〔シンポジウム：遺伝子検査における新しい分析技術の応用〕

インターカレーター性色素を用いた特定遺伝子の
ホモジニアス測定法

——HCV RNA の検出と定量——

石 黒 敬 彦

SUMMARY

We demonstrated the application of IM-PCR, intercalation monitoring PCR, to quantify HCV RNA of serum samples from patients with chronic hepatitis C by performing PCR in the presence of oxazole yellow derivative, a fluorescent DNA intercalative dye, and monitoring the fluorescence intensity of the PCR reaction mixture in the course of PCR cycles. The assay gave the efficient and reproducible results in clinically useful dynamic range below 10^{-6} copies of HCV RNA for interferon therapy. We also reported here our novel fluorescent DNA probe, oxazole yellow (YO)-linked oligonucleotide complementary to a target DNA/RNA, which can enhance the fluorescence on hybridizing with a target nucleotide and its applicability to construct an assay of a sequence specific homogeneous detection of HCV RNA in clinical samples in conjunction with RT-PCR.

Key words: IM-PCR, HCV RNA, RT-PCR, intercalator, fluorescence.

はじめに

DNA は、相補的な塩基同士で結合し、2本鎖を形成して安定化しようとする性質を有する。そこで、その高い特異的な認識能力を細菌やウイルスの臨床検査へ応用しようという試みがなされてきた。とくに、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法の登場は、従来は高感度なイムノアッセイをもってしても容易ではなかった HIV や HCV など血液試料中の微量なウイルスそのものの検査をより身近なものとした。

これまで、増幅産物の分析にはビーズや膜などの固相を用いたハイブリダイゼーション法あるいは電気泳動や HPLC などの分離分析手段を用いる方式が一般的であった。しかし、臨床検査の現場において多数の

検体を処理するには、これらの方法は操作が煩雑で時間もかかり、また反応液の容器からの移し換えも避けられないことから、増幅産物の飛散に由来する偽陽性の発生にも十分な留意が求められる。

オキサゾールイエロー (以後 YO と略す)、チアゾールオレンジ、エチジウムブロマイドなどのインターカレーター性色素は、2本鎖核酸と結合すると顕著な蛍光増感を示すことが知られている。われわれはこの性質を利用した分離分析の全く不要な均一測定法の開発に注力してきた。標的核酸を広いダイナミックレンジで定量するインターカレーション・モニタリング PCR 法 (IM-PCR 法) を提案¹⁾、慢性 C 型肝炎患者の経過観察へ応用した結果、臨床的に有効な手段のひとつとなり得ることを見出した^{2,3)}。

Homogeneous assay of nucleic acid sequences by the fluorescence activation of DNA intercalator —Its application to HCV monitoring in IFN therapy—

Takahiko Ishiguro; 東ソー株式会社東京研究所

Correspondence address: Takahiko Ishiguro, TOSOH Corporation, Tokyo Research Laboratories, 2743-1, Haya-kawa, Ayase 252, Japan.

第 47 回日本電気泳動学会春季大会・シンポジウム

しかし、インターカレーターそのものは核酸配列を識別することができないことから、IM-PCR 法ではプライマーダイマーのような PCR による非特異的増幅産物の生成によっても蛍光が生じ、HIV など極微量のウイルスの感染の有無を問題にするには必ずしも信頼できる方法とはいえなかった。そこで、われわれは、標的配列と相補結合を形成することによって顕著な蛍光増感を与える新規な DNA プローブ（発蛍光プローブ）を開発し⁴⁾、これを用いた配列特異的で高感度なホモニアス検出法を構築した。

本稿では IM-PCR 法を慢性 C 型肝炎患者の経過観察へ応用した結果について報告する。また、発蛍光プローブについてその基本性質ならびにこれを用いた配列特異的で高感度なホモニアス検出法についてあわせて報告する。

定量法としての IM-PCR 法

インターカレーター性色素は 2 本鎖 DNA に結合して蛍光を発する性質をもつ。この色素の共存下で PCR を行うと、反応液は増幅された PCR 産物量に応じて蛍光を発する¹⁻³⁾。

図 1 には、専用測定機「PCR モニター」¹⁻³⁾によって PCR サイクルごとの反応液の蛍光強度を経時的に測定した結果を示した。これから、PCR による核酸増幅が、初期コピー数に応じた一定のサイクルにおいて指数関数的増幅から線形的な増幅へと移行し、全体

としてはロジステックス関数でよく近似できることがわかる。そこで、IM-PCR では、この線形的増幅域において蛍光強度が特定の値に達するサイクル数（遷移サイクル数）を実験的に求め、標準物質での測定値を基準として標的核酸の初期量を算出する。

図 2 A には、HCV RNA 標準試料について、得ら

図 1. HCV RNA 標準試料を測定した場合の蛍光強度の経時変化。

インデックス値は標準 HCV RNA の初期分子数の対数値に相当する（インデックス値 1, 2, 3, 4 および 5 は 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 および 10^5 コピーに相当する）。蛍光強度が特定の値（破線）に達するサイクル数を遷移サイクル数と設定した。

図 2. HCV RNA 濃度と遷移サイクル数より作成した検量線。

(A) HCV RNA 標準試料を測定した場合の蛍光強度プロファイルより算出した遷移サイクル数に対する HCV RNA 濃度をプロットした。(B) HCV RNA 標準試料を 10 重測定した場合の平均値および標準偏差の 3 倍の範囲を示した。

図3. IFN療法における血清中HCV RNA量のモニター結果。

Group AはIFN療法終了後少なくとも3カ月間低値（インデックス値2.7未満）を示した症例，Group BはIFN療法終了後インデックス値が2.7以上に上昇した症例，Group CはIFN療法中も低値への移行が認められなかった症例。（A）IFN療法前のHCV RNAインデックス値，（B）IFN療法開始1週間後におけるHCV RNAインデックス値。

れた遷移サイクル数を初期コピー数の対数に対して図示した。一旦この直線が得られると、これを検量線として未知試料の遷移サイクル数の測定結果からHCV RNAの初期コピー数（インデックス値：標準RNA分子数の対数値に相当）が算出できる。この例から、インデックス値2～6と広い範囲で良好な再現性で定量が可能であることがわかる。慢性C型肝炎患者検体を用いた場合も、競合RT-PCR法およびマルチサイクリックRT-PCR法による結果と良好な相関を示した¹⁾。

そこで、IFN療法を行った慢性C型肝炎患者について、療法前、療法中および療法後の血清中HCV RNA量のモニターにIM-PCR法を応用した。治療期間中のHCV RNA量の推移を、療法後の測定結果によってグループ化すると（図3）、IFN療法前にインデックス値4.5未満を示した症例のうち療法開始後1週間で低値（インデックス値2.7未満）を示したものは療法終了後も長期にわたって低値を維持する傾向が認められるのに対し、一方IFN療法前にインデックス値が4.5以上の症例では、療法終了後も再上昇の傾向が認められた。引き続き今後の研究が必要ではあるが、これらの結果から、血清中HCV RNA量がIFN療法前に4.5未満でさらに療法開始後1週間で低値へ移行する場合は、多くの場合においてIFN療法が有効であると推察される。

このように、IFN療法では治療効果の予測や判断

に療法前および療法開始後早期での血清中HCV RNA量のモニターが有用であるが、IM-PCR法は数百コピーから数百万コピーにわたる広い範囲での定量を可能とし投与計画立案の目的には有効な手段のひとつと考えられる。

以上のように、IM-PCR法は、ホモジニアス系の1段階の測定方法で、通常のPCR実施後の産物の分離分析が全く不要であるという特長をもつ。このことは、とくに、1バッチの検体を大幅に増やす必要がある場合には、PCRに要する以外の処理時間を必要としないことから、顕著な処理能力の向上に結びつく。また、PCR後の増幅産物の分析のために試料を容器から取り出す必要がないことから、PCR産物の飛散に由来する汚染を回避することも可能となる。

配列特異的検出と発光プローブ

IM-PCR法は、慢性C型肝炎患者の経過観察への応用にみたように広いダイナミックレンジでの標的核酸の定量を可能とする優れた定量法ではあるが、HIVなど極微量のウイルスの感染の有無を問題にするにはインターカレーターそのものが核酸配列を識別することができないことから、プライマーダイマーのようなPCRによる非特異的増幅産物の生成によっては結果に偽陽性を与え、原理的に必ずしも信頼できる方法とはいえない。

そこで、われわれは、標的配列と相補結合を形成す

図 4. 発蛍光プローブの構造と蛍光スペクトル.

(A)発蛍光プローブの構造. (B)(dT) 30 mer, (dA) 30 mer, 組み換え体 HCV RNA の共存下での YO-(dA) 13 の蛍光スペクトル. (dT) 30 mer, (dA) 30 mer および組み換え体 HCV RNA のそれぞれについて, 40 mM Tris・HCl (pH 8.0), 5 mM DTT, 8 mM MgCl₂, 50 μg/ml BSA, 5 nM YO-(dA) 13 の 5 nM 溶液を調製し, 蛍光分光光度計 (日本分光株式会社製, FP-777 型) にて測定した (励起波長 490 nm/HW 5 nm/室温).

ることによって顕著な蛍光増感を与える新規な DNA プローブ (発蛍光プローブ) を開発し, これを用いた配列特異的で高感度なホモジニアス検出法を構築した.

発蛍光プローブはオキサゾールイエローが DNA 鎖のリン酸ジエステル結合にリンカーを介して修飾された構造をもつ (図 4 A)⁴⁾. その特長は相補的核酸と結合することによって顕著な蛍光増感を与えることである. 図 4 B には YO-(dA) 13 と各種 1 本鎖核酸を混合した場合の蛍光スペクトルを示した. 非相補的な (dA) 30 mer および組み換え体 HCV RNA 共存下では蛍光増加は認められないが, 相補的な (dT) 30 mer 共存下では顕著な蛍光増加が認められた. 発蛍光プローブは従来の蛍光標識プローブとは異なり, 標的核酸と配列特異的に結合することによって蛍光増感を与え, 複合体の形成に寄与しなかった余剰プローブを反応液から分離除去する必要のないホモジニアス分析を可能とする新規な DNA プローブといえる.

in vitro 転写蛍光モニタリングによる HCV RNA の検出

そこで, RT-PCR によって末端にプロモーター領域を具備した増幅産物を合成し, 発蛍光プローブ存在下で *in vitro* 転写を行い, 反応液の蛍光強度から標的核酸を検出する方法について検討した.

図 5 にはその原理を示した. SP 6 プロモーター配列をもったプライマーを用いて RT-PCR を行う. これによって, SP 6 プロモーターを含む PCR 産物が得られる. 得られた PCR 産物に発蛍光プローブおよび SP 6 RNA ポリメラーゼを添加し, RNA ポリメラーゼの至適温度でインキュベーションを行う. この *in vitro* 転写反応によって生成した RNA に発蛍光プローブが結合し蛍光増感を与える. 反応液の蛍光強度を経時的に測定することによって試料中の HCV RNA の有無が判定できる.

図 6 A には, HCV RNA 標準試料での *in vitro* 転

図5. 発蛍光プローブによる HCV RNA のホモジニアス検出の原理。

写蛍光モニタリングの結果を示した。試料中に HCV RNA が存在しない場合は、30 分間の転写反応をもって反応液の蛍光強度には変化が認められなかったが、標的 RNA が存在した場合は有意な蛍光強度の増大が認められ、その変化量は PCR 産物量によく相関した (図 6 B)。これは、蛍光強度の経時変化が転写産物の生成過程を特異的かつ定量的に反映していることを示している。

各種濃度の検体での蛍光増加を図 7 に示した。陰性試料での蛍光増加の平均値にその標準偏差の 3 倍を加えた値を判定基準値とすると、10 μ l 中 10 コピー以上の組み換え体 HCV RNA では検出率 100 % を、5 コピーにおいても 87.5 % の検出率を与えた。血清検体においても 10 コピーの HCV RNA の検出が可能であった。

PCR 産物の分析には通常ハイブリダイゼーション法が用いられるが、余剰プローブの除去など煩雑な操作を必要とし、多数の検体の処理が求められる臨床検査の現場での適用には必ずしも容易な方法とはいえない。

い。本法では、PCR 後、反応液に 1 試薬を添加し一定時間の蛍光測定を行い、その蛍光強度の経時的な測定結果から試料中の標的核酸の有無を判定する。本法は、IM-PCR 法と同様に PCR 後の分離分析はいっさい行わないが 10 コピーの標的核酸の検出が可能で、今後定量法としての IM-PCR 法と組み合わせることによって臨床的にも有効な測定法となり得るものと考えられる。

HCV RNA のタイピングへの応用

相補結合の安定性は温度に依存し、その融解温度の測定から核酸配列の相同性を評価することが古くから行われている。発蛍光プローブは相補鎖と複合体を形成し、その量に応じて反応液の蛍光強度が変化することから、蛍光強度の温度依存性から標的核酸のプローブ配列に対する相補性の差異に関する情報が得られる。さらに、初期量の影響を無視できる特定の温度での蛍光強度は、複合体の安定性を反映していると考えられることから、プローブ配列を指標に各標的核酸配

図6. 発蛍光プローブによる HCV RNA のホモジニアス検出.

(A)発蛍光プローブによる転写反応の蛍光モニター. RT-PCR への試料量は 10 μ l とし, それぞれは 50, 10, 5 および 0 コピーの HCV RNA を含む. プライマー R: 5'-GCACTCGCAAGCACCTATCA-3'/HCV cDNA の塩基番号⁹⁾ 282~302 に相補的, SP 6 プロモータープライマー: 5'-ATTTAGGT-GACACTATAGAATACAACACTCCACCATAGATCACTCCCTG-3' / SP 6 プロモーター配列の下流に HCV cDNA の塩基番号 11~35 の配列⁹⁾ が隣接. 発蛍光プローブ YO-271 の 1~11 番目の塩基が HCV cDNA の塩基番号 223~233 に相補的⁹⁾. (B) 蛍光モニター結果と RT-PCR 産物量の相関. 転写反応 30 分間の蛍光モニタリングによって得られた蛍光増加とアガロース・ゲル電気泳動後デンストメーターで定量した RT-PCR 産物量の相関を示した.

列の相同性を評価することも可能となる.

そこで, 慢性 C 型肝炎患者の III 型⁹⁾ 血清 5 検体, II 型⁹⁾ III 型重感染血清 3 検体および II 型血清 3 検体を用いて, *in vitro* 転写蛍光モニタリングの HCV RNA タイピングへの応用を検討した.

一般的には血清検体中の HCV RNA の初期量はあらかじめ不明である. したがって, 蛍光強度の差からタイプを識別するには, 蛍光強度への初期量の影響が小さい温度をまず決定しておく必要がある. II 型および III 型の典型例である No. 5 と No. 9 の各 PCR 産物について, 転写反応後, 各反応液の蛍光強度の温度依存性を調べた. 65°C においても II 型は有意な発光強度を維持しているが, III 型ではその転写 RNA とプローブとの複合体はほぼ完全に解離していることを示した. そこで, 5' 末端に RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を有するプライマーを用いて RT-PCR を行った後, 発蛍光プローブの存在下でインキュベーション

を行い, 30 分後に 65°C で反応液の蛍光強度を測定した (図 8). II 型および II 型 III 型重感染では全てにおいて有意な蛍光増加が認められた.

II 型 HCV RNA の配列に比較して, III 型ではプローブに対してさらに一塩基のミスマッチングを有するが, 本法はこの配列上の一塩基の置換も検出し優れた特異性を有することを示した.

結 論

IM-PCR 法を慢性 C 型肝炎に対する IFN 療法の経過観察に適用し, IFN 療法前の HCV RNA の定量や療法開始後ごく早期における HCV RNA 量のモニターが IFN 治療効果の判定に有効であることが示唆された. IM-PCR 法は, PCR 後の分離分析操作をいっさい必要とせず, 広いダイナミックレンジで試料中の標的核酸量を決定することができることから, 今後慢性 C 型肝炎患者の治療方針の決定および治療経過

図7. 発蛍光プローブによる HCV RNA のホモジニアス検出法の検出下限界。

(A) HCV RNA の検出下限界。RT-PCR への試料量は 10 μ l とし、それぞれは 50, 10, 5, 1 および 0 コピーの HCV RNA を含む。(B) 慢性 C 型肝炎患者血清希釈列の測定。血清 100 μ l から核酸抽出を行い (東ソー核酸抽出キット: Extragen), 得られた核酸沈殿物に検体希釈液 12 μ l を添加し、溶解後の 10 μ l を RT-PCR に用いた。

図8. 蛍光測定による C 型肝炎患者血清のタイプング。

血清 200 μ l から核酸抽出を行い (東ソー核酸抽出キット: Extragen), 得られた核酸沈殿物に検体希釈液 40 μ l を添加し、溶解後の 10 μ l を RT-PCR に用いた。YO-271 存在下 *in vitro* 転写後、反応液を蛍光分光光度計内で 65°C に加温し、蛍光強度 (励起波長 490 nm, 蛍光波長 510 nm) を測定した。65°C における YO-271 のみの測定値を差し引いた値を示した。

の観察に有力な方法となりうる事が期待される。一方、新規 DNA プローブ「発蛍光プローブ」と *in vitro* 転写を組み合わせた PCR 産物の検出法は高感度 (10 コピーの HCV RNA の検出が可能) で、1 塩基置換の検出も可能であった。本法によれば PCR 反応液に発蛍光プローブと RNA ポリメラーゼを添加しその蛍光強度を測定するだけで微量の標的核酸の有無を判定することが可能で、自動化も容易であることから、今後、定量法としての IM-PCR 法に発蛍光プローブによる判定法を組み合わせることによって、より信頼性の高い臨床的にも有効な測定法となるものと考えられる。

文 献

- 1) Ishiguro T, Saitoh J, Yawata H, Yamagishi H, Iwasaki S, Mitoma Y. Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalator. *Anal Biochem* 1995; 229: 207-13.
- 2) 石黒敬彦. IM-PCR (インターカレーションモニタリング PCR) 一定量 PCR の新しい方向. 医学のあゆみ 1995; 173: 959-63.
- 3) 石黒敬彦, 斎藤寿一. IM-PCR (インターカレーションモニタリング PCR) の原理と応用: IFN

治療効果判定への HCV RNA 量のモニタリング. 臨床病理 1996; 45: 213-7.

- 4) Ishiguro T, Saitoh J, Yawata H, Otsuka M, Inoue T, Sugiura Y. Fluorescence detection of specific sequence of nucleic acids by oxazole yellow-linked oligonucleotides. Homogeneous quantitative monitoring of in vitro transcription. Nucleic Acids Res 1996; 24: 4992-7.
- 5) Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese with non-A, non-B hepatitis. Proc Acad Natl Sci USA 1990; 87: 9524-8.
- 6) Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, Tanaka T, Sato K, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. J Gen Virol 1992; 73: 673-9.

要 旨

IM-PCR 法を慢性 C 型肝炎に対する IFN 療法の経過観察に応用した。IM-PCR 法は、PCR 後の分離分析操作をいっさい必要とせず、広いダイナミックレンジで試料中の標的核酸量を決定することができる。今後慢性 C 型肝炎患者の治療方針の決定および治療経過の観察に有力な方法となりうることが示された。一方、標的核酸と配列特異的に結合することによって蛍光増感を与える新規 DNA プローブ（発蛍光プローブ）を開発した。発蛍光プローブは、II 型および III 型 HCV 感染血清を用いた実験において、標的核酸の 1 塩基置換の識別が可能であることを見出した。また、*in vitro* 転写と組み合わせた PCR 産物の検出への応用では、余剰プローブの除去を行うことなく 10 コピーの HCV RNA の検出が可能であった。