

アイソトープを用いない酵素的遺伝子増幅法とDig-ELISA 法を用いたATLウイルス遺伝子検査法の開発

宮本 寛治¹⁾、富田 徳子²⁾

要約：ゼラチン粒子凝集法(PA法)で陽性、間接蛍光抗体法(IF法)で陽性あるいは陰性と判定された検体のリンパ球について酵素的遺伝子増幅法(PCR法)を用いてウイルス遺伝子の一部を特異的に増幅させ、ジゴキシゲニン(Dig)標準プローブを用いて、非放射標識・検出法にてATLウイルス遺伝子を検出した。その結果PA法(+)/IF法(+)の検体27例中27例(100%)、PA法(+)/IF法(-)の検体20例中3例(15%)プロウイルスが検出された。さらに改良型PA法キット[SERODIA・HTLV-1]を用いて、従来のPA法キットで陽性と判定されたPA法(+)/IF法(-)の検体を検討したところ、3管と4管目のところで30~40%が陰性となった。

見出し語：ゼラチン粒子凝集法(PA法)、PCR法、Dig-ELISA法
[SERODIA・HTLV-1]PA法キット

研究方法：抗ATLA抗体検査は従来のPA法キット及び改良型[SERODIA・HTLV-1]PA法キットを使用し、IF法はMT-2/Molt-4細胞株を使用した。抗ATLA抗体陽性者健康人末梢血から白血球を分離し、フェノール法でDNAを抽出した。プライマーとしてenv-pX領域及びpX領域の約300bpはなれた+鎖と-鎖の各19merとした。100 μ lの反応液に、DNA1 μ g、1 μ Mの各プライマー、200 μ Mの各dNTP、1.5単位のTaq polymeraseを加え、92 $^{\circ}$ C、1分間熱変性、62 $^{\circ}$ C、2分間annealing、

72 $^{\circ}$ C、1分間DNA鎖の伸長を1サイクルとし、30サイクルの反応を行った。反応液10 μ lをアガロースゲルで泳動分離し、サザンブロッティング法により、増幅したHTLV-1の遺伝子を検出した。目的領域内部の30mer及び39merの合成オリゴマーをDig-11-dUTPとTdTを用いたTailing法で標識し、検出用プローブとした。従来のPA法で陽性と判定された検体のうち低力価の抗体値をもつ血清検体を主に改良型PA法キット[SERODIA・HTLV-1]で検討した。

1)岡山大学医療技術短期大学部(School of Health Sciences,Okayama Univ.)

2)岡山県赤十字血液センター研究課(Okayama Red Cross Blood Center)

結果：PA法(+)/IF法(+)¹の検体27例中27例(100%)全てHTLV-I遺伝子が検出され、PA法(+)/IF法(-)²の検体20例中3例(15%)で遺伝子が検出された。従来のPA法キットで陽性と判定された検体のうち改良型[SERODIA・HTLV-I]PA法キットでPA法(+)/IF法(-)の検体のうち3管目及び4管目陽性の検体が30~40%陰性となった。一方IF法(+)¹の検体は全て陽性であった。

考察：PCR法とDig標識プローブを用いた検出法の組み合わせにより、ウイルス遺伝子が検出され、アイソトープを用いない方法としてこれは有用であると思われる。今回の結果からPA法(+)/IF法(-)検体にも3例遺伝子が検出されたが、今後プライマーとして、他の領域も選りさらに検討する予定である。なおこの方法は他のウイルスの遺伝子検出にも応用が可能である。

従来のPA法キットと改良型PA法キット間に抗体陰性率に不一致が見られ、低力価の3管目と4管目は30~40%が陰性となった。このことは、改良したPA法キットでは従来の抗原にエンベロープ膜タンパク質を加えることで、他の構成成分の抗原量を減少させた結果、エンベロープ膜タンパク質に対する抗体が反映され、非特異反応のよく出る分子量19万及び24万の抗原タンパク質が抑えられたものと思われる。

文献

- 1)宮本寛治ら：酵素的遺伝子増幅法とDig-ELISA法による抗HTLV-I抗体陽性者のプロウイルス検索。医学のあゆみ、151(4)；237-238、1989。
- 2)宮本寛治：[SERODIA・HTLV-I]PA法キットによるHTLV-I抗体検出の検討。医学と薬学。(印刷中)



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:ゼラチン粒子凝集法(PA法)で陽性、間接蛍光抗体法(IF法)で陽性あるいは陰性と判定された検体のリンパ球に、ついて酵素的遺伝子増幅法(PCR法)を用いてウイルス遺伝子の一部を特異的に増幅させ、ジゴキシゲニン(Dig)標準プローブを用いて、非放射標識・検出法にてATLウイルス遺伝子を検出した。その結果PA法(+)/IF法(+の検体27例中27例(100%)、PA法(+)/IF法(-)の検体20例中3例(15%)プロウイルスが検出された。さらに改良型PA法キット[SERODIA・HTLV-]を用いて、従来のPA法キットで陽性と判定されたPA法(+)/IF法(-)の検体を検討したところ、3管と4管目のところで30~40%が陰性となった。