＜短 報＞

Competitive RT-PCR (CRT-PCR) 法による C 型肝炎

ウイルス量の測定とインターフェロン治療効果

加藤 直也 横須賀 収 小俣 政男 細田 和彦
 今関 文夫 田川まさみ 大藤 正雄*

近年, C型肝炎ウイルス (HCV) が同定され, HCV 抗体の測定系が開発された^{1,2)}. また, C型肝炎患者血清から, Reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いての HCV RNA の検出も可能となった³⁻⁵⁾. RT-PCR 法は, ごく微量の HCV RNA を増幅可能な優れた方法であるが, 定性的意味合いが強く, 検体中のウイルス量を明らかにするために定量的方法の確立が望まれた. そこで, 今回我々は, Competitive RT-PCR (CRT-PCR) 法⁶⁾を用いての HCV RNA の定量法を確立し, インターフェロン (以下 IFN) 超大量療法を施行した慢性 C型肝炎患者において, 治療直前の HCV RNA の定量を行い, 治療効果および肝生検組織所見との関連を検討したのでここに報告する.

対象と方法: 天然型 α IFN (住友製薬スミフェロン HLBI) の超大量療法 (108~1,008MU, 平均621MU) を施行した慢性 C型肝炎患者23例を対象とし, CRT-PCR 法を用いて, 治療直前の血清50 μ l 中の HCV RNA の定量を行った. まず, RT-PCR 法を応用し, 新たに EcoRI site を生じるような点突然変異を HCV の5'non-coding region⁷⁾の215bp の cDNA fragment の中央付近に導入⁸⁾し, これを pGEM-4z vector (Promega) に cloning し, T7 RNA polymerase を用いて, mutant RNA を作製した. そこで, この既知量の mutant RNA を用いて, RT-PCR 法の検出感度を決定した. 次に, 患者血清から抽出した未知の量の RNA と適当な希釈系列の既知の量の mutant RNA とを同一のチューブ内で RT-PCR を行い, 反応産物の一部を EcoRI にて消化し, acrylamide gel 中に泳動, ethidium bromide 染色し, gel 中にて分離した target cDNA (EcoRI にて消化されない) と mutant cDNA (EcoRI にて消化され二つの fragment となる) とを比

較し, 定量を行った. なお, PCR は nested PCR⁹⁾にて行った.

成績: RT-PCR 法での HCV RNA 検出限界は ethidium bromide 染色上, ウイルス5~10コピーであった. 慢性 C型肝炎患者23例の IFN 治療直前の HCV RNA の定量を行い, 治療効果, 肝生検組織所見との関連をみた (Table). 代表的症例の EcoRI で消化した PCR 産物の gel 電気泳動像 (ethidium bromide 染色) を Fig. に示した. ウイルス数は血清50 μ l 当り $10^4 \sim 10^7$ コピーと100万倍の開きがあった. 治療直前のウイルス数が 10^5 コピー以下の患者では, 11例中 9 例 (82%) に治療後の肝機能持続的正常化あるいは改善が認められたが, 10^5 コピーより多い患者では, 12例中 2

Table The relationship between the amount of HCV RNA and the effect of interferon treatment.

Patients	Copy number of HCV	Total dose of IFN	ALT after treatment	Histology of liver
# 1	10^4	1,008 MU	not changed	CPH
# 2	10^4	504	normalized	CPH
# 3	10^4	504	normalized	CPH
# 4	10^4	504	normalized	CPH
# 5	10^4	336	normalized	CPH
# 6	10^5	504	improved	LC
# 7	10^5	324	not changed	CAH IIa
# 8	10^5	504	normalized	CPH
# 9	10^5	336	normalized	CAH IIa
#10	10^5	1,008	normalized	CAH IIa
#11	10^5	1,008	normalized	CPH
#12	$10^5 \sim 10^6$	1,008	not changed	CPH
#13	$10^5 \sim 10^6$	738	normalized	CAH IIa
#14	10^6	336	not changed	CPH
#15	10^6	336	not changed	CAH IIb
#16	$10^6 \sim 10^7$	1,008	normalized	CAH IIb
#17	$10^6 \sim 10^7$	756	not changed	CAH IIa
#18	$10^6 \sim 10^7$	153	not changed	not done
#19	10^7	1,008	not changed	CPH
#20	10^7	774	not changed	LC
#21	10^7	756	not changed	CAH IIa
#22	10^7	756	not changed	CAH IIb
#23	10^7	108	not changed	CAH IIb

* 千葉大学第1内科

Fig. Ethidium bromide staining of EcoRI digested RT-PCR product. The RT-PCR product of HCV RNA obtained from the patient's serum, which was not digested with EcoRI, was observed at the length of 93 base pairs (bp). The RT-PCR product of mutant RNA was digested with EcoRI and was observed at the length of 56bp and 37bp. This patient's serum was appeared to contain 10^5 copies of HCV RNA

lane 1: containing 10^7 copies of mutant RNA, lane 2: 10^6 copies, lane 3: 10^5 copies, lane 4: 10^4 copies, lane 5: 10^3 copies, lane 6: 10^2 copies

例(17%)のみであった。また、肝生検組織所見と比較すると、CPH 10例では平均116万コピーとウイルス量が少なく、CAH IIa 6例では平均260万コピー、CAH IIb 4例では平均650万コピー、LC 2例では平均500万コピーと、病期が進展するに従いウイルス量は多くなる傾向を認めた。

考察：CRT-PCR法は、新たな制限酵素認識部位をもつ mutant RNA を competitive template として、目的とすると RNA と同一チューブ内で同じプライマーを用いて RT-PCR を行い(目的とする RNA と mutant RNA は同じ効率で逆転写、増幅される)、制

限酵素にて消化し、その比をみることにより RNA の定量を行う方法である。この方法の利点は、個々の実験、あるいは個々のチューブの反応効率のばらつきに左右されにくく、また competitive template として RNA を用いているので、逆転写反応の効率にも左右されず、比較的簡便に正確な定量が行える点にある。

慢性 C 型肝炎に対し、IFN 治療は有効であると考えられているが、その投与方法に関してはいまだ確立しておらず、種々の投与方法が検討されている⁹⁾。今回、我々は IFN 投与直前のウイルス量の定量を行い、治療効果がウイルス量と非常に良く相関することを明らかにした。このことから、今後は、ウイルス量に応じた治療が必要になると考えられた。すなわち、治療前にウイルス量を定量することにより、IFN の適切な投与量、投与方法が決定され、効率良く治療を行う展望が開けた。

索引用語：C型肝炎ウイルス、HCV RNA 定量、competitive RT-PCR 法

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) Weiner AJ, Kuo G, Bradely DW, et al: Lancet 335: 1—3, 1990 4) Garson JA, Tedder RS, Briggs M, et al: Lancet 335: 1419—1422, 1990 5) Kato N, Yokosuka O, Omata M, et al: J Clin Invest 86: 1764—1767, 1990 6) Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, et al: Proc Natl Acad Sci USA 87: 2725—2729, 1990 7) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, et al: Japan J Exp Med 60: 167—177, 1990 8) Higuchi R, Krummel B, Saiki RK: Nucleic Acids Res 16: 7351—7367, 1988 9) 小俣政男, 横須賀収, 伊藤よしみ, 他: 日消誌 87: 1430—1435, 1990

The relationship between the amount of hepatitis C virus quantified by competitive RT-PCR (CRT-PCR) and the effect of interferon treatment

Naoya KATO, Osamu YOKOSUKA, Masao OMATA, Kazuhiko HOSOSA, Fumio IMAZEKI, Masami TAGAWA and Masao OHTO*

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