCR 反応は GoTaqMixture によって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左にマイクロチップ電気泳動装置が算出したマーカーの位置を示す。

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



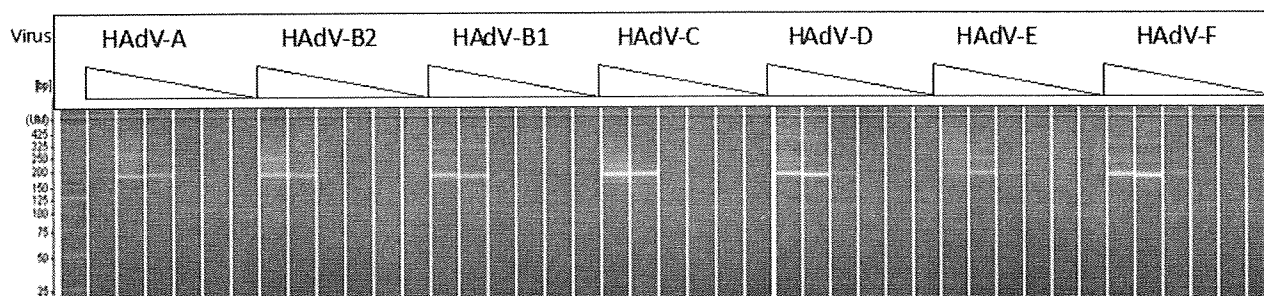
図中の各楕円の点は遺伝子を示し、楕円内にはウイルス型名称と遺伝子番号が連続して記載されている。実際にプライマー設計に用いられた代表的ウイルス型を青い楕円で示す。

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



ヒトアデノウイルス DNA polymerase 遺伝子の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントのマイクロチップ電気泳動像。各レーンには、ヘルペスウイルスの種名を示す。PCR 反応は PrimerStarHS キットによって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左にマイクロチップ電気泳動装置が算出したマーカーの位置を示す。

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



ヒトアデノウイルス DNA polymerase 遺伝子の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントを鋳型として degenerate プライマーで一部を増幅した PCR 産物のマイクロチップ電気泳動像。各レーンの上一段目にヒトアデノウイルスの型名を、二段目に OE-PCR 産物の copy 数の序列を示す。三角形の底辺から 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10^1 および 10^0 の OE-PCR 産物が理論的に PCR 反応の鋳型として用いられたことを示す。PCR 反応は GoTaqMixture によって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左にマイクロチップ電気泳動装置が算出したマーカーの位置を示す。

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）

ウイルス検出の自動化の実現性検討に関する研究

研究分担者：水谷哲也 国立感染症研究所・ウイルス1部
山口一成 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：澤井恒治 横河電機 技術開発本部 遺伝子計測研究所
中島龍生 日本パーカーライジング広島工場
木場佳治 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
滝澤和也 国立感染症研究所・血液安全性研究部
遠藤大二 酪農学園大・獣医学部

研究要旨

ウイルス検出の自動化は、検査する者の安全性や結果の信頼性の上で非常に重要である。本年度は研究班全体でおこなってきたウイルス種特異的なプライマーの設計や増幅方法の検討の延長上の研究として、ウイルス検出の自動化に向けた検討をおこなった。ウイルス検出までの過程には、検体からの核酸抽出、核酸の増幅、DNAチップへのハイブリダイゼーション、検出のステップが含まれる。この自動化装置を作成している横河電機では、すでに核酸の抽出と増幅が検討されているので、本研究ではDNAチップ上での検出工程について重点的に検討をおこなった。

A. 研究目的

本研究では、HCV、HBV、HIVウイルスの検出自動化にむけての実現性検討を行う。具体的には、DNAチップを用いたウイルスの自動検出システムを試作し、血液もしくは原料血漿から抽出された病原体由来の核酸増幅産物に対し、その蛍光検出ま

でのハイブリダイゼーション工程を自動化するための実現性を検討する。

B. 材料と方法

材料ならびに装置

- ・病原体検出用DNAチップ（（株）日本パーカーライジング広島工場製）
- ・集積型カートリッジ（横河電機）

- ・ バイオチップ読取装置（横河電機）
- ・ 蛍光標識検体 HCV, HBV, HIV（国立感染症研究所よりご提供）
- ・ 洗浄液 A
- ・ 洗浄液 B

集積型カートリッジ（試作開発中）

DNAチップは、基板上に固定化された1本鎖のDNA（プローブDNA）が配置されたものである。1本鎖のDNAは、互いに相補的な配列同士でハイブリッドを形成し結合する性質がある。この性質を利用し、DNAチップに検体を反応させることで、検体中にDNAチップと相補的なDNA配列が存在していれば、この配列は固定化されたチップ上の特定部位へとアドレスングされる。プローブDNAとの結合の有無は蛍光によって検出され、結果として検体中に目的の配列を含むDNAが存在していたかを知ることができる。

1) また、核酸同士のハイブリッド形成には加温が必要となる。この温度設定により、プローブDNAとその相補的なDNA配列との結合の正確性と効率が変化するため、適切な値とすることが必要となる。また、プローブDNAに結合する相補DNAの量は、反応時間に大きく依存するため、こちらも検出に必要な値を設定する必要がある。さらに、洗浄液の塩および界面活性剤濃度、洗浄時間によってストリンジェンシーが変化するため、洗浄過程

もハイブリダイゼーションの正確性に影響する重要なステップである。2) 集積型カートリッジは、これらの工程をカートリッジ内部の流体処理・反応技術を用いて、全自動で行うことを可能としている。図1に、集積型カートリッジの特徴を示す。あらかじめ試薬が封入され、また廃液を出さない集積型の構造とすることで、外界とカートリッジ内部の処理系との隔離を実現している。これによって危険な菌やウイルスのカートリッジ外への漏出と、ノイズとなる外部の生体分子のカートリッジ内部への混入が防止できる。また、作業者のスキルの影響を受けない安定した反応を実現できる。さらに測定終了後は、検体や廃液を含む集積型カートリッジ全体を焼却・廃棄可能である。これらによって医療の現場に普及させるために必要な、安全、確実に簡単な測定が可能となる。3)

バイオチップ読取装置（試作開発中）

本装置は、DNAチップ上の蛍光をレーザーで読みとり、遺伝子を特定する。その際、一度に複数のレーザー光をDNAチップのプローブに当てて同時に読み取るマルチビーム方式を採用したことで、DNAチップを動かさずに計測できる。この結果、読取装置の振動発生を抑え、医療現場で要求される測定の安定性を確保している。

また、共焦点スキャナで培った高感度

蛍光検出技術を応用することで背景光を低減した。さらに光源と受光系の光学系・画像処理に改良を加え、高感度かつ16ビットを越える広ダイナミックレンジを実現した。図2参照。3)

手順

本研究は、以下の手順にて履行した。

1) 提供されたチップ単体のハイブリダイゼーション確認 (HIV、HBV、HCV)

2) 本件に対応する集積型カートリッジの検討・開発

3) 提供されたチップの集積型カートリッジへの組み込み作業

4) 集積型カートリッジ内での反応

実験

5) DNAチップの計測実験

方法

(1) 集積型カートリッジに組み込まれる病原体検出用DNAチップに関して、これらハイブリダイゼーションの温度、時間条件および洗浄条件は、感染症研究所での研究によって十分に検討されている。そこで本試作の集積型カートリッジでの反応諸条件は、これに準ずるように設定した。

(2) 本試作の集積型カートリッジの開発においては、あらかじめ調製されたハイブリダイゼーション溶液をサンプルとし、カートリッジ内でサンプルの送液・DNAチップ加熱・

冷却、溶液の混合を行なうことができるよう設計した。

(3) 必要試薬 (ハイブリダイゼーションの洗浄液) は、微小容器に封入されてカートリッジに内蔵された状態とし、外部からの溶液供給を必要としない、独立したカートリッジとした。これにより作業者はカートリッジを専用の送液装置にセットする操作だけで、ハイブリダイゼーションが完結するような機構とした。

(4) 供給された日本パーカーライジング社製のDNAチップの寸法 (3mmx3mm) に合わせ、集積型カートリッジのDNAチップ搭載部分を設計した。

(5) 集積型カートリッジはHCV、HBV、HIVの識別が可能な上記病原体検出用DNAチップを搭載し、洗浄液A、Bを内蔵するものとした。

(6) サンプルはPCRによる遺伝子増幅時にCy5を取り込ませ、標識検体としたものを使用した。この検体は、国立感染症研究所より提供いただいた。この蛍光標識検体は、HBVはACCURUN325 HBV-DNA (MEDIMARK) を、RNAウイルスのHCV、HIVに関しては ACCURUN305 HCV-RNA (MEDIMARK) および ACCURUN315 HIV-RNA (MEDIMARK) を逆転写したcDNAをそれぞれ鋳型とし、Degenerate PrimerによるPCR産物を使用したものである。

- (7) 本試験では、HCV、HBV、HIV由来のDNAを含む標識済みのハイブリダイゼーション溶液をサンプルとした。このサンプルを集積型カートリッジに注入後、カートリッジ内の送液およびDNAチップの過熱冷却を行う専用の送液装置にセットし、下記に示すハイブリダイゼーション/洗浄工程を全自動で行った。
- (8) ハイブリダイゼーションと洗浄動作の終了したカートリッジをこの装置から取り出し、搭載されたDNAチップに対し横河製バイオチップ読取装置による蛍光の読取を行ない、ハイブリ画像を取得した(図3)。
- (9) カートリッジによる自動ハイブリダイゼーションに使う蛍光標識検体には、HCV、HBV、HIV、およびHCV、HBV、HIVを混合したもの(Mix)の4種を使用した。また、ハイブリダイゼーションの時間・温度、洗浄条件、洗浄溶液組成の各条件は、国立感染症研究所より示されたDNAチップの反応条件に従った。

ハイブリダイゼーション

調製したハイブリ液20 μ Lを用いて、50 $^{\circ}$ Cで2時間、ハイブリダイゼーションを行った。

洗浄処理

ハイブリ終了後、洗浄液Aにて室温で

10分間洗浄を行い、さらに、洗浄液Bにて室温で1分間洗浄を行った。

チップ画像取得

洗浄処理終了後、横河バイオチップ読取装置にて、Cy5のシグナルを検出し、ハイブリ後のチップ画像を取得した。

C. 研究結果

今回、国立感染症研究所より供給されたウイルス核酸由来の遺伝子増幅産物、および株式会社日本パーカーライジング広島工場より供給されたDNAチップを、横河電機株式会社が試作した自動化システム(集積型カートリッジ)に導入、適用し、機器動作とウエット反応の確認試験を行った。

これによる全自動ハイブリダイゼーションにおいて、DNAチップ上のHCV、HBV、HIVをそれぞれ認識する複数のスポットで、検体中の標識DNAに特異的なシグナルが得られることが確認された(図4)。

D. 考察と結論

国立感染症研究所で開発された病原体検出用DNAチップの検出自動化を目指し、横河電機では本DNAチップを搭載した集積型カートリッジを試作した。これを用いてハイブリダイゼーション/洗浄工程の自動化を試み、3種の病原体DNAのハイブリ結果が得られることを示した。

今後は核酸の抽出、増幅、精製を行う

前処理工程の自動化検討を進めることで、検体導入から検出までを全自動化させたシステムの実現が期待される。

参考文献

- 1) DNAマイクロアレイと最新PCR法 (松村正明, 秀潤社)
- 2) DNAマイクロアレイ (Mark Schena, タカラバイオ)
- 3) 横河技報 Vol.52 2008

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1) 論文発表

Kouji Sakai, Yuichi Ueno, Shuhei Ueda, Kaori Yada, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Kenichiro Mutoh, Kazuki Yoshioka, Masayuki Nakamura, Kazuaki Takehara, Shigeru Morikawa, Tetsuya Mizutani. Novel reovirus isolation from an Ostrich (*Struthio camelus*) in Japan. *Vet. Microbiol.* 2009. 134. 227-232. (Corresponding author: Tetsuya Mizutani)

Nakamura S, Yang CS, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, Goto N, Takahashi K, Yasunaga T, Ikuta K, Mizutani T, Okamoto Y, Tagami M, Morita R, Maeda N, Kawai J,

Hayashizaki Y, Nagai Y, Horii T, Iida T, Nakaya T. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. *PLoS ONE.* 2009. 4:e4219.

Yamao T, Eshita Y, Kihara Y, Satho T, Kuroda M, Sekizuka T, Nishimura M, Sakai K, Watanabe S, Akashi H, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Miyata T, Sakata A, Hosokawa M, Nakashima M, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Nakauchi M, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. Novel virus discovery from field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). *Arch Virol.* 2009. 154. 153-158.

(Corresponding author: Tetsuya Mizutani)

Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Ogata M, Nakauchi M, Kurane I, Mizuguchi M, Morikawa S. Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *J. Med. Virol.* 81. 1102-1108. 2009

Saijo M, Ami Y, Suzuki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. *J. Gen. Virol.* 2009. 90. 2266-2271.

Shumpei Watanabe, Naoya Ueda, Koichiro Iha, Joseph S. Masangkay, Hikaru Fujii, Phillip Alviola, Tetsuya Mizutani*, Ken Maeda, Daisuke Yamane, Azab Walid, Kentaro Kato, Shigeru Kyuwa, Yukinobu Tohya, Yasuhiro Yoshikawa, Hiroomi Akashi. Detection of a new bat gammaherpesvirus in the Philippines. *Virus Genes.* 2009. 39. 90-93.
(Corresponding author; Tetsuya Mizutani)

Nakauchi M, Fukushi S, Saijo M, Mizutani T, Ure AE, Romanowski V, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009. 16. 1132-1138.

Tomomitsu Satho, Hamady Dieng, Tetsuya Mizutani, Yuki Eshita, Takeshi Miyata, Parimal Talukder, Nobuhiro Kashige, Abu Hassan Ahmad and Fumio Miake. Fluorescence can be used to trace the fate of exogenous micro-organisms inside the alimentary tract of mosquitoes. *Journal of Parasitology and Vector Biology.* 1. 013-018. 2009

Kazuya Shirato and Tetsuya Mizutani. Replication, Transcription, and Translation of Coronaviruses. In *Viral Genomes.* (edited by Zhi Freng and Ming Long) Nova Publishers. 2009. pp.159-167.
(Corresponding author; Tetsuya Mizutani)

Tetsuya Mizutani. Signaling pathways of SARS-CoV in vitro and in vivo. In *Molecular Biology of the SARS-Coronavirus* (Edited by Sunil K Lai) (in press)
(Corresponding author; Tetsuya Mizutani)

水谷哲也 「川崎病ウイルス病因説」アクトリアル小児科診療 -Actual Series of Clinical Pediatrics. 「川崎病のすべて」(総編集：五十嵐隆、専門編集：石井正浩) 中山書店 (2009) pp30-31.

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. 2009. pp321-344. (Corresponding author; Tetsuya Mizutani)

該当なし

水谷哲也 「大量シーケンスによる川崎病の原因微生物の同定」 in 関東川崎病研究会レポート No. 23 http://www.kawasaki-disease.org/tokyo/oren/pdf/23report_2.pdf 2009

水谷哲也 「網羅的ウイルスゲノム検査 [新しいウイルス]」臨床と微生物 (近代出版) 36 卷 3 号 (2009) p239-244.

水谷哲也 「新興ウイルス感染症の網羅的検出方法 (RDV法) の確立と畜産分野への応用の可能性」 獣医畜産新報 (文永堂出版) 62 卷第 10 号 (2009) p821-822

水谷哲也 「レオウイルス」 in 「広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査 (3) (第 7 版) - その数値をどう読むか -」日本臨床 2010 年増刊 (印刷中)

2) 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況