<短 報>

PCR 法を用いた C 型肝炎ウイルス RNA の検索

加藤 直也 横須賀 収 小俣 政男
 細田 和彦 大藤 正雄*

目的：最近、長い間不明であった輸血後非 A 非 B 型肝炎の起因ウイルス（C 型肝炎ウイルス；HCV）の核酸（RNA）が同定され、抗 HCV 抗体の測定も可能になった^{1,2)}。しかしながら、ウイルス本体の存在を示すと考えられるウイルス抗原やウイルス核酸の検索法は未だ確立されていない。すでに我々は、polymerase 反応を繰り返し行い目的とする DNA を極く微量でも増幅し得る Polymerase chain reaction (PCR) 法³⁾を用いて B 型肝炎ウイルス DNA を増幅したうえで検出し、塩基配列を決定（直接シーケンス）する方法を報告した^{4,5)}。そこでこの方法を応用し、非 A 非 B 型慢性肝疾患患者の血清中 HCV-RNA を、PCR 法を用いて検索したので報告する。

対象と方法：Chiron 社より発表された HCV の塩基配列⁶⁾に基づき、15～23mer の約40種類の primer を Applied Biosystems 社380B DNA 合成機にて作製し、HPLC にて精製した。予備実験としてこれら多数種類の primer を様々に組合せ、抗 HCV 抗体陽性の血清より抽出した RNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成後、PCR を行った。血清からの RNA 抽出は、検体を SDS-proteinase K 処理後、phenol/chloroform にて抽出し、ethanol 沈殿して行った。cDNA 合成は、上記 primer を用い、Amersham 社 cDNA synthesis system plus kit にて行った。引続き PCR は、cDNA 合成産物、10mM Tris (pH 8.4)、2.5mM MgCl₂、50mM KCl、0.02% gelatin、100mM dNTP に、4unit の Taq polymerase を加え、denature, annealing, polymerase reaction 各 2 分間の反応を 1 cycle として 30～60cycle 施行し、行った。PCR 反応産物の一部を 8% acrylamide gel 中にて泳動し、ethidium bromide 染色して検索したところ、数組の primer にて予想される size の band が認められた (Fig. 1a)。そこで、T4 polynucleotide kinase と γ -³²P-ATP にて標識した合成 primer を用い、PCR 産物

Fig. 1a) Ethidium bromide staining of PCR products. The expected length of the product between two primers was 140 base pairs. A single band (arrow) was found in lane 1 where anti-HCV antibody positive serum was analyzed. In contrast, no signal was identified at expected position in lane 2 where anti-HCV antibody negative serum was analyzed.

Fig. 1b) A portion of sequence ladder obtained by direct sequencing of PCR products. Nucleotides which were different from reported sequence by Houghton et al. were shown by asterisks.

を Sanger の方法^{7,8)}に準じて dideoxy nucleotide 溶液中で polymerase 反応を行い、8M urea/8% acrylamide gel に泳動後 autoradiography を行い塩基配列を決定した。その結果、1組の primer については HCV-RNA を特異的に増幅していると考えられ、これらの primer を用いて非 A 非 B 型慢性肝疾患患者から得られた血清12検体（抗 HCV 抗体陽性 7 検体、陰性 5 検体）を対象とし、HCV-RNA の検索を行った。

成績：予備実験にて得られた抗 HCV 抗体陽性血清よりの140bp の cDNA から、PCR、直接シーケンス

* 千葉大学第1内科

に用いられた primer の部分を除く100bpの塩基配列を決定することができた。その塩基配列をChiron社のものと比較してみると、100塩基中74塩基、すなわち74%のhomologyが認められた(Fig. 1b)。また、同部位をアミノ酸に翻訳して比較してみると、33アミノ酸中31アミノ酸、すなわち94%のhomologyが認められた。このことから、本法はHCV-RNAを特異的に増幅していると考えられた。Chiron社の塩基配列と異なっている26塩基中23塩基がアミノ酸のコドンの3番目であった。そのため、核酸のhomologyに比し、アミノ酸のhomologyが高率であったと考えられた。また非A非B型慢性肝疾患患者血清12検体を検索したところ、7検体に予想される約140bpのbandを検出し、その内訳は抗HCV抗体陽性7検体中5検体(71%)、陰性5検体中2検体(40%)であった。

考察：①PCR法を用いて抗HCV抗体陽性血清からHCV-RNAを検出し解析し得た。その結果、Chiron社の核酸の塩基配列とのhomologyは74%とかなりのvariationが認められ、このvirusのheterogeneityがうかがわれた。またこのことが、逆転写過程およびPCRにおけるprimerの選択や反応条件の設定を困難なものとしていたと考えられた。②この方法により、

慢性肝疾患患者の血清中からHCV-RNAを検出し得た。また、抗HCV抗体陰性血清からHCV-RNAが検出され、C型肝炎ウイルスが血中に存在しながら何らかの理由で充分量の抗体が産生されない場合があるということが判明した。すなわち、抗HCV抗体でのassay系ではウイルスに対する生体側の反応を検出しているわけであるが、この方法ではウイルス自体の存在を証明することができ、診断、治療、感染の予防に臨床応用が可能であると考えられた。

索引用語：C型肝炎ウイルス, Polymerase chain reaction (PCR), 抗HCV抗体

文 献：1) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al: Science 244: 359—362, 1989 2) Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al: Science 244: 362—364, 1989 3) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al: Science 239: 487—491, 1988 4) 横須賀収, 小俣政男, 多田稔, 他: 肝臓 30: 178—181, 1989 5) 横須賀収, 小俣政男, 大藤正雄: 肝臓 30: 596—597, 1989 6) Houghton M: International application published under the patent cooperation treaty (PCT): 1—242, 1989 7) Scharf S, Hoarn GT, Erlich HA: Science 233: 1076—1078, 1986 8) Wong C, Dowling CE, Saiki RK, et al: Nature 330: 384—386, 1987

Detection of hepatitis C virus RNA using polymerase chain reaction

Naoya KATO, Osamu YOKOSUKA, Masao OMATA, Kazuhiko HOSODA and Masao OHTO*

* First Department of Medicine, Chiba University School of Medicine (Chiba)