

Polymerase chain reaction (PCR)法によるHTLV-I provirusの検出について

扇谷陽子 山口昭弘 福士 勝 佐藤泰昌 菊地由生子

要 旨

妊婦のHuman T cell leukemia virus type I (HTLV-I) 感染スクリーニングの確認検査に応用することを目的として、Polymerase chain reaction (PCR) 法によるHTLV-Iプロウイルス検出について検討した。サンプルは精製したDNAもしくは乾燥濾紙血液とし、ウイルスの複数部位を増幅する検査方法を検討した。その結果、本検査法は、複数部位のPCR結果を総合判断することにより、一次スクリーニングであるParticle Agglutination (PA)法で陽性を示した妊婦のHTLV-Iウイルス感染の確認試験として非常に優れていることが確認された。

1. 緒 言

HTLV-IIは極めて予後不良なadult T cell leukemia (ATL)の原因ウイルスである。本ウイルスは胎盤や産道において、および母乳を介して母子感染すると考えられている。この中で最も感染の危険が多い母乳による感染は、母乳の冷凍処理もしくは人工栄養により感染の予防が可能である。そこで、妊婦のHTLV-I感染を早期に発見し、母子感染の予防を行う目的で、特に感染者が多い西南日本を中心に、妊婦のHTLV-I感染の検査が実施されている。当所ではパイロットスタディとして年間1500名程度の妊婦について一次検査をPA法で行い、この検査において陽性である妊婦について確認検査を行っている。確認検査の方法にはImmunofluorescence (IF) 法、Enzyme Immuno assay (EIA) 法、Westan Blot (WB) 法等があるが、各種検出方法の結果が一致しないことがある。そこで、最近確認検査として報告されてきたPCR法によりプロウイルスの存在を直接検出する方法の導入を検討し、さらに乾燥濾紙血液をサンプルとする検出方法についても検討したので報告する。

2. 方 法

2-1 サンプル

検討にはPA法で陽性を示した妊婦から抗凝固剤としてEDTAを使用し採血した血液及びこの一部を用いて作成した乾燥濾紙血液を用いた。陽性コントロールにはMT-2由来細胞を、陰性コントロールには、Molt-4由来細胞と感染のないことを確認した人のDNAを用いた。

2-2 装置

PCR用装置:ASTEC 製 PC-700型

2-3 方法

血液は0.2%NaCl溶液で溶血させ末梢単核球を分離しPhenol/Chloroformで抽出後イソプロパノールでDNAを沈殿させた。

乾燥濾紙血液は、直径3.2mmにパンチしたサンプルにアセトン:メタノール:蒸留水=35:35:10を10 μ l添加し37 $^{\circ}$ で30分乾燥(血色素固定)後、蒸留水40 μ lを加え95 $^{\circ}$ で15分加熱してDNAを抽出した。

PCR用のサンプルには前者はDNA 1 μ gを、後者は抽出液20 μ lを用いた。

PCRはサンプルに、10 nmole dNTP、HTLV-I gag

env pX各部分(図1)に対応する文献に準じたオリゴヌクレオチドプライマー(表1) 25 pmole及びTaq polymerase 2.5Uを50mM KCl、1.5mM MgCl₂、10mM Tris(pH8.3)の緩衝液を加え、全量を50 μlとして行った。

PCR条件は、表2に示すとおりとした。

増幅後のサンプルはエチジウムブロマイドを含有するアガロースゲル(3%NuSieve GTGアガロース、1%SeaKem MEアガロース)で電気泳動により分離し、UV照射下で増幅されたDNAを観察することにより陽性が陰性かについて判断した。

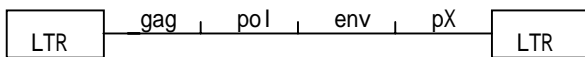


図1 HTLV-1 genome

表1 PCRに用いた増幅部位, プライマーの塩基配列

Primer (strand)	Sequence	Length of amplified product(bp)	Ref..
Primer gag (+)	GCCAAACCCAAGATCACTTTAAG	186	1)
Primer gag' (-)	GAGGCGTTCGTGTTTAAAGG		
Primer env (+)	CTAGTCGACGCTCCAGGATATGAC	467	2)
Primer env' (-)	CAGACGCCACCGGTACCGCTCGGC		
Primer pX1 (+)	CCCACCTCCAGGGTTGGACAGAG	203	3)
Primer pX1' (-)	CTGTAGAGCTGAGCCGATAACGCG		
Primer pX2 (+)	CGGATACCCAGTCTACGTGT	159	4)
Primer pX2' (-)	GAGCCGATAACGCGTCG		

表2 PCR反応条件

Primer gag, Primer pX2		Primer env		Primer pX1	
1. 95	5分	1. 95	5分	1. 95	5分
2. 95	1分	2. 95	1分	2. 95	1分
3. 65	0.5分	3. 55	0.5分	3. 68	2分
4. 72	2分	4. 72	2分	4. 72	2分
5. 72	7分	5. 72	7分	5. 72	7分
2-4は35回くり返し		2-4は35回くり返し		2-4は35回くり返し	

3. 結果

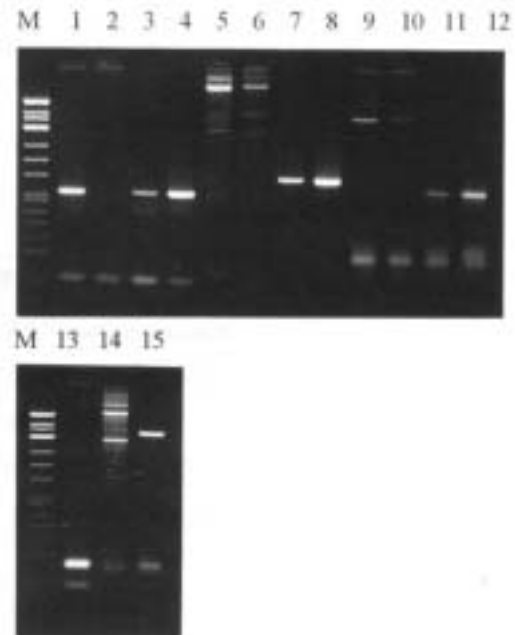
3-1 PCRの感度

表2に示す条件でMT-2細胞由来のDNAを増幅した場合の感度はgag領域のプライマーで0.1ng、envで1ng、pX1及びpX2で0.01ngであった。

3-2 精製DNAの増幅結果

精製DNAを用いて増幅を行った結果を図2に示す。

一部非特異的な増幅も認められるが、増幅条件は検査には十分であると考えられた。



	サンプル	プライマー
M	マーカー(X174/RFI)	
1	陽性コントロール(MT-2)	pX2
2	人陰性DNA	"
3	人陽性DNA(PA法:1024倍)	"
4	陽性コントロール(MT-2)	"
5	陰性コントロール(Molt-4)	pX1
6	人陰性DNA	"
7	人陽性DNA(PA法:1024倍)	"
8	陽性コントロール(MT-2)	"
9	陰性コントロール(Molt-4)	gag
10	人陰性DNA	"
11	人陽性DNA(PA法:1024倍)	"
12	陽性コントロール(MT-2)	"
13	人陰性DNA	env
14	陰性コントロール(Molt-4)	"
15	陽性コントロール(MT-2)	"

図2 精製DNAの増幅結果

3-3 乾燥濾紙血液をサンプルとした増幅結果

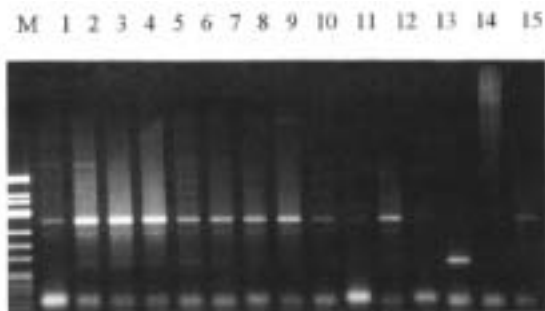
乾燥濾紙血液をサンプルとする際の抽出には、直接精製水を加え加熱する方法とアセトン:メタノール:蒸留水=35:35:10により血色素を固定化後精製水を加え加熱抽出する2つの方法について検討を行った。感染細胞が少ないことを考慮し抽出液量を減じると前者は清澄なサンプルが得難く、また、DNAの回収率に大きな差を認めなかったことから後者を用いることとした。増幅条件は精製DNAと同様とした。精製DNAに比較すると非特異バンドが多く認められるが、陽性バンドとは区別できた。しかし一番感度が悪いenvのプライマーでは、PA法で抗体価が512,1024,2048の3名について乾燥濾紙血液の量を3.2mmディスク1-4枚に変化させ検討したが陽性のバンドは認められなかった。次に感度が低いgagのプライマーで上記サンプルを増幅した結果を図3に示す。この結果サンプル量に応じた定量的な結果を得ることができなかった。pX領域のプライマーでは、いずれも強い陽性バンドが観察できた。

4. 考 察

HTLV-Iの感染者の血液中の感染T細胞の数は、HAM/TSP患者の感染細胞で10-20%、無症候性キャリア³⁾で0.1%との報告にみられるように、発症した患者でさえ、全ての細胞にDNAが存在する遺伝性の疾患に比べ標的DNA量が少ない。仮に感染細胞を0.1%とし、1μgのDNAをPCRに使うとその中の感染細胞は30個と計算される⁴⁾。乾燥濾紙血液をサンプルとするとさらに細胞数が少なくなる。しかし、試験検査者への感染性等を考慮すると乾燥濾紙血液を確認検査に使用できることが望ましい為、プライマーの選択にあたっては特に感度を重視した。

他方、HTLV-IIは一部人の内在性レトロウイルス等と同性がある。またこのウイルスは一部欠損していても感染を起こすことがあるためプライマーは複数部位から選択し総合的な判断が必要である。

これらを考慮した上で、他のレトロウイルスと相



	サンプル	プライマー
M	マーカー(X174/RFI)	
1	PA法1024倍3.2mm ⁺ ディスク1枚	gag
2	PA法1024倍3.2mm ⁺ ディスク2枚	〃
3	PA法1024倍3.2mm ⁺ ディスク3枚	〃
4	PA法1024倍3.2mm ⁺ ディスク4枚	〃
5	PA法2048倍3.2mm ⁺ ディスク1枚	〃
6	PA法2048倍3.2mm ⁺ ディスク2枚	〃
7	PA法2048倍3.2mm ⁺ ディスク3枚	〃
8	PA法2048倍3.2mm ⁺ ディスク4枚	〃
9	PA法512倍3.2mm ⁺ ディスク1枚	〃
10	PA法512倍3.2mm ⁺ ディスク2枚	〃
11	PA法512倍3.2mm ⁺ ディスク3枚	〃
12	PA法512倍3.2mm ⁺ ディスク4枚	〃
13	陽性コントロール(MT-2)	〃
14	人陰性DNA	〃
15	PA法陰性3.2mm ⁺ ディスク1枚	〃

図3 乾燥濾紙血液をサンプルとした増幅結果

同性が低い²⁾と考えられているenv領域、発癌に強く関係していると考えられており欠損株でも必ず保有している⁵⁾と報告されている pX領域からプライマーを選択、さらに欠損株等の検出の可能性のある少し離れた位置にあるgag領域のプライマーも検討した。

先に述べたように乾燥濾紙血液をサンプルとした場合、精製したDNAに比較すると非特異バンド

が多く認められる。しかし今回検討したプライマーは、陽性バンドと区別できたため、感度が高い3種は、乾燥濾紙血液をサンプルとしても検査が行えると考えられた。(env領域のプライマーは感度の面から不可)

感度を高める為アニーリング温度を下げると非特異バンドが増加し、陽性バンドと区別できないバンドが生じる場合がある。最近非特異的な増幅を減じるPerfect Match DNA Enhancer (TOYOBO製) について検討を始めたが、一部のプライマーで効果を示したがプライマーによってはむしろ非特異的なバンドが増える傾向があった。このため、すべてのプライマーで用いることができるわけではないものの、この試薬はサンプル量の少ない乾燥濾紙血液からの検出に有効である可能性がある。

5. 結 語

ATLのスクリーニングの確認試験としてPCR法を検討した。プロウイルスの存在を直接確認できるこの方法の導入が可能となり、より精度の高い確認検査を行えるようになった。

6. 文 献

- 1)成田光生他:日本小児科学会雑誌,94(7),1531-1534, 1990.
- 2)渡辺俊樹:実験医学,8(9),1144-1147,1990.
- 3)日野茂男:実験医学,8(9),1141-1143, 1990.
- 4)日野茂男:医学のあゆみ,153(9),516-521,1990.
- 5)畑中正一他:蛋白質・核酸・酵素,35(17),105-110,1990.

Detection of HTLV-I proviral DNA by Polymerase chain reaction method

Yoko Ogiya, Akihiro Yamaguchi, Masaru Fukushi,
Yasumasa Sato and Yuko Kikuchi

Detection of proviral DNA of Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) by polymerase chain reaction method was developed for a confirmatory test for screening of HTLV-I infection to pregnant woman. DNA purified from blood samples and dried blood samples were used as sources of template DNA for PCR. Primers were designed to amplify some regions in HTLV-I proviral genome. Some primer pairs gave PCR products from dried blood samples, thus this method will be useful for a confirmatory test of HTLV-I infection for pregnant woman who were determined to be positive by primary screening with the particle agglutination method.