

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の
強化に関する研究（H23 - 新興—指定—020）

Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS: 重症発熱性血小板減少症)の
実験室診断法に関する研究

研究分担者 森川 茂 （国立感染症研究所獣医科学部）

研究要旨： SFTS (severe fever with thrombocytopenia syndrome ; 重症熱性血小板減少症候群) ウイルスは 2011 年に中国で同定された新規ブニヤウイルスで、2013 年 1 月には本ウイルスに感染した国内初の SFTS 患者が報告された。このウイルスは中国において、フタトゲチマダニやオウシマダニからウイルス遺伝子が検出されておりマダニ媒介性のウイルスである可能瀬が示唆されている。しかし 2013 年 4 月の段階において、国内の SFTS ウイルスを保持するダニ種、陽性率、個体あたりのウイルス量、季節性変動性、陽性マダニの国内分布等は全く不明であった。そこで、本研究ではマダニにおける SFTS ウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法の確立するための陽性コントロールプラスミドの構築と、反応試薬の選択を目的とし検討を行った。

研究協力者: 宇田晶彦、木村昌伸、加来義浩、野口章、今岡浩一（同獣医科学部） 福士秀悦、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸（同ウイルス第 1 部）

A. 研究目的

SFTS (severe fever with thrombocytopenia syndrome ; 重症熱性血小板減少症候群) ウイルスは 2011 年に中国で同定された新規ブニヤウイルスである。このウイルスに感染したヒトの症状は、発熱、消化器症状、血小板減少、白血球数減少等を特徴とし、年齢が高いほど重症例と死亡率が高くなる傾向がある。2013 年 1 月に日本国内において初めての SFTS 患者が確認され、現在では RT-PCR 法による患者の診断検査体制が全国に整備されている。

中国においてフタトゲチマダニ (5.4%)

およびオウシマダニ (0.6%) から SFTS ウイルス遺伝子が検出されたが、一方で蚊等の昆虫からはこのウイルス遺伝子が検出されなかった事から、SFTS はマダニ媒介性の感染症であると考えられている。また、ヤギ (80%)、ヒツジ (70%)、ウシ (60%)、イヌ (38%) 等の動物からウイルス抗体が検出されており、マダニと動物間でウイルスが保持されている可能性が示唆されている。しかし動物からヒトへの感染は報告されておらず、ヒトへの感染はマダニによる刺咬が主因であると考えられている。

2013 年 4 月の段階において、国内の SFTS ウイルスを保持するダニ種、陽性率、個体あたりのウイルス量、季節性変動性、陽性マダニの国内分布等は全く不明であった。そこで、本研究ではマダニにおける

SFTS ウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法の確立するための陽性コントロールプラスミドの構築と反応試薬の選択を目的とした。

B. 研究方法

陽性コントロールプラスミドの構築

SFTS ウイルス YG1 株を感染した Huh7 細胞の培養上清から、IsogenII を用いてウイルスゲノム RNA を精製した。得られた RNA を鋳型とし、ウイルスの S セグメントを増幅する pSFTS-S-22s および pSFTS-S-541a プライマー (表 1) と Invitrogen SuperScript III One-Step RT-PCR System with PlatinumTaq (Life Technologies) で増幅し得られた 520 bp の DNA 断片をプラスミドベクターに挿入した (図 2)。このプラスミドを用いて大腸菌 DH5a を形質転換し、カナマイシンを含む LB 寒天培地で選択後、カナマイシンを含む LB 培地で培養した。得られた菌体は遠心を用いて集菌し、NucleoBondXtra Midi (Macherey-Nagel) でプラスミドを精製した。

2 種類の制限酵素サイト (BamHI, EcoRV) と TaqMan プローブサイトから成る DNA 断片を挿入する為に、得られたプラスミドを鋳型とし PrimeSTAR Max Premix (Takara) と変異導入用プライマー (pSFTS-S-mut-s および pSFTS-S-mut-a : 表 1 および図 1) を用いて PCR を行い、ライゲーション処理を無しに大腸菌 DH5a (TOYOBO, Competent high DH5a) を形質転換し、カナマイシンを含む LB 寒天培地で選択後、カナマイシンを含む LB 培地で培養した。得られた菌

体は遠心を用いて集菌し、NucleoBondXtra Midi (Macherey-Nagel) を用いてプラスミドを精製した (図 2)。

リアルタイム RT-PCR

SFTS ウイルスを検出するためのリアルタイム RT-PCR 試薬は TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Takara) および RNA-direct Realtime PCR Master Mix (Toyobo) を使用し、各々の推奨反応条件に改良を加え施行した。TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit を使用する際には 42□ 5 分間の RT 反応、95□ 10 秒間の熱変性後、50 サイクルのシャトル PCR (95□ 5 秒、60□ 35 秒) を行った。RNA-direct Realtime PCR Master Mix を使用する場合には、95□ 30 秒間の熱変性、61□ 20 分間の RT 反応、95□ 30 秒間の熱変性後、50 サイクルのシャトル PCR (95□ 5 秒、64□ 60 秒) を行った。このリアルタイム RT-PCR には SFTSV-S2-237 プライマー、SFTSV-S2-400a プライマー、SFTSV-S2-317MGB プローブ (表 1) を用いて増幅した。

リアルタイム RT-PCR の増幅産物の特異性確認試験

制限酵素処理を行わない場合にはリアルタイム RT-PCR 反応液 3μl を電気泳動しウイルス由来増幅産物 (164bp) およびプラスミド由来増幅産物 (201bp) を識別した。制限酵素処理を行う場合には反応液反応液 3μl を 10 unit の制限酵素 (BamHI または EcoRV) と付属の緩衝液を添加しトータル 20μl の反応液で 37□ 1 時間インキュベート

後、4%アガロースゲルでウイルス由来増幅産物（164bp）およびプラスミド由来増幅産物（126+75bp）を確認した。

シーケンス解析を行うために、リアルタイム RT-PCR 反応液 5 μ l に 1/40 希釈した illustraExoProStar（GE ヘルスケア社）を添加し 37 $^{\circ}$ C 1 時間インキュベート後、80 $^{\circ}$ C 15 分間酵素変性処理を行った。得られたサンプルの中から 2 μ l を鋳型とし、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（GE ヘルスケア社）を用いてシーケンスサンプルを作製、Sephadex G-50 Superfine で精製、乾燥後 Hi-Di Formamide（GE ヘルスケア社）で溶解しシーケンスサンプルとした。シーケンス解析は Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザを用いた。

C. 研究結果

陽性コントロールプラスミドの構築

リアルタイム RT-PCR のコピー数を算出するために陽性コントロールプラスミドの構築を試みた。最初に構築したプラスミドはリアルタイム RT-PCR で増幅するウイルスの塩基配列 164bp を含む 520bp をプラスミドベクターに挿入した（図 2 左）。しかしながら、このプラスミドを陽性コントロールが増幅して得られた塩基配列と、ダニに含まれる SFTS ウイルス由来の増幅産物の塩基配列は一致するためコンタミネーションを識別することが困難である。そこで、新規の陽性コントロールプラスミドではリアルタイム RT-PCR で増幅する領域に、2 種類の制限酵素サイト（BamHI：GGATCC、EcoRV：GATATC）と TaqMan プローブ配列（ggctaagcagttgggtggtgcaggatg）を含む

配列を挿入した。この結果、リアルタイム RT-PCR による増幅がウイルス由来の PCR 産物か、プラスミドのコンタミか否かが迅速に判定可能となった（図 2 右）。

電気泳動によるコンタミネーションの判定法の確認

最初に作出したプラスミド（旧陽性コントロールプラスミド）とウイルス由来の PCR 増幅産物のサイズは両者ともに 164 bp であり、電気泳動によるコンタミ識別は不可能であった（図 3）。一方で新プラスミド由来の PCR 増幅産物のサイズ（201 bp）はウイルス由来の増幅産物（164 bp）よりも 37bp 大きく、4%アガロースゲルによる電気泳動でコンタミ識別が可能となった。更に新プラスミドの増幅産物は BamHI（157 および 44 bp）または EcoRV（126 および 75 bp）制限酵素によって消化されるが、ウイルス由来の増幅産物には両制限酵素サイトは存在しない為、制限酵素処理を行っても 164 bp のままであるのでコンタミネーションを容易に判定可能となった（図 3）。

2 色法リアルタイム RT-PCR によるコンタミネーションの判定法の確認

新しい陽性コントロールプラスミドを用いたリアルタイム RT-PCR 法では、反応液にウイルス配列と相補する FAM 標識 MGB プローブ（SFTSV-S2-317MGB）と陽性コントロールプラスミドと特異的に相補する HEX 標識 TaqMan プローブ（PosiContTaqman）を同時に添加すると、ウイルス由来増幅産物では FAM 標識 MGB プローブしか増幅されないが、プラスミド

由来増幅産物では FAM 標識 MGB プローブ および HEX 標識 PosiContTaqman probe の増幅が認められ、コンタミネーションをリアルタイム RT-PCR 反応中にモニタリング可能となった (図 4)。

シーケンス解析によるコンタミネーションの判定の確認

リアルタイム RT-PCR 反応終了後の反応液をシーケンス解析する為に illustraExoProStar キットで処理を行った。このキットに含まれる大腸菌由来のエキソヌクレアーゼ I (Exo I) は PCR 産物中の過剰なプライマーなどの一本鎖 DNA を特異的に消化し、バクテリア由来の熱感受性アルカリフォスファターゼ (BAP) は PCR 産物に含まれる未反応 dNTPs のリン酸基を除去して dNTPs を不活性化する。これらの酵素は 80℃ で容易に失活するので、酵素熱変性処理済み溶液をシーケンスの鋳型としてそのまま使用した。アンチセンスプライマーを用いてシーケンス反応を行うと、プラスミド由来の増幅産物では 37bp の挿入配列が確認されるので、容易にコンタミネーションの判定を行うことが可能であった。

リアルタイム RT-PCR に用いるプライマーおよび MGB プローブの選定

ダニにおける SFTS ウイルスを効率よく特異的に検出する為に、ウイルスゲノム L セグメントに対して 4 種類のプライマーと 2 種類の MGB プローブ、M セグメントに対しては 8 種類のプライマーと 2 種類の MGB プローブ、S セグメントに対しては 8 種類のプライマーと 4 種類の MGB プロー

ブを設計した。様々な組合せでプライマーおよび MGB プローブの特異性及び検出効率を検討するために、各セグメントの増幅領域を含む 520bp をプラスミドベクターに挿入し、リアルタイム RT-PCR 反応液に 10^6 コピー添加し増幅効率を検討した。この結果、S セグメントを標的としたプライマー・MGB プローブセットが最も検出効率が高く、次いで L セグメント (S セグメントに対する増幅効率最高値: 1/110)、M セグメント (S セグメントに対する増幅効率最高値: 1/396) を標的としたプライマー・MGB プローブセットだった。これらの S セグメントを標的としたプライマー・MGB プローブセットの中で、最も増幅効率と特異性の高かった SFTSV-S2-237s センスプライマー、SFTSV-S2-400a アンチセンスプライマー、SFTSV-S2-317MGB プローブの組合せをダニからの SFTS ウイルス検出用のリアルタイム RT-PCR に用いる事とした。

リアルタイム RT-PCR 法に用いる増幅試薬の選択

SFTS ウイルスを検出するためのリアルタイム RT-PCR 試薬は TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Takara) および RNA-direct Realtime PCR Master Mix (Toyobo) を各々の推奨反応条件に改編を加え施行した (図 5)。両試薬の性能比較検討を行うにあたり同一のプライマー (SFTS-S2-237s、SFTS-S2-400a) と 10^3 から 10^1 コピー/反応に段階希釈した陽性コントロール用プラスミドを用意し解析を行った (図 6)。この結果、TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit では確実に 10 コピーに希釈し

た陽性コントロールプラスミドを検出することができたが、40 サイクル以降で鋳型を添加していない陰性コントロールでも偽増幅が観察された。一方で、RNA-direct Realtime PCR Master Mix 場合には陰性コントロールの義増幅は観察されないが、10 コピーに希釈した陽性コントロールプラスミドで 1/3 の割合で増幅が見られなかった。これらの結果から RNA-direct Realtime PCR Master Mix はやや増幅効率は劣るが非特異増幅が見られない事から、ダニサンプルの SFTS ウイルス検出に適していると推測された。

D. 考察

マダニ媒介性の SFTS (重症熱性血小板症候群) は、2013 年初頭に国内の患者が初めて確認された新興ウイルス感染症である。SFTS 患者発生を受けて、このウイルスを持つ動物やウイルス感染を媒介するマダニの国内分布を調査する為の SFTS ウイルス検出用検査法の確立は急務であった。一般的にウイルス感染症の確定診断にはウイルス分離が必要であったが結果判定までに数日必要であることから、近年では PCR 法を利用してウイルス遺伝子を迅速に検出する事で数時間で検査結果が得られるようになった。それらの PCR 法の中でも各ウイルス遺伝子の極めて特徴的な塩基配列に相補するよう設計されたプライマーとプローブを組合せたりリアルタイム PCR は、信頼性と迅速性を兼ね備えた手法としてウイルス診断に汎用されつつある。SFTS 患者では血中のウイルス量が極めて高く、conventional RT-PCR で十分の感度で SFTS ウイルス遺伝子を検出できた。しかし、中国 CDC の

Porf. Mifang Liang、Porf. Li-Dexin らとの協議で、マダニのウイルス量は極めて低いことから、高感度で特異的なリアルタイム RT-PCR が必要であることが分かった。そこで、本研究では、マダニにおける SFTS ウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法の確立と、その際の陽性コントロールプラスミドの構築を目的とした。様々な検討の結果、RNA-direct Realtime PCR Master Mix (Toyobo) とウイルス特異的なプライマー・MGB プローブセット(表 1)を用いる事でダニが保持する SFTS ウイルスを迅速かつ特定の検出できる可能性を明らかにした。また、2 種類の制限酵素サイトと TaqMan プローブサイトを含む 37bp の DNA 断片を挿入した陽性コントロールプラスミドを用いればコンタミネーションが迅速かつ簡単に判定できる事を明らかにした。今後本研究で確立したプロトコルを用いて日本国内の SFTS 陽性ダニの種、ウイルス陽性率、個体あたりのウイルス量、ウイルス陽性ダニの季節性変動性、国内分布等を調査を行う。本リアルタイム RT-PCR 法は、複数の機器で非特異反応が全く出ないこと、高感度にマダニからの遺伝子検出ができることを確認しており、特に流行地などの地方衛研などでマダニの調査が可能になると考えられる。

E. 結論

2013 年に初めて患者が確認された SFTS の病原ウイルスを持つマダニを調査するための、SFTS ウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法を確立、改善した。陽性コントロールもコンタミが確認している系に改良された。今後のマダニの調査に有用である。

F. 健康危険情報

SFTS は、2013 年に国内で患者が確認され、その後さかのぼり調査で 12 名、2013 年 3 月からの患者が 40 名確認されている。国内では複数種のマダニから SFTS ウイルス遺伝子が検出されている。

1. 論文発表

- 1) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* 2013 Nov 14. in press
- 2) 下島昌幸、福士秀悦、谷 英樹、吉河智城、森川 茂、西條政幸：日本における重症熱性血小板減少症候群、ウイルス 63: 7-12, 2013.

- 3) 森川 茂：重症熱性血小板減少症候群、*獣医学雑誌* 17(2)142-143, 2014.

2. 学会発表

- 1) 前田健、高橋徹、奥田優、水谷哲也、山岸拓也、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスの分離・同定 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20~22 岐阜大学
- 2) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、井上智、今岡浩一、柳井徳磨、下島昌幸、西條政幸、前田健 動物の SFTS ウイルス抗体調査 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20~22 岐阜大学
- 3) Nguyen Dung、下田宙、濱崎千菜美、寺田農、野口慧多、鎌田流星、高野愛、森川茂、前田健 飼育犬から重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスと交差する抗体の検出 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20~22 岐阜大学
- 4) 谷口怜、福士秀悦、Joseph Masangkay、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからの SFTS ウイルスと交差する抗体の検出 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20~22 岐阜大学
- 5) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、安藤秀二、川端寛樹、高野愛、前田健、藤田博己、澤邊京子、西條政幸、森川茂 マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出

- 第 156 回日本獣医学会学術集会
2013.9.20～22 岐阜大学
- 6) 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、宇田晶彦、谷口怜、福間藍子、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の確定診断に使用されているコンベンショナル PCR の評価、及びリアルタイム定量 PCR との比較 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 7) 福間藍子、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、下島昌幸、森川茂、前田健、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の血清学的診断法の開発 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 8) 西條政幸、高橋徹、前田健、水谷哲也、大松勉、吉河智城、谷英樹、福士秀悦、下島昌幸、福間藍子、緒方もも子、鈴木忠樹、中島典子、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、山岸拓也、倉根一郎、森川茂 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された 11 名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 9) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、福間藍子、加来義浩、朴ウンシル、谷英樹、吉河智城、井上智、今岡浩一、下島昌幸、西條政幸、前田健 SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 10) 谷口怜、福士秀悦、Joseph Masangkay、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 11) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、井上智、安藤秀二、前田健、西條政幸、森川茂 マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 12) 谷英樹、下島昌幸、福間藍子、谷口怜、吉河智城、福士秀悦、森川茂、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP を外套したシュードタイプ VSV の作製 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 13) 高橋徹、亀井敏昭、前田健、水谷哲也、下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、森川茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠樹、永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大石和徳、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の日本における初症例 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 14) 前田健、濱崎千菜美、久保翔太郎、遠藤泰之、寺田農、鍬田流星、高野愛、下田宙、森川茂 国内飼育犬から重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスに対する抗体の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. 本研究で用いた合成オリゴ DNA のリスト

Primer & probe name	Sequence (5' ->3')
リアルタイム RT-PCR に用いたプライマーおよびプローブ (ウイルス増幅サイズ: 164 bp、陽性コントロールプラスミド: 201 bp)	
SFTSV-S2-237s	GCAACAAGATCGTCAAGGCATCAGG
SFTSV-S2-400a	TGCTGCAGCACATGTCCAAGTGG
SFTSV-S2-317MGB (FAM 標識)	CTGGTTGAGAGGGCA
PosiContTaqman (HEX 標 識)	CATCCTGCACCACCAACTGCTTAGCC
陽性コントロールプラスミド構築の為のプライマー (増幅サイズ: 520 bp)	
pSFTS-S-22s	GGAAAGACGCAAAGGAGTGATCATGTC
pSFTS-S-541a	CAGGGTCTTCGTTGTGGCTTCAG
陽性コントロールプラスミドに 37 bp の挿入配列を導入する為のプライマー	
pSFTS-S-mut-s	CGGCTAAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGATATCGGGTCTAAGAGGTTGATG
pSFTS-S-mut-a	CCAACTGCTTAGCCGGATCCAGAGTTTGACATTTTCCCTG

図 1. 陽性コントロールプラスミドに 37 bp の挿入配列を導入する為のプライマーの位置

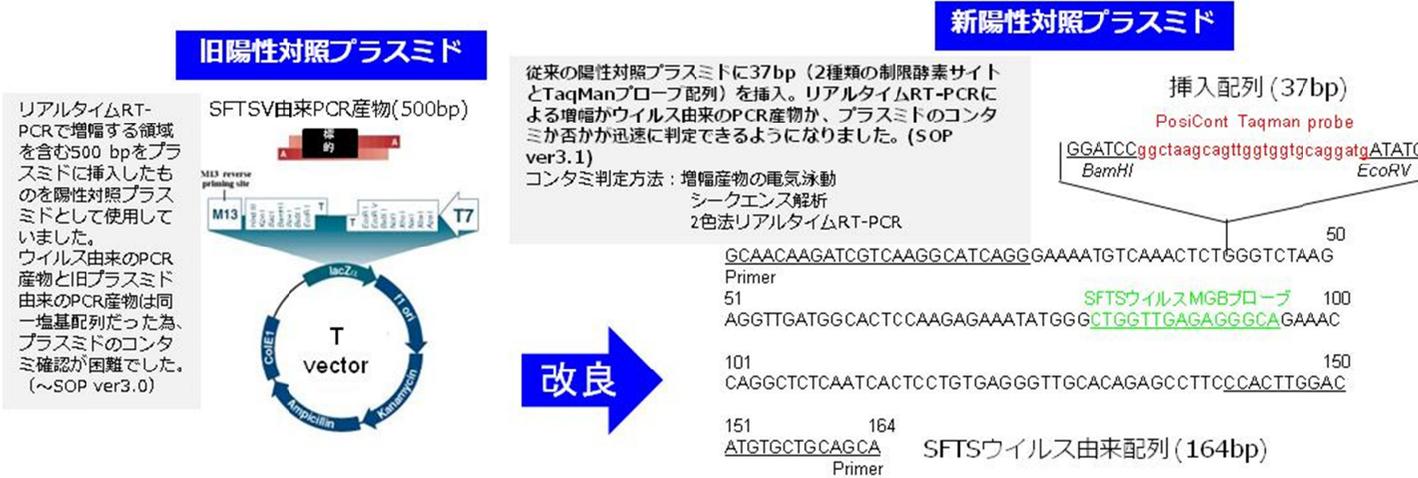
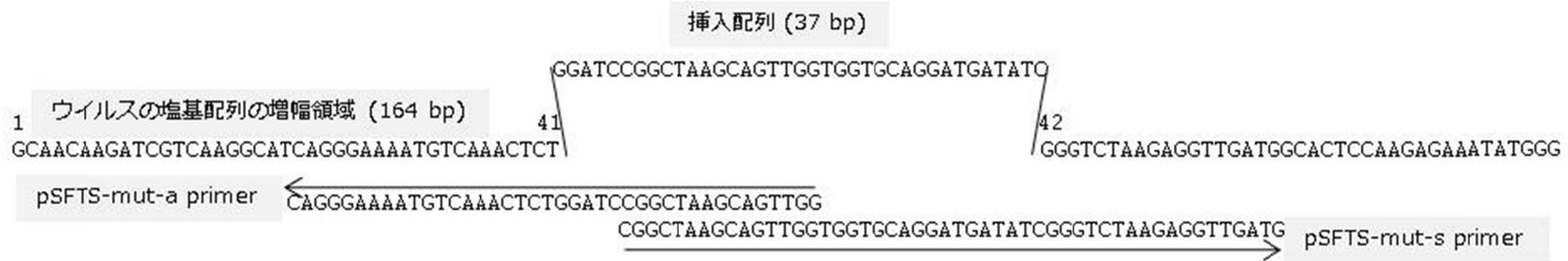


図 2. 陽性コントロールプラスミド構築の概要

図 3. 電気泳動を用いたコンタミネーションの判定

電気泳動を用いたコンタミ確認

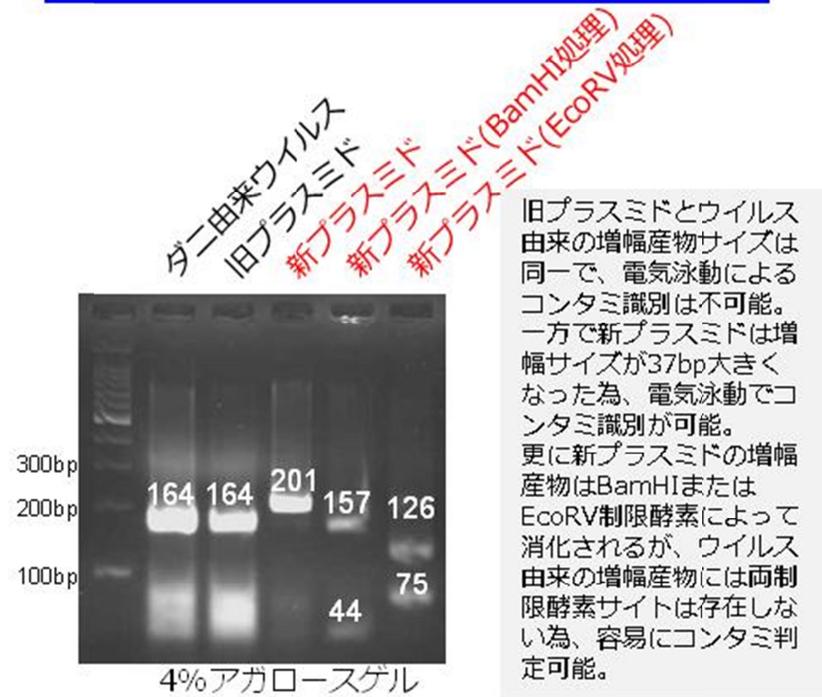
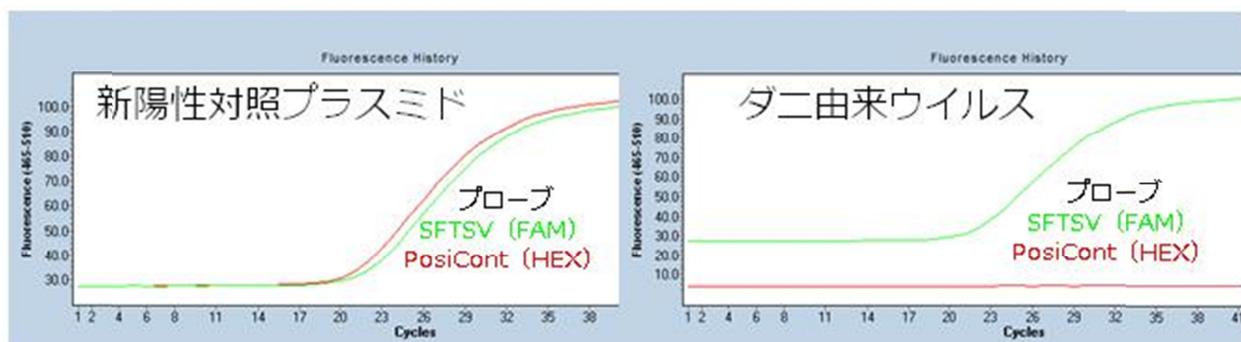


図 4. 2色リアルタイム RT-PCR 法を用いたコンタミネーションの判定

2色法を用いたコンタミ確認 (イメージ図)



新しい陽性対照プラスミドを用いたリアルタイムRT-PCR法では、従来の反応液にPosiCont Taqman probe (catcctgcaccaccaactgcttagcc; 蛍光色素HEXまたはVIC) を添加すれば増幅反応中にプラスミド由来のコンタミをモニタリング可能。

判定方法

- ・ウイルス特異的増幅では緑色のみ増幅が見られる。
- ・一方で新プラスミドがコンタミしていると赤と緑色の両方で増幅が見られる。

図 5. ダニからの SFTS ウイルス検出に用いたリアルタイム RT-PCR 用試薬と温度条件

Takara One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)			TOYOBO RNA-direct Realtime PCR Master Mix		
RT					
			Denature	90°C	30sec
RT	42°C	5min	RT	61°C	20min
Denature	95°C	10sec	Denature	95°C	30sec
PCR					
50 cycles			50 cycles		
Denature	95°C	5sec	Denature	95°C	5sec
Annealing & elongation	60°C	35sec	Annealing & elongation	64°C	60sec

図 6. リアルタイム RT-PCR 反応試薬の比較

