

HTLV-I 検出における TaqMan PCR 法の評価

山下 順香¹⁾ 前田 雅子¹⁾ 谷 慶彦¹⁾ 柴田 弘俊¹⁾
山下 進²⁾ 林 仲信²⁾ 松本加代子¹⁾

¹⁾大阪府赤十字血液センター

²⁾(株)サワディーテクノロジー

(平成 10 年 7 月 10 日受付)

(平成 10 年 12 月 22 日受理)

EVALUATION OF THE TaqMan POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD FOR DETECTION OF HUMAN T CELL LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE I

Naoko Yamashita¹⁾, Masako Maeda¹⁾, Yoshihiko Tani¹⁾, Hirotoishi Shibata¹⁾,
Susumu Yamashita²⁾, Nakanobu Hayashi²⁾ and Kayoko Matsumoto¹⁾

¹⁾Osaka Red Cross Blood Center

²⁾Sawady Technology Co., Ltd.

We used a novel “real time” quantitative PCR method, TaqMan PCR (T-PCR), in which the accumulation of amplified products is detected via the formation of dual fluorogenic probe complexes, to diagnose HTLV-I infection, and compared the results with the Nested PCR method (N-PCR). Currently, confirmation of HTLV-I infection requires the detection of anti-HTLV-I by a serological method and of HTLV-I genome by a polymerase chain reaction (PCR)—based methodology. Secondary PCR-based assay is required to screen false positives which may occur during the serological testing. N-PCR is normally employed to amplify specific sequences from a very few copies of HTLV-I genome; this, however, consists of two PCR (time consuming) steps and is not intended for quantitative analysis. In our testing model as few as 3 copies of a partial genome of HTLV-I (3' end half of HTLV-I genome cloned in plasmid) were successfully amplified and detected with comparable accuracy to N-PCR. Moreover, the measured quantitative values (Th cycle) of T-PCR were highly correlated with copy numbers of integrated HTLV-I genome estimated by other routine methodologies. Lastly, less labor was required to perform T-PCR than N-PCR, and the use of closed tubes in T-PCR significantly reduced carryover contamination. We conclude that T-PCR is a rapid and accurate assay system for confirmation of the serological diagnosis of HTLV-I infection.

Key words : HTLV-I, TaqMan PCR, Nested PCR, PRISM™ 7700, HTLV-I carrier

はじめに

現在, Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)¹⁾²⁾ 感染の確認は主に血清学的診断法である抗 HTLV-I 抗体検査により行われており, 測定操作も簡便で多検体処理の可能な粒子凝集 (PA) 法や酵素免疫測定法 (EIA) がスクリーニング検査法として広く用いられている³⁾. しかし, これらの方法には偽陽性が認められることから, 陽

性試料についてはさらに特異性に優れた間接蛍光抗体 (IF) 法やウエスタンブロット (WB) 法による確認検査が行われている²⁾⁴⁾. しかしながら, IF 法や WB 法にも低頻度ではあるが非特異反応が認められ, 使用する抗原の違いにより判定基準が異なるため結果判定に統一性がない等の問題点も残されており, より確実な診断を必要とする場合は HTLV-I プロウイルスの検出が行われる.

プロウイルスの検出はサザンブロット (SB) 法や一段階反応による polymerase chain reaction (PCR) 法により行われているが⁵⁾⁶⁾、これらの測定法では検出感度が低く、感染細胞数の少ない HTLV-I キャリアーではその約半数が検出不能となる⁷⁾。このため、さらに高感度な Nested PCR 法 (N-PCR) が実施される。しかし、N-PCR は 2 段階反応のため測定に長時間を要し、操作も煩雑である等の問題点が残されている。

今回、我々は 2 種類の蛍光色素で標識されたプローブを用いて PCR 増幅産物をリアルタイムで検出する TaqMan PCR 法を用いて HTLV-I 検出を行い、その有用性について N-PCR との比較検討を行ったので報告する。

材料および方法

1. 試料

当センター献血者において抗 HTLV-I 抗体スクリーニング検査である PA 法が陽性を示した検体を試料とした。なお、プロウイルス検出用試料は同献血者由来の血液製剤よりフィコール比重遠沈法で単核球を分離し、フェノール・クロロホルム法にて抽出したゲノム DNA を制限酵素 (PstI または EcoRI) で切断し、使用した。

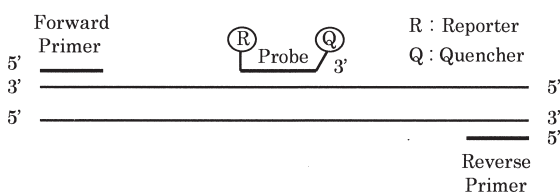
2. 方法

① HTLV-I プロウイルスの検出

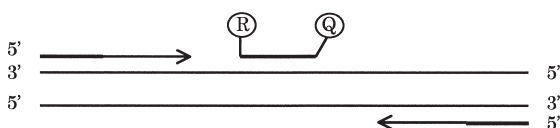
a. TaqMan PCR 法 (T-PCR)

本法は通常の PCR 反応に TaqMan プローブを加えて行われる。この TaqMan プローブは 5' 端に Fluorescein 系の蛍光色素 (リポーター: R)、3' 端に Rhodamine 系の蛍光色素 (クエンチャー: Q) を標識したオリゴヌクレオチドであり、両プライマー間で特異的にアニールする。しかし、TaqMan プローブの 3' 末端はリン酸化されており、プローブ自体から伸長することはない。PCR 反応は Fig. 1 に示すように、まず TaqMan プローブ、続いてプライマーが目的とする DNA にアニールし、*Thrmus aquaticus* (Taq) ポリメラーゼによる伸長反応が進むと 5'-3' エキソヌクレアーゼ活性により TaqMan プローブは 5' 末端より加水分解する。その結果、TaqMan プローブは R が Q より離れることで共鳴エネルギーの移動が起こ

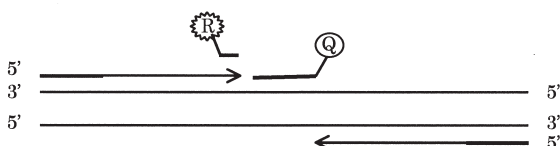
Annealing



Polymerization



Cleavage



Emission

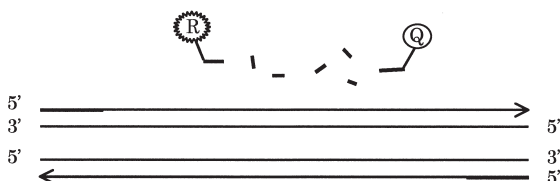


Fig. 1 Schematic diagram of TaqMan PCR.

り、抑制されていた R の蛍光強度が増加する。この蛍光強度の変化を ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (Perkin Elmer Applied Biosystems: ABI 社) を用いて、リアルタイムで検出した⁸⁾。今回の検討では Primer Express ソフトウェア (ABI 社) を用いて設計した Table 1 に示すプライマー対と TaqMan プローブを用いて、Fig. 2 に示す HTLV-I の pX 領域 (7254-7374)⁹⁾ 検出を行った。試料として 100 ng の DNA フラグメントを用い、300 nM の各プライマー、100 nM TaqMan

Table 1 Primer pairs and probes used for amplification and detection of HTLV-I

	Primer or probe *	Base (5'—3')	
		position	sequence
T-PCR	Primer +	7,254—7,277	GCATCGAAACAGCCCTACAGATAC
	Primer -	7,374—7,351	CCTTGACACAGTCTCCAAACACG
	Probe +	7,280—7,312	AGTTAACCATGCTTATTATCAGCCCACTTCCCA
N-PCR	First		
	Primer +	7,312—7,330	AGGGTTTGGACAGAGAGTCTT
	Primer -	7,567—7,548	AAGGACCTTGAGGGTCTTAG
	Nested		
	Primer +	7,331—7,351	CTTTTCGGATACCCAGTCTAC
	Primer -	7,546—7,525	GGTTCTCTGGGTGGGAAGGAG

* : “+” designates the genomic strand and “-” complementary to the genomic strand.

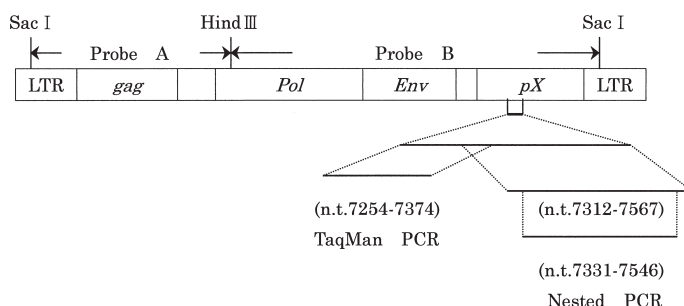


Fig. 2 Positions of primers and probes used for detection of HTLV-I proviral genome.

プローブおよび TaqMan™ PCR Reagent Kit (ABI 社) に含まれる 1.25 U AmpliTaq DNA ポリメラーゼ, 200 μM dATP・dCTP・dGTP, 400 μM dUTP, 3.5 mM MgCl₂, 0.5 U AmpErase Uracil-N-glycosylase, 1×TaqMan buffer A を組成とする反応液 50 μl で, 50℃ 2 分, 95℃ 10 分反応後, 95℃ 15 秒, 60℃ 1 分の反応を 40 回繰り返し増幅させた. PCR 反応は二重測定を行い, 判定は 40 回の増幅過程において蛍光強度が Sequence Detection ソフトウェア (ABI 社) により定義された一定の基準値 (Threshold: Th) を超えたものを陽性, Th 以下を陰性とし, 二重測定の結果が異なるものを判定保留とした. また, 陽性については Th を超えた時点でのサイクル数 (Th cycle) の平均値, 判定保留については陽性を示した Th cycle を記載した.

b. Nested PCR 法 (N-PCR)

Table 1 に示す 2 組のプライマー対を用いて,

Fig. 2 に示す pX 領域 (7331-7546)⁹⁾ 検出を行った⁹⁾. 試料として 1 μg の DNA フラグメントを用い, 500 nM の各 First プライマー, 2.5 U Taq ポリメラーゼ, 1.5 mM dNTPs, 50 mM Tris HCl (pH 8.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄ を組成とする反応液 100 μl で, 94℃ 2 分, 60℃ 1 分, 72℃ 2 分の反応を 30 回繰り返した. 次に, その増幅産物 2 μl を用いて 500 nM の各 Nested プライマーにて 1 次と同様の条件で 2 次増幅を行なった. PCR 反応は PJ 2000 サーマルサイクラー (Perkin Elmer 社) を用いて行った. 判定は 1.6% アガロースゲル電気泳動後, エチジウムブロマイド染色して行った.

c. サザンプロット法 (SB)

試料として 10 μg の DNA フラグメントを用い, 0.8% アガロースゲル電気泳動後, ナイロン膜に転写したものを, Fig. 2 に示す 2 種類の³²P 標識プローブで検出した⁷⁾. 判定は 2 種類のプローブ

Table 2 Comparison of detection limits by the N-PCR and T-PCR methods in measurement of HTLV-I plasmid DNA

No.	DNA conc. (pg)	N-PCR	T-PCR (cycle)
1	1.0×10^{-1}	+	+
2	1.0×10^{-2}	+	+
3	1.0×10^{-3}	+	+
4	1.0×10^{-4}	+	+
5	1.0×10^{-5}	±	±
6	1.0×10^{-6}	-	-

N-PCR : Nested PCR, T-PCR : TaqMan PCR.

の内、いずれか一方でも反応したものを陽性とした。

② 抗 HTLV-I 抗体の測定

抗 HTLV-I 抗体の測定は粒子凝集法を原理とする「セロディア HTLV-I」(PA; 富士レビオ社), マイクロプレート EIA を原理とする「ニューエイトテスト ATL」(EIA-E; エーザイ社) および「デタミナー HTLV-I 抗体」(EIA-D; 協和メデックス社), MT-2: Molt-4 細胞混合塗沫スライドを用いた間接蛍光抗体法 (IF; 自家調製)⁶⁾, MT-2 lysate を用いて Laemmli の方法¹¹⁾に従い抗原ストリップを作製したウエスタンブロット法 (WB; 自家調製)⁴⁾の5法にて行った。

結 果

1. 検出感度の比較と T-PCR の定量性

HTLV-I プロウイルスゲノムの後半 6.5 kb を組み込んだプラスミド DNA を注射用蒸留水 (大塚製薬社) にて 10^6 希釈を行い調製した試料を用いて、各 DNA 濃度における T-PCR と N-PCR の判定値を比較した。その結果は Table 2 に示すように、両測定法ともほぼ同等の検出感度を示した。また、T-PCR の Th cycle と DNA 濃度の関係を明らかにするため、DNA 濃度を縦軸、Th cycle を横軸として各測定値をプロットした。その結果は Fig. 3 に示すように、各試料の Th cycle は DNA 濃度の上昇に伴って減少し、両者の関係は極めて優れた直線性を示した。

2. 抗 HTLV-I 抗体測定法および SB が全て陰性または全て陽性を示した試料における比較

抗 HTLV-I 抗体測定 5 法が全て陰性かつ SB が

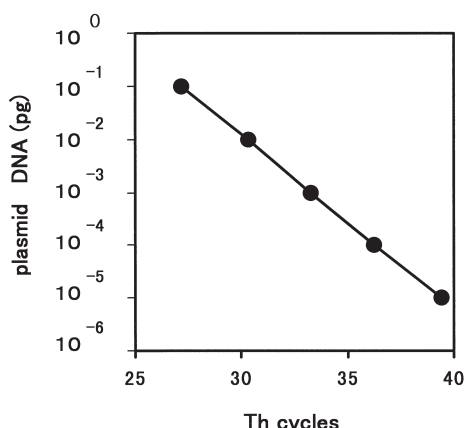


Fig. 3 Comparison of plasmid DNA concentration and Th cycle by the TaqMan PCR method.

陰性を示した 20 例および抗 HTLV-I 抗体測定 5 法が全て陽性かつ SB が陽性を示した 10 例を試料とし、T-PCR と N-PCR の判定値を比較した。その結果、前者 20 例における判定値は両測定法とも全例が陰性を示した。また、後者 10 例における判定値は Table 3 に示すように、両測定法とも全例が陽性を示し、T-PCR の Th cycle は 25.89~32.25 であった。

3. 抗 HTLV-I 抗体測定法が全て陽性を示し、SB が陰性を示した試料における比較

抗 HTLV-I 抗体測定 5 法が全て陽性かつ SB が陰性を示した 19 例を試料とし、T-PCR と N-PCR の判定値を比較した。その結果は Table 4 に示すように、両測定法で共に陽性を示したものが 15 例、共に陰性が 3 例、判定不一致 (N-PCR: 陰性, T-PCR: 陽性) が 1 例 (No. 16) 認められた。また、共に陽性を示した 15 例における T-PCR の Th cycle は 27.51~35.44 であり、判定不一致 1 例におけるそれは 39.19 であった。

4. 抗 HTLV-I 抗体測定法間で判定不一致を示した試料における比較

抗 HTLV-I 抗体測定 5 法間で判定不一致を示した 14 例を試料とし、T-PCR と N-PCR の判定値を比較した。その結果は Table 5 に示すように、両測定法で一致したものが 11 例、N-PCR 陽性で T-PCR 陰性あるいは判定保留が各々 1 例 (No. 4, 7),

Table 3 Comparison between the N-PCR and T-PCR methods using ten samples known to be positive with five anti-HTLV-I antibody tests and SB assay

No.	Ab tests	SB	N-PCR	T-PCR (cycle)	
1	+	+	+	+	(28.17)
2	+	+	+	+	(27.39)
3	+	+	+	+	(27.60)
4	+	+	+	+	(28.09)
5	+	+	+	+	(27.24)
6	+	+	+	+	(26.14)
7	+	+	+	+	(25.89)
8	+	+	+	+	(28.49)
9	+	+	+	+	(27.57)
10	+	+	+	+	(32.25)

N-PCR : Nested PCR, T-PCR : TaqMan PCR, Ab tests : Particle agglutination, EIA-Eitest, EIA-Determiner, Indirect fluorescence and Western blot, SB : Southern blot.

N-PCR 陰性で T-PCR 陽性が 1 例 (No. 14) 認められた。また, T-PCR が陽性あるいは判定保留を示した試料における Th cycle は 36.84~38.87 であった。

考 察

現在, HTLV-I キャリアーにおけるプロウイルスの検出は主に Nested PCR 法 (N-PCR) により行われている。この方法は 2 組のプライマー対を用いる 2 段階の PCR であり, 1 段階の PCR に比し特異性が高く, 高感度な検出が可能である。しかし, この方法は測定時間が長く, 操作に伴うコンタミネーションの危険性が高いなどの欠点を有する。今回, 検討に用いた TaqMan PCR 法 (T-PCR) を原理とする ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System はクローズドチューブシステムであることから操作過程におけるコンタミネーションが最小限に抑えられ, さらに PCR 増幅産物をリアルタイムで検出することから迅速簡便かつ定量的な測定が可能と考えられる。そこで我々は本システムを用いて HTLV-I の検出を行い, N-PCR と比較検討した。その結果について以下に考察する。

段階希釈により調製した既知濃度の DNA 標品を用いた比較検討より, T-PCR は N-PCR とほぼ同等の検出感度を有した。さらに, 両 PCR で陽性

Table 4 Comparison between the N-PCR and T-PCR methods using nineteen samples known to be positive with five anti-HTLV-I antibody tests but negative for SB assay

No.	Ab tests	SB	N-PCR	T-PCR (cycle)
1	+	—	+	+(28.51)
2	+	—	+	+(29.47)
3	+	—	+	+(31.55)
4	+	—	+	+(30.92)
5	+	—	+	+(28.86)
6	+	—	+	+(32.21)
7	+	—	+	+(29.92)
8	+	—	+	+(28.20)
9	+	—	+	+(32.34)
10	+	—	+	+(33.57)
11	+	—	+	+(35.44)
12	+	—	+	+(27.51)
13	+	—	+	+(29.85)
14	+	—	+	+(33.76)
15	+	—	+	+(34.90)
16	+	—	—	+(39.19)
17	+	—	—	—
18	+	—	—	—
19	+	—	—	—

N-PCR : Nested PCR, T-PCR : TaqMan PCR, Ab tests : Particle agglutination, EIA-Eitest, EIA-Determiner, Indirect fluorescence and Western blot, SB : Southern blot.

を示した最少 DNA 濃度 (1.0×10^{-5} pg) のプロウイルス DNA 分子を算出すると 3 分子となり, 極めて高い検出感度であることが確認された。また, T-PCR の定量性についても同時に観察したが, T-PCR の Th cycle と DNA 濃度の関係は直線的であったことから Th cycle は DNA 濃度を反映し, Heid らの報告¹²⁾と同様に優れた定量性を示すことが確認された。

抗 HTLV-I 抗体測定法および SB が全て陰性を示した試料, 即ち HTLV-I 非感染者における両 PCR の陰性率 (特異度) は何れも 100% であった。次に, 抗 HTLV-I 抗体測定法および SB が全て陽性を示した試料, 即ち HTLV-I に感染し, HTLV-I プロウイルス量も多いと推測される群における両 PCR の陽性率 (鋭敏度) は何れも 100% であった。また, T-PCR の平均 Th cycle は 27.88 と少ないサイクル数で陽性を示した。この結果は試料中にプロウイルス DNA が多量に存在することを裏付けるものである。

Table 5 Comparison between the N-PCR and T-PCR methods using discrepant samples by five anti-HTLV-I antibody tests

No.	PA	EIA-E	EIA-D	IF	WB	SB	N-PCR	T-PCR(cycle)
1	+	-	+	+	-	-	-	-
2	+	-	-	+	+	-	-	-
3	+	±	±	+	±	-	-	-
4	+	-	-	+	-	-	+	± (38.87)
5	+	+	-	+	±	-	+	+
6	+	+	-	+	±	-	-	-
7	+	+	+	+	±	-	+	-
8	+	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-	-	+

N-PCR : Nested PCR, T-PCR : TaqMan PCR, PA : Particle agglutination, EIA-E : EIA-Eitest, EIA-D : EIA-Determiner, IF : Indirect fluorescence, WB : Western blot, SB : Southern blot.

さらに、抗 HTLV-I 抗体測定法が全て陽性を示しかつ SB が陰性を示した試料、即ち HTLV-I に感染しているが HTLV-I プロウイルス量が少ないと推測される群における両 PCR の陽性率(鋭敏度)は何れも約 80% とほぼ同等であった。また、両 PCR が共に陽性を示した 15 例と判定不一致 1 例における Th cycle を比較したところ、共に陽性例が平均 31.13、不一致例が 39.19 であり、母集団と標本の平均の差の検定結果は、有意水準を 0.1%とした場合有意な差を認めた。この結果は判定不一致試料中のプロウイルス DNA 量が極めて少ないことを示唆するものである。さらに、SB 陽性群と SB 陰性群(両 PCR 陽性)における平均 Th cycle は各々 27.88, 31.13 であり、独立 2 標本の平均の差の検定結果は $P=0.0017$ となり、有意水準を 1%とした場合有意な差を認めた。この結果から SB 陰性試料中のプロウイルス DNA 量は SB 陽性試料のそれに比し、明らかに少ないと考えられる。

抗 HTLV-I 抗体測定法間で判定不一致を示した試料、即ち HTLV-I 感染の有無が明確でない試料における両 PCR の判定値は T-PCR 判定保留 1 例を除く 13 例中 11 例が一致 (84.6%) し、この群においても両 PCR の反応性は類似したものであった。なお、両 PCR の判定値が大きく異なった

試料 No. 7 と No. 14 については、乖離原因として増幅領域における塩基置換が考えられるため、この領域のシーケンスを行ったが変異は認められなかった。増幅領域周辺の塩基置換に伴う立体構造変化により、TaqMan プローブの反応性が変化した可能性も考えられるため、現在精査中である。

以上の結果をまとめると、HTLV-I プロウイルス DNA 検出における T-PCR の検出感度は N-PCR のそれとほぼ同等であり、さらにその Th cycle から HTLV-I 感染量を推定することが可能である。また、従来法では煩雑かつ高価であった定量検査を迅速かつ安価で実施することも可能となった。このことから、T-PCR は N-PCR に代わる確認検査として、さらにはその定量値より HTLV-I associated myelopathy (HAM) などの病態把握も可能である¹³⁾ことから臨床的にも有用性の高い測定法と思われる。

現行の T-PCR では 1 チューブ内で 2 つ以上の TaqMan プローブを使用できないことから PCR 反応阻害による影響の確認等は標的遺伝子と内部標準の増幅を 2 つのチューブを用いて個々に実施する必要がある。この点が改良され、今後さらに簡便で信頼性の高い定量測定が可能になることを期待する。

文 献

- 1) Poiesz, B. J., et al. : Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 : 7415—7419, 1980.
- 2) Hinuma, Y., et al. : Adult T-cell leukemia : Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 6476—6480, 1981.
- 3) 山下順香, 他 : 抗 HTLV-I 抗体スクリーニングにおける Enzyme immunoassay および Particle agglutination の評価. *JJCLA*, 20 : 12—16, 1995.
- 4) Kiyokawa, T., et al. : Western blot criteria for HTLV-I. *Lancet*, ii : 312, 1991.
- 5) Yamaguchi, K., et al. : DNA Diagnosis of HTLV-I. *Intervirology*, 39 : 158—164, 1996.
- 6) Matsumoto, C., et al. : Detection of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus in an infected cell line and in peripheral mononuclear cells of blood donors by the nested double polymerase chain reaction method : Comparison with HTLV-I antibody tests. *J. Virol.*, 64 : 5290—5294, 1990.
- 7) 松本加代子 : HTLV-I キャリヤー末梢血中のウイルスゲノムの解析. *大阪大学医学誌*, 46 : 1—8, 1994.
- 8) Stevens, J. : リアルタイムモニタリングによる定量的 PCR. *実験医学*, 15 : 728—733, 1997.
- 9) Seiki, M., et al. : Human adult T-cell leukemia virus : Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 3618—3622, 1983.
- 10) Fujino, R., et al. : Improvement of gelatin particle agglutination test for detection of anti-HTLV-I antibody. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82 : 367—370, 1991.
- 11) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, 227 : 680—685, 1970.
- 12) Heid, C. A., et al. : Real time quantitative PCR. *Genome res.*, 6 : 986—994, 1996.
- 13) Kira, J., et al. : Antibody titers to HTLV-I-p 40^{ex} protein and gag-env hybrid protein in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis : correlation with increased HTLV-I proviral DNA load. *J. Neurol. Sci.*, 107 : 98—104, 1992.