<短 報>

RT-PCR 法を用いた HCV の検出

林 仲信 江角真理子 清水 洋子
 前野 貢 鈴木 高祐 小松 浩平
 今井かほる 岡野 匡雄 志方 俊夫*

Non A Non B ウイルス (HCV) は現在輸血後肝炎の起因ウイルスの大部分を占めている。このウイルスによる肝炎は慢性化しやすく、慢性肝炎、肝硬変、肝癌の発症へとつながり、その検出系、ワクチンの開発が急がれている。1988年、米国カイロン社はこのウイルスのクローニングに成功し、約10kbのプラスストランド RNA である事がわかり、HCV と名づけられた¹⁾。今回我々は、この HCV sequence を基に、HCV 特異的 primer, probe を作製し、RT-PCR 法²⁾により、血中、肝臓中に微量にしか存在しないとされる、このウイルスの特異的領域を増幅し直接的に検出可能であることを証明したので報告する。

対象及び方法

1) 材料

HCV 持続感染チンパンジー (NIH, F 株) 血清 2 例、その血清で感染させたチンパンジーの接種前及び急性期の肝臓を対象とした。コントロールとして、正常ヒト血清 2 例、正常ヒト肝臓 2 例を用いた。

血清の処理はポリエチレングリコール沈殿の後グアニジウムイソシアネートバッファーに懸濁、フェノール抽出、エタノール沈殿した。肝臓の RNA の抽出はグアニジウムイソシアネート-塩化セシウム密度勾配遠心法により行った。

2) Primer 及び probe の作製

HCV の sequence data より、150塩基の増幅領域を選び、その両端に対する sense, antisense primer、及び、その領域間の internal probe を DNA 合成機にて作製した (Sequence data は European patent application, Application number : 883109225 を参考とした)。

3) RT-PCR 法²⁾

RNA を random primer, reverse transcriptase を用いて逆転写し (RT)、そのサンプルの一部を PCR に

Fig. Southern blot analysis of RT-PCR products. lanes 1, 2: HCV positive chimpanzees sera, lane 3: Preinoculated phase liver RNA of chimpanzee, lane 4: Post inoculated phase (8weeks) liver RNA of chimpanzee, lanes 5, 6: Normal human sera, lanes 7, 8: Normal human liver RNA.

かけた。PCR は 94℃, 30秒間の denature, 55℃, 30秒間の annealing, 72℃, 1分間の extension の行程を 40 サイクル、Thermal cycler で行った。

4) Southern blot analysis

PCR 産物の一部を電気泳動し、フィルターに transfer した。その後 γ -³²P-ATP, Polynucleotide kinase で末端ラベルした internal probe によるハイブリダイゼーション、オートラジオグラフィーを行った。

成績：図に Southern blot の結果を示す。HCV 陽性チンパンジー血清 2 例、急性期チンパンジー肝臓 1 例には、150bp 位に陽性シグナルを認めるが、それ以外の正常者血清、正常人肝臓、感染前チンパンジー肝臓にはシグナルは認められなかった。

考察：HCV 特異的 primer と internal probe による RT-PCR 法により、HCV の検出が可能である事を示した。

HCV は血清中、肝臓中には微量にしか存在せず、抗原アッセイ系や、通常の核酸ハイブリダイゼーション法ではその検出は困難と考えられ、現在あるアッセイ系は、このウイルスに対する血中の抗体を検出する系 (抗体アッセイ) のみであり、この virus に対する直接

* 日本大学第 1 病理

<受付日1989年10月31日>

的な検出方法はなかった。

今後、この RT-PCR 法は、微量にしか存在しないとされる、HCV を微量の血清、肝組織生検材料より、直接的に検出する有力な方法となるであろう。

索引用語：HCV, RT-PCR

文 献：1) Choo QL, et al: Science 244 : 359, 1989
2) Noonan KE, et al: Nucl Acid Res 16 : 10366, 1988

Detection of HCV by RT-PCR

Nakanobu HAYASHI, Mariko ESUMI, Youko SHIMIZU, Mitsugu MAENO, Koyu SUZUKI,
Kouhei KOMATSU, Kahoru IMAI, Tadao OKANO and Toshio SHIKATA*

* The First Department of Pathology, Nihon University School of Medicine (Tokyo)