

博士論文

フラップエンドヌクレアーゼによる
三重鎖核酸修復機構を利用した感染症
ならびに造血器腫瘍診断法の基盤構築
とその技術応用

令和 3 年 6 月

田所 健一

フラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構を利用した感染症ならびに造血器腫瘍診断法の基盤構築とその技術応用

ページ

緒言 6

第 I 章. フラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構を利用した定性解析

1. HBV 遺伝子型判定法の確立 8

(1) 緒言

(2) 方法

(3) 結果

(4) 考察

2. HBV 薬剤耐性変異の検出 27

(1) 緒言

(2) 方法

(3) 結果

(4) 考察

第 II 章. フラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構を利用した定量解析

1. *BCR/ABL* キメラ mRNA に認められる *ABL* 遺伝子キナーゼドメインアミノ酸 315 変異 (Threonine → Isoleucine) の相対比率算出による治療効果予測法の開発 (蛍光強度比を用いた簡易定量法) 42

(1) 緒言

(2) 方法

(3) 結果

(4) 考察

2. 広範囲なダイナミックレンジを有するリアルタイムモニタリング定量法の開発 58

(1) 緒言

(2) 方法

(3) 結果

(4) 考察

	ページ
3. リアルタイムモニタリング定量法を用いたハイリスク HPV14 遺伝子型の 相対定量解析による子宮頸がんリスク評価方法の開発	68
(1) 緒言	
(2) 方法	
(3) 結果	
(4) 考察	
4. リアルタイムモニタリング定量法を用いた歯周病菌の定量解析による 歯周病リスク判定法の開発	83
(1) 緒言	
(2) 方法	
(3) 結果	
(4) 考察	
5. リアルタイムモニタリング定量法を用いた HCV コア領域アミノ酸 70・91 変異の相対定量解析による肝発がんリスク評価方法の開発	92
(1) 緒言	
(2) 方法	
(3) 結果	
(4) 考察	
総括	106
フラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構による核酸の定性および 定量的遺伝子検出法の医療診断分野における基盤構築とその技術応用	
謝辞	110
引用文献	111

略号一覧

DNA : デオキシリボ核酸

RNA : リボ核酸

EGFR : epidermal growth factor receptor (上皮成長因子受容体)

FLT3 : Fms -Like Tyrosine Kinase 3

PCR : polymerase chain reaction

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (制限酵素断片長多型)

SNP : Single nucleotide polymorphism (一塩基多型)

GWAS : Genome Wide Association Study (ゲノムワイド関連解析)

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer (蛍光共鳴エネルギー移動)

RT : reverse transcriptase (逆転写)

HPV : Human papillomavirus (ヒトパピローマウイルス)

EIA : Enzyme Immunosolvent Assay

GSPA : Genotype-Specific Probe Assay

T.W.T. : Third Wave Technologies, Inc.

FAM 蛍光 : fluorescein 蛍光

RED 蛍光 : Redmond RED 蛍光

FOZ : Fold over zero

BCR/ABL : Breakpoint cluster region-Abelson

ASO-PCR : allele-specific oligonucleotide PCR

NCBI : National Center for Biotechnology Information

SurePath : 婦人科系細胞保存液

IL-6 : Interleukin-6

SOCS3 : Suppressor of cytokine signaling 3

使用機器一覧

- ・ PCR
 - GeneAMP PCRsystem9700 (アプライドバイオシステムズ)
- ・ 等温反応
 - ブロックインキュベーターBI-535 (アステック)
- ・ 蛍光測定
 - Cytoflour 4000 (アプライドバイオシステムズ)
 - 200-FL/T-ABS fluorescence plate reader (TECAN)
- ・ キャピラリー電気泳動装置
 - MultiNA マイクロチップ電気泳動システム (島津製作所)
- ・ キャピラリーシークエンサー
 - Model 3130 fluorescent DNA sequencer (アプライドバイオシステムズ)
- ・ リアルタイム PCR
 - LightCycler 480 (ロシュ・ダイアグノスティクス)

緒言

1940年代にそれまでタンパク質のみで構成されていると考えられていた遺伝子の本体が核酸（DNAあるいはRNA）であることが報告された（6）。1950年代にはDNAの構造が二重らせんであることも明らかとなり（93）、研究は急速に進んでいった。

血液や唾液などから細胞を採取して遺伝子情報を読み取ることは医療の分野にも大きく貢献しており、遺伝子検査は様々な検査分野と密接に関わりあってきた（101）。遺伝子検査は大きく①遺伝性疾患や出生前診断といった生殖細胞系列遺伝子検査、②肺癌におけるEGFR遺伝子変異や造血器腫瘍におけるFLT3遺伝子変異などの体細胞遺伝子検査、③外来生物の病原体の遺伝子を検出する感染症遺伝子検査の3つに分類される。

遺伝子検査の手法としては、まず相補的な配列を持つプローブを用いて制限酵素などで処理されたDNA断片を検出するサザンブロットハイブリダイゼーションなどの核酸プローブ法が用いられた（11）。1980年代に入り、DNAをコピーし大量の特定標的DNAを合成する方法としてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）が報告された（53）。PCRは、高温に耐性を持つDNAポリメラーゼ（Taqポリメラーゼ）の発見と冷却と加温を迅速に行える測定機器（サーマルサイクラー）の開発により世界的に広まっていった（10）。さらにPCRとプローブハイブリダイゼーションを組み合わせたリアルタイムPCR（25）、プライマーの特異性を利用した点突然変異の検出（102）、PCRと制限酵素切断を組み合わせたPCR-RFLP（56）、PCR産物を鋳型として直接塩基配列を決定するダイレクトシーケンス法（70）など、多様なPCRベースの検査法が普及していった。

1990年代にはいつてダイレクトシーケンス法によりヒトゲノムの全塩基配列の解析が広く行われた結果、ヒトゲノム上には一塩基多型（SNP）と呼ばれる一塩基が変異した多様性がみられることが明らかになった（16）。SNPは遺伝的背景を調べるためのDNAマーカーとして利用することができ（16）、一部の遺伝病における将来的な危険率の診断にも用いることができる（16）。また、疾患関連遺伝子の特定にSNPを利用したゲノムワイド関連解析（GWAS）を用いた研究も行われている（39）。SNPを検出するための方法としては、以前は制限酵素を用いたPCR-RFLP法が用いられていたが、この方法は煩雑な操作を要する、時間が掛かるなどの大量の検体を測定するには不向きな点もあった。そのため、SNPの正確かつ簡便な検出法が求められるようになり、汎用性の高い方法として二重標識プローブを用いたリアルタイムPCR（24）やパイロシーケンス法（62）が開発された。そのなかのひとつがフラップエンドヌクレアーゼの三重鎖修復機構を利用したインバーダー法（47）である。

インバーダー法はフラップエンドヌクレアーゼによる二つの反応で構成される。一次反応では、標的となるDNA配列、相補的な配列を持つインバーダーオリゴおよびプライマリープローブで形成される3重鎖部分（切断点）をフラップエンドヌクレアーゼが切断し、プライマリープローブの5'-末端にあるフラップ配列が遊離する。遊離したフラップ配

列は相補配列を持ち蛍光色素とクエンチャー色素を二重標識している FRET カセットに結合する。これにより二次反応が起こりフラップ配列と FRET カセットにより形成された 3 重鎖はフラップエンドヌクレアーゼに切断され、蛍光色素が遊離する (図 1)。インバーダー法の特徴としては①切断点に SNP を設定し、2 種類のプライマリープローブと FRET カセットを用いることで多型解析を行える ②一次反応、二次反応ともに等温反応であるため、サーマルサイクラーなど的高額機器を必要としない ③すべての反応に共通の FRET カセットを使用するため試薬コストがかからない、の 3 点があげられる。

本論文ではこのヒトの生殖細胞系列検査 (SNP 解析) のために開発されたインバーダー法を体細胞遺伝子検査および感染症遺伝子検査に応用することを目指した。

第 I 章-1 は HBV 遺伝子型判定法の確立 (80)、第 I 章-2 では HBV ポリメラーゼ RT ドメインにおける薬剤耐性関連変異 (L180M、A181G/S/T/V、T184A/C/F/G/I/L/M/S、S202C/G/I、M204I/V、M250I/L/V) を検出する HBV 薬剤耐性変異検出法 (81)、第 II 章-1 では蛍光強度比を用いた簡易定量法による *BCR/ABL* キメラ mRNA *ABL* 遺伝子キナーゼドメインアミノ酸 315 変異 (Threonine → Isoleucine) の相対比率算出による治療効果予測法 (82)、第 II 章-2 ではリアルタイム PCR とインバーダー反応を組み合わせた広範囲なダイナミックレンジを有するリアルタイムモニタリング定量法の開発 (83)、第 II 章-3 では“リアルタイムモニタリング定量法”を用いたハイリスク HPV14 遺伝子型の相対定量解析による子宮頸がんリスク評価方法の開発 (84)、第 II 章-4 では Red complex を含む 6 菌種の歯周病関連菌のリアルタイムモニタリング定量法を用いた定量解析 (85)、第 II 章-5 ではリアルタイムモニタリング定量法を用いた C 型肝炎ウイルス (HCV) コア領域アミノ酸 70・91 変異の相対定量解析による肝発がんリスク評価方法 (86) について述べた。

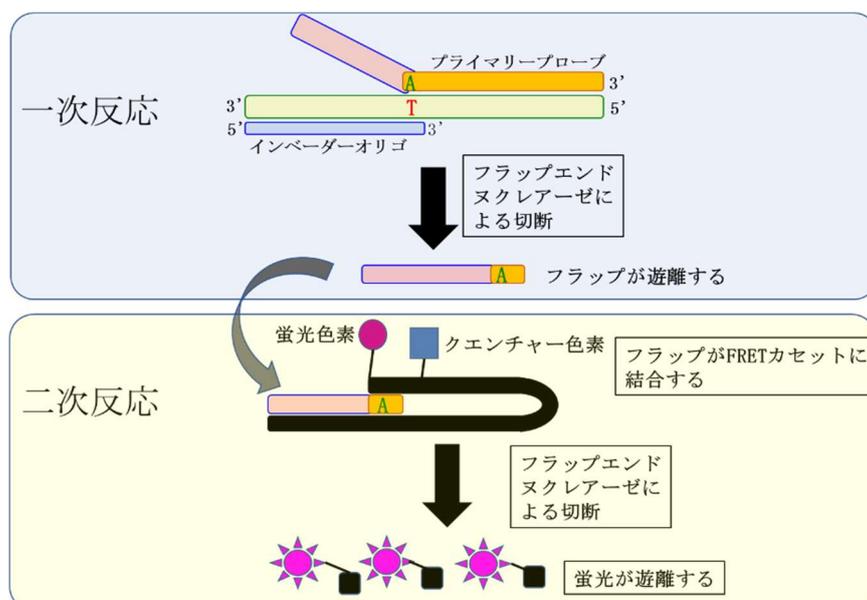


図 1. インバーダー法の原理

第 I 章. フラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構を利用した定性解析

第 I 章-1. HBV 遺伝子型判定法の確立

(1) 緒言

Hepatitis B virus (HBV) 持続感染者は全世界で約 4 億人と報告されている (28)。HBV は慢性肝炎、肝硬変および肝がんの主たる病因のひとつであり、その重篤な病状と感染性は世界的に問題となっている (48)。HBV は 8%以上の配列の違いから大きく 8 つの遺伝子型 (A-H) に分類されており (63)、その遺伝子型は特徴的な地理的分布をみせている。ヨーロッパ、アフリカおよびアメリカでは A 型と D 型が優位であり、東アジアでは B 型と C 型が優位となっている。日本では東北と沖縄を除き 90%以上が C 型である (65)。HBV ではいくつかの亜型も報告されている。B 型では 2 つの亜型が報告されており、日本を除くアジアに分布している Ba 型はリコンビネーションによりコア領域の配列は C 型に近似している (76)。日本で検出される B 型は Bj 型として分類されている (76)。A 型についても 2 つの亜型が定義されている (35)。Ae 型はヨーロッパに多く分布し、Aa 型はアジア・アフリカで一般的である (35)。各遺伝子型の臨床的な相違についても研究が進められている。日本における研究では HBV 感染の最終像である肝がんの発症率で遺伝子型間の違いを比較すると、統計学的に有意に C 型に多く、B 型に少ない傾向が認められ、発症年齢も C 型では平均 50 歳代、B 型では平均 70 歳代、と有意差がある。Bj 型では HBe 抗体陽性率が高いのに対して Ba 型では HBe 抗原陽性率が高いことが報告されている (30)。また、Ba 型は薬剤耐性変異として報告されている RT 領域 204 番目のアミノ酸がメチオニンからバリンもしくはイソロイシンに置換する YMDD 変異が起りやすく、ブレークスルーを起こしやすいことも報告されている (32)。増加傾向にある A 型については急性肝炎から速やかに慢性肝炎に移行することが報告されている (31)。台湾では、B 型と 50 歳以下の世代における肝がんの急激な進行において統計学的に有意な関連が報告されている (27)。

これらの疫学的および臨床的研究から HBV の遺伝子型を明確にすることが重要であり、簡便かつ確実な遺伝子型診断方法が求められている。HBV-DNA のシーケンスや Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) が主流であったが、煩雑であること、コストが高いことが主因となり、恒常的に実施するには難点がある。

本章では、ヒトゲノムにおける一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism ; SNP) をタイピングするために開発されたフラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構 (インバーダー法) を利用した HBV 遺伝子型判定法の構築について検討した。HBV のコ

ア領域および preS / S 領域を PCR 増幅し、合計 12 カ所の特徴的な塩基配列をクリベージポイント（フラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構における切断点）に選り取り HBV の遺伝子型および亜型である Aa, Ae, Ba, Bj, C, D, E, F, G および H 型を正確に判別することを可能にした。

(2) 方法

・材料

HBV 遺伝子型判定の検討には、虎の門病院分院（神奈川）にて B 型慢性肝炎と診断された患者から採取され、解析に使用するまで -80℃ で凍結保存されていた 505 例の血清検体を用いた（倫理委員会承認番号 2003-39）。

・ Enzyme Immunosolvent Assay および Genotype-Specific Probe Assay を用いた HBV genotype の測定

市販されている Enzyme Immunosolvent Assay (EIA) 法による HBV ゲノタイプ判定用キット (HBV genotype EIA) (Institute of Immunology) および DNA プローブ (Genotype-Specific Probe Assay ; GSPA) 法による HBV ゲノタイプ判定用キット (Genome Science Laboratories) を用いて HBV 遺伝子型を測定した(28, 91)。EIA 法では A~F 型まで DNA プローブ法では A~G 型までに分類した。

・ HBV 遺伝子型判定用インバーダープローブの作製

完全長 HBV ゲノム (約 3200bp) でゲノムデータベース *genbank* に登録されている HBV-DNA 塩基配列 491 例をダウンロードし、配列解析ソフトウェア *clustal X* (欧州バイオインフォマティクス研究所) を用いてマルチプルアライメント (Gap Opening: 10、Gap Extension: 0.2、Delay Divergent Sequence: 30、DNA transition Weight: 0.5) を行なった。次に同じ遺伝子型内で保存されかつ異なる遺伝子型とは DNA 配列の異なる領域をコア領域、S 領域から探し出した。コア領域については nt1978、nt1984、nt2020、nt2056、nt2059、nt2160 および nt2345 をクリベージポイント (L1~L7) とした (図 1)。また L8~L12 (t2887、nt2901、nt2950、nt2980 および nt3008) を S 領域のクリベージポイントとした。これら 12 ヶ所について遺伝子型により得られるシグナルのパターンが異なるように Aa, Ae, Ba, Bj, C, D, E, F, G および H 型を判別するために必要なプライマリープローブおよびインバーダーオリゴ DNA を設計した (表 1)。L1~L12 における 1~10 本のプローブは合算して 3.5 μ M となるように等量ずつ混合し、混合プローブ

とした。L5 は Ba 型の判定にのみ使用した。L7 をクリベージポイントとするプローブ結合領域は全ての遺伝子型で高く保存されているためこのウェルにシグナルが得られた場合を HBV 陽性とした。塩基番号参照配列にはアクセッション No. AB014378 を使用した。

・ HBV-DNA の抽出とマルチプレックス PCR

HBV-DNA は血清 100 μ L からスマイテスト EX R&D (Genome Science Laboratories) を用いて抽出した。抽出した DNA は各 1 μ M の core-F (nt1916-nt1944):5' -TATAAAGAATTTGGAGCTWCTGTGGAGTT-3'、core-R (nt2414-nt2395):5' -GCGGCGATTGAGAYCTKCKT-3'、S-F (nt2815-nt2843):5'-GGTCACYATATTCTTGGGAACAAGAMCTA-3' S-R (nt3151-nt3128):5' -CTGACTGCCGATTGGTRGAGGCAG-3'、800 nM d-UTP、2 \times Multiplex PCR Master Mix (キアゲン)、1 unit (U) の UNG (アプライドバイオシステムズ) を含む 25 μ L の反応液に加えた。PCR は GeneAMP PCRsystem9700 (アプライドバイオシステムズ) を用いて 50 $^{\circ}$ C 2分、95 $^{\circ}$ C 15分反応させた後、94 $^{\circ}$ C 30秒、58 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 30秒 で 50 サイクルのサーマルサイクリングを実施し、最後に 72 $^{\circ}$ C 7分間の追加伸長反応を実施した。PCR 産物は 25 μ L の PCR 反応液全量から AMPure (日本ジェネティクス) を用いて精製し、50 μ L の蒸留水 (DW) に溶出した。溶出液は 95 $^{\circ}$ C で 5 分間処理し、2 μ L をそれぞれのインベーター反応に供した。

・ インベーター反応

インベーター反応には Cleavase XI Invader Reagent core kit (Amplified DNA) (T.W.T.) を使用した (57)。65 $^{\circ}$ C で 15 分反応させた後、Cytoflour 4000 (アプライドバイオシステムズ) を用いて FAM および Redmond RED (Epoch Bioscience) の蛍光値 (Fold over zero: FOZ) を測定した。FOZ 値のカットオフ設定のために HBV 陰性血清 24 例を測定し、各ウェルにおける FAM-FOZ 値、RED-FOZ 値の平均値+5S.D.を求めた。FAM-FOZ 値では L1~L12 において 1.21~1.51、RED-FOZ 値では 1.20~1.64 であった。そのため、カットオフ値は 2.00 に設定した。

・ HBV-DNA のクローニング

検出感度の検討用として A~D 型における約 3000bp の HBV-DNA をプライマー-HBV-seq F (nt1912-nt1925):5' -CCCGTATAAAGAATTTGGAGCTTC-3'、HBV-seq R (nt1736-nt1715):5' -GAAGTATGCCTCAAGGTCGGTC-3' を用いて増幅した後、pCR II-TOPO (インビトロジェン) ベクターに組み込んだプラスミドを作製した。混合型

を確認するクローニングシーケンスについては、過去の報告に基づいて行った (28)。

・検出感度の検討

A～D型のHBV-DNAを導入したプラスミドを1～10³コピーに希釈し、測定した。また混合型における検出感度を調べるため、10コピーのプラスミドを異なる遺伝子型のプラスミド10～10³コピーに添加し測定した。

(3)結果

検出感度の検討

プラスミドを用いた検出感度の検討ではAe、BaおよびC型で1コピー/チューブ、BjおよびD型で10コピー/チューブまでHBV-DNAをPCR増幅し、遺伝子型を判定することが可能であった(表3)。混合比の検討では、Ae型については、C型が10³コピー中に10コピーの存在まで混合型と判定することができ、Ba型およびBj型については、C型が10⁴コピー中に10¹コピーの存在まで混合型と判定することができた(表4)。この相互関係はメジャーな遺伝子型をBa/Bj型にし、マイナーな遺伝子型をC型に変えて試験したところ、同様の結果を示した。

各遺伝子型の検出

シーケンス解析によりHBV亜型/遺伝子型を確認した検討用血清(表5)を本法で測定した。L1～L12における蛍光検出パターンは図3に示したとおり遺伝子型特異的であった。特にBa型およびBj型ではコア領域内のL1,3,4,5および6で明確な違いがみられ、Aa型およびAe型はL2およびL12で判別することが可能であった(図4)。

EIA法およびGSPA法との判定結果の比較

計505例のB型慢性肝炎患者の血清検体を用いて、pre-S2領域に存在するHBV遺伝子型特異的配列を認識するモノクローナル抗体を用いたEIA法およびpre-S1領域を用いたGSPA法と遺伝子型判定結果を比較したところ、EIA法で単一遺伝子型と判定された165例中162例(98.2%)はインバーダー法による判定と一致し、3例(1.8%)が不一致であった(表6A)。GSPA法では、343例中333例(97.1%)で結果がインバーダー法による判定と一致した(表6B)。GSPA法で判定不能となった10例については、ダイレクトシーケンス解析によりインバーダー法で判定された遺伝子型を確認できた。両者で揃って

混合型を示した4例については、コア領域をクローニングしたのち、シーケンスを行い、2例から遺伝子型の異なるクローンを得た。他の2例では、それぞれ15クローン、20クローンをシーケンスしたが複数の遺伝子型を確認することはできなかった(表7)。

(4) 考察

インベーター法を用いてHBVの遺伝子型であるA~Hまでの8つの型と、A型、B型の亜型であるAa, Ae, BaおよびBjを判別する方法を開発した。各遺伝子型でよく保存された塩基配列、およびその周辺領域12ヶ所にプライマリープローブおよびインベーターオリゴDNAを設計し、FAM/RED蛍光の検出パターンからAa~H型までの10種類の遺伝子型の判別と、A~D型までの混合感染を検出できることが確認された。本法は、HBVの遺伝子型に加え亜型も簡便に分類可能な初めての検査法である。HBVのAe, Ba, Bj, CおよびDそれぞれのDNA断片を組み込んだプラスミドを用いた検出感度の検討では、10コピー/テストチューブまでの検出が可能であった。遺伝子型の異なるプラスミドを異なった濃度で混合した検討では、1,000:10の差であっても両方の遺伝子型を検出することが可能であった。この検出感度はGSPA法キットと同等であった(48)。168例のHBV陽性血清を用いてインベーター法とEIA法との結果を比較した。168例中3例(1.8%)でインベーター法とEIA法の結果が乖離したが、この3例におけるGSPA法およびシーケンス解析の結果はインベーター法と一致した。さらに、GSPA法とは343例の血清を用いて結果を比較した。GSPA法では343例中10例(2.9%)が判別不能となったが、この10例におけるインベーター法とシーケンス解析の結果は一致した。EIA法では、PreS2領域に設定されたモノクローナル抗体が正確に認識できる抗原エпитープが保持されていることが検出の条件となる(91)。インベーター法では12カ所の塩基配列に検出用のプローブを設計してあるため、数カ所にプローブ結合領域内の遺伝子変異により反応阻害が起こったとしても、12ヶ所のシグナルパターンを総合的に判読するので、このような制約は無い。実際の臨床検体で、遺伝子型BjとCの重複感染が検出された事例について検討したところ、GSPA法、インベーター法共にBjとCの重複感染シグナルを検出可能であった。しかし、この検体のPCR産物のランダムクローニングとクローンのシーケンスを実施したところ、20クローンの解析では、全てBjを示した。本検体における実際のBj, Cの存在比率は、ディープシーケンサーを用いて調べてみる必要があるが、20クローンのシーケンスの全てがBjであったことから、混在するCの存在割合は、5%以下であったと考えられた。従って、GSPA法、インベーター法共に5%以下の微量に混合した遺伝子型の存在を検出可能と思われた。更に、インベーター法は、ヒトゲノムのSNPタイピングを主な解析の目的として開発された手法だが(57)、その原理は、HBVの遺伝子型分類に限らず、感染症領域の診断にも応用することができると思われた。すでに、細菌の菌種同定や、薬剤耐性変異の解析に既に広く用いられている実績もあ

り（81）、今後の応用に期待が持てる。

表1. HBV遺伝子型および亜型判定を行うためのプライマリープローブおよびインバーダーオリゴDNA

HB1978-p1	<u>ACGGACGCGGAG</u> YRTTCGAGAYCTCCTYGAC
HB1978-p2	<u>CGCGCCGAGGG</u> GTGCRDGAYCTCCTAGA
HB1978-io	CTGTGGAGTTACTCTCTTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTTCKTCC
HB1984-p1	<u>CGCGCCGAGGG</u> GATCTACTHGAHACMSG
HB1984-p2	<u>ACGGACGCGGAG</u> AGATCTYSTRGAYACMG
HB1984-io	TCGTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCTTCMGHVNGT
HBV2020-p1	<u>CGCGCCGAGGH</u> GCHTTRRAATCTCCTG
HBV2020-p2	<u>ACGGACGCGGAG</u> GCCTTAGAGTCTCCS
HBV2020-io	GACACCGCCTCHGCYYTGTATMGGGAT
HB2056-p1	<u>CGCGCCGAGGG</u> TGRTGAKGTGAGCAAT
HB2056-p2	<u>ACGGACGCGGAG</u> ATGRTGAGGWGWRCAATG
HB2056-io	CAACACACAATAGCTTGCTGAKTGCYGT
HB2059-p1	<u>CGCGCCGAGG</u> CGTATRGTGAGSYGWVMH
HB2059-io	MCCCAACAYWSAAYVVCTTGCTGAKWGCA
HB2160-p1	<u>ACGGACGCGGAG</u> GYTATGTCAAYRTTAATATGGG
HB2160-p2	<u>CGCGCCGAGG</u> ATTATGTTAACTMMCAYGGG
HB2160-io	AGTAATTTTSAAGAYCCAGCATCCAGGGAWYTAGTAGTCAC
HBV2345-p1	<u>CGCGCCGAGG</u> KDYRTCTAACWAYASWAGTY
HBV2345-p2	<u>ACGGACGCGGAG</u> GYCYCKDYRTCTAA
HBV2345-io	AGGGAGTTCTTCTTCTAGGGRWCCYGCVTCT
HB2887-p1	<u>ACGGACGCGGAG</u> CAGAATCTTTYCAYCAGC
HB2887-p2	<u>CGCGCCGAGG</u> ACRAAYCTKCKGTGCC
HB2887-io	KTCTTSSRAACMWMRRCWASRSMWKGGGKT
HB2901-p1	<u>CGCGCCGAGG</u> KCCCAAYCCKCTGGG
HB2901-p2	<u>ACGGACGCGGAG</u> CCYCAATCCNCTGGG
HB2901-io	CTCGRMAAGGCATGGGGACRAATCTTTCYGTA
HB2950-p1	<u>ACGGACGCGGAG</u> AAAGCCAACCTCMGAMAATC
HB2950-p2	<u>CGCGCCGAGG</u> GGAGCCAAYTCAAACAATC
HB2950-io	TCCCGATCATCAGTTGGACCCTGCRTTCT
HB2980-p1	<u>ACGGACGCGGAG</u> CTCAAYCCVMACAAGGAC
HB2980-p2	<u>CGCGCCGAGG</u> TTCAACCCCAACAAGGAT
HB2980-io	TGCATTCAAAGCCAACCTCAGAAAATCCAGATTGGGACA
HB3008-p1	<u>ACGGACGCGGAG</u> GCTGGCCAGKKGT
HB3008-p2	<u>CGCGCCGAGG</u> TSKGGCCAGYSGTC
HB3008-io	GAATGCTCCYACTCCTACCTGRTKGGCTC

p1: プライマリープローブ (FAM蛍光) p2: プライマリープローブ (RED蛍光) io: インバーダーオリゴDNA

下線部は 5'フラップ配列を示した。

∴ プライマリープローブのクリベージポイントを示した。

表2. インベーター法による遺伝子型および亜型判定を行う標的核酸残基の位置

Core Gene	Nt position	1978(L1)		1984(L2)		2020(L3)		2056(L4)		
	Nucleotide	G	Y	G	A	A	G	C	T	
	Genotype	Bj	Ba,C,G	Aa	Ae,E	Bj	Ba,C	Bj	Ba,C,F,G	
	Nt position	2059(L5)		2160(L6)		2345(L7)				
	Nucleotide	G		A G		6塩基 (ARGACC) - の挿入				
	Genotype	Ba		Bj Ba,C, E		A Not A				
S Gene	Nt position	2887(L8)		2901(L9)		2950(L10)		2980(L11)		3008(L12)
	Nucleotide	A	C	T	C	G	A	T	C	A C
	Genotype	A,B,C,G	D	A,C,G,H	B	C,G	B	C	B	Aa,E Ae,G

Nt positionはアクセッション番号AB014378のEcoRI切断点を1として算出した。

表3. インベーター法による遺伝子型および亜型の検出感度

コピー数 (プラス ミド)	HBV/Ae	HBV/Ba	HBV/Bj	HBV/C	HBV/D
	FAM / RED				
10 ³	+ (1.1/30.9)	+ (1.1/32.1)	+ (13.0/1.0)	+ (1.0/32.7)	+ (1.1/25.4)
10 ²	+ (1.0/28.3)	+ (1.0/31.3)	+ (13.0/1.0)	+ (1.1/36.4)	+ (1.1/24.0)
10 ¹	+ (1.0/27.5)	+ (1.1/30.3)	+ (9.4/0.9)	+ (1.1/32.8)	+ (1.1/23.4)
1	+ (1.0/25.2)	+ (1.0/4.9)	- (1.0/0.9)	+ (1.0/31.3)	- (1.1/ 1.1)

プラスミドを用いた検出感度の検討。HBV-DNAをPCR増幅し、Ae、BaおよびC型で1コピー/チューブ、BiおよびD型で10コピー/チューブまで遺伝子型を判定した。

遺伝子型特異的なシグナルが得られた場合を陽性 (+) とした。

FAM / REDは L6 (nt2160) における FOZ値を表した。

表4. インベーター法における混合プラスミドを用いた検討

HBV/C型プラスミドのコピー数	10 ⁵ コピー	10 ⁴ コピー	10 ³ コピー	10 ² コピー	10 ¹ コピー
10コピーのHBV/Aeを添加	C (1.2/26.9)*	C (1.7/26.3)*	Ae + C (6.8/24.2)*	Ae + C (17.7/23.0)* ^a	Ae + C (21.4/21.3)*
10コピーのHBV/Baを添加	C (14.6/1.4)**	Ba + C (14.1/ 3.0)**	Ba + C (14.2/9.3)**	Ba + C (13.7/12.6)**	Ba + C (14.3/12.9)**
10コピーのHBV/Bjを添加	C (17.3/ 1.3)**	Bj + C (15.4/ 2.7)**	Bj + C (13.6/ 7.1)**	Bj + C (14.1/10.5)**	Bj + C (13.1/13.4)**

混合比の検討。C型：Ae型では10³：10までAe型を検出し、C型：Ba型およびC型：Bj型では10⁴：10までBa / Bj型を検出した。

HBV/C型のプラスミドにHBV/Ae型、HBV/Ba型およびHBV/Bj型のプラスミド10コピーを添加

* L6 (nt2160) におけるFOZ値 (FAM / RED)。FAM-FOZ が2.0以上のときAe型陽性とした。

** L11 (nt2980) におけるFOZ値 (FAM / RED)。RED-FOZが2.0以上のときB型陽性とした。

表5. シーケンス解析およびホモロジー検索によるHBV 亜型/遺伝子型の確認

Genotype*	accession No.**	Homology***
Ae	AY128092	98%
Aa	AB116094	99%
Ba	AB073832	98%
Bj	AB073846	97%
C	AF461363	100%
D	X97849	99%
E	AB205192	99%
F	AY179735	99%
G	AF405706	100%
H	AB179747	99%

シーケンス解析およびホモロジー検索によるHBV 亜型 / 遺伝子型の確認。この10例におけるインベーター法の蛍光検出パターンを図4に示した。

*判定された遺伝子型および亜型

** genbankデータベースのBLAST サーチで最も高いスコアを示した配列のアクセッション番号

***ホモロジースコア

表6. インベーター法とEIAおよびGSPA法との比較

(A) EIA法との比較

インベーター法で判定された遺伝子型	インベーター法で判定された遺伝子亜型	EIA法で判定された遺伝子型				
		A	B	C	D/E	F
A	Ae	16				
	Aa	4				
B	Ba		16	1*		
	Bj		37			
Ba + C				1		
Bj + C			1	1		
C		1*	1*	87		
D					1	
F						1

* EIA法とインベーター法で結果が乖離した検体

(B) GSPA法との比較

インベーター法で判定された遺伝子型	インベーター法で判定された遺伝子亜型	GSPA法で判定された遺伝子型				
		A	B	C	D	班別不能
A	Ae	31				3**
	Aa	4				
B	Ba		1			1**
	Bj		16			4**
C				275		2**
D					2	

** GSPA法とインベーター法で結果が乖離した検体

B型慢性肝炎患者の血清検体を用いてpre-S2領域に存在するHBV遺伝子型特異的配列を認識するモノクローナル抗体を用いたEIA法およびpre-S1領域を用いたGSPA法と遺伝子型判定結果を比較した。EIA法とは単一遺伝子型と判定された165例中162例（98.2%）で判定が一致し、GSPA法とは343例中333例（97.1%）で判定が一致した。

表7. GSPA法およびインバーダー法で混合型と判定されたサンプルの塩基配列解析結果

サンプル 番号	GSPA法	インバーダー法	クローニングシーケンス	
			クローン	Accession*
72	B,C	Bj,C	20	Bj (AB073848)
80	B,C	Bj,C	15	C (AF458664)
84	B,C	Bj,C	3	Bj (D23678)
			3	C (D50518)
112	B,C	Bj,C	21	Bj (D23678)
			3	C (AB050018)

混合型を示した4例についてコア領域のクローニングシーケンスを行い、得られた配列についてホモロジー検索した。

*クローンから得られた配列についてgenebankデータベースのBLAST検索を実施し最も高いスコアを示した配列のアクセッション番号

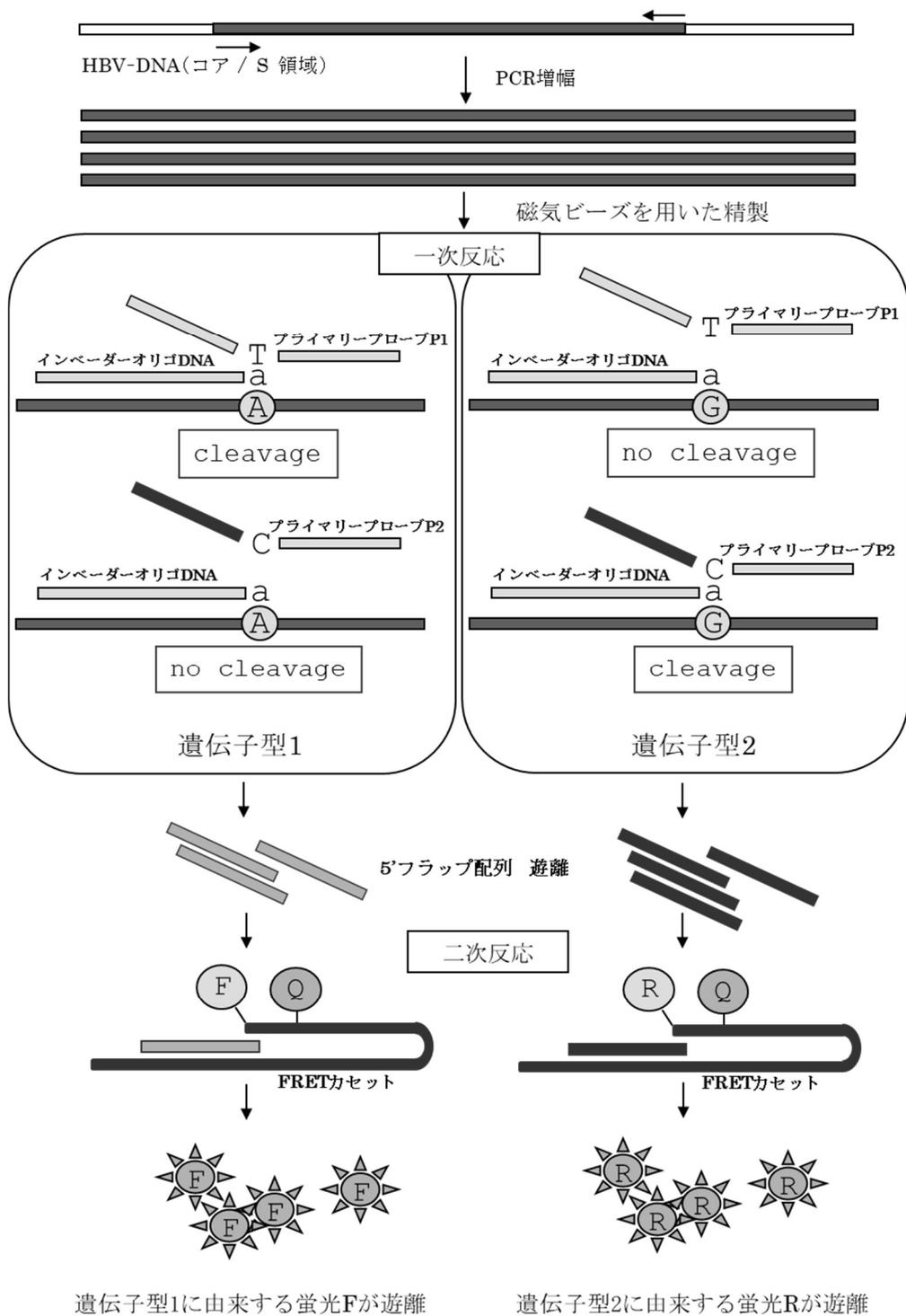


図 1. HBV 遺伝子型判定におけるインバーダー法の反応原理

図中の略号を以下にまとめた。

F: FAM 蛍光色素 R: RED 蛍光色素 Q: クエンチャー (消光) 色素

5' フラップ配列: プライマリープローブの 5' 末端に位置する二次反応を発生させるための塩基配列

FRET カセット: インバーダー法の二次反応に用いる共通蛍光標識プローブ

Aa-AF297625	451	..TTGGGAGTCTGATTCGGCAGCTCCCTCCAGCATATATAGACCAACCAATCGCCCTATCTTATATACAGCTTCGGGAACTACTGTTTATGACGACGACCTGAGGGGAGTCCCTATGAGGAGAACTCCGCTCGCGCAGCGAAGATCTCA	600
Aa-M57663	451G.....C.....	600
Ae-AB014370	451G.....C.....	600
Ae-AJ012207	364G.....C.....	513
Ba-AF100309	364	T.....G.....C.....	507
Ba-AF121246	451	T.....T.....T.....	594
Bj-AB010289	451	T.....G.....TC.C.C.....	594
Bj-AB014366	451	T.....G.....TC.C.C.....	594
C-AB014362	451	T.....G.....T.T.C.....	594
C-AB014378	451	T.....G.....A.CC.T.C.....	594
D-AB033558	364G.....T.....	507
D-AF121241	451G.....T.....	594
E-AB032431	451	T.....G.....T.....	594
E-AB091255	451	T.....G.....T.....	594
F-AB036912	451	T.....G.....A.T.T.G.....	594
F-AB036913	451	T.....G.....A.T.T.G.....	594
G-AB064311	400	T.....G.....T.....	543
G-AF160501	400	T.....G.....T.....	543
H-AB059659	451	T.....G.....A.T.T.....	594
H-AB059661	451	T.....G.....A.T.T.....	594
Aa-AF297625	601	..TTGGGAGTCTGATTCGGCAGCTCCCTCCAGCATATATAGACCAACCAATCGCCCTATCTTATATACAGCTTCGGGAACTACTGTTTATGACGACGACCTGAGGGGAGTCCCTATGAGGAGAACTCCGCTCGCGCAGCGAAGATCTCA	623
Aa-M57663	601G.....C.....	623
Ae-AB014370	601G.....C.....	623
Ae-AJ012207	514G.....C.....	536
Ba-AF100309	508G.....C.....	530
Ba-AF121246	595G.....C.....	617
Bj-AB010289	595	A.....G.....C.....	617
Bj-AB014366	595	A.....G.....C.....	617
C-AB014362	595	A.....G.....C.....	617
D-AB033558	508G.....C.....	617
D-AF121241	595G.....C.....	530
E-AB032431	595G.....C.....	617
E-AB091255	595G.....C.....	617
F-AB036912	595G.....C.....	617
F-AB036913	595G.....C.....	617
G-AB064311	544GC.....	566
G-AF160501	544GC.....	566
H-AB059659	595G.....C.....	617
H-AB059661	595G.....C.....	617
Aa-AF297625	601	..TTGGGAGTCTGATTCGGCAGCTCCCTCCAGCATATATAGACCAACCAATCGCCCTATCTTATATACAGCTTCGGGAACTACTGTTTATGACGACGACCTGAGGGGAGTCCCTATGAGGAGAACTCCGCTCGCGCAGCGAAGATCTCA	623
Aa-M57663	601G.....C.....	623
Ae-AB014370	601G.....C.....	623
Ae-AJ012207	514G.....C.....	536
Ba-AF100309	508G.....C.....	530
Ba-AF121246	595G.....C.....	617
Bj-AB010289	595	A.....G.....C.....	617
Bj-AB014366	595	A.....G.....C.....	617
C-AB014362	595	A.....G.....C.....	617
D-AB033558	508G.....C.....	617
D-AF121241	595G.....C.....	530
E-AB032431	595G.....C.....	617
E-AB091255	595G.....C.....	617
F-AB036912	595G.....C.....	617
F-AB036913	595G.....C.....	617
G-AB064311	544GC.....	566
G-AF160501	544GC.....	566
H-AB059659	595G.....C.....	617
H-AB059661	595G.....C.....	617

図2. HBV遺伝子判定におけるコア領域のグライイマー結合領域およびクリページポイント Core-Fおよびcore-Rは、グライイマーPCR増幅用のグライイマーを示した。核酸のポジション(nt)は、アクセションNo. AB014378 (Genotype C) のコア領域の塩基配列に従って記載した。タッシュ(・)は、ギャップを示し、ドット(・)は、標準配列Aa-AF297625と同じ残基である事を示した。グライイマー領域以外の□は、インペーター法の標的残基の位置(1978, 1984, 2020, 2056, 2160および2345)を示した。

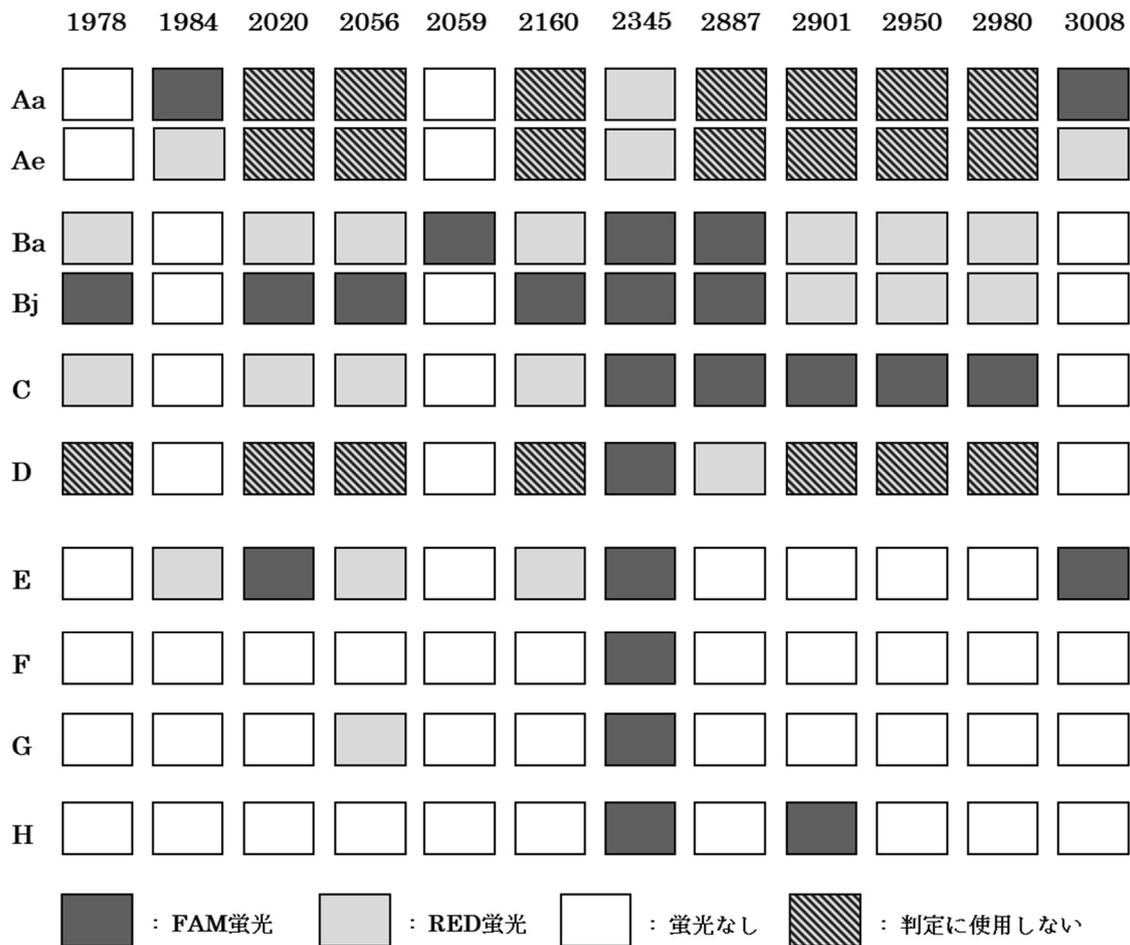
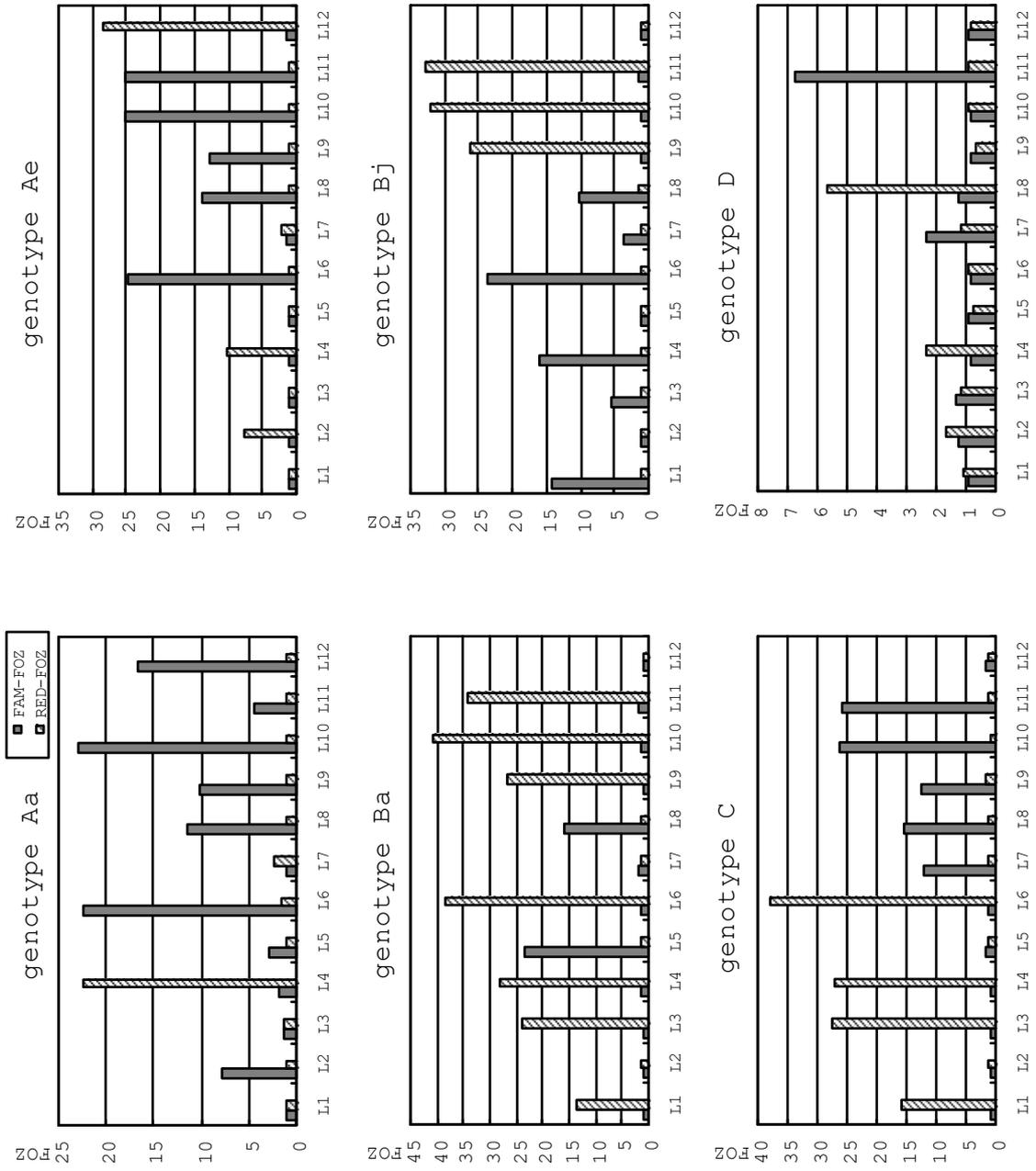


図 3. HBV 遺伝子型別の蛍光パターン

濃い灰色は FAM 蛍光を示し、薄い灰色は RED 蛍光を示した。Fold over Zero 値 (FOZ 値) の cut-off は 2.0 に設定した。□は、蛍光を発しないことを、斜線の四角は、判定に使用しないことを示した。縦軸には HBV の遺伝子型もしくは亜型を、横軸にはインベーター法の標的残基のポジションをアクセッション No. AB014378 (Genotype C) の塩基配列に従って記載した。



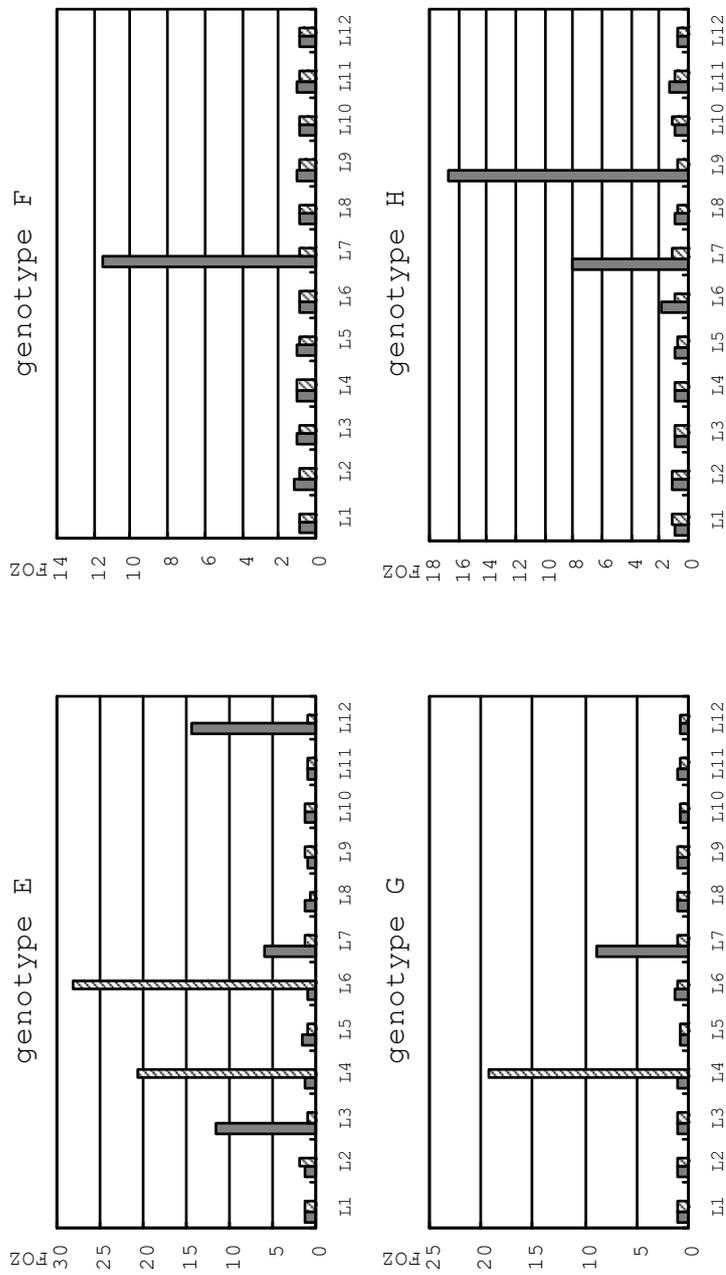


図4. 各遺伝子型における FAM-FOZ 値および RED-FOZ 値の検出パターン
縦軸は FOZ 値、横軸にはインベーター法の標的残基のポジション No. AB014378 の塩基
配列に従って記載した。

L1～L7:nt1978, nt1984, nt2020, nt2056, nt2059, nt2160 および nt2345
L8～L12:nt2887, nt2901, nt2950, nt2980 および nt3008
バーグラフのグレーバーは各ポジションにおける FAM-FOZ 値を示し、斜線バーは RED-FOZ 値を示した。

第 I 章-2. HBV 薬剤耐性変異の検出

(1) 緒言

HBV (hepatitis B virus) により引き起こされるB型肝炎は全世界で問題視されている (49)。核酸アナログによる治療はウイルスの増幅をコントロールすることで肝疾患の進行を抑え、罹患率および死亡率の抑制に寄与している (89)。現在、日本ではラミブジン、アデフォビルおよびエンテカビルの3剤が承認されている (79)。長期間の核酸アナログ治療においてウイルスが薬剤耐性変異を獲得する場合がある (42)。ラミブジンによる治療の場合、60ヶ月を経過した時点で50-80%の患者に薬剤耐性変異が生じることが報告されている (23, 79)。

ラミブジン耐性では主に HBV-ゲノム C ドメインにある YMDD モチーフ (アミノ酸 203-206 番) のメチオニンがイソロイシンあるいはバリンに変異している (23)。また二次的変異として B ドメインに位置する 173 番目のバリンがロイシンに変異する V173L および 180 番目のロイシンがメチオニンに変異する L180M がある (23)。また 181 番目のアラニンがセリン、スレオニンあるいはバリンに変異する A181S/T/V はラミブジンおよびアデフォビル治療に抵抗性を獲得する (41, 95)。T184A/C/F/G/I/L/M/S、S202C/G/I および M250I/L/V の変異はエンテカビル耐性と関連している (43, 99)。ラミブジン耐性変異である L180M+M204V の 2 つの変異に 184、202 および 250 番目の変異が 1 つ以上加わることで、エンテカビル耐性が獲得される (43, 99)。耐性変異を検出することは適切な治療を行ううえで有益な情報となる。エンテカビル治療では未治療者における 5 年後の耐性株出現率は 1.2% と低いものの (43, 99)、ラミブジン変異を有する患者ではエンテカビル耐性率は 51% に上昇する。しかしながら、耐性変異を有することが必ずしも再燃に結びつくわけではないことも報告されている (89)。これらのことから野生型に対する耐性変異の正確な相対比率を把握することはウイルス量をモニタリングすることと同様に重要となる。

本章では HBV ゲノムにおける耐性変異の相対比率を半定量的に測定する方法について検討した。

(2) 方法

・材料

HBV 耐性変異解析の検討には虎の門病院分院 (神奈川) にて用いたラミブジン治療からエンテカビル治療に切り替えた B 型肝炎患者から採取され、解析に使用するまで -80℃ で凍結保存されていた 75 例の血清検体を用いた (倫理委員会承認番号 2005-36)。

- ・ HBV 薬剤耐性変異解析用インバーダープローブの作製

HBV 薬剤耐性変異 (L180M、A181G/S/T/V、T184A/C/F/G/I/L/M/S、S202C/G/I、M204I/V、M250I/L/V) を検出するためのプライマリープローブおよびインバーダーオリゴはゲノムデータベース **genbank** に登録されている 491 例の HBV-DNA 塩基配列について **clustal X** (欧州バイオインフォマティクス研究所) を用いたマルチプルアライメント (Gap Opening: 10、Gap Extension: 0.2、Delay Divergent Sequence: 30、DNA transition Weight: 0.5) を行い設計した。

- ・ HBV-DNA の抽出と PCR 増幅

200 μ L の血清から **PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit** (ライフテクノロジーズ) を用いて HBV-DNA を抽出した。sense: 5'-CACYTGTATTCCCATCCCATCRTC-3' および anti-sense: 5'-TTGACAWACYTTCCRATCRATDGG-3' を用いて HBV ポリメラーゼ RT ドメインのアミノ酸 156~288 番目を PCR 増幅した。PCR 条件、PCR 産物の精製および熱処理については「1. HBV 遺伝子型判定法の確立」と同様に行った。

- ・ インバーダー反応

インバーダー反応には **Cleavase XI Invader Reagent core kit (Amplified DNA)** (T.W.T.) を使用した (57)。2 μ L の精製した PCR 産物に加え、95°C で 5 分、65°C で 90 分反応させたブロックインキュベーター **BI-535** (アステック) で反応後、**200-FL/T-ABS fluorescence plate reader** (TECAN) を用いて **FAM** および **Redmond RED** の **FOZ** 値を測定した。野生型を測定する **FAM-FOZ** 値はサンプルの蛍光値を陰性コントロールの蛍光値で割ることで標準化し、変異型を測定する **RED-FOZ** 値は偽陽性を防ぐためにサンプルの蛍光値を野生型プラスミドの蛍光値で割ることで標準化した。

- ・ シークエンス解析

Model 3130 fluorescent DNA sequencer および **BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit** (アプライドバイオシステムズ) を用いてダイデオキシ法で塩基配列を決定した。

- ・ HBV-DNA のクローニングによるコントロールプラスミドの作製

臨床検体から抽出した L180M、M204I/V および野生型 HBV-DNA の PCR 産物を pCR II-TOPO (インビトロジェン) ベクターに組み込み、プラスミドを作製した。その他の変異を持った PCR 産物については、メガプライマーを用いた site-directed mutagenesis 法により作製した。

- ・ 測定感度および再現性の検討

測定感度および再現性の検討には野生型、変異型あるいは両者を混合したプラスミドをテンプレートとして用いた。測定感度の検討には $1\sim 10^6$ コピーに調製したプラスミド溶液の希釈系列を使用した。また $n=5$ で 3 回測定し、再現性について検討した。

(3) 結果

検出感度の検討

全ての測定系において $10\sim 10^6$ コピー間で 20 以上の明確な FOZ 値が得られ、測定下限は 10 コピーであった (図 3)。10 コピーの変異型と野生型のプラスミドを 1:10、1:50、1:100 および 1:1000 の割合で混合した場合の検出感度は 1:50 (2%) であった。

混合プラスミドを用いた半相対定量解析

変異型プラスミドの混合比が 100、80、40、20、5 および 2% となるように調製した混合プラスミド (10^3 コピー) をテンプレートとして測定し、濃度依存的な変異型の FOZ 値を得た (図 4)。これらの結果から臨床検体を測定する際の検出下限を 2% に設定した。

臨床検体の測定

75 例の臨床検体について HBV ポリメラーゼ RT ドメインのアミノ酸 156~288 番目をインベーター法およびシーケンスで解析した。インベーター法では変異型および野生型 FOZ 値の相対比率から検出した変異型を弱陽性 (2~20%) と陽性 (>20%) に区別した。シーケンスでは L180M 変異を 73.3% (55/75) に認めた。M204I および M204V 変異の検出率はそれぞれ 50.6% (38/75) および 58.7% (44/75) であった。これらの変異は全てインベーター法でも検出した。シーケンスでは 75 例中にエンテカビル耐性に関連する変異はアミノ酸 L184 では 9 例、S202 では 3 例、M250 では 7 例検出された

が、インベーター法では L184 で 10 例、S202 と M250 では 7 例ずつ陽性となり、L184 で 4 例、S202 で 19 例、M250 で 12 例が弱陽性となった（表 2）。L180M と M204V に L184、S202 あるいは M250 変異が加わりエンテカビル耐性となる組み合わせは、ダイレクトシーケンスでは 20.0%（15 / 75）検出され、インベーター法では 50.6%（15 / 75）検出された。

クローニングシーケンスによる耐性株の確認

インベーター法のみで検出した耐性株を確認するために異なる耐性株を持つ 3 例についてクローニングシーケンスを行った。サンプル 20 では 2.9%（1 / 34）のクローンから L180M + M204V + T184A 変異を検出した。サンプル 02 からは L180M + M204V + S202G の変異株を 8.7%（4 / 46）のクローンから、サンプル 04 からは L180M + M204V + M250V の変異株を 5.6%（3 / 54）のクローンから検出した（表 3）。

(4) 考察

核酸アナログを用いた HBV 治療において薬剤耐性株を的確に検出することは非常に有用となる。この章ではインベーター法を用いたラミブジンおよびエンテカビルなどの核酸アナログ耐性変異を検出する測定系の構築について延べた。構築した測定系の検出感度および再現性について検討し、シーケンス解析と結果を比較した。薬剤耐性変異はこれまで報告されている既知の方法でも検出することができる。例えば、最も一般的なシーケンスでは解析範囲の 20%以上の変異については検出可能であり（98）、ラインプロブアッセイでは一度に複数の変異を検出することが出来る（14, 42）ものの、測定感度についてはシーケンスと同等となっている。

本章ではインベーター法は測定下限の 10 コピーから 10^6 コピーまでの測定レンジを有し、10 コピーの変異型プラスミドを様々な割合（1 : 10、1 : 50、1 : 100 および 1 : 1000）で野生型と混合した場合の検出感度は 1 : 50（2%）であった。言い換えれば、 5×10^2 コピー以上の野生型の中から 2%の変異型を検出可能であった。

インベーター法の性能を確認するために 75 例の臨床検体をシーケンスとインベーター法で測定した。シーケンスで検出した変異は全てインベーター法でも検出した。さらにインベーター法ではシーケンスでは検出されない微小な変異も検出した。特に S202G 変異についてはシーケンスでの変異検出率は 4.0%であったのに対してインベーター法では 34.7%であった。また、シーケンスでは検出率が 20.0%であったエンテカビル耐性変異もインベーター法では 50.6%まで検出した。

インベーター法で検出された微小な耐性変異の動態を正確に予測することは困難であるが、その出現は再燃のリスクを伴っている。微小な耐性株が検出された後、定期的な測定

を行っていくことで再燃を早期に捉えられる可能性がある。耐性変異株の動態をモニタリングすることは HBV 陽性患者の治療を行っていくうえで有用だと思われた。

表 1. HBV 薬剤耐性変異解析を行うためのプライマリープローブおよびインバーダーオリゴ DNA

Target		Sequence(5'-3')
L180M	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> RDAGAAACGGRCTGAG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> TDAGAAACGGRCTGAGG
	io probe	GAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGAVHCAC
A181G	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> GCCARGAGAAACGGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> CCARGAGAAACG
	io probe	CTGCGAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGNT
A181S1*	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> GCCARGAGAAACGGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> GACARGAGAAACG
	io probe	CTGCGAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGNT
A181S2*	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> GCCARGAGAAACGGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> CTCARGAGAAACG
	io probe	CTGCGAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGNT
A181T	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> CCARGAGAAACGGAC
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> TCARGAGAAACGGAC
	io probe	CTGCGAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGNGC
A181V	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> GCCARGAGAAACGGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> ACCARGAGAAACGGA
	io probe	CTGCGAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGNT
T184A	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> ACTWGYKCCMTTGTTC
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> GCTWGYKCCMTTGTTC
	io probe	GCCTCAGTCCGTTTCTCYTGGCTCAKTTTT
T184C	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> GTAACCTGAGCCARGAGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> CAAACTGAGCCARGAGA
	io probe	CCCTGCGAACCACTGAACAAATGGMACTRA
T184F	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> GTAACCTGAGCCARGAGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> AAAACTGAGCCARGAGA
	io probe	CCCTGCGAACCACTGAACAAATGGMACTRA
T184G	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> ACTWGYKCCMTTGTTC
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> GTWGYKCCMTTGTTC
	io probe	GCCTCAGTCCGTTTCTCYTGGCTCAKTTTT

Target		Sequence(5'-3')
T184I	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> GTA [.] AACTGAGCCA [.] KGAGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> A [.] TAACTGAGCCA [.] KGAGA
	io probe	CCCTGCGAACC [.] ACTGAACAA [.] ATGGMACTBC
T184L1**	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> T [.] RAAMTGAGCCADRAGAA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> G [.] RAAMTGAGCCADRAGA
	io probe	CCCTGCGAACC [.] ACTGAACAA [.] AKGGCRCWARA
T184L2**	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> T [.] RAAMTGAGCCADRAG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> A [.] GRAAMTGAGCCADRAG
	io probe	CCCTGCGAACC [.] ACTGAACAA [.] AKGGCRCWAT
T184M	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> A [.] GTA [.] AACTGAGCCARGAG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> C [.] ATA [.] AACTGAGCCARGAG
	io probe	CCCTGCGAACC [.] ACTGAACAA [.] ATGGMACTA
T184S***	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> G [.] TAACTGAGCCARGAGA
	p2 probe a	<u>ACGGACGCGGAG</u> C [.] TAACTGAGCCARGAGA
	p2 probe b	<u>ACGGACGCGGAG</u> G [.] AAA [.] ACTGAGCCARGAGA
	io probe	CCCTGCGAACC [.] ACTGAACAA [.] ATGGMACTRA
S202C	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> T [.] RMADGCSAVRCARTGG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> A [.] RMADGCSAVRCARTG
	io probe	MGAYTTGGCCCC [.] CAAWACCRVATCATCNAYRTARCA
S202G	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> T [.] RMADGCSAVRCARTGG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> C [.] RMADGCSAVRCARTG
	io probe	MGAYTTGGCCCC [.] CAAWACCRVATCATCNAYRTARCA
S202I	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> C [.] TRMADRCSAAACAGTG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> A [.] TRMADRCSAAACAGTG
	io probe	CGACTTGGCCCC [.] CAATACCACATCATCMAYRTADT
M204I	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> CATATARCTGARAGCCAAACAGT
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> DATATARCTGARAGCCAAACAGT
	io probe	TACGACTTGGCCCC [.] CAATACCACATCATCA
M204V	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> ATGGATGATGTGGTATTGG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> G [.] TNGATGATGTGGTATTGG
	io probe	GGGCTTCCCC [.] CACTGTTTGGCTTTCDKYTATT

Target	Sequence(5'-3')
M250I	p1 probe <u>CGCGCCGAGG</u> GGGWTAYRTAATTGGAAGTTGGGG
	p2 probe <u>ACGGACGCGGAG</u> HGGWTAYRTAATTGGAAGTTGGGG
	io probe TAATAAAACCAAACGTTGGGGCTACTCCCTHMAYTTYATT
M250L	p1 probe <u>CGCGCCGAGG</u> TGAAGTTWAGGGARTADCCCA
	p2 probe <u>ACGGACGCGGAG</u> RGAAGTTWAGGGARTADCCCA
	io probe TGTGGTAAAGTNCCCCAACTKCCAATTAYRTANCCNAA
M250V	p1 probe <u>CGCGCCGAGG</u> TGAAGTTWAGGGARTADCCCA
	p2 probe <u>ACGGACGCGGAG</u> CGAAGTTWAGGGARTADCCCA
	io probe TGTGGTAAAGTNCCCCAACTKCCAATTAYRTANCCNAA

p1: プライマリープローブ (FAM蛍光) p2: プライマリープローブ(RED蛍光)

io: インバーダーオリゴDNA

下線部は 5'フラップ配列を示した。

∴ プライマリープローブのクリベージポイントを示した。

*: 第1コドンの変異を検出するためにA181S1、第2コドンの変異を検出するためにA181S2を設計した。また非特異反応を防ぐためにA181S1のクリベージポイントは標的配列の隣に設計した。

** : T184L1およびT184L2の結果を合わせてT184Lを判定した。

***: T184Sのp2プローブは二種類を等量ずつ混合した。

表 2. インベーター法および塩基配列解析（シーケンス）で検出した薬剤耐性変異の比較

	L 180 M	A 181 T	T 184 A	T 184 F	T 184 L	S 202 G	M 204 I	M 204 V	M 250 I	M 250 L	M 250 V
シーケ エンス	55	1	5	1	3	3	38	44	0	6	1
インベーター法											
陽性*	59	0	6	1	3	7	41	46	0	4	3
弱陽性**	7	14	3	0	1	19	18	13	3	4	5

75 例の臨床検体について HBV ポリメラーゼ RT ドメインのアミノ酸 156～288 番目をインベーター法およびシーケンスで解析した。シーケンスで検出した変異は全てインベーター法でも検出した。

陽性*: 野生型に対する変異型の相対比率が 20%より大きい。

弱陽性**: 野生型に対する変異型の相対比率が 2～20%。

表 3. 臨床検体から検出された薬剤耐性変異

	クローン*	薬剤耐性変異 (%)
Sample 20 (T184A)	34	1 (2.9)
Sample 02 (S202G)	46	4 (8.7)
Sample 04 (M250V)	54	3 (5.6)

インバーダー法のみで検出した耐性株を確認するために異なる耐性株を持つ 3 例についてクローニングシーケンスを行った。

*: PCR 産物のランダムクローニングにより単離したクローン数

HBV RT領域

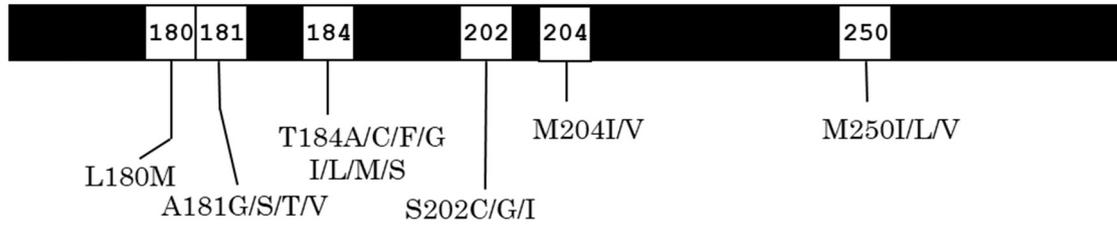


図 1. インベーター法で検出する薬剤耐性変異

ラミブジン耐性変異: L180M、A181G/S/T/V、M204I/V

アデフォビル耐性変異: A181G/S/T/V

エンテカビル耐性変異: L180M + M204V + T184A/C/F/G/I/L/M/S もしくは S202C/G/I
もしくは M250I/L/V

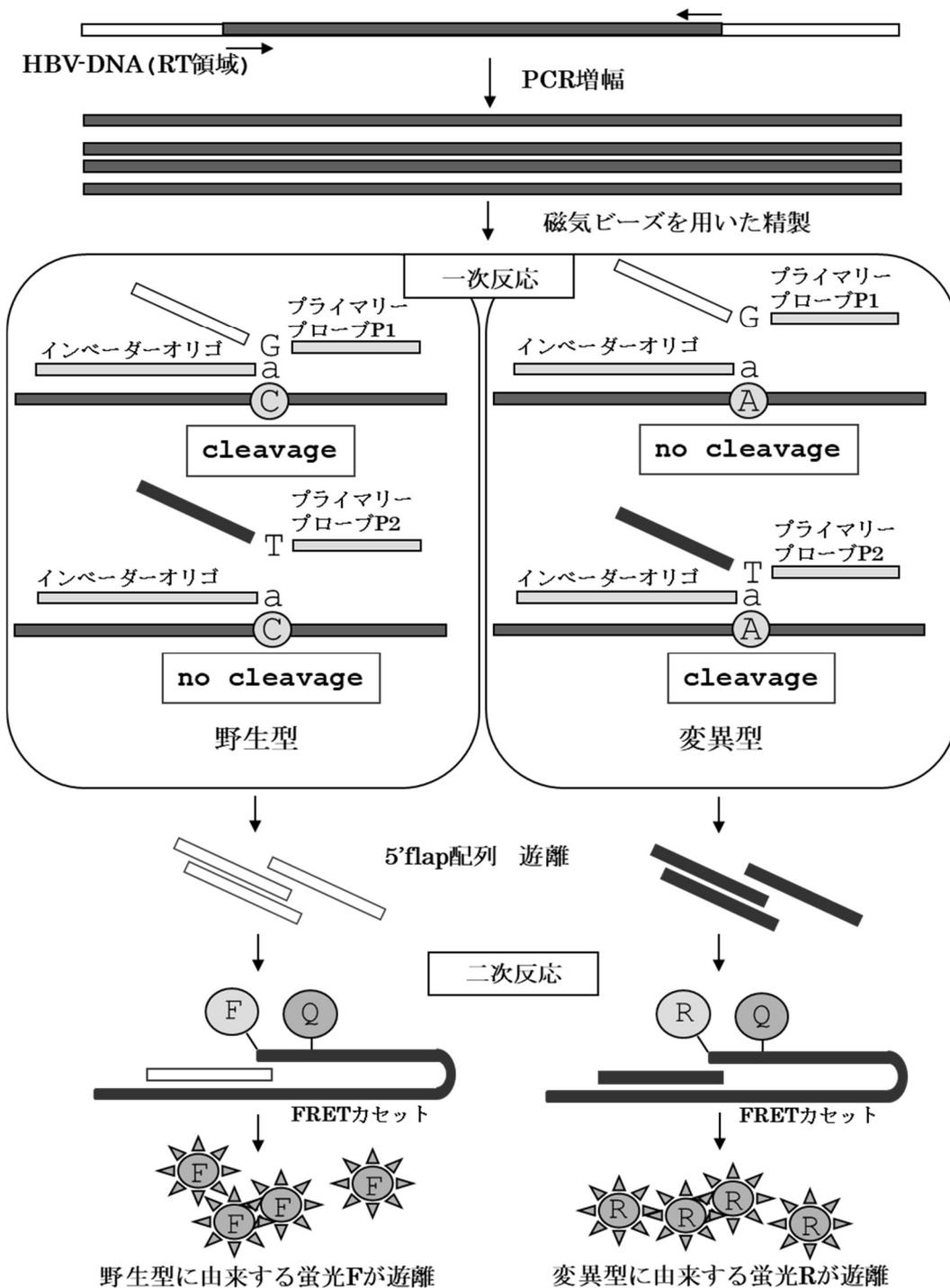


図 2. HBV 薬剤耐性変異解析におけるインベーター法の反応原理

F: FAM 蛍光色素

R: RED 蛍光色素

Q: クエンチャー (消光) 色素

5' フラップ配列: プライマリープローブの 5' 末端に位置する二次反応を発生させるための塩基配列

FRET カセット: インベーター法の二次反応に用いる共通蛍光標識プローブ

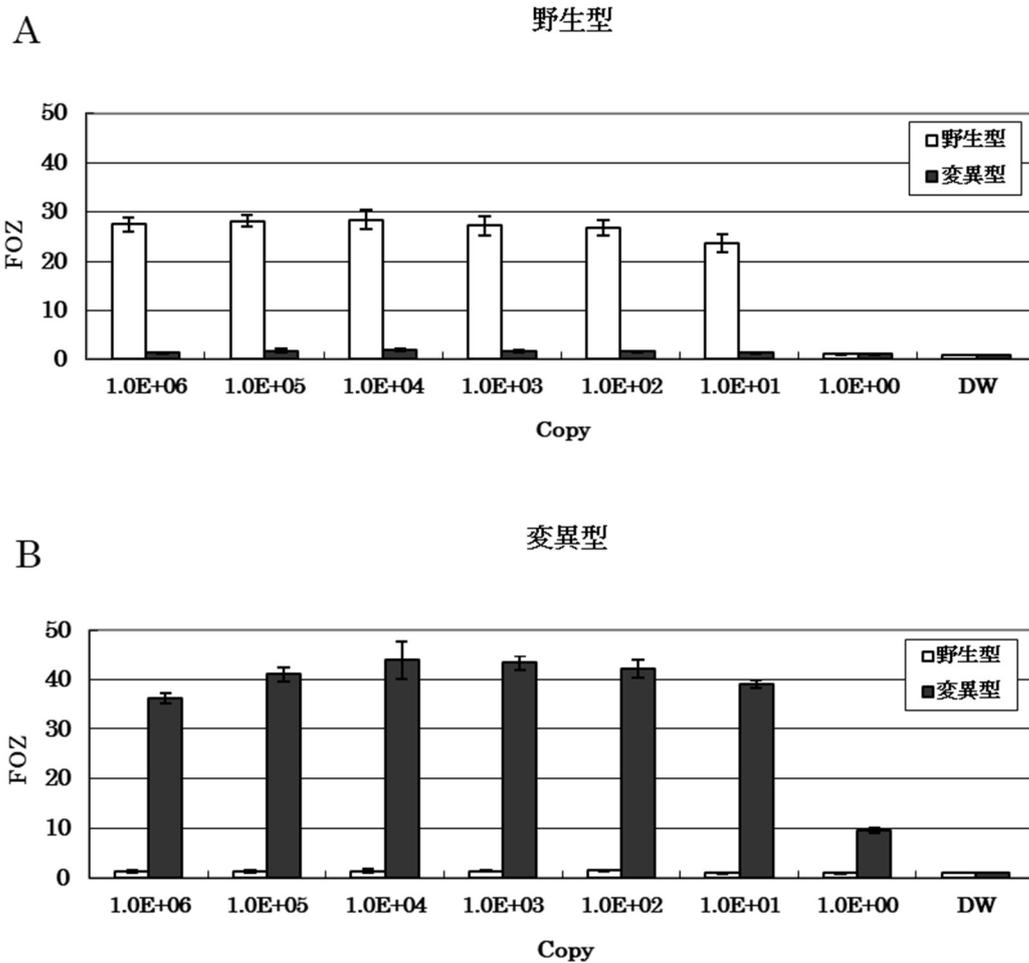


図 3. インベーター法による野生型および薬剤耐性変異の測定感度

M250V における野生型および変異型のプラスミド DNA を $1 \sim 10^6$ コピーに調製し、インベーター法で測定した。

横軸にプラスミド DNA コピー数、縦軸に 10 倍希釈系列によって生成された野生型および耐性変異の FOZ 値を示した。

エラーバーは $n=5$ で 3 回測定した際の標準偏差を示した。

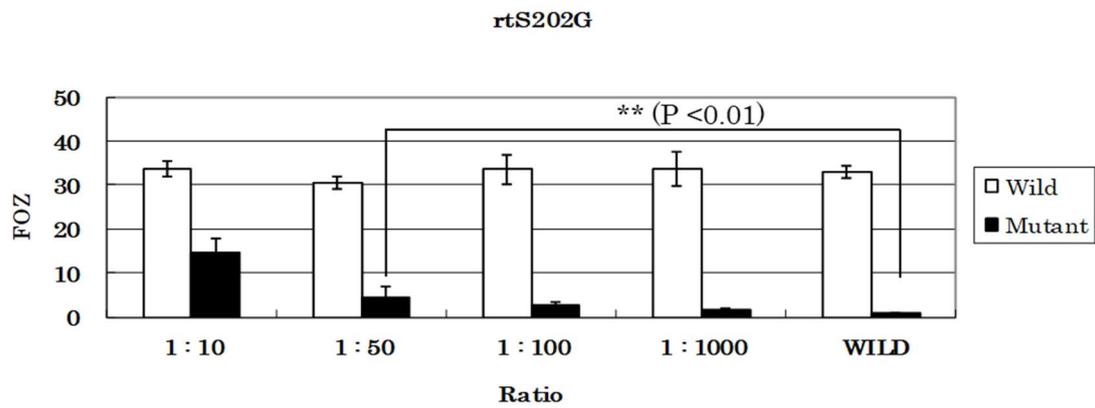


図 4. インベーター法による野生型に対する薬剤耐性変異の検出感度①
 野生型プラスミド (10^2 コピー、 5×10^2 コピー、 10^3 コピーおよび 10^4 コピー) に変異型
 10 コピーを添加した。1:50 (2%) 以上を野生型と有意差をもって判別した。
 □は野生型 FOZ 値。
 ■は変異型 FOZ 値。
 横軸にコピー数の比率 (変異型:野生型)、縦軸に FOZ 値を示した。
 エラーバーは $n=5$ で 3 回測定した際の標準偏差を示した。

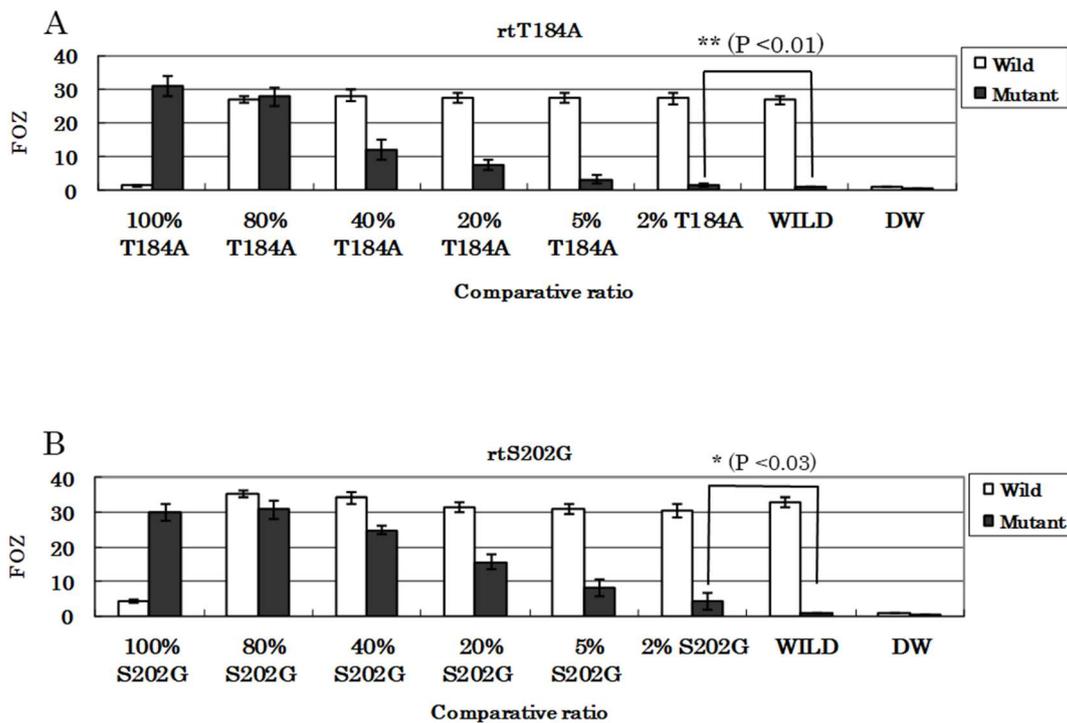


図 5. インベーター法による野生型に対する薬剤耐性変異の検出感度
 変異型プラスミド (A; rtT184A、B; rtS202G) の比率が 0, 2, 5, 20, 40, 80 および 100%
 になるように調製し測定した。いずれも 2%以上を野生型と有意差をもって判別した。
 テンプレートの総和は全て 10^3 コピー。
 横軸に変異型プラスミドの比率 (%)、縦軸に FOZ 値を示した。
 エラーバーは $n=5$ で 3 回測定した際の標準偏差を示した。

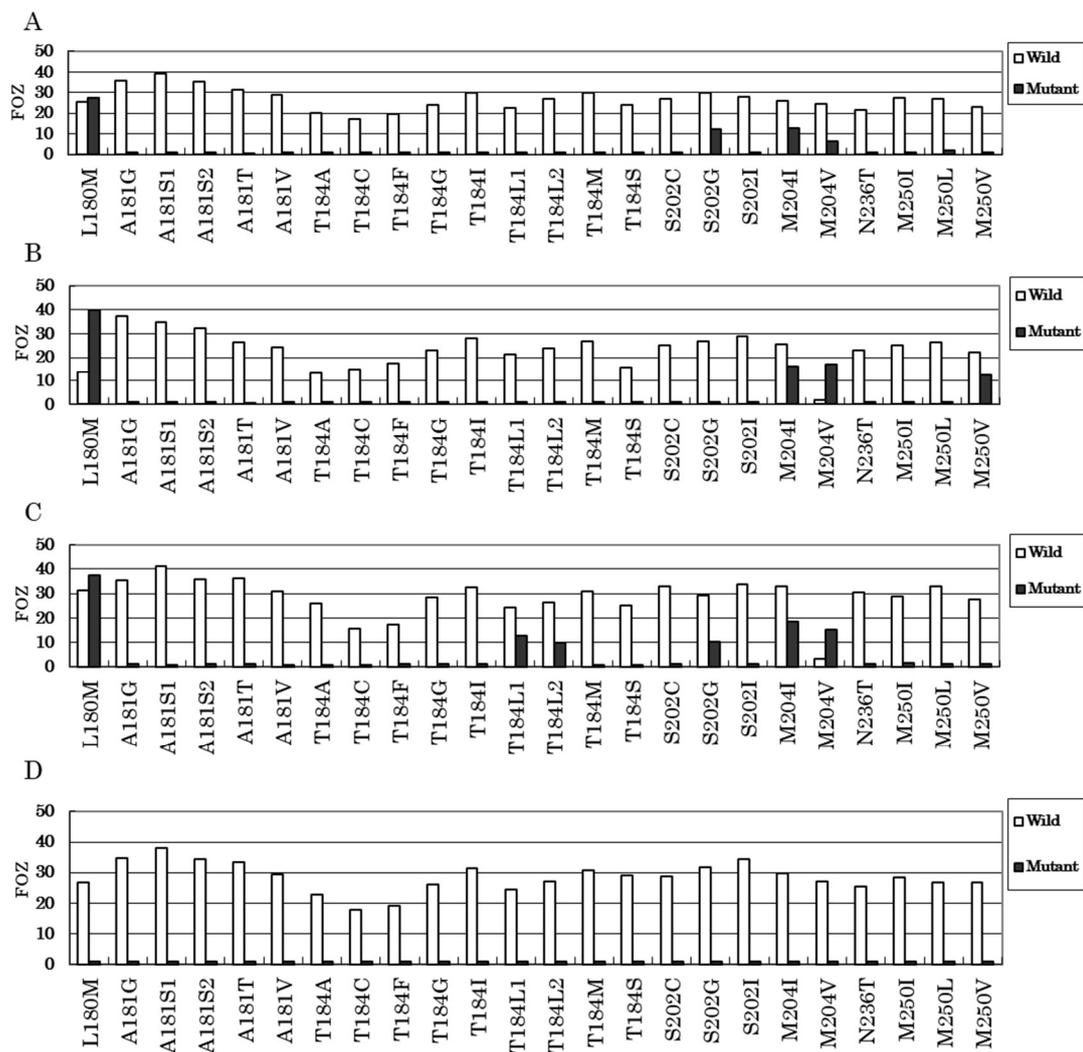


図 6. インベーター法による臨床検体 (A、B および C) と野生型プラスミド (D) の FAM-FOZ 値および RED-FOZ 値の検出パターン

□は野生型 FOZ 値。

■は変異型 FOZ 値。

横軸に各変異型、縦軸に FOZ 値を示した。

第 II 章. フラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構を利用した定量解析

第 II 章-1. *BCR/ABL* キメラ mRNA に認められる *ABL* 遺伝子キナーゼドメインアミノ酸 315 変異 (Threonine → Isoleucine) の相対比率算出による治療効果予測法の開発 (蛍光強度比を用いた簡易定量法)

(1) 緒言

慢性骨髄性白血病 (CML) の治療では Breakpoint cluster region-Abelson (*BCR/ABL*) チロシンキナーゼ活性を阻害する分子標的医薬イマチニブの投与が標準療法として確立されている (7)。しかしながら、一部にはイマチニブ抵抗性となる患者が現れることが報告されている (7)。耐性を引き起こす最も一般的なメカニズムは *BCR/ABL* キメラ遺伝子の *ABL* キナーゼドメインに起こる点突然変異であり、少なくとも 40 のミスセンス変異が報告されている (15)。そのなかでもアミノ酸 315 番目の変異 (Threonine → Isoleucine) (T315I 変異) は第二世代のダサチニブおよびニロチニブにも統計学的に優位に高い耐性を示す (61)。耐性変異のなかで T315I 変異の占める割合は 12-20%にもおよび (58, 94)、その検出方法については様々な手段が試みられてきた。20%以上の変異を検出するのであれば最も標準的な手段としてはダイレクトシーケンスが挙げられる (74)。早期発見を目的として 0.01%までの微小な変異を検出するのであれば Allele-specific oligonucleotide PCR (ASO-PCR) が有効であるが、ごく少数の変異を有する細胞がチロシンキナーゼ阻害剤投与前に既に存在している場合があり、この変異を有する細胞の存在が必ずしも耐性獲得と結びつかない可能性も指摘されている (69, 94)。そのためチロシンキナーゼ阻害剤を用いた治療においては変異クローンの野生型に対する相対比率をモニタリングしつつ、*BCR/ABL* キメラ mRNA を定量することが重要と考えられる。しかしながら、高感度に相対比率を求めることは困難である上に既存の定量法を採用するには *BCR/ABL* キメラ mRNA の長さが障害となる (12, 29, 68)。この章では PCR-インベーター法を用いて *BCR/ABL* キメラ mRNA 中の T315I 変異クローンを相対定量解析 (1-100%) する方法について述べた。さらに、その測定感度と有用性について検証するために臨床検体における T315I 変異クローンを測定し、結果を ASO-PCR およびダイレクトシーケンスと比較した。

(2) 方法

・臨床検体

埼玉医科大学において矢ヶ崎史治医師により本研究におけるインフォームドコンセント

の得られた*BCR/ABL* キメラmRNA変異クローンを持つ2例の患者から採取した骨髄液12検体を使用した。

症例Aは、フィラデルフィア陽性の急性リンパ芽球性白血病（ALL）と診断された67歳の男性である。1回のイマチニブ併用化学療法後に完全寛解を達成したが、診断から3ヵ月後にE255K/VおよびT315I変異クローンを伴う再燃が確認され、ニロチニブ治療の日本第I/II試験に登録された。その後、病態の進行に伴ってT315I変異クローン優位となり、ニロチニブ投与は中止された。

症例Bは、CMLの慢性期と診断され、イマチニブで治療を開始した54歳の女性。彼女は急性転化後イマチニブ抵抗となり、ダサチニブ療法のフェーズI/II試験に登録された。1年間の治療後、T315I変異クローンを伴う2度目の急性転化を発症したため、T315I変異クローンを標的とするpan-Auroraキナーゼ阻害剤であるトザセルチブの第II相試験に登録された。

・ RNA抽出および逆転写反応

骨髄液からのRNA抽出にはQIAamp RNAeasy kit（キアゲン）を使用した。cDNAは、1 µgのRNAとSuperScript VILO cDNA Synthesis Kit（ライフテクノロジー）を使用し、キットプロトコールに従って合成した。

・ ASO-PCR

PCR-インベーター法と結果を比較するため定性および定量ASO-PCRでT315I変異クローンを測定した。定性ASO-PCRではMultiNA マイクロチップ電気泳動システム（島津製作所）を用いてPCR産物を確認した。定量ASO-PCRではライトサイクラー480（ロシュ・ダイアグノスティクス）を使用しT315I変異クローンの相対比率を求めた。

・ インベータープローブの設計

National Center for Biotechnology Information (NCBI)データベースから*ABL1*遺伝子配列（アクセッション No. NM_007313）を取得し、この配列をリファレンスとして変異型検出用プライマリープローブ（5'- CGCGCCGAGGTTGAGTTCATGACCTACG<アミノ化>-3'）、野生型検出用プライマリープローブ（5'- ACGGACGCGGAGCTGAGTTCATGACCTACG< amino>-3'）およびインベーターオリゴ（5'- ACCCGGGAGCCCCGTTCTATATCATCAA -3'）を設計した。プライマリープローブの下線部分はインベーター反応におけるフラップ配列を示す。インベーター反応における検出感度および再現性の検討にはプライマリープローブおよびインベーターオリゴ結

合部分の相互配列であるターゲットオリゴ（変異型：5′ -
TCCCGTAGGTCATGAACTCAATGATGATATAGAACGGGGGCTCCCGGGTGC-3′、
野生型：5′ -
TCCCGTAGGTCATGAACTCAGTGATGATATAGAACGGGGGCTCCCGGGTGC-3′）
を使用した。

- ・インバーダー反応による T315I 変異クローンの検出

384 ウェルプレートに Cleavase XI Invader core reagent kit (Amplified DNA)
(T.W.T.)、各 70 nM プライマリープローブ、7 nM インバーダーオリゴおよびテンプレ
ート DNA を加え、63°C で反応させた。変異型を検出する FAM 蛍光と野生型を検出する
REDmond RED (Epoch Bioscience) 蛍光を 10 分後に測定した。測定値は、測定間差を
標準化するために陰性コントロールの値で割り Fold Over Zero (FOZ) 値で表した。

- ・インバーダー反応における測定感度および再現性

1×10⁶~5×10⁹コピーに調製したターゲットオリゴを用いて測定下限の検討を行った。
5重測定を3回行い、再現性について検討した。ターゲットオリゴを変異型の比率が1、5、
10、50、75および100%になるように混合し、相対比率の検討を行った。

- ・PCR 増幅

臨床で使用するためにはより少ないテンプレート DNA を測定できるよう、改良が必要
となる。本測定系の測定感度を上昇させるため、PCR 増幅を加えた。PCR 条件は PCR 産
物が 5×10⁸ コピー/2 μL の時にプラトーに達するよう調整した。BCR 領域に設定した 20
μM AF1 プライマー (5′- GGAGCAGCAGAAGAAGTGTTTCAGA -3′)、ABL 領域に設定
した 20 μM AR8 プライマー (5′- GCCTGCAGCAAGGTACTCACAGC -3′)、10×PCR
buffer、2 mM MgSO₄、0.4 mM d-NTP および 1 U Platinum Taq DNA Polymerase
High Fidelity (ライフテクノロジー) をテンプレート DNA と混合し 25 μL 反応液とし
た。PCR は GeneAMP PCRsystem9700 (ロシュ・ダイアグノスティクス) を用いて
94°C 2分反応させた後、95°C 15秒、60°C 30秒、68°C 1分で50サイクルし、68°C
7分反応させた。PCR 産物の精製および熱処理については「1. HBV 遺伝子型判定法の確
立」と同様に行った。

・ T315I変異型クローンおよび野生型プラスミドとシーケンス解析

T315I変異型クローンおよび野生型のPCR産物をpCR II-TOPO（ライフテクノロジー）ベクターに組み込み、プラスミドを作製した。シーケンス解析についてはModel 3130 fluorescent DNA sequencerおよびBigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ）を用いてダイデオキシ法でシーケンスした。

・ PCR-インベーター法における測定感度および再現性

T315I変異型および野生型プラスミドをテンプレートとしてPCR-インベーター法の測定感度、再現性について検討した。測定感度の検討には $1\sim 10^7$ コピーに調製したプラスミド溶液の希釈系列を使用した。また $n=5$ で3回測定し、再現性について検討した。

(3) 結果

PCR-インベーター法の T315I 変異型検出感度

ターゲットオリゴの量が $10^6\sim 10^9$ コピー間で濃度依存的に FOZ 値は増加した。インベーター反応の検出下限は T315I 変異型および野生型ともに 5×10^6 コピーであった（図 2）。このことから 1%の検出感度を得るためには 5×10^8 コピー以上の標的テンプレート DNA が必要となる。T315I 変異型プラスミドに野生型プラスミドを、0, 1, 5, 10, 50, 75 および 100%の割合で混合し測定した結果、相対比率に比例して T315I 変異型の FOZ 値が増加した（図 3）。T315I 変異型および野生型プラスミドの希釈系列（ $1\sim 10^7$ コピー）を PCR 増幅した結果、テンプレート量 $10\sim 10^7$ コピーにおいてインベーター反応に必要な 5×10^8 コピー/2 μL の PCR 産物を得た（図 4）。10 コピーの T315I 変異型プラスミドに 1:1、1:10、1:100、1:1000 の割合で野生型プラスミドを混合し測定した結果、1:100（1%）まで変異型を検出可能であった（図 5）。

T315I 変異型を相対定量する公式

テンプレート DNA の量がインベーター反応に及ぼす影響を確認するために総テンプレート量を $10^3\sim 10^6$ コピーにして検討したが、T315I 変異型 0, 1, 5, 10, 50, 75, 85 および 100%に調製した混合プラスミドの FOZ 値に差はみられなかった。相対定量値を求めるために T315I 変異型の FOZ 値で野生型の FOZ 値を割り、「商 (quotient 値)」を求めたところ、quotient 値は変異型オリゴの相対比に反比例し、テンプレート DNA の量にかかわらず一定の値を示した。図 6B に 1~85%における相対比率と quotient 値の相関を示し

た。相対比率と *quotient* 値は、相関式[A]: $0.713x-0.573$ (決定係数は 0.983) で解析可能であることが示された。そこで、この相関式[A]を相対定量解析の標準曲線と定義し、臨床検体における相対定量解析を試みた。

BCR/ABL mRNA 陽性臨床検体における T315I 変異率

臨床検体における T315I 変異クローンを 4 種類の方法で測定した (図 7 および 8)。定性、定量 ASO-PCR および PCR-インベーター法では全ての検体から T315I 変異を検出可能であった (12 / 12)。しかし、PCR 増副産物のサンガー法によるダイレクトシーケンズでの検出率は 83.3% (10 / 12) に留まった。PCR-インベーター法と比較するために定量 ASO-PCR で求めた T315I 変異 mRNA 量を全 *BCR/ABL* mRNA 量で割り、T315I 変異率を求めた。両方法の結果を比較したところ、決定係数 0.951 と良好な相関が得られることが明らかとなった (図 8)。2 症例における T315I 変異クローンの比率変化を時系列で測定した (図 9) ところ、T315I 変異クローンの比率は症例 A では 1 ヶ月の間に 8.3% から 56.8% に上昇し手いたことが明らかになった。しかし、トザセルチブの投与を受けた症例 B では 66.0% からおよそ 20% まで経時的に減少しており、トザセルチブにより T315I 変異細胞が減少していく様子が観察された。

(4) 考察

PCR-インベーター法を用いて *BCR/ABL* mRNA 中の T315I 変異クローンの比率を測定する方法を確立した。PCR-インベーター法は 1% の測定感度で 10 コピーの T315I 変異クローンを検出可能であった。T315I 変異型および野生型の配列を持つターゲットオリゴを用いたインベーター反応の測定感度の検討では、FOZ 値で 5×10^6 コピーを検出可能であった (図 2)。FOZ 値は、 5×10^9 コピーまで合成オリゴの量に比例して増加した。T315I 変異型および野生型の合成オリゴを混合して行った検討では 5×10^8 コピーにおける 1% の T315I 変異型を検出した (図 3)。インベーター反応に必要な 5×10^8 コピーを得るためにテンプレート DNA を PCR 増幅した。PCR により $10 \sim 10^7$ コピーのテンプレート DNA で T315I 変異型、野生型ともに一様な FOZ 値を得ること可能になった (図 4)。この結果から、PCR-インベーター法に必要なテンプレート量は 10 コピーとした。PCR-インベーター法においてもインベーター法と同様に 1% の T315I 変異型を検出した (図 5)。言い換えれば、1% の T315I 変異型クローンを検出するためには 10^3 コピーのテンプレート DNA が必要であった。しかし、テンプレート DNA 量が 10^3 コピーに満たなかったとしても野生型より比率が高ければ T315I 変異型の相対比率を求めることは可能と思われた。例えば $1 \mu\text{g}$ RNA 中に 10^4 コピーの *BCR/ABL* mRNA が存在していれば 1% の T315I 変異型クローンを検出し、*BCR/ABL* mRNA が 2×10^2 コピーであったとしても T315I 変異型クローンの存在比率が 50% (10^2 コピ

一) あれば検出できる。PCR-インベーター法の性能を検証するために、T315I変異陽性となった2症例の時系列サンプルについて定量ASO-PCRと結果を比較した。変異率8.3～60.6%において両法の結果は高い相関性を示した(決定係数 $R^2=0.951$)。2検体(8.3%、14.3%)については定性および定量ASO-PCR、PCR-インベーター法ではT315I変異を検出したが、ダイレクトシーケンスでは検出できなかった(図7および図8)。今回の検討により、PCR-インベーター法は3つの特徴を有していることが明らかとなった。①測定感度はダイレクトシーケンスより高い②高額な検出装置は不要③定量値は定量ASO-PCRと高い相関を示す(表1および図8)。今回測定した2症例のうち、Case Aは*BCR/ABL* mRNAのABLキナーゼ領域に別の二つの変異(E255KとE255V)を持っていたが、T315I変異率の測定には影響しなかった。Case Bではpan-Auroraキナーゼ阻害剤であるトザセルチブによるT315I変異率の低下を捉えることが出来た。また*BCR/ABL* mRNAにおけるT315I変異率はmRNA量と異なった動態を示していた。PCR-インベーター法を用いた*BCR/ABL* mRNA中のT315I変異相対定量法はダイレクトシーケンスより高感度であった。再発時のABLキナーゼ領域の変異解析に有効と思われた。

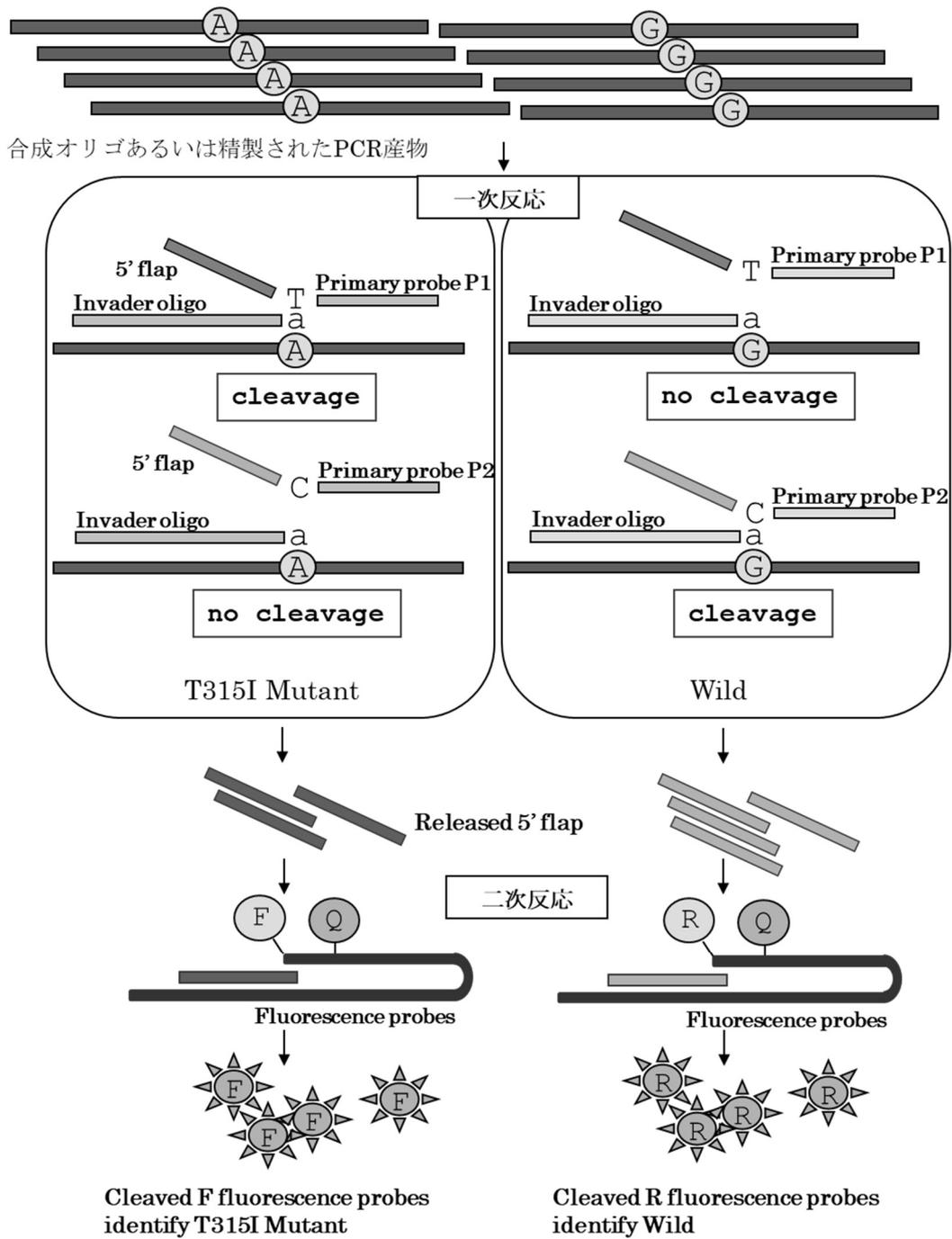


図 1. T315I 変異を検出する PCR-インベーダー法の反応原理

F: FAM 蛍光色素 R: RED 蛍光色素

Q: クエンチャー (消光) 色素

5' フラップ配列:プライマリープローブの 5' 末端に位置する二次反応を発生させるための塩基配列

FRET カセット: インベーダー法の二次反応に用いる共通蛍光標識プローブ

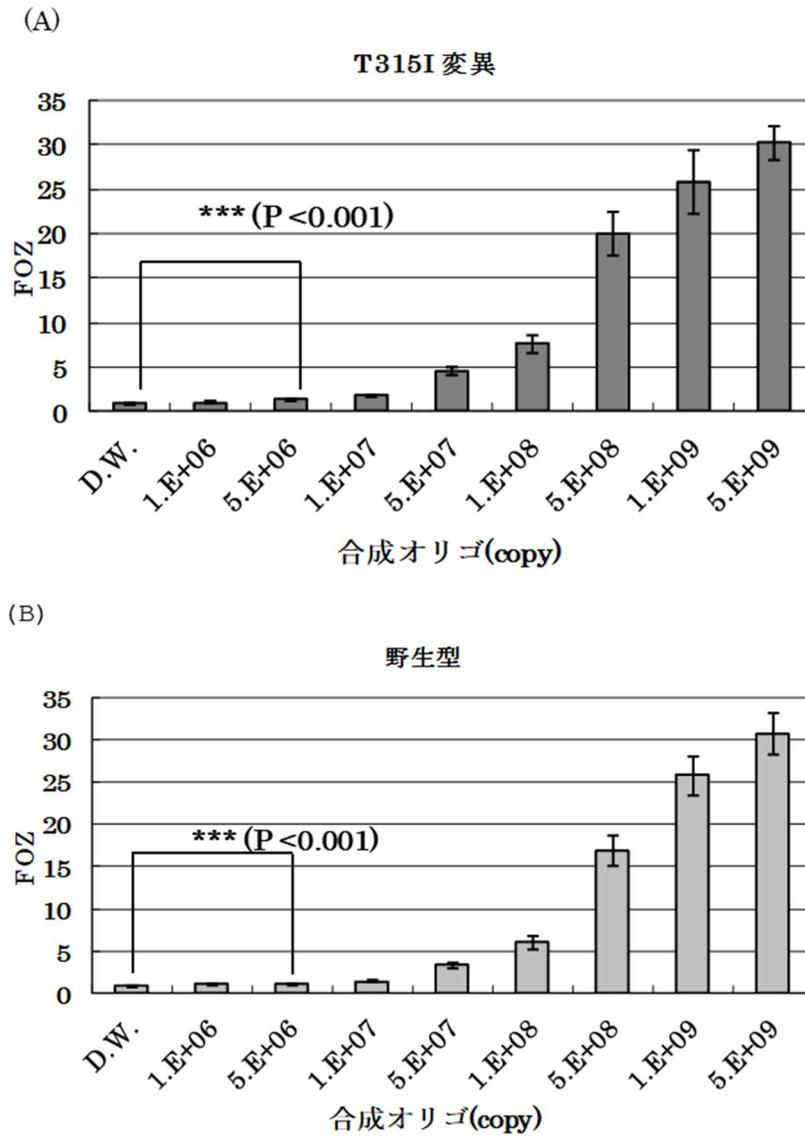


図 2. インベーター法における合成オリゴ希釈系列の測定

$1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^9$ コピーに調製したターゲットオリゴを用いて測定下限の検討を行った。

検出下限は T315I 変異型および野生型ともに 5×10^6 コピー。

縦軸: FOZ 値 横軸: コピー数

$1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^9$ コピーに調製した T315I 変異型 (A) および野生型 (B) の合成オリゴにおける FOZ 値。エラーバーは、 $n=5$ の回測定における標準偏差を示す。陰性コントロールとして蒸留水 (DW) を用いた。*** $P < 0.001$ (t 検定による)

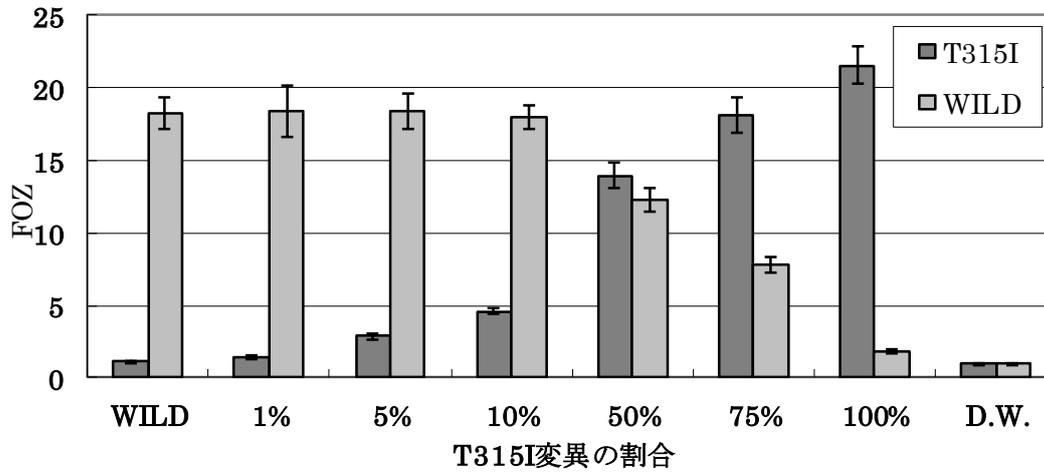


図 3. インベーター法における野生型/T315I 変異型の混合合成オリゴの測定
 T315I 変異型の割合が 0,1,5,10,50,75 および 100%となるよう調製した合成オリゴ (5×10^8 コピー) をインベーター法で測定した。相対比率に比例して T315I 変異型の FOZ 値が増加した。

縦軸: FOZ 値 横軸: T315I 変異型比率

エラーバーは、n=5 の 3 回測定における標準偏差を示す。T315I 変異型の FOZ 値は濃い灰色。野生型の FOZ 値は薄い灰色で示した。

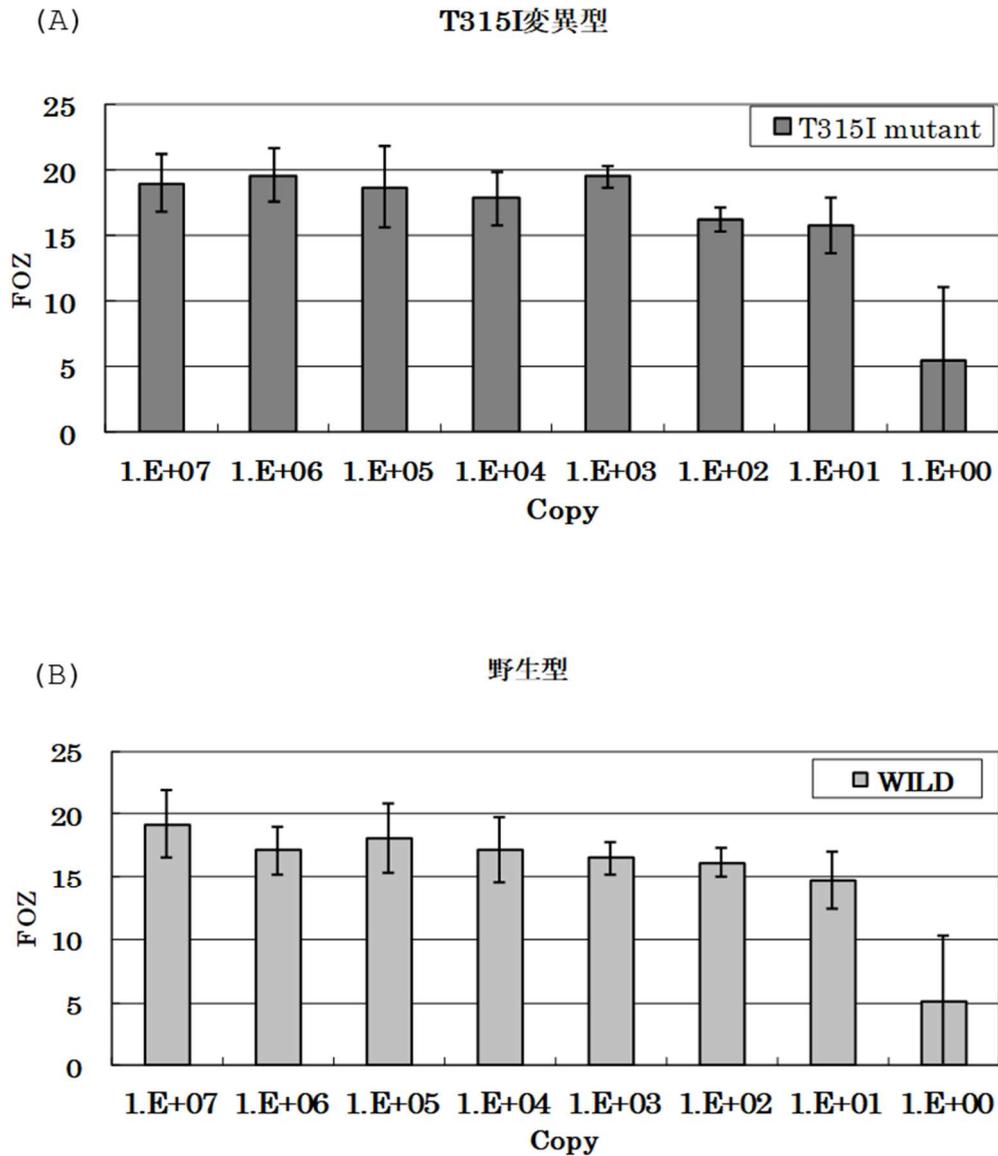


図 4. PCR-インベーター法における T315I 変異型 / 野生型プラスミド DNA 希釈系列の測定

1~10⁷ コピーに調製した T315I 変異型/野生型プラスミド DNA の希釈系列をテンプレートとして測定した。テンプレート量 10~10⁷ コピーにおいてインベーター反応に必要な 5×10⁸ コピー/2 μL の PCR 産物を得た。

縦軸: FOZ 値 横軸: コピー数

エラーバーは、n=5 の 3 回測定における標準偏差を示す。

(A) : T315I 変異型 (B) : 野生型。

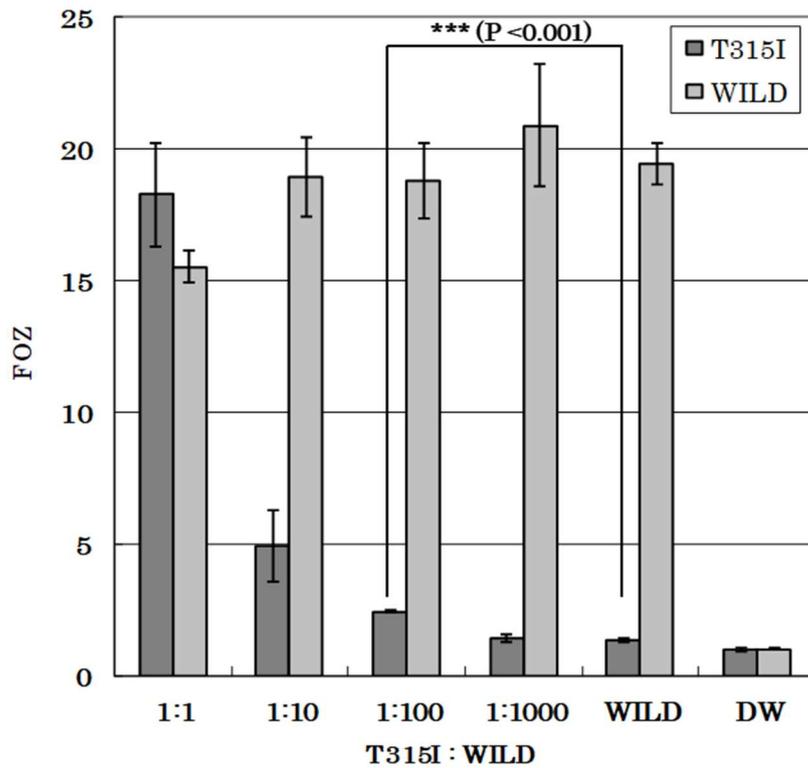


図 5. PCR-インベーター法における測定感度

10 コピーの T315I 変異型プラスミドを 1:1～1:1000 の割合で野生型と混合し、PCR-インベーター法で測定した。1:100 (1%) まで変異型を検出可能であった。

縦軸: FOZ 値 横軸: 変異型と野生型の比率

エラーバーは、n=5 の 3 回測定における標準偏差を示す。

*** P < 0.001 (t 検定による)

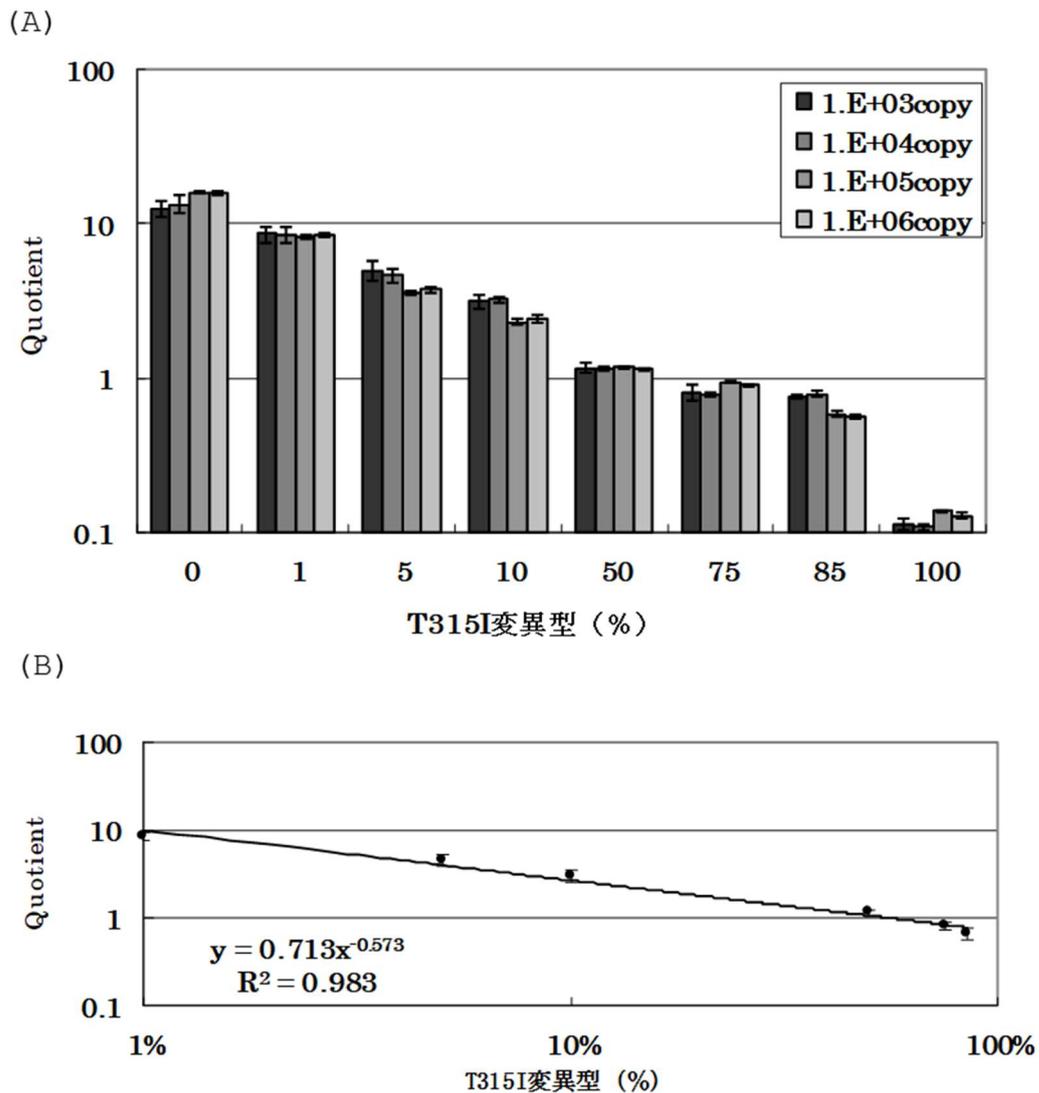


図 6. 定量的 PCR-インベーター法を用いた相対定量解析のための標準曲線の作成
総量 $10^3 \sim 10^6$ コピーに調製した 0, 1, 5, 10, 50, 75, 85 および 100%T315I 変異型プラスミ
ドを PCR-インベーター法で測定した。

T315I 変異型の FOZ 値で野生型の FOZ 値を割り、「商 (Quotient 値)」を求めた。

縦軸: Quotient 値 横軸: T315I 変異型比率

エラーバーは、 $n=5$ の 3 回測定における標準偏差を示す。

(A) 各割合のプラスミド DNA における Quotient 値。y 軸は対数スケール。

(B) Quotient 値から作成した標準曲線。

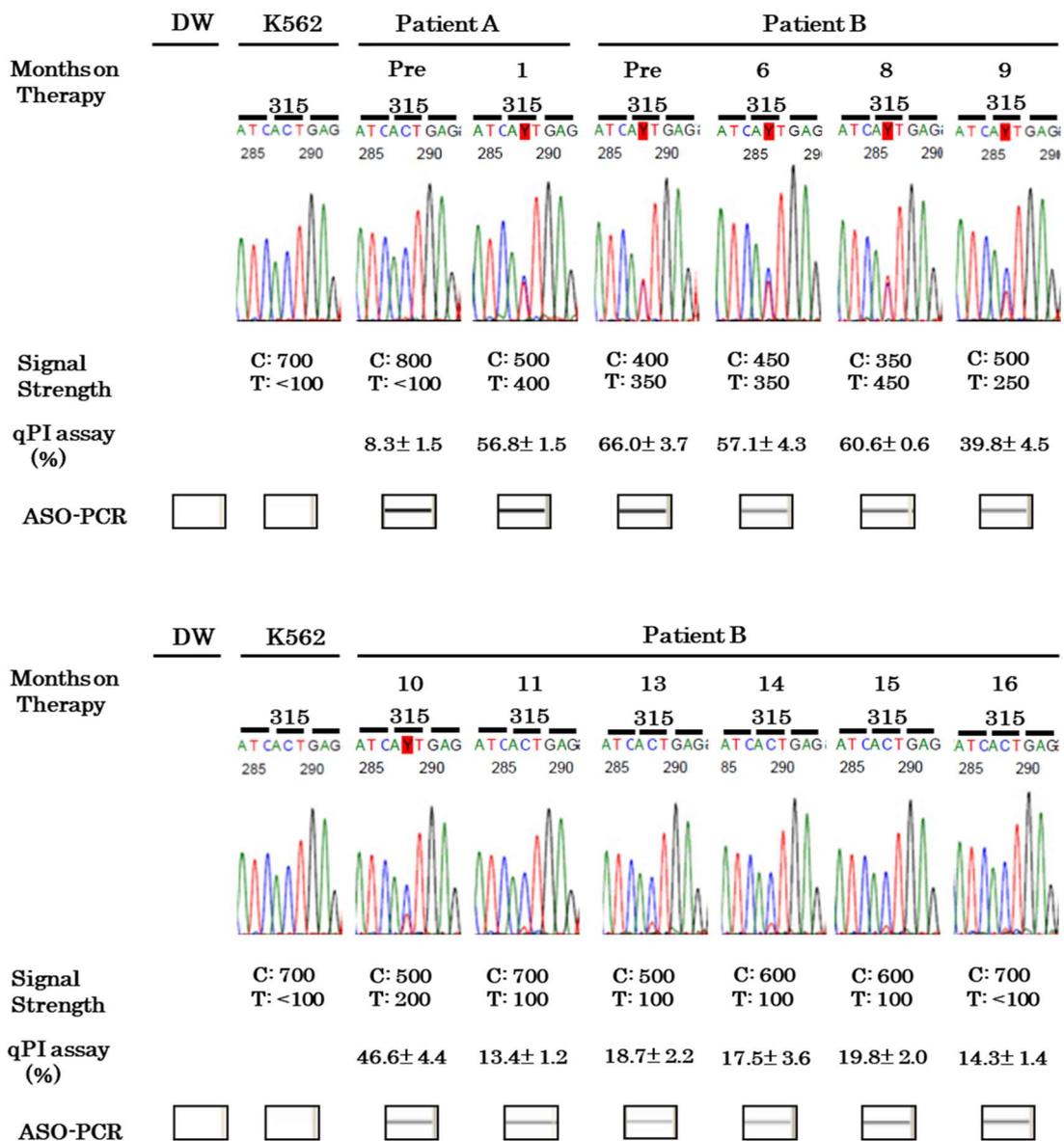


図 7. ダイレクトシーケンス、定性 ASO-PCR および定量的 PCR-インベーター法の比較
症例 A (Patient A) と症例 B (Patient B) の時系列サンプルについてダイレクトシーケ
ンス、定性 ASO-PCR および定量的 PCR-インベーター法の結果を比較した。

シーケンス解析の波形図は、ABL 領域のアミノ酸 314、315 および 316 を示した。

Signal Strength: アミノ酸 315 の第二コドンにおける C/T のシグナル強度を示した。

ASO-PCR: 定性 ASO-PCR における増幅産物は MultiNA マイクロチップ電気泳
動システムを用いて泳動した。

qPI assay (%) : 定量的 PCR-インベーター法は n=5 で 3 回測定し、相対定量値 (%)
(平均±S.D.) を求めた。

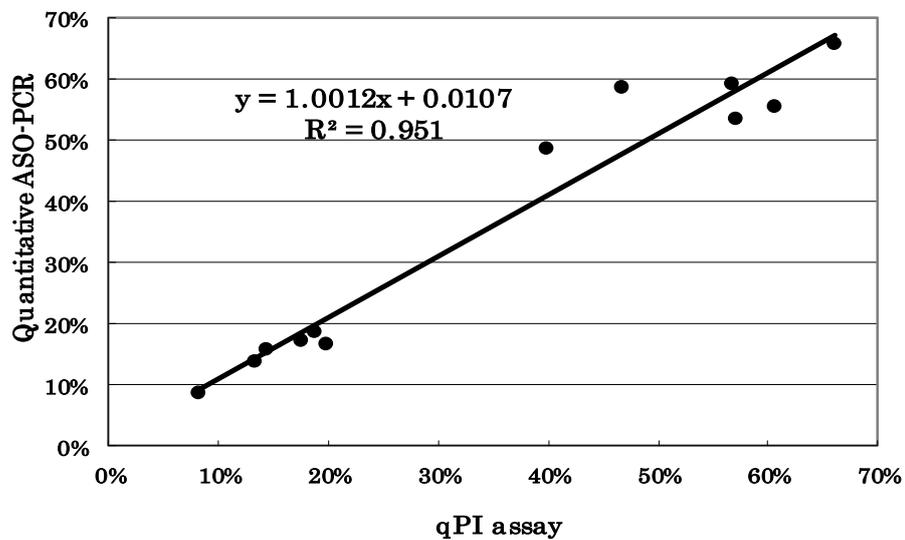


図 8. 定量 ASO-PCR と定量的 PCR-インバーダー法における T315I 変異率の相関
 PCR-インバーダー法と比較するために定量 ASO-PCR で求めた T315I 変異 mRNA 量を全 *BCR/ABL* mRNA 量で割り、T315I 変異率を求めた。両法の相対定量値は線形近似曲線における決定係数: 0.951 と良好な相関性を示した。
 縦軸: 定量 ASO-PCR における T315I 変異率
 横軸: 定量的 PCR-インバーダー法における T315I 変異率

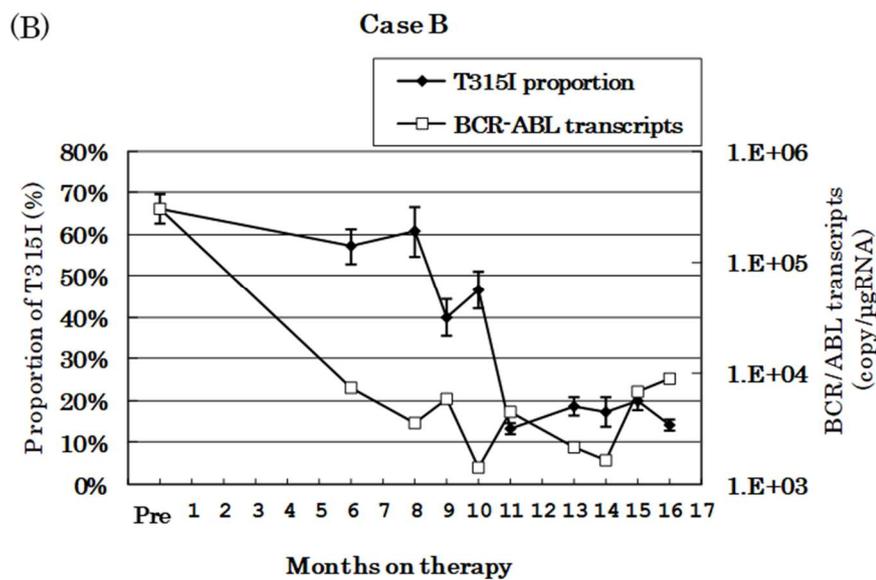
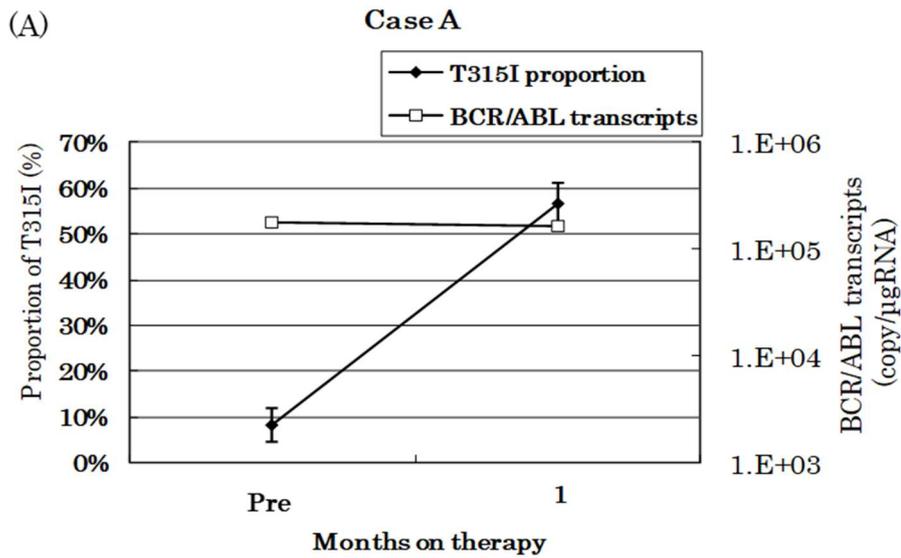


図 9. 2 症例における T315I 変異型相対比率の変化

左縦軸: T315I 変異率

右縦軸: *BCR/ABL* mRNA 量 (コピー/ μ gRNA)

横軸: 治療経過数 (月)

(A) 症例 A : T315I 変異型相対比率は 8.3% から 56.8% に増加した。

(B) 症例 B : 16 ヶ月以上にわたってモニタリングした結果 T315I 変異型相対比率は急に低下し 20% 前後で推移した。

BCR/ABL mRNA 量はリアルタイム PCR で測定した。

第 II 章-2. 広範囲なダイナミックレンジを有するリアルタイムモニタリング定量法の開発

(1) 緒言

リアルタイム PCR はウイルスあるいは細菌を定量するために有効な方法である (50)。リアルタイム PCR では PCR 産物を検出するために蛍光標識された加水分解プローブ (TaqMan プローブ) またはヘアピン構造のオリゴヌクレオチド(モレキュラービーコン)を用いる (33, 50)。これらの測定系は高い特異性を有してはいるものの標的ごとに異なった蛍光プローブを必要とするためにコストが掛かる。異なるターゲットをリアルタイム PCR で検出する際に共通の蛍光標識プローブを用いることができれば低コストかつ効率的に測定を行える。インベーター法はゲノムあるいは PCR 産物上に存在する一塩基多型 (SNPs) を簡便に判別する方法として開発された ((47)。この技術は様々なターゲットに対して共通した蛍光プローブを使用できるため、多くのサンプルを安価に測定することが可能である。

この章ではリアルタイム PCR とインベーター反応を組み合わせた新たな測定法について述べる。この方法は次にしめす 3 つの特徴を持っている。

- ①測定時間の短縮
- ②プローブ設計時の低コスト化
- ③汎用蛍光プローブを使用

この測定法の性能評価のためにヒトパピローマウイルス 16 (HPV16) の測定系を構築し、加水分解プローブを用いたリアルタイム PCR (52) と結果を比較した。

(2) 方法

- ・コントロール DNA

American Type Culture collection (ATCC) より HPV16 のゲノム DNA (No.45113D) を購入した。PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (インビトロジェン) を用いて DNA 濃度を測定し、HPV16 のゲノムサイズからコピー数を算出した。この DNA から希釈系列を作製し、陽性コントロールとして使用した。

- ・子宮頸部サンプルからの DNA 抽出

本検討は石渡病院において石渡勇医師により本研究におけるインフォームドコンセントを取得した検体を用いて後茨城県立保健衛生研究所の倫理委員会の承認を受け実施した。子宮頸部サンプルは、Cervex-Brush (Rovers Medical Devices) で採取された後

SurePath (TriPath)に懸濁され、4°Cで6~12ヶ月茨城県立公衆衛生研究所で保管されたものを使用した。SurePath 懸濁液 500 µLから QIAGEN DNA mini kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出した。

- ・インバーダープローブの設計

National Center for Biotechnology Information (NCBI)データベースから HPV16 ゲノム配列 (アクセッション No. NC_001526) を取得し、この配列をリファレンスとして検出用プライマリープローブ (5'- CGCGCCGAGGGTTCCTGCATGATAATATATGTT <アミノ化>-3')、およびインバーダーオリゴ (5'- GGATGTCCAAGTCAAGTAGTCTGGATT-3') を設計した。プライマリープローブの下線部分はインバーダー反応におけるフラップ配列を示した。

- ・インバーダー反応をともなうリアルタイム PCR (リアルタイムモニタリング定量法)

HPV16 ゲノムを増幅するための 1 µM プライマー (forward primer: 5'- AGCACGGATGAATATGTTGCACG-3' および reverse primer: 5'- CCCTGTATTGTAATCCTGATACTTTAG-3')、50 µM d-NTP、700 nM プライマリープローブ、70 nM インバーダーオリゴ、2.5 U AmpliTaq Stoffel fragment (Applied Biosystems)、および Cleavase XI Invader core reagent kit (genomic DNA 用) (T.W.T.) をテンプレート DNA と混合し 15 µL 反応液とした。PCR は LightCycler 480 (ロシュ・ダイアグノスティクス) を用いて 95°C 2分反応させた後、①95°C : 10 秒、②61°C~69°C : 10~60 秒、③50°C : 30 秒、④72°C : 30 秒の 4-step PCR を 35 サイクル行った。②において FAM 蛍光 (carboxyfluorescein; wave length/bandwidth: excitation, 485/20 nm; emission, 530/25 nm) を測定した。本測定系では PCR 増幅とインバーダー反応は図 1 に示すとおり 1 サイクル中にそれぞれのステップで進行していく。①のステップにおいて PCR 産物は熱変性により 1 本鎖となる。ステップ②でプライマリープローブおよびインバーダーオリゴが結合し、フラップエンドヌクレアーゼによりプライマリープローブの 5'-側からフラップ配列が切り離される。遊離したフラップ配列は蛍光標識された FRET カセットに結合し、フラップエンドヌクレアーゼにより、蛍光物質が遊離する (インバーダー反応)。ステップ③ではテンプレート DNA あるいは PCR 産物にプライマーが結合し、ステップ④で AmpliTaq Stoffel fragment により相補鎖が合成される。本測定系における蛍光強度の増幅曲線は加水分解プローブを用いたリアルタイム PCR と近似しているため、定量解析には LightCycler 480 ソフトウェアに含まれる fit point methods (46) を採用した。

・反応条件の検討

4-step PCR における反応温度と反応時間の最適化について検討した。インベーター反応ステップにおける温度を 61°C、63°C、65°C、67°C および 69°C に、反応時間を 10、20、30 および 60 秒に変更して測定した。陰性コントロール、 2×10^4 および 2×10^5 コピーに調製した HPV-DNA をテンプレートとして使用した。測定は全て 5 重測定で行った。

・測定感度および再現性の検討

測定感度および再現性の検討には $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$ コピーに調製した HPV-DNA 希釈系列を使用した。再現性の検討として 5 重測定を 3 回実施した。希釈系列から得られた Cp 値を基に標準曲線を作成した。

・加水分解プローブを用いたリアルタイム PCR

加水分解プローブおよびプライマーは Moberg らの報告(52)を基に合成した。HPV16 ゲノムを増幅するための 1 μ M プライマー、0.4 μ M 加水分解プローブおよび 2 \times LightCycler 480 Probes Master (ロシュ・ダイアグノスティクス) をテンプレート DNA と混合し 20 μ L 反応液とした。PCR は LightCycler 480 (ロシュ・ダイアグノスティクス) を用いて 95°C 10 分反応させた後、95°C 10 秒、57°C 30 秒、72°C 60 秒の 3-step PCR を 45 サイクル行った。定量用標準曲線はリアルタイムモニタリング定量法と同様に作成した。

(3) 結果

反応条件

リアルタイムモニタリング定量法では PCR のための DNA ポリメラーゼおよびインベーター反応のためのフラップエンドヌクレアーゼの 2 種類の酵素が必要となる。フラップエンドヌクレアーゼを除いた場合、蛍光は検出されない。また、DNA ポリメラーゼを除いた場合はインベーター反応のみによる蛍光が検出される (図 2A)。 2×10^5 コピーの HPV DNA をテンプレートとしてインベーター反応の温度を 61°C から 69°C まで 2°C 毎に変更し Cp 値の変化について検討した。それぞれの Cp (クロッシングポイント: 閾値に達したサイクル数) 値は 61°C: 15.56 ± 0.07 、63°C: 16.30 ± 0.12 、65°C: 17.41 ± 0.14 、67°C: 19.05 ± 0.16 および 69°C: 19.77 ± 0.06 となり、61°C で最も早い Cp 値が得られた。 2×10^4 コピーの HPV DNA は 65°C 以下の条件で検出された (図 3B)。しかしながら、反応温度

の低下とともに非特異的な反応も増加した（図 3C）。また、インバーダー反応の時間を 10 秒以下にした際には反応性が低下した。

測定感度と再現性

「反応条件」の結果からインバーダー反応の条件は 65°C 30 秒とした。測定下限は 2×10^1 コピーであり、 $2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^7$ コピーの間で希釈直線性が得られた（図 4A）。各ポイントにおける標準偏差は 0.28~0.94（図 4B）であった。

リアルタイム PCR との比較

性能評価のためにリアルタイム PCR とリアルタイムモニタリング定量法で同じサンプルを測定した。HPV-DNA の希釈系列を測定した際の標準曲線の傾きはリアルタイムモニタリング定量法が -3.39、リアルタイム PCR が -3.33 であった。この結果から Zhao らの報告にしたがって求めた増幅効率にはリアルタイムモニタリング定量法が 97.24%、リアルタイム PCR が 99.66% となった。標準曲線の Y 切片はリアルタイムモニタリング定量法が 35.08、リアルタイム PCR が 41.96 となり、全てのポイントで 6~8 サイクル早い C_p 値が得られた（図 4A）。また、リアルタイム PCR と比較して増幅曲線はより鋭角な立ち上がりを示した（図 4B）。本検討ではリアルタイム PCR において 132 例の細胞診検体から 14 例の HPV 16 陽性検体を検出した。この 14 例についてリアルタイムモニタリング定量法で測定し結果を比較した。陽性検体における両法の定量値は累乗近似曲線における決定係数: 0.9681 と良好な相関性を示した（図 5）。また、陰性検体から偽陽性のシグナルが生じることも無かった。

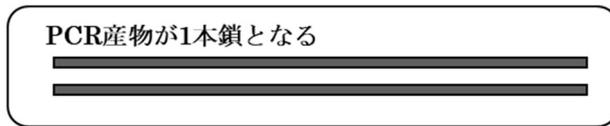
(4) 考察

この章ではリアルタイム PCR とインバーダー反応を組み合わせた新たな測定法の実用性について述べた。この方法の特徴としては PCR 増幅中にインバーダー反応によって生じる蛍光を用いることが挙げられる。至適条件を検討するために反応温度と反応時間について検討した。最も効率的な反応温度は検討したなかで最も低い 61°C であったが、65°C 以下であれば近似した検出感度を得る事が可能であった。しかしながら、プライマリープロンプの T_m 値より低い反応温度では非特異シグナルが増加した。熱変性ステップにおける時間については 10~30 秒で違いはみられなかったが、インバーダー反応による蛍光値は時間に比例しており反応時間の短縮は蛍光値の減少につながった。インバーダー反応における条件選択では二つの点に注意する必要がある。一つは、至適反応温度を求めるためには検出感度と非特異シグナルについて検討すること、もう一つは、反応時間を 20 秒以上に

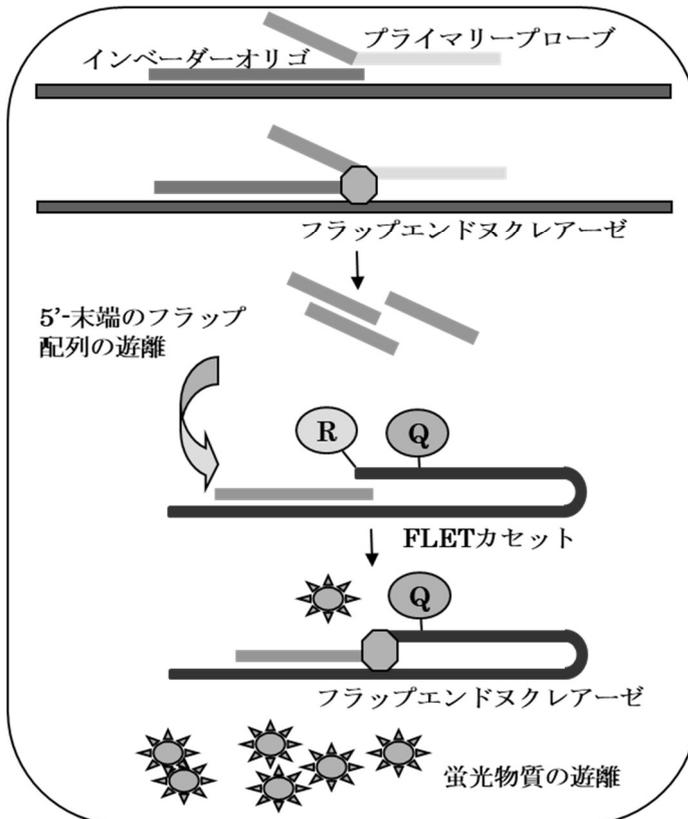
設定することである。本検討における HPV ゲノムの増幅領域は、キャプシドを構成する L1 蛋白質をコードする L1 遺伝子を選択した。この領域の配列は、データベースに多数の登録があり、遺伝子型特異的なプライマーおよびプローブの設計に適しているためである。リアルタイムモニタリング定量法とリアルタイム PCR について HPV16 DNA の希釈系列を用いた比較検討を行ったところ、増幅効率はリアルタイム PCR に及ばなかったが、6~8 サイクル早い Cp 値が全てのポイントで得られた。リアルタイム PCR と比較して Cp 値が減少した理由は、以下のように考察した。リアルタイム PCR では DNA ポリメラーゼによる TaqMan プローブの加水分解反応によって蛍光が生成されるが、この反応が生じる可能性は PCR サイクル毎に各 PCR 産物につき 1 回以下である。しかし、リアルタイムモニタリング定量法では、プライマリープローブの融解温度において複数回のインベーター反応が生じる可能性があり、さらに二次反応はテンプレート DNA に依存しないため、蛍光のシグナル強度増加がリアルタイム PCR よりも速く進み、その結果 Cp 値が減少したと考えられた。また、インベーター法では全ての測定系で共通のフラップ配列と蛍光プローブを使用できるため、リアルタイムモニタリング定量法は臨床におけるターゲットの定量解析に有用だと思われた。

本章では HPV16 DNA の簡便、迅速および安価な測定系を構築に成功したことを示した。リアルタイムモニタリング定量法の定量結果は TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR と良好な相関性を示した。HPV については 100 以上の遺伝子型が報告されている。HPV16 を含む特定の遺伝子型の感染は、子宮頸癌の最も重要な独立した危険因子である。HPV 遺伝子型解析のように多くの遺伝子型を検出しなければならないときにリアルタイムモニタリング定量法は有用なツールと考えられた。

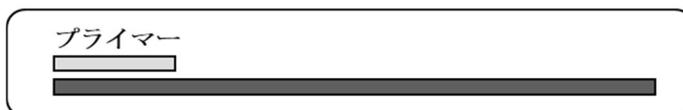
1) 熱変性 (95° C)



2) インベーター反応



3) プライマー結合 (50° C)



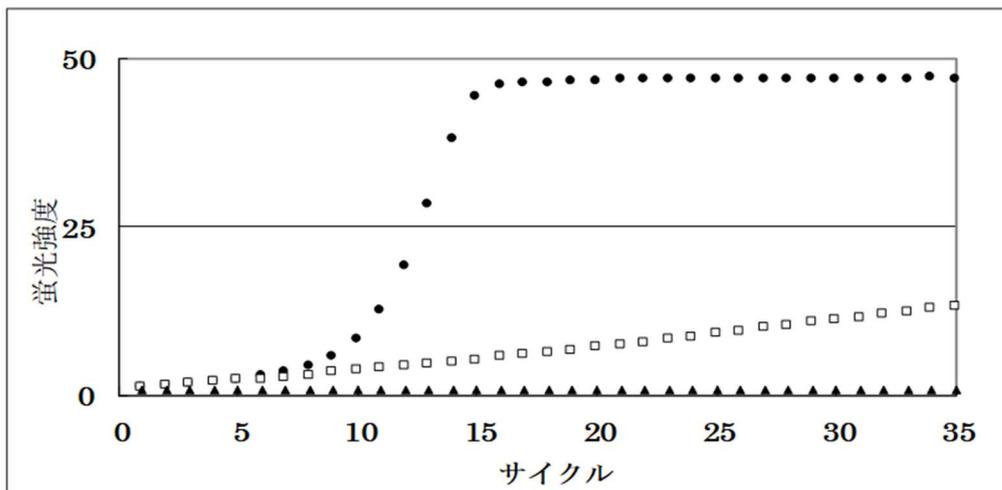
4) 伸長反応 (72° C)



図1. インベーター反応を伴うリアルタイム PCR の反応原理

リアルタイムモニタリング定量法の概略図。1) 最初のステップ (熱変性) で PCR 産物は一本鎖に変性される。2) 次のステップでプライマリプローブおよびインベーターオリゴと結合する。フラップエンドヌクレアーゼにより切断され遊離したフラップ配列は、二次反応において FLET カセットの蛍光物質を遊離させる。3) さらにプライマー結合し、4) 伸長反応のステップに進むことで PCR 産物は再び二重鎖 DNA を形成する。

A



B

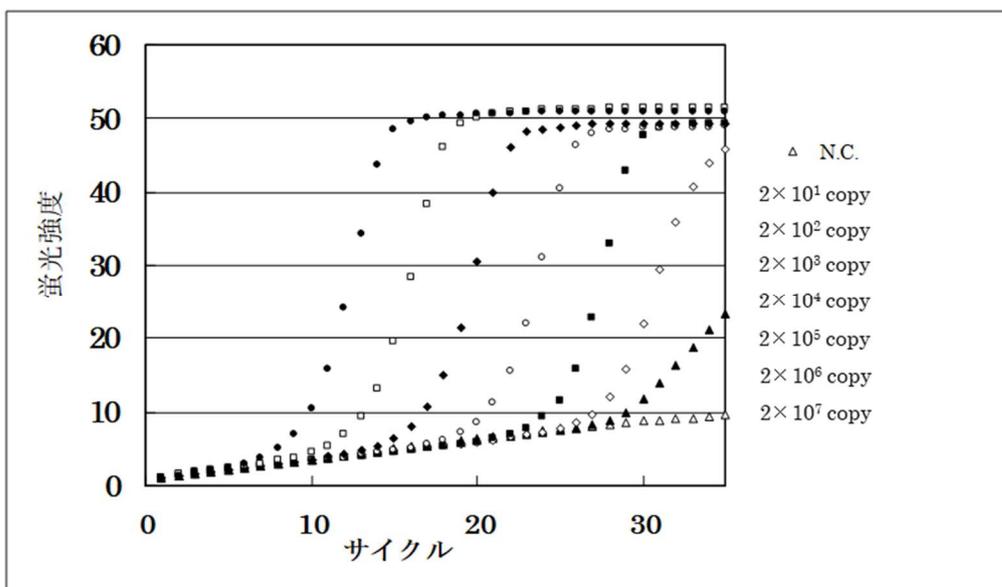


図 2. PCR とインベーター反応の組み合わせから得られる増幅曲線

(A) 増幅曲線の比較。テンプレート量はすべて 2×10^7 コピー。

DNA ポリメラーゼ + フラップエンドヌクレアーゼ (●)、DNA ポリメラーゼなし (□)、およびフラップエンドヌクレアーゼのない (▲)

(B) リアルタイムモニタリング定量法による HPV-DNA10 倍希釈系列 ($2 \times 10 \sim 2 \times 10^7$ コピー) の測定。N.C.: 陰性コントロール。

インベーター反応は、(A) および (B) とともに 65°C で 30 秒間反応させた。

縦軸：蛍光強度 横軸：PCR サイクル数

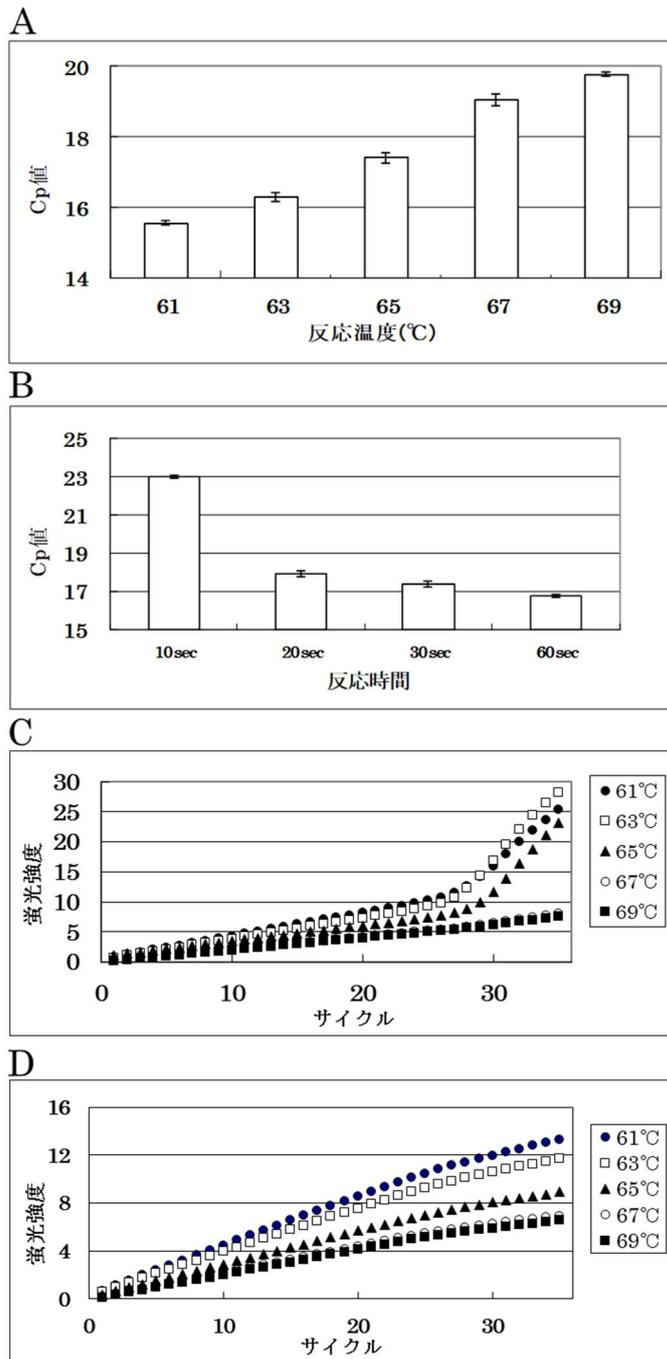


図 3. 反応条件の検討

(A) 61~69°Cにおける Cp 値 (縦軸: Cp 値、横軸: 反応温度 (°C))

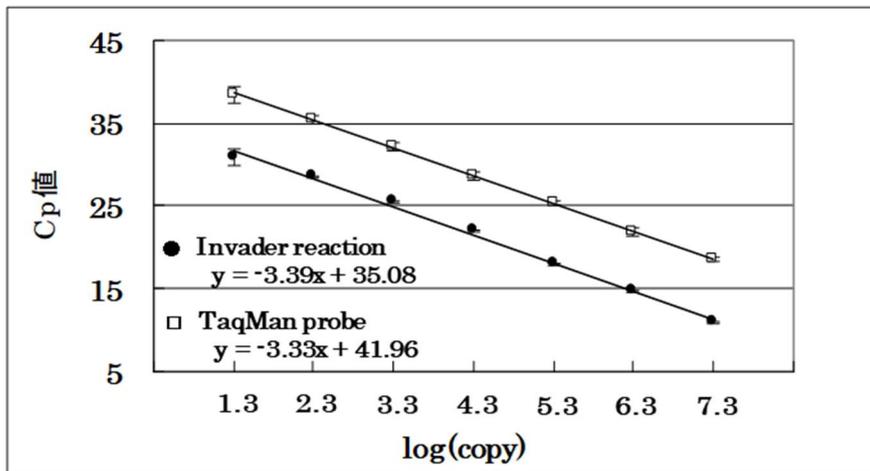
(B) 反応時間 (10~60 秒) における Cp 値 (縦軸: Cp 値、横軸: 反応時間 (秒))

(A) および (B) におけるテンプレート量は 2×10^5 コピー。エラーバーは $n=5$ の 3 回測定における標準偏差を示す。

(C) 61~69°Cにおける 2×10 コピーの増幅曲線 (縦軸: 蛍光強度、横軸: サイクル数)

(D) 61~69°Cにおける陰性コントロールの増幅曲線 (縦軸: 蛍光強度、横軸: サイクル数)

A



B

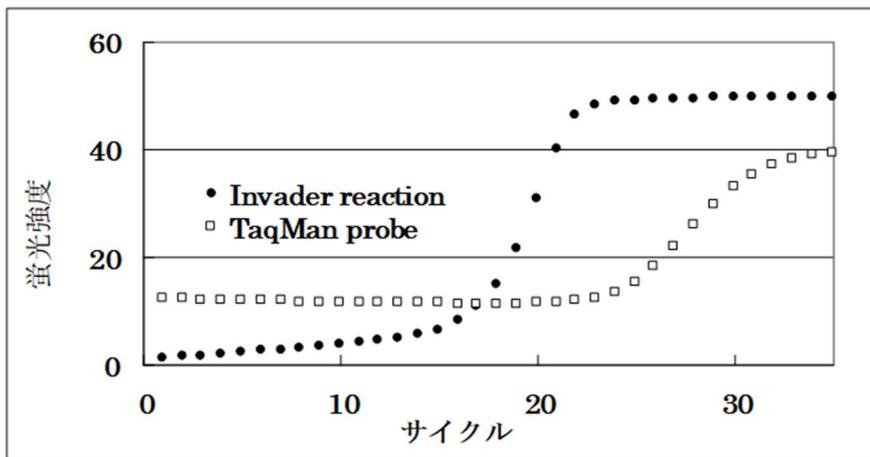


図 4. リアルタイムモニタリング定量法 (●) とリアルタイム PCR (□) における標準曲線と増幅曲線の比較

(A) 標準曲線。HPV-DNA10 倍希釈系列 ($2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ コピー) における Cp 値 (平均) をプロットし、標準曲線を作成した。エラーバーは $n=5$ の 3 回測定における標準偏差を示す (縦軸: Cp 値、横軸: コピー数 (対数))

(B) 増幅曲線。テンプレート量は 2×10^5 コピー (縦軸: 蛍光強度、横軸: サイクル数)

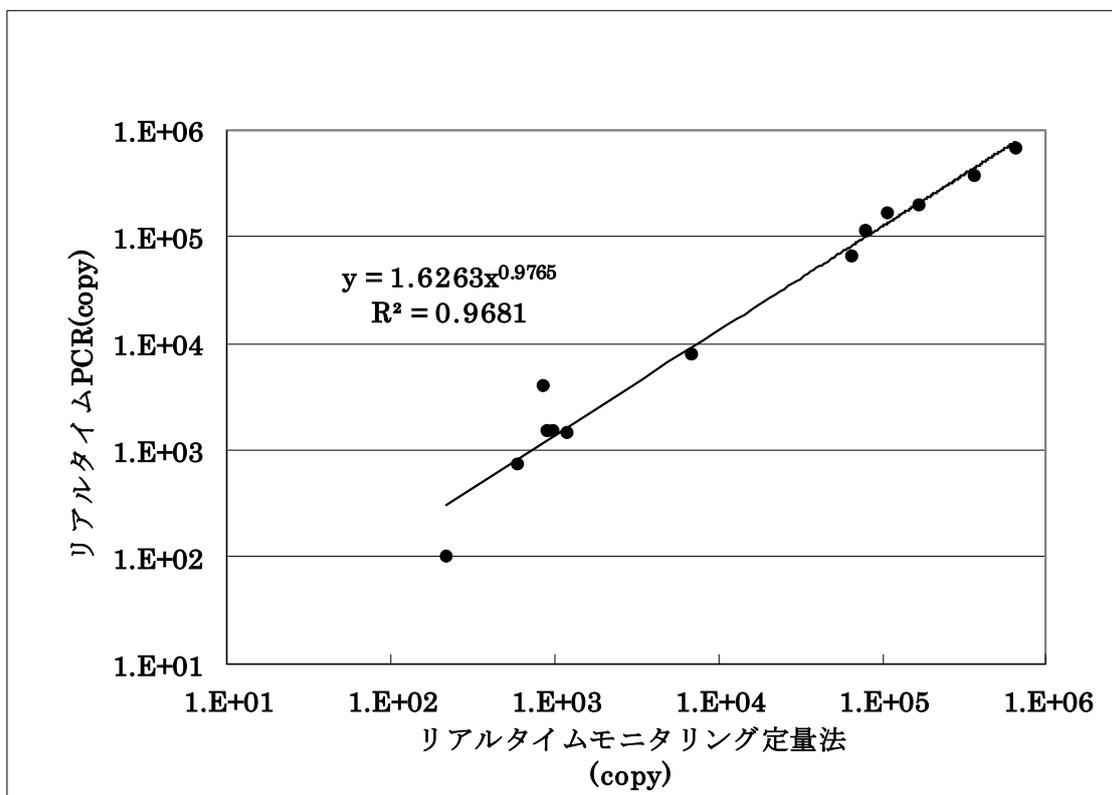


図 5. リアルタイムモニタリング定量法とリアルタイム PCR の相関性

14 例の HPV 16 陽性検体をリアルタイム PCR とリアルタイムモニタリング定量法で測定した。両法の定量値は累乗近似曲線における決定係数: 0.9681 と良好な相関性を示した。

縦軸：リアルタイム PCR

横軸：リアルタイムモニタリング定量法

第 II 章-3. リアルタイムモニタリング定量法を用いたハイリスク HPV14 遺伝子型の相対定量解析による子宮頸がんリスク評価方法の開発

(1) 緒言

ヒトパピローマウイルス (HPV) は、子宮頸癌の最も一般的な原因の1つである (100)。これまでに100以上の遺伝子型が報告され、少なくとも40の型がヒトの子宮頸部に感染することが知られている (8)。HPVは子宮頸癌リスクに基づいて低リスクあるいは高リスクに分類されており、少なくとも14の遺伝子型 (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67および68型) が高リスクに分類されている (4, 45)。高リスクHPV遺伝子型の迅速診断は検診の成果を高め、治療方針を決める上で重要な情報を提供する可能性がある (44)。HPVを検出するために一般的に用いられている方法としては共通プライマーを用いたPCRやハイブリダイゼーションプローブを用いたハイブリッドキャプチャー法が知られている (21, 26, 66)。PCR法ではおもに3種類のプライマー(PGMY09/11, GP5+/GP6+およびL1C1/2)が検出に用いられ (26, 13, 97)、遺伝子型はRFLP法 (60)、型特異的プローブのハイブリダイゼーション (22)、ラインプローブ法 (21) あるいはシーケンスにより判定されている。これらの方法は多くのHPV遺伝子型を検出するために非常に有用ではあるが、コストが高く非常に煩雑な肯定を経る必要がある。近年はマルチプレックスPCR (59) やリアルタイムPCR (87) を用いた方法も報告されている。

HPVの重複感染は頻度が高いものの病態との関連性については不明な点が多い。複数のウイルス株が存在している場合、それぞれのウイルス量を測定することは簡単ではなく、検討報告も少ない (44)。その要因としてはそれぞれのウイルス株を定量するためには多くのスタンダードを同時に測定しなければならないことがあげられる。また宿主DNAとの相対比率からウイルス量を定量する方法についても宮頸部擦過物の採取方法に宿主DNA量が影響されてしまうため困難なことが報告されている (66)。そのため、重複感染例においてはHPV遺伝子型間で相対比率を比較する方法が有用となることが予想される。

本章では、リアルタイムモニタリング定量法を用いたハイリスク HPV14 遺伝子型の相対定量解析による、子宮頸がんリスク評価方法の開発について述べる。型特異的プライマー、インバーダープローブおよび2種類の FLET カセットを用いて、異なる HPV 遺伝子型を同時に半定量する測定系について検討し、シーケンスと結果を比較した。

(2) 方法

・コントロール DNA

HPV16 および HPV18 のゲノム DNA (ATCC 45113D および 45152D) は American Type Culture collection (ATCC) から購入した。PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Invitrogen) を用いて DNA 濃度を測定し、ゲノムサイズからコピー数を算出した。HPV-DNA から希釈系列を作成し、コントロールとして使用した。

・臨床サンプル

子宮頸部擦過サンプル 182 例は Cervex-Brush (Rovers Medical Devices) で採取された後 SurePath (TriPath) に懸濁され、4°C で 1~12 ヶ月茨城県立公衆衛生研究所で保管されたものを使用した。前章と同様に石渡病院において石渡勇医師により本研究におけるインフォームドコンセントを取得した検体を用いて後茨城県立保健衛生研究所の倫理委員会の承認を受け測定した。

・DNA 抽出

前章と同様に SurePath 懸濁液 500 μ L から QIAGEN DNA mini kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出した。

・HPV-DNA のクローニング

14 の遺伝子型 HPV-DNA をクローニングし、相対定量解析の検討に用いる標準物質 (プラスミド) を作製した。それぞれの遺伝子型の HPV-DNA を L1 領域のコンセンサスプライマーとして報告されている L1C1/2 プライマー (97) を用いて増幅し、PCR 産物を pCRII-TOPO ベクター (インビトロジェン) に組み込んだ後、ダイデオキシ法でシーケンス解析した。それぞれの配列は National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースにおける BLAST 検索により確認した。

・プライマーおよびインバーダープローブの設計

National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースからそれぞれの遺伝子型の配列を取得し遺伝子型特異的プライマーをコントロールプラスミドの挿入配列内で設計した。プライマリープローブおよびインバーダーオリゴは増幅領域内に設計した

(表 1A および 1B)。内在性コントロールとしてβ-グロビン (9、92) を検出するためのプライマーおよびプローブを設計した。F-プライマー: 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC -3', R-プライマー: 5'- GAAGAGCCAAGGACAGGTAC -3', プライマリープローブ: 5'- ACGGACGCGGAGGTGTTCACTAGCAACCT <アミノ化>-3' および インバーダーオリゴ: 5'-CAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACACAACCTC -3')。プライマリープローブの下線部分はインバーダー反応におけるフラップ配列を示した。

・リアルタイムモニタリング定量法を用いた相対定量解析

HPV14 遺伝子型の相対定量解析は前章のリアルタイムモニタリング定量法を改変して行った。インバーダー法では異なる蛍光で標識された 2 種類の FRET カセットを使用すれば 1 ウェルで 2 つの遺伝子型を検出できる。7 ウェルで 14 遺伝子型を検出するように組み合わせを検討し、ウェル 1: 51 と 16、ウェル 2: 56 と 31、ウェル 3: 18 と 33、ウェル 4: 39 と 35、ウェル 5: 45 と 52、ウェル 6: 59 と 58 およびウェル 7: 68 と 67 とした。2 種類の HPV ゲノムを増幅するためのプライマー、50 μM d-NTP、700 nM プライマリープローブ、70 nM インバーダーオリゴ、2 U AmpliTaq gold (アプライドバイオシステムズ)、および Cleavase XI Invader core reagent kit (genomic DNA 用) (T.W.T.) をテンプレート DNA と混合し 12 μL 反応液とした。PCR は LightCycler 480 (ロシュ・ダイアグノスティクス) を用いて 95°C 10 分反応させた後、①95°C 30 秒、②65°C 60 秒、③50°C 30 秒、④72°C 30 秒の 4-step PCR を 35 サイクル行った。②において FAM 蛍光 (carboxyfluorescein) および RED 蛍光 (REDmond RED) を測定した (図 1)。定量解析は前章と同様に LightCycler 480 ソフトウェアに含まれる fit point methods (46) を採用した。

・L1C1/2 および遺伝子型特異的プライマーをもちいたシーケンスによる確認

単一の HPV 遺伝子型のみを含む臨床検体については L1C1/2 プライマーを用いて PCR 増幅した後シーケンスを行った。複数の遺伝子型を持つ臨床検体については遺伝子型特異的配列をもつ F-プライマーを設計し (表 2)、共通プライマーである PGMY09 プライマー (R-プライマー) とともに PCR 増幅した後シーケンス解析した。

・検出感度と再現性の検討

それぞれの遺伝子型のプラスミドを用いてリアルタイムモニタリング定量法の検出感度および再現性について検討した。10³~10⁷ コピーに調製したプラスミドの 10 倍希釈系列

を $n=5$ で 3 回測定した。重複感染における相対定量解析の検討では複数のプラスミドを混合して測定した。この検討はマイナー株のコピー数を 5×10^3 コピーに固定して行った。

(3) 結果

検出感度と再現性

$10^3 \sim 10^7$ コピー間で希釈直線性および再現性が得られた。各遺伝子型の 10^3 および 10^7 コピーにおける平均 Cp 値と標準偏差は表 3 に示した。Cp 値における C.V.(%) は 0.7–4.6 であった。

相対定量解析

重複感染における各遺伝子型の相対比率を求めることを目的として相対定量解析を行った。各遺伝子型における高コントロール (10^7 コピー) および低コントロール (10^3 コピー) の値から Cp 値を [+1] から [+6] までの 6 エリアに分割した (図 2)。この [+1] ~ [+6] を相対定量値とし、混合プラスミドを測定した。異なる遺伝子型のプラスミドを等量ずつ含むサンプルの場合、それぞれの遺伝子型の相対定量値は近似した。しかし、比率が 10 倍以上離れていた場合は相対定量値の差も広がった。全ての結果において混合比を反映した相対定量値を得ることが可能であった (表 4)。

臨床検体における HPV 遺伝子型判定

182 例の子宮頸部擦過サンプルについてリアルタイムモニタリング定量法で測定し、131 例から HPV を検出した。104 例からは単一の遺伝子型、27 例からは複数の遺伝子型を検出した。一症例における混在する遺伝子型の最大数は 4 であった。単一の遺伝子型が検出された 104 例については L1C1/C2 プライマーを用いたダイレクトシーケンスで配列を確認した。リアルタイムモニタリング定量法とシーケンス解析の結果は 77.9%(81/104) で一致した。22.1%(23/81) についてはシーケンスで明確な配列を得る事が出来ず、その理由としてはリアルタイムモニタリング定量法で検出する 14 遺伝子型以外の重複感染があげられた。この 23 例については遺伝子型特異的プライマーを用いて改めてシーケンス解析し、リアルタイムモニタリング定量法で検出した遺伝子型の配列を確認した。複数の遺伝子型を検出した 27 例におけるリアルタイムモニタリング定量法の結果は表 5 に示した。

(4) 考察

子宮頸癌のリスクを決定するうえでハイリスク HPV の検出および遺伝子型判定は重要である。これまで重複感染におけるハイリスク HPV-DNA の相対比率を求める検査法は報告されていなかった。本章ではリアルタイムモニタリング定量法を用いて重複感染における HPV 遺伝子型の検出と相対比率を求める方法について検討した。各 HPV 遺伝子型を検出するプライマーとインベータープローブは HPV-DNA L1 領域に設定した。

リアルタイムモニタリング定量法では各遺伝子型において 2 つのコントロール（高コントロールおよび低コントロール）の値から C_p 値を 6 エリアに分割し、重複感染における HPV 遺伝子型の相対比率を求めた。単一のハイリスク HPV 陽性サンプル 104 例について、リアルタイムモニタリング定量法およびダイレクトシーケンスで測定した。結果は全てのサンプルで一致した。27 例からは複数のハイリスク HPV 遺伝子型を検出した。検出された遺伝子型の数は 2~4 であり、2 が 81.5%(22/27) と最も多かった。

本章では重複感染例におけるハイリスク HPV 遺伝子型の相対比率を測定した。HPV の重複感染と子宮頸がんの悪性度の関連についてはこれまでのところあきらかにはなっていない。しかしながら、重複感染における相対比率をモニターすることは治療する上で HPV の動態を理解するために有用と思われる。HPV 感染のほとんどは一過性であり自然に消失していくもののハイリスク HPV の持続感染により子宮頸がんを引き起こされることがある (100)。欧米では 16、18、31、33 および 45 型は子宮頸がんを引き起こすリスクが高い遺伝子型として報告されている (67、75)。しかしながら本邦では子宮頸がんにおいて 52 および 58 型のほうが 18 型よりも陽性率が高いことが報告されている (4)。

液状細胞診サンプルを用いた HPV 遺伝子型判定は子宮頸がんにおける臨床診断において必須となり始めている。近い将来、重複感染の研究は更なるリスク診断を行ううえで重要となる可能性がある。本章で述べたリアルタイムモニタリング定量法による相対定量解析は臨床および疫学的な大規模調査に有用と思われた。

表1. HPV14遺伝子型の相対定量解析を行うためのプライマー、プライマリープローブおよびインバーダーオリゴ

遺伝子型 16-45

Target		Sequence (5'-3')	Region
HPV16-F	F-primer	AGCACGGATGAATATGTTGCACG	nt5703- nt5725
HPV16-R	R-primer	CCCTGTATTGTAATCCTGATACTTTAG	nt5850- nt5824
HPV16-probe	P-probe	ACGGACGCGGAGGTTCTGCATGATAATATATGTT	
HPV16-io	I-oligo	GGGATGTCCAAGTCAAGTAGTCTGGATT	
HPV18-F	F-primer	GGCAGCTCTAGATTATTAAGTGTGG	nt5724- nt5749
HPV18-R	R-primer	CACCCTAAATACTCTATATTG	nt5837- nt5817
HPV18-probe	P-probe	CGCGCCGAGGGCAGGAACCCTAAAATATGG	
HPV18-io	I-oligo	AGGAATATCCTGCTTATTGCCACCACCTA	
HPV31-F	F-primer	CAACATATATTATCACGCAGGCAGT	nt5644- nt5668
HPV31-R	R-primer	CCCTAAATACCCTATATTGTAATCC	nt5777- nt5753
HPV31-probe	P-probe	ACGGACGCGGAGACCTAAATCTGACAATCCTAAA	
HPV31-io	I-oligo	CTTACAGTAGGCCATCCATATTATTCCATT	
HPV33-F	F-primer	TGTGTCTCGCACAAGCATT	nt5674- nt5668
HPV33-R	R-primer	GACCCTAAAAACCCTATATTG	nt5821- nt5801
HPV33-probe	P-probe	ACGGACGCGGAGGCTAAAAAATTATTGGTACCCA	
HPV33-io	I-oligo	GTTGGCCATCCATATTTTTCTATTAATAAATCCTACTAACC	
HPV35-F	F-primer	CGTAAACGTATCCCATATTTTTTT	nt5546- nt5569
HPV35-R	R-primer	GCCTAGAACTGCCTGCATGA	nt5697- nt5678
HPV35-probe	P-probe	ACGGACGCGGAGGTCAGTGTCTAAGGTTGTTA	
HPV35-io	I-oligo	CGAAGCCACTGTCTACCTGCCTCCAGTC	
HPV39-F	F-primer	CGTAAACGTATTCCCATTTTTTTT	nt5615- nt5638
HPV39-R	R-primer	TTGATATGCAGACACCTTTG	nt5849- nt5830
HPV39-probe	P-probe	CGCGCCGAGGCATACCCACTTTAAAATATGGAT	
HPV39-io	I-oligo	CTTTGGAATGTCTGCTTGCGACCACCATT	
HPV45-F	F-primer	ATGGCTTTGTGGCG	nt5608- nt5621
HPV45-R	R-primer	CTCTAAACACCCTATACTGATATGC	nt5833- nt5809
HPV45-probe	P-probe	CGCGCCGAGGCCATTAGGTACAACCCTAAA	
HPV45-io	I-oligo	CCTTAGGAACAGCCTGTTTATTACCTGCAT	

遺伝子型 51-68

Target		Sequence (5'-3')	Region
HPV51-F	F-primer	TGCAGGCAGTTCAGACTAAT	nt5628- nt5648
HPV51-R	R-primer	TAAATACCCTGTATTGAAATGC	nt5628- nt5648
HPV51-probe	P-probe	<u>CGCGCCGAGGGGTTTTAGGTATTGAAAAATAGG</u>	
HPV51-io	I-oligo	GATACTTTAGGAATAGCAGCACGCGTTGAC	
HPV52-F	F-primer	TTATGCAGGCAGTTCTCGATT	nt5747- nt5767
HPV52-R	R-primer	CCTGTATTGCAGGCC	nt5737- nt5716
HPV52-probe	P-probe	<u>CGCGCCGAGGGTTTTAATAGAAAAATAGGGATGTC</u>	
HPV52-io	I-oligo	AAAACTTTTTTACCATTACCACTACTGGTT	
HPV56-F	F-primer	CGTAAACGTATTCCCTATTTTTTT	nt5569- nt5592
HPV56-R	R-primer	AACCCTAAATACCCTATATTG	nt5818- nt5798
HPV56-probe	P-probe	<u>CGCGCCGAGGGACAATACCAAACAAACATTC</u>	
HPV56-io	I-oligo	TAGGACATCCCTATTACTCTGTGACTAAGC	
HPV58-F	F-primer	CGTAAACGTTTTCCCATATTTTTTT	nt5615- nt5638
HPV58-R	R-primer	CTAAAGACCCTATACTGTAAGCC	nt5866- nt5844
HPV58-probe	P-probe	<u>ACGGACGCGGAGGTCCCAATAACAATAAAAAAGTATTAG</u>	
HPV58-io	I-oligo	TGTTGGCAATCCATATTTTTCCATCAAAAC	
HPV59-F	F-primer	ATTTTCTACCACGCAGGCAG	nt5702- nt5721
HPV59-R	R-primer	CCCTAAATACTCTGTATTGATATGC	nt5828- nt5804
HPV59-probe	P-probe	<u>ACGGACGCGGAGGGTAGACAGGATGTTCCCT</u>	
HPV59-io	I-oligo	CATATTTTAAAGTACCTAAAGGTGGTAATT	
HPV67-F	F-primer	TGTGTCTCGCACAAGCATT	nt5696- nt5715
HPV67-R	R-primer	AACCCTAAATACCCTATACTG	nt5843- nt5823
HPV67-probe	P-probe	<u>ACGGACGCGGAGAGGGATTAGGAATGGAAAAG</u>	
HPV67-io	I-oligo	CTTGGGCACTAACACCTTTTTAGTGTGGT	
HPV68-F	F-primer	GGTTATTAAGTGTAGCCATCCAT	nt5609- nt5632
HPV68-R	R-primer	CTAAACACTCTGTATTGATATGC	nt5708- nt5686
HPV68-probe	P-probe	<u>CGCGCCGAGGATAGGAACCTTAAATATGGATG</u>	
HPV68-io	I-oligo	CCTGCTTGCGGCCCCAGACT	

F-primer: Forward-プライマー ; R-primer: Reverse-プライマー ; P-probe: プライマリープローブ ; I-oligo: インバーダーオリゴ

下線部 : 5'フラップ配列を示した。

太字の塩基はプライマリープローブのクリベージポイントを示した。

参照配列

HPV 16; GenBank accession no. NC_001526, HPV 18; GenBank accession no. NC_001357,
HPV 31; GenBank accession no. J04353, HPV 33; GenBank accession no. M12732,
HPV 35; GenBank accession no. M74117, HPV 39; GenBank accession no. M62849,
HPV 45; GenBank accession no. X74479, HPV 51; GenBank accession no. M62877,
HPV 52; GenBank accession no. X74481, HPV 56; GenBank accession no. X74483,
HPV 58; GenBank accession no. D90400, HPV 59; GenBank accession no. X77858,
HPV 67; GenBank accession no. D21208, HPV 68; GenBank accession no. DQ080079

表2. 重複感染例における複数のHPV遺伝子型を検出するための遺伝子型特異的F-プライマー

Target	Sequence (5'-3')	Region
HPV 16	TGTCCTTATGTGCTGCCATATCTAC	nt6661-nt6685
HPV 18	AGTACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACAC	nt6627-nt6657
HPV 31	TTGTGCTGCAATTGCAAAC	nt6586-nt6604
HPV 33	CGCAGTACTAATATGACTTTATGCACAC	nt6605-nt6632
HPV 35	TCTGCTGTGTCTTCTAGTGACAGT	nt6612-nt6635
HPV 39	CCCGTAGTACCAACTTTACATTATC	nt6649-nt6673
HPV 45	CTCTACACAAAATCCTGTGCCAAGTA	nt6650-nt6672
HPV 51	CAACATTTACTCCAAGTAACTTTAAGC	nt6578-nt6604
HPV 52	CATATAAAAATGAAAATTTTAAGGAATACCTTC	nt6715-nt6747
HPV 56	GTTAAGTAAATATGATGCACGAAAAATTAAT	nt6643-nt6673
HPV 58	CATTATGCACTGAAGTAAATAAGGAAGG	nt6670-nt6697
HPV 59	CCAATCTTTCTGTGTGTGCTTCTACT	nt6624-nt6649
HPV 67	CATGACTTTATGTTCTGAGGAAAAATC	nt6641-nt6667
HPV 68	CTAATTTACATTTGTCCACTACTACAGAC	nt6506-nt6534

表3. リアルタイムモニタリング定量法における再現性の検討

プラスミド コピー数	HPV 遺伝子型						
	51	56	18	39	45	59	68
10 ⁸	25.2±0.4	23.6±0.5	22.5±0.4	25.7±1.2	24.1±0.5	24.9±0.4	25.9±0.4
10 ⁷	10.6±0.4	10.1±0.5	8.5±0.2	11.9±0.4	14.3±0.2	12.6±0.1	13.6±0.4

プラスミド コピー数	HPV 遺伝子型						
	16	31	33	35	52	58	67
10 ⁸	23.3±0.4	25.1±0.5	23.6±0.5	21.1±0.5	26.7±0.4	23.9±0.4	24.6±0.6
10 ⁷	9.4±0.4	12.4±0.4	9.9±0.5	7.9±0.3	12.7±0.5	9.2±0.2	9.7±0.4

各遺伝子型のプラスミドを 10³および 10⁷コピーに調製し、再現性試験を行った。

10³および 10⁷コピーの各遺伝子型プラスミドを測定した際の平均 Cp 値±標準偏差を示した。

Cp 値における C.V.(%)は 0.7-4.6。

表 4. リアルタイムモニタリング定量法における混合プラスミドを用いた検討

HPV 遺伝子型	比率	相対定量値					
		+1	+2	+3	+4	+5	+6
45:31	1:1		31 45				
45:31	1:10		45	31			
45:31	1:100		45		31		
45:31	1:1000		45			31	
16:51	1:1		16 51				
16:51	1:10		16	51			
16:51	1:100		16		51		
16:51	1:1000		16			51	
16:31	1:1		16 31				
16:31	1:10		16	31			
16:31	1:100		16		31		
16:31	1:1000		16			31	
18:39	1:1		18 39				
18:39	1:10		18	39			
18:39	1:100		18		39		
18:39	1:1000		18			39	
16:18:31	1:10:100		16	18	31		
51:52:58	1:10:100		51	52	58		

2種類または3種類の遺伝子型プラスミドを様々な比率で混合し、リアルタイムモニタリング定量法で測定した。全ての結果において混合比を反映した相対定量値を得た。

2種類の遺伝子型を混合した場合の45、16および18型のコピー数は 5×10^3 コピー。

3種類の遺伝子型を混合した場合の16および51型のコピー数は 5×10^3 コピー。

表 5. リアルタイムモニタリング定量法における HPV 重複感染例の遺伝子型判定結果

Sample ID	相対定量値					
	+1	+2	+3	+4	+5	+6
41	16 56					
87			16	52 59		
95	16		58			
122	16		39			
125			16	59		
148	16		51 67			
71	18				52	
78		58	18			
158		18	56			
11	31 59					
176	31		39	56 58		
164				33 56		
16				35 56		
142	68	39				
151	52	39				
14		58	51			
25			51	52		
135	51 68					
165	67	51				
55		52		67		
143		58	52	56		
147			52 58			
3	58	56				
64			52 58	16		
27		52			35	
49	67		56			
118	68			59		

重複感染例 27 例から検出された HPV 遺伝子型と相対定量値。検出された遺伝子型の数は 2~4 であり、2 が 81.5%(22/27)と最も多かった。

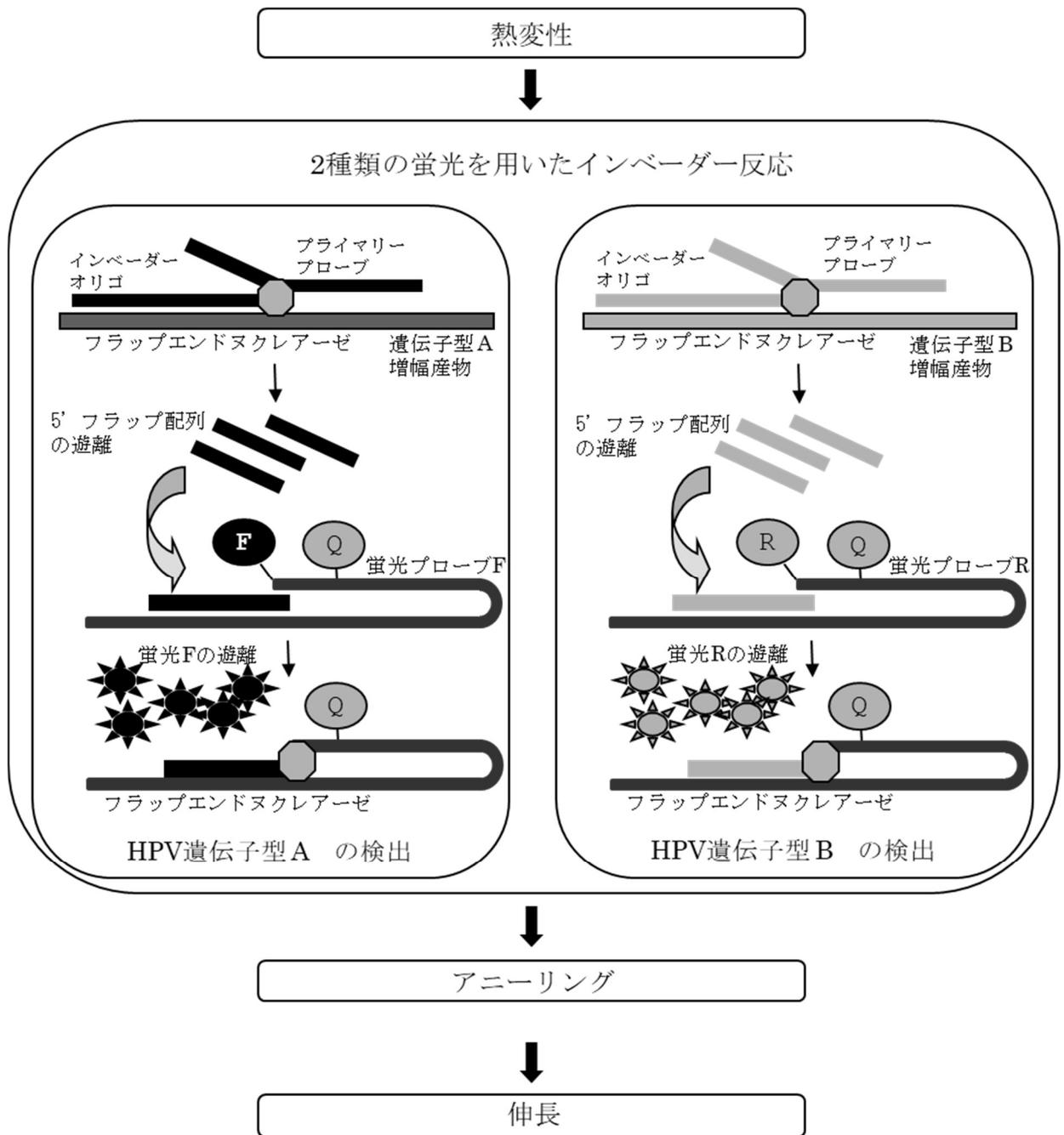


図 1. 2種類の蛍光を用いたリアルタイムモニタリング定量法による HPV 遺伝子型判定法の概略図

F: FAM 蛍光色素

R: RED 蛍光色素

Q: クエンチャー (消光) 色素

5' フラップ配列: プライマリープローブの 5' 末端に位置する二次反応を発生させるための塩基配列

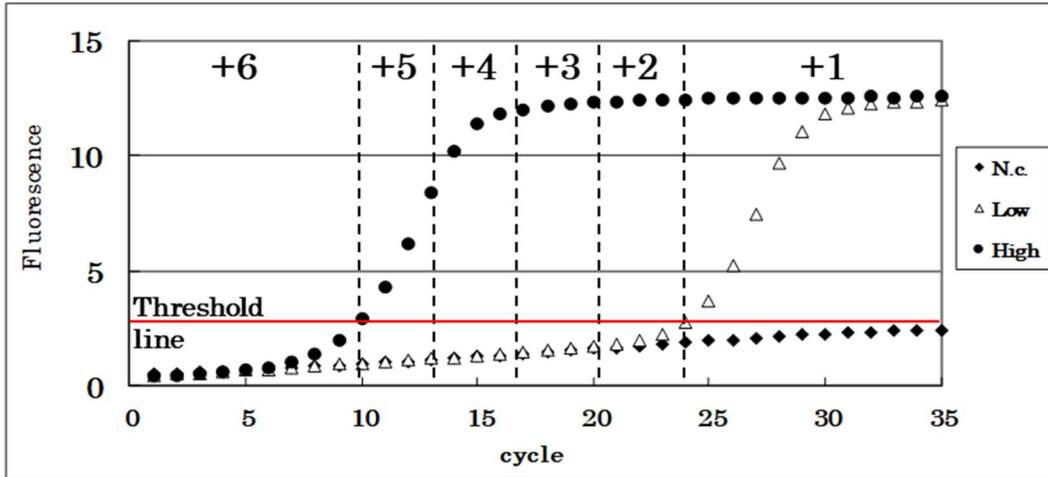


図 2. リアルタイムモニタリング定量法における相対定量値の算出

高/低コントロールの C_p 値は Threshold line を用いた fit point method によって求めた。

高/低コントロールの C_p 値から相対定量値を以下のように求めた：

+6; $C_p \leq \text{高}$ 、+5; $+6 < C_p \leq \text{高} + 1/4$ (低-高)、+4; $+5 < C_p \leq \text{高} + 2/4$ (低-高)、+3; $+4 < C_p \leq \text{高} + 3/4$ (低-高)、+2; $+3 < C_p \leq \text{低}$ 、+1; $\text{低} < C_p$ 。

高コントロール (●)、低コントロール (△) および陰性コントロール (◆) の増幅曲線

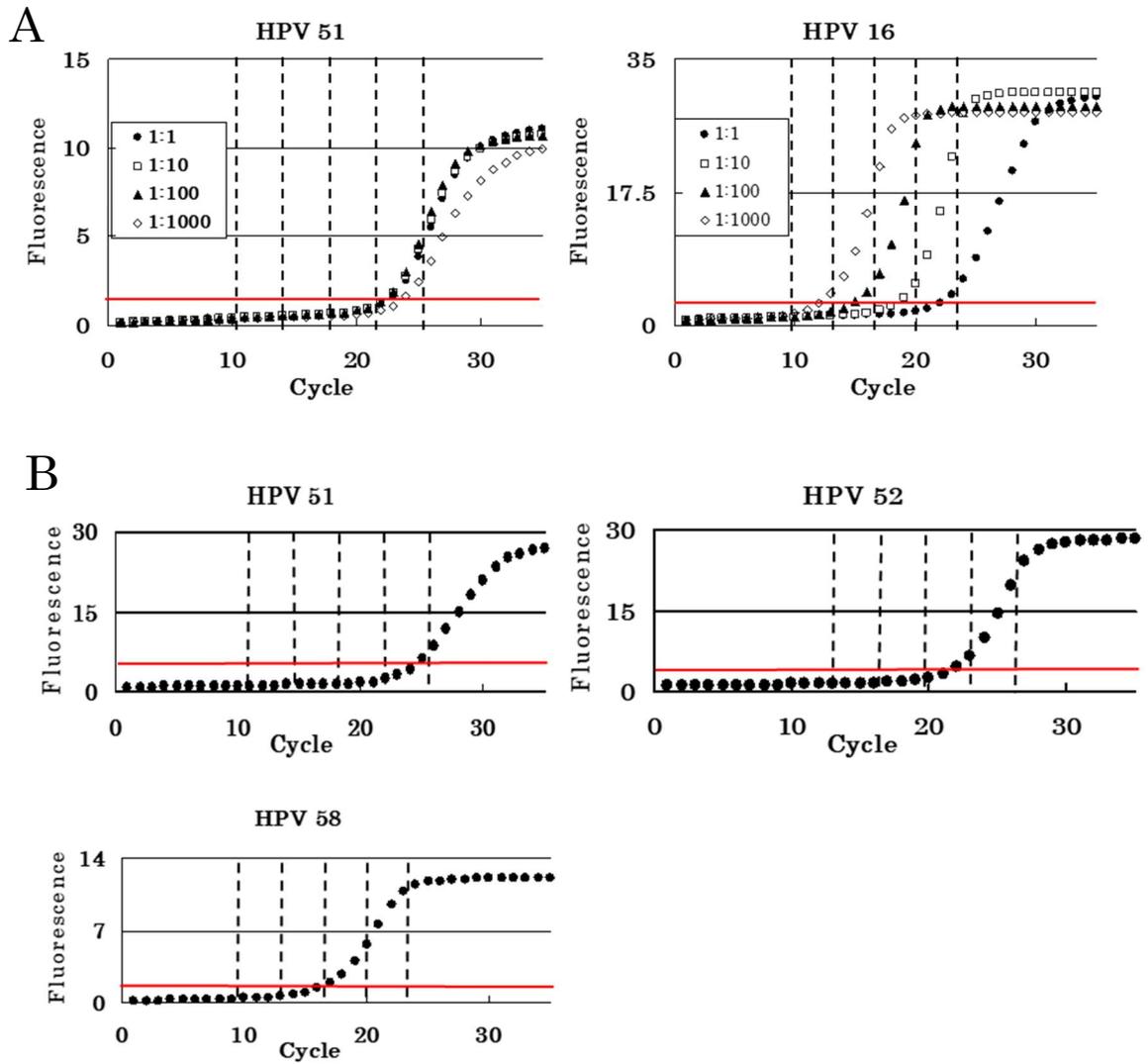


図 3. 混合プラスミドを用いた検討

(A) 2 種類の HPV 遺伝子型 (51 型および 16 型) を混合した場合の増幅曲線 ; HPV51 : HPV 16 = 1 : 1 (●)、1 : 10 (□)、1:100 (▲) および 1 : 1000 (◇)。

(B) 3 種類の HPV 遺伝子型 (51 型、52 型および 58 型) を混合した場合の増幅曲線 HPV51 : HPV 52 : HPV58 = 1 : 10 : 100。

第 II 章-4.リアルタイムモニタリング定量法を用いた歯周病菌の定量解析による歯周病リスク判定法の開発

(1) 緒言

歯周病は *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *T. forsythensis* および *F. nucleatum* などの口腔細菌によって引き起こされる (71)。特に *P. gingivalis*, *T. denticola*, および *T. forsythensis* の 3 菌種は「Red complex」と呼ばれ、深刻な歯周病と関連し、その他の菌種についても歯周炎を引き起こすことが報告されている (17)。これまで様々な方法で唾液あるいはプラーク中のこれらの細菌数が報告され (5, 40)、複数の菌種をマルチプレックスに検出する方法が生み出されてきた (54, 96)。その中でもリアルタイム PCR は細菌やウイルスを定量する手段として最も一般的なもののひとつである (33, 50)。リアルタイム PCR における増幅産物を検出する手段としては TaqMan プローブなどの蛍光標識プローブや SYBR Green I などのインターカラー色素が使用されているが、それぞれに長所短所がある。インターカラー色素を用いた測定系は簡便ではあるもの非特異増幅産物との判別が困難である。反対に蛍光標識プローブは高い特異性が得られるものの標的ごとにプローブを作製する必要があり、コストが掛かる。

複数の標的を検出する際に共通の蛍光プローブを使用できれば簡便、効率的かつ安価に測定することが可能となる。インバーダー法はゲノム DNA や PCR 産物における一塩基多型を検出する方法として開発された (47)。共通の蛍光標識プローブを使用するため複数の標的に対して安価、簡便でハイスループットな測定系を構築することが可能となる。本章では、リアルタイムモニタリング定量法を用いた歯周病関連菌、Red complex を含む 6 菌種の定量測定系について検討した。

(2) 方法

・細菌からの DNA 抽出

それぞれの細菌コロニー (*Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586)、*Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277)、*Prevotella intermedia* (ATCC 49046)、*Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ATCC 43718) および *Toreponema denticola* (ATCC 35404) から QIAamp DNA mini kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出した。これらの細菌 DNA および ATCC から購入した *Tannerella forsythensis* の DNA (ATCC 43037D) は PicoGreen (インビトロジェン) を用いて濃度を測定した。

- ・プライマーおよびインバーダープローブの設計

それぞれの細菌のゲノム配列は National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースから入手した。プライマーは *F. nucleatum* を除き 16S rRNA 遺伝子領域に設計し、プライマリープローブおよびインバーダーオリゴは増幅領域内に設計した。*F. nucleatum* については Martin らのプライマー (51) を使用した (表 1)。

- ・リアルタイムモニタリング定量法

細菌 DNA を増幅するためのプライマー、50 μ M d-NTP、700 nM primary probe、70 nM Invader oligo、2.5 U AmpliTaq Stoffel fragment (Applied Biosystems)、および Cleavase XI Invader core reagent kit (genomic DNA 用) (T.W.T.) をテンプレート DNA と混合し、15 μ L 反応液とした。PCR は LightCycler 480 (ロシュ・ダイアグノスティクス) を用いて 95°C 2 分反応させた後、①95°C 1 秒、②63°C 60 秒の 2-step PCR を 35 サイクル行った (図 1)。②において FAM (carboxyfluorescein) 蛍光を測定した。

- ・測定感度の検討

測定感度の検討は各細菌から抽出した DNA の希釈系列 (10ng~10fg) を用いて行った。標準曲線は第 II 章-2 同様、fit point method を用いて解析した。

- ・ボランティア唾液検体からの DNA 抽出

64 例のボランティアからガムを用いた刺激唾液を 5 mL 採取し、2000rpm で 1 分間遠心した。上清 200 μ L から DNA blood mini kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出し、リアルタイムモニタリング定量法およびリアルタイム PCR で歯周病関連菌定量解析を行った。

(3) 結果

リアルタイムモニタリング定量法

本章からリアルタイムモニタリング定量法は熱変性反応とアニーリング/伸長反応の 2-ステップ PCR とした (図 1)。フラップエンドヌクレアーゼによるインバーダー法の一次反応、二次反応および DNA ポリメラーゼによる PCR 産物生成はアニーリング/伸長反応に

において同時に進行する。インベーター法の一次反応と DNA ポリメラーゼによる PCR 産物生成は標的鎖において競合することにより定量する。

検出感度

細菌 DNA 溶液を用いてリアルタイムモニタリング定量法の検出感度について検討した。リアルタイムモニタリング定量法では *F. nucleatum* DNA 溶液の希釈系列 10ng から 10fg までを濃度依存的に検出可能であった (図 2)。

リアルタイム PCR との比較

全ての細菌 DNA 溶液希釈系列において第 II 章-2 同様に従来のリアルタイム PCR よりも早い C_p 値 (図 3) および鋭角な増幅曲線を得ることが可能であった (図 4)。リアルタイム PCR で 64 例のボランティア唾液検体を測定した結果、8 例から *A. actinomycetemcomitans*、34 例から *P. gingivalis*、34 例から *P. intermedia*、47 例から *T. denticola*、60 例から *T. forsythensis*、63 例から *F. nucleatum* がそれぞれ検出された。リアルタイムモニタリング定量法で同検体を測定した結果、両法の C_p 値は決定係数で *T. forsythensis*: 0.8271、*A. actinomycetemcomitans*: 0.8463、*P. intermedia*: 0.8614、*T. denticola*: 0.8977、*P. gingivalis*: 0.903 および *F. nucleatum*: 0.987 と良好な相関性を示した (図 5)。最も良好な相関性は同じプライマーを用いている *F. nucleatum* で得られ (決定係数 0.987)、線形近似曲線 ($y=1.03x + 7.09$) となった。リアルタイム PCR の陰性検体においてリアルタイムモニタリング定量法で陽性となったものは無かった。

(4)考察

F. nucleatum の定量系では、同じプライマーを用いたリアルタイム PCR と比較して、リアルタイムモニタリング定量法は、明らかに早い C_p 値が得られた。これにはいくつかの理由が考えられた。両反応系はいずれも 2-ステップ PCR で増幅を行っているため増幅効率ほぼ同等と推測された。しかしながら、リアルタイム PCR では、1 回の PCR サイクルでテンプレートから生じる蛍光はひとつだけなのに対して、リアルタイムモニタリング定量法では 2 次反応がテンプレートに依存していないこともあり、アニーリング/伸長反応において継続的に蛍光物質の遊離が起きる。この蛍光物質の遊離量はアニーリング/伸長反応の時間の長さ按比例すると考えられた。つまり、リアルタイムモニタリング定量法の蛍光は、PCR によるテンプレートの増幅とフラップエンドヌクレアーゼによるインベーター反応の相乗効果により生じていると思われた。そのため、同じサンプルを測定した場合

には、リアルタイムモニタリング定量法でより早い C_p 値が得られると推測された。

本章ではリアルタイムモニタリング定量法の反応条件については様々な検討を行った。PCR における DNA ポリメラーゼについては、幅広い $MgCl_2$ 濃度に対応できる **AmpliTaq Stoffel fragment** が最適であった。アニーリング/伸長反応における温度は、プライマリープローブの T_m 値において最も優れた反応を示した（データ示さず）。リアルタイムモニタリング定量法では、全ての測定系において共通の蛍光プローブを使用できる。個々の測定系に必要となるのは補的な配列を持つプライマリープローブとインベーターオリゴのみである。本検討では、唾液中における 6 種類の歯周病関連菌の定量測定においてリアルタイム PCR と良好な相関性を示したが、リアルタイムモニタリング定量法において、非特異反応が生じ、リアルタイム PCR の結果と齟齬が生じた場合、プライマリープローブの 3' 端をアミノ化することで非特異反応を抑え、良好な相関性が得られることが知られている (47)。これらの特徴から、リアルタイムモニタリング定量法は、リアルタイム PCR と比較して、臨床診断において複数のターゲットを定量解析する上で優れた方法であると思われた。

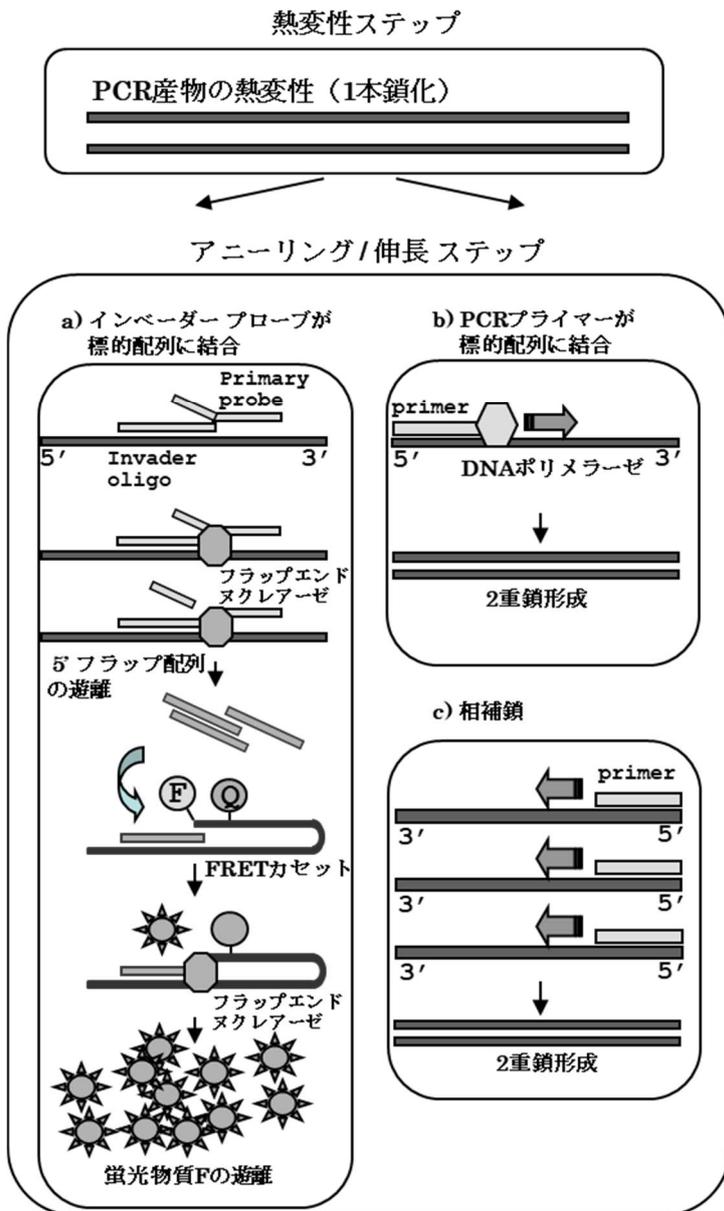


図 1. 2-ステップ PCR を用いたリアルタイムモニタリング定量法の反応原理

F: FAM 蛍光色素

Q: クエンチャー (消光) 色素

5' フラップ配列: プライマリープローブの 5' 末端に位置する二次反応を発生させるための塩基配列

FRET カセット: インベダー法の二次反応に用いる共通蛍光標識プローブ

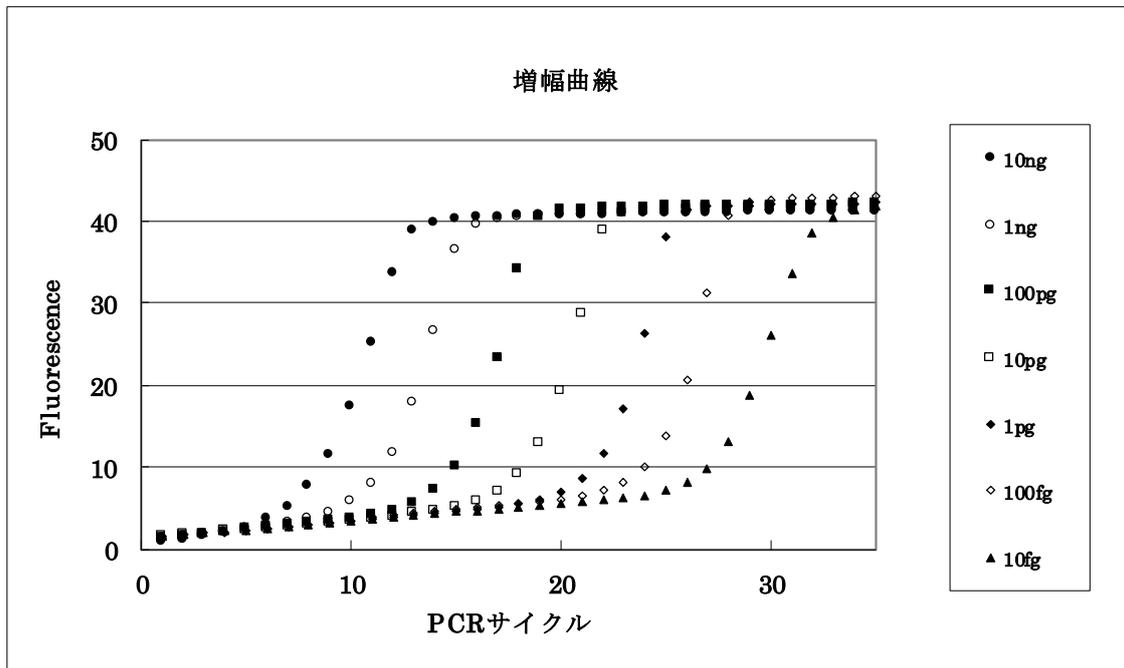


図 2. リアルタイムモニタリング定量法における増幅曲線 (*F. nucleatum*)
F. nucleatum DNA 溶液の 10 倍希釈系列 10ng~10fg をリアルタイムモニタリング定量法
 で測定した。濃度依存的な増幅曲線を得た。
 縦軸：蛍光強度 横軸：PCR サイクル

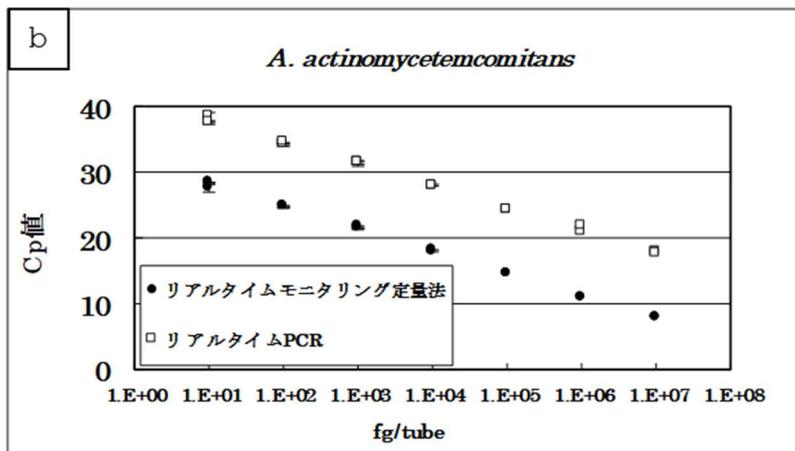
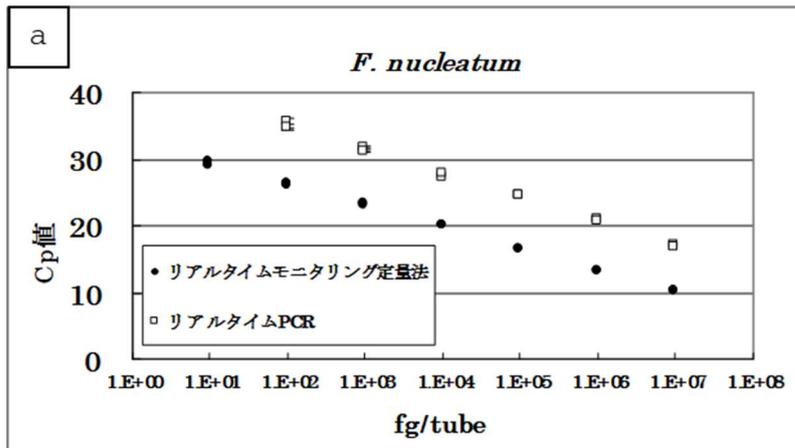


図3. 標準曲線におけるリアルタイムモニタリング定量法とリアルタイムPCRの比較
リアルタイムモニタリング定量法 (●) およびリアルタイムPCR (□)
細菌DNA希釈系列 (10ng~10fg) を測定し、得られたCp値を示した (二重測定)。
リアルタイムPCRよりも早いCp値を得た。

a: *F. nucleatum* b: *A. actinomycetemcomitans*

エラーバーは標準偏差を示す。

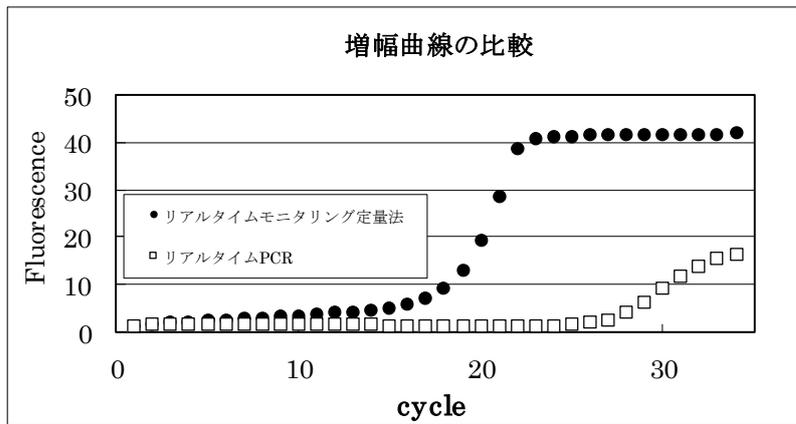


図 4. リアルタイムモニタリング定量法およびリアルタイム PCR の増幅曲線。
F. nucleatum DNA 10pg をテンプレートとしたときの増幅曲線を示した。
 リアルタイム PCR よりも鋭角な増幅曲線を得た。
 リアルタイムモニタリング定量法 (●) およびリアルタイム PCR (□)

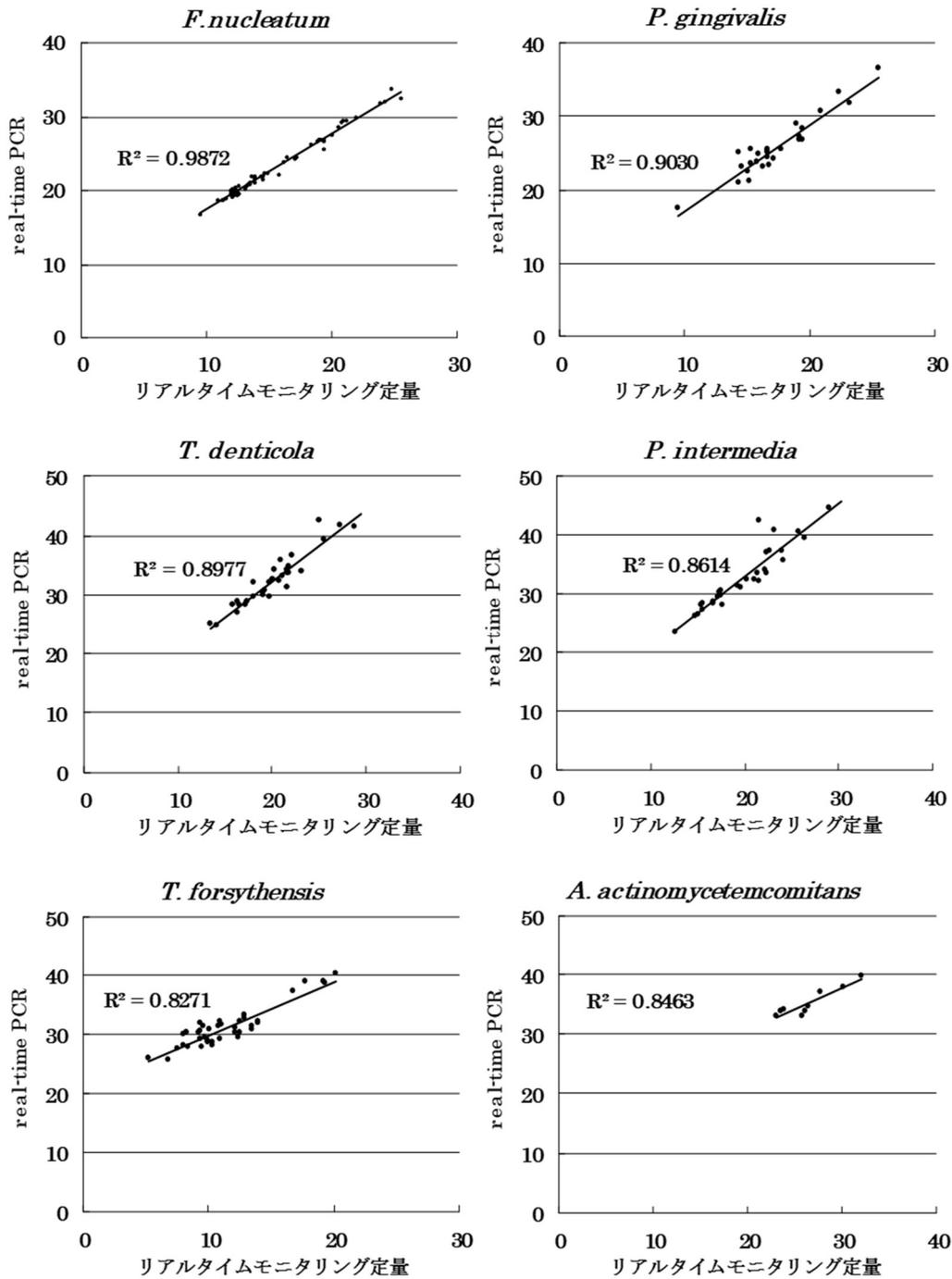


図 5. 臨床検体を用いたリアルタイムモニタリング定量法とリアルタイム PCR の相関性
 64 例のボランティア唾液検体をリアルタイム PCR とリアルタイムモニタリング定量法で測定した。両法の Cp 値における決定係数は 0.8271~0.9872 となった。

X 軸: リアルタイムモニタリング定量法における Cp 値

Y 軸: リアルタイム PCR における Cp 値

R²: 線形近似曲線における決定係数

第 II 章-5. リアルタイムモニタリング定量法を用いた HCV コア領域アミノ酸 70・91 変異の相対定量解析による肝発がんリスク評価方法の開発

(1) 緒言

C型肝炎ウイルス（HCV）は全世界でおよそ1億7000万人が感染していると考えられている。HCV感染は慢性疾患を引き起こし、肝硬変や肝臓がん（HCC）などの重篤な症状へとつながる可能性を上昇させる（72）。慢性C型肝炎におけるインターフェロン（IFN）療法は、ウイルスを除去することによってHCCを発症するリスクおよび肝臓関連死を減少させる（1）。2004年以来、本邦ではペグインターフェロン（PEG-IFN）およびリバビリン（RBV）併用療法が標準的な治療法となっている（18）。さらに2011年からはPEG-IFN、RBVにプロテアーゼ阻害剤（ボセプレビルまたはテラプレビル）などの直接作用型抗ウイルス薬（DAA）を加えた三剤併用療法が承認され、恒常的に使用されてきた（36）。しかしながら、必ずしも全ての患者でウイルス学的持続陰性化（SVR）が得られわけではなく、本邦では最も一般的なHCV遺伝子型である1b型に感染した患者の26.3%においてウイルス学的反応が確認されなかった（2）。

近年、HCV遺伝子型1bの患者におけるウイルス学的反応の欠如には2つの要因が関連していることが報告された。ひとつはヒトIL28B遺伝子近傍の一塩基多型（20、88、90）であり、もうひとつはHCV-1bコア領域におけるアミノ酸70および91の変異である（3）。HCV-1bコア領域のアミノ酸70変異（Arginine→GlutamineあるいはHistidine）および91変異（Leucine→Methionine）はウイルス学的非応答者において高頻度に検出され、変異を有する患者群では併用療法におけるウイルス量の低下率が低いことが報告されている（3）。また、HCV-1bコア領域のアミノ酸70変異の有無とIL28B遺伝子近傍の一塩基多型から三剤併用療法におけるSVR獲得の予測が可能であった（3）。さらに併用療法中においてクアジスपीシズによるアミノ酸70変異型の増加が治療成功率の低下と関連していることが示唆された（38）。これらのことからHCV治療においてアミノ酸70/91の変異率はウイルス量とともにモニタリングしていくことが重要となる。しかしながら一塩基変異を高感度に検出することは困難であり、これまでにNakamotoらの報告（55）があるのみである。本章ではリアルタイムモニタリング定量法を用いたアミノ酸70/91変異の相対定量解析法について述べる。アミノ酸70/91変異率を求めるための測定系を構築し、測定感度と再現性について検討した。また、臨床検体を測定し、シーケンス（3）および変異型特異的プライマーを用いたPCR（64）と結果を比較した。

(2) 方法

・症例

虎の門病院分院に保管されている HCV-1b 陽性血清 123 例を虎の門病院分院（神奈川）の倫理委員会の承認後（承認番号 2012-3HB）、検討に使用した。検体は解析に使用するまで -80°C で凍結保存された。

・インベータープローブの設計

HCV-1b コア領域アミノ酸 70 変異および 91 変異を検出するためのプライマリープローブおよびインベーターオリゴは National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースに登録されている 55 の HCV ゲノム配列を参考に周辺領域のバリエーションを考慮して設計した。

・HCV-RNA の抽出および逆転写反応

200 μL の血清から PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit (ライフテクノロジーズ)を用いて 10 μL RNase/DNase-free 水に HCV-RNA を抽出した。ランダムプライマーを用いた cDNA 合成には SuperScript III cDNA Synthesis Kit (ライフテクノロジーズ)を使用した。

・リアルタイムモニタリング定量

本章よりインベーター反応試薬を d-NTP、DNA ポリメラーゼを含み、リアルタイムモニタリング定量法に適した Universal General Purpose Reagent (T.W.T.) に変更した。HCV-1b コア領域を増幅するためのプライマー、300 nM プライマリープローブ、700 nM インベーターオリゴ、Universal General Purpose Reagent (T.W.T.)、PCR を強力にするための 2U AmpliTaq gold (ライフテクノロジーズ) および 2 種類 (FAM/RED) の FRET カセットをテンプレート cDNA と混合し 15 μL 反応液とした。PCR は LightCycler 480 (ロシュ・ダイアグノスティクス) を用いて 95°C 20 分反応させた後、① 95°C 15 秒、② 65°C 60 秒の 2-step PCR を 40 サイクル行った (図 1)。②のステップにおいて FAM 蛍光 (carboxyfluorescein) および RED 蛍光 (REDmond RED) を測定した。

- ・シーケンス

臨床検体におけるコア領域アミノ酸 70 および 91 の配列は Akuta らの方法 (1) に従って測定した。Model 3130 fluorescent DNA sequencer および BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ) を用いてダイデオキシ法でシーケンスした。

- ・ HCV-RNA のクローニングによるコントロールプラスミドの作製

臨床検体から抽出したコア領域アミノ酸 70 変異型、91 変異型および野生型 HCV-RNA の PCR 産物を pCR II-TOPO (インビトロジェン) ベクターに組み込み、プラスミドを作製した。

- ・ 特異的プライマーを用いた解析

Okamoto らが報告 (64) した変異型および野生型特異的プライマーを用いて PCR 増幅し、MultiNA マイクロチップ電気泳動装置で PCR 産物を確認した。

- ・ 測定感度と再現性

変異型および野生型のコントロールプラスミドを様々な割合に混合してテンプレートとし、測定感度と再現性について検討した。測定感度の検討には $10 \sim 10^7$ コピーに調製した 10 倍希釈系列を用いた。相対定量解析の検討は変異型および野生型プラスミドを混合して行った。それぞれの検討は $n=5$ で 3 回測定した。

(3)結果

測定下限と再現性

アミノ酸 70 の測定では $10 \sim 10^7$ コピーで濃度依存性が保たれ、測定下限は変異型、野生型ともに 10 コピーであった。アミノ酸 91 の測定では $10^2 \sim 10^7$ コピーで濃度依存性が保たれ、測定下限は変異型、野生型ともに 10^2 コピーであった (図 2 および図 3)。

相対定量解析

変異型と野生型の相対比率を求めるために相対定量解析を行った。変異型と野生型のコ

ピー数をコントロールプラスミドで作成したスタンダードを用いて Fit Point Methods によりそれぞれ測定し、相対比率は変異型のコピー数を全コピー数（変異型数+野生型数）で割って求めた。様々な割合に混合したコントロールプラスミドを用いた検討では、マイナーな遺伝子型を 1:100 の比率で検出可能であり（図 4）、算出した相対比率はテンプレート DNA と一致した（図 5）。

臨床検体における相対定量解析

HCV-1b 陽性血清 123 例のコア領域の配列をダイレクトシーケンスで確認した。アミノ酸 70 および 91 についてリアルタイムモニタリング定量法で測定した。ダイレクトシーケンスの結果と比較するためにリアルタイムモニタリング定量法の結果を 3 群（変異型 1%未満、混合型（変異型 1~99%）、変異型 99%<）に分類した。アミノ酸 70 についてはリアルタイムモニタリング定量法で 30.1%（37/123）が混合型（変異型 1~99%）となり、このうち 43.2%（16/37）がダイレクトシーケンスでも混合と判定された。アミノ酸 91 についてはリアルタイムモニタリング定量法で 17.9%（22/123）が混合型（変異型 1~99%）となり、このうち 59.1%（13/22）がダイレクトシーケンスでも混合型と判定された。

特異的プライマーを用いた混合型の確認

リアルタイムモニタリング定量法で混合型と判定され、ダイレクトシーケンスで確認ができなかった 4 検体について変異型 / 野生型特異的プライマーを用いて検討した。アミノ酸 70 において変異型をわずかに含むサンプル 99（変異型 4%）およびサンプル 118（変異型 5%）、野生型をわずかに含むサンプル 80（変異型 98%）およびサンプル 18（変異型 99%）について測定し、全てのサンプルで野生型および変異型を検出した。アミノ酸 91 についても同様の結果となった（表 3）。

(4)考察

HCV - 1b コア領域のアミノ酸残基 70 / 91 位の突然変異の相対比を正確に迅速に測定することは、C 型肝炎の治療の主力として用いられているペグ・インターフェロンとリバビリンの併用療法の有効性を保証するために重要である。本研究では、比較定量分析による高感度法であるインベーター法を基盤技術として用いたリアルタイムモニタリング定量法を開発し、本方法の検出感度および正確性を調べ、直接配列決定法および型特異的プライマーによる PCR 法と比較した。HCV-1b コア領域の 2 つの位置（70 および 91）における野生型/突然変異体配列の検出のために、2 つの蛍光プローブによる検出感度を調べたところ

ろ、野生型、突然変異体ともにアミノ酸残基 70 位での検出感度は鋳型 DNA が 10 コピー、91 位での検出感度は 100 コピーであった (図 3)。次に、さまざまな比率で野生型と突然変異体の配列をもつプラスミドの混合物をモデル検体として、相対比算出精度を調べたところ、リアルタイムモニタリング定量法は、マイナータイプ (野生型 / 突然変異体内、相対含有量が少ない方を意味する) の 1% まで決定できることが明らかになった (図 4)。本方法によって測定し、算出された相対比は、鋳型 DNA の混合比と完全に一致しており、相対比は混合した鋳型 DNA の総量に影響されなかった (図 5) ことから、検査対象となる患者血清中に含まれるウイルス濃度が変化しても、HCV-1b コア領域の 2 つの位置 (70 および 91) における野生型 / 突然変異体配列の相対比を精度良く検出できると考えられた。

リアルタイムモニタリング定量法を実際の検体で検証するために、患者由来の 123 の臨床検体について、直接配列決定法およびリアルタイムモニタリング定量法により HCV - 1b コア領域の 70 / 91 位の突然変異を分析したところ、ダイレクトシーケンス法で検出された変異は、すべてリアルタイムモニタリング定量法でも検出され、比較検討結果に齟齬は無かった。さらに、リアルタイムモニタリング定量法は、ダイレクトシーケンス法で検出できない、検体にわずかに含まれる野生型 / 突然変異体を検出することができた。例えば、アミノ酸残基 70 位では、リアルタイムモニタリング定量法により 37 検体で野生型と突然変異体の両方が検出されたが、ダイレクトシーケンス法では、症例の 56.8% (37 例中 21 例) が野生型 / 突然変異体のどちらか一方しか検出できず、野生型 / 突然変異体の混合は無いと判定された。リアルタイムモニタリング定量法で検出されたマイナータイプの有無を確認するため、マイナータイプ特異的プライマーを用いたタイプ特異的 PCR を行って結果を検証したところ (表 3)、野生型 / 突然変異体の混合が確認された 37 検体全てで、マイナータイプ由来の増副産物が確認されたことから、本方法が実検体においても、高感度且つ高精度に HCV - 1b コア領域のアミノ酸残基 70 / 91 位の突然変異の相対比を検出可能だと考えられた。

HCV-1b コア領域の 70 / 91 位のアミノ酸変異と併用または 3 剤併用療法の有効性との関連性については、多くの研究で報告されている (3, 55)。また、70 / 91 位のアミノ酸変異は *in vitro* でインターフェロンに耐性を示すことが知られている (19)。コア突然変異体をトランスフェクトした細胞における SOCS3 をアップレギュレートする IL - 6 の発現レベルは、野生型よりも有意に高いことも報告されており (19)、この現象がインターフェロン療法に対する 70 / 91 位のアミノ酸変異の臨床的耐性を説明できるのではないかと考えられている。また、HCV-1b コア領域の 70 位のアミノ酸変異は、ウイルス学的 non-responder における HCC の独立予測因子として有意であることから、インターフェロン療法と HCC 発症の研究では、70 / 91 位のアミノ酸変異の重要性が増している (73)。さらに、70 / 91 位のアミノ酸変異体の相対比は、個々の患者で異なっており (64)、治療方法によって治療期間中に相対比変化が異なることも報告されている (34,

38)。以上のことから、突然変異体の相対比を治療前の治療方法を選択するために決定すること、治療中にリアルタイムにモニタリングすることは、HCV 治療に対する有効性予測、データの基づく作用機序の解明に寄与すると考えられた。本研究で開発されたリアルタイムモニタリング定量法は既存の方法よりも高感度かつ高精度な方法であり、相対比の詳細な動的变化をリアルタイムに、かつ安価に提供可能であり、今後の C 型肝炎の治療法開発に貢献できると思われた。

表 1. HCV コア領域アミノ酸 70・91 変異相対定量解析を行うためのプライマーおよびインバーダープローブ

Target		Sequence (5'-3')
core 70	F-primer	CCTCGTGGAAGGCGACAACCTAT
	R-primer	GGCCADGGRTACCCRGGCTG
	p1 probe	<u>CGCGCCGAGG</u> CGRMRAKCYTTGG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> TGRMRAKCYTTGG
	io probe	GCCCAGGHYCTRCCCTCGKBNA
core 91	F-primer	CCTGGGCTCAGCCYGGGTA
	R-primer	CGGGGTGACAGGAGCCATC
	p1 probe	<u>CGCGCCGAGGY</u> TRGGRTGGRCAG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> ATRGGRTGGRCAGGAT
	io probe	TTGGCCCCTCTAYGGCAAYKAGGGYT

p1: プライマリープローブ (FAM蛍光)

p2: プライマリープローブ (RED蛍光)

io: インバーダーオリゴ

下線部は 5'フラップ配列を示した。

プライマリープローブにおける太字はフラップエンドヌクレアーゼの切断点

表 2. リアルタイムモニタリング定量法と塩基配列解析との比較

Core 70		ダイレクトシーケンス		
		野生型	混合型	変異型
リアルタイム モニタリング 定量法 (変異%)	1%未満	43		
	1-99%	12	21	4
	99%<			43
Core 91		ダイレクトシーケンス		
		野生型	混合型	変異型
リアルタイム モニタリング 定量法 (変異%)	1%未満	55		
	1-99%	9	9	4
	99%<			46

HCV-1b 陽性血清 123 例をダイレクトシーケンスおよびリアルタイムモニタリング定量法で測定し、コア領域アミノ酸 70 / 91 の結果を比較した。

リアルタイムモニタリング定量法の結果は 3 群 (変異型 1%未満、混合型 (変異型 1~99%)、変異型 99%<) に分類した。

表 3. リアルタイムモニタリング定量法で混合型と判定されたサンプルにおける特異的プライマーを用いた PCR の結果

Core 70	リアルタイムモニタリング定量法	ダイレクトシーケンス	特異的プライマーを用いた PCR	
	変異型(%)		野生型	変異型
Sample 099	4%	野生型	+	+
Sample 118	5%	野生型	+	+
Sample 080	98%	変異型	+	+
Sample 018	99%	変異型	+	+

Core 91	リアルタイムモニタリング定量法	ダイレクトシーケンス	特異的プライマーを用いた PCR	
	変異型(%)		野生型	変異型
Sample 088	2%	野生型	+	+
Sample 067	2%	野生型	+	+
Sample 090	98%	変異型	+	+
Sample 071	98%	変異型	+	+

リアルタイムモニタリング定量法で混合型と判定され、ダイレクトシーケンスで確認ができなかった 4 検体について変異型 / 野生型特異的プライマーを用いて検討した。全てのサンプルで野生型および変異型を検出した。

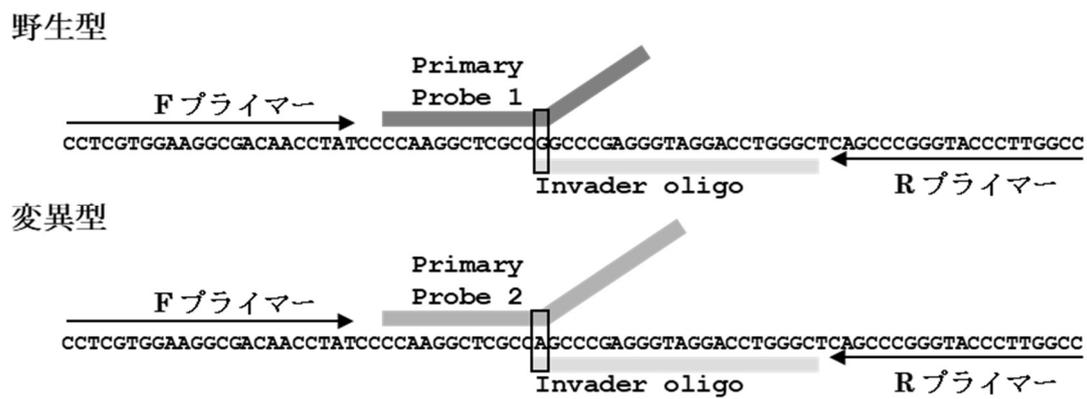


図 1. HCV-1b コア領域アミノ酸 70 におけるリアルタイムモニタリング定量法のプライマーおよびインベーダープローブ結合領域
□部分はフラップエンドヌクレアーゼの切断点。
対照配列は HCV-J (アクセッション No. D90208)

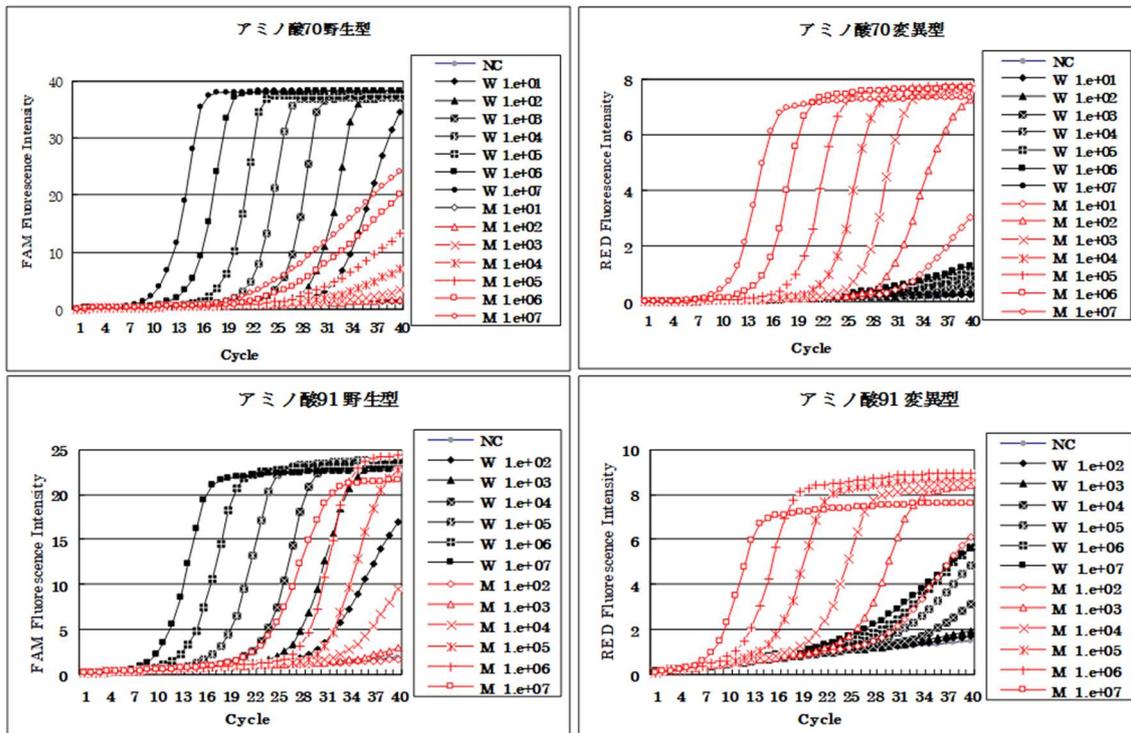


図 2. リアルタイムモニタリング定量における増幅曲線

変異型/野生型プラスミドの希釈系列 ($10^1 \sim 10^7$ コピー) を測定したときの増幅曲線。

特異的かつ濃度依存的な増幅曲線を得た。

縦軸：蛍光強度 横軸：PCR サイクル数

(W: 野生型プラスミド、M: 変異型プラスミド)

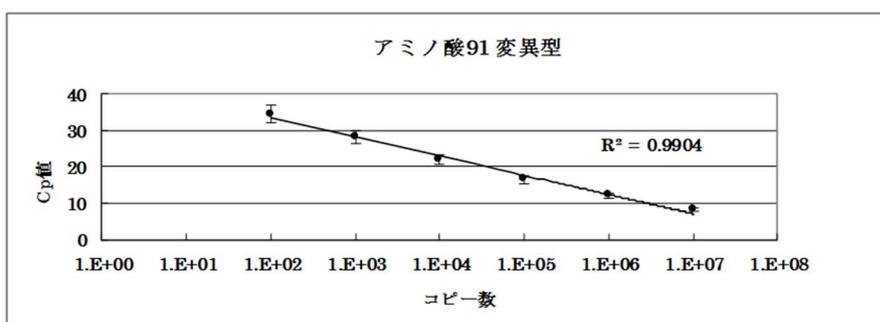
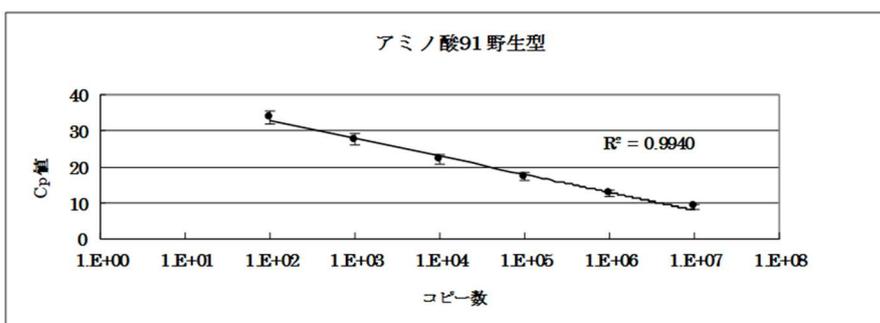
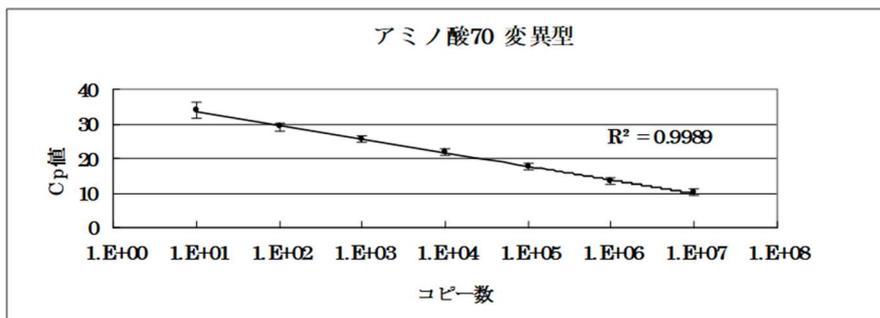
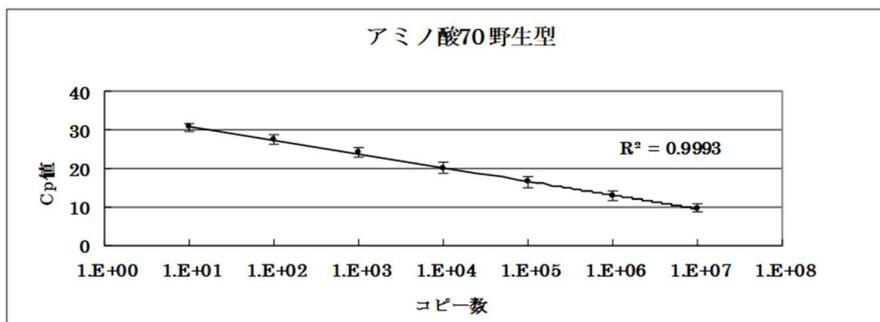


図 3. リアルタイムモニタリング定量法における標準曲線

プラスミド希釈系列 (10~10⁷ コピー) における Cp 値 (平均) をプロットし、標準曲線を作成した。

測定下限はアミノ酸 70 では 10 コピー、アミノ酸 91 では 10² コピーであった。

縦軸 : Cp 値 横軸 : コピー数

エラーバーは n=5 の 3 回測定における標準偏差を示す。

R² は対数近似曲線における決定係数。

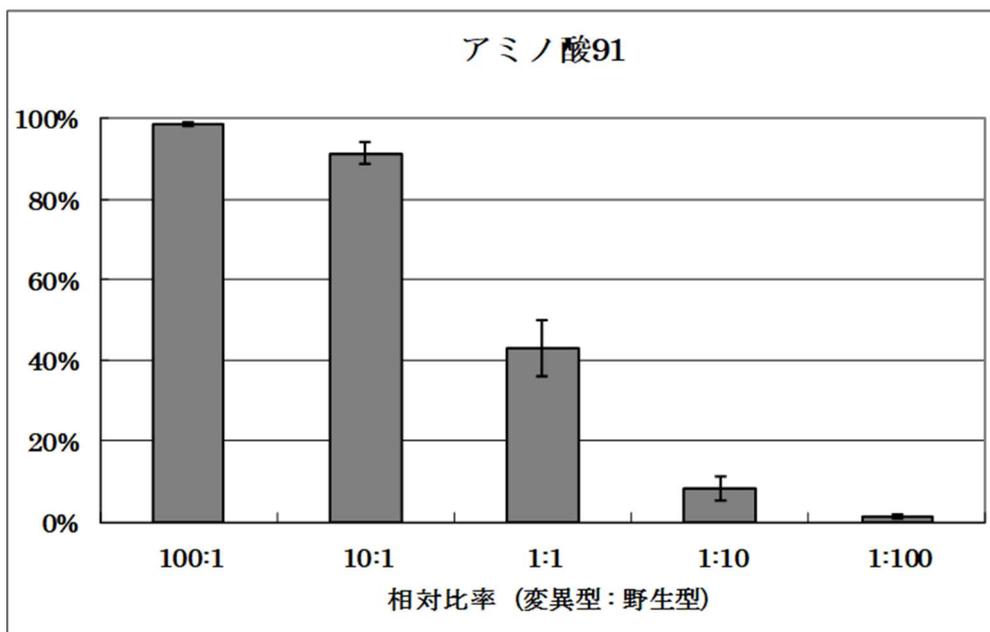
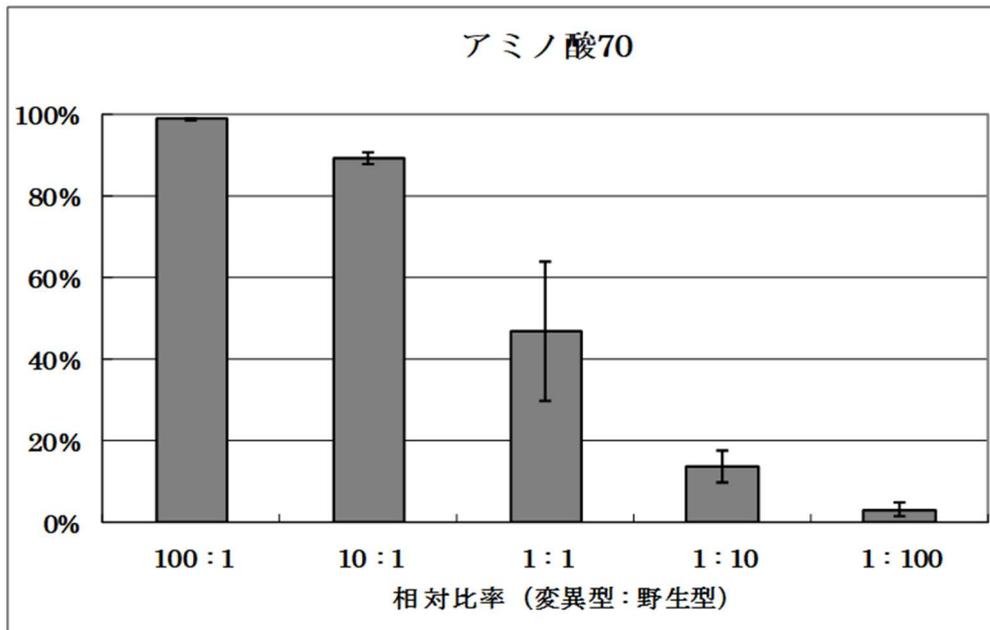


図 4. リアルタイムモニタリング定量法の検出感度

アミノ酸 70 についてはマイナー遺伝子型のコピー数を 10^1 コピー、アミノ酸 91 については 10^2 コピーとした。

マイナーな遺伝子型を 1:100 の比率で検出した。

縦軸：リアルタイムモニタリング定量法における変異比率

横軸：プラスミドの相対比率 (変異型：野生型)

変異型 / 野生型プラスミドを 100:1~1:100 の割合で混合し、測定した。

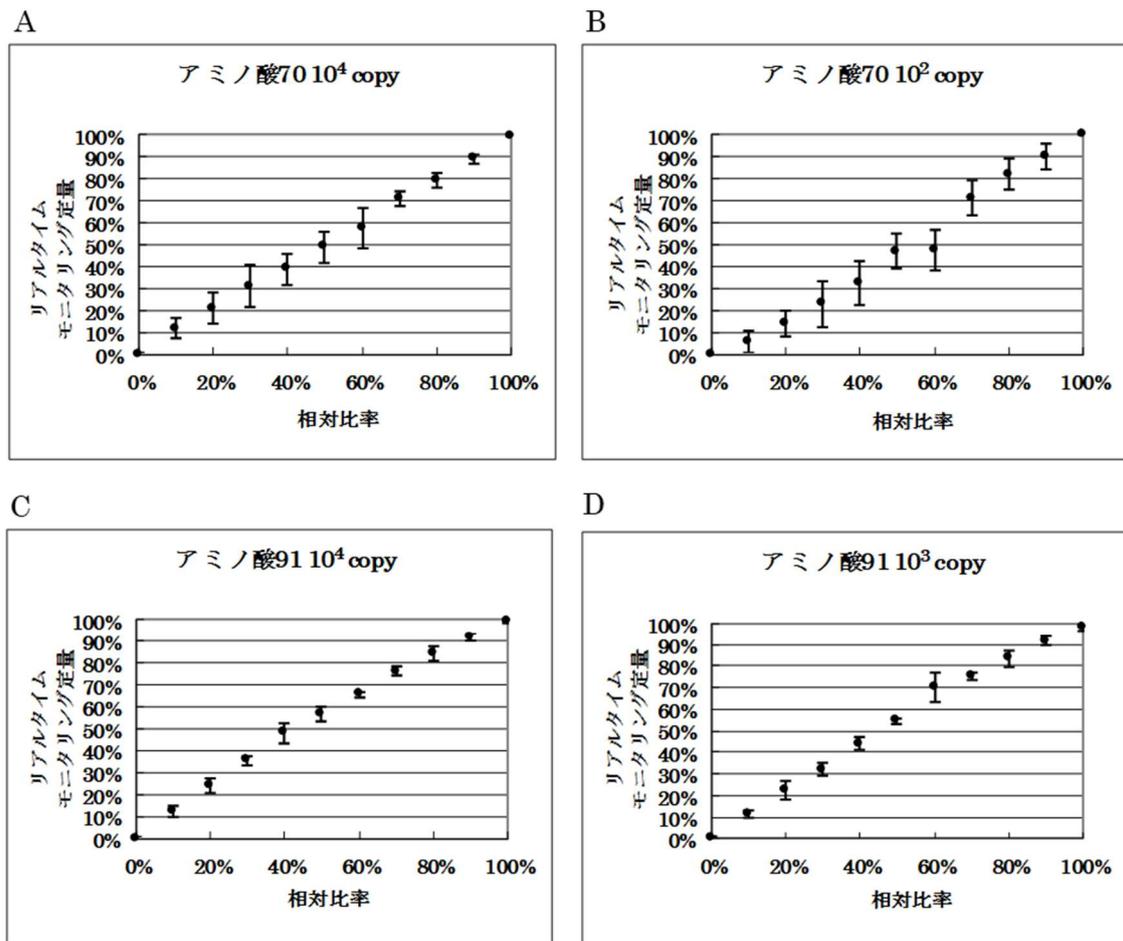


図 5. リアルタイムモニタリング定量法における混合プラスミドを用いた再現性試験
 変異型比率 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 および 100% となるようにプラスミドを混合した。
 アミノ酸 70 では総量 10^4 コピー (A) および 10^2 コピー (B)、アミノ酸 91 では総量 10^4 コピー (C) および 10^3 コピー (D) で測定した。
 算出した相対比率はテンプレート DNA の相対比率と一致した。
 縦軸：リアルタイムモニタリング定量法における変異比率
 横軸：プラスミドの相対比率

総括

フラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構による核酸の定性および定量的遺伝子検出法の医療診断分野における基盤構築とその技術応用

フラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構（インバーダー法）はヒトゲノムにおける一塩基多型（SNP）を判定するための方法として 2000 年に Lyamichev らによって報告された（47）。この方法は多型を検出する 1 次反応と蛍光を産生する 2 次反応が同一ウェルかつ等温条件で同時に進行するため、標的配列に依存した蛍光物質標識オリゴマーを必要としない。本学位論文では、インバーダー法を基盤とした感染症あるいは造血器腫瘍などの疾病診断法確立について述べた。

第 I 章では Hepatitis B virus（HBV）を標的とした PCR-インバーダー法を用いた二つの定性解析法確立について論じた。

第 I 章-1 は HBV 遺伝子型判定法の確立についてまとめた。HBV は 8%以上の配列の違いから大きく 8 つの遺伝子型（A-H）に分類されており、A 型および B 型についてはそれぞれ二つの亜型が報告されている。各遺伝子型は、特徴的な地理的分布を示すととも臨床的な相違についても研究が進められている。本章では、HBV の遺伝子型（Aa, Ae, Ba, Bj, C, D, E, F, G および H 型）判別法構築にかかる研究成果を示した。genebank に登録されている各遺伝子型の完全長 HBV ゲノムを比較し、同じ遺伝子型内で保存されているが、異なる遺伝子型間では DNA 配列が異なる領域をコアタンパク質コード領域、S タンパク質コード領域から選び、遺伝子型依存的に得的なインバーダー反応のシグナルが得られるようにプライマー、プライマリープローブおよびインバーダーオリゴ DNA を設計した。計 505 例の B 型慢性肝炎患者の血清検体を用いて、モノクローナル抗体を用いた EIA 法および GSPA 法と遺伝子型判定結果を比較し、EIA 法では単一遺伝子型と判定された 165 例中 162 例（98.2%）、GSPA 法では、343 例中 333 例（97.1%）で PCR-インバーダー法による判定と一致した。GSPA 法で判定不能となった 10 例については、ダイレクトシーケンス解析により PCR-インバーダー法で判定された遺伝子型が確認された。

核酸アナログを使用した HBV 治療において、耐性変異を早期にとらえることは薬剤選択のうえで重要である。第 I 章-2 では薬剤耐性との関連が報告されている HBV ポリメラーゼ RT ドメインにおける 6 コドン（L180M、A181G/S/T/V、T184A/C/F/G/I/L/M/S、S202C/G/I、M204I/V、M250I/L/V）の変異を検出する HBV 薬剤耐性変異検出法について述べた。野生型と変異型の PCR 産物を組み込んだプラスミドを用いた測定感度の検討では 2%の変異型を検出可能であった。核酸アナログをラミブジンからエンテカビルに変更した 75 例の臨床検体についてダイレクトシーケンスの結果を比較した。ダイレクトシーケンスで検出した変異は全て PCR-インバーダー法でも検出可能であった。さら

に、インベーター法では、ダイレクトシーケンスでは検出されない微小な変異も検出可能であった。特に S202G 変異についてはダイレクトシーケンスでの変異検出率は 4.0% であったのに対して PCR-インベーター法では 34.7% であり、有意に高感度で検出可能であった。

第 II 章ではインベーター法を利用した定量解析について記した。第 II 章-1 では蛍光強度比を用いた簡易定量法による *BCR/ABL* キメラ mRNA に認められる *ABL* 遺伝子キナーゼドメインアミノ酸 315 変異 (Threonine → Isoleucine) の相対比率算出による治療効果予測法について述べた。慢性骨髄性白血病 (CML) ではチロシンキナーゼインヒビターを用いた治療が標準療法として確立されている。*BCR/ABL* 遺伝子 *ABL* キナーゼドメインにおける点突然変異は薬剤に抵抗を示す原因になる。特にアミノ酸 315 変異 (T315I) は第二世代を含む全てのチロシンキナーゼに対して耐性を獲得することが知られている。本章では、*BCR/ABL* キメラ mRNA 中の T315I 変異クローンを相対定量解析 (1-100%) する方法について検討した。野生型と変異型の PCR 産物を組み込んだプラスミドを用いたインベーター法による測定感度の検討では、1%の変異型を検出可能であった。T315I 変異陽性となった 2 症例の時系列検体を用いてダイレクトシーケンス、定性 ASO-PCR および PCR-インベーター法と結果を比較した。2 検体 (8.3%、14.3%) については定性および定量 ASO-PCR、PCR-インベーター法では T315I 変異を検出したが、ダイレクトシーケンスでは検出できなかった。PCR-インベーター法は変異率 8.3~60.6%において定量 ASO-PCR と高い相関性を示した (決定係数 $R^2=0.951$)。

第 II 章-2 ではリアルタイム PCR とインベーター反応を組み合わせた広範囲なダイナミックレンジを有する“リアルタイムモニタリング定量法”の開発について述べた。リアルタイム PCR はウイルスあるいは細菌を定量するために有効な方法だが、標的ごとに異なった蛍光プローブを必要とするためにコストがかかる。共通の蛍光標識プローブを用いることができれば、複数の異なるターゲットを検出する際に低コストかつ効率的に測定が可能である。“リアルタイムモニタリング定量法”では PCR 増幅とインベーター反応は下記のように同時進行していく。①PCR 産物は熱変性により 1 本鎖となる。②ステプライマリプローブおよびインベーターオリゴ DNA が結合し、フラップエンドヌクレアーゼによりプライマリプローブの 5' -側からフラップ配列が切り離される。遊離したフラップ配列は蛍光標識された FRET カセットに結合し、フラップエンドヌクレアーゼにより、蛍光物質が遊離する (インベーター反応)。③テンプレート DNA あるいは PCR 産物にプライマーが結合する。④DNA ポリメラーゼ (AmpliTaq Stoffel fragment) により相補鎖が合成される。本測定法の性能評価のためにヒトパピローマウイルス 16 (HPV16) の測定系を構築し、加水分解プローブを用いたリアルタイム PCR と結果を比較した。HPV-DNA の希釈系列を測定した際の標準曲線の傾きは“リアルタイムモニタリング定量法”が -3.39、リアルタイム PCR が -3.33 であった。この結果から増幅効率は“リアルタイムモニタリング定量法”が 97.24%、リアルタイム PCR が 99.66% となった。標準曲線の Y 切片

は“リアルタイムモニタリング定量法”が 35.08、リアルタイム PCR が 41.96 となり、全てのポイントで 6~8 サイクル早い C_p 値が得られた。14 例の HPV 16 陽性検体における両法の定量値は累乗近似曲線における決定係数 R^2 : 0.9681 と良好な相関性を示した。

第 II 章-3 では“リアルタイムモニタリング定量法”を用いたハイリスク HPV14 遺伝子型の相対定量解析による子宮頸がんリスク評価方法の開発について述べた。HPV は、子宮頸癌リスクに基づいて低リスクウイルス遺伝子型あるいは高リスク遺伝子型に分類されている。少なくとも 14 の遺伝子型 (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67 および 68 型) が高リスクに分類されており、高リスク HPV 遺伝子型を迅速に診断することは検診の成果を高め、治療方針を決める上で重要な情報を提供する。HPV は複数の遺伝子型が同時に感染する重複感染の頻度が高いことが報告されているが、病態との関連性については不明な点が多い。複数の遺伝子型が同時感染している場合、それぞれの遺伝子型の比率を測定することは困難であり、検討報告も少ない。ハイリスク群に属する上記 HPV の 14 種類の遺伝子型の相対定量解析による、子宮頸がんリスク評価方法の開発を目的として、“リアルタイムモニタリング定量法”を用いて検討をおこない、ダイレクトシーケンスと結果を比較した。前章の“リアルタイムモニタリング定量法”を改変し、2 種類の蛍光物質を用いて 7 ウェルで HPV の 14 種類の遺伝子型を相対定量解析した。182 例の子宮頸部擦過サンプルについて測定し、131 例から HPV を検出した。このうち 104 例からは単一の遺伝子型、27 例から複数の遺伝子型を検出可能であった。一症例における混在する遺伝子型の最大数は 4 であった。単一の遺伝子型が検出された 104 例については L1C1/C2 プライマーを用いたダイレクトシーケンスで配列を決定し、本方法との整合性が確認された。

歯周病は *A. actinomycetemcomitans*、*P. gingivalis*、*P. intermedia*、*T. denticola*、*T. forsythensis* および *F. nucleatum* などの口腔細菌によって引き起こされる。特に *P. gingivalis*、*T. denticola*、および *T. forsythensis* の 3 菌種は「Red complex」と呼ばれ、深刻な歯周病と関連し、その他の菌種についても歯周炎を引き起こすことが報告されている。第 II 章-4 では Red complex を含む 6 菌種の歯周病関連菌のリアルタイムモニタリング定量法を用いた定量解析について述べた。それぞれの細菌から抽出した DNA の希釈系列を用いた測定感度の検討では 10ng から 10fg までを濃度依存的に検出が可能であった。64 例のボランティア唾液検体を測定しリアルタイム PCR との良好な相関性を示した。

第 II 章-5 ではリアルタイムモニタリング定量法を用いた C 型肝炎ウイルス (HCV) コア領域アミノ酸 70・91 変異の相対定量解析による肝発がんリスク評価方法について述べた。HCV は全世界でおよそ 1 億 7000 万人が感染していると考えられている。HCV 感染は慢性疾患を引き起こし、肝硬変や肝臓がん (HCC) などの重篤な症状へとつながる可能性を上昇させる。HCV-1b コア領域のアミノ酸 70 変異 (Arginine → Glutamine あるいは Histidine) および 91 変異 (Leucine → Methionine) はペグインターフェロン (PEG-IFN) およびリバビリン (RBV) 併用療法の治療成功率の低下と関連している。リアルタ

イムモニタリング定量法を用いたアミノ酸 70 / 91 変異の相対定量解析法の開発を目的として検討を行い、ダイレクトシーケンスおよび変異型特異的プライマーを用いた PCR と結果を比較した。変異型/野生型プラスミドを用いた検討では 1%のマイナー遺伝子型を検出し、算出した相対比率はテンプレートと一致した。123 例の臨床検体を用いた検討では、シーケンスで検出した全ての変異をリアルタイムモニタリング定量法で検出した。シーケンスで確認できなかった変異については遺伝子型特異的プライマーを用いた PCR で確認した。

以上、フラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構（インベーター法）は、感染症あるいは造血器腫瘍などの疾病診断に広く応用可能であることを示した。インベーター法はあくまで既知の一塩基置換を速やかに検出するための検査法であり、新たなものの探索には適していない。しかしながら、現在流行している新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）も、点突然変異によるアミノ酸置換がワクチンからの逃避や新薬の効果低下につながる可能性もあり、迅速且つ高精度なバリエーションウイルスの検出が求められている。このようなケースにおいて、インベーター法を導入するメリットは高く、今後、本方法の応用範囲は更に拡大していくと思われる。また本論文で検討したリアルタイムモニタリング定量法は一塩基置換における相対定量解析に適しており、特に感染症および造血器腫瘍領域でのさらなる応用が期待できると思われる。

謝辞

本論文の執筆にあたり、多大なご指導をいただきました北里大学大村智記念研究所ウイルス感染制御学研究室1の片山和彦教授に心より感謝致します。また、本研究の指導には株式会社ビー・エム・エル総研第三検査部の山口敏和部長、江頭徹顧問にも多大な御指導をいただきました。心より感謝いたします。HBVおよびHCVの研究では国家公務員共済組合連合会虎の門病院分院の熊田博光顧問、肝臓研究室の小林万利子室長、肝臓内科の鈴木文孝部長にも御指導いただきましたことを感謝致します。ABL遺伝子キナーゼドメイン変異の研究では埼玉医科大学国際医療センターの石川真穂講師にも御指導いただきましたことを感謝いたします。株式会社ビー・エム・エルの近藤健介社長、荒井信貴副社長、奈良部安検査本部長には私の学位（論文博士）申請を許諾いただきましたことを感謝致します。平井博之課長には申請を応援していただきましたことを感謝致します。株式会社ビー・エム・エルゲノム検査課のメンバーには本研究のアドバイスをいただきましたことを感謝致します。

引用文献

- (1) Akuta, N., Suzuki, F., Sezaki, H., Suzuki, Y., Hosaka, T., Someya, T., Kobayashi, M., Saitoh, S., Watahiki, S., Sato, J., Matsuda, M., Kobayashi, M., Arase, Y., Ikeda, K., Kumada, H. 2005. Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology*. 48. 372-80.
- (2) Akuta, N., Suzuki, F., Sezaki, H., Suzuki, Y., Hosaka, T., Someya, T., Kobayashi, M., Saitoh, S., Watahiki, S., Sato, J., Kobayashi, M., Arase, Y., Ikeda, K., Kumada, H., 2006. Predictive factors of virological non-response to interferon-ribavirin combination therapy for patients infected with hepatitis C virus of genotype 1b and high viral load. *J Med Virol*. 78. 83-90.
- (3) Akuta, N., Suzuki, F., Hirakawa, M., Kawamura, Y., Yatsuji, H., Sezaki, H., Suzuki, Y., Hosaka, T., Kobayashi, M., Kobayashi, M., Saitoh, S., Arase, Y., Ikeda, K., Chayama, K., Nakamura, Y., Kumada, H. 2010. Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology*. 52. 421-9.
- (4) Asato, T., Maehama, T., Nagai, Y., Kanazawa, K., Uezato, H., Kariya, K. 2004. A large case-control study of cervical cancer risk associated with human papillomavirus infection in Japan, by nucleotide sequencing-based genotyping. *J. Infect. Dis.* 189, 1829–1832.
- (5) Ashimoto, A., C. Chen, I. Bakker, and J. Slots. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* 11, 266–273.
- (6) Avery, OT., MacLeod, CM., and McCarty, M. 1944. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. *Journal of Experimental Medicine* 79(2): 137-158.
- (7) Branford, S., Rudzki, Z., Walsh, S., Parkinson, I., Grigg, A., Szer, J., Taylor, K., Herrmann, R., Seymour, JF., Arthur, C., Joske, D., Lynch, K., Hughes, T. 2003.

Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*. 102(1):276-83.

- (8)Burd, E.M. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 1–17.
- (9)Capone, RB., Pai, SI., Koch, WM., Gillison, ML., Danish, HN., Westra, WH., Daniel, R., Shah, KV., Sidransky, D. 2000. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 6, 4171-5.
- (10)Chien, A., Edgar, DB., Trela, JM. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127(3):1550–1557.
- (11)Cleary, ML., Chao, J., Warnke, R., and Sklar, J. 1984. Immunoglobulin gene rearrangement as a diagnostic criterion of B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(2): 593–597.
- (12)Chomel JC, Sorel N, Bonnet ML, Bertrand A, Brizard F, Saulnier PJ, Roy L, Guilhot F, Turhan AG. 2009. Quantitative monitoring of the T315I mutation in patients with chronic myeloid leukemia (CML). *Leuk Res.* 33(4), 551-5.
- (13)Coutlée, F., Gravitt, P., Kornegay, J., Hankins, C., Richardson, H., Lapointe, N., Voyer, H., Franco, E. 2002. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J. Clin. Microbiol.* 40, 902–907.
- (14)Degertekin, B., Hussain, M., Tan, J., Oberhelman, K., Lok, A.S., 2008. Sensitivity and accuracy of an updated line probe assay (HBV DR v.3) in detecting mutations associated with hepatitis B antiviral resistance. *J Hepatol.* 50, 42-8.
- (15)Druker, BJ. 2008. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood.* 112(13):4808-17.

- (16)Fareed, M., Afzal, M. 2013. Single-nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 14 (2): 123–134.
- (17)Foschi, F., Izard, J., Sasaki, H., Sambri, V., Prati, C., Müller, R., Stashenko, P. 2006. Treponema denticola in disseminating endodontic infections. *J Dent Res*. 85(8), 761-5.
- (18)Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R., Smith, C., Marinos, G., Gonçales, F.L. Jr., Häussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., Yu, J. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 347. 975-82.
- (19)Funaoka, Y., Sakamoto, N., Suda, G., Itsui, Y., Nakagawa, M., Kakinuma, S., Watanabe, T., Mishima, K., Ueyama, M., Onozuka, I., Nitta, S., Kitazume, A., Kiyohashi, K., Murakawa, M., Azuma, S., Tsuchiya, K., Watanabe, M. 2011. Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. *J Virol*. 85, 5986-94.
- (20)Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., Heinzen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Muir, A.J., Sulkowski, M., McHutchison, J.G., Goldstein, D.B. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 461, 399-401.
- (21)Gravitt, P.E., Peyton, C.L., Apple, R.J., Wheeler, C.M. 1998. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J. Clin. Microbiol*. 36, 3020–3027
- (22)Han, J., Swan, D.C., Smith, S.J., Lum, S.H., Sefers, S.E., Unger, E.R., Tang, Y.W. 2006. Simultaneous amplification and identification of 25 human papillomavirus types with Templex technology. *J. Clin. Microbiol*. 44:4157–4162.
- (23)Hashimoto, Y., Suzuki, F., Hirakawa, M., Kawamura, Y., Yatsuji, H., Sezaki, H., Hosaka, T., Akuta, N., Kobayashi, M., Saito, S., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Arase, Y., Ikeda, K., Kumada H., 2010. Clinical and virological effects of long-term (over 5 years) lamivudine therapy. *J Med Virol*. 82. 684-91.

- (24) Heid, CA, Stevens, J, Livak, KJ, Williams, PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6(10):986-94.
- (25) Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. 1993. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026–1030.
- (26) Jacobs, M.V., Snidjers, P.J.F., van den Brule, A.J.C., Helmerhorst, T.J.M., Meijer, C., Walboomers, J. 1997. A general primer GP5_/GP6_-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J. Clin. Microbiol.* 35, 791–795.
- (27) Kao, JH., Chen, PJ., Lai, MY., Chen, DS. 2000. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 118, 554-559
- (28) Kato, H., Orito, E., Sugauchi, F., Ueda, R., Koshizaka, T., Yanaka, S., Gish, R.G., Kurbanov, F., Ruzibakiev, R., Kramvis, A., Kew, M.C., Ahmad, N., Khan, M., Usuda, S., Miyakawa, Y., Mizokami, M. 2003. Frequent coinfection with hepatitis B virus strains of distinct genotypes detected by hybridization with type-specific probes immobilized on a solid-phase support. *J. Virol. Methods* 110, 29–35.
- (29) Khorashad, JS., Anand, M., Marin, D., Saunders, S., Al-Jabary, T., Iqbal, A., Margerison, S., Melo, JV., Goldman, JM., Apperley, JF., Kaeda, J. 2006. The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia* 20(4), 658-63.
- (30) Kobayashi, M., Suzuki, F., Akuta, N., Tsubota, A., Ikeda, K., Arase, Y., Suzuki, Y., Saitoh, S., Kobayashi, M., Hosaka, T., Someya, T., Matsuda, M., Sato, J., Miyakawa, Y., Kumada, H. 2005. Virological differences between patients infected with subtypes Ba and Bj of hepatitis B virus genotype B. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20, 570–576.
- (31) Kobayashi, M., Akuta, N., Suzuki, F., Suzuki, Y., Arase, Y., Ikeda, K., Hosaka, T., Saitoh, S., Kobayashi, M., Someya, T., Sato, J., Watabiki, S., Miyakawa, Y., Kumada, H. 2006. Virological outcomes in patients infected chronically with

hepatitis B virus genotype A in comparison with genotypes B and C. *J. Med. Virol.* 78, 60–67.

- (32) Kobayashi, M., Saitoh, S., Ikeda, K., Kobayashi, M., Matsuda, M., Satoh, J., Takagi, K., Kumada, H., 2003. Efficacy of lamivudine therapy and factors associated with emergence of resistance in chronic hepatitis B virus infection in Japan. *Intervirology*. 46. 182-9.
- (33) Kofla, G., Ruhnke, M., 2007. Development of a new real-time TaqMan PCR assay for quantitative analyses of *Candida albicans* resistance genes expression. *J. Microbiol. Methods*. 68, 178–183
- (34) Kozuka, R., Enomoto, M., Hai, H., Ogawa, T., Nakaya, M., Hagihara, A., Fujii, H., Kobayashi, S., Iwai, S., Morikawa, H., Tamori, A., Kawada, N. 2012. Changes in sequences of core region, interferon sensitivity-determining region and interferon and ribavirin resistance-determining region of hepatitis C virus genotype 1 during interferon-alpha and ribavirin therapy, and efficacy of retreatment. *Hepatol Res.* 42(12), 1157-67.
- (35) Kramvis, A., Weitzmann, L., Owiredu, W.K., Kew, M.C. 2002. Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. *J. Gen. Virol.* 83, 835–839.
- (36) Kumada, H., Toyota, J., Okanoue, T., Chayama, K., Tsubouchi, H., Hayashi, N. 2012. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for treatment-naive patients chronically infected with HCV of genotype 1 in Japan. *J Hepatol.* 56(1), 78-84
- (37) Kumada, H., Suzuki, Y., Ikeda, K., Toyota, J., Karino, Y., Chayama, K., Kawakami, Y., Ido, A., Yamamoto, K., Takaguchi, K., Izumi, N., Koike, K., Takehara, T., Kawada, N., Sata, M., Miyagoshi, H., Eley, T., McPhee, F., Damokosh, A., Ishikawa, H., Hughes, E. 2014. Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection. *Hepatology* 59(6), 2083-91.
- (38) Kurbanov, F., Tanaka, Y., Matsuura, K., Sugauchi, F., Elkady, A., Khan, A., Hasegawa, I., Ohno, T., Tokuda, H., Mizokami, M. 2010. Positive selection of core

70Q variant genotype 1b hepatitis C virus strains induced by pegylated interferon and ribavirin. *J Infect Dis.* 201. 1663-71.

- (39)Lai E, Riley J, Purvis I, Roses A. 1998. A 4-Mb high-density single nucleotide polymorphism-based map around human APOE. *Genomics.* 54(1):31-8.
- (40)Lau, L., M. Sanz, D. Herrera, J. M. Morillo, C. Martín, and A. Silva. 2004. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J. Clin. Periodontol.* 31, 1061–1069
- (41)Lee, Y.S., Suh, D.J., Lim, Y.S., Jung, S.W., Kim, K.M., Lee, H.C., Chung, Y.H., Lee, Y.S., Yoo, W., Kim, S.O., 2006. Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy. *Hepatology.* 43, 1385-91.
- (42)Libbrecht, E., Doutreloigne, J., Van De Velde, H., Yuen, M.F., Lai, C.L., Shapiro, F., Sablon, E., 2007. Evolution of primary and compensatory lamivudine resistance mutations in chronic hepatitis B virus-infected patients during long-term lamivudine treatment assessed by a line probe assay. *J Clin Microbiol.* 45, 3935-41.
- (43)Locarnini, S., 2008. Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. *Hepatol Int.* 2. 147-51.
- (44)Lindh M., Görander S., Andersson E., Horal P., Mattsby-Balzer I., Ryd W. 2007. Real-time Taqman PCR targeting 14 human papilloma virus types. *J. Clin. Virol.* 40, 321 –4.
- (45)Lorincz, A.T. 1996. Hybrid capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 22, 629–636.
- (46)Luu-The, V., Paquet, N., Calvo, E., Cumps, J., 2005. Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation

- and double correction. *Biotechniques*. 38, 287–293.
- (47) Lyamichev, V., Neri, B. 2003. Invader assay for SNP genotyping. *Methods Mol Biol* 212:229-40.
- (48) Mizokami, M., Nakano, T., Orito, E., Tanaka, Y., Sakugawa, H., Mukaide, M., Robertson, B.H. 1999. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Lett.* 450, 66–71.
- (49) Manigold, T., Rehermann, B., 2003. Chronic hepatitis B and hepatocarcinogenesis: does prevention of "collateral damage" bring the cure? *Hepatology*. 37. 707-10.
- (50) Martell, M., Gomez, J., Esteban, J. I., Sauleda, S., Quer, J., Cabot, B., Esteban, R., Guardia, J., 1999. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J. Clin. Microbiol.* 37, 27–32.
- (51) Martin, FE., Nadkarni, MA., Jacques, NA., Hunter, N., 2002. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1698–704.
- (52) Moberg, M., Gustavsson, I., Gyllensten, U., 2003. Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papilloma virus types associated with high risk of cervical cancer. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3221–3228.
- (53) Mullis, KB, Faloona, FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335–350.
- (54) Naito, M., A. Matsui, M. Inao, S. Nagoshi, M. Nagano, N. Ito, T. Egashira, M. Hashimoto, S. Mishiro, S. Mochida, and K. Fujiwara. 2005. SNPs in the promoter region of the osteopontin gene as a marker predicting the efficacy of interferon-based therapies in patients with chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol.* 40, 381–388.
- (55) Nakamoto, S., Imazeki, F., Fukai, K., Fujiwara, K., Arai, M., Kanda, T., Yonemitsu, Y., Yokosuka, O. 2010. Association between mutations in the core region of hepatitis C virus genotype 1 and hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol.*

52. 72-8.

- (56) Narayanan, S. 1991. Applications of restriction fragment length polymorphism. *Ann Clin Lab Sci.* 21(4):291-6.
- (57) Nevilie, M., Selzer, R., Aizenstein, B., Maguire, M., Hogan, K., Walton, R., Welsh, K., Neri, B., de Arruda, M. 2002. Characterization of cytochrome P450 2D6 alleles using the Invader system. *Biotechniques* S34-8, 40-3.
- (58) Nicolini, FE., Corm, S., Lê, QH., Sorel, N., Hayette, S., Bories, D., Leguay, T., Roy, L., Giraudier, S., Tulliez, M., Facon, T., Mahon, FX., Cayuela, JM., Rousselot, P., Michallet, M., Preudhomme, C., Guilhot, F., Roche-Lestienne, C. 2006. Mutation status and clinical outcome of 89 imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia patients: a retrospective analysis from the French intergroup of CML (Fi(phi)-LMC GROUP). *Leukemia.* 20(6), 1061-6.
- (59) Nishiwaki, M., Yamamoto, T., Tone, S., Murai, T., Ohkawara, T., Matsunami, T., Koizumi, M., Takagi, Y., Yamaguchi, J., Kondo, N., Nishihira, J., Horikawa, T., Yoshiki, T. 2008. Genotyping of human papillomaviruses by a novel one-step typing method with multiplex PCR and clinical applications. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1161-8.
- (60) Nobre, R.J., de Almeida, L.P., Martins, T.C. 2008. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. *J. Clin. Virol.* 42, 13-21.
- (61) Noronha, G., Cao, J., Chow, CP., Dneprovskaja, E., Fine, RM., Hood, J., Kang, X., Klebansky, B., Lohse, D., Mak, CC., McPherson, A., Palanki, MS., Pathak, VP., Renick, J., Soll, R., Zeng, B. 2008. Inhibitors of ABL and the ABL-T315I mutation. *Curr Top Med Chem.* 8(10), 905-21.
- (62) Nyren, P., Petersson, B., and Uhlen, M. 1993. Solid Phase DNA Minisequencing by an Enzymatic Luminometric Inorganic Pyrophosphate Detection Assay. *Analytical Biochemistry* 208 (1), 171-175.
- (63) Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R.I., Imai, M., Miyakawa,

- Y., Mayumi, M. 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence, comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.* 69, 2575–2583.
- (64) Okamoto, K., Akuta, N., Kumada, H., Kobayashi, M., Matsuo, Y., Tazawa, H. 2007. A nucleotide sequence variation detection system for the core region of hepatitis C virus-1b. *J Virol Methods.* 141. 1-6.
- (65) Orito, E., Ichida, T., Sakugawa, H., Sata, M., Horiike, N., Hino, K., Okita, K., Okanoue, T., Iino, S., Tanaka, E., Suzuki, K., Watanabe, H., Hige, S., Mizokami, M. 2001 Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 34, 590–594.
- (66) Peyton, C.L., Schiffman, M., Lörincz, A.T., Hunt, W.C., Mielzynska, I., Bratti, C., Eaton, S., Hildesheim, A., Morera, L.A., Rodriguez, A.C., Herrero, R., Sherman, M.E., Wheeler, C.M., 1998. Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J. Clin. Microbiol.* 36. 3248–3254.
- (67) Pirog, E. C., Kleter, B., Olgac, S., Bobkiewicz, P., Lindeman, J., Quint, W. G., Richart, R. M., Isacson, C. 2000. Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* 157, 1055–1062.
- (68) Poláková, KM., Lopotová, T., Klamová, H., Moravcová, J. 2008. High-resolution melt curve analysis: initial screening for mutations in BCR-ABL kinase domain. *Leuk Res.* 32, 1236-43.
- (69) Roche-Lestienne, C., Preudhomme, C. 2003. Mutations in the ABL kinase domain pre-exist the onset of imatinib treatment. *Semin Hematol.* 40, 80-2.
- (70) Sanger, F. and Coulson, AR. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 94 (3): 441-446.
- (71) Sakamoto, M., Y, Takeuchi., M, Umeda., I, Ishikawa., and Y, Benno. 2001. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR.

- (72) Seeff, L.B. 2002. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002. 36. S35-46.
- (73) Seko, Y., Akuta, N., Suzuki, F., Kawamura, Y., Sezaki, H., Suzuki, Y., Hosaka, T., Kobayashi, M., Kobayashi, M., Saitoh, S., Arase, Y., Ikeda, K., Kumada, H. 2013. Amino Acid Substitutions in the Hepatitis C Virus Core Region and Lipid Metabolism Are Associated with Hepatocarcinogenesis in Nonresponders to Interferon plus Ribavirin Combination Therapy. *Intervirology* 56(1), 13-21
- (74) Smith, T.A., Whelan, J., Parry, P.J. 1992 Detection of single-base mutations in a mixed population of cells: a comparison of SSCP and direct sequencing. *Genet Anal Tech* 9, 143-5.
- (75) Speich, N., Schmitt, C., Bollmann, R., Bollmann, M. 2004. Human papillomavirus (HPV) study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: genotype spectrum of patients from the West German area. *J. Med. Microbiol.* 53, 125–128
- (76) Sugauchi, F., Orito, E., Ichida, T., Kato, H., Sakugawa, H., Kakumu, S., Ishida, T., Chutaputti, A., Lai, C.L., Ueda, R., Miyakawa, Y., Mizokami, M. 2002. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J. Virol.* 76, 5985–5992.
- (77) Suzuki, F., Tsubota, A., Arase, Y., Suzuki, Y., Akuta, N., Hosaka, T., Someya, T. 2013 Dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir for patients with HCV genotype 1b infection and limited treatment options. *J Hepatol.* 58(4), 655-62.
- (78) Suzuki F, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Seko Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Mineta R, Watahiki S, Miyakawa Y, Kumada H. 2012. Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. *J Clin Virol.* 54(4), 352-4.

- (79) Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, Yatsuji H, Sezaki H, Arase Y, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Kumada H. Efficacy of switching to entecavir monotherapy in Japanese lamivudine-pretreated patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 May;25(5):892-8.
- (80) Tadokoro, K., Kobayashi, M., Yamaguchi, T., Suzuki, F., Miyauchi, S., Egashira, T., Kumada, H. 2006 Classification of hepatitis B virus genotypes by the PCR-Invader method with genotype-specific probes. *J Virol Methods*. 138(1-2), 30-9.
- (81) Tadokoro, K., Suzuki, F., Kobayashi, M., Yamaguchi, T., Nagano, M., Egashira, T., Kumada, H. 2011. Rapid detection of drug-resistant mutations in hepatitis B virus by the PCR-Invader assay. *J Virol Methods*. 171(1):67-73.
- (82) Tadokoro, K., Ishikawa, M., Suzuki, M., Saito, T., Suzuki, Y., Yamaguchi, T., Yagasaki, F. 2011 Comparative quantitative analysis of BCR-ABL transcripts with the T315I mutant clone by polymerase chain reaction (PCR)-Invader method. *Transl Res*. 158(3), 169-79.
- (83) Tadokoro, K., Yamaguchi, T., Egashira, T., Hara, T. 2009 Quantitation of viral load by real-time PCR-monitoring Invader reaction. *J Virol Methods*. 155(2), 182-6.
- (84) Tadokoro, K., Akutsu, Y., Tanaka, K., Saito, T., Yamaguchi, T., Egashira, T., Ishiwata, I., Hara, T. 2010 Comparative quantitative analysis of 14 types of human papillomavirus by real-time polymerase chain reaction monitoring Invader reaction (Q-Invader assay). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 66(1), 58-64.
- (85) Tadokoro, K., Yamaguchi, T., Kawamura, K., Shimizu, H., Egashira, T., Minabe, M., Yoshino, T, Oguchi, H. 2010 Rapid quantification of periodontitis-related bacteria using a novel modification of Invader PLUS technologies. *Microbiol Res*. 165(1), 43-9.
- (86) Tadokoro, K., Kobayashi, M., Suzuki, F., Tanaka, C., Yamaguchi, T., Nagano, M.,

- Egashira, T., Kumada, H. 2013 Comparative quantitative analysis of hepatitis C mutations at amino acids 70 and 91 in the core region by the Q-Invader assay. *J Virol Methods*. 189(1), 221-7.
- (87) Takács, T., Jeney, C., Kovács, L., Mózes, J., Benczik, M., Sebe, A. 2008. Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of 15 high-risk and 5 low-risk HPV types. *J. Virol. Methods*. 149, 153–162
- (88) Tanaka, Y., Nishida, N., Sugiyama, M., Kurosaki, M., Matsuura, K., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Korenaga, M., Hino, K., Hige, S., Ito, Y., Mita, E., Tanaka, E., Mochida, S., Murawaki, Y., Honda, M., Sakai, A., Hiasa, Y., Nishiguchi, S., Koike, A., Sakaida, I., Imamura, M., Ito, K., Yano, K., Masaki, N., Sugauchi, F., Izumi, N., Tokunaga, K., Mizokami, M. 2009. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 41. 1105-9.
- (89) Tenney, D.J., Rose, R.E., Baldick, C.J., Levine, S.M., Pokornowski, K.A., Walsh, A.W., Fang, J., Yu, C.F., Zhang, S., Mazzucco, C.E., Eggers, B., Hsu, M., Plym, M.J., Poundstone, P., Yang, J., Colonna, R.J. 2007. Two-year assessment of entecavir resistance in Lamivudine-refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance mutations present. *Antimicrob Agents Chemother*. 51. 902-11.
- (90) Thomas, D.L., Thio, C.L., Martin, M.P., Qi, Y., Ge, D., O'Huigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S.I., Alexander, G., Goedert, J.J., Kirk, G.D., Donfield, S.M., Rosen, H.R., Tobler, L.H., Busch, M.P., McHutchison, J.G., Goldstein, D.B., Carrington, M. 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 461. 798-801.
- (91) Usuda, S., Okamoto, H., Iwanari, H., Baba, K., Tsuda, F., Miyakawa, Y., Mayumi, M. 1999. Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product. *J. Virol. Methods*. 80, 97–112.
- (92) van Doorn, L.J., Quint, W., Kleter, B., Molijn, A., Colau, B., Martin, M.T., Kravang-

- In, Torrez-Martinez, N., Peyton, CL., Wheeler, CM. 2002. Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMY line blot assay and the SPF(10) line probe assay. *J Clin. Microbiol.* 40, 979-83.
- (93) Watson, JD, Crick, FH. 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 171(4356):737-8
- (94) Willis, SG., Lange, T., Demehri, S., Otto, S., Crossman, L., Niederwieser, D., Stoffregen, EP., McWeeney, S., Kovacs, I., Park, B., Druker, BJ., Deininger, MW. 2005. High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naive patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood.* 106(6), 2128-37.
- (95) Yatsuji, H., Suzuki, F., Sezaki, H., Akuta, N., Suzuki, Y., Kawamura, Y., Hosaka, T., Kobayashi, M., Saitoh, S., Arase, Y., Ikeda, K., Watahiki, S., Iwasaki, S., Kobayashi, M., Kumada, H., 2008. Low risk of adefovir resistance in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir plus lamivudine combination therapy: two-year follow-up. *J Hepatol.* 48. 923-31.
- (96) Yoshida, A., S. Nagashima, T. Ansai, M. Tachibana, H. Kato, H. Watari, T. Notomi, T. Takehara. 2005. Loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2418–2424
- (97) Yoshikawa, H., Kawana, T., Kitagawa, K., Mizuno, M., Yoshikura, H., Iwamoto, A., 1991. Detection and typing multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 524–31.
- (98) Zhang, X., Liu, C., Gong, Q., Zhang, S., Zhang, D., Lu, Z., Wang, Y., 2003. Evolution of wild type and mutants of the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy. *J Gastroenterol Hepatol.* 18. 1353-7.
- (99) Zoulim, F., Locarnini, S., 2009. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology.* 137. 1593-608
- (100) Zur Hausen, H., de Villiers, E.M. 1994. Human papillomaviruses. *Annu. Rev.*

Microbiol. 48, 427–447.

(101)木戸 隆宏 2007. 遺伝子診断の現状 保健医療技術学部論集 (1), 29-40.

(102)須貝 幸子、林 尚子、中村 祐輔. 1996. PCRによる点突然変異の検出--アレル特異的 PCR (PCR法最前線--基礎技術から応用まで) -- (PCRによる特定領域の変異の検出) 蛋白質核酸酵素 41(5), 546-548