

研究成果の刊行物・別刷

第 7 版
化 学 便 覧

応用化学編

日本化学会
編

丸 善 出 版

6) Committee ISO/TC249 Traditional Chinese Medicine (provisional) (<http://www.iso/iso.org/livelink/livelink/open/tc249>)

参考文献

- 厚生労働省, 第16改正日本薬局方 (<http://jpdb.nihs.go.jp/jp16/>)
- 伊藤美千穂 編著, “生薬学へのいざない”, 京都廣川書店 (2009).
- Paul M Dewick 著, 海老塚豊 監訳, “医薬品天然物化学”, 南江堂 (2004).
- 高石喜久, 馬場きみ江, 本多義昭 編, “薬用植物学・生薬学テキスト”, 廣川書店 (2011).

16.7 その他の医薬品と関連物質

16.7.1 生物由来製品, 特定生物由来製品

血液製剤, ワクチン, 細胞培養/遺伝子組換え製剤, および細胞組織医療機器などは, 人その他の生物(植物を除く)の細胞, 組織などに由来する原料または材料を用いて製造される。これらの製品は, ① 未知の感染性因子を有している可能性を否定できない, ② 不特定多数の人や動物から採取されている場合, 感染因子混入のリスクが高い, ③ 感染因子の不活化処置などに限界がある場合がある, などをおもな特徴とする。これらの感染因子を伝播するおそれが完全には否定できないため, 平成14年, 改正薬事法において「生物由来製品」「特定生物由来製品」の概念が定義され, 平成15年7月より, その特性に応じた安全対策が講じられるようになった。

a. 生物由来製品

「生物由来製品」とは, 「人その他の生物(植物を除く)に由来するものを原料または材料として製造される医薬品, 医薬部外品, 化粧品または医療用具のうち, 保健衛生上特別の注意を要するものとして, 厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて指定するもの」と定義されてい

る(表16.17)。たとえば, ワクチン, トキソイド, 遺伝子組換え製剤, 動物成分抽出製剤, 尿由来製剤, 動物由来心臓弁, ヘパリンコーティングカテーテルなどがある(図16.138)。遺伝子組換え製剤であっても, 非病原性の細菌の培養により製する製剤(大腸菌や酵母由来の遺伝子組換え製剤), および, 動物成分抽出製剤であっても, 高度な加熱・化学処理などがなされているゼラチンなどや人獣共通感染症のおそれがない魚類由来コンドロイチン硫酸エステルなどは, 生物由来製品に該当しない。

生物由来製品を取り扱う製造者および医療機関・薬局, ならびに厚生労働大臣には, 安全性対策が求められている。製造販売業者には, 適切な表示が義務づけられており, 生物由来製品の直接の容器には, 白地, 黒枠, 枠囲い黒字をもって「生物」と表示し, 製造番号・記号を表示する。また, 予防的なBSE対策などによりプリオン病に対するリスクの蓋然性が低い場合, あるいは長期リスクの可能性に備えた対応のため, 原材料に応じて10または30年間の製造記録の保管, 並びに感染症定期報告が義務づけられる。厚生労働大臣は, 毎年度, 報告の状況について薬事・食品衛生審議会に報告し, 必要に応じて, 意見を聞いて必要な措置を講ずるとされている。医療機関・薬局は, 感染症が起こったときに厚生労働省に報告を行う必要がある。

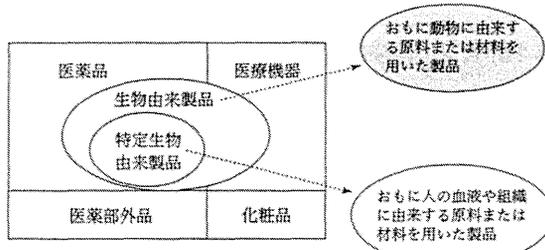


図16.138 生物由来製品及び特定生物由来製品の概念図 [厚生労働省ホームページより]

表16.17 生物由来製品および特定生物由来製品

	生物由来製品	特定生物由来製品
定義	人その他の生物(植物を除く)に由来するものを原料または材料として製造される医薬品, 医薬部外品, 化粧品または医療用具のうち, 保健衛生上特別の注意を要するものとして, 厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて指定するもの(薬事法第2条第5項)	生物由来製品のうち, 販売し, 賃貸し, または授与した後において当該生物由来製品による保健衛生上の危害の発生または拡大を防止するための措置を講ずることが必要なもの(薬事法第2条第6項)
製品例	ワクチン, トキソイド, 遺伝子組換え製剤, 動物成分抽出製剤, 動物由来心臓弁, ヘパリンコーティングカテーテルなど	輸血用血液製剤, 血液凝固因子, 人血清アルブミン, 人免疫グロブリン, 人胎盤由来抽出物など
製造販売者の役割	① 原材料の安全性確保・汚染防止など ② 人血液成分以外の成分に関する提供者・製造記録の保管10年・人血液成分を含む場合の人血液成分に関する記録の保管30年 ③ 適切な表示・情報提供・適正使用など ④ 感染症定期報告	① 原材料の安全性確保・汚染防止など ② 提供者・製造記録の保管30年 ③ 適切な表示・情報提供・適正使用など ④ 感染症定期報告 ⑤ 参考品の保存10年
医療機関・薬局の役割	① 感染等情報の報告	① 患者への適切な説明 ② 使用記録の作成と保管20年 ③ 感染等情報の報告
厚生労働大臣の役割	毎年度, 報告の状況について薬事・食品衛生審議会に報告し, 必要があると認めるときは, 意見を聞いて必要な措置を講ずる	

b. 特定生物由来製品

生物由来製品のなかでも、血液製剤や、人組織由来の医薬品などのように、感染症の発生リスクが理論的にも、かつ、経験的にも高いものは「特定生物由来製品」として位置づけられる。具体的には、輸血用血液製剤、血液凝固因子、人血清アルブミン、人免疫グロブリンのような血液製剤や、人胎盤抽出物などがある。遺伝子組換え製剤であっても、製造工程や製剤の添加物に人由来原料が使用されている製剤は特定生物由来製品に該当する。

特定生物由来製品には、生物由来製品よりも厳しい安全対策が要求される。承認取得者には、提供者・製造記録の保管30年、適切な表示、情報提供、適正使用、感染症定期報告および参考品の保存10年が求められる。特定生物由来製品の直接容器には、白地、黒枠、黒囲い文字による「特生物」のラベルと、製造番号・記号が表示される。また、原料となる血液の採血国や採血方法として「献血」または「非献血」が表示される。医療機関および薬局は、特定生物由来製品を使用するさいに、製品のリスクとベネフィットについて患者（またはその家族）に説明を行い、理解を得るようにする必要がある。さらに、特定生物由来製品を使用した場合の情報（製品名、製造番号、患者の氏名・住所、投与日）を記録し、医療機関で少なくとも20年間保管することが義務づけられている。（川崎ナナ）

■ 16.7.2 希少疾病用医薬品

難病、エイズなどを対象とする医薬品は医療上の必要性が高いにもかかわらず、患者数が少なく、その研究開発を円滑に進めることが困難であること、また、医療をめぐる国民のニーズは多様化し、安全かつ良質な医薬品を1日も早く医療の現場に提供することがいっそう求められていることから、一定の条件を有する医薬品を希少疾病用医薬品（オーファンドラッグ）とし、試験研究を促進するための特別の支援措置が講じられている。下記に、指定基準および

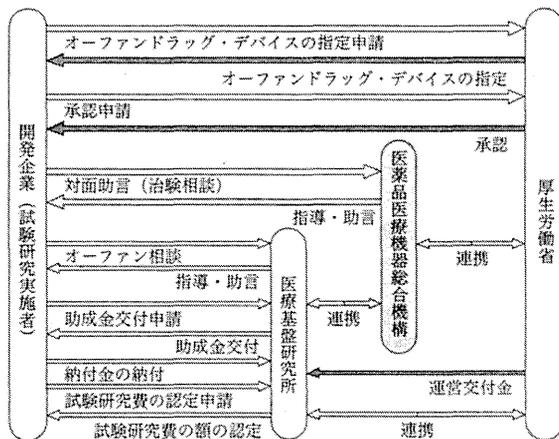


図 16.139 オーファン制度に係る組織

本制度は医療機器も対象としているため、オーファンデバイスも含めて記載

[厚生労働省ホームページより]

支援措置の概略を示すとともに、図 16.139 に本制度概要を示す。

a. 希少疾病用医薬品の指定基準

(i) 対象者数 当該医薬品の用途に係る対象者数が、本邦において5万人未満であること。

(ii) 医療上の必要性 難病等重篤な疾病を対象とするとともに、次のいずれかに該当するなど、とくに医療上の必要性が高いものであること。

- ・代替する適切な医薬品または治療法がないこと。
- ・既存の医薬品と比較して著しく高い有効性または安全性が期待されること。

(iii) 開発の可能性 対象疾病に対して当該医薬品を使用する理論的根拠があるとともに、その開発に係る計画が妥当であると認められること。

b. 支援措置について

(i) 助成金の交付 希少疾病用医薬品の開発に係る経費の負担を軽減するため、医薬基盤研究所を通じて助成金の交付を受けることができる。

(ii) 指導・助言 希少疾病用医薬品に関する試験研究について厚生労働省、医薬品医療機器総合機構および医薬基盤研究所による指導・助言を受けることができる。

(iii) 税制措置 医薬基盤研究所からの助成金の交付対象期間に行う試験研究に係る費用のうち、希少疾病用医薬品に係る試験研究費総額(医薬基盤研究所の助成金を除く)の12%を税額控除額として算定できる。

(iv) 優先審査 希少疾病用医薬品に指定されたものについては、できるだけ早く医療の現場に提供できるように、他の医薬品に優先して承認審査がなされる。通常品目と比べて承認審査に係る手数料が減額される。

(v) 再審査期間の延長 希少疾病用医薬品に指定され、承認された医薬品は再審査期間が最長10年間に延長される。

希少疾病用医薬品は、企業からの希少疾病用医薬品の指定申請に基づき、指定基準に合致するものを薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて厚生労働大臣が指定する。

表 16.18 に平成23年度に指定を受けた希少疾病用医薬品の一覧を示す。（奥田晴宏）

■ 16.7.3 医療用医薬品、一般用医薬品、薬局医薬品、医薬部外品

医薬品は、有効性、安全性および品質に関するリスクに応じて、規制されている。医薬品を規制の観点から医療用医薬品、一般用医薬品、薬局製造販売薬品(薬局製剤)に大別することができる。

a. 医療用医薬品と一般用医薬品

医療用医薬品は、医師もしくは歯科医師によって使用されるか、またはこれらの者の処方せんもしくは指示によって使用されることを目的として供給される医薬品である。それに対して、一般用医薬品は、その効能および効果において人体に対する作用が著しくないのであって、薬剤師

表 16.18 平成 23 年度に指定を受けた希少疾病用医薬品

指定年月日	指定を受けた医薬品	指定を受けた予定される効能、効果または対象疾病	製造販売承認を受けた効能または効果
H23.1.28	crizotinib	ALK 融合遺伝子陽性の進行非小細胞肺癌	ALK 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌
H23.3.9	スチリベントール	クロバザムおよびバルプロ酸ナトリウムでは発作を十分にコントロールできない乳児重症ミオクロニーてんかん(Dravet 症候群)患者の間代発作および強直間代発作の補助療法、クロバザムおよびバルプロ酸ナトリウムと併用する。	クロバザムおよびバルプロ酸ナトリウムで十分な効果が認められない Dravet 症候群患者における間代発作または強直間代発作に対するクロバザムおよびバルプロ酸ナトリウムとの併用療法
H23.3.9	アポモルヒネ塩酸塩水和物	通常の薬物療法で十分な効果が得られないパーキンソン病における症状の日内変動に対するレスキュー療法	パーキンソン病におけるオフ症状の改善(レボドパ含有製剤の頻回投与および他の抗パーキンソン病薬の増量などを行っても十分に効果が得られない場合)
H23.3.9	Genz-112638	ゴーシェ病 1 型	—*
H23.3.9	ミグルスタット	ニーマン・ピック病 C 型	ニーマン・ピック病 C 型
H23.5.13	Velaglucerase alfa	ゴーシェ病の諸症状(貧血、血小板減少症、肝脾腫および骨症状)の改善	指定取消(H 25.4.4)
H23.6.10	ドルナーゼ アルファ(遺伝子組換え)	嚢胞性線維症における肺機能の改善	嚢胞性線維症における肺機能の改善
H23.6.10	トラベクテジン	染色体転座を伴う悪性軟部腫瘍	—*
H23.6.10	スニチニブリンゴ酸塩	根治切除不能な膵内分泌腫瘍	脳神経内分泌腫瘍
H23.6.10	ルフィナミド	Lennox-Gastaut 症候群(4 歳以上)における強直発作および脱力発作に対する抗てんかん薬との併用療法	他の抗てんかん薬で十分な効果が認められない Lennox-Gastaut 症候群における強直発作および脱力発作に対する抗てんかん薬との併用療法
H23.8.8	カフェインクエン酸塩	早産・低出生体重児における原発性無呼吸(未熟児無呼吸発作)	—*
H23.9.8	ruxolitinib	骨髄線維症	—*
H23.9.8	オフアツムマブ(遺伝子組換え)	慢性リンパ性白血病	再発または難治性の CD20 陽性の慢性リンパ性白血病
H23.9.8	テトラベナジン	ハンチントン病に伴う舞踏運動	ハンチントン病に伴う舞踏運動
H23.9.8	リオシグアト	慢性血栓塞栓性肺高血圧症	—*
H23.9.8	ヘミン	急性ポルフィリン症の発作	急性ポルフィリン症患者における急性発作症状の改善
H23.9.8	BIBF 1120	特発性肺線維症	—*
H23.11.16	リルビリン塩酸塩	HIV-1 感染症	HIV-1 感染症
H23.11.16	ストレプトゾシン	膵・消化管神経内分泌腫瘍	—*
H23.11.16	パゾパニブ塩酸塩	進行性悪性軟部腫瘍	悪性軟部腫瘍
H23.12.14	エベロリムス	結節性硬化症	結節性硬化症に伴う腎血管筋脂肪腫(錠剤製剤のみ) 結節性硬化症に伴う上下大巨細胞性星細胞腫
H23.12.14	tafamidis meglumine	トランスサイレチンアミロイドポリニューロパチー(家族性アミロイドポリニューロパチー)	—*
H23.12.14	サリドマイド	らい性結節性紅斑	らい性結節性紅斑
H23.12.14	イマチニブメシル酸塩	FIP1L1-PDGFR α 陽性の下記疾患 好酸球増多症候群, 慢性好酸球性白血病	FIP1L1-PDGFR α 陽性の下記疾患 好酸球増多症候群, 慢性好酸球性白血病

* 開発中、[(独)医薬基盤研究所ホームページより抜粋(一部改変)]

その他の医薬関係者から提供された情報に基づく需要者の選択により使用されることを目的とする医薬品である。したがって、医療用医薬品の多くは、販売授受に際して、医師の処方せんを必要とする処方せん薬であるが、一般用医薬品は、需要者が自らの判断で使用する医薬品であって、安全性を確保できる成分が配合されている場合が多い。一般用医薬品はそのリスクの程度に応じて第 1 類から第 3 類までに分類される。

b. 薬局製造販売医薬品

薬局製造販売医薬品(薬局製剤)は、薬局開設者が当該薬局における設備および器具をもって製造し、当該薬局において直接需要者に販売し、または授与する医薬品であって、厚生労働大臣の指定する有効成分以外の有効成分を含有し

ない医薬品である(承認を要する 385 品目および承認不要の 9 品目の合わせて 394 品目が指定されている)。

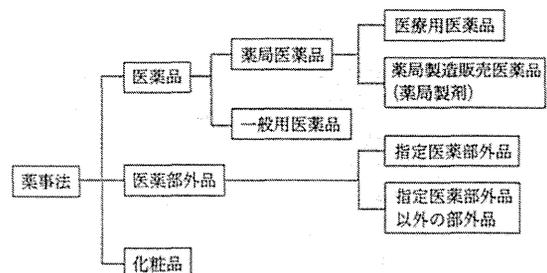


図 16.140 医薬品の分類

表 16.19 薬局医薬品販売・授与時における情報提供

書面で説明すべき事項
・当該医薬品の名称
・当該医薬品の有効成分の名称(一般的名称があるものにあつては、その一般的名称、以下同じ)およびその分量(有効成分が不明のものにあつては、その本質および製造方法の要旨、以下同じ)
・当該医薬品の用法および用量
・当該医薬品の効能または効果
・当該医薬品に係る使用上の注意のうち、保健衛生上の危害の発生を防止するために必要な事項
・その他当該医薬品を販売し、または授与する薬剤師がその適正な使用のために必要と判断する事項

医療用医薬品と薬局製剤を合わせて、薬局医薬品と呼称される(図 16.140)。薬局医薬品に関しては、薬剤師による対面販売・授与と適正な使用のために必要な文書による情報提供が必要である。情報提供すべき内容を表 16.19 に示す。また、調剤室以外の場所に貯蔵し、または陳列してはならないことが定められている。

c. 医薬部外品

医薬部外品とは、薬事法では人体に対する作用が緩和なものであつて、以下の目的のために使用される薬物あるいはネズミ、ハエ、蚊、ノミなどの駆除に用いられるものとされていたが、規制緩和をはかるため、厚生労働大臣が指定するものとして 27 種の用途に供する薬物が追加された。

- ・吐きけその他の不快感または口臭もしくは体臭の防止
- ・あせも、ただれなどの防止
- ・脱毛の防止、育毛または除毛 (奥田晴宏)

■ 16.7.4 麻薬・向精神薬、覚せい剤・覚せい剤原料、指定薬物、習慣性医薬品

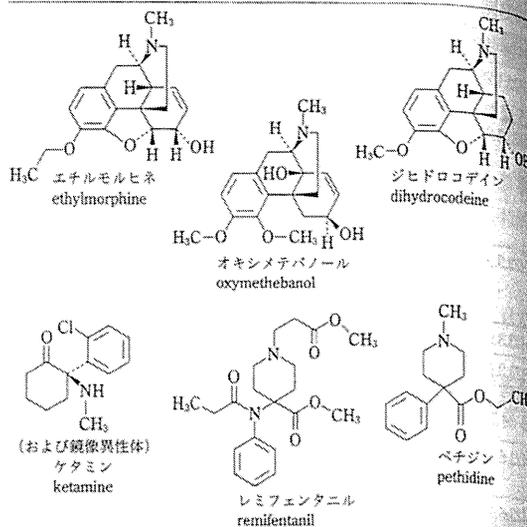
a. 麻薬

麻薬とは、あへんやあへんアルカロイドおよびその誘導体のうち、著しい精神および身体依存性を有する強力な鎮痛作用を有する薬物を指す用語として用いられていた。最近、これらの薬物と類似の作用を示す合成あるいは天然の薬物も含めて麻薬とよばれる。

これら麻薬は、「麻薬及び向精神薬取締り法」により、厳重な取締りの対象となっている。同法においては、モルヒネおよびその塩類、ジアセチルモルヒネ(別号ヘロイン)、コデイン、エチルモルヒネその他モルヒネのエーテルおよびその塩類その他モルヒネのエステルおよびその塩類、コカインその他エクゴニンのエステルおよびその塩類等多数の薬物が麻薬として指定(これらを含む物を含む、ただし、1%以下のコデイン、ジヒドロコデインまたはこれらの塩類を除く)されている。図 16.141 に日本で医薬品として流通している麻薬の例を示す。

b. 向精神薬

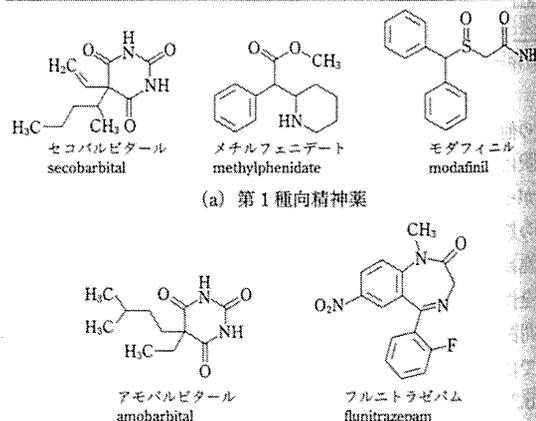
向精神薬は、「麻薬及び向精神薬取締り法」で取締りの対象になっている。中枢神経に作用して精神機能に影響を及ぼし、濫用のおそれのある薬物である。濫用や有害作用発現のリスクは麻薬や覚せい剤よりも低いとされ、濫用のリ



モルヒネ、コデイン、オキシコドン、フェンタニル[構造式: 図 16.33 参照]、コカイン[構造式: 図 16.136 参照]

図 16.141 麻薬の構造式

スクと治療上の有用性に於いて第 1 種から第 3 種の 3 種類に分類されている。第 1 種および第 2 種向精神薬に関しては、譲り受け、譲り渡し、または廃棄したときは、記録することが必要である。また輸出入に関して、第 1 種向精神薬に関してはそのつど許可を得ることが、第 2 種向精神薬に関してはそのつど届け出が必要である。鎮咳、鎮痛、中枢抑制あるいは興奮、抗てんかん、食欲抑制などの薬理作用を示し、医薬品として市販されている薬物も多い。日本で流通している第 1 種向精神薬にはセコバルビタール、メチルフェニデートおよびモダフィニルが、第 2 種向精神薬にはアモバルビタール、ブプレノルフィン、フルニトラゼパム、ペンタゾシンおよびペントバルビタールなどがある。図 16.142 に構造式を示す。



(a) 第 1 種向精神薬

(b) 第 2 種向精神薬

ブプレノルフィン、ペンタゾシン[構造式: 図 16.33 参照]、ペントバルビタール[構造式: 図 16.32 参照]

図 16.142 向精神薬構造式

用医薬品に対しては、対象動物や使用時期その他使用者が遵守すべき事項が定められていることである。

抗生剤、合成抗菌剤、寄生虫駆除剤などの動物用医薬品が対象となっており、使用方法、使用量、使用禁止期間な

どの使用基準が定められている。

また食品衛生法で食品中の残留基準が定められており、残留基準値を超えて医薬品が残留した場合、回収や廃棄の対象となる。

(奥田晴宏)

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、実践編-15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

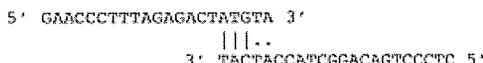
デザインソフトを使用してプライマーをデザインする（表）。いずれも以下の点を考慮して選択またはデザインする。③のプライマーダイマー形成の可能性については、図1の3種類について考慮する必要がある。

- 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	有償/無償	特徴など
プライマーダイマーチェック			
PrimerDimerCheck	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	お馴染みのソフト。一度に100セットまで

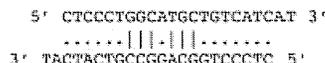
A 3'-ダイマー



プライマー同士の3'側が相補鎖になっている場合、これによりプライマーを鋳型にした増幅が起こる可能性がある

「 $> -2 \Delta G$ (kcal · mole⁻¹)」

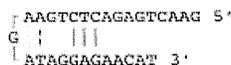
B Overall ダイマー(プライマー類全体)



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

「 $> -6 \Delta G$ (kcal · mole⁻¹)」

Cヘアピン形成



プライマー自身を鋳型にした形成、同一プライマー内に3'鎖と相補鎖があるとそれを鋳型にして伸長増幅する

「 $> -3 \Delta G$ (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 genome + 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フローブ検出用にある程度必要のため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PrimerDimerCheck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)。

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活用の目的とポイント

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、健康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対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

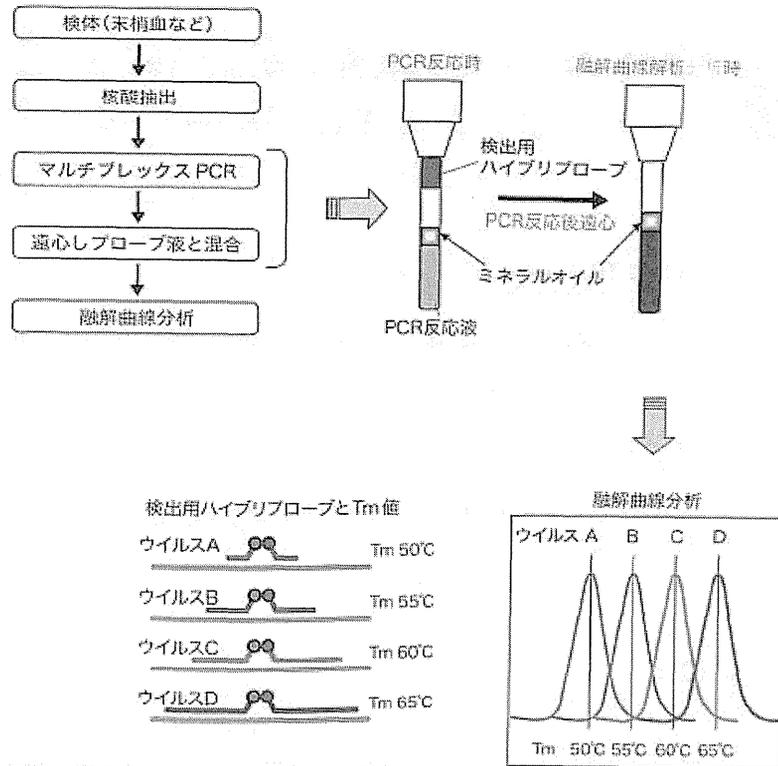


図1 複数ウイルスの迅速検査系の概略

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℃であり、プローブ同士のTm値の差が3℃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LeRed640, 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度は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。
- サンプル (検体) DNA 約1 μ g
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、ハイブリフロー[®] *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
A セ ット	単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus : HSV-1, HSV-2)
	水痘・帯状疱疹ウイルス (Varicella-Zoster virus : VZV)
	パルボウイルスB19 (Parvovirus B19 : B19)
	ヒトヘルペスウイルス6型 (Human Herpes Virus type 6 : HHV-6)
	サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus : CMV)
B セ ット	BKウイルス (BKV), JCウイルス (JCV)
	EBウイルス (Epstein-Barr virus : EBV)
	ヒトヘルペスウイルス7型 (Human Herpes Virus type 7 : HHV-7)
	ヒトヘルペスウイルス8型 (Human Herpes Virus type 8 : HHV-8)
	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、フローフ配列は参考文献1、2を参照

- LightCycler[®] Capillaries (20 μ L)
- LightCycler[®] Centrifuge Adapters
あらかじめ4°Cで冷却しておく。
- LightCycler[®] 2.0 Sample Carousel (20 μ L)
- 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

④ プライマーミックスの作製

各プライマーセットを混合L 10×濃度に調製しておく。

HSV primer F ^{1,2}	20 μ L
HSV primer R	20 μ L
CMV primer F	80 μ L

CMV primer R	80 μ L
HIV6 primer F	40 μ L
HIV6 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。

⑥ ハイブリブローブミックスを5 μLずつ入れる

各FITC標識ブローブおよび各LcRed標識ブローブを各0.02 pmol/μLに調製する。

< Aセットブローブの場合 >

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

*5 各ブローブは100 pmol/μLに調製したものをを用いる

⑦ 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。

⑧ マルチプレックスPCRの実行

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

3. 融解曲線分析, 判定

⑨ 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>		温度変化速度 (°C/s)	データ取得 タイミング	TOTAL 10分
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	
↓				
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。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
	705 (F3)	HSV-2	69.5
		HHV-6	53.5
		CMV	60
B	640 (F2)	IC(β -globin)	51
		EBV	64
	705 (F3)	HHV-7	55
		HHV-8	62.5
		HBV	66

F1 : FITC
F2 : LcRed 640
F3 : LcRed 705

B

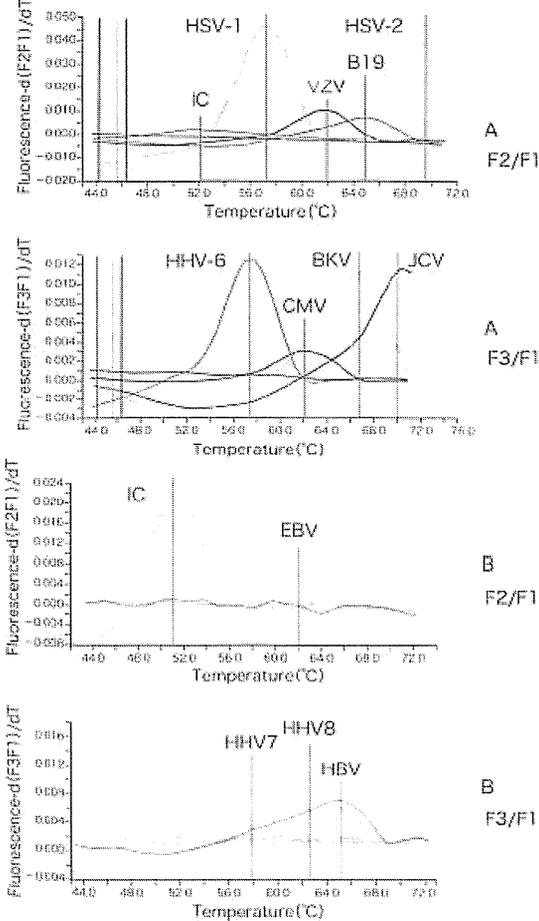


図2 標準DNAを用いたウイルス
A, Bセット2本の検出結果

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

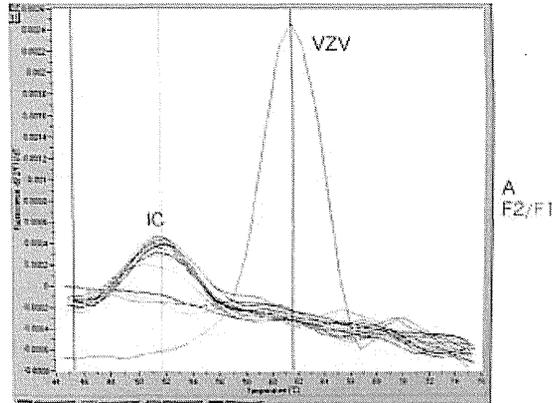


図3 複数の検体の1つからVZVが検出された例

を行うことが望ましい。

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、安定化剤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