

実験医学別冊

最強の
ステップUP
シリーズ

原理からよくわかる

リアルタイム

PCR

完全 実験ガイド

北條浩彦 [編]

次世代の
デジタル
PCR
も掲載!

羊土社
YODOSHA

10

プライマー/プローブの設計の
手順②

マルチプレックスPCRの場合

北條浩彦, 清水則夫

マルチプレックスPCRは、1つのPCR反応液中で複数のターゲット遺伝子を同時に増幅し検出する方法である。この方法は、1回のPCRで多くの情報（データ）を得ることができることから貴重なサンプルの有効利用と迅速な解析に優れている。しかし、このマルチプレックスPCRを実行するためには、細密なプライマー設計とPCR反応条件の検討が必要である。

■ マルチプレックスPCRと
そのポイント

マルチプレックスとは「多重化」の意味である。マルチプレックスPCRは、1つのPCR反応系（反応チューブ内）で複数の異なるターゲット遺伝子を同時に増幅し（複数ターゲット遺伝子/1反応系）、それらを識別して検出（解析）する方法である。通常の方法（1ターゲット遺伝子/1反応系）と比べて、マルチプレックスPCRは同じ量の鋳型DNAからより多くのデータを得ることができる。このため迅速な解析や網羅的な解析、そして貴重なサンプルの有効利用に長けている。このような解析を可能にするのは、①異なるターゲット遺伝子を同時に増幅させる特異性の高いPCRプライマーセットと②増幅したそれぞれのPCR産物を識別する異なる蛍光波長をもった数種の蛍光物質である。よって、特異性が高く相互干渉のないPCRプライマーセットの設計と細密なPCR条件の検討、そして識別可能な異なる蛍光波長をもった蛍光物質の組み合わせがマルチプレックスPCR実行の重要なポイントとなる。

■ プライマーデザインの
簡単な方法

文献から定量用にデザインされたプライマーセットを見つけ出して表のプライマーダイマーチェックソフトで確認して相性のよいものを選択する。例えば、第15章のウイルスの迅速検査実験は本方法を使用している。

■ プライマーを
初めからデザインする方法

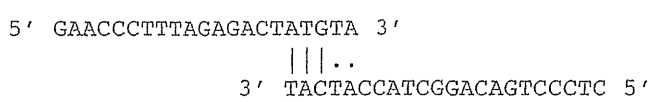
デザインソフトを使用してプライマーをデザインする（表）。いずれも以下の点を考慮して選択またはデザインする。③のプライマーダイマー形成の可能性については、図1の3種類について考慮する必要がある。

- ①Primer Tm値を合わせる。各プライマーの差がTm値±5℃以内（できれば2℃以内）になるように設定する。
- ②デザインされたプライマーの特異性をチェックする。プライマー配列をGenBank BLAST解析で特異性を確認する。GenBank DNA BLAST

表 本項で扱ったウェブアプリケーションとそのURLなど

Webアプリ名	URL	有料/無料	特徴など
プライマーダイマーチェック			
PriDimerCheck	http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/primer_dimer.html	フリー	—
IDT OligoAnalyzer	http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/	フリー	—
デザインソフト			
MPprimer	http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/	フリー	セット数に制限がないが多数のデザインは困難
PrimerStation	http://ps.cb.k.u-tokyo.ac.jp/mquery.php?language=ja	フリー	ヒトゲノムのみ
PrimerPrem	http://www.premierbiosoft.com/index.html	有料	お勧めするソフト。一度に100セットまで

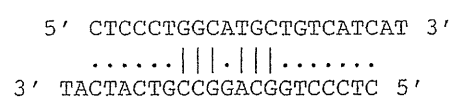
A 3'-ダイマー



プライマー同士の間が相補鎖になっている場合、それによりプライマーを特異的に増幅させる可能性がある

『 > -2 ΔG (kcal · mole⁻¹) 』

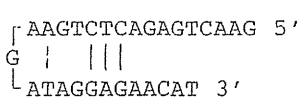
B Overall ダイマー(プライマー鎖全体)



プライマー同士が相補鎖に近いことによるダイマー形成

『 > -6 ΔG (kcal · mole⁻¹) 』

C ヘアピン形成



プライマー自身を特異的に形成、同一プライマー内にも鎖と相補鎖があるとそれを特異的に増幅増殖する

『 > -3 ΔG (kcal · mole⁻¹) 』

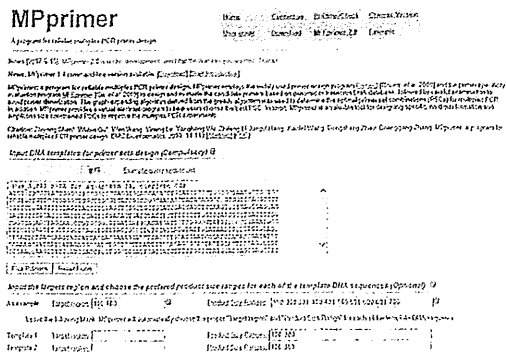
図1 望ましくないプライマーダイマーヘアピン構造の例

『 』は、IDT OligoAnalyzerによって出力される望ましい値を示す

- (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) から nucleotide blastを選択, 配列を Enter Query Sequence に入れてヒトサンプルであったら Database のところに Human genomic + transcript にチェックを入れて BLAST ボタンを押す.
- ③プライマーダイマー, ヘアピン形成のチェック.
- ④増幅産物サイズ. 増幅産物の長さは短い方がよいがプローブ検出用にある程度必要なため 100 ~ 300 bp 程度が適当である.

1. MPprimer デザインの実際

Input DNA template 欄に FASTA 形式の DNA 配列を入力する. このソフトは PCR 産物を電気泳動でサイズを確認するデザインになっているので Product Size Ranges をすべて 100 ~ 300 bp にしてデザインする. デザインされたプライマーについて, MPprimer にある PriDimerCheck を使って, プライマーダイマーの確認を行い, 最適なプライマーを選択する (図2).

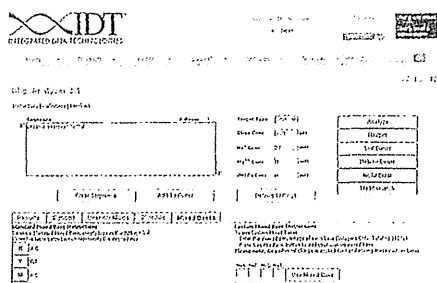


PriDimerChecking Output

Sequence: 5'-AGGCTGCTGGGGGGGGGGG-3'
 Primer 1: 5'-AGGCTGCTGGGGGGGGGGG-3'
 Primer 2: 5'-AGGCTGCTGGGGGGGGGGG-3'

Sequence	Primer 1	Primer 2	Tm (°C)
AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	44.762619
AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	44.762619
AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	44.762619
AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	44.762619
AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	44.762619
AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	AGGCTGCTGGGGGGGGGGG	44.762619

図2 MPprimerの入力画面とPriDimerCheckの結果画面



Structures

Structure Name	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	Tm (°C)
1		-0.48	32.1
2		-0.14	27.1
3		0.4	21.9

* Note dNTP Concentration is not taken into account.

図3 IDT OligoAnalyzerの入力画面とヘアピン構造予測の結果

2. IDT OligoAnalyzerによるヘアピン形成チェック

IDT OligoAnalyzerの sequence 欄にプライマー配列を入れてヘアピン構造を確認する (図3)。

■ ハイブリプローブ設計のポイント

ハイブリプローブ*を設計する際には、PCR反応後に入れるためプライマーやプローブの相性を見る必要はなく、プローブ配列は増幅内であればどこでもよい。ただし、反応内のすべてのプライマー配列や他のターゲット増幅産物との相同性は確認しておくこと。

Tm値を Current Protocols in Molecular Biology に準拠し、次の式から算出している。

$$(Tm \text{ 値}) = 60.8 + 0.41 \times [\text{G,Cの割合}(\%)] - \frac{500}{(\text{総塩基数})}$$

しかし、ここで求めたTm値がそのまま融解曲線分析でのTm値(実測値)にはならないことに注意が必要である。経験的には、求めたTm値より5°C高い温度が融解曲線分析でのTm値となる。LcRedとFITC標識プローブのうち、Tm値の低いプローブの値が反映される。またLcRedを実験編-15では使用したが、FRETの原理を用いるため、例えばLcRed705の代わりに安価なCy5.5など同じ波長であれば別の色素でも構わない。

※ ハイブリプローブを用いたPCRの試薬とプライマー濃度：専用試薬が市販されているが、Taqポリメラーゼの3'エキソヌクレアーゼ活性を不活化しているものと特異性を増強するタンパク質を添加しているものがあり、清水らはタンパク質が添加されている方を使用している (AccuPrime™ Taq DNA Polymerase)。また通常の試薬でも増幅するが、プライマーセットが多いときはTaqポリメラーゼ濃度を2~3倍にするとよく増幅される。また各プライマー濃度は初めは0.2 μMで実験するとよい。その後は0.1~0.3 μMで調整する。

15

ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査

清水則夫，渡邊 健，外丸靖浩

リアルタイムPCR活用の **メリット** と **デメリット**

ウイルスは分離培養が難しいため、PCRによりウイルスゲノムを直接検出する手法はウイルス感染症の診断に欠かせない技術となっている。一方、健常人にも多くのウイルスが持続感染していることが知られており、ウイルスゲノムが検出されてもすぐに病気の原因と断定することはできない場合もある。われわれの研究室では、PCR法によるウイルスゲノムの検出法として定性的検査法と半定量的検査法の2種類を開発し、検査対象ウイルスの種類・目的・検査時間・検体量などにより定性的検査系と定量的検査系を使い分けている。

はじめに

ウイルス感染症が疑われる疾患の原因ウイルスを特定する際、一般には臨床症状などから予想されるウイルスを個別に検査する手法がとられている。しかしこのような検査では、予想外のウイルス感染が見逃されたり、複数のウイルスの重複感染や主たる病因ウイルスの感染が見逃される危険性がある。われわれは、多くのウイルスを網羅的・迅速・安価に検出することが可能になればウイルス感染症をより適切に診断できると考え、キャピラリーPCR装置を使用したマルチプレックスPCR法による多種類のウイルスを同時に検出できる検査法（定性検査）を開発した。さらに、多種類のウイルスの同時定量と検査系の自動化を目的にプレートタイプのリアルタイムPCR装置を使用した網羅的ウイルス検出法を開発した。

本項では、迅速性に重点を置いたキャピラリーPCR装置による定性的検査法と、一般に普及しているプレートタイプのリアルタイムPCR装置を用いた半定量的検出法と検査系の自動化に関する取組みを紹介する。

キャピラリーPCR装置を使用した網羅的・迅速検査系

本検査法は、マルチプレックスPCRにより1本のキャピラリー内で最大32種類の遺伝子が検出可能である。測定はPCR40分、融解曲線解析10分の合計50分程度ときわめて短時間で完了し、単一項目の検出を行う場合と同等の検出感度がある。

図1にマルチプレックスPCR法による、複数ウイルスの同時・迅速・高感度ウイルス検査系

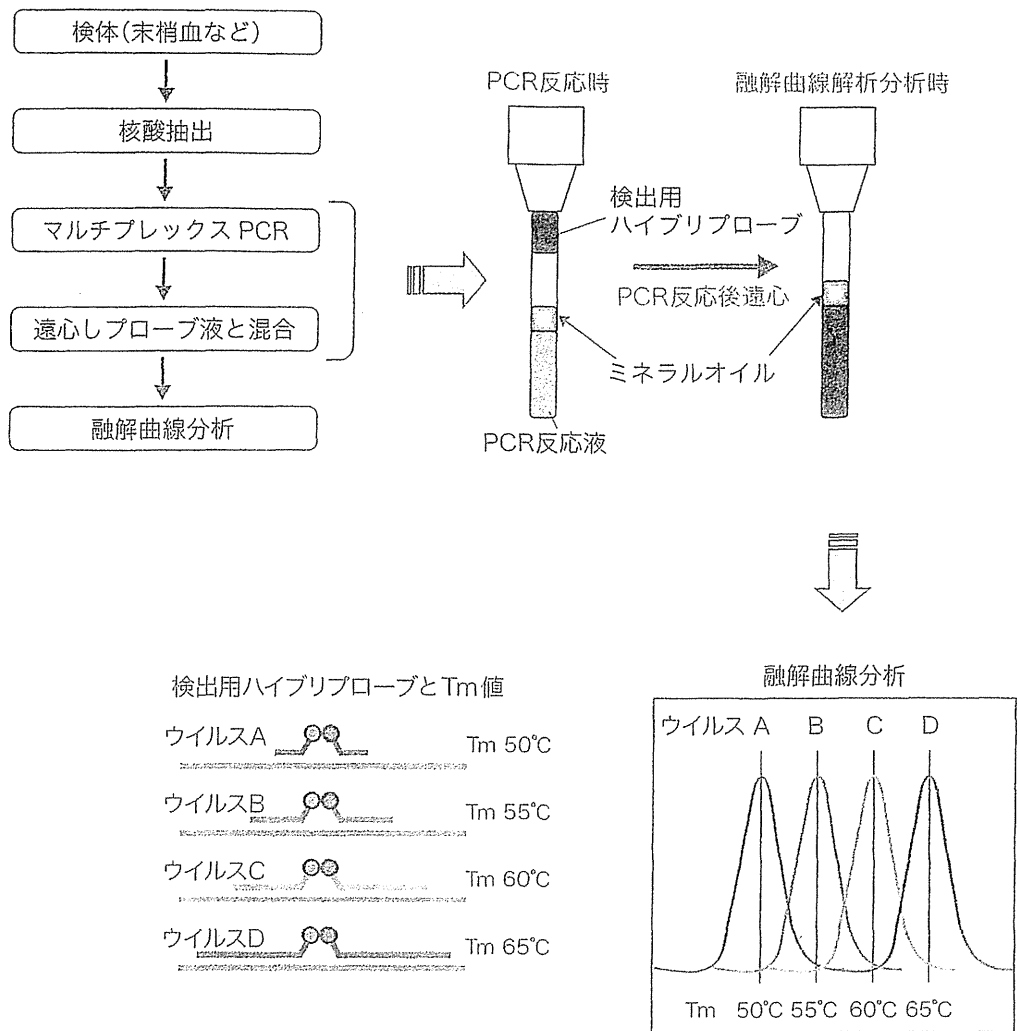


図1 複数ウイルスの迅速検査系の概略

の概略を示す。サンプルから核酸を抽出し、マルチプレックスPCRを行う。その後、検出用ハイブリプローブMixを加えて増幅配列にハイブリダイズさせ、FRETによる蛍光を検出し融解曲線分析 (Melting Curve Analysis) を行い、複数のウイルスを同時・定性的に検出・識別するシステムである。図1に示してあるようにハイブリプローブのTm値が異なるため、どのウイルス遺伝子が増幅されたか融解曲線分析により得られたピークのTm値から判定される。さらに、内在性コントロール遺伝子 (IC) も加え、PCR反応が進まないために生じる偽陰性を防止している。

はじめにPCRを行い終了後に検出用ハイブリプローブを混合するため、お互いの相性を考慮する必要性が低下しプライマー・プローブの設計が容易になる。

検出用ハイブリプローブの設定可能なTm値の範囲は50~75°Cであり、プローブ同士のTm値の差が3°C以上あればウイルス種を区別可能なため、合計8種類の異なるピークを区別できる。LightCycler® 2.0では、アクセプター色素としてLcRed640, 610, 670, 710の4種類の蛍光波長が使用可能であるため、理論上は1本のキャピラリーで4×8=32種類のウイルス種が検出可能なことになる。

準備

例として、ウイルス12種類を同時に検出する系を示す。なお、1度に32本測定できるため同時測定が可能なサンプル数は15検体である。

- LightCycler® 2.0 (ロシュ・ダイアグノスティックス社)
- DNAウイルス定性用試薬増幅酵素+ Bufferセット (日本テクノサービス株式会社 #D001-1)
詳細については日本テクノサービス株式会社へ直接問合せる。
- サンプル (検体) DNA 約1 μg
DNAの精製度は結果に影響を及ぼすので非常に重要である。
- プライマー, ハイブリプローブ*1
株式会社日本遺伝子研究所などで購入可能。

	検出ウイルス名
	単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus : HSV-1, HSV-2)
A	水痘・帯状疱疹ウイルス (Varicella-Zoster virus : VZV)
セ	パルボウイルスB19 (Parvovirus B19 : B19)
ツ	ヒトヘルペスウイルス6型 (Human Herpes Virus type 6 : HHV-6)
ト	サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus : CMV)
	BKウイルス (BKV), JCウイルス (JCV)
B	EBウイルス (Epstein-Barr virus : EBV)
セ	ヒトヘルペスウイルス7型 (Human Herpes Virus type 7 : HHV-7)
ツ	ヒトヘルペスウイルス8型 (Human Herpes Virus type 8 : HHV-8)
ト	B型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus : HBV)

*1 ウイルスセットのプライマー, プローブ配列は参考文献1, 2を参照。

- LightCycler® Capillaries (20 μL)
- LightCycler® Centrifuge Adapters
あらかじめ4°Cで冷却しておく。
- LightCycler® 2.0 Sample Carousel (20 μL)
- LC Carousel Centrifuge 2.0
- ミネラルオイル (M8662-SVL, シグマアルドリッチ社)
- 微量高速遠心機
1.5 mLチューブが遠心できるもの。

プロトコール

以下、Aセットを例にして示す (Bセットも同様)。

1. マスターミックスの作製

① プライマーミックスの作製

各プライマーセットを混合し10×濃度に調製しておく。

HSV primer F*2	20 μL
HSV primer R	20 μL
CMV primer F	80 μL

CMV primer R	80 μ L
HHV6 primer F	40 μ L
HHV6 primer R	40 μ L
B19 primer F	60 μ L
B19 primer R	60 μ L
BKV JCV primer F	40 μ L
BKV JCV primer R	40 μ L
VZV primer F	20 μ L
VZV primer R	20 μ L
Total	520 μ L

*2 各プライマーは 100 pmol/ μ L に調製したものをを用いる。

② 内在性コントロール遺伝子 (IC) β -グロビンプライマーミックスの作製

プライマー濃度を 4 pmol/ μ L に調製する。

β -グロビン primer F	4 μ L
β -グロビン primer R	4 μ L
Nuclease free water	92 μ L
Total	100 μ L

③ マルチプレックスPCR用マスターミックスの作製

< 1 反応分 >

Primer (①で調製したもの)	0.60 μ L
IC primer (②で調製したもの)	0.40 μ L
Buffer	1.50 μ L
定性用増幅酵素	0.25 μ L
dH ₂ O	2.25 μ L
Total	5.00 μ L

2. 反応液の調製

試薬の調製は、あらかじめ 4°C で冷却しておいた LightCycler Centrifuge Adapters に LightCycler Capillaries (20 μ L) を立てて行う。

- ① ミネラルオイルを 3 μ L ずつキャピラリーに入れる
- ② マスターミックスを 5 μ L ずつ入れる
- ③ テンプレートを 0.2 μ g 添加してピペティングで混合し、ヌクレアーゼフリー水で全容量 10 μ L に調製する *3

*3 ここでは全容量 10 μ L にしているが最大で倍の 20 μ L まで増やせる。

- ④ キャピラリーをアダプターごと高速微量遠心機で 1,000 \times g (3,000 rpm) で 3 秒遠心する *4

*4 キャピラリーの蓋が開いているため、ミストの発生によるコンタミネーションの危険がある。それを避けるため高速で遠心しないこと。

⑤ ハイブリブローブミックスを5 μ L ずつ入れる

各 FITC 標識プローブおよび各 LcRed 標識プローブを各 0.02 pmol/ μ L に調製する。

< Aセットプローブの場合 >

HSV-1,2	FITC 標識プローブ* ⁵	2 μ L
HSV-1,2	LcRed640 標識プローブ	2 μ L
VZV	FITC 標識プローブ	2 μ L
VZV	LcRed640 標識プローブ	2 μ L
B19	FITC 標識プローブ	2 μ L
B19	LcRed640 標識プローブ	2 μ L
HHV-6	FITC 標識プローブ	2 μ L
HHV-6	LcRed705 標識プローブ	2 μ L
CMV	FITC 標識プローブ	2 μ L
CMV	LcRed705 標識プローブ	2 μ L
BKV, JCV	FITC 標識プローブ	2 μ L
BKV, JCV	LcRed705 標識プローブ	2 μ L
β -Globin	FITC 標識プローブ	2 μ L
β -Globin	LcRed640 標識プローブ	2 μ L
Nuclease free water		972 μ L
total		1,000 μ L

*5 各プローブは 100 pmol/ μ L に調製したものをを用いる。

⑥ キャッピングツールを使用してキャピラリーに蓋をし、カローセルにセットする
カローセルごと LightCycler 2.0 にセットし、PCR 反応を行う。

⑦ マルチプレックス PCR の実行

〈リアルタイム PCR 条件〉					TOTAL 40分
			温度変化速度 ($^{\circ}$ C/s)	データ取得 タイミング	
熱変性	95 $^{\circ}$ C	2分	20	Single	40 サイクル
↓					
熱変性	95 $^{\circ}$ C	2秒	20	None	
アニーリング	58 $^{\circ}$ C	15秒	20	None	
伸長反応	72 $^{\circ}$ C	15秒	1	None	
↓					
冷却	40 $^{\circ}$ C	30秒	20	None	

3. 融解曲線分析, 判定

⑧ PCR 終了後, カローセルごと LightCycler 2.0 から取り出し, LC Carousel Centrifuge 2.0 で遠心し, PCR 反応液とハイブリブローブミックスを混合する

- ② カローセルを逆さにして暗所で1分静置する
- ③ 再びLightCycler 2.0にセットし、融解曲線分析を行う

<融解曲線分析条件>					TOTAL 10分
			温度変化速度 (°C/s)	データ取得 タイミング	
ハイブリダイズ	40°C	00秒 ^{*6}	20	None	} 3サイクル
熱変性	95°C	10秒	20	None	
↓					
熱変性	95°C	00秒	20	None	
ハイブリダイズ	40°C	20秒	4	None	
解離	80°C	00秒	0.2	Continuous	
↓					
冷却	40°C	10秒	20	None	

*6 0秒は、設定温度に到達させることが目的である。

- ④ AnalysisでTm Callingを選択し、Color Compensation^{*7}をOnにする
 SettingでManual Tmを選び、Tm値^{*8}を手動で確認し、チャンネルとTm値からウイルスの種類(図2A参照)を判定する。
 - *7 Color Compensationデータはあらかじめ取得しておかないと蛍光の漏れこみによりF2/F1, F3/F1の両方に同じピークが現れ判定を誤る恐れがある。
 - *8 サンプルの塩濃度が高いとTmも塩濃度に依存して変化するのでTm値全体が上がる。ICのピークを見て例えば1°C高ければ他のウイルスのピークも1~2°C高くなる。LightCycler 4.0のソフトで調節できる。

実験例

1. 2本のキャピラリーで合計12種類のウイルスを測定(図2)

A, Bセットで12種類のウイルスについて、図2Aに示されているTm値の差異によって明確に区別でき、検出・同定が可能になる。図2Aにウイルス種類別のTm値の目安を示す。このように、あらかじめポジティブコントロールで実際に検出するTm値を確認しておく必要がある。

もしネガティブコントロールが陽性になった場合はコンタミの可能性があるので、試薬をすべて変える。変えても検出する場合はPCRのアニーリング温度を最適化する。あるいは新しいプライマーに変更する。

A

セット	チャンネル	Target	Tm(°C)
A	640 (F2)	IC(β -globin)	51
		HSV-1	56
		VZV	61
		B19	64
		HSV-2	69.5
	705 (F3)	HHV-6	53.5
B	640 (F2)	IC(β -globin)	51
		EBV	64
	705 (F3)	HHV-7	56
		HHV-8	62.5
		HBV	66

F1 : F1TC
 F2 : LcRed 640
 F3 : LcRed 705

B

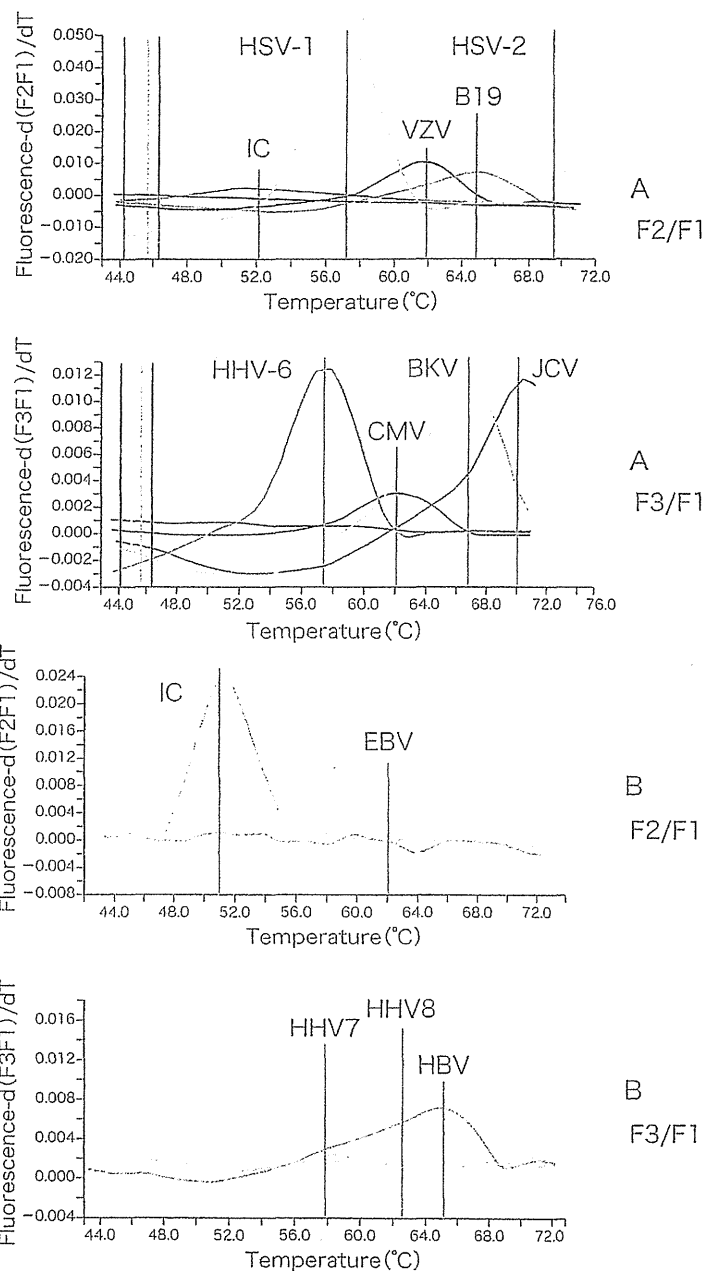


図2 標準DNAを用いたウイルスA, Bセット2本の検出結果

IC遺伝子を含め、ピークが何も検出されない場合は、サンプル抽出がうまくいっていない場合が想定される。

2. 構築されたウイルス検査系を使用した眼疾患検査への利用例

眼科疾患においてブドウ膜炎の原因の多くは自己免疫疾患とウイルス・細菌などによる感染症のいずれかで起こることが知られている。原因によって治療法が全く異なるため、原因を迅速に決定し適切な治療を行うことが患者QOLを確保するうえできわめて重要である。また採取できる眼科検体は微量であり、個別に多くの項目を測定するためには検体を薄める必要があり、検出感度が低下する。したがって、マルチプレックスPCRにより高感度かつ多項目の同時測定

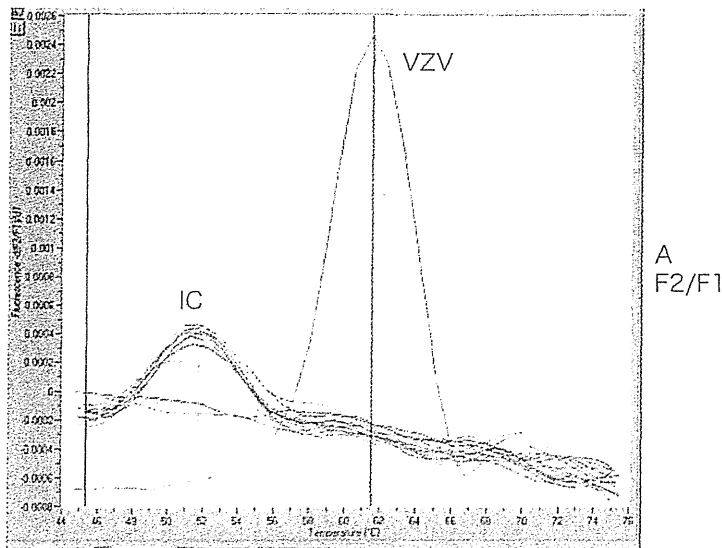


図3 複数の検体の1つからVZVが検出された例

を行うことが望ましい²⁾。

図3は複数サンプルを同時に測定した例で、1検体から水痘帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus : VZV) が検出された。その他のサンプルからはIC (β -Globin) のみが検出され、ウイルス陰性であったことを示している。

固相化試薬とプレートタイプPCR装置を使用した網羅的検査系

プレートタイプPCR装置を使用した網羅的ウイルス検査系では、プローブをPCR反応後に加えることが難しいためマルチプレックスPCRの感度が低下してしまう懸念がある。予備的検討では、1つの反応場で行うPCR反応を3つ程度に抑えればプライマー・プローブの配列をそれほど吟味しなくても良好な結果を得られるとの結果が出ていた。しかし、多項目の検出を行おうとすると多数のウェルを使用する必要があるため、試薬のセットアップに長時間を要する欠点がある。本検査系では、あらかじめプライマー、プローブ、安定化剤等を固相化した試薬を準備することで、短時間で多くの項目を網羅的に検査することが可能となった。また、プローブをはじめから投入するため、半定量的結果を得ることが可能である。

準備

固相化ウイルス測定試薬 (固相化ストリップ)

日和見感染症セット (日本テクノサービス社)、DNA・RNAウイルス・マイコプラズマ定性試薬セット (日本テクノサービス社) など、プライマー・プローブ、安定材などが固相化されたもの (図4)。50コピーの検出をCt値40以下で行えるように調製されている。

サンプルDNA 100 ng

リアルタイムPCR装置

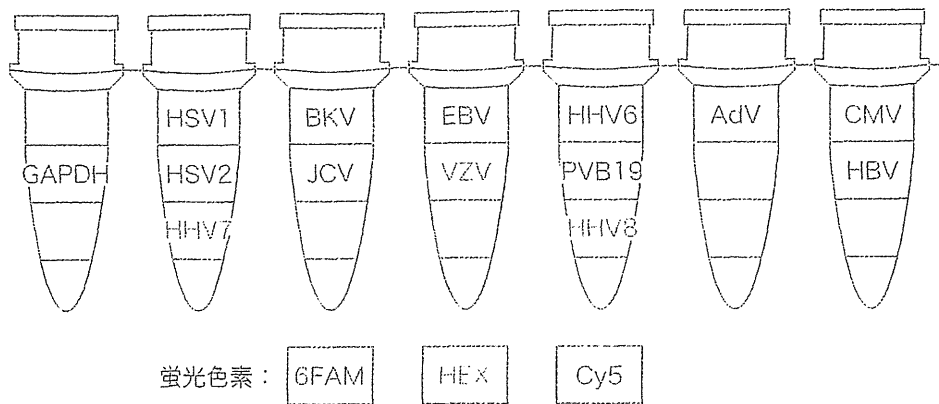


図4 固相化ウイルス測定試薬のイメージ

検出プローブの蛍光色素を組み合わせることで、1ウェルで1~3種類のウイルスを検出できる

LightCycler® 480 (ロシュ・ダイアグノスティックス社), CFX96 Touch™ リアルタイムPCR (バイオ・ラッド社), PikoRealリアルタイムPCR (サーモサイエンティフィック社) など。

- PCR 定量用 Buffer (#B002, 日本テクノサービス社)
- PCR 反応液定量用増幅酵素 (#T002, 日本テクノサービス社)
詳細については日本テクノサービス株式会社へ直接問合せる。
- 標準DNA

各検査項目に対応した標準DNA、検査対象のウイルスゲノムなどを取得することが困難である場合が多いため、一般的には、検査する際に増幅させる領域を含むDNA断片をPCRで増幅した産物や、その領域が挿入されたプラスミドを用いる。調製した標準DNAのコピー数は、DNAの濃度と断片の長さから、以下の式で計算する。

$$1 \text{ コピーの質量 (Y g)} = \frac{\text{DNA断片鎖長} \times 660 \text{ (1 bpの平均分子量)}}{6.02 \times 10^{23}}$$

$$\text{コピー数濃度} = \frac{\text{DNA溶液の濃度 (g/}\mu\text{L)}}{1 \text{ コピーの質量 (Y g)}}$$

- マイクロタイタープレート対応ミキサー
- 分注機

ウイルスの検査をするにあたって、人為的な間違いやコンタミネーションは結果に甚大な影響を及ぼす。また、一度に多くのサンプルを処理する場合は、その危険性が高くなる。このようなリスクを低減するため当研究室では、小型で安価な自動分注機 (Nadeshiko II : #BM-N002, ジーンワールド社) を共同開発・運用している。

プロトコール

1反応分がチューブに固相化された日和見感染症セットの8連ストリップ(8連チューブ)を用いた場合の実験手順を以下に示す。なお、PCRは高感度であるため、コンタミネーションの影響を受けやすい。そのため、反応液を調製する場所は、クリーンに保つことが重要である。当研究室では、検査をする実験室とその他の実験室を別にし、さらにPCR反応液の調製はクリーンベンチ内で行うなど、コンタミネーションのリスクを減らす取り組みを行っている。

① 目的に応じたマルチプレックス検出系の選択

② 反応液の調製

以下の組成のリアルタイムPCR反応溶液を調製する*1*2。サンプルが多いときには分注機を用いる。

PCR 定量用 Buffer	9.8 μL
PCR 定量用増幅酵素	0.2 μL
サンプルDNA	300 ng
超純水	適量
Total	20 μL

- *1 日和見感染症セットは7ウェルで13項目について検査するため、反応液の調製は7~8ウェル分を先に準備して、それを各ウェルに分注する。
- *2 8連ストリップには、プライマー・プローブそして安定化材が固相化されている。そのため、反応液を加えたあとよくピペッティング（5~10回程度）、あるいはプレートミキサーを使用しよく攪拌し均一化する必要がある。

③ リアルタイムPCR反応

以下の温度条件でPCR反応を行う。LightCycler® 480, CFX96 リアルタイム PCR, Piko-Realについては、以下の条件で増幅検出できることを確認している。

ポリメラーゼの活性化	95°C	10秒	TOTAL 60分 45サイクル
↓			
熱変性	95°C	10秒	
アニーリング	60°C	30秒	

④ 実験データの解析

リアルタイムPCR反応後、解析装置付属の解析ソフトを用いて増幅曲線を確認し、ウイルスの陰陽判定を行う。

各種装置付属解析ソフトのアルゴリズムは、それぞれ独自のものを使用しているため、それぞれの手順書に従って解析する。ほとんどの解析ソフトが、増幅曲線からCt値を計算するための閾値やバックグラウンドを自動で設定する機能がついているので、これを利用し参考にしながらそれぞれの設定を行うこともできる。

また得られたCt値から、あらかじめ標準DNAを用いて検量線を作成しておくことで、半定量的な情報を得ることができる。

実験例

血液から抽出したDNAと日和見感染症セットを用いて、実際のウイルス検査の結果を図5に示す。本項で紹介したプロトコールを実際の血液サンプルでテストした結果、多くのサンプルから複数のウイルスが検出された。このように、網羅的な検査は、標的を絞った検査では見落とす可能性のあるウイルスを検出することができる大きなメリットである。

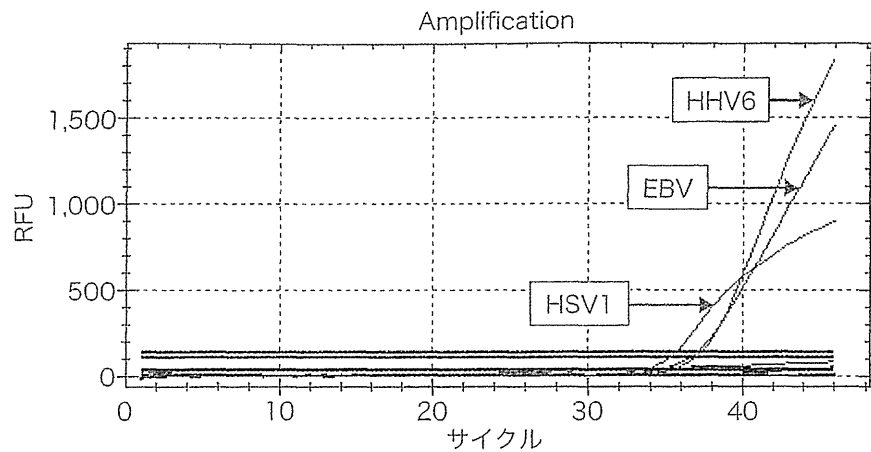


図5 日和見感染症セットを実際の血液サンプルを用いて解析した結果

おわりに

本項では当研究室で主にウイルスの検出を目的として開発したマルチプレックスPCR検出系を解説した。マルチプレックスPCR法による網羅的ウイルス検査は、ウイルス感染症が疑われる疾患の病因特定に有用な情報を与えることができるため、すでに多くの医療施設で利用されている。一方、iPS技術の登場により再生医療に対する注目度が高まっているが、ヒトには多くの病原体が持続感染しているため治療用細胞製剤の原材料には微生物汚染のリスクが避けられない。細胞製剤は滅菌操作をすることが不可能なため、安全に治療を行うためには微生物検査を徹底することが非常に重要であり、マルチプレックスPCRを応用した本検査法は細胞製剤の安全管理法として注目されている。また、本項で記したように、あらかじめ固相化試薬を準備しておけば、さまざまな遺伝子検査を簡便に実施することが可能になる。固相化ストリップの作製技術は日本テクノサービス社と共同開発した成果であり、必要な固相化ストリップの製造を委託することが可能である。本プロトコルに関する技術的な質問は、東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス治療学 清水則夫 (nishivir@tmd.ac.jp) まで。

◆ 参考文献

- 1) Ito, K. et al. : Intern. Med., 52 : 201-211, 2013
- 2) Sugita, S. et al. : Br. J. Ophthalmol., 92 : 928-932, 2008
- 3) 『医薬品の品質管理とウイルス安全性』(日本医薬品等ウイルス安全性研究会/編), 文光社, 2011

