

プローブ DNA 結合粒子による HIV-DNA の特異的な濃縮及びその PCR 検出

¹⁾日本合成ゴム (株) 筑波研究所, ²⁾日本ロシュ (株) 試薬本部

³⁾(株) エイジーン研究所, ⁴⁾神奈川県衛生研究所ウイルス部

范 可君¹⁾ 田野 裕之¹⁾ 北島 政明¹⁾ 玉造 滋²⁾
古市 泰宏³⁾ 林 孝子⁴⁾ 今井 光信⁴⁾

(平成 7 年 4 月 17 日受付)

(平成 7 年 6 月 13 日受理)

Key words: HIV-DNA, probe-DNA particles

要 旨

probe-DNA を結合したラテックス粒子を用いて, HIV-DNA を特異的に濃縮してから, PCR 法で増幅することにより, 極めて高感度な HIV-DNA の検出法を確立した. 数十 ml 中に数コピーないし数十コピーの標的 DNA が存在する系においては, 通常の PCR ではその検出が難しい. 本方法によれば, 粒子表面の probe-DNA が極めて高い効率で標的 DNA とハイブリダイゼーションすることができ, また, 捕捉された HIV-DNA を粒子から解離せず, 粒子ごとに PCR 反応で増幅することができた.

モデル検体系に於いて本方法の検出感度は 18 コピー/30 ml であった. また, HIV キャリアーの血液 1 部を正常血液 29 部, 49 部, 99 部と混合したプール血液系について, 通常の PCR ではいずれも検出できなかったが, 本方法の濃縮後 PCR では, 全て陽性の結果が得られた. 従って, 本方法は, PCR 法による輸血用血液の HIV スクリーニングへの道を拓くものと期待できる.

序 文

現在一般的に PCR 検査に用いられるリンパ球 DNA 調製法に, フィコールパックなどを用いる遠心分離法, または溶血法によりリンパ球を調製し, そのリンパ球を SDS-プロテアーゼで蛋白消化後, フェノール抽出または熱処理で酵素を不活性化する方法などがある¹⁾²⁾. また, 上記方法を効率的に行うためのキットも市販されている.

しかし, 上記方法は核酸と蛋白の分離に力点を置いたものであり, 回収される核酸には標的 DNA 以外の核酸が大量に含まれる. 通常 PCR 法に用いる DNA 量は最大 1 μ g であるため³⁾⁴⁾, 大量

の DNA (10 μ g 以上) 中に少量の HIV-DNA が存在するとき, その検出は困難である.

我々はラテックス粒子に probe-DNA を固定したものをを用いて, 血液サンプルから, 標的核酸を特異的にハイブリダイズさせ, 粒子と共に回収, 濃縮し, そのまま PCR 反応で増幅する方法を開発した (Fig. 1). この方法を用いれば, 多数検体をプールし, 濃縮することにより, 1 回の PCR で多数検体のスクリーニング検査が行える可能性がある. ここでは, ラテックス粒子による HIV-DNA の濃縮, それに続く HIV-DNA の検出結果について報告する.

材料と方法

1. probe-DNA 粒子の調製

ここで使用する粒子の粒径は約 1 μ m のポリス

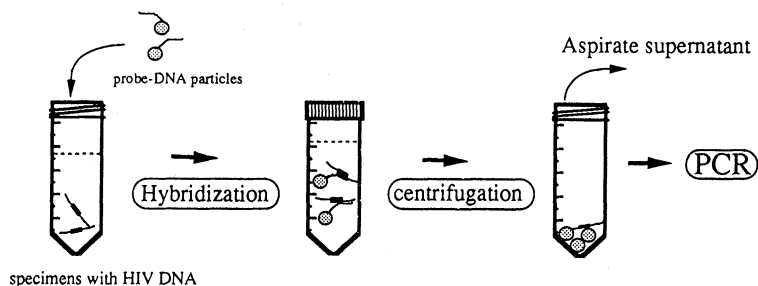
別刷請求先: (〒305) 茨城県つくば市御幸が丘 25 番

日本合成ゴム (株) 筑波研究所

范 可君

平成 7 年 9 月 20 日

Fig. 1 The enrichment process of HIV-DNA with probe-DNA particles



チレン系ラテックスである (L0101, 日本合成ゴム)。粒径が小さいため, 表面積が大きい。分散性もよい, ハイブリダイゼーション効率も高い⁵⁾⁶⁾。通常の溶液反応に適する担体である。また, 通常の遠心操作で容易に固液分離し, かつ, PCR 反応を阻害しないものである。

HIV-DNA の probe は保存性の高い *gag* 遺伝子領域の一部を sense (塩基配列1163~1200, 38塩基), antisense (塩基配列760~798, 39塩基) 両鎖に対応するものをそれぞれ選定した⁷⁾。Table 1 に probe-DNA の配列を示す。また, 粒子表面に5'末端を特異的に固定するために, probe-DNA の5'末端にアームとしてデオキシシトシン (dC) を10塩基分導入した。アーム部を除く probe-DNA の塩基配列のアミノ基を当量の相補鎖でアニーリングし, 2本鎖形成することにより, 固定化反応から保護した。固定化反応では dC 塩基部のアミノ基をラテックス粒子表面のカルボキシル基と反応させ, アミド結合により DNA を固定化させた⁸⁾。probe-dC51と probe-dC54をそれぞれ固定した probe-DNA 粒子2種類を得た。

2. probe-DNA 粒子の固定化率評価

³²P で標識された dC54相補鎖と dC54 probe-DNA 粒子を0.5MNaCl 溶液に40°Cで15分間反応し, ハイブリッド体を形成させた。ハイブリッド体を遠心分離により回収し, ハイブリッド体形成前後の³²P カウントの測定値から dC54相補鎖の捕捉量を算出した。同様な評価を dC-51 probe-DNA 粒子についても行った。これらの結果, 粒子1個あたりに6~8千個の probe-DNA が機能していることが分かった。

3. probe-DNA 粒子の濃縮効率

上記で調製した2種類の HIV-DNA probe-DNA 固定粒子 (固形分それぞれ1重量%) を容量比1:1の割合で混合し, 濃縮の検討に使用した。標的 DNA として, HIV ウィルス DNA 全長鎖を含む培養ヒト白血球 NY 10株から抽出したものを用いた。まず, NY10DNA 原液を段階希釈し, それぞれ希釈液5μl を Nested PCR で検出し, 希釈溶液中の HIV-DNA 量を調べた。

1stPCR のプライマーには, SK145A と SK431A を, 2ndPCR には SK145 と SK431を用いた (Table 1)。Nested PCR の最終産物は142塩基である。PCR のサーマルサイクラーは PEPKIN ELMER CETUS 社 PJ-2000を用い, 1stPCR, 2ndPCR 共に, 94°C×1分, 55°C×1.5分, 72°C×1分, 30サイクル行った後, 72°C×7分間で最終反応を行った。

PCR 産物は, 2%アガロースゲルで電気泳動した後, エチジウムブロマイド染色することによって同定した。

NY10DNA 希釈液において, Nested PCR の検出限界 (5μl) に1コピーHIV-DNA があると仮定した。

ハイブリダイゼーション緩衝液の組成は10mM Tris-HCl (pH 8), 0.25M NaCl, 0.01% Triton X-100, 0.1mg/ml の calf thymus DNA である。この溶液30ml の中に probe-DNA 固定粒子 (固形分1重量%, 30μl), 及び標的 DNA として NY10 DNA を加え, 60°Cで1時間ハイブリダイゼーションを行った。NY10DNA は予め熱変性したものを用いた。ハイブリダイゼーション後, 10,000

Table 1 The sequences of HIV-DNA probes and PCR primers

probes		
dC54(forward)		
5'-CCC CCC CCC CCT TAT GTC CAG AAT GCT GGT AGG GCT ATA CAT TCT TAC-3'		
dC51(reverse)		
5'-CCCCC CCCCCG TCA TCA GGC CATATC ACC TAG AAC TTT AAATGC ATG G-3'		
primers		
1st	SK145A	5'-CCC ACA AGA TTT AAA CAC CA-3'
	SK431A	5'-TGA AGG GTA CTA GTA GTT CC-3'
2nd	SK145	5'-AGT GGG GGG ACA TCA AGC AGC CAT GCA AAT-3'
	SK431	5'-TGC TAT GTC AGT TCC CCT TGG TTC TCT-3'

Table 2 PCR detection with and without enrichment procedure

Experimental conditions			Nested PCR results(+/tested)							Relative PCR sensitivity
start vol. (ml)	final vol. after enrichment vol.(μ l)	Hybridization condition	Dilution ratio of HIV-DNA(NY10-DNA)							
			10 ⁴	3.3 \times 10 ⁴	10 ⁵	3.3 \times 10 ⁵	10 ⁶	3.3 \times 10 ⁶	10 ⁷	
without enrichment			29/30	11/30	0/6	0/6	0/6	ND	ND	1
30	50	37°C \times 1Hr	ND	ND	ND	5/6	2/12	0/8	ND	33
30	50	37°C \times 12Hr	ND	ND	ND	6/6	9/10	0/8	ND	100
30	50	60°C \times 1Hr	ND	ND	ND	ND	21/22	7/8	0/4	330
30	50	60°C \times 12Hr	ND	ND	ND	ND	15/15	4/4	2/4	330

ND: No data

rpm で10分間遠心し、粒子を沈澱として回収した。2ml の10mM Tris-HCl, 0.1M NaCl 緩衝液で再分散し、1 回遠心洗浄してから、標的 DNA を probe-DNA 粒子から離さずに、そのまま PCR の鋳型として粒子と共に PCR 反応系に加えて、増幅反応に使用した。上記ヒト白血球 DNA を含まないモデル系での濃縮結果を Table 2 に示す。

4. 血液検体での濃縮, PCR 検出

(1) HIV 陽性血液中 HIV-DNA 数の調査

アンプリコア血液検体処理試薬 (日本ロシュ) を用いて 5 つの HIV 陽性血液 0.5ml からそれぞれ 0.2ml 白血球 DNA 抽出液を調製した。HIV 陽性抽出液を 100°C で 30 分間熱処理してプロテアーゼを失活させた後、希釈液を調整し、それぞれの希釈液 5, 10, 20 μ l を鋳型として用い、Nested PCR で増幅し、HIV-DNA のコピー数を調べた。Table 3 にその結果を示す。

(2) プール検体中にある HIV-DNA の濃縮, PCR 検出

上記 5 つの HIV 陽性血液から抽出された

DNA 溶液 80 μ l に対して、それぞれ HIV 陰性抽出液 2.32ml (29 人分), 3.92ml (49 人分), 7.92ml (99 人分) を加え、30, 50, 100 倍の希釈液を調製した。この希釈液を 100°C で 30 分間熱処理してプロテアーゼを失活させた後、終濃度が 0.25M となるように NaCl を添加してから、HIV-DNA 粒子 30 μ l (固形分 1 重量%) を入れ 60°C で 1 時間インキュベートすることによって、HIV ウイルス由来 DNA と probe-DNA 粒子をハイブリダイズさせた。続いて遠心分離 (10,000rpm \times 5min) を行い、HIV ウイルス DNA を粒子と共に沈澱として回収し、一回遠心洗浄後、そのまま Nested PCR 反応に用いた。

成 績

1. モデル系での濃縮, PCR 検出

一細胞当たり、HIV-DNA を一遺伝子含む NY10 細胞より抽出した DNA 溶液の希釈系列液を調製し、probe-DNA による HIV-DNA の濃縮効率を調べるモデル実験を行った。結果を Table 2 に示した。

NY10DNA 抽出液の順次希釈液 ($\sim 10^7$ 倍) を調製し、その $5\mu\text{l}$ を用いて PCR 増幅を行った結果、 10^4 倍希釈液では30回中29回、 3.3×10^4 倍希釈液中では30回中11回 HIV-DNA が検出できた。次にこれらの希釈液 30ml を用いて、probe-DNA 粒子による HIV-DNA の濃縮を行い ($30\text{ml} \rightarrow 50\mu\text{l}$)、それらの濃縮液の全量 ($50\mu\text{l}$) を用いて Nested PCR を行った結果、 60°C 、1時間のハイブリダイゼーション条件で濃縮を行った場合、 3.3×10^6 倍希釈でも 8 回中 7 回、HIV-DNA が検出できた。ハイブリダイゼーション時間を12時間にすれば、4 回中 4 回検出することができた。従って、この濃縮条件では、HIV-DNA の検出感度は330倍改良され、18コピー/ 30ml になっていることがわかった。

2. 血液検体系での濃縮, PCR 検出

5 つの異なる HIV 陽性検体に対して、まず Nested PCR で全血 $200\mu\text{l}$ 中にある HIV-DNA のコピー数を調べた (Table 3)。その結果検体 1 から検体 5 までの全血 $200\mu\text{l}$ 中に HIV-DNA コピー数はそれぞれ160, 160, 80, 40, 16コピーで

あった。続いてこれら 5 つの HIV 陽性検体全血 1 部 ($200\mu\text{l}$) に対して、正常検体血液をそれぞれ 29部 (5.8ml)、49部 (9.8ml)、99部 (19.8ml) を混合し、プールスクリーニングテスト用の混合検体を調製した。これらのプール検体からそれぞれの血液量に応じて白血球 DNA 抽出液をそれぞれ 2.4ml 、 4.0ml 、 8.0ml 得た。これら白血球 DNA 抽出液にそれぞれ10倍のハイブリダイゼーション緩衝液と probe-DNA 粒子 (1 重量%, $30\mu\text{l}$) を加え、インキュベート、遠心分離した後、Nested PCR 検出に供した。また、比較のため、濃縮操作を行う前に、これら白血球 DNA 抽出液をそれぞれ $5\mu\text{l}$ を採り、同じ Nested PCR で増幅し、HIV-DNA の検出を行なった。

濃縮操作前後の Nested PCR 検出結果を Table 4 に示した。30人分のプール検体において、HIV 陽性検体の HIV-DNA 濃度はそれぞれ67, 67, 33, 17, 7 コピー/ ml であった。濃縮前の HIV 抽出液の容量は約 2.4ml であるが、濃縮後の容量は $50\mu\text{l}$ であった。濃縮前の PCR 検出は 5 例中 5

Table 3 Titration of HIV-DNA concentration for each specimen by Nested PCR

Dilution Ratio	1			10			100	
volume of DNA extraction as 1st PCR template (μl)	10	5	20	10	5	20	10	5
specimen 1	ND	+	+	+	+	-	-	-
2	ND	+	+	+	+	-	-	-
3	ND	+	+	+	-	-	-	ND
4	ND	+	+	-	-	-	ND	ND
5	+	+	-	-	-	ND	ND	ND

ND: No data

Table 4 PCR detection with and without prior enrichment procedure

mixed specimens ratio (HIV-carrier : normal)	Nested PCR results						total volume (ml)
	HIV-carrier	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	
	HIV-DNA copies	160	160	80	40	16	
1 : 29	no enrichment	-	-	-	-	-	2.4
	with enrichment	+	+	+	+	+	
1 : 49	no enrichment	-	-	-	-	-	4.0
	with enrichment	+	+	+	+	+	
1 : 99	no enrichment	-	-	-	-	-	8.0
	with enrichment	+	+	+	+	+	

例とも陰性であったが、濃縮後 PCR で全て陽性と判定することができた。また、50人分、100人分プールした検体についても、濃縮前陰性判定であったものが濃縮後の PCR 検出で5例中5例とも全て陽性と判定できた。

Table 3 の HIV 陽性検体中の HIV-DNA 濃度を用いて計算すると、濃縮後の PCR の検出感度は30人、50人、100人分プールした系において、それぞれ16コピー/2.4ml、16コピー/4ml、16コピー/8ml であった。濃縮しない通常の PCR 増幅では、5 μ l に少なくとも1コピーが必要であることを考えれば、濃縮操作によって約100倍検出感度を高めることができた。

考 察

probe-DNA を固相キャリアーに固定し、目的物質の分離に使うことはよく用いられる手法である。しかし、通常このような方法で調製される目的 DNA 量は比較的高濃度で、少なくとも数マイクロモル (10^{17} 分子) 以上のものであり¹⁾、数分子程度の標的 DNA の特異的な濃縮に成功したのは今回が初めてと思われる。

NY10DNA を標的 DNA とするモデル系において、probe-DNA 粒子による濃縮後の PCR 検出感度は18コピー/30ml であった。また、血液検体についても、濃縮後の検出感度は16コピー/8ml (1:99プール検体系) であった。プール血液検体を用いた濃縮実験でも濃縮後の PCR では、濃縮前 PCR 検出感度 (1コピー/5 μ l) に比べて約100倍アップできたことになる。

濃縮効率はハイブリダイゼーション効率に深く依存するものと考えられる。ハイブリダイゼーション緩衝液の組成、温度、時間が一定の場合でも、ハイブリダイゼーション反応の容量、または標的 DNA のコピー数によって成績が異なる。今回の実験では、ハイブリダイゼーションの温度は60°C、時間は12時間と長い場合が最も濃縮効率が良かった。

標的核酸を濃縮してから PCR で検出する本方法は、標的核酸が極くわずかな量しか存在しない検体からの検査に特に有効である。PCR の検体調製に濃縮操作を加えることにより、1回の PCR

で取り扱える検体量の制限がなくなるか、同じ量であればより高感度な検査結果が期待できる。

本方法は従来のイソプロパノール沈澱法、または、ガラスビーズを用いる吸着法等に比べて、標的核酸の抽出原理が基本的に異なる。イソプロパノール沈澱法は核酸と蛋白の析出の違いを利用した核酸/蛋白の分離法である。回収できるのは全ての核酸である。また、回収された核酸液の中に、蛋白、エタノール等が含まれているため、時々 PCR 反応を阻害することがある。同様なことをガラスビーズ法についても言える。ガラスビーズが物理化学的な吸着性で核酸の分離に使用されているが、特異的な標的核酸の抽出はできない。一般的にガラスビーズ粒径が大きい。その分散性がラテックスに比べて悪く、吸着効率も低い。PCR 産物も同時に吸着するので、PCR 反応系に大量のガラスビーズを直接導入すると、PCR 効率に悪影響を及ぼす。また、通常の PCR 反応に用いられる DNA 量は最大1 μ g であるため、数 ml の血液検体から抽出される大量の DNA 溶液中にある僅かな標的 DNA の PCR 検出には、本方法の probe-DNA 粒子による特異的な抽出法が有効と思われる。

また、本方法は輸血用血液の PCR による HIV スクリーニングテストへの道を開くものである。現在、輸血液の HIV 感染の検査は抗体検査で行われているが、この方法にはウィンドウ期の問題が存在する。通常の PCR 検査は経済的、時間的制約から、全ての献血者に対して実施することは現時点で困難とされる。この問題を解決するには、HIV-DNA 粒子を用いるプールのスクリーニング法が有効と考えられる⁸⁾。現在 HIV 感染率の低いことを考えれば、50~100人分の献血の一部をプールし、本法による HIV-DNA の濃縮操作後の PCR 検査を行うのがよいと思われる。その結果が陰性なら、プール血液全てが陰性と判定できる可能性がある。また、もし陽性のときは、さらに小さいプールまたは個々の検体の PCR を行い、HIV 陽性検体を特定する。この方法を用いれば、遺伝子診断において1検体当たりの検査コストと検査労力を従来法の数十分の一以下に抑え、莫大

な数に上る輸血液の全てに対してPCR検査を実施することも可能となる。簡便な抗体法とHIV-DNA粒子を用いる遺伝子診断法を併用することによって、ウィンドウ期の懸念を除外した、より安全な輸血液が供給されることが期待できる。

本稿をまとめるにあたり、西岡久寿彌氏、日方幹雄氏、笠井 澄氏、小嶋雅晴氏に貴重な御意見を賜りました。深く感謝いたします。

文 献

- 1) Kawasaki, E.S.: 血液、細胞などからの試料の調整, 「PCR 実験マニュアル」.(斉藤 隆 監訳) p. 129—134, HBJ 出版社, 1994.
- 2) White, T.J., Madej, R. & Persing, D.H.: The Polymerase Chain Reaction: Clinical Applications. (Advances in Clinical Chemistry), 29, p. 180—181, Academic Press, 1992.
- 3) Erlich, H.A.: Basic Methodology: (Erlich, H. A. ed., PCR Technology), p. 1—5, Stockton Press, 1989.
- 4) Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. & Arnheim, N.: Enzymatic application of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230: 1350—1354, 1985.
- 5) Kuribayashi, K., Hikata, M., Hiraoka, O., Miyamoto, C. & Furuichi, Y.: A rapid and efficient purification of poly(A)-mRNA by oligo(dT)30-Latex. Nucleic Acids Research, Symposium Series No. 19, p. 61—64, 1988.
- 6) Kuribayashi-Ohta, K., Tamatsukuri, S., Hikata, M., Miyamoto, C. & Furuichi, Y.: Application of oligo(dT)30-Latex for rapid purification of poly(A)⁺ mRNA and for hybrid subtraction with the in situ reverse transcribed cDNA. Biochimica Biophysica Acta, 1156: 204—212, 1993.
- 7) Sanchez-Pescador, R., Power, M.D., Barr, P.J., Steimer, K.S., Stempien, M.M., Brown-Shimer, S.L., Gee, W.W., Renard, A., Randolph, A., Levy, J.A., Dina, D. & Luciw, P.A.: Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). Science, 227: 484—495, 1985.
- 8) Kato, S., Nishimura, K. & Takano, T.: Sensitive detection of HIV-1 DNA enriched by molecular hybridization. Abstract of 6th International conference on AIDS, 3, 244, S.C. 621. 1990.

Prior Enrichment of HIV-DNA with Probe-DNA Particles for an Efficient PCR Diagnosis

Kejun FAN¹⁾, Hiroyuki TANO¹⁾, Masa-aki KITAJIMA¹⁾, Shigeru TAMATSUKURI²⁾,
Yasuhiro FURUICHI³⁾, Takako HAYASHI⁴⁾ & Mitsunobu IMAI⁴⁾

¹⁾Japan Synthetic Rubber Co., Ltd. Tsukuba Research Laboratory

²⁾Nippon Roche K.K.

³⁾AGENE Research Institute

⁴⁾Kanagawa Prefectural Institute of Health

PCR mediated detection of HIV-DNA has been widely used. However, compared with traditional immunological diagnoses, the extraction of DNA is a laborious and time consuming step. We have developed a procedure for the efficient isolation and concentration of HIV-DNA from cell lysates. We report here a novel method by which one can recover HIV-DNA in a small volume ($\sim 50 \mu\text{l}$) of solution from a large volume of crude cell lysate which contains as few as several copies. The method uses the specific hybridization of HIV-DNA to HIV probe-DNA particles. This prior enrichment augmented the sensitivity in the detection of HIV-DNA by PCR, and allows us to make a diagnosis even if the specimen contained an extremely low copy number of HIV-DNA molecules in a large volume, which would have otherwise resulted in false-negative data with the conventional extraction method. The method also enables the examination of 100 individual blood specimens in a combined form. Thus, the application of the present enrichment procedure with HIV probe-DNA particles should reduce the labor and cost of HIV diagnosis, since the HIV positive samples represent a very minor group of people among specimens subjected to clinical laboratory tests and, particularly, among blood samples voluntarily donated to be used for transfusions.