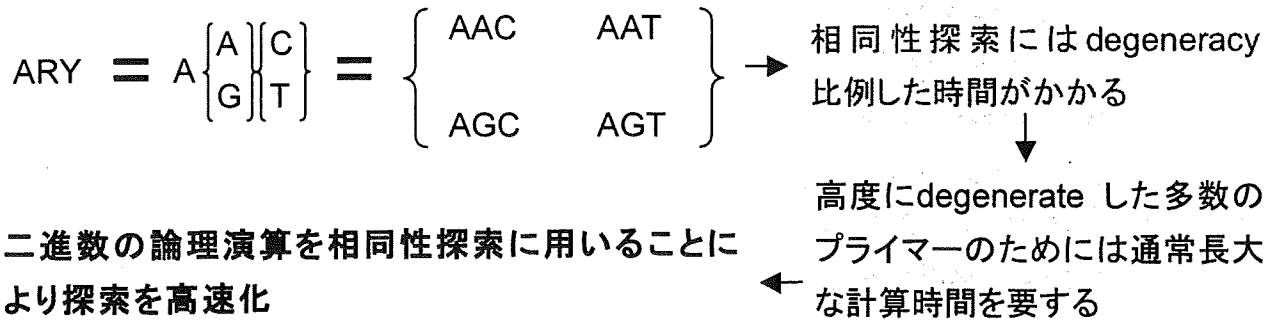


図3 degenerate プライマーの高速 Homology 検索モジュール(Estimate)

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4 OE-PCR法の概念図

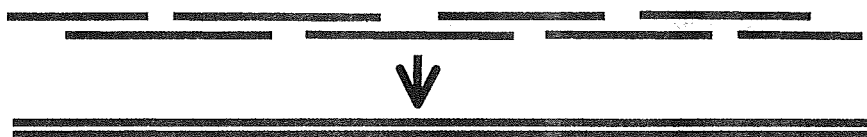


図5 コロナウイルス科の遺伝的近縁性相関図

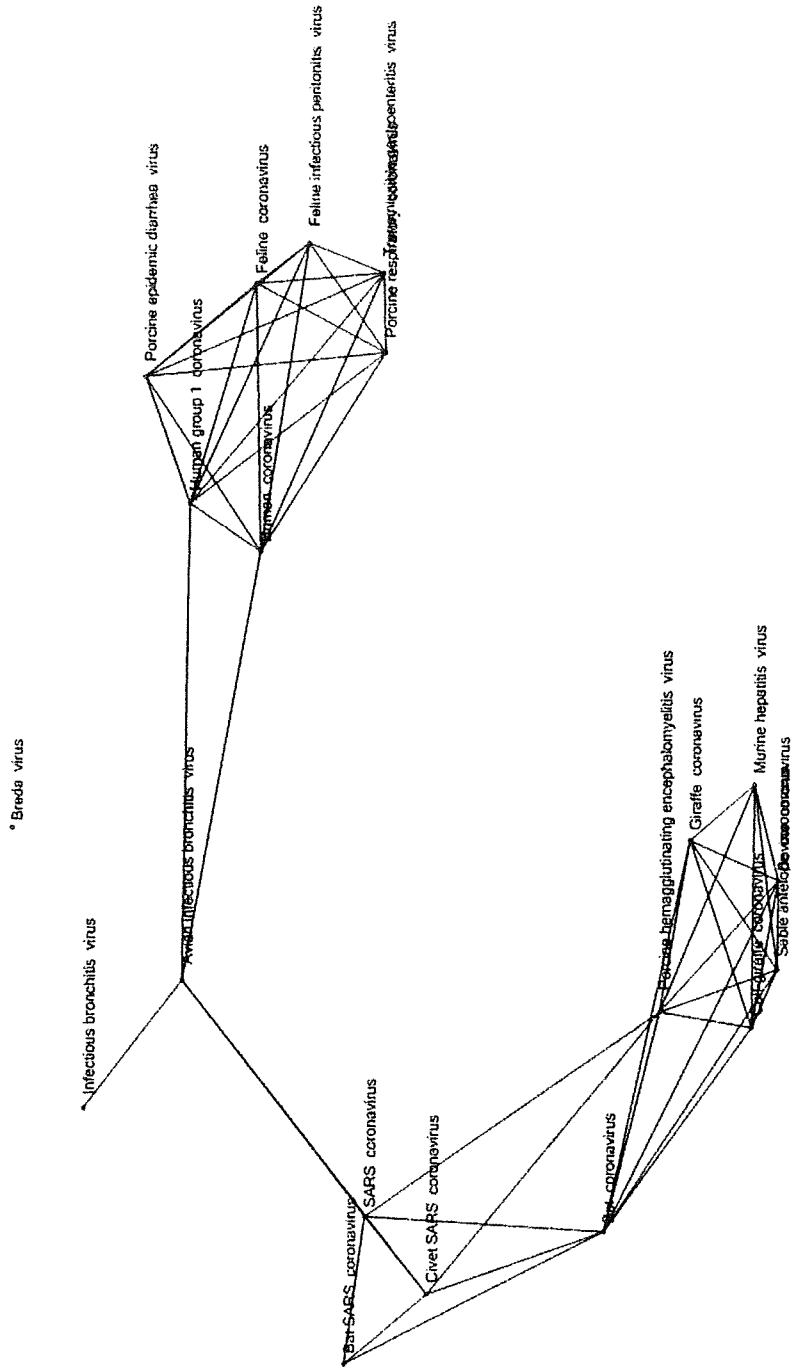


図 6 SARS コロナウイルス感染細胞由来 cDNA を鋳型とした PCR

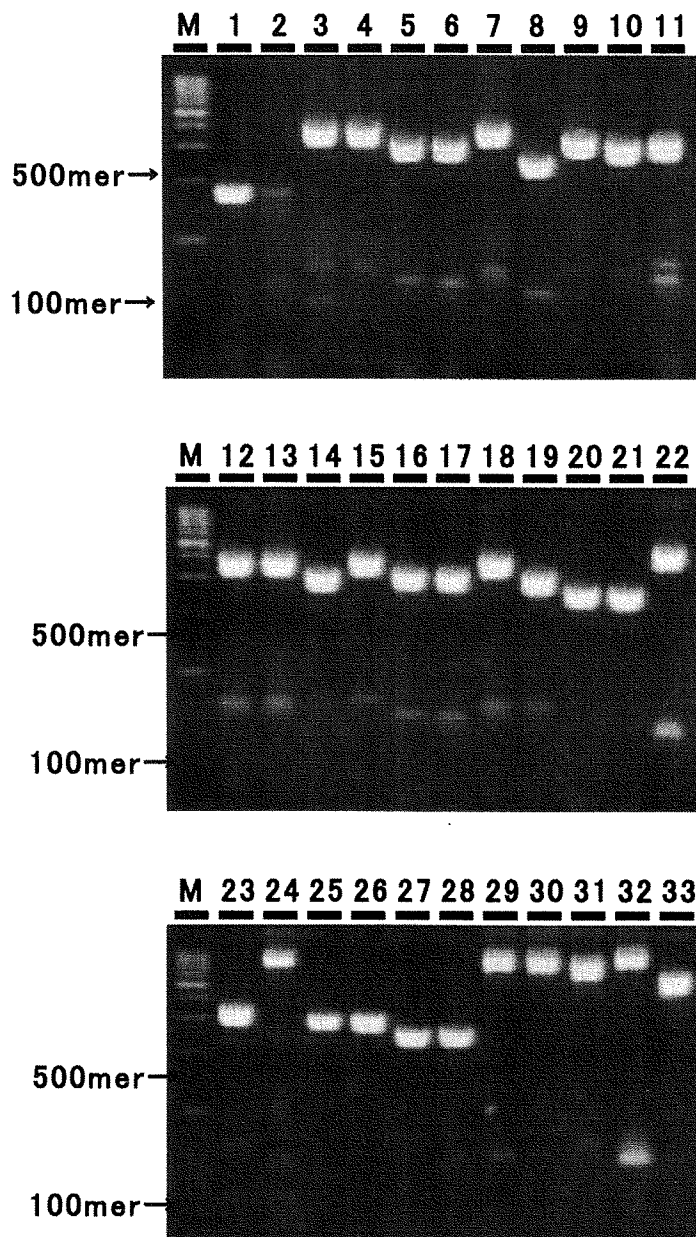
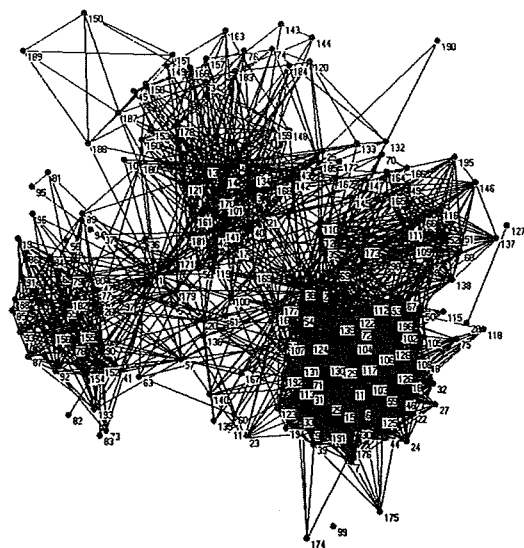
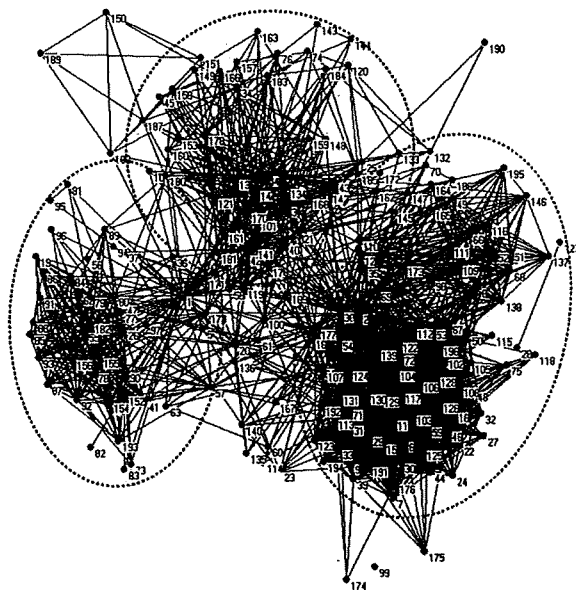


図7 HIV-1 ゲノムデータの social network analysis

A Kamada-Kawai 法に基づいた相関関係の描出像



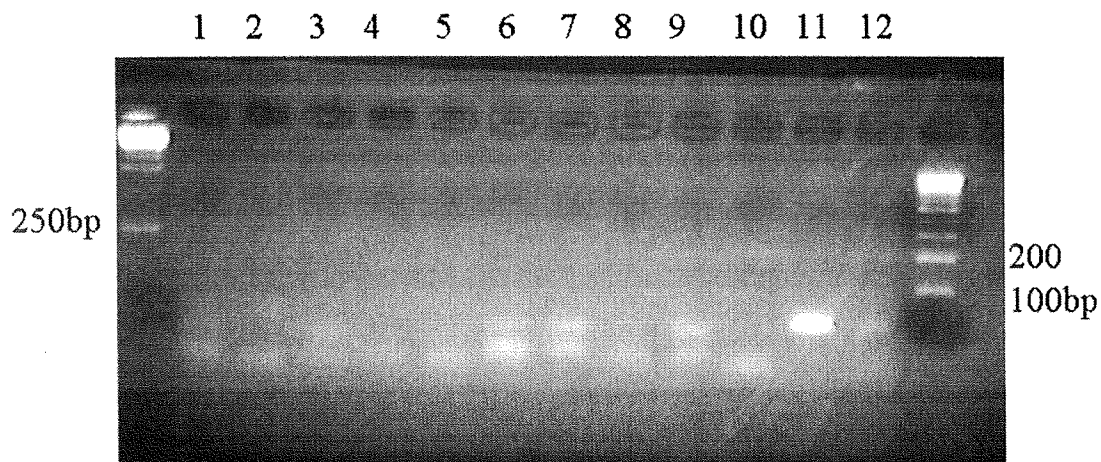
B 描出像を元に3個の二次グループに分類を実施した際の分離境界線



C 各二次グループに含まれるゲノムデータの件数

二次グループ	含まれる選択一次グループ件数
1	100
2	40
3	50

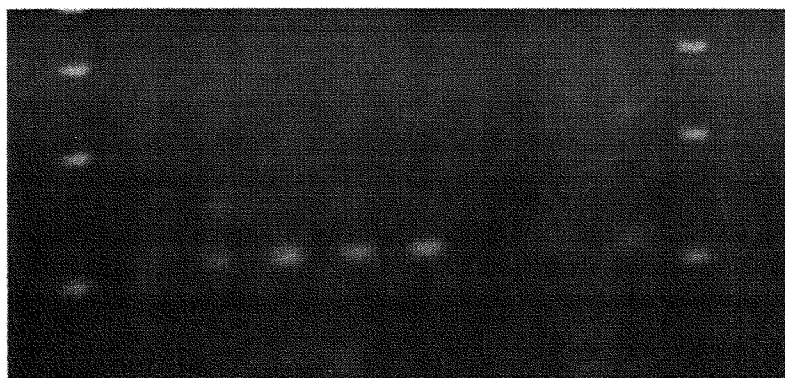
図8 HCV ゲノム共通 degenerated primer による HCV cDNA 増幅



HCV ゲノム共通 degenerated primer による HCV ゲノムの増幅結果を示す。各レーンは、1 : hec0802F1- hec0802R1, 2 : hec0802F2- hec0802R2, 3 : hec0802F3- hec0802R3, 4 : hec0802F4- hec0802R4, 5 : hec0802F5- hec0802R5, 6 : hec0802F6- hec0802R6, 7 : hec0802F7- hec0802R7, 8 : hec0802F8- hec0802R8, 9 : hec0802F9- hec0802R9, 10 : hec0802F10- hec0802R10, 11: hec0802F11- hec0802R11 および 12: hec0802F12- hec0802R12primer を用いた PCR 結果を示す。

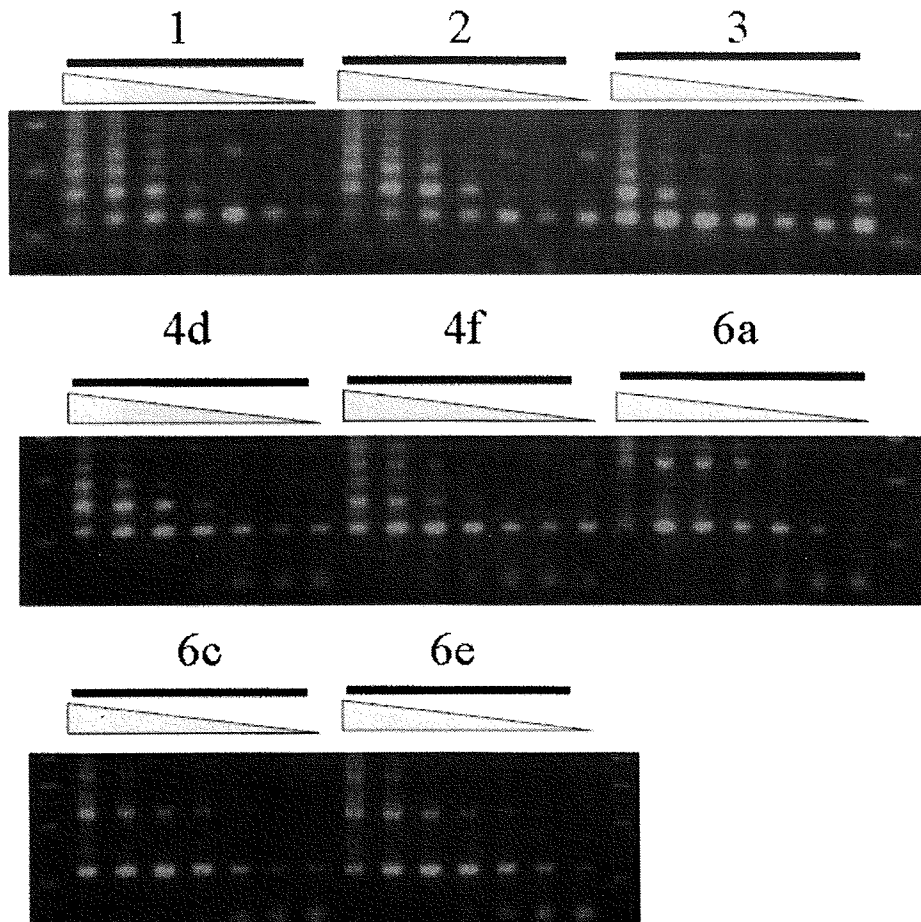
図9 HCV ゲノム断片の OE-PCR

Genotype 1 2 3 4d 4f 6a 6c 6e



HCV 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アガロース電気泳動像。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。レーンの左端マーカを示す。

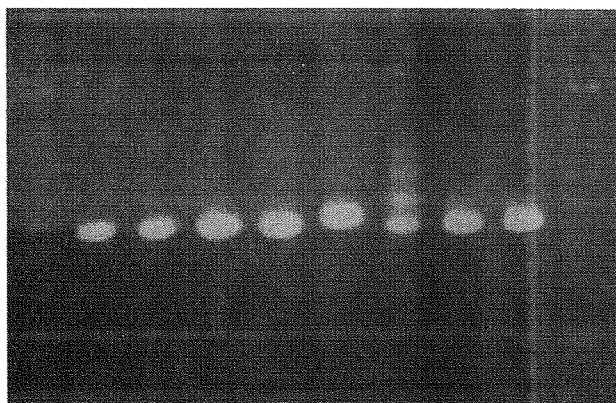
図 10 HCV OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅



HCV 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 産物のアガロース電気泳動像。各レーンの上一段目に OE-PCR の分子設計の元となった Genotype および Subtype の名称を、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 10^9 , 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 よって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左端にマーカーの位置を示す。

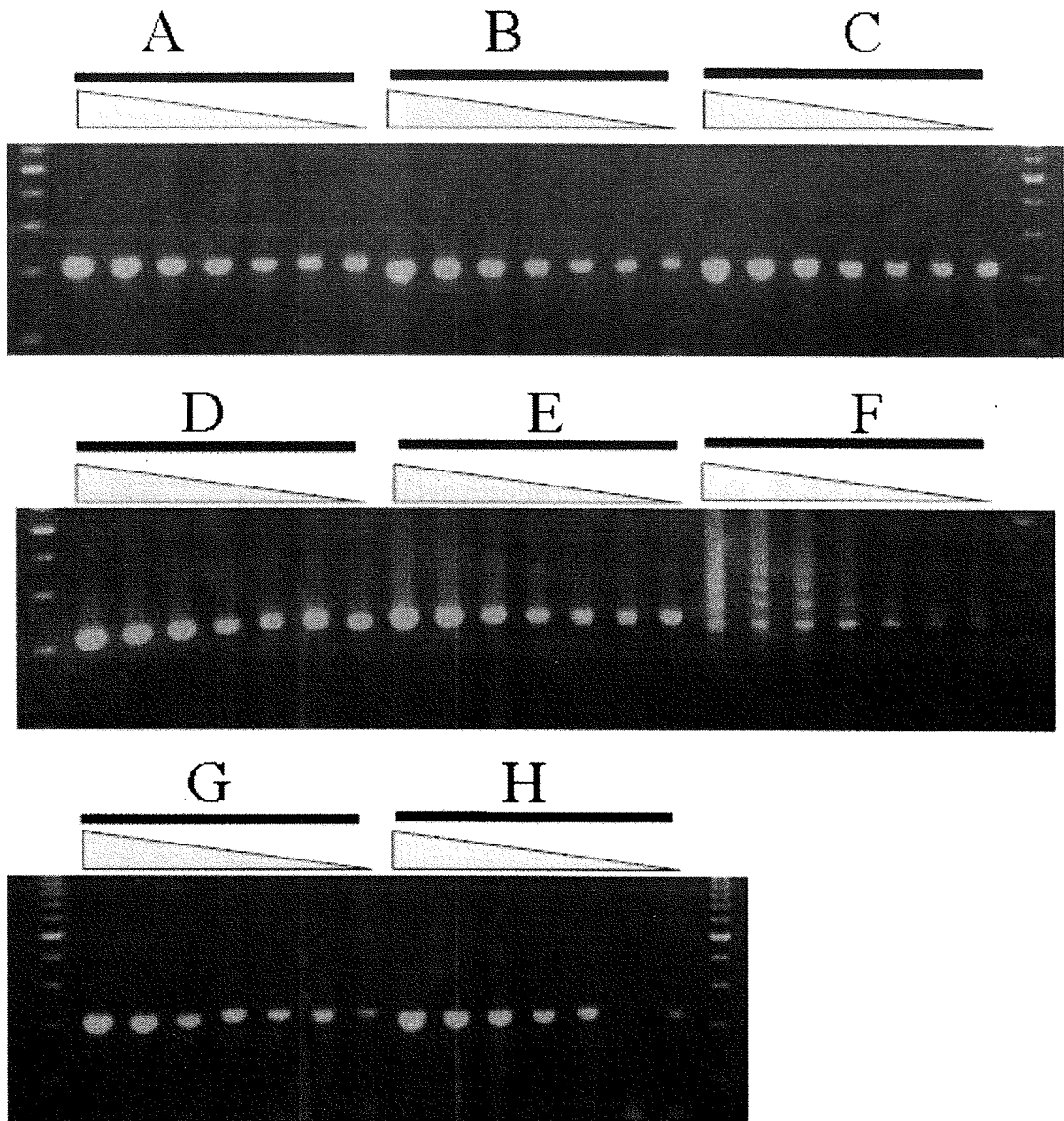
図 11 HBV ゲノム断片の OE-PCR

Genotype A B C D E F G H



HBV 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アガロース電気泳動像。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。レーンの左端マーカを示す。

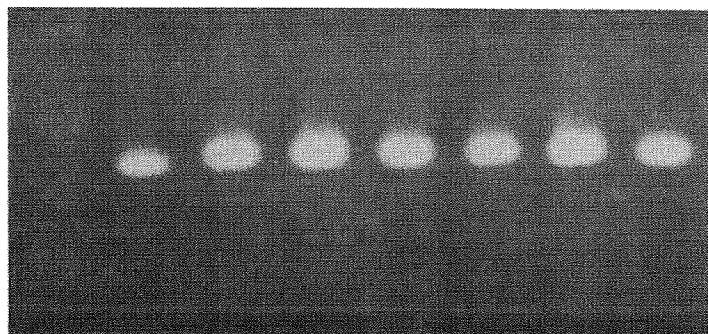
図 12 HBV OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅



HCV 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 産物のアガロース電気泳動像。各レーンの上一段目に OE-PCR の分子設計の元となった Genotype の名称を、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 10^9 , 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。レーンの左端にマーカーの位置を示す。

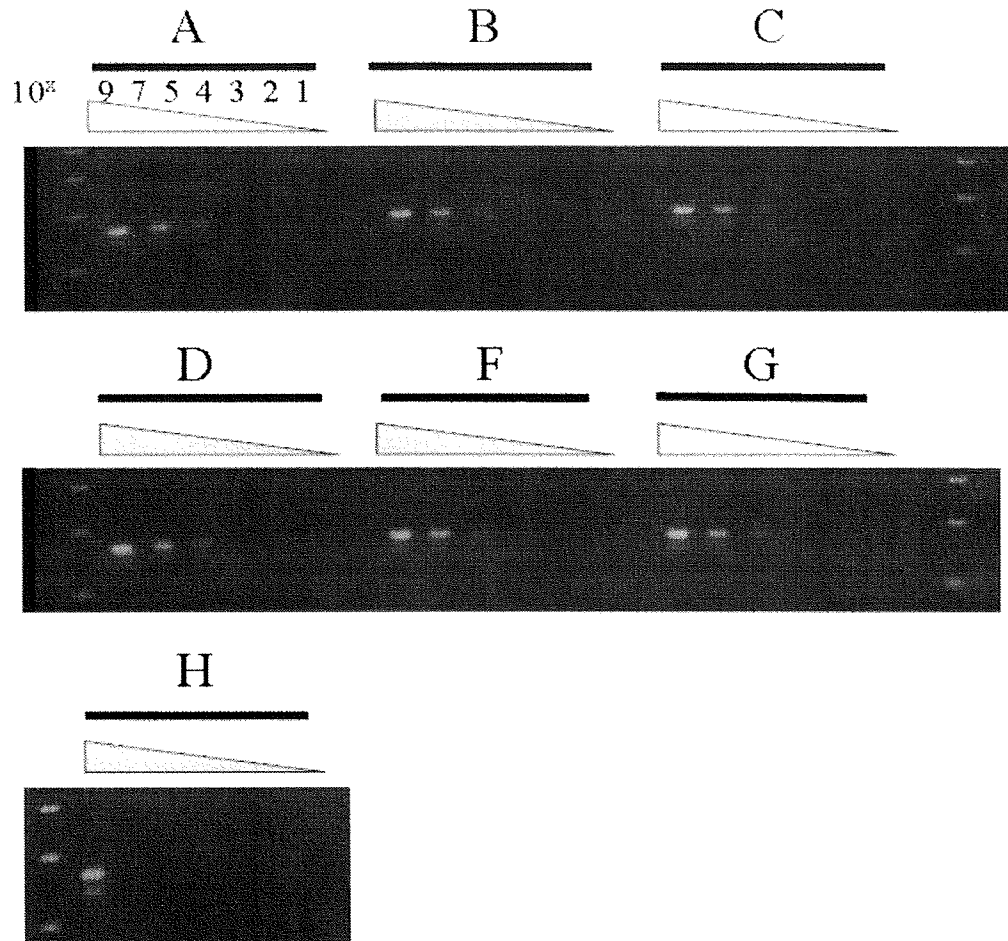
図 13 HIV-1 ゲノム断片の OE-PCR

Genotype A B C D F G H



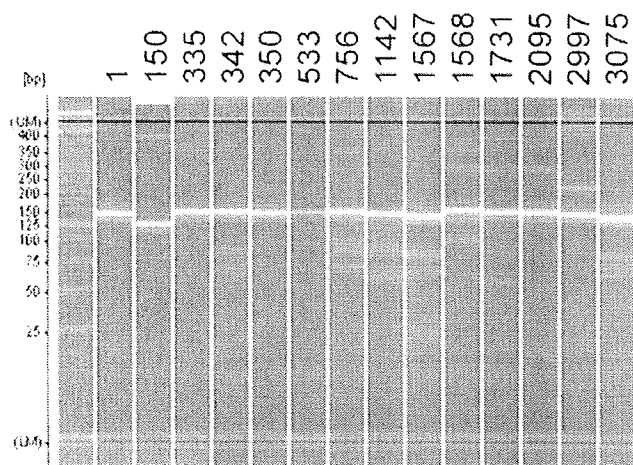
HIV-1 の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントのアガロース電気泳動像。PCR 反応は PrimerStarHS キットによって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左端マーカを示す。

図 14 HIV-1 OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅



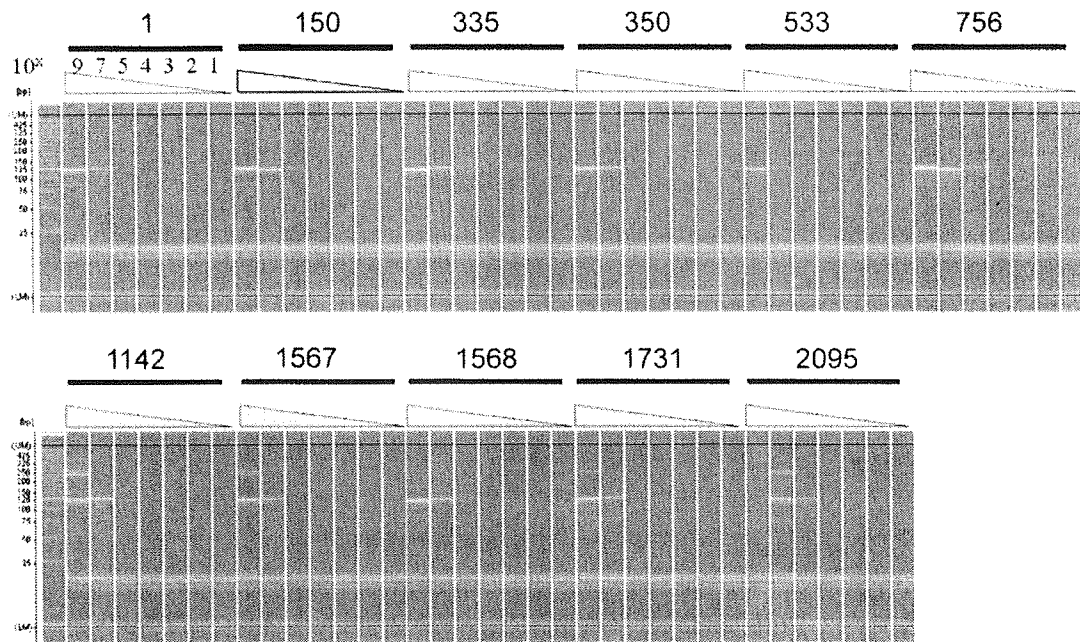
HIV-1 の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントを鋳型として degenerate プライマーで一部を増幅した PCR 産物のアガロース電気泳動像。各レーンの上一段目に OE-PCR の分子設計の元となった Genotype の名称を、二段目に OE-PCR 産物の copy 数の序列を示す。三角形の底辺から 10^9 , 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10^1 および 10^0 の OE-PCR 産物が理論的に PCR 反応の鋳型として用いられたことを示す。PCR 反応は GoTaqMixture によって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左端にマーカーの位置を示す。

図 15 HEV ゲノム断片の OE-PCR



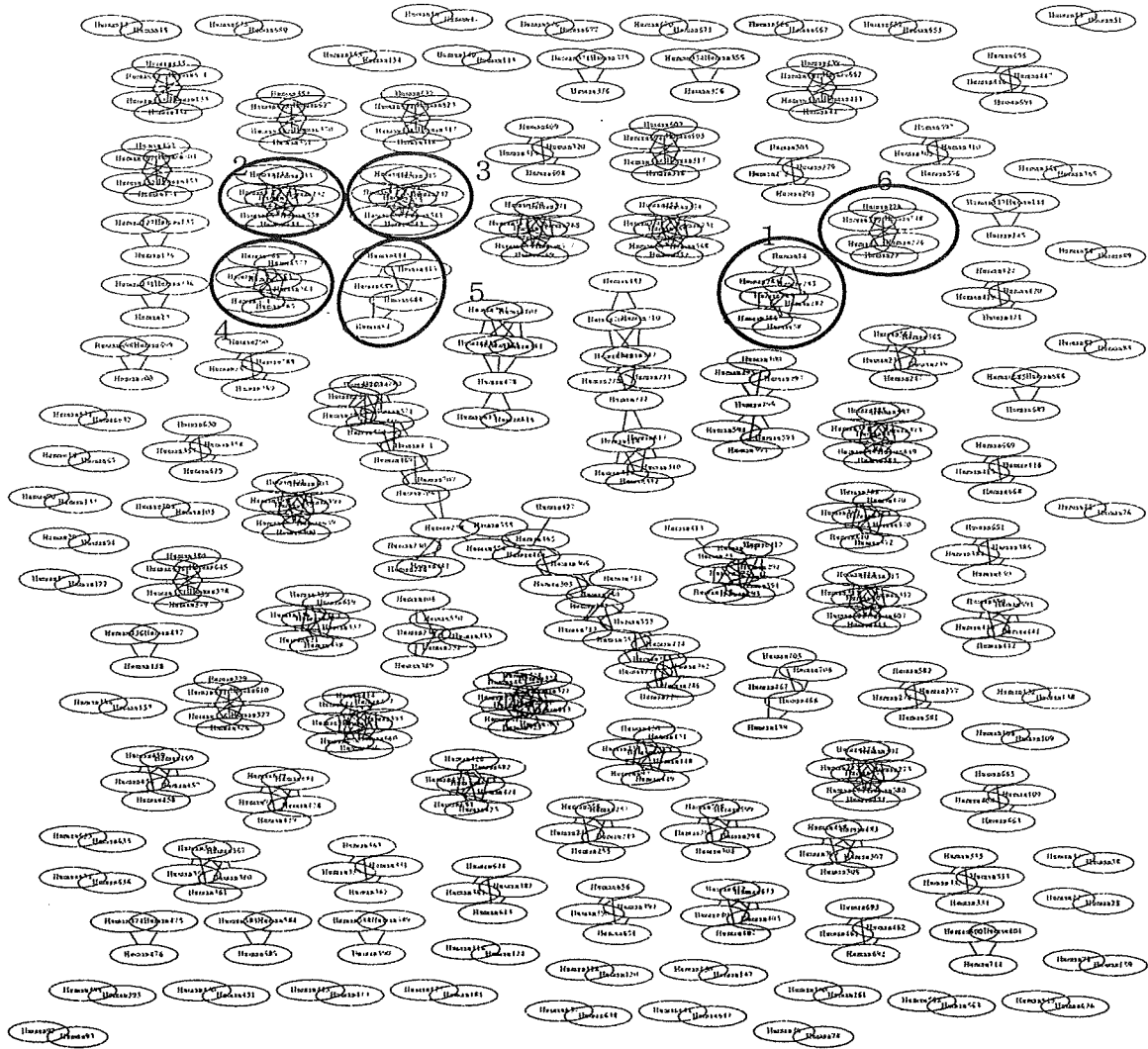
HEV の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントのマイクロチップ電気泳動像。各レーンには、塩基配列情報の元になった塩基配列の ID(表 15)を示す。PCR 反応は PrimerStarHS キットによって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左にマイクロチップ電気泳動装置が算出したマーカの位置を示す。

図 16 HEV OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅



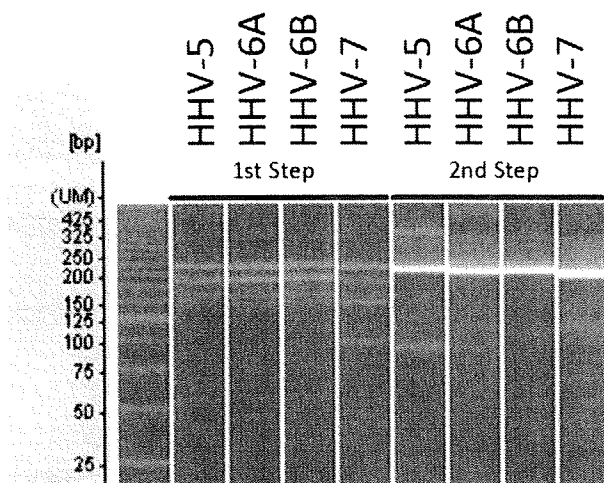
HEV の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントを鋳型として degenerate プライマーで一部を増幅した PCR 産物のマイクロチップ電気泳動像。各レーンの上一段目に OE-PCR の分子設計の元となった塩基配列の ID(表 15)を、二段目に OE-PCR 産物の copy 数の序列を示す。三角形の底辺から 10^9 , 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10^1 および 10^0 の OE-PCR 産物が理論的に PCR 反応の鋳型として用いられたことを示す。PCR 反応は GoTaqMixture よって実施された。温度条件は材料と方法に示す。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17 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



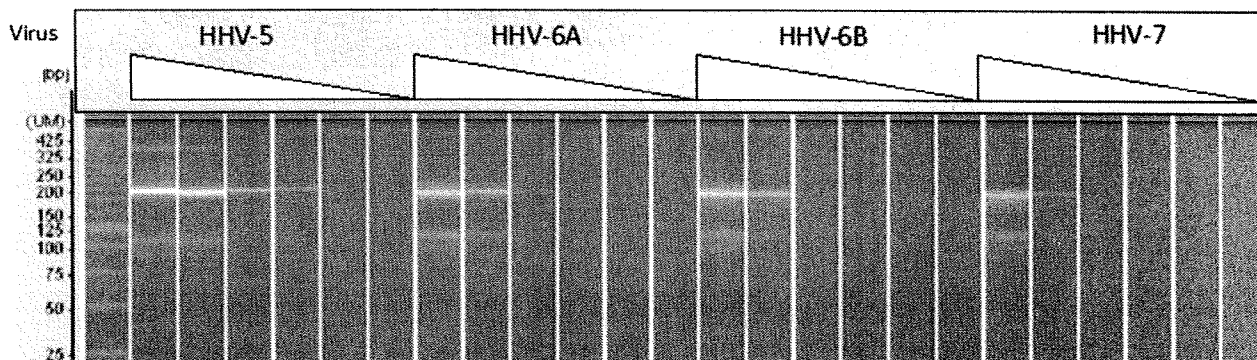
図中の各楕円の点は遺伝子を示し、楕円内にはウイルス名称(Human5, Human6 または Human7)と遺伝子番号が連続して記載されている(たとえば HHV-5 ウイルスの整理番号 11 番の遺伝子は Human511 と記載される)。実際にプライマー設計を試みた 6 つのクラスターを青い円で囲んでいる。

図 18 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



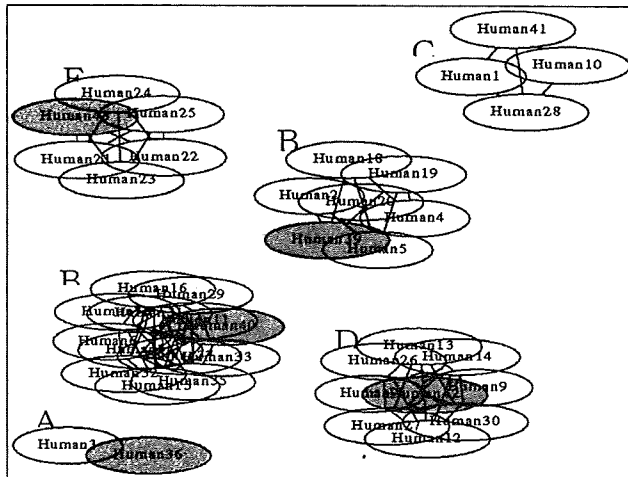
HHV-5, HHV-6A, HHV-6B および HHV-7 の major capsid protein の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントのマイクロチップ電気泳動像。各レーンには、ヘルペスウイルスの種名を示す。PCR 反応は PrimerStarHS キットによって実施された。温度条件は材料と方法に示す。レーンの左にマイクロチップ電気泳動装置が算出したマーカの位置を示す。

図 19 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



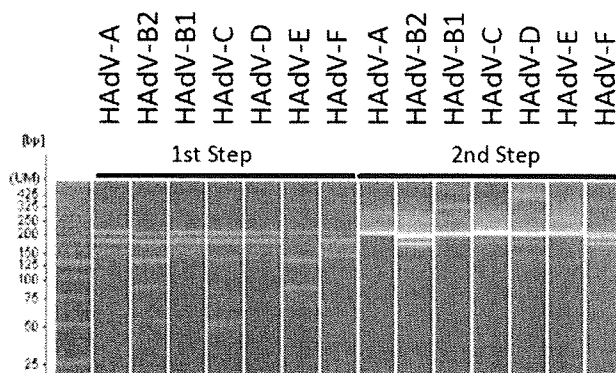
HHV-5, HHV-6A, HHV-6B および HHV-7 の major capsid protein の塩基配列情報を基に、OE-PCR により作成されたゲノムフラグメントを鋳型として degenerate プライマーで一部を増幅した PCR 産物のマイクロチップ電気泳動像。各レーンの上一段目にヘルペスウイルスの種名を、二段目に OE-PCR 産物の copy 数の序列を示す。三角形の底辺から 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10^1 および 10^0 の OE-PCR 産物が理論的に PCR 反応の鋳型として用いられたことを示す。PCR 反応は GoTaqMixture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

図 20 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



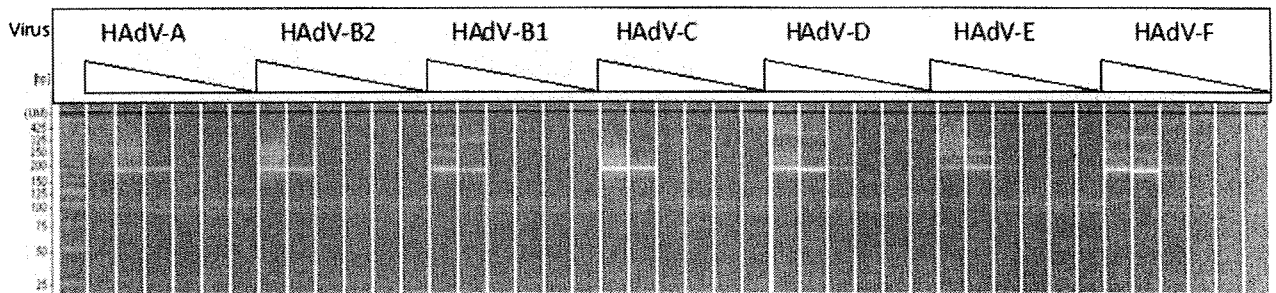
図中の各楕円の点は遺伝子を示し、楕円内にはウイルス型名称と遺伝子番号が連続して記載されている。実際にプライマー設計に用いられた代表的ウイルス型を青い楕円で示す。

図 21 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 22 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)

ウイルス遺伝子の非特異的増幅方法の確立、および検出の自動化の試み

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
江下優樹 大分大学医学部
佐藤朝光 福岡大学医学部

研究要旨

複数のウイルスを感度良く検出するためには、ウイルス核酸の非特異的な増幅が必要である。そこで、本研究では近年我々が取り組んできたウイルスの網羅的検出法（Rapid determination of viral nucleic acid sequences; RDV 法）の感度を改良して、RDV ver4を開発した。また、その他にも市販の非特異的増幅方法を検討した。これらの方法でウイルス核酸を増幅した後に、ウイルス種特異的なプライマーでPCRをおこなうことにより、感度良く検出することが可能になる。さらに本研究ではウイルス検出の自動化の検討をおこなった。検体から核酸を自動的に抽出しPCRをおこなった後にDNAチップで検出することを目的とした。本研究では特にDNAチップの自動検出について詳しく検討をおこなった。これらの方法を組み合わせることにより、高感度かつ自動にウイルスを検出できる可能性を示すことができた。

A. 研究目的

血液検査を行う場合に既知のウイルスをPCR法により検出するためには、

GenBank などから遺伝子の塩基配列の情報を得てプライマーを設計し、PCR法を実施する。このように一般的な検査法であ

る NAT などはずべて既知の塩基配列をもとに開発されている。現在は PCR や NAT などの技術も進歩しているので、既知のウイルスならば数十分で数コピーのゲノムを検出できる。しかし、検査すべきウイルスの種類が多くなると、その操作は容易ではなく、検査の費用も膨大になる。そこで、複数のウイルス遺伝子を非特異的に増幅することにより操作の簡便化を行い。増幅後に安価な DNA chip を用いて検出するというシステムの構築を目標とした。

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

本研究においては、さらにウイルス核酸の検出において、非特異的な増幅ではないがある特定のウイルス種を幅広く検出する方法をいくつか検討した。本研究班では HCV、HBV、HIV について degenerate primer を用いた増幅について検討をおこなっている。PCR 増幅産物は primer 間に

存在する配列をプローブにした DNA チップで検出され、標的ウイルスの増幅を確認している。実際に血液製剤からこれらのウイルスが検出されたときには、確定の検査が必要になる。一般に、PCR 増幅産物の確定には DNA チップは用いられず、遺伝子配列の決定を行う。遺伝子配列の決定は、(1) 増幅に用いたプライマーを使ってダイレクトシーケンス、もしくは (2) 増幅産物をプラスミドにクローニングして大腸菌で増やしたのちにプラスミド上の配列をプライマーとして使用してシーケンスをおこなう。後者の場合には実験室中に舞う大腸菌がいわゆる DNA コンタミネーションの原因になり、それ以降の検査に影響を及ぼすので敬遠される。前者は簡便な方法であるが、degenerate primer の場合には効率よくシーケンスのプライマーにならないので塩基配列を決定できない。そこで、本研究では、DNA チップによる検出後の確定を目的とした、degenerate primer 増幅産物のダイレクトシーケンスの新しい技術の開発も目的とした。

さらに本研究では、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った。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した。

B. 材料と方法

1. 新しい RDV 法の開発：キアゲン社の QuantiTect Whole transcriptome kit をベースに、合成アルブミン mRNA を用いて操作の簡便化と感度の上昇を目標に改良を行った。その結果、図 1 に示すような反応系がもっとも感度良く遺伝子を増幅できることがわかった。すなわち、RNA から cDNA を合成し、その cDNA を互いに（さらに oligo を加えることにより架橋する）連結することで長い cDNA を作成した。Phi29 酵素は長い DNA を 10000 倍まで増幅できるので、この cDNA は良い基質となりうる。この方法を RDV ver4 と名付けた。

2. 簡便な非特異的増幅方法

(1) Templify を用いた増幅：GE ヘルスケア社の Templify は試薬を 2 回加えるだけの簡単な増幅方法である。Templify は特にプラスミドなどの環状 DNA の増幅効率が良い。そこで、部分的環状構造を取る HBV について検討した。HBV-1 を 1000, 100, 10, 1, 0, -1 分子用意し、マニュアルに従って Templify の反応をおこなった後に HBV specific primer を用いて PCR をおこなった。

(2) Genomiphi HY を用いた増幅：GE ヘルスケア社の Genomiphi HY は反応時間が 18 時間必要であるので迅速性に欠けているが、増幅効率は優れているので同様に検討した。

(3) その他、Loopamp（栄研化学）や

PyroPhage3137 DNA polymerase（フナコシ）、DOP-PCR 法（ロシュ社）などの非特異的増幅キットを検討した。また、独自の方法として、Phi29 酵素と Locked nucleic acid 標識を組み合わせた primer を用いる方法などを試みた。

(4) 増幅効率の良い結果が得られた方法について、HBV のほかに HCV, HIV についても検討した。

3. Degenerate primer 増幅産物のダイレクトシーケンス（図 2）

コウモリの脾臓から DNA を抽出後、広範にヘルペスウイルスを検出できる degenerate primer (TGV, IYG, KGI) を用いて PCR をおこなった。最終的に約 200bp の増幅産物が得られたが、これらの degenerate primer はダイレクトシーケンスができないので、制限酵素 HaeIII で切断後、RDV adaptor を結合した。TGV primer と 16 種類の RDV primer (N1-16) で個別に PCR をおこなった。得られた増幅産物について、ダイレクトシーケンスを実施した。

4. 自動化検出手順

(1) 3 種類のウイルス (HCV, HBV, HIV) に対するプローブが搭載されたチップへのハイブリダイゼーションを確認。

(2) 集積型カートリッジの検討・開発

(3) チップの集積型カートリッジへの組み込み作業