

(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

C. 研究結果

1. 新しい RDV 法の確立。合成アルブミン mRNA を用いた実験系の検討では、約 100 分子を効率よく増幅できることが明らかとなった (図 1)。

2. 簡便な非特異的増幅方法の確立。Templify はマニュアル通りに増幅しても効率の良い結果は得られなかったが、dNTP を過剰に添加することにより増幅効率は大幅に改善された。特に、最終濃度 1667 μ M のときに、1000 倍以上の増幅が見られたが不安定な反応であることがわかった。一方、Genomiphi HY では 100 分子の HBV が約 5000 倍に増幅された。本方法は反応時間が長いのが欠点であるが、反応自体は簡単なので実用的であると考えられる。他の方法では HBV の遺伝子はほとんど増幅されなかった。そこで、HIV、HBV、HCV を含んだ (不活化) 血清の標準品、Accurun、を用いて Genomiphi HY を検討した。各血清 50 μ l を出発材料として RNA と DNA を同時に抽出し、そのうち 6 μ l を cDNA 化した。20 μ l の cDNA 中、2.5 μ l を Genomiphi HY の反応に用いた。反応後、cDNA と増幅産物を希釈した溶液について、ウイルス特異的なプライマーで PCR を行うことにより、増幅効率を判定した。その結果、HCV と HBV では 10000 倍以上、HIV

では 1000 倍以上増幅されていた (図 3)。

3. Degenerate primer 増幅産物のダイレクトシーケンス

方法に示したように、TGV primer と RDV primer のうち N8 primer において、約 100bp の増幅産物が得られた (図 2)。そこで、N8 primer からダイレクトシーケンスをおこない遺伝子配列を決定したところ、約 80bp の配列情報が得られ、新しいヘルペスウイルスの配列であることがわかった。この 80bp の配列から specific primer をデザインして TGV-KGI 間の塩基配列をダイレクトシーケンスにより決定した。このウイルスを *Hipposideros diadema herpesvirus* (HDHV) と名付けた。系統樹から、HDHV はガンマヘルペスウイルスに属することがあきらかになった。

4. 自動化に向けた試み。ウイルス核酸由来の遺伝子増幅産物 (国立感染症研究所)、および DNA チップ (パーカーライジング広島工場) 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)。全自動によるハイブリダイゼーションおよび洗浄動作の所要時間は 2 時間 15 分であっ

た。

D. 考察

RDVver4 は改良前の非特異的増幅方法 (RDV ver1.0, 2.0) と比較して、短時間に低分子のウイルス核酸も増幅できる。また、本法は RNA ウイルスも DNA ウイルスも同時に増幅することが可能である。本法では数十から数百分子の遺伝子を増幅することができることがわかった。

Genomiphi HY はどのウイルスも効率良く非特異的に増幅できるキットである。RDV ver4.0 にこのキットを組み合わせることで更に改良可能であると考えられる。一方、本研究で開発した新しいダイレクトシーケンス法は、degenerate primer で増幅されたウイルス遺伝子がどのような配列であっても、最終的にはダイレクトシーケンスできることを示している。

DNAチップを搭載した集積型カートリッジ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。今後は検出対象のウイルスの種類を増やすことが必要と考えられる。

E. 結論、

新しい遺伝子の増幅法、RDV ver4は、ウイルスの遺伝子を効率よく網羅的に増幅することが示された。また、DNAチップと組み合わせることにより、特定ウイルスの検出や確定をおこなうことができる。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。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1) 論文発表

Tetsuya Mizutani, Daiji Endoh, Michiko Okamoto, Kazuya Shirato, Hiroyuki Shimizu, Minetaro Arita, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Koji Sakai, Chang Kwang Limn, Mikako Ito, Reiko Nerome, Tomohiko Takasaki, Koji Ishii, Tetsuro Suzuki, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa and Hidekazu Nishimura. Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses. Emerging Infectious Diseases. 13. 2007. 322-324. (Corresponding author: Tetsuya Mizutani)

Tetsuya Mizutani, Shuetsu Fukushi, Tsuyoshi Kenri, Yuko Sasaki, Koji Ishii, Daiji Endoh, Aya Zamoto, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane and Shigeru Morikawa Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans* Arch Virol. 2007. 152:1019-1025. (Corresponding author: Tetsuya

Mizutani)

Ikejiri M, Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Kurane I, Maruyama T. Synthesis and biological evaluation of nucleoside analogues having 6-chloropurine as anti-SARS-CoV agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007. 17:2470-2473.

Kouji Sakai, Tetsuya Mizutani, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Daiji Endoh, Ichiro Kurane, Kazuaki Takehara and Shigeru Morikawa. An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences for avian RNA virus. *Arch. Virol*. 2007. 152: 1763-1765.

(Corresponding author; Tetsuya Mizutani)

Fukushi S, Mizutani T, Sakai K, Saijo M, Taguchi F, Yokoyama M, Kurane I, Morikawa S. Amino acid substitutions in S2 region enhance SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells. *J. Virol*. 81. 10831-10834. 2007.

Saijo M, Georges-Courbot MC, Marianneau P, Romanowski V, Fukushi S, Mizutani T, Georges AJ, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Development of recombinant

nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever. *Clin Vaccine Immunol*. 2007. 14. 1182-1189.

Yuki Kihara, Tomomitsu Satho, Yuki Eshita, Kouji Sakai, Akira Kotaki, Tomohiko Takasaki, Yupha Rongsriyam, Narumon Komalamisra, Raweevan Srisawat, Parichat Lapcharoen, Suchada Sumroiphon, Shiroh Iwanaga, Hiroshi Ushijima, Daiji Endoh, Takeshi Miyata, Akira Sakata, Nobuhiro Kashige, Fumio Miake, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa and Tetsuya Mizutani. Rapid determination of viral RNA sequences in field-collected mosquitoes. *J. Virol. Methods*. 2007. 146. 372-374.

(Corresponding author; Tetsuya Mizutani)

Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi M, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani T. Isolation of a novel adenovirus from a fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). *Emerging Infectious Diseases* 2008, 14: 347-349.

Shumpei Watanabe, Tetsuya Mizutani, Kouji Sakai, Kentaro Kato, Yukinobu Tohya, Shuetsu Fukushi,

Masayuki Saijo, Yasuhiro Yoshikawa, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa, Hiroomi Akashi. Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). *J. Clin. Virol.* 2008. 43: 56-59. (Corresponding author: Tetsuya Mizutani)

Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Iizuka I, Sakai K, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains. *Jpn. J. Infect Dis.* 2008. 61: 140-142.

Hamaguchi I, Imai J, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Kato H, Mizutani T, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Application of quantitative gene expression analysis for pertussis vaccine safety control. *Vaccine* 2008. 26: 4686-4696.

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, Suzaki 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

著書

Tomomitsu Satho, Tetsuya Mizutani. Apoptosis in insect. In New Cell Apoptosis Research (edited by Lindsey C. Vinter). Nova Publishers 2007. pp107-120.

(Corresponding author: Tetsuya

Mizutani)

Kazuya Shirato and Tetsuya Mizutani. Tumor necrosis factor and carcinoma by hepatitis C and B virus-infection. In *Oncogene Proteins: New Research* (edited by Artur H. Malloy and Earl C. Carson). Nova Publishers. 2008. pp273-287. (Corresponding author; Tetsuya Mizutani)

Kazuya Shirato and Tetsuya Mizutani. Viral Proteins, Host Cell Proteins, and Manipulation of the Cell Cycle by Viruses. In *Progress in cell growth process research*. (edited by T. Hayashi) Nova Publishers. 2008. Pp135-147. (Corresponding author; Tetsuya Mizutani)

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」 *アクチュアル小児科診療 -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)

総説など

水谷哲也 「川崎病の原因に迫る」 *日本川崎病研究センターニュースレター No.14*, pp2 (2007) (依頼)

水谷哲也 「新興ウイルス感染症の網羅的検出方法 (RDV 法) の確立と応用」 「ウイルス」 2007. 57 巻 pp217-226.

福士秀悦、平井明香、新倉綾、山田靖子、前田健、吉川泰弘、横山勝、水谷哲也、酒井宏治、西條政幸、倉根一郎、森川茂 「コウモリ由来 ACE2 発現細胞を用いた

SARS コロナウイルスの感受性の解析」
「獣医畜産新報」 Vol. 61, No. 3. 2008

Tetsuya Mizutani. Review of methods to determine nucleic acid sequences of unknown viruses. Special issue of Indian J. Micorbiol. (in press)
(Corresponding author; Tetsuya Mizutani)

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-ren/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 巻 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巻第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
該当なし

図の説明

図 1. RDV ver4.0 の反応の概要。

実際には RNA だけではなく、DNA が含まれていても実施可能である。また、核酸は 1 本鎖、2 本鎖を問わない。RNA は逆転写反応で cDNA を合成する。denature 後、1 本鎖の核酸を oligo A を介して架橋する。長くなった cDNA を Phi29 で増幅し、RDV 法の反応に進む。HaeIII で切断後、アダプターを付加して、特殊なプライマーで増幅後にダイレクトシーケンスをおこなう。

図 2. ダイレクトシーケンス不可能な PCR における RDV 法の応用

図ではコウモリから degenerate PCR primer を用いて増幅した例を示す。RDV 法における HaeIII 切断後、アダプターを付加する。片側は degenerate primer (TGV), 片側は RDV primer で増幅することにより、得たバンドを RDV primer でダイレクトシーケンスする。この塩基配列の情報をもとに genome walking をおこなう。

図 3. 非特異的増幅の効果

Genomiphi HY を用いて増幅した結果をもとの cDNA と比較すると、HCV と HBV では 10000 倍以上、HIV では 1000 倍以上増幅されていた。

図4. 自動化への試み

- A. 集積型カートリッジの特徴：検体はカートリッジ内で核酸の抽出、増幅、DNAチップへの結合ができ、最終的にカートリッジごと廃棄できるので安全である。
- B. バイオチップ読取装置：DNAチップは別の読取装置で検出する。
- C. 集積型カートリッジシステムの使用イメージ：反応系全体のイメージ図。

図1. RDV ver4.0の反応の概要

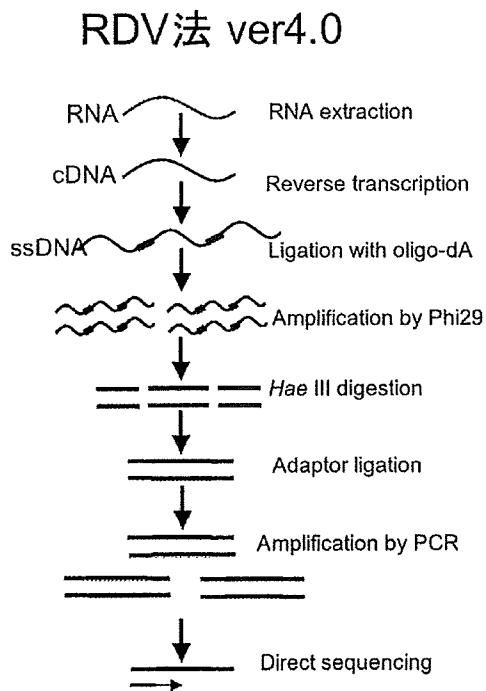


図 2. ダイレクトシーケンス不可能なPCRにおけるRDV法の実用

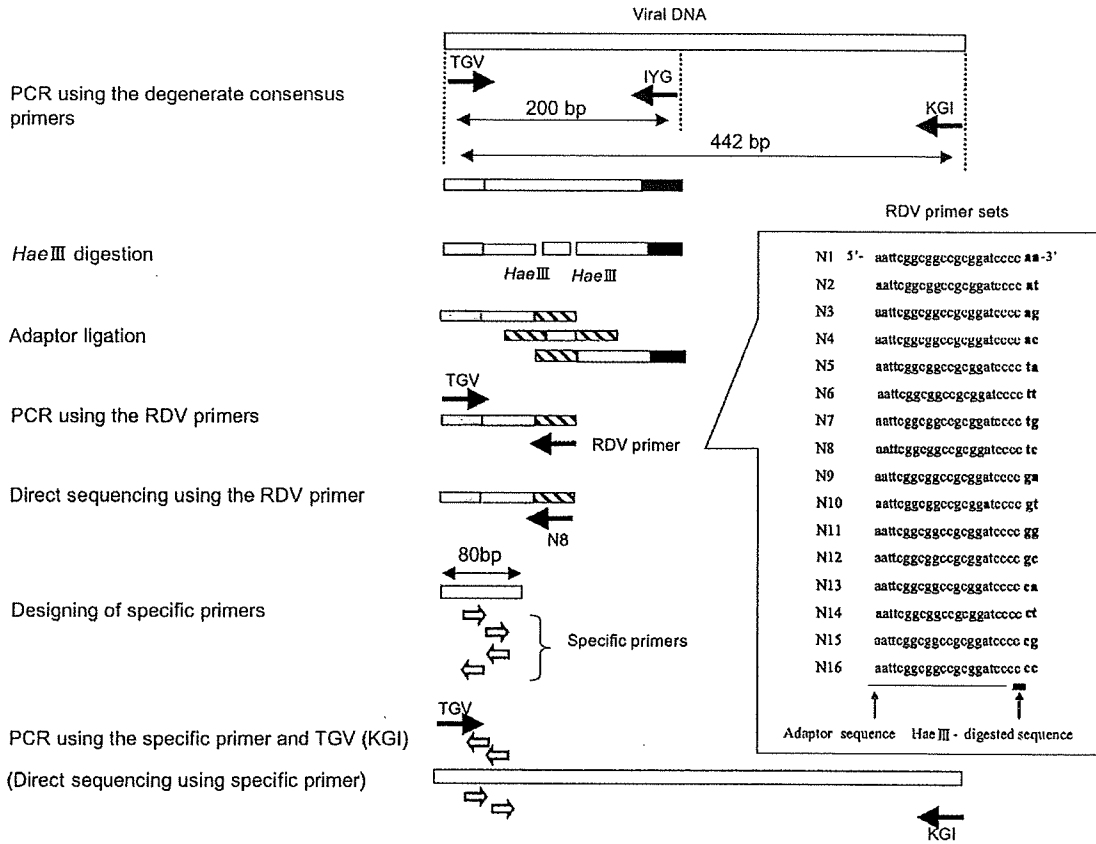


図 3. 非特異的増幅の効果

増幅産物を希釈して原液 cDNA と比較

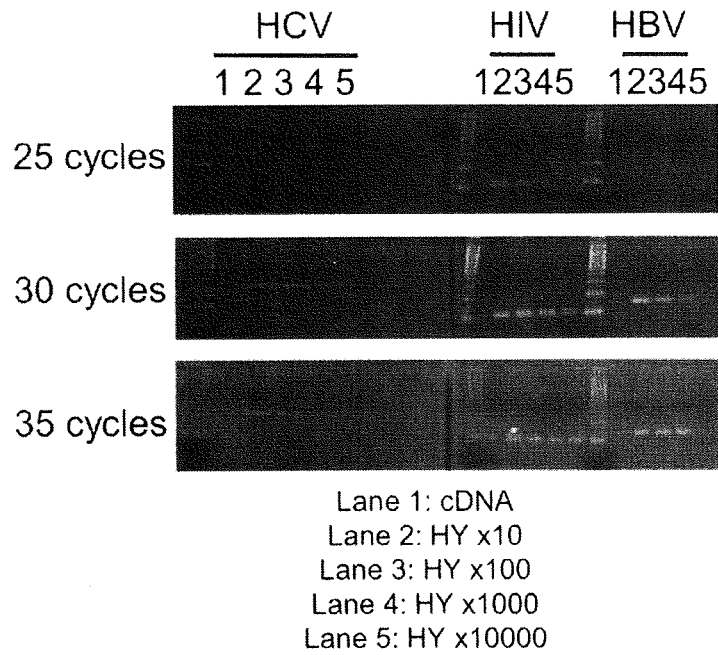
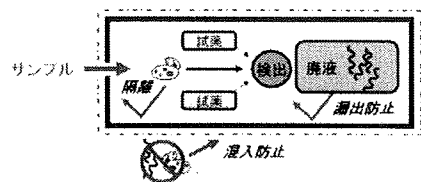
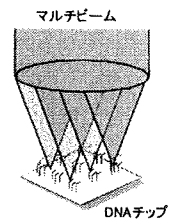


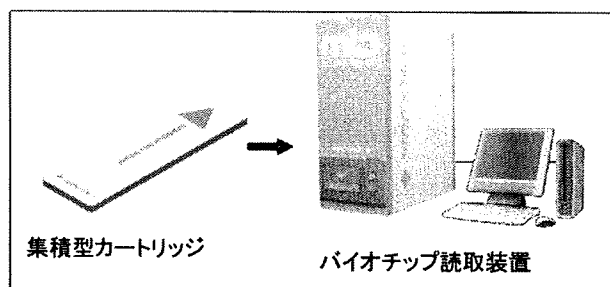
図4. 自動化への試み



A. 集積型カートリッジの特徴



B. バイオチップ読取装置



C. 集積型カートリッジシステムの使用イメージ

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急研究事業）
ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究
分担研究報告書

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

研究分担者 古田 里佳（大阪府赤十字血液センター、研究部）
田所 憲治（日本赤十字血液中央研究所）

研究要旨

血液事業における現行の核酸増幅検査（NAT）は極めて高い感度を有するが、日本国内における感染状況の必要に応じて検査内容に変更を加えながら常にその時点最良のNAT品質を提供することができないこと、また、リスクマネジメントおよび国内医療経済の観点からは海外一社の検査製品にのみ100%依存している現在の体制は望ましいものとは言えないことから、（株）タカラバイオ独自開発の核酸増幅システムである一定温度核酸増幅法 Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids (ICAN法)を用いた新規NAT開発を試みた。

今回樹立したHIV-1 ICAN、HCV ICAN、HBV ICANは1反応あたり確実にそれぞれ100 vge、100 IU、100IUを検出し、陰性検体200例の試験においてそれぞれ全て陰性という高い反応特異性を示した。しかしながら、まだmultiplexには対応しておらず、PCR NATと比較して操作性には今後の課題を残した。したがって、現時点において本法を現行NATに置き換える緊急性はないが、ICAN法はPCR法とは増幅原理が全く異なるので、PCR NATでの判定不明例の解析における利用が期待される。また、何らかの危機的状況において現行PCR NATの使用が困難になった場合のバックアップ検査体制のひとつとして国産技術による本法を準備しておくことは血液センターのリスクマネジメントの一環となると考えられる。

A. 研究目的

血液事業において肝炎ウイルス等による輸血感染の排除は至上命題であるが、ウィンドウ期の問題および検出限界という技術上の障壁により、100%安全な血液

製剤を供給するのは原理的に不可能である。しかしながら、血液センターでは核酸増幅検査(NAT)技術により、その安全性をより高める努力を続けている。「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的

とした核酸増幅検査 (NAT) の実施に関するガイドライン」においては NAT 品質について厳しい精度が要求されているが、現行の Roche 社キットでは各試薬濃度やプライマー配列等が公表されていないため、上記ガイドラインが要求する品質はメーカーが提供するデータをそのまま受け入れて代用する状況である。然るにウイルスは日々進化し、薬剤耐性株等これまでになかった核酸配列が次々と出現していることは確実である。したがって、現時点において流行しているウイルス株を同時進行的に補足し、必要に応じて検査内容に変更を加えながら常にその時点最良の NAT 品質を提供するには、検査技術の内容がオープンに扱える NAT 試薬の開発が必須である。加えて、リスクマネジメントおよび国内医療経済の観点からも、海外一社の検査製品にのみ 100% 依存している現在の体制は望ましいものとは言えない。

本研究課題においては、(株)タカラバイオ独自開発の核酸増幅システムである一定温度核酸増幅法 Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids (ICAN 法) を用いた血液ウイルス NAT を開発し、血液事業における実用可能性を探ることを目的とする。

B. 研究方法

ICAN 法はプライマーとして DNA-RNA キメラオリゴヌクレオチドを用い、鎖置

換型 DNA ポリメラーゼ (BcaBEST) を使って RNaseH 存在下で等温度 DNA 増幅を行うものである。ICAN 法では、鋳型 DNA にアニールした RNA-DNA キメラオリゴヌクレオチドがプライマーとなって鎖置換型伸長反応と鋳型交換反応が同時に進行する。産生された反応中間体に存在する RNA 部分は RNaseH で切断され、次はその切断部を始点として鎖置換反応ならびに鋳型交換反応が起こり、以後反応が次々と繰り返されることによって一定長の DNA が増幅される。増幅モニタリングは 5' 側にクエンチャー (Eclipse) / 3' 側に蛍光物質 (ROX) を結合した標的配列特異的 RNA-DNA キメラサイクリングプローブを用いて行われ、標的配列に結合したプローブが RNaseH で切断されることによりクエンチャーが外れ、蛍光を発するしくみである (サイクルプロービング法、タカラバイオ独自技術)。

本研究では平成 19 年度にヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) と C 型肝炎ウイルス (HCV) を検出する ICAN 法を樹立し、20 年度は樹立した HCV ICAN の特異性評価と B 型肝炎ウイルス (HBV) 検出用 ICAN のプロトタイプ樹立を行った。最終年度である 21 年度は HBV 検出系の最適化ならびに HIV-1 の臨床分離株での評価を行い、ICAN 法の輸血感染ウイルス検査法としての総合評価を行った。

評価に用いた HCV および HBV は大阪府赤十字血液センターで感染症検査陽性となった献血検体 (血漿) である。それぞれの

ウイルスをゴールドスタンダード（アンプリコアモニタ、ロッシュ社）で定量し、感染症検査陰性コントロール血漿で希釈して評価用規準検体とした。HIV-1 陽性規準検体作成のためには、ヒト培養細胞（293T細胞）に HIV-1 感染性分子クローン pNL4-3 を遺伝子導入し、二日後の培養上清中のウイルスを定量し、感染症陰性コントロール血漿で希釈して評価用検体とした。HIV-1 各分離株については入手困難であるため、増幅領域を含む 186 BP の二重鎖 DNA を合成し、pBluescriptSK(-)にクローニング後、T7 polymerase を用いて、当該 RNA を in vitro transcription にて作成した。転写されたウイルス遺伝子コピー数は吸光度から計算し、評価検体とした。

血漿状態の評価検体は、PureLink Viral RNA/DNA Kit (Invitrogen)を用いて核酸精製を行い、ICAN 反応に用いた。

C. 結果

ICAN 反応系の構築

HIV-1、HCV、HBV それぞれの ICAN 検出系は同一のアルゴリズムを用いて構築した（図 1）。まず、(1)データベースに登録されている塩基配列を元に相同性解析を行い、分離株間で高い相同性を示す領域に複数のプライマー/プローブ候補を設定する。(2) これらプライマー/プローブ候補を用いた小スケールプロトタイプ反応系を構築し、(3) 最適プライマー/プローブ候補を選択する。(4) 感度を維持しながら、検査に用い易いように反応をスケールアップする。(5)

それぞれの反応系について、反応試薬、酵素、プライマー/プローブ濃度および反応温度を変化させ、反応の最適化を行う。

プライマー/プローブ配列

今回作成した HIV-1、HCV、HBV それぞれの ICAN 反応に用いたプライマー及びプローブ配列を表 1 に示す。増幅効率を上げながら複数の genotype 塩基配列を増幅できるよう、種々のプライマーの組み合わせで検討を行い、表 1 に示すプライマー群で最良の結果を得た。HIV-1 と HCV の逆転写にはそれぞれ特異的プライマーとランダムヘキサマーを組み合わせることで、増幅効率の上昇が認められた。HBV は ICAN 反応に複数プライマーを用いることで良好な感度が認められた。

反応系

構築した ICAN 反応系の組成と反応条件を表 2 に示す。表 2 に示す通り、それぞれのウイルス遺伝子増幅における最適反応条件は異なる。反応に用いた 3 種の酵素、逆転写酵素 (PrimeScript)、熱耐性 RNaseH、BcaBEST DNA polymerase は全てタカラバイオ社の自社製品である。HIV-1 と HCV の増幅においては、まず 80 μ l の反応系で逆転写を行い、逆転写終了後、20 μ L の ICAN 用試薬を追加する。HBV 増幅においてはプライマーも酵素も HIV-1/HCV より高濃度が必要だった。

反応のモニタリングはリアルタイムサーマルサイクラーの ROX 設定でリアルタイム

ム検出が可能であるが、反応終了時における UV 励起による撮影でも判定可能である (図 2)。

感度

構築した ICAN それぞれの感度を表 3 に示す。HIV-1 の genotype E-H およびグループ N と O については現在評価中である。HCV、HBV に関しては国内での主要流行株で評価を行った。これまで評価したウイルスにおいては全て 1 反応あたり 100 コピー以上のウイルスを 100% 検出できている。

特異性

感染症検査が全て陰性であったコントロール血漿 200 検体分について、HIV-1、HCV、HBV ICAN をそれぞれ行ったところ、疑陽性は 1 例も認められなかった。

D. 考察

国産技術 (タカラバイオ社) を用いたウイルス核酸増幅検査法を開発した。これまでに得られた感度は現行 NAT とほぼ同等であり、特異性はより高い。操作性に関しては、HIV-1 および HCV ICAN は逆転写反応と増幅反応の二段階反応になっており、途中で酵素等を加える必要がある。これは ICAN 反応自体が RNA 分解反応を利用しているために、逆転写反応と同一チューブ内では行えないためである。大量数の検査へ応用するには、チューブ内を熱溶解性の膜等で二分し、逆転写反応後に増幅反応試薬が自動的に混合するようなしくみを工夫しなければ

ならないと思われる。また HIV-1 分離株の中で増幅感度が劣るものがある。

E. 結論

感度/特異性に関して十分使用可能な新しいウイルス核酸検査法を確立した。現在の PCR NAT は十分な感度と特異性があり非常に簡便な取り扱いが可能であることから、本法を現行 NAT に置き換える必要性はないが、ICAN 法は PCR 法とは増幅原理が全く異なるので、PCR NAT で判定不明例の解析での利用が期待される。また、何らかの危機的状況において現行 PCR NAT の使用が困難になった場合のバックアップ検査体制のひとつとして国産技術による本法を準備しておくことは血液センターのリスクマネジメントの一環となると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

Yasui K, Miyazaki T, Matsuyama N, Kojima Y, Furuta RA, Fujisawa J-I, Tani Y, Shibata H, Kato T, Ikeda H, Hirayama F. Establishment of cell lines stably expressing HNA-1a, -1b, and -2a antigen with low background reactivity in flow cytometric analysis. *Transfusion* 2007, 47:478-485.

Yasui K, Hirayama F, Matsuyama N, Furuta RA, Kimura T, Odagiri M, Watanabe Y, Tani Y, Shibata H. New cell lines express HNA-1c, -4a, -4b, -5a, or -5b for identification of HNA antibodies. *Transfusion* 2008, 48(5):1037-9.

Matsukura K, Shibata S, Tani T, Shibata H, Furuta RA. Persistent infection by human parvovirus B19 in qualified blood donors. *Transfusion* 2008, **48**(5):1036-7.

Yasui K, Furuta RA, Matsuyama N, Fukumori Y, Tani Y, Shibata H, Hirayama F. Possible involvement of heparin-binding protein in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 2008. (in press).

R. A. Furuta, Y. Konodo, T. Saito, M. Tomita, K. Oka, Y. Kishimoto, Y. Tani & H. Shibata. Transfusions of red blood cells from an occult hepatitis B virus carrier without apparent signs of transfusion-transmitted hepatitis B infection. *Transfusion Medicine* 2008, **18**:379-381.

K. Yasui, F. Hirayama, N. Matsuyama, R. A. Furuta, T. Kimura, Y. Tani, H. Shibata, M. Odagiri & Y. Watanabe. New cell lines express HNA-1c, -4a, 4b, 5a, or -5b for identification of HNA antibodies. *Transfusion* 2008, **48**:1037-1039.

T. Hayashi, K. Yasui, N. Matsuyama, R. A. Furuta, Y. Hori, S. Tanaka, F. Hirayama, Y. Tani, H. Shibata & M. Inoue. Establishment of a novel method for detecting Nak^a antibodies by using a panel cell line. *Transfusion* 2008, **49**:390-392.

Sumiyoshi K, Kubota S, Furuta RA, Yasui K, Aoyama E, Kawaki H, Kawata K, Ohgawara T, Yamashiro T, Takigawa M. Thrombopoietic-mesenchymal interaction that may facilitate both endochondral ossification and platelet maturation via CCN2. *J Cell Commun Signal*. 2009 Oct 2. [Epub ahead of print]

Matsuyama N, Hirayama F, Wakamoto S, Yasui K, Furuta RA, Kimura T, Taniue A, Fukumori Y, Fujihara M, Azuma H, Ikeda H, Tani Y, Shibata H. Application of the basophil activation test in the analysis of allergic transfusion reactions. *Transfus Med*. 2009,

19(5):274-7.

Jiang S, Inada T, Tanaka M, Furuta RA, Shingu K, Fujisawa J. Involvement of TORC2, a CREB co-activator, in the in vivo-specific transcriptional control of HTLV-1. *Retrovirology*. 2009, **11**:6:73.

Hayashi T, Yasui K, Matsuyama N, Furuta RA, Hori Y, Tanaka S, Hirayama F, Tani Y, Shibata H, Inoue M.

Establishment of a novel method for detecting Nak antibodies by using a panel cell line. *Transfusion*. 2009, **49**(2):390-2.

Koh Y, Taniue A, Ishii H, Matsuyama N, Amakishi E, Hayashi T, Furuta RA, Fukumori Y, Hirayama F, Yoshimura K, Nagamine T, Tamai S, Nakano S. Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by an antibody specific for a newly identified allele of human platelet antigen-7. *Transfusion*. 2010 Jan 8. [Epub ahead of print]

2) 学会発表

ICAN 法を用いた血中 HCV 検出の試み
古田里佳、木村貴文、谷慶彦、柴田弘俊
大阪府赤十字血液センター
第56回日本輸血学会総会(2008,福岡)

ICAN 法を用いたウイルス核酸増幅検査法の開発

古田里佳、木村貴文、平山文也、谷慶彦、柴田弘俊
大阪府赤十字血液センター 研究部
第32回日本血液事業学会総会(2008,大阪)

DEVELOPMENT OF A NOVEL NON-PCR
NAT FOR THE DETECTION OF VIRAL
NUCLEIC ACIDS IN DONOR SERA

Rika A. Furuta, Kazuta Yasui, Takafumi Kimura
and Fumiya Hirayama

The XXth Regional Congress of the ISBT, Asia
(2009、名古屋)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1. ICAN反応系樹立アルゴリズム

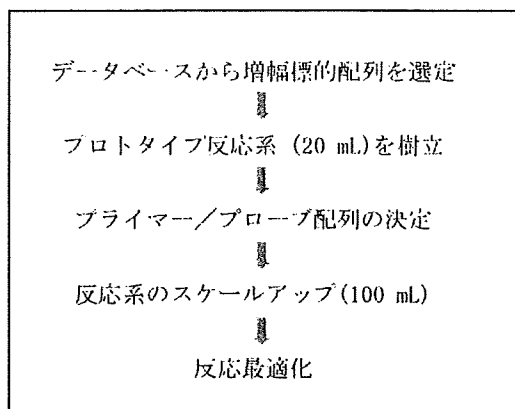


表1. プライマーおよびプローブ配列

Virus	プライマー配列	プローブ配列
HIV-1	逆転写用: TTAAATTGTGCTGTCCCTGTAATAAAC	CCCTGCACT (G)TA
	逆転写用: TTAATAATTGTGCTGTCTCTGTAATAAAC	
	ICAN用: AAGAAAAGGGGGGA (UG)	
	ICAN用: CTGTCTCTGTAATA (AAC)	
HCV	逆転写用: GCGGGGCACGCGGTCTACGAGACCTCCC	GTACTGCCT (G)ATA
	ICAN用: AGACTGCTAGCCGAG (UAG)	
	ICAN用: TCCCGGGCACTCGC (AAG)	
HBV	ICAN用: TGTGACAA (G)AATCC (UCA)	CC (A)CGAGTCTAG
	ICAN用: ACAA (G)AATCCTCACAA (UAC)	
	ICAN用: TGAGAGAAGTCCAC (CAC)	
	ICAN用: AGAAAACCCCGAAAATTGAGAGAAGTC	

注) 配列は左から右に5' →3'、()内塩基はRNA、プローブの5'はEclipseで3'はROXで標識。

表2. 反応組成および反応条件

Virus		反応組成		反応条件
HIV-1	逆転写 80 μ L中	8 pmol 200 pmol 1 x 0.5 mM 5 mM 50 U 80 U	各逆転写プライマー random 6 mer ICAN Buffer (注. 1) 各dNTP Mg(OAc)2 PrimeScript RTase RNase Inhibitor	42°C、15 min
	ICAN反応追加分 20 μ L中	1 x 10 mL 54 pmol 26 pmol 42 U 88 U	ICAN Buffer (注. 1) Mg(OAc)2 各ICANプライマー プローブ 熱耐性RNaseH BeaBEST DNA polymerase	55°C、120 min
HCV	逆転写 80 μ L中	8 pmol 200 pmol 1 x 0.5 mM 5 mM 50 U 80 U	逆転写プライマー random 6 mer ICAN Buffer (注. 1) 各dNTP Mg(OAc)2 PrimeScript RTase RNase Inhibitor	42°C、15 min
	ICAN反応追加分 20 μ L中	1 x 10 mL 54 pmol 20 pmol 80 U 88 U	ICAN Buffer (注. 1) Mg(OAc)2 各ICANプライマー プローブ 熱耐性RNaseH BeaBEST DNA polymerase	58°C、120 min
HIV	ICAN反応 100 μ L中	1 x 10 mM 0.4 mM 64 pmol 40 pmol 108 U 176 U	ICAN Buffer (注. 1) Mg(OAc)2 各dNTP 各ICANプライマー プローブ 熱耐性RNaseH BeaBEST DNA polymerase	58°C、120 min

(注. 1) 1 x ICAN Buffer: 32 mM HEPES-KOH, 100 mM KOAc, 1% DMSO, 0.04% propylendimamine, 0.11% BSA