

# C型肝炎ウイルスRNAのホモジニアス定量測定法の開発

齊 藤 寿 一  
石 黒 敬 彦

## Homogeneous Quantitative Assay of HCV RNA by the Intercalater Monitoring PCR

Juichi SAITOH  
Takahiko ISHIGURO

We have developed the title method for the homogeneous quantitative determination of DNA/RNA, which is based on performing the polymerase chain reaction (PCR) in the presence of a DNA intercalative fluorescent dye, 3-methyl-2-[1-(3-trimethylammoniopropyl)-1, 4-dihydroquinoline-4-ylidenemethyl] benzo-1, 3-oxazolium diiodide, and monitoring the fluorescence intensity of the PCR mixture throughout the course of PCR cycles.

This assay was successfully applied to the measurement of HCV RNA in the serum samples of patients suffering from chronic hepatitis C, and efficient and reproducible results were obtained for clinically useful dynamic range of HCV RNA in interferon therapy.

### 1. 緒 言

DNAは、互いに相補的な塩基どうしで結合し2本鎖を形成して安定化しようとする性質を有することから、その高い特異的な認識能力を細菌やウイルスの臨床検査へ応用しようという試みがなされてきた。

特に、PCR法が登場してからは、標的核酸そのものを特異的に試験管内で増幅することが可能となったことから、従来はラジオアイソトープを用いる方法以外では検出の困難であったHIVやHCVなどの血液試料中に存在量の僅少なウイルスのDNA/RNA検査についても、臨床検査の現場において実施可能となった。

しかしながら、試料中の標的核酸の有無を判定することはPCRにより従来に比してはるかに容易となったものの、試料中の標的核酸の存在量を定量する実際的な方法の確立は次元の異なる技術的課題として残っていた。

イムノアッセイによっては、抗体の有無から既往歴に関する情報は得られるものの、疾患の進行に関する知見を得ることは容易ではない。特に、治療薬の存在する感染症の場合は、治療効果のモニタリングと投与計画の立案の観点から、ウイルス量の増減の指標としてウイルスDNA/RNA量を定める必要がある。

われわれは、インターカレーター性蛍光物質の存在下にPCRを行い、その蛍光強度の経時変化から標的核酸の初期量を求める一段階の測定法（インターカレーターモニタリングPCR法；IM-PCR法）を確立し、現在インターフェロン（IFN）投与後のウイルス量の定量的なモニタリングの必要性が望まれているC型肝炎に着目し、血中HCV-RNA測定システムの開発を進めてきた。

従来指標GOT/GPTでは明確な判断が困難な患者についても詳細なウイルス量の変動に関する情報が得られ、臨床的に有効な手段を提供できる見通しが得

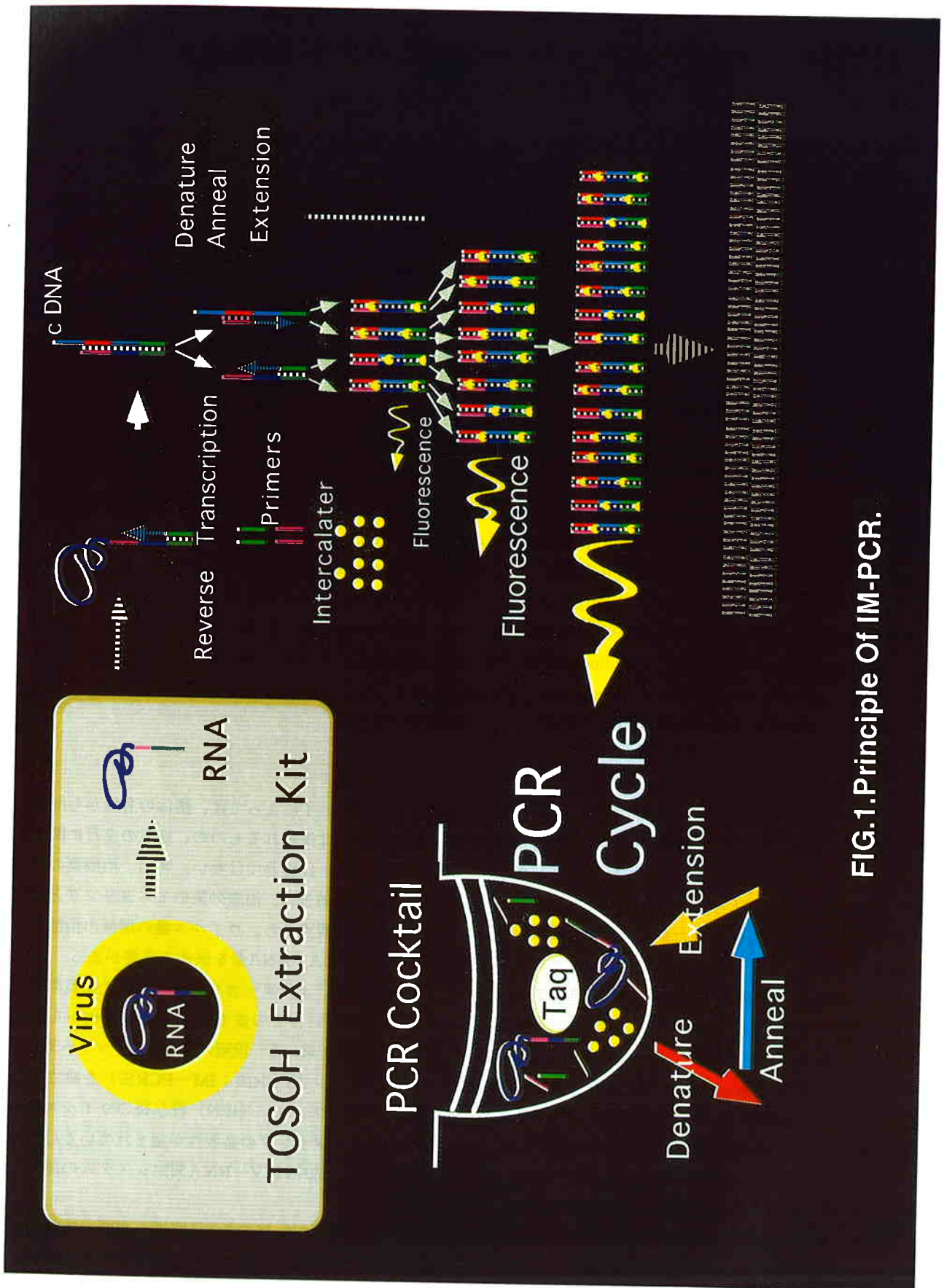


FIG.1.Principle Of IM-PCR.

られたので報告する。

## 2. 原理 (Fig. 1)

PCR法は、特定の標的核酸を指数関数的に増幅させる方法として一般的には理解されている。

しかしながら、実際には、各サイクルごとにPCR反応液を採取し高速液体クロマトグラフィーによって標的産物を分離分析してみると、初期コピー数に応じた一定のサイクルから線形的な増幅が始まり、全体としてはロジステック関数でよく近似できるプロファイルを示す<sup>1)</sup>。この現象は、現実の反応が耐熱性DNAポリメラーゼであるTaqポリメラーゼの活性、1サイクルの伸張時間、及びプライマー量が所与の有限の条件下で進行していることにもとづくとして説明できる。例えば、PCR反応においてTaqポリメラーゼを2.25単位使用する場合、1分間の伸張反応において鋳型として処理可能なDNAの量は $8 \times 10^{11}$ コピーが最大量となる<sup>1)</sup>。従って、この量に到達したサイクル以降は、プライマーの消費によって増幅を停止するまでは1サイクルでの生産量は一定となる。しかも、酵素活性と1サイクルの伸張反応を所与とした場合、この最大生産量に到達するサイクル数は、試料中に含まれていた初期コピー数に依存する。そこで、予め標準物質として用意した既知濃度の標的核酸（キャリブレーター）に対して指数関数的増幅から線形増幅へ移行するサイクル（遷移サイクル）の測定から増幅前の標的核酸のコピー数を算出することが可能となる。

この方法を具体的に実施するには、試料中の標的核酸の増幅過程を各サイクルごとにモニターする必要がある。原理的にはPCRサイクルごとに試料を採取

し、HPLCなどの分離分析手段によって標的核酸の増幅の経時変化を追跡することが必要である。しかし、反応容器から試料をいちいち採取することは、多数の検体の迅速な処理が求められる臨床検査の現場に極めて手間のかかる作業を持ち込むばかりか、PCRの実施において従来から問題とされている増幅産物の混入に由来する擬陽性の問題も生じる可能性がある。

従来から2本鎖DNAにインターカレーションし、蛍光増感を示す物質（インターカレーター性蛍光物質）が知られている。そこで、IM-PCRでは、PCRで産成される標的核酸増幅産物が2本鎖であることに着目し、PCR反応液に予めインターカレーター性蛍光色素を添加しておき、その存在下でPCRを行いながらその反応液の蛍光強度をモニターすることによって、容器中の標的核酸の増加を蛍光強度の増強から追跡する（Fig. 2）。蛍光が所定の強度に達したサイクル数（カットオフサイクル数）と予め得られていたキャリブレーターによる検量線とから、試料に含まれていた標的核酸の初期量を算出する。

## 3. 材料および調製法

### [1] 臨床サンプル

C型肝炎患者由来でHCV抗体陽性の血清サンプルは、京都大学医学部の協力の下に入手した。

### [2] HCV-RNAキャリブレーターの調製<sup>2)</sup>

国立ガンセンターより提供された3種類のHCV cDNAクローン（クローン番号1、2、3；文献3）をもとに、HCV-RNAの非翻訳領域（1-1487塩基；文献3）をプラスミドベクターpTZ19Rに挿入した（pTZ19R/HCV123DNA）。pTZ19R/HCV123DNAを制限酵素PmaCIによって処理し、T7 RNAポリメラーゼによってin vitroの転写を行い、1549ヌクレオチドからなるRNAを得た。これをCHROMA-SPIN 30カラム（Clontech社製）並びにG4000SWカラム（東ソー製）によって精製した。吸光度からRNA濃度を推算し、100ug/ml YeastRNAを含むTEバッファーによって段階希釈することによって、HCV-RNAのキャリブレーターセットとした。

### [3] インターカレーター

本法では、インターカレーターとして、ヘキスト33258、エチジウムブロマイド、チアゾールオレンジなどが使用できる<sup>2)</sup>。本システムでは、3-メチル-2-[1-(3-トリメチルアンモニオプロピル)-1,4-ジヒドロキノリン-4-イルデン-メチル]ベン

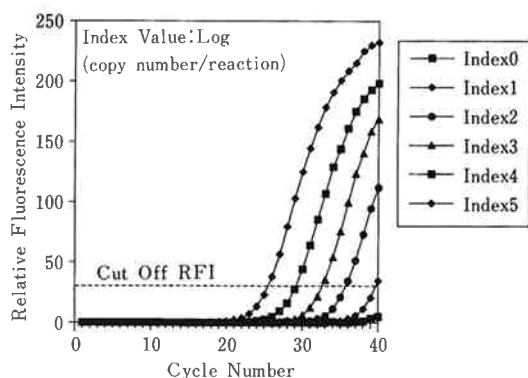


Fig. 2 Increase of relative fluorescent intensity during PCR cycles.

ゾー1、3-オキサゾリウムジヨードライド (Molecular Probe社製: YO-PRO-1) を使用した。2本鎖DNAの存在下では、YO-PRO-1は、核酸塩基間にインターカレーションし顕著な蛍光増感を示す(励起波長: 490nm/蛍光波長: 510nm)。

#### [4] 装置

温調機能付き蛍光検出器-PCRモニターの概略をFig. 3に示す。96ウェルタイタプレートを反応容器として用いて、PCRを行いながら反応液中の蛍光強度を測定することが可能なように設計されている。PCRの各サイクルにおいて、伸張反応後90秒間で96ウェルの蛍光強度を測定する。

装置は、レーザー励起蛍光検出器、X-Y蛍光スキャナー及びタイタプレートの装着が可能な温調器から構成され、これらは側置きパーソナルコンピュータによって制御される。温調器として、PCR用サーマルサイクラー (M.J.Research社製: PTC-100) を組み込んだ。

ウェル内部への励起光の照射並びに蛍光の収集は、光源および検出器からのびた2本の石英ファイバー (住友電工製: MS-08: コア径800 $\mu$ m) によってタイタプレート上部から行われる。2本の石英ファイバーの一端は束ねられX-Yアームに装着されていて、タイタプレートの各ウェル上部を走査しながら蛍光測定が行われる。光源は空冷アルゴンイオンレーザー

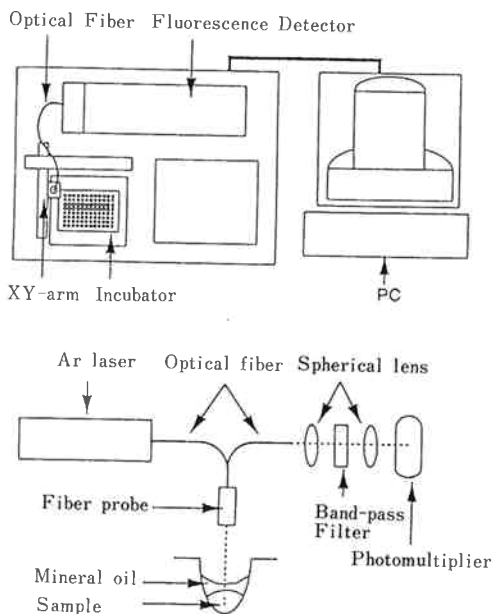


Fig. 3 System configuration and block diagram of optical sensing system of IM-PCR.

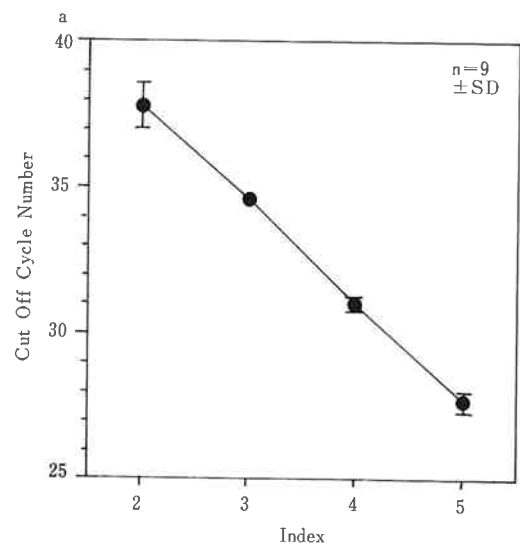
(NEC製: GLG3070D: 3mW) を用い、励起波長としてその488.0nmの発振線を利用した。一方、蛍光は、干渉フィルター (朝日分光製: 中心波長510nm/半値幅: 10nm) によって分光した後、光電子増倍管 (浜松ホトニクス製: R212) に導きその強度を測定した。

#### 4. 結果および考察

##### [1] 試薬および測定方法<sup>2)</sup>

試薬キットは、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ コピー/テストの検量線作成用HCV-RNA標準試料 (キャリブレーター) 及びRTバッファー、逆転写酵素を含むRT酵素試薬、PCR試薬およびインターカレーター試薬から構成される。RTバッファーは、標的RNAの下流配列を認識するプライマーを含む。PCR試薬には、Taqポリメラーゼとともに標的RNAの上流配列を認識するプライマーが含まれている。実際のアッセイにおいては、RTバッファーとRT酵素液並びにPCR試薬とインターカレーター試薬は用時混合し、それぞれ1液 (カクテル) として使用する。これらと併せて、血清からの核酸の抽出に抽出キット (東ソー核酸抽出キット) が使用される。

抽出キットによって抽出されてきたRNA試料は各コピー数のキャリブレーターとともに専用タイタプレートに分注し、RTカクテルを添加した後PCRモニターにセットする。10分間c-DNA合成反応を行う。引き続き、PCRカクテルを添加し、PCRモニターによってPCRを行いながら各ウェル内部の蛍光強度の経時



Index Value: Log(copy number/reaction)

Fig. 4 a Reproducibility of calibration.

測定を開始する。40サイクルのPCR反応を完了した時点で、各ウェル内部の蛍光強度の経時変化がコンピューター内部に記録される。

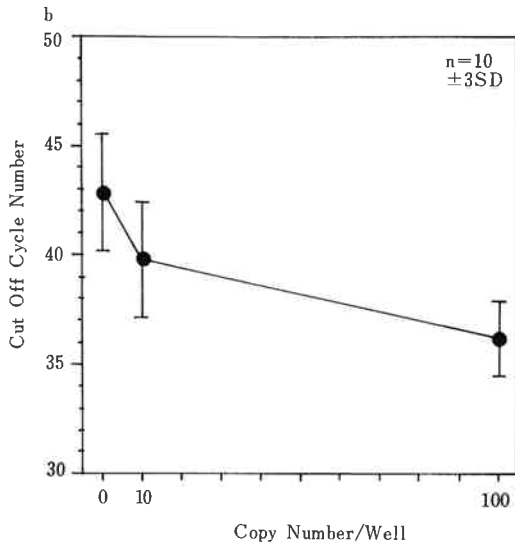


Fig. 4 b Minimum detectable limit.

TABLE Intra-and Inter-Assay Precision  
Sample:HCV Ab Positive serum

Sample No.	Assay-1 (Index)	Assay-2 (Index)
1	5.9	5.9
	5.7	5.9
2	2.7	2.9
	2.9	2.7
3	4.7	4.4
	4.7	4.5
4	3.2	2.9
	3.2	2.9
5	4.9	4.8
	4.8	4.9
6	<2.0	<2.0
	<2.0	<2.0
7	3.6	3.2
	3.2	3.0
8	5.6	5.7
	5.1	5.4
9	4.6	4.7
	4.8	4.4
10	<2.0	<2.0
	<2.0	<2.0

INDEX value:  
Log (copy number/83 μl serum)

キャリーブレーターセットを測定した時の蛍光モニターの結果をFig. 2に示した。ここで、蛍光が所定の強度(カットオフRFI)に達したサイクル数(カットオフサイクル数)と初期濃度から検量線が作成され(Fig. 4 a)、同様に未知試料のカットオフサイクル数からHCV-RNAの初期コピー数が検査結果として出力される。測定結果は、コピー数の対数をインデックスと称して表示される。

〔2〕 基本性能評価

組み換え体HCV-RNAで調製したサンプルを測定したとき、10コピーにおけるカットオフサイクル数は、陰性コントロールのそれと有意水準1%で差がある

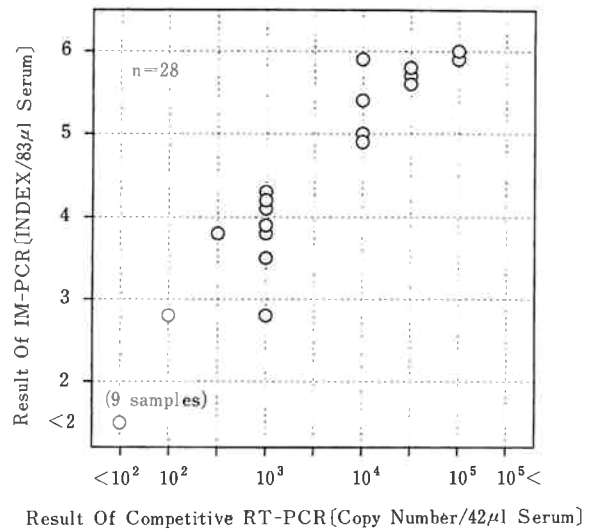


Fig. 5 Correlation between IM-PCR and competitive RT-PCR.

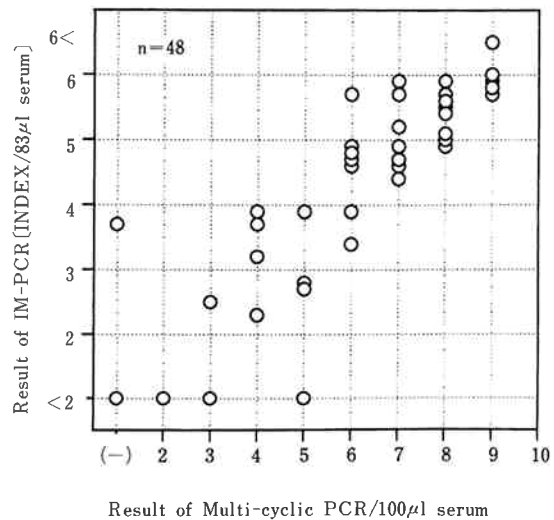


Fig. 6 Correlation between IM-PCR and multi-cyclic PCR.

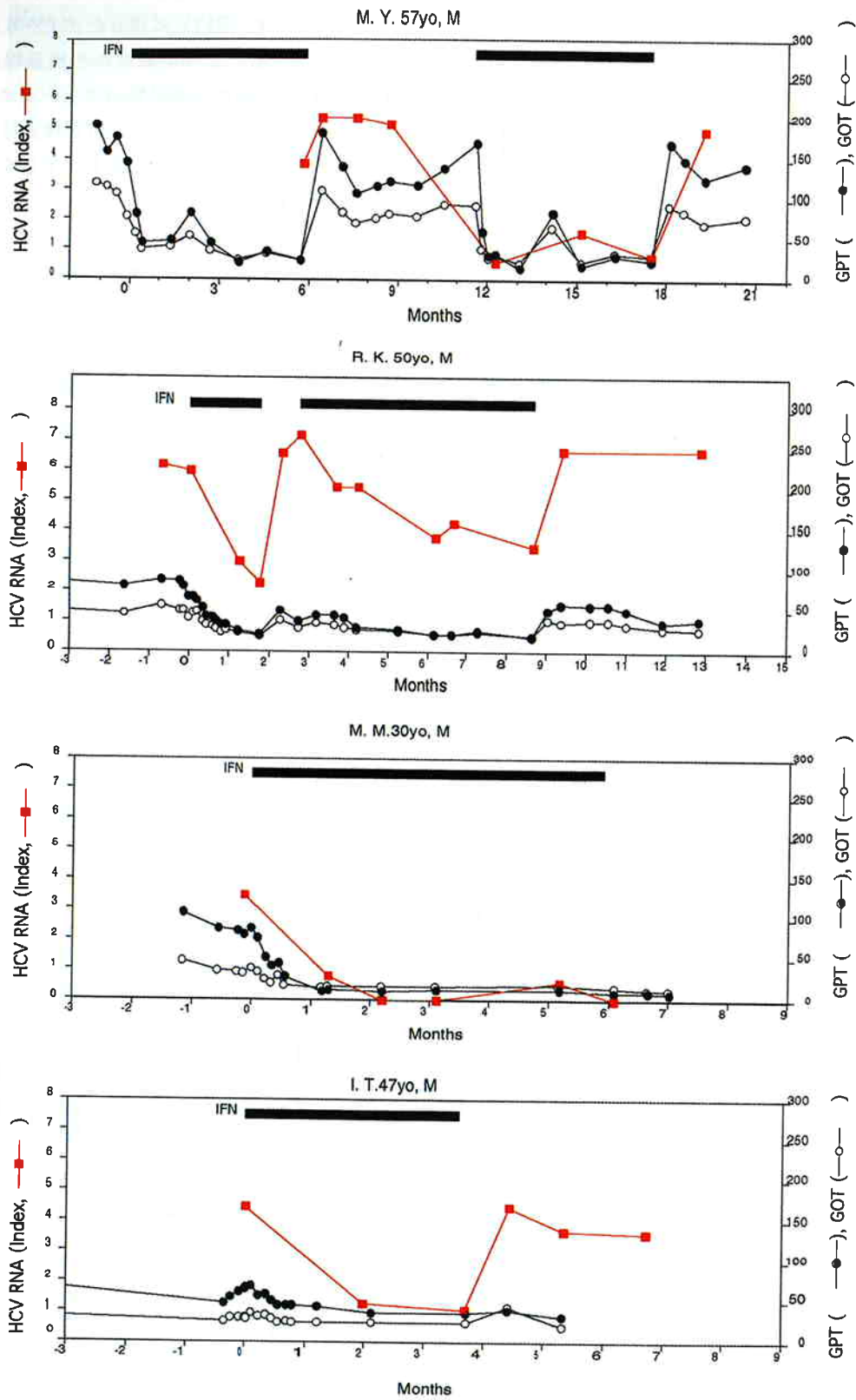


Fig. 7 Response to IFN treatment.

(t 検定) ことから (Fig. 4 b)、検出下限界は約10コピーと考えられる。一方、再現性はCV2.4% (Index 2.7/約500コピー) と良好である<sup>4)</sup>。次に、血清検体について再現性を調べた。典型的な臨床サンプル10例につき、二重測定で日をかえて測定した結果をTableに示す。いずれの濃度域でも再現性は良好であった。PCRを用いた一般的な定量法のひとつに、競合PCR法<sup>5)</sup>があるが、次にHCV抗体陽性血清28例につき、同一の核酸抽出操作を行い、RT-PCR以降におけるIM-PCR法と競合PCR法との相関を調べたのが、Fig. 5である。相関係数は0.93で、良好な相関がみとめられた。

さらに、他の定量法としてマルチサイクリックPCR法<sup>6)</sup>との相関を調べた。慢性C型肝炎患者血清48例につき、異なる核酸抽出操作の後マルチサイクリックPCR法とIM-PCR法との相関を調べたのがFig. 6である。この結果から、相関係数は0.85でIM-PCR法が核酸抽出段階から異なる従来法とも良好な相関を示すことがわかった<sup>7)</sup>。

### 〔3〕 臨床サンプルによる性能評価

臨床所見からC型肝炎が疑われインターフェロン療法を受けている患者について、本システムを用いてHCV-RNA量の変動をモニタリングした。結果の一部をFig. 7に示した。いずれにおいても、測定されたHCV-RNA量はインターフェロンの投与とその中断に顕著な対応を示していることがわかる。患者[MY57yoM]では、インターフェロンの投与によって、HCV RNA量が $10^5$ コピーから10コピーまで減少するものの、その後投与を中断すると再び $10^5$ コピーまで増加している。その様子はGPTやGOTの変動とよく対応している。しかし、患者[RK50yoM]の場合は、投与および中断の影響がHCV-RNA量の大きな変動として認められるにもかかわらず、GPT及びGOTには顕著な反映が見られない。患者[MM30yoM]及び[IT47yoM]では、いずれもGOT及びGPTではインターフェロン投与の効果があつたと判断するケースであるが、[IT47yoM]の測定結果は投与中断後のHCV-RNAの急激な増加を示している。

これらの結果から、本方法では広いダイナミックレンジでHCV-RNAの変動を測定することが可能となり、投与計画をたてる上での臨床的に有効な指標を簡便に提供することが可能となるものと考えられる<sup>8)</sup>。

## 5. 結 論

基本性能評価の結果も良好で、増幅産物の飛散による擬陽性の出現やPCR後の煩雑な分析の必要性など従来から指摘されてきたPCR法の臨床応用での課題からの回避が可能となり、慢性C型肝炎に対するインターフェロン療法の経過観察を可能とする実際的な手段の提供が可能となった。特に、従来の指標GOT/GPTでは明確な判定の困難な患者についても詳細なウィルス量の変動に関する情報が得られ、臨床的に有効な指標を提供できる見通しが得られた。

尚、本稿にて紹介した方法は、東ソー株式会社より日本、米国及び欧州(指定国)にて特許出願(優先日: 1990年10月31日)がなされている。

## 6. 謝 辞

C型肝炎患者血清の入手並びに本システムの評価にあたって、京都大学医学部第2内科 福田善弘 助教授及び京都大学化学研究所 上田國弘 教授の協力を得た。HCV cDNAクローンは、国立ガンセンターウイルス部 下遠野忠邦 部長から提供を受けた。

諸先生のご協力に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) 石黒敬彦、医学のあゆみ、173、12、959-963 (1995)
- 2) Takahiko, I. et al., Analytical Biochemistry, 229, 2, 207-213 (1995)
- 3) Kato, N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 9524-9528 (1990)
- 4) 斉藤寿一、石黒敬彦、日本薬学会第114年会(東大)にて発表。要旨は講演要旨集(4) 131頁(1994)に収載。
- 5) 加藤直也 他、肝臓、32、750-751 (1991)
- 6) 石山業弘 他、肝臓、33、506-507 (1992)
- 7) 斉藤寿一、石黒敬彦、第30回日本肝臓学会総会(旭川)にて発表。要旨は「肝臓」35巻suppl. (1) 242頁(1994)に収載。
- 8) 米田俊貴、福田善弘 他、第31回日本肝臓学会総会(福岡)にて発表。要旨は「肝臓」36巻suppl. (1) 266頁(1995)に収載。



著 者

氏名 齊 藤 寿 一

Juichi SAITOH

入社 昭和62年4月1日

所属 東京研究所

バイオ分野

副主任研究員



著 者

氏名 石 黒 敬 彦

Takahiko ISHIGURO

入社 昭和58年4月1日

所属 東京研究所

バイオ分野

主席研究員