

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460705

研究課題名(和文) サイクリングプローブLAMP法によるHHV-6型特異的定性/定量検出法の開発

研究課題名(英文) Development of quantitative method by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) using cycling probe.

研究代表者

井平 勝 (IHIRA, Masaru)

藤田保健衛生大学・保健学研究科・教授

研究者番号：10290165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：LAMP法は、定量的評価という点では課題が残る。これに対しcycling probeとの融合による解決を着想した。Cycling probe LAMP法の評価に用いたcycling probe PCR法は高感度でありTaqman probeによるreal-time PCRとの相関は優れていた。本法の至適条件設定としてpHとprobe濃度を検討、1000～100万コピーでCt値との間に優れた直線性を観察した。LAMP乾燥試薬によるHHV-6DNA検出結果は、液状試薬と一致していた。まだ改善は必要であるが乾燥試薬とcycling probe LAMP法による簡易迅速な定量法の構築が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study was to develop quantitative LAMP method for measurement of target DNA load by using cycling probe. We combine LAMP and cycling probe to develop new quantitative method. The cycling probe PCR had a broad, linear dynamic range of detection between 10 and 1000000 copies of viral DNA. Strong correlations were demonstrated between cycling probe PCR and Taqman real-time PCR. The optimized condition for cycling probe LAMP was confirmed using variable concentration of pH and probe. The cycling probe LAMP assay had excellent linear dynamic range between 1000 and 1000000 copies of viral DNA. However, cycling probe LAMP was less sensitive than Taqman real-time PCR. Result of detection from HHV6 DNA in serum by our developed dry reagent for LAMP were correspond with that of liquid reagent. Our cycling probe LAMP require improved sensitivity. However, combine dry reagent-LAMP and cycling probe suggest the possibility of rapid and simple DNA quantitation method.

研究分野：臨床ウイルス学

キーワード：HHV-6A HHV-6B LAMP cycling probe

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、突発性発疹(突発疹)の起因ウイルスである human herpes virus 6 (HHV-6) について臨床ウイルス研究を継続してきた。その過程で初感染HHV-6 迅速診断の必要性、臓器移植患者では、ウイルス再活性化の定量的モニタリング、特に移植後に問題となる他のヘルペス属ウイルスの同時測定(multiplex)が必要となることを痛感した。そこで、まずは LAMP 法 (Loop mediated isothermal amplification) に着目し、全てのヘルペスウイルスを対象とした LAMP 法による迅速ウイルス遺伝子増幅法を開発し報告してきた。LAMP 法は、独特なプライマーデザインと鎖置換型 DNA 合成酵素を用いることにより、等温ですぐれた核酸増幅効率を実現している。本法は、迅速な病原体核酸検出を行うための point of care test として極めて有用な検査法であるが、標的核酸の定量的評価、multiplex 化という点ではいまだ課題が多い。この問題点に対し本研究では、cycling probe と LAMP 法の融合による解決を目指した。同時に LAMP 試薬の乾燥化を行うことにより、さらなる簡易迅速な遺伝子定量法開発が可能となると考えた。

## 2. 研究の目的

Cycling probe 法は、その一部に DNA-RNA 鎖 (キメラ) を含むことにより、標的配列と完全に一致した時にプローブの RNA 鎖部分が RNase H により切断され蛍光を発する極めて特異性の高いプローブである。本研究は、cycling probe LAMP 法を確立することにより、現在の主流となっている real-time PCR 法とは異なった標的遺伝子の迅速定量法の確立を目指すとともに、最終的に multiplex 化を目的とした。

## 3. 研究の方法

Cycling probe PCR 法については、HHV-6 以外の病原微生物についてはすでにいくつかの論文が報告されている。LAMP 法構築の前に、probe が機能するか確認するため、まずは LAMP 法の標的領域とした HHV-6U31 領域について、cycling probe PCR 法によって非常に相同性の高い HHV-6A と B を識別可能かどうか検討した。これにより、cycling probe による HHV-6A と B の multiplex 定量 PCR 法が開発可能となる。続いて、臨床検体を使った際の有用性についても検討する。これら一連の研究は、cycling probe や試薬の取扱いや multiplex LAMP 法構築時に役立ち、cycling probe LAMP 法の評価の際に比較するうえでの基準になると考えた。

### (1) HHV-6 cycling probe PCR 法の構築 primer, probe の設計

標的表域を HHV-6 tegment protein をコードする U31 領域に設定、専用ソフトウェア (<http://www.takara-bio.co.jp/prt/snps/intro.html>) を用いて両ウイルスを識別する SNP を含むように primer、probe を設計した。Probe については SNP 位置が RNA になるよう設計した。

HHV-6A probe には Rox、HHV-6B には HEX と、Multiplex 化を考慮して異なった蛍光色素で標識した。

Target	Primers and probes	Sequences (5'-3')
HHV-6A	H6U31AF	CTGAACGAGAAGCCACAG
"	H6AU31R	CCGTGGAAAGAAATTTATCTAGC
"	U31H6Ap	5'-(Eclipse) TAAACTCTTCTCA (Rox) 3'
HHV-6B	H6BU31F	TCCACGGAAATCCATGATA
"	H6BU31R	AAAGCTCGGAATCAGGTC
"	U31H6Bp	5'-(Eclipse) AACGGAAGTC (HEX) 3'

表 1 cycling probe PCR primer、probe 配列

### HHV-6 cycling probe PCR 法

HHV-6A、B それぞれの標準株感染細胞から抽出した DNA を用いて、上記で設計した primer を用い PCR を行い標的領域同領域をサブクローニングした。作成したプラスミドを段階希釈し、キャリブレーション曲線を作成した。反応試薬は 16.5  $\mu$  l cycleave PCR® Reaction Mix (TAKARA) 115 nM of both primers (HHV-6A: H6U31AF、H6AU31R、HHV-6B: H6BU31F、H6BU31R)、115 nM probe (HHV-6A: U31H6Ap、HHV-6B: U31H6Bp) に 5  $\mu$  l of extracted DNA を加え、総量を 21.5  $\mu$  l とした。測定には Mx3005p (ストラタジーン) を用いた。それぞれの primer、probe による singleplex 反応 (単一 primer, probe) と multiplex 反応 (両 primer, probe を混合) 条件下で検出感度、日差・同時再現性を評価した。

### 特異性の確認

ヒトに感染する全てのヘルペスウイルス DNA を用いて、HHV-6 cycling probe PCR 法を行い特異性を確認した。

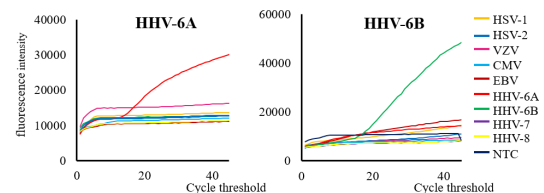
### ④ 臨床検体による有用性評価

造血幹細胞移植患者 8 名から移植後定期的に採血。全血 200  $\mu$  l から DNA を抽出、multiplex HHV-6 cycling probe PCR 法による HHV-6A、B の同時測定を行い real-time PCR 法と比較検討した。

### (2) 結果

#### HHV-6 cycling probe PCR 法の特異性

それぞれの標的に対して交差反応性を認めなかった (図 1)。

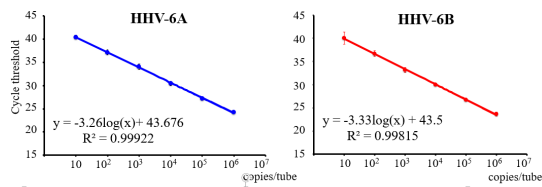


#### HHV-6 cycling probe PCR 法の感度

Singleplex 反応では、HHV-6A、B の各検出感度はいずれも 10 コピー/反応で、優れた直線性を示した。Multiplex 反応での検出感度も、単一標的の場合は 10 コピー/反応まで検出可能であった (図 2)。日差・同時再現性の検討においても、すべての Ct 値の CV は 5% 以下であった。しかし、サンプル内に両標的が同時に存在する場合を考え、HHV-6A と HHV-6B の両ウイルス DNA を含む検体を解析した結

果、HHV-6B が  $10^6$  コピー/反応以上存在すると HHV-6A の Ct(cycle threshold)値に影響が認められた。しかし、HHV-6A を含む検体では HHV-6B に対する影響はなかった。

Singleplex cycling probe real-time PCR



Multiplex cycling probe real-time PCR - single target -

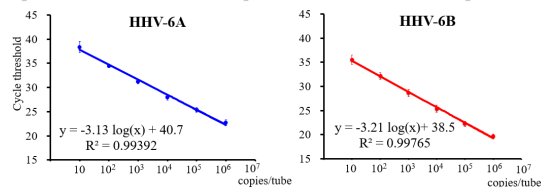


図 2

この場合の検出感度は、両ウイルスとも  $10^2$  copies/反応であった (図 3)。

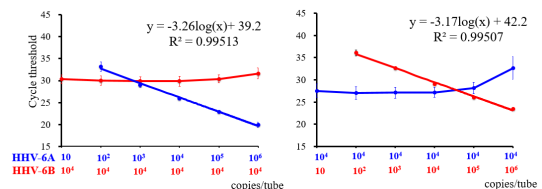
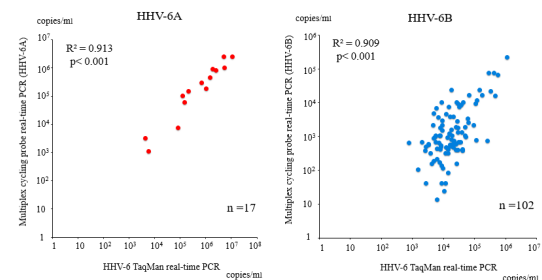


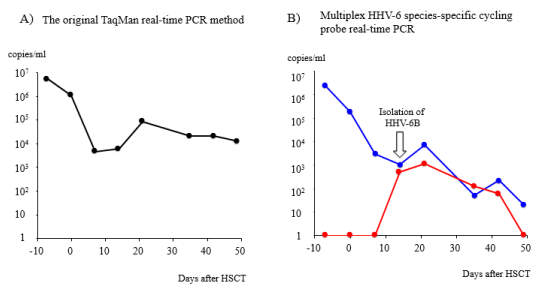
図 3

### HHV-6 cycling probe PCR 法の臨床的有用性

HHV-6 cycling probe PCR 法の multiplex 反応で測定された標的ウイルス DNA 量と、現在のゴールドスタンダードとされている real-time PCR による測定結果と比較した。図 4 に示すように、HHV-6A、HHV-6B ともにそ



れぞれのウイルス DNA 量には優れた相関が確認された (図 4)。移植後に同一検体から



HHV-6A、HHV-6B DNA が検出された症例について解析した結果を図 5 に示す。この患者は HHV-6A が染色体の中に挿入されている

(inherited chromosomally integrated human herpesvirus-6 : iciHHV-6A) ことが確認された症例である。レシピエントからの正常な造血幹細胞 (iciHHV-6 ではない) 移植によって、生着にともないドナー細胞由来の血液中 HHV-6A DNA は急激に減少している。ところが Multiplex HHV-6 cycling probe PCR 法によって、移植後 2 週間後に HHV-6B ウイルス量が急激に上昇、同じ血液から HHV-6B が分離されたことからこの時期に HHV-6B による再活性化が確認された。

### (4) 小括 1

最初に取り組んだ HHV-6 cycling probe PCR 法は優れた特異性を持っており、標的遺伝子を段階希釈した基礎検討によれば singleplex 反応、multiplex 反応のいずれにおいても 10copies/反応の標的遺伝子まで検出可能な高感度な方法であることが証明され、再現性にも優れていた。特に multiplex 反応における同時測定については、コスト、検査時間の短縮において有用と考えられた。臨床検体における検討でも、従来の real-time PCR 法と良好な相関が確認できた。しかし、同一検体中の高い HHV-6B ウイルス量 ( $10^6$  コピー/反応以上) 存在が HHV-6A DNA の定量に影響することが明らかとなった。この問題については、HHV-6 が遺伝子に挿入されている iciHHV-6 患者においては  $10^6$  コピー/反応以上の HHV-6DNA 量が検出されることが報告されており、今後改善する必要がある。iciHHV-6 については、ウイルスの再活性化がなくても高いコピー数が検体中にみられることから、誤診断の可能性が指摘されてきた。今回示したケースにおいては、iciHHV-6A の患者において移植後の HHV-6B 再活性化を確実にとらえることに成功している。今後症例数を増した検討が必要と考えられる。今回、HHV-6 cycling probe PCR において設計した probe は、HHV-6A,B を識別可能であり、両ウイルス遺伝子の同時定量的評価に有用なことが示唆された。

### (5) Cycling probe LAMP 法の至適条件設定 LAMP 法の primer 設計

HHV-6 cycling probe PCR 法の標的領域と同じ HHV-6U31 領域を対象として、HHV-6A、B の共通遺伝子配列部分に LAMP 専用 primer ツール (primer explore : <https://primerexplorer.jp/>) を用いて LAMP primer を設計した。HHV-6A,B に特異的 cycling probe に関しては LAMP primer 中の loop primer を流用、配列中には HHV-6A と B を識別可能な SNP が配置されるようにそれぞれのキメラ probe を設計した (Takara Bio)。HHV-6A probe は Rox、HHV-6B probe は FAM で標識した (表 2)。

表 2 cycling probe LAMP primer,probe 配列

Name of primer	Sequence of primer to amplify HHV-6 U31
F3	5'-CTGAACGAGAAGCCACAG-3'
B3	5'-CCGTGGAAGAAAATTATCTAGC-3'
FIP	5'-TAGAAGCCTTCAGTGGCGTCCATCTAGATCTGTCAGACAT-3'
BIP	5'-AGAAACCTCCAATTGTGCGTCTAATCGTATGTCGGGGTCT-3'
LPF (HHV-6A_probe)	5'-(Rox)-TAAACTTCTCA(Eclipse)-3'
LPP (HHV-6B_probe)	5'-(FAM)-AACTGCTACCCGCCAC(Eclipse)-3'
LPB	5'-GATAAGAAGCTCGCGCTC-3'

設計した LAMP primer が標的領域を正確に増幅するか確認するために、標的領域をサブクローニング、コピー数を決定後段階希釈して感度決定に用いた。LAMP 法は 63 にて 60 分間反応とした。濁度決定による LAMP 法の感度は、反応あたり  $10^2$  コピー(熱変性過程あり)であった。LAMP 試薬の組成は、20mM Tris-HCL(pH8.8)、10mM KCL、10mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  8mM  $\text{MgSO}_4$  0.8M Betaine 0.2% Tween20)、Primer 濃度は以下の様である 2.4 $\mu\text{M}$  FIP,BIP, 1.2 $\mu\text{M}$  LPB,0.6 $\mu\text{M}$  F3,B3,0.2 $\mu\text{M}$  (LPF は probe として使用のため入れていない)

#### Cycling probe LAMP 法 至適条件設定 (pH)

これまでの LAMP 反応における至適 pH は 8.8 であった。一方、cycling probe の要である Thermostable RNaseH (Hybridase<sup>TM</sup>)の至適 pH は 7.5 である。LAMP buffer(20mM Tris buffer, 10mM KCL 10mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  8mM  $\text{MgSO}_4$  0.8M Betaine 0.2% Tween20)について Tris buffer の pH を 8.8 と 7.5 とした 2 種類の buffer を用意し Ct(cycle of threshold)値を比較した。標的は単一 probe のみ (HHV-6DNA) である。HHV-6 primer, probe 濃度は、以下の様である。2.4  $\mu\text{M}$  FIP,BIP, 1.2  $\mu\text{M}$  LPB, 0.6  $\mu\text{M}$  F3,B3,0.2  $\mu\text{M}$  H6B cycling probe, RNaseH 0.5  $\mu\text{l}$ , HHV-6B plasmid 5  $\mu\text{l}$  ( $10^7$ - $10^9$ copies/反応) で全量 25  $\mu\text{l}$  とした。

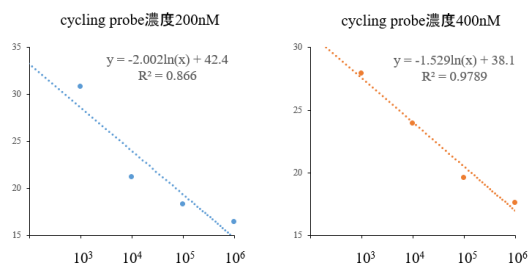
表 3

	10 <sup>7</sup> コピー	10 <sup>6</sup> コピー	10 <sup>5</sup> コピー	陰性
pH 7.0	12.1	13.0	14.2	-
pH8.8	9.4	10.2	12.1	-

蛍光強度の立ち上がりは pH7.0 よりも pH8.8 の buffer の方が速く蛍光強度が増していた (表 3)。

#### 至適条件設定 (probe 濃度)

HHV-6 cycling probe PCR 法での結果を参考に cycling probe を 200nM、400nM とし、他の試薬条件 (pH8.8) 揃えて同様に比較した (図 5)。



Ct 値とコピー数の相関は probe 濃度を 400nM にした方が優れており検出感度は  $10^3$  コピー/反応であったが、 $10^3$ - $10^6$  のレンジにおいて優れた直線性が確認された。しかしながら現時点の感度は、real-time PCR 法に及ばなかった。

#### ④ 小括 2

LAMP 法と cycling probe 法の組み合わせにより、LAMP 反応による遺伝子増幅を cycling probe で検出できることが明らかとなった。反応条件としては、LAMP 法の至適条

件である pH8.8 においても cycling probe 法に用いる RNase が機能できることが分った。また、最適な probe 濃度も決定した。しかしながら現在の感度としては  $10^3$  コピー/反応で十分とは言えず、primer の再検討が必要と考えられた。感度上昇のためにテンプレートを熱変性することが有効であるが、Bst polymerase が 80 で失活してしまうことや、熱変性後に Bst polymerase を加えることは迅速、簡便性を考慮すると現実的でないため、アルカリ変性など他の感度上昇手段を講じる必要がある。

#### (6) 乾燥 LAMP 試薬作成の基礎検討

これまで LAMP 法は、凍結された buffer, dNTPs, primer, Bst polymerase を随時溶解し、mixture を作成、検体を加えて LAMP 反応を実施せねばならなかった。しかし、試薬が乾燥化できれば、検体を混ぜるだけで反応が開始できるなど工程が簡素化でき、検査時間の短縮にもつながる。現在の液状 LAMP 試薬を乾燥化し、さらに簡易迅速な方法とするため、cycling probe による定量法条件設定と並行して LAMP 乾燥試薬の基礎検討を行った。

乾燥 LAMP 試薬として 10mM KCL 10mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  8mM  $\text{MgSO}_4$  0.8M Betaine 0.2% Tween20)、HHV-6 primer 2.4  $\mu\text{M}$  FIP,BIP, 1.2  $\mu\text{M}$  LPB, LPF 0.6  $\mu\text{M}$  F3,B3,0.2  $\mu\text{M}$  (Ihira et al. J Clin Virol. 2007)、1.4mM dNTPs で 8.4  $\mu\text{l}$  とし、LAMP 反応チューブの蓋の裏側に分注した。このチューブを室温にて乾燥後 4 保存とした。Bst polymerase については、保存による失活や熱変性を行うことを考慮し、乾燥化はさけた。検査工程は、以下の様である。サンプル 5  $\mu\text{l}$  と 100mM Tris buffer(pH8.8) 19  $\mu\text{l}$  を混和 全量を乾燥チューブに移し蓋をして転倒混和、96 1 分熱変性を行ったのち、氷上 2 分で冷却した。その後、Bst Polymerase を 1  $\mu\text{l}$  加えて 63 にて 60 分 LAMP 反応を行った。反応中に 0.1 まで濁度が上昇したチューブを HHV-6DNA 陽性と判定した。対象検体は、突発性発疹症が疑われ採血された患児 50 名である。遠心後すでに報告した方法(Ihira et al. J Clin Virol. 2007)に従って液状 LAMP と今回開発中の乾燥 LAMP の両検査を行い比較した。

表 4 液状 LAMP 試薬と乾燥試薬の比較

検体	保存 日数	乾燥 試薬	液状 試薬	検体	保存 日数	乾燥 試薬	液状 試薬
1	15	+	+	16	50	+	-
2	15	+	+	17	50	+	+
3	15	-	-	18	50	-	-
4	15	-	-	19	50	+	+
5	15	-	-	20	50	-	-
6	21	+	+	21	50	-	-
7	44	+	-	22	50	-	-
8	44	-	-	23	50	+	+
9	44	-	-	24	74	-	-
10	44	-	-	25	74	-	-
11	44	+	+	26	74	+	+
12	50	+	+	27	74	-	-
13	50	+	+	28	74	-	-
14	50	-	-	29	78	-	-
15	50	+	+	30	99	+	+

乾燥 LAMP は、定期的に検体が集まった時点で検討を行ったため、乾燥試薬の保存期間は 15 日 (5 検体)、21 日 (1 検体)、44 日 (5 検体)、50 日 (12 検体)、74 日 (5 検体)、78 日 (1 検体)、99 日 (1 検体) となった。液状 LAMP は依頼日に実施し、残余血清を凍結保存し乾燥 LAMP 法に用いた。乾燥 LAMP 試薬の結果は、液状 LAMP による結果と 1 検体 (No7) を除いて一致していた。最長の保存期間は 99 日であった。

### 小括 3

今回作成した乾燥試薬は、4 保存においておよそ 100 日間は液状試薬と同等の結果を得られることが示された。血清からの DNA 抽出を省いて直接 HHV-6DNA 増幅を行う本方法は、熱変性工程を必要とするため最後に Bst polymerase1 $\mu$ l を加える工程が必要となるものの、血清を希釈して乾燥チューブに加えるだけで反応を開始することができ、mixture を作成する液状試薬による方法と比較して大幅な工程の簡素化に成功した。HHV-6 cycling probe PCR 法と組み合わせて最終的に完成させるためには、今後至適条件を決定しなければならない点や probe を加えた場合の安定性について検討する必要がある。

### 4. 研究成果

HHV-6 cycling probe PCR 法構築は、cycling probe 設計や特殊な試薬の取扱いが最終的な multiplex LAMP 法構築時に役立つものと考え研究を開始した。最終的には、cycling probe LAMP 法との比較検討にも利用できると考え、基礎検討だけでなく、臨床検体を用いた評価も行った。結果として HHV-6 cycling probe PCR 法も、新規開発した multiplex な HHV-6 DNA 定量技術として完成、報告することができた。

本研究は、LAMP 反応による産物を cycling probe により検出できることを初めて示した。しかし、その感度は充分といえず、primer 設計や条件設定など継続して検討する必要がある。Preliminary な結果ではあるが、現時点で約 30 分で定量が可能となっており、従来の real-time PCR と比較しても迅速である。また、別に並行して検討した試薬乾燥化については、液状試薬を用いた場合の結果と非常に一致しており、臨床現場での使用が可能なが示された。今回の検討では 100 日前後の試薬保存が可能なが示された。この点についても、より長期的な保存期間 (3 カ月から 6 カ月) を経たのちの信頼性について確認する必要がある。我々の検討によれば、DNA 抽出工程を省略してサンプルから直接標的遺伝子を検出するためには、熱変性過程が必須なが明らかとなった。これは血清中に含まれる Bst polymerase 阻害物質によるものと考えられる。Cycling probe LAMP 法の感度を上昇させる手段として熱変性工程を加えることは、Bst polymerase を熱変性後に加えることが避けられず多数検体を処理するよう場合には致命的となる。よって DNA を変

性させるための他の手段として、アルカリ変性など応用の可能性を検討してみたい。HHV-6 cycling probe LAMP 法の至適条件設定について、研究期間中に全ての問題解決に至らなかったが、primer 改良、アルカリ変性の応用などによりさらなる感度上昇が期待できるため、試薬の乾燥化と合わせ今後も研究を継続してゆく必要がある。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

Ihira M, Yamaki A, Kato Y, Higashimoto Y, Kawamura Y, Yoshikawa T. 2016 Cycling probe-based real-time PCR for the detection of human herpesvirus 6A and B. *J Med Virol*. 査読有. 2016 Mar 4. doi: 10.1002/jmv.24513.

Ohye T, Kawamura Y, Inagaki H, Yoshikawa A, Ihira M, Yoshikawa T, Kurahashi H. 2016. A simple cytogenetic method to detect chromosomally integrated human herpesvirus-6. 査読有 *J Virol Methods*. 228:74-8.

Miura H, Kawamura Y, Kudo K, Ihira M, Ohye T, Kurahashi H, Kawashima N, Miyamura K, Yoshida N, Kato K, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T. 2015 Virological analysis of inherited chromosomally integrated human herpesvirus-6 in three hematopoietic stem cell transplant patients. 査読有 *Transpl Infect Dis*. 17(5):728-31.

Miura H, Kawamura Y, Ozeki E, Ihira M, Ohashi M, Yoshikawa T. 2015 Pathogenesis of Severe Neutropenia in Patients With Primary Human Herpesvirus 6B Infection. 査読有 *Pediatr Infect Dis J*. 34(9):1003-7.

Kawamura Y, Nakayama A, Kato T, Miura H, Ishihara N, Ihira M, Takahashi Y, Matsuda K, Yoshikawa T. 2015. Pathogenic Role of Human Herpesvirus 6B Infection in Mesial Temporal Lobe Epilepsy. 査読有 *J Infect Dis*. 212(7):1014-21.

Hiramatsu H, Suzuki R, Yamada S, Ihira M, Isegawa Y, Kawamura Y, Matsuoka E, Miura H, Yoshikawa T. 2015. Analysis of ganciclovir-resistant human herpesvirus 6B clinical isolates using quenching probe PCR methodology. 査読有 *Antimicrob Agents Chemother*. 59(5):2618-24.

Ohye T, Inagaki H, Ihira M, Higashimoto Y, Kato K, Oikawa J, Yagasaki H, Niizuma T, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T, Kurahashi H. 2014 Dual roles for the telomeric repeats in chromosomally integrated human herpesvirus-6. 査読有 *Sci Rep*:4559.

Yoshikawa T, Matsuo T, Kawamura Y, Ohashi M, Yonekawa T, Kanda H, Notomi T, Ihira M. 2014 Direct detection of human herpesvirus 6B by the LAMP method using newly developed dry-reagents. 査読有 *J Virol Methods*. 201:65-7.

Kato Y, Ihira M, Umeda M, Higashimoto Y, Kawamura Y, Ohashi M, Ishi J, Yoshikawa T. 2014 Copy numbers of telomeric repeat sequences of human herpesvirus 6B in clinical

isolates: possibility of mixed infections. 査読有 J Clin Microbiol. 52(2):419-24

Kumagai T, Yoshikawa T, Shiraki K, Yoshida M, Nakayama T, Ihira M, Asano Y. 2014 Virus specific cell-mediated immunity may play a role in controlling reactivated human herpesvirus 6B in patients under measles induced immunosuppression. 査読有 J Med Virol. 86(4):658-65.

Yamamoto Y, Morooka M, Hashimoto S, Ihira M, Yoshikawa T. 2014 Analysis of the shedding of three  $\beta$ -herpesviruses in urine and saliva of children with renal disease. 査読有 J Med Virol. 86(3):505-11.

Kawamura Y, Yamazaki Y, Ohashi M, Ihira M, Yoshikawa T. 2014 Cytokine and chemokine responses in the blood and cerebrospinal fluid of patients with human herpesvirus 6B-associated acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. 査読有 J Med Virol. Mar;86(3):512-8.

Kawamura Y, Ohashi M, Ihira M, Hashimoto S, Taniguchi K, Yoshikawa T. 2014 Nationwide survey of rotavirus-associated encephalopathy and sudden unexpected death in Japan. 査読有 Brain Dev. 36(7):601-7.

Kobayashi T, Yagami A, Suzuki K, Ihira M, Yoshikawa T, Matsunaga K. 2013 Clinical utility of loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of common alpha herpesvirus skin infections. 査読有 J. Dermatol. 40(12):1033-7.

Ihira M, Higashimoto Y, Kawamura Y, Sugata K, Ohashi M, Asano Y, Yoshikawa T. 2013 Cycling probe technology to quantify and discriminate between wild-type varicella-zoster virus and Oka vaccine strains. 査読有 J Virol Methods. 193(2):308-313.

Kuhara T, Watanabe D, Ishida N, Tamada Y, Matsumoto Y, Ihira M, Fukaya S, Yoshida S, Yoshikawa T, Asano Y. 2013 Quantitative analysis of shedding of Epstein-Barr virus in saliva from patients with connective tissue diseases: a pilot study. 査読有 Int J Dermatol. 52(7):887-90.

Ihira M, Enomoto Y, Kawamura Y, Nakai H, Sugata K, Asano Y, Tsuzuki M, Emi N, Goto T, Miyamura K, Matsumoto K, Kato K, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T. 2012 Development of quantitative RT-PCR assays for detection of three classes of HHV-6B gene transcripts. 査読有 J Med Virol., 84(9):1388-95.

#### [学会発表](計10件)

The Analysis of the Origin of Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6 Y. Kawamura, T. Ohye, H. Miura, M. Ihira, H. Kurahashi, T. Yoshikawa 9th international conference on HHV-6,7 Boston MA, USA 11/9-11 2015 Oral

Human Herpesvirus 6B Infection in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation. H. Miura, Y. Kawamura, F. Hattori, K. Kudo, M. Ihira, T. Yoshikawa 9th international conference on HHV-6,7 Boston MA, USA 11/9-11 2015

Development of HHV-6A Real-Time RT-PCR Assays for Detection of Three Classes of HHV-6A Gene Transcripts. M. Ihira, H. Miura, Y. Higashimoto, F. Hattori, Y. Kawamura, K.

Sugata, T. Yoshikawa 9<sup>th</sup> international conference on HHV-6,7 Boston MA, USA 11/9-11 2015

Real-time RT PCR法によるHHV-6AmRNA検出法の構築 井平 勝、東本 祐紀、加藤 友理、平松裕之、鈴木竜太、三浦浩樹、河村吉紀、吉川 哲史 2015 6月13-14日 岡山 LAMP 法によるMycobacterium tuberculosis 特異的 trans-renal DNA検出 第2報 井平 勝、中島千絵、浅野喜造、鈴木定彦、吉川 哲史 2014/2/22 東京 富士通ソリューションスクエア 第7回LAMP研究会 2/28 東京

Human herpes virus 6A and 6B specific real-time PCR by using cycling probe technology M. Ihira Y. Kato Y. Higashimoto H. Hiramatsu H. Sugiyama Y. Enomoto Y. Kawamura T. Yoshikawa The 39<sup>th</sup> Annual International Herpesvirus Workshop 2014 7/19-23 Kobe Japan

Pathogenic role of human herpesvirus 6B in mesial temporal sclerosis Y. kawamura H. miura M. Ihira Y. Takahashi K. Matsuda T. Yoshikawa The 39<sup>th</sup> Annual International Herpesvirus Workshop 2014 7/19-23 Kobe Japan

Cycling probe を用いた human herpesvirus 6 A, B の新規 DNA 定量法開発 井平 勝、榎本喜彦、杉山博子、東本 祐紀、平松裕之、鈴木竜太、河村吉紀、吉川 哲史 第54回日本臨床ウイルス学会 2014 平成 26 年 6 月 8-9 日 北海道札幌

Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of trans-renal Mycobacterium tuberculosis DNA in Urine in M. Ihira, Chie Nakajima Yasuhiko Suzuki T. Yoshikawa and Y. Asano US-Japan cooperative medical science program ;tuberculosis and leprosy panel Meeting(2013/8/17-18) Hokkaido University Sapporo

乾燥化した LAMP 試薬による簡便な突発性発疹迅速診断法の有用性 井平 勝、大橋正博、榎本喜彦、杉山博子、東本裕紀、河村吉紀、吉川哲史 第12回ヘルペスウイルス研究会 2012 年 6 月 8 日 愛知

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井平 勝 (IHIRA, Masaru)

藤田保健衛生大学・保健学研究科・教授  
研究者番号: 10290165

##### (2) 研究分担者

杉山 博子 (SUGIYAMA, Hiroko)

藤田保健衛生大学・医学研究科・研究員

研究者番号: 10387714

榎本 喜彦 (ENOMOTO, Yoshihiko)

藤田保健衛生大学・医学研究科・研究員

研究者番号: 00387713

吉川 哲史 (YOSHIKAWA, Tetsushi)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号: 80288472