

簡易PCR法によるHTLV-1感染の診断

(分担研究：成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-1)の感染メカニズムの解明)

山本直樹

要約：PCR (polymerase chain reaction) 法は今日種々のDNA診断技術の中でその精度の高さ並びに簡便さと言う点から急速に注目を浴びてきているものである。我々は本法をHTLV-1感染の診断に応用できる可能性について検討した。その結果、採血全液100 μ lからフェノール法等によるDNA抽出操作をすることなく、しかもその検出に放射性同位元素を用いずにATLのDNA診断を行えることが明らかになった。さらにHTLV-1感染者もHTLV-1プロウイルス0.001コピー/細胞の感度まで放射性同位元素を用いることなく検出できることが明らかとなった。本法は採血から診断まで8時間程度で行えるきわめて簡便なものである。我々の研究からHTLV-1感染者(ATLを除く)では末梢血全細胞中HTLV-1プロウイルスが0.33-0.001コピー/細胞存在することが明らかになった。

見出し語：HTLV-1, PCR

研究方法：PCR法に用いる検体は通常のフェノール法により抽出したDNA、および全血または細胞から直接調整した。細胞および全血からの検体調節法は以下のごとくである。

A：細胞を用いた場合

1. 細胞を2回PBSで洗浄
2. 上清を捨て、細胞にPCR緩衝液¹ 200 μ l/
1 \times 10⁶細胞になるように加える。
3. 50-60°C 1時間反応
4. 95°C 10分間反応

5. -20°Cにて保存

B：全血を用いた場合

1. 全血0.5mlと0.5ml lysis緩衝液²を加えよく攪半後、15,000rpm20秒遠心
 2. 上清を廃棄後、沈澱に1mlのlysis緩衝液を加えよく攪半後再び遠心
 3. ステップ1, 2.を更に3回繰り返した後、
A：ステップ2.以降の操作に移る。
- 以上の操作で得られた検体5 μ lを用いて通常のPCR法を行う(反応液25 μ l)。反応の生成物は8%ポリアクリルアミドゲル電気泳導法に解析した。

山口大学医学部寄生体 (Dept. of Virology and Parasitology, Yamaguchi Univ. Sch. Med.)

1. PCR緩衝液: 50mM KCl, 10mM Tris, pH8.3, 2.5mM MgCl₂, 0.1mg/ml gelatin, 0.45% NP-40, 0.45% Tween 20, 60 μg/ml proteinase K.

Lysis 緩衝液: 0.32M sucrose, 10mM Tris pH7.5, 5mM MgCl₂, 1% Triton X-100.

用いたHTLV-1プライマーは

Tax 5' (7871-7890)

CAATGTTCCCTACAAGCGAA

Tax 3' (8071-8090)

AATCATAGGCGTGCCATCGG

である。またグロビン遺伝子のプライマーを同時に反応することによりPCR反応のポジティブコントロールとした。

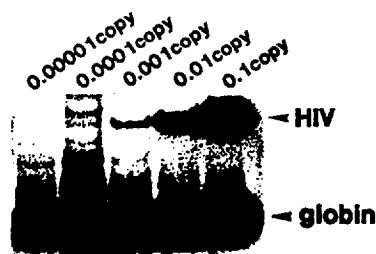
結果: まず我々はPCR法によるDNA増幅の感度を検定した。細胞あたり1コピーのプロウイルスが存在していることが明かとなつてのいる培養細胞からA:の方法により検体を調整してPCRを行った。結果を図1に示す。この実験ではHIV感染細胞をもちい、生成物の検出には5' エンド標識したプライマーを用いた。図から明らかに本法では0.0001コピー/細胞まで検出可能であった。本実験においてはPCR反応に25,000細胞に相当する検体を用いたため、このような検出感度となったが、検体を100,000細胞相当まで用いることにより更に0.00001コピー/細胞まで検出感度を上げることが可能である。このような条件を基に実際のHTLV-1感染者末梢血細胞から抽出したDNAを用いてPCRを行ったのが図2である。ここでは5例のATL患者および8例のACでの例を示してある。明らかに全員の検体でpX領域のDNAが検出できた。さらにこれらは必ずしも放射標識

したプライマーを用いずとも電気泳導後のゲルをEtBr染色しただけでATL全例、AC7例が陽性と判定された。そこでこれらの検体中のHTLV-1プロウコピー/細胞を算定したのが表1である。この表で判るように5例のATL患者ではほぼ1コピー/細胞のプロウイルスが検出され、ACでは0.002-0.33/細胞のプロウイルスが検出される。

次に全血を用いたPCRを検討した。用いた検体は27例であり、いずれもPA法、IF法で陽性と判定されたものである(福岡血液センターより供与)。これらの結果を表2に示す。その結果15/27(55.6%) EtBr染色法で陽性と判定され、22/27(81.5%)が放射標識法で陽性と判定された。

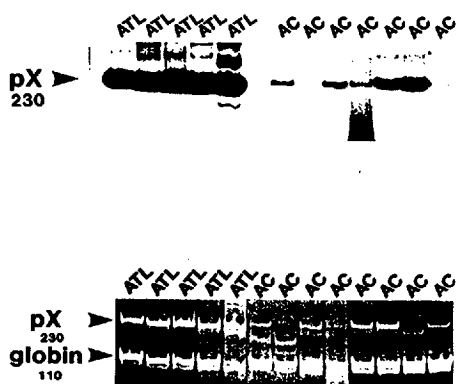
考察: 本研究からPCRを用いた場合ATLの診断は放射標識プローブを用いることなく行えることが明かとなった。さらに極僅(10⁻⁶程度)全血を用いて、DNA抽出せずに行えることから、一般の診断法として応用されうると考えられる。一方ACに於いては、今後さらに多くの検体について検討しなければならないが、今回の検査では0.001コピー/細胞の検出限界では約56%が、0.0001コピー/細胞の検出限界では約82%が陽性と判定された。今後の技術改良で更に精度は上昇すると考えられ、実際の診断法としての応用が更に検討を要するものの、可能である。また、ACの10%近くが0.1コピー/細胞程度のきわめて高いHTLV-1プロウイルスを有するという事実は今後のATL発症機構解明に重要な問題となると考えられる。

図1. PCR法によるプロウイルスコピー数の算定



HIV感染細胞（細胞当たり1コピーを有するもの）を系列希釈した検体を用いてPCRを行った。

図2. HTLV-1感染者末梢血細胞から抽出したDNAを用いてのPCR



上段は³²P放射標識したプライマーを用いたもののオートラディオグラフィ

下段はそのEtBr染色

表1. HTLV-1感染者末梢血細胞中のHTLV-1コピー数

case	HTLV-1コピー／細胞
ATL	0.85
ATL	1.01
ATL	1.19
ATL	1.01
ATL	0.95
AC	0.027
AC	0.002
AC	0.083
AC	0.015
AC	0.15
AC	0.33
AC	0.01
AC	0.082

図2の結果から算定した

表2. 全血検体のPCR

方法	陽性率 (%)
EtBr. 法	15 / 27 (55.6)
放射標識法	22 / 27 (81.5)

参考文献

小林信之：ヒトレトロウイルス感染症（ATL、AIDS）のDNA診断；周産期医学19巻1675、1989

小林信之：感染症（ATL、AIDS）のDNA診断；遺伝子診断マニュアル（講談社）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:PCR(polymerase chain reaction)法は今日種々の DNA 診断技術の中でその精度の高さ並びに簡便さと言う点から急速に注目を浴びてきているものである。我々は本法を HTLV-1 感染の診断に応用できる可能性について検討した。その結果、採血全液 100 μ l からフェノール法等による DNA 抽出操作をすることなく、しかもその検出に放射性同位元素を用いずに ATL の DNA 診断を行えることが明らかになった。さらに HTLV-1 感染者も HTLV-1 プロウイルス 0.001 コピー/細胞の感度まで放射性同位元素を用いることなく検出できることが明かとなった。本法は採血から診断まで 8 時間程度で行えるきわめて簡便なものである。我々の研究から HTLV-1 感染者(ATL を除く)では末梢血全細胞中 HTLV-1 プロウイルスが 0.33-0.001 コピー/細胞存在することが明らかになった。