

EBV 核酸増幅検査法の確立と一次国際標準品と標準物質による反応系の検証

©西山雄亮¹⁾、生田和史²⁾、眞野 容子¹⁾、古谷信彦¹⁾、福田 誠¹⁾
 文京学院大学 大学院保健医療科学研究科¹⁾、金沢大学 医薬保健研究域保健学系²⁾

【目的】 Epstein-Barr virus (EBV) 感染症検査には抗体検査と核酸検査があり、抗体検査としては EBV の capsid 抗原・早期抗原・核抗原の 3 抗原に対する抗体価測定が実施されている。コロナ禍により核酸検査法として PCR 検査が普及した。EBV 感染症や EBV 関連疾患においても、EBV DNA の検出と定量が EBV の存在実証と病態把握に有用とされている。そこで我々のグループでは、EBV DNA の PCR 検出系とリアルタイム PCR 定量系を確立した。

EBV の核酸標準品として、EBV 陽性バーキットリンパ腫 (BL) 由来細胞株と WHO の EBV 核酸増幅検査用第一次国際標準品 (1st WHO International Standard=WHO EBV 国際標準品) から核酸を抽出し、EBV DNA の PCR 検出系の検証を行った。PCR 増幅産物はシーケンス解析後にホモロジー検索による確認を行った。

【方法】 ①標準品：EBV 陽性 BL 由来細胞株として Akata 細胞、WHO EBV 国際標準品は 5×10^6 IU/ml を使用した。②DNA 精製：QIAamp DNA Mini Kit を用いた。③PCR 反応と産物の確認： TaKaRa PCR サーマルサイクラ

ー を用いて EBV DNA の BALF5 遺伝子領域を増幅後、Mupid 泳動槽を用いた電気泳動により確認した。④シーケンス解析：WHO EBV 国際標準品由来の PCR 増幅産物を QIAamp DNA Mini Kit で精製後、ユーロフィンジェノミクス株式会社により塩基配列を決定した。ホモロジーは NCBI BLAST により解析した。⑤リアルタイム PCR：StepOne plus リアルタイム PCR (ThermoFisher Scientific) を使い、SYBR Green による検討を行った。

【結果と考察】 DNA 精製キットにより Akata 細胞と WHO EBV 国際標準品から純度の高い EBV DNA を得た。両 DNA を使い、EBV DNA の BALF5 遺伝子領域を標的とした PCR において電気泳動により増幅産物を確認した。PCR 増幅産物の塩基配列は EBV DNA の BALF5 遺伝子領域と 100% 相同していることを確認した。リアルタイム PCR 系では標準品の段階希釈による検量線を作成した。PCR 産物では単一ピークを有する融解曲線を確認できたことにより、EBV DNA のリアルタイム PCR 定量系を確立した。連絡先 福田誠 mafukuda@bgu.ac.jp 03-3811-0465