

原 著

## 自動核酸抽出機と TaqMan PCR & Real-time detection 法による多数検体用 核酸検査法の検討：成人 T 細胞白血病プロウイルス DNA 検出について

松本千恵子 塩沢理英子 光永 滋樹 市川 明子 石渡 里香  
内田 茂治 中島 一格 田所 憲治 十字 猛夫

日本赤十字社中央血液センター

(平成 12 年 12 月 27 日受付)

(平成 13 年 4 月 3 日受理)

### HIGH-THROUGHPUT HTLV-1 PROVIRAL DNA DETECTION SYSTEM USING A NUCLEIC ACID EXTRACTION ROBOT AND REAL-TIME PCR DETECTION

Chieko Matsumoto, Rieko Shiozawa, Shigeki Mitsunaga, Akiko Ichikawa, Rika Ishiwatari,  
Kazunori Nakajima, Kenji Tadokoro and Takeo Juji

The Japanese Red Cross Central Blood Center

A high-throughput nucleic acid testing system was developed for detecting proviral DNA of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) using an automatic nucleic acid extractor and the real-time detection TaqMan PCR (TaqMan PCR) targeting the pX region of the HTLV-1 genome. Approximately 4 µg and 2.5 µg of DNA were obtained from 200 µl of whole blood and 100 µl of frozen blood cells separated from whole blood, respectively. Extraction of nucleic acid from 48 blood samples was completed within 120 minutes. The detection limit of the TaqMan PCR was as high as that of the nested PCR. Amplification and detection of HTLV-1 genome in 96 blood samples was completed within 160 minutes. Extraction plus TaqMan PCR for viral genome as well as enzyme immunoassay (EIA) and indirect immunofluorescence assay (IF) for HTLV-1-antibodies were performed to test 38 blood samples which were determined to be HTLV-1-antibody positive by the donor screening test using particle agglutination. The results of EIA and IF coincided well with those of the TaqMan PCR, indicating that this detection system for HTLV-1 provirus DNA was useful for testing many samples in a short time with high sensitivity and specificity.

**Key words** : HTLV-1, proviral DNA, TaqMan PCR

### 緒 言

成人 T 細胞白血病ウイルス (human T-cell leukemia virus type 1 : HTLV-1) は輸血で感染するウイルスだが<sup>1)</sup>, 1986 年に日本赤十字社が献血ドナースクリーニングに感作粒子凝集 (particle agglutination : PA) 法による抗体検査を導入した後

は, 輸血による感染が確認された例はほとんど無い<sup>2,3)</sup>. しかし受血者 3,602 名を追跡したところ HTLV-1 抗体陽転が 1 例あった, という報告がある<sup>4)</sup>. また少数だが輸血後に患者で感染が認められた症例が血液センターに寄せられ, 輸血による感染かどうか検討されている. 輸血された血液は

抗体スクリーニングで陰性であるから、HTLV-1感染の初期で抗体産生が十分でないいわゆるウィンドウ期献血など、抗体の検出されないウイルス血症が想定される。PCRによるプロウイルスDNA検出検査が必要であるが、ドナーが多数の場合従来のフェノール、クロロフォルム法等での核酸抽出、nested PCRによる増幅、電気泳動による増幅確認、という方法では高感度であるが迅速な検査はできない。

我々はB型肝炎ウイルスとC型肝炎ウイルスのゲノム検出検査をするにあたり、核酸自動抽出機 BioRobot と TaqMan PCR & Real-time detection (以下 TaqMan PCR 法)を用いる方法を開発し、輸血による感染の疑われる症例の患者および関係ドナー検体の解析に用いている<sup>5,6)</sup>。そこで HTLV-1 についても従来の用手法に代わり、自動核酸抽出機により血液から直接白血球 DNA を調製し、TaqMan PCR 法でプロウイルス DNA を増幅、検出するシステムの開発を試みた。

### 材料および方法

#### 1. 検体

日本赤十字社中央血液センターでなされた献血にともなって 検査用に採取された EDTA 加全血と、副作用が発生した場合の解析用に採取された検体 (以下保管検体) の 2 種類を用いた。献血時にすべての献血者より HTLV-1 を含むウイルス検査を行うことの了解が得られている。保管検体は抗凝固剤添加のものと同無添加の場合があるが、いずれも分離剤入り試験管に採取され、分離後凍結保存された。EDTA 加全血は血算測定後 4 で保存した。保管検体は室温で融解後上清と分離剤を取り除き、血球層を採取して血球層と同容量の PBS を加えて浮遊させ、検査検体とした。さらに HIV-1 抗体陽性の献血者のパuffyコートも用いた。

また HTLV-1 持続感染細胞株である HUT-102 細胞と、ヒト由来の非感染細胞株として CEM 細胞も培養して用いた。

#### 2. 核酸の抽出

用手法としてフェノール、クロロフォルム抽出法、または QIAamp DNA Blood mini kit (キアゲ

ン)を用いた。

自動抽出法としてキアゲン社の核酸抽出機 BioRobot 9604 と、QIAamp 8 DNA Blood BioRobot kit を用いた。この方法では核酸をシリカメンブレンに吸着させて得る。検体は BioRobot で 200  $\mu$ l を自動採取し、プロトコールに従って核酸抽出した。抽出液の 260nm の吸光度から核酸濃度を算定した。また OD280nm も測定し、OD260nm との比を精製度の目安とした。

#### 3. PCR

nested PCR は以前報告した方法に従い、HTLV-1 の pX 領域をプライマー pX①、②、③、④を用いて増幅した<sup>7)</sup>。

TaqMan PCR は PE Applied Biosystems 社の ABI PRISM 7700 を用いて増幅と検出を行った。この PCR は、蛍光色素 (FAM 等) およびクエンチャー物質 (TAMRA 等) を結合させた TaqMan プローブ存在下で増幅反応が行われ、結果は DNA 複製の繰り返しの伴い増加した蛍光を検出することで得られる。HTLV-1 ゲノム検出の増幅対象は変異が少なく<sup>8)</sup>、かつ核酸配列のよく研究されている pX 領域とした。データベースより得た全長配列 9 例、pX 領域配列 20 例を検討し、pX 領域のなかでも特に保存の高い配列を選び、以下のように TaqMan プローブとプライマーをデザインした。SP1 (nt<sup>9</sup> 7325-7344): CCCACTT-CCCAGGGT TTGGA SP2 (nt 7446-7461): GG-CCAGTAGGG CGTGA, FAM および TAMRA 修飾プロブ SMPR1 (nt 7354-7374): CCAGT-CTACGTGTT TGGAGACTGTGTACA。増幅は EZ core reagent 試薬 (PE Applied Biosystems) を用い、反応液 50  $\mu$ l で変性 95 15 秒、アニーリング 60 60 秒、伸長 72 15 秒で 50 サイクル反応させた。

#### 4. HTLV-1 pX 領域 DNA のクローニング

HUT 102 細胞より抽出した DNA をプライマー Sp1 と pX②を用いて pX 領域の PCR を行い、増幅産物を TOPO TA cloning kit (Invitrogen 社) を用いてプラスミドベクターに組み込み、クローン化した。精製した DNA 溶液の OD260nm の吸光度より分子濃度を計算した。

## 5. 核酸の RNase 消化

蒸留水に溶解した核酸 36 $\mu$ l に RNase (ペーリンガー マンハイム) 20mg/ml を 10 $\mu$ l 加え, 室温で 15 分間インキュベートした. さらにフェノール, クロロフォルム抽出を行い, エーテル処理の後エタノール沈殿, 乾燥後蒸留水に再溶解し, ヌクレオチドや核酸の小断片を除くためスピンカラム処理した.

## 6. 抗体検出

EIA はイテスト ATL (エーザイ) を用いて行った. 間接蛍光抗体法 (Indirect immunofluorescence testing: IF) 法は日沼らの方法に従った<sup>10)</sup>. HTLV-1 持続感染細胞株の MT-2 と, ヒト由来非感染細胞株の Molt 4 細胞アセトン固定したスライドガラスに血清検体を反応させ, ついで FITC 結合ヒト IgG ウサギ抗体を反応させた. 抗 HTLV-1 抗体の有無は蛍光顕微鏡観察により判定した.

## 結 果

### 1. TaqMan PCR & Real-time detection (TaqMan PCR)

HTLV-1 持続感染細胞である HUT102 細胞より抽出した DNA を用いて増幅の確認を行った. 10pg から 10ng の HUT102 細胞 DNA を HTLV-1 非感染の CEM 細胞の DNA 0.5 $\mu$ g に加えて増幅

し, Fig 1 に示した増幅パターンを得た. CEM 細胞 DNA だけでは増幅は認められず, HUT102 細胞 DNA が多いほど少ないサイクル数での増幅が確認された. また HTLV-1 と同じヒトレトロウイルスである HIV-1 DNA 陽性の 2 検体と, HTLV-1 抗体が PA 法で陰性の 20 検体の末梢白血球より得た DNA 各 0.5 $\mu$ g 用いて TaqMan PCR を行った. いずれも増幅は認められなかった.

検出感度を検討するため, クローン化した HTLV-1 の pX 領域 DNA をテンプレートとして TaqMan PCR と nested PCR を行った. 種々の濃度のテンプレート DNA を, CEM 細胞 DNA 0.5 $\mu$ g 存在下で増幅した. Table 1 に示したように従来の nested PCR では pX 領域 DNA 2 分子の検出率が 10 回中 1 回であったのに対し, TaqMan PCR では 4 回中 2 回であった. 20 分子以上では両方法とも全て検出した. また HUT 102 細胞 DNA 8pg を用いて nested PCR と TaqMan PCR を行ったところ前者で 10 回中 2 回, 後者で 12 回中 6 回の増幅がみられた. 40pg 以上では両方法ともすべて増幅した. TaqMan PCR 法は nested PCR 法と同等の検出感度と考えられた.

この TaqMan PCR は 96 検体を 160 分で増幅でき, 反応ウエルの蓋を開放することなく終了と

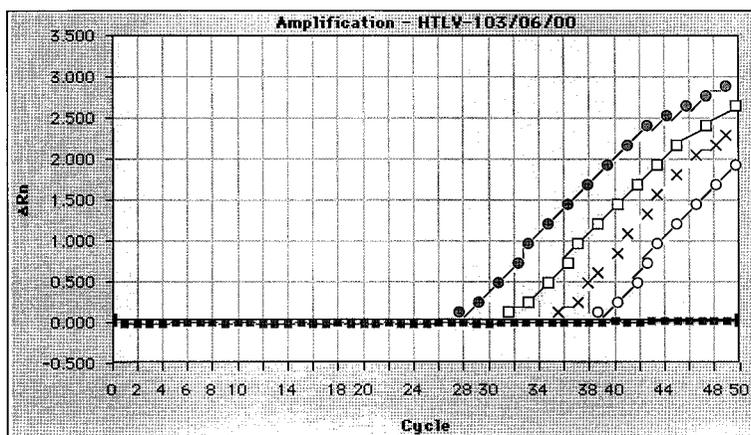


Fig. 1 Amplification pattern of the HTLV-1 pX region DNA by TaqMan PCR. Zero ng ( ) 0.01 nanograms ( ) 0.1 ng ( × ) 1 ng ( ) and 10 ng ( ) of HUT-102 cell DNA were amplified.

Table 1 Amplification of the HTLV-1 pX region DNA by nested PCR and TaqMan PCR

template DNA		nested PCR	TaqMan PCR
HTLV-1 pX region DNA *	2 copies	1/10**	2/4
	20	3/3	14/14
	200		14/14
	2,000		4/4
HUT 102 cell DNA	8 pg	2/10	6/12
	40	3/3	8/8
	200	1/1	4/4
	1,000		2/2

\*HTLV-1 pX region sequence was cloned into plasmid DNA .

\*\*Number of positive results/number of tests .

Table 2 TaqMan PCR of cloned HTLV-1 DNA spiked into nucleotides extracted from HTLV-1-negative blood samples

copy number of HTLV-1 pX region DNA	2	10	20	200	2,000	20,000
PCR : spiked into DDW(%)	5/14*(35.7)	12/22(54.5)	12/12(100)	12/12(100)	2/2(100)	2/2(100)
PCR : spiked into extracted nucleotide(%)	5/28(17.9)	13/22(59.1)	19/19(100)	19/19(100)	9/9(100)	9/9(100)

\*Number of positive results/number of experiments.

同時に産物の確認がなされた。

## 2. BioRobot 9604 による血液細胞の DNA 抽出

EDTA 加全血 44 検体より BioRobot により核酸抽出を行った。200 $\mu$ l より 4.0 $\pm$ 1.2 $\mu$ g の核酸が得られた。4 保存で少なくとも採血後 15 日間は核酸採取量に低下は認められなかった。これら抽出核酸の OD 260nm/280nm は 1.85 $\pm$ 0.09 であった。

抗凝固剤加保管検体 40 検体の血球 100 $\mu$ l より得られた核酸は 2.5 $\pm$ 1.8 $\mu$ g, OD 260nm/280nm は 1.93 $\pm$ 0.13 であった。なお抗凝固剤なしの血餅検体では検体採取が難しく, BioRobot による抽出ではほとんど核酸が得られなかった。EDTA 加全血 10 検体より得た核酸と, それを RNase 消化後で吸光度より核酸量を測定した。RNase で消化前の核酸は 4.5 $\pm$ 1.3 $\mu$ g, 消化後では 4.1 $\pm$ 1.4 $\mu$ g と計算され大きな差はなかった。

さらに BioRobot で得た核酸抽出液中に TaqMan PCR に対し阻害物質があるかどうかみるため, HTLV-1 非感染検体より抽出した核酸に

HTLV-1 pX クローン化 DNA を添加して増幅した。Table 2 に示したように 2 コピー加えた場合 17.9%(5/28)陽性で, クローン化 DNA のみの 35.7%(5/14) 陽性の結果より低かった。しかし 10 コピー加えたもので 59.1% でクローン化 DNA のみ(54.5%)と同等の増幅が認められ, 20 コピー以上では全てで増幅が認められた。以上より明らかな阻害は無いと考えられた。

BioRobot を用いて, 48 検体の核酸抽出が約 120 分で行うことができた。

BioRobot + TaqMan PCR 法での一検体当たりの試薬, 消耗品代は約 1,500 円と試算された。

## 3. HTLV-1 抗体陽性の保管検体における BioRobot + TaqMan PCR によるプロウイルス DNA の検出

本方法による HTLV-1 ゲノム検出を抗体陽性検体で検討した。2000 年 1 月から全国の血液センターで, HTLV-1 の PA 法による抗体スクリーニング検査が陽性となった献血について EIA 法と IF 法による確認検査を行っている。中央血液セン

Table 3 Detection of HTLV-1 genome in donated blood samples that showed positive results by PA, and positive/negative results by EIA and IF.

	group(1)	group(2)				group(3)	total sample number
antibody for HTLV-1							
PA	+	+	+	+	+		
EIA	-	+	-	+	+(CI > 2.0)		
IF	-	-	+	+(CI < 2.0)	+		
number of samples	12	1	3(4*)	7	14	37(38*)	
number of TaqMan positive samples	0	0	3(4*)	7	13(14**)	(25*, **)	

\*includes one blood sample whose positivity was not determined by IF.

\*\*includes one blood sample in which viral DNA was amplified in one of five experiments.

ターで献血され、PA法で陽性となった検体でかつ保管検体が抗凝固剤添加のものより(1)EIAおよびIF法で抗体陰性の12検体(2)EIAとIFのいずれかで陰性またはEIAのcut off index(CI)値が2.0以下の弱陽性となった12検体、さらに(3)EIA,IFともに陽性となった検体でEIAのCI値が2.0以上の14検体を3群それぞれ無作為に選んだ。EIA陰性,IFで判定不能が1例あったが(2)群に分類した。この献血38例の保管検体からBioRobotで核酸を抽出した。従来のnested PCRで抽出DNAを0.5~1μg用いているので、ここでも各約0.5μgの核酸を用いてTaqMan PCR法によりプロウイルスDNAの検出を行った。

結果をTable 3に示した(1)群のEIA,IFともに陰性の12検体はPCRも陰性となった(2)群の12検体では11例がPCR陽性で、EIA陽性,IF陰性の1例がPCR陰性であった。抗体検査三法陽性の(3)群の14検体では13例は明らかな陽性となったが、1例は5回の繰り返し実験で1回しか増幅されなかった。

### 考 察

HTLV-1のプロウイルスDNAを対象としたTaqMan PCRは、従来のnested PCR法と同様の高い検出感度を示した。nested PCR法では0.5~1μgのDNAを用いており、TaqMan PCRでも細胞DNA 0.5~1μg(ヒトゲノムがハプロイド当たり $3 \times 10^9$ bpとすると白血球 $1 - 2 \times 10^5$ 個由来に相当)を用いることで従来法と同等の検出感度と考えられる。非特異増幅も認められなかった。ま

た増幅の検出は反応ウエルの蓋を開けずにプレートのカバー越しに蛍光を検出するため、増幅産物のキャリアオーバーコンタミネーションによる偽陽性が防げる、という利点があった。

BioRobotによる核酸抽出ではEDTA加全血200μlより4μg前後の核酸が得られ、RNase消化をしてもほとんど残ることから大半がDNAと推定される。純度についてはOD 260nm/280nmの値と、クローン化HTLV-1 pX領域DNAを用いたスパイク実験からプロウイルス検出用PCRに十分使用できると考えられる。しかしながら保管検体からは、ほぼ全血200μlに相当する血球100μl由来の核酸は $2.5 \pm 1.79$ μg、と全血の場合と比べて少なく、またばらつきが大きかった。これは凍結検体を解凍し、さらに血球層に密着している分離剤を除いて血球を得るため、DNAの回収率が低下したと考えられる。回収されたDNAが1μg以下の検体もあり、保管検体でHTLV-1のゲノム検査をするには複数回の抽出および検出検査が必要かもしれない。また保管検体が凝固剤無しの血餅状態の場合、現在のところゲノム検査は難しく今後の課題である。

自動核酸抽出機BioRobot+TaqMan PCR法で抗体陽性検体でのウイルス血症の検出状況を検討した。PA陽性の38検体において、抗体確認検査として行われたEIAとIF法のいずれも陰性であった12検体では、PCRも陰性となった。PA法は力価の低い場合を中心に非特異的反応するものがあるとされ、この12検体もHTLV-1非感染

例と考えられる。EIA と IF の少なくとも一方で抗体が陽性であった 25 検体において EIA 陽性、IF 陰性の 1 例をのぞいた 24 例で PCR 陽性となった。PCR 陰性の 1 例は EIA 陽性、IF 陰性であり、感染例であるのかどうかは判断できない。また EIA 陰性で IF 法で判定できなかった 1 例で HTLV-1 ゲノムが検出され、PCR は確認検査として有用であった。抗体検査の結果と照らし合わせてみて、BioRobot + TaqMan PCR 法はウイルス陽性細胞をほぼ検出していると考えられる。しかし 1 例 EIA、IF 法ともに陽性であるが PCR はわずか 5 回中 1 回しか増幅されなかった検体があった。用いる DNA を増やすなどすることで検出感度をさらに上げられるかもしれない。

PA 法による抗体スクリーニングは効果を上げているが、HTLV-1 は水平感染が知られており残るリスクとしてウインドウ期献血が考えられる<sup>11)</sup>。そうした検体の検査に PCR が有効かもしれない。しかし多数検体用核酸検査法は肝炎ウイルス等では開発されているが、HTLV-1 では抽出まで含めた方法はほとんど検討されていない。フェノール、クロロフォルム抽出 + nested PCR 法では数検体であっても検出までに数日を要し多数検体処理は難しい。一方 BioRobot + TaqMan PCR 法では 96 検体の検査が一日で終了する。操作はほとんど自動化されており、短時間で処理できるため多数ドナーが関係した輸血後 HTLV-1 感染症の解析など、多数検体検査に有用と考えられる。

### 結 語

今回開発した BioRobot + TaqMan PCR 法は、従来の HTLV-1 ゲノム検出検査法に代わって、多数検体の迅速な検査ができる良い方法と考えられた。

### 文 献

- 1) Okochi, K., et al. : A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion : seroconversion in recipients. *Vox Sang*, 46 : 245-253, 1984.
- 2) 佐藤博行 : HTLV-I スクリーニングの成果. *日輸血会誌*, 39 : 379, 1993.
- 3) 日本赤十字社中央血液センター医薬情報部 : 副作用報告からみた輸血副作用の発生頻度. *輸血情報*, 9705-37.
- 4) 稲葉頌一 : 輸血ウイルス感染症. *日本臨床*, 55 : 2320-2326, 1997.
- 5) Mitsunaga, S., et al. : High throughput HBV DNA and HCV RNA detection system with high sensitivity and specificity using a nucleic acid extraction robot and real-time detection PCR. *Transfusion* : 40, supplement : SP209, 2000.
- 6) 藤村佳世子, 他 : 核酸自動抽出装置と Real-time detection PCR 法による迅速な輸血後肝炎解析. *日輸血学会誌*, 46 : 211, 2000.
- 7) Matsumoto, C., et al. : Detection of Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) 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.
- 8) Cann, A.J. and Chen, I.S.Y. : Human T-cell leukemia virus types I and II. *Virology*, second edition, pp1501-1527, Edited by Fields, B.M., et al. Raven Press, Ltd. New York, 1990.
- 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) Hinuma, Y., et al. : Adult T-cell leukemia : antigen in an ALT cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Aatl Acad Sci USA*, 78 : 6476-6480, 1981.
- 11) Schreiber, GB., et al. : The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med*, 334 : 1685-1690, 1996.