HGV 特異的 RT-nested PCR の確立

新妻 宏文 石井 元康 小林 智夫
鈴木 千晶 小林 光樹 豊田 隆謙*

要 旨: 近年, 7 番目の肝炎ウイルスとして GBV-C あるいは HGV が同定された。その検出法として Simons JN らは RT-nested PCR や RT-single PCR の後サザンハイブリダイゼーションを行う方法を用いているが, RT-nested PCR は HGV に特異的ではなく, HCV の geno-type 2a にも交差反応を示すことが判明した。そこで, HGV のシーケンスの結果より HGV 特異的と考えられるプライマーを設定し, HGV 特異的な RT-nested PCR の系を確立した。この系は HGV に特異的で, ラジオアイソトープを必要としない有用な方法と考えられた。

索引用語: HGV RT-nested PCR プライマー

緒 言

1995年4月に Simons JN らにより, HCV 近縁の肝炎ウイルスとして GBV-A 及び GBV-B が報告された^{1,2)}。しかしその後の検討により, GBV-A および GBV-B はサル (tamarin) 由来のウイルスであると考えられるようになってきている³⁻⁵⁾。ヒトの肝炎ウイルスとしては, 1995年6月 Simons JN らにより GBV-C の部分的シーケンスが発表され⁶⁾、1996年1月 Linnen J らにより HGV の全シーケンスが発表され⁷⁾、GBV-C と HGV は同一のウイルスであると考えられている (以下 HGV として用語を統一する)。

HGV の検出法として Simons JN らおよび Linnen J らは, いくつかの系を記載している。これらの系の大半は RT-single PCR の後, ラジオアイソトープ (RI) を用いたサザンハイブリダイゼーションを行う方法であり^{6,7)}、特異性の検討された RT-nested PCR の系の報告はない。HGV の近縁ウイルスである HCV の検出方法としては RT-nested PCR が普及しており⁸⁾、HGV の検出法としても, RI を必要とせずかつ簡便な RT-nested PCR 系の開発が期待される。また, HGV は HCV の近縁ウイルスであり, 感染経路も HCV 同様に血液媒介感染で, HGV と HCV の重感染例も多いと想定されるため⁷⁾、検出系が HCV と交差反応をしないことを確認することが重要である。そこで今回我々は, HCV と交差反応をしない, HGV を特異的に

検出する RT-nested PCR の系を確立したので報告する。

対象および方法

1. 対象

Simons JN らが報告した下記の RT-nested PCR の系 (1st PCR プライマー: ns3.2-s1, ns3.2-a2; 2nd PCR プライマー: GB-C-s1, GB-C-a1)⁶⁾にて HGV-RNA 陽性とされた症例14例 (全例 HBs 抗原陰性) を対象とした。症例の背景を Table に示す。HCVAb, HBsAg, HBsAb, HBcAb は ELISA (ダイナボット社製 IMx ELISA キット) で測定した。HCV-RNA, HBV-DNA は既報のごとく検出した^{9,10)}。

2. RNA の抽出・cDNA の合成

血清200μl よりプロテインナーゼ K で蛋白を消化後, フェノール/クロロホルム法にて RNA を抽出し, エタノール沈澱にてペレットを得た。ペレットを Tris-EDTA に溶解し, その1/10量と anti-sense primer, 逆転写酵素 RAV-2™ (タカラ) を用いて, 既報のごとく cDNA を合成した⁹⁾。

3. 原著⁶⁾に基づく RT-PCR

Simons JN らの報告した ns3.2-s1 と ns3.2-a2 を 1st PCR に, GB-C-s1 と GB-C-a1 を 2nd PCR に用いて Nested PCR を行った。PCR の温度条件は, Simons JN らの論文⁶⁾では 2nd PCR を 'touchdown' thermocycling protocol で行ったと記載されている。PCR のア

Hirofumi NIITSUMA, Motoyasu ISHII, Tomoo KOBAYASHI, Chiaki SUZUKI, Koju KOBAYASHI and Takayoshi TOYOTA*

*東北大学医学部第3内科

＜受付日1996年6月4日＞

Table Patient profiles.

No.	Sex	Age	HCVAb	HCV-RNA	HBsAg	HBsAb	HBcAb	HBV-DNA	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
1*	M	59	+	-	-	+	+	-	20	19
2	M	52	+	+	-	-	-	-	51	120
3	M	42	+	+	-	+	+	-	51	111
4	M	27	+	+	-	-	-	-	26	56
5	M	57	+	+	-	+	+	-	18	26
6	M	29	+	+	-	+	+	-	83	183
7	M	34	+	+	-	-	+	-	114	228
8	M	48	+	+	-	+	+	-	17	17
9	F	43	+	+	-	+	+	-	85	128
10	M	59	+	+	-	-	-	-	28	44
11	F	25	+	+	-	-	-	-	26	25
12	F	64	+	+	-	+	+	-	120	127
13	M	36	+	+	-	-	-	-	43	106
14	M	38	+	+	-	-	-	-	19	27

*This patient had been treated for chronic hepatitis C with interferon α .

ニーリング温度を50°Cから65°Cの間で一定,あるいは種々の'touchdown' thermocycling protocolを用いて最適条件を検討したところ, 55°C 1分で一定としたときに最も増幅効率が良かったので, これを採用した. 熱変性は93°C 1分, 伸長は74°C 1分で1st PCRは35サイクル, 2nd PCRは30サイクル行った. 反応液組成等については既報の如くである^{10,11)}.

4. シークエンス

PCR産物ダイレクトシークエンス法にて塩基配列の決定を行った. 蛍光オーオシークエンサー(model 373A, Applied Biosystems Japan)を用い, 試薬はTaq Dye Deoxy Terminator Sequencing キット(Applied Biosystems Japan)を, シークエンスプライマーは上記のGB-C-s1とGB-C-a1を用いて, 5'側と3'側の両方からシークエンスを行った.

5. 系統樹解析

系統樹解析には遺伝子解析プログラムGENETYX-MAC 7.3 (ソフトウェア開発)のUPGMA法¹²⁾を用いた. 今回塩基配列の比較のために用いた既報のシークエンスは次の通り. HGVの3クローン(クローン名, Genbank accession No.: HGU44402; U44402; HGU45966, U45966; HG25538, U25538)およびHCVの各genotypeの代表的なクローン(genotype, クローン名, Genbank accession No.: 1a, HPCPLYPR, M62321; 1b, HPCJ483, D13558; 1c, HPCP1, D14853; 2a, HPCPOLP, D00944; 2b, HPCJ8G; D10988; 3a, HPCCGPA, D17763, 3b, HPCHCVTR1, D49374).

6. HGV 特異的 RT-PCR

プライマーはSimons JNらの報告したGB-C-s1とGB-C-a1⁹⁾を1st PCRに用いたが, 2nd PCRにはHGVのシークエンスの検討よりHGV特異的と考えられるGB-C-s2 (nt. 4280-4299, 5'-TGGGCATGGCATMCCCCTGG-3')とGB-C-a2 (nt. 4427-4447, 5'-ACSAGGTCCCCRTCYTTGATG-3')を新たに設定した(HGVに関する塩基番号は, 現在genbankに登録されている最長のシークエンスHGU44402, accession No. U44402による. また塩基配列の略号はIUPACの表記による.). PCRの条件は熱変性は93°C 1分, アニーリングは55°C 1分, 伸長は74°C 1分で, 1st PCRは35サイクル, 2nd PCRは30サイクル行った.

成 績

原著⁶⁾に基づいて行ったRT-nested PCRにより陽性バンドが検出された14例のシークエンスの結果をFig. 1に示す. 14例中5例はプライマーで挟まれて増幅された配列がHGV (HG25538)と同じく199bpであったが, 9例では202bpであった.

この9例のクローンがウイルス学的にどのウイルスのどのgenotypeに属するかを明らかにするために, HGV (HG25538)及びHCVの各genotypeの代表的なクローンと今回シークエンスしたクローンの分子系統樹を作成した. PCR産物が199bpである5例のクローンは全てHGVと近縁関係を示し, 202bpである9例のクローンは全てHCVのgenotype 2aと近縁関係を示した (Fig. 2).

	ns3.2-s1	GB-C-s1	GB-C-s2
sense sequence	GCIACIGCIACNCCNCCNGG	GACGTTGGTGAGATCCCTTT	TGGGCATGGCATMCCCTGG
HGU44402 (HGV)	...c...t...a...t...c...	...G...C...T...	...A...a...C...
HGU45966 (HGV)	...c...t...c...g...t...t...	...T...G...T...	...a...C...
HG25538 (HGV)			...T...c...C...
Pt.1			...a...
Pt.2			...a...
Pt.3			...a...T...
Pt.4			...T...
Pt.5			...T...T...
HPCPLYPR (HCV-1a)	...c...c...c...t...g...	AC...ACC...A...T...	C...CA...G...CT...c...C...
HPCJ483 (HCV-1b)	...c...c...t...a...t...g...	A...AA...A...	...CA...A...C...A...T...
HPCP1 (HCV-1c)	...c...c...t...a...a...t...	ACT...AG...G...A...A...	...TA...G...C...c...AA...
HPCPOLP (HCV-2a)	...t...g...t...g...c...c...	C...G...AG...	...AGG...CG...T...T...
HPCJ8G (HCV-2b)	...c...a...c...g...t...c...	C...AG...C...T...	...CA...A...CT...T...A...
HPCCGPA (HCV-3a)	...g...a...a...t...c...a...	TCT...AA...	C...TA...G...CT...a...GA...A...
HPCHCVTR1 (HCV-3b)	...a...c...g...c...t...c...	AGT...AC...A...A...	...CA...A...C...c...A...
	GB-C-a2	GB-C-a1	ns3.2-a2
sense sequence	CATCAARGAIGGGACCTSGT	GGGTACACAGGAACCTTCG	YYTDGAYCCNACIITIACCAT
HGU44402 (HGV)	...g...t...g...	...T...T...T...	cc...t...t...c...ca...t...
HGU45966 (HGV)	...g...c...A...T...g...	...A...T...G...	cc...t...t...c...ca...t...
HG25538 (HGV)	...a...c...A...g...		
Pt.1	...a...t...A...T...		
Pt.2	...g...t...c...		
Pt.3	...T...g...t...T...c...		
Pt.4	...a...t...c...		
Pt.5	...g...t...c...		
HPCPLYPR (HCV-1a)	...CCA...CC...Gc...C...TG...T...	...C...T...C...CG...	cc...t...c...t...ct...c...
HPCJ483 (HCV-1b)	...ACCACCT...Tc...A...G...c...C...	...T...TT...C...CG...T...T...	ct...g...t...c...ct...c...
HPCP1 (HCV-1c)	...CCA...CCACA...A...G...c...	...C...C...C...CG...T...	cc...a...c...t...at...ct...T...
HPCPOLP (HCV-2a)	...ACCA...CTC...G...A...G...A...	...TT...T...G...T...	ct...g...c...c...at...c...
HPCJ8G (HCV-2b)	...ACCA...CTC...A...A...G...g...	...C...CG...T...	cc...a...c...a...ct...c...
HPCCGPA (HCV-3a)	...ACCA...CaACA...A...G...c...	...A...T...C...GG...	cc...g...c...c...ct...tT...
HPCHCVTR1 (HCV-3b)	...ACCTGTaTc...A...G...c...	...A...T...GG...T...T...	tc...a...c...c...tt...ct...
anti-sense sequence	GTAGTTCTRCCTGGASCA	CCCATGTGTCTTTGAAGC	RRAHCTRGGNTGIIAITGGTA

Fig. 3 Homology of nucleotide sequences between the primers used in this study and the HCV and HGV clones. Dots indicate conserved nucleotides. Large and small letters indicate nucleotides mismatched and matched, respectively, to the primer nucleotide.

Fig. 4 Results of nested PCR with the primers GB-C s1/GB-C-a1 and GB-C-s2/GB-C-a2. PCR product was stained with ethidium bromide and photographed under UV light.

考 察

HGV の検出方法はいくつか報告がなされているが、特異性が確認された RT-nested PCR の系はない。Simons JN らが報告したプライマー-ns3.2-s1, ns3.2-a1 および GB-C-s1, GB-C-a1 を用いた方法で増幅され

た DNA をシーケンスし、系統樹解析したところ、HCV の genotype 2a が交差反応することが明らかになった。従って、この方法は HGV 特異的とは言えず、HGV 特異的検出系としては利用できないことが明らかになった。

今回、我々はNS3領域にプライマーを設定した。この領域にはヘリカーゼなどがコードされていると考えられており^{13,14)}、HCVのgenotype間では5'UTRとコア領域に次いで相同性が高い領域であり、フラビウイルス間では最も相同性が高い領域である^{15,16)}。従って、NS3領域にプライマーを設定することにより感度は向上するが、特異性が問題となる。そこでHGV間では保存されているがHCVとは大きく異なる塩基配列を持つ領域をプライマーに選ぶ必要が出てくる。特にプライマー部位に着目してHGVとHCVの各genotypeの塩基配列を比較すると、ns3.2-s1とns3.2-a2はHCVとHGVの双方に相同性が高くHGVに特異的ではないことが判る (Fig. 3)。一方、GB-C-s1とGB-C-a1は比較的HGVに特異性が高いと考えられた (Fig. 3) ので、これを1st PCRのプライマーとして用いた。2nd PCRのプライマー設定に当たっては、HCVとHGVを比較したときに3bpの長さの差となる欠失を挟むプライマーGB-C-a2を片側に設定し、もう一方に比較的HGVに特異性が高いと考えられるプライマーGB-C-s2を設定した (Fig. 3)。

こうして設定したプライマーを用いて行ったRT-PCRの結果 (Fig. 4) は、塩基配列の系統樹解析によりHGVあるいはHCVに属すると判定した結果と一致しており、今回設定したRT-PCRの特異性が確認された。

今後HGVの全長のシーケンスが多数行われることにより、HGVにおいて最も相同性が高い領域が明らかになり、最適なプライマーについての知見が得られると考えられるが、我々がプライマーを設定した部位は、現在までに報告されているHGV株で十分に保持されており、このプライマーが感度・特異性の両面で実用性があると考えられる。

結 語

今回の検討によりHGV特異的なRT-PCRの系が確立された。この系はHGVに特異的な点、ラジオアイソトープを必要とせず簡便な点で有用であると考えられた。

文 献

- 1) Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, et al: Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3401—3405, 1995
- 2) Zuckerman AJ: The new GB hepatitis viruses. *Lancet* 345: 1453—1454, 1995
- 3) Schlauder GG, Dawson GJ, Simons JN, et al: Molecular and serologic analysis in the transmission of the GB hepatitis agents. *J Med Virol* 46: 81—90, 1995
- 4) Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, et al: Genomic organization of GB viruses A and B: Two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* 69: 5621—5630, 1995
- 5) Schlauder GG, Pilot-Matias TJ, Gabriel GS, et al: Origin of GB-hepatitis viruses. *Lancet* 346: 447—448, 1995
- 6) Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, et al: Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1: 564—569, 1995
- 7) Linnen J, Wages J, Zhang-Keck ZY, et al: Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent. *Science* 271: 505—508, 1996
- 8) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, et al: Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5'-noncoding region. *Jpn J Exp Med* 60: 215—222, 1990
- 9) Saitoh Y, Miura M, Niitsuma H, et al: Changes of serum hepatitis C virus levels in patients with chronic hepatitis C treated with two courses of interferon administration. *Tohoku J Exp Med* 173: 361—369, 1994
- 10) Niitsuma H, Ishii M, Saitoh Y, et al: Prevalence of precore-defective mutant of hepatitis B virus in HBV carriers. *J Med Virol* 46: 397—402, 1995
- 11) Niitsuma H, Ishii M, Miura M, et al: Detection of HBV precore mutation by PCR-RFLP. *Nippon Rinsho* 53 (Suppl): 316—320, 1995
- 12) Nei M: Molecular population genetics and evolution, North-Holland, Amsterdam, 1975
- 13) Kanai A, Tanabe K, Kohara M: Poly (U) binding activity of hepatitis C virus NS3 protein, a putative RNA helicase. *FEBS Lett* 376: 221—224, 1995
- 14) Kim DW, Gwack Y, Han JH, et al: C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem*

- Biophys Res Commun 215 : 160—166, 1995
- 15) Shukla DD, Hoyne PA, Ward CW : Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. Arch Virol 140 : 1747—1761, 1995
- 16) 森 千里, 岡山博人 : C 型肝炎ウイルス遺伝子の構造. 「最新アプローチ, C 型肝炎, HCV 解明から IFN 療法の実際」, 服部 信, 野本明男, 小俣政男編, メジカルビュー社, 東京, 1994, p22—28

Development of RT-nested PCR for specific detection of hepatitis G virus

Hirofumi NIITSUMA, Motoyasu ISHII, Tomoo KOBAYASHI, Chiaki SUZUKI,
Koju KOBAYASHI and Takayoshi TOYOTA*

A newly discovered hepatitis virus termed GBV-C or HGV was isolated from patients with chronic non-A, non-B, non-C hepatitis. Since the nonstructural region 3 of the genome of GBV-C virus has been sequenced, Simons et al, have developed a method for detecting this virus with the polymerase chain reaction plus Southern blot hybridization with a probe specific for this region. We found the primers they used reacted also with HCV genotype 2a. Since full-length genome of HGV, which is supposedly the same virus as GBV-C, has also been sequenced recently, we constructed primers specifically hybridizing to HGV. Using these primers, all 5 patients infected with HGV showed positive and 9 patients infected with HCV genotype 2a showed negative. These results prove the primers constructed in this study are specific for the detection of HGV without supplementation of Southern blot hybridization.

* Third Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine (Sendai)