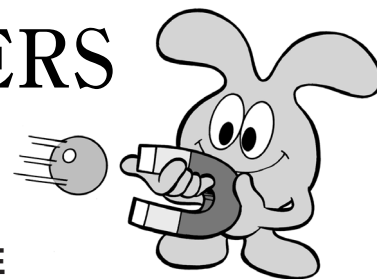


DYNABEADS LETTERS



Dynabeads Oligo(dT)₂₅ を用いた AZT 耐性 HIV-1 RNA の血漿からの検出

大阪大学・微生物病研究所・ウイルス感染制御分野
 栃倉明子、栗村敬

1. 目的

Azidothymidine (zidovudine : AZT) をはじめとするヌクレオシドアナログが human immunodeficiency virus (HIV) によって引き起こされる acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) の治療薬として認可されて以来、現在我が国においても主に AZT が用いられている。AZT は DNA の chain terminator として抜群の抗ウイルス活性を示す一方、造血機能障害などの副作用、耐性株の出現が問題となっている。薬剤耐性株を検出することは HIV 感染者に対する有効な薬剤治療を検討する上で重要な意義を有することが考えられる。ここでは実際 AZT のターゲットとなる患者血漿中の HIV-1 RNA が AZT 投与経過後、野性型から変異型に変わっているかどうかを比較的簡単に調べる方法例を紹介する。

2. 原理と利点

既に報告されている HIV-1 pol 遺伝子のコドン215 番目の変異¹⁾ (Thr Tyr あるいは Thr Phe) は2塩基の置換 (ACC TTC あるいは ACC TAC) を必要とするため、AZT 耐性獲得に最も重要と思われる。患者血漿中に Dynabeads Oligo(dT)₂₅ を加えることにより、ビーズ上のデオキシチミジル酸が HIV-1 mRNA の polyA と結合し、遠心機を使用せずに短時間で血漿から mRNA を効率良く抽出することができる。分離した mRNA を逆転写後、これらをテンプレートとしてコドン215番目の変異の有無を各々 AZT 野性型 (W)、変異型 (M) に特異的なプライマー・ペアを用いて nested PCR 法により調べた。

3. 方法

RNA の抽出

- 1) 血漿 (serum : PBS = 2 : 1) 500 μ l、4.5 mM 酢酸カルシウム (酢酸で pH 7.0 にあわせる) 1 ml およびヘパリナーゼ (生化学工業、Code No.100700 を滅菌精製水 100 ml に溶解する) 5 μ l を 15 ml 試験管に加え、キャップをしてパラフィルムで密封した後、37 $^{\circ}$ C で1時間インキュベートする。この操作は検体がヘパリン採血されている場合、ヘパリンの逆転写酵素活性阻害作用によりウイルス RNA の逆転写が抑制されることを防ぐためのものである。
- 2) ヘパリナーゼ処理後、Lysis/binding buffer* 1.5ml およびビーズ 50 μ l (予め Lysis/binding buffer* でビーズを洗っておく) を加え、再びキャップをしてパラフィルムで密封した後、shaker で穏やかに攪拌する (常温、30 分)。

- 3) マグネット(MPC-6) でビーズを集め、上清を捨てる。Washing buffer + SDS** 500 μ l を加え、ビーズを 1.5 ml エッペンドルフチューブに移す。
- 4) マグネット(MPC-M) でビーズを集め、上清を捨てる。Washing buffer + SDS**500 μ l を加えて攪拌し、ビーズを集め上清を捨てる。この操作を3 回繰り返す。
- 5) 上清を捨てた後、Washing buffer*** 500 μ l を加えて攪拌し、新しいチューブに移す。
- 6) ビーズを集めて上清を捨て、Elution buffer**** 10 μ l を加えて攪拌し、65 $^{\circ}$ C、2 分間インキュベートしてビーズから RNA をはずす。

Lysis/binding buffer*	100 mM Tris-HCl, pH 8.0 500 mM LiCl 10 mM EDTA, pH 8.0 1% SDS 5 mM dithiothreitol (DTT)
-----------------------	---

Washing buffer + SDS**	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 0.15 M LiCl 1 mM EDTA 0.1 % SDS
------------------------	---

Washing buffer***	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 0.15 M LiCl 1 mM EDTA
-------------------	--

Elution buffer****	2 mM EDTA, pH 8.0
--------------------	-------------------

MPC-6 : Magnetic Particle Concentrator (Prod.No.120.02)

MPC-M : Magnetic Particle Concentrator for Eppendorf microtubes (Prod.No.120.09)
(manufactured by Dynal A.S, N-0212 Oslo, Norway)

逆転写および nested PCR

- 1) ビーズで抽出した RNA 10 μ l に RT Mixture solution* を 39.1 μ l を加え 37 $^{\circ}$ C で1時間インキュベートする。
- 2) 予め PCR Mixture 1** 50.9 μ l を加えた PCR チューブに1)で逆転写したサンプルを加え、First PCR を行う (94 $^{\circ}$ C 1分、45 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 2分を 30 サイクル終了後、72 $^{\circ}$ C 5分を1 サイクル)。
- 3) First PCR 産物 10 μ l をテンプレートとし、PCR Mixture 2*** 40 μ l を用いて Second PCR を行う (94 $^{\circ}$ C 1分、45 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 2分を 30 サイクル終了後、72 $^{\circ}$ C 5分を1 サイクル)。
- 4) Second PCR 終了後、最終産物 10 μ l を 4 %アガロースゲルを用いて電気泳動し、特異的なバンドの位置と濃度を比較する。

RT Mixture solution*	RNA-PCR buffer (10x) ^A	5 μ l
	dNTP (2.5 mM)	25 μ l
	RNasin (Promega, 40000U/ml)	1 μ l
	Reverse transcriptase (TAKARA : RAV-2, 25U/ml)	0.1 μ l
	Primer 1 (TS-51, 50 mM)	2 μ l
	Primer 2 (TS-53, 50 mM)	2 μ l
	H ₂ O	4 μ l

PCR Mixture 1**	RNA-PCR buffer (10 x) ^A	5 μ l
	DMSO	10 μ l
	Taq polymerase (Cetus : AmpliTaq, 5U/ml)	0.25 μ l
	H ₂ O	35.65 μ l

PCR Mixture 2**	DNA-PCR buffer (10 x) ^B	5 μ l
	dNTP (2.5 mM)	25 μ l
	DMSO	5 μ l
	Taq polymerase (Cetus : AmpliTaq, 5U/ml)	0.125 μ l
	Primer 1 (TS-7 or 8, 50 mM)	1 μ l
	Primer 2 (TS-12, 50 mM)	1 μ l
	H ₂ O	2.875 μ l

RNA-PCR buffer (10x) ^A	500 mM Tris - HCl 12.8 mM MgCl ₂ 400 mM KCl 10 mM DTT	pH 8.3
DNA-PCR buffer (10x) ^B	100 mM Tris - HCl 21 mM MgCl ₂ 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2 % Gelatin	pH 8.8

プライマー・ペア

Outer primer として TS-51/TS-53、inner primer として TS-7/TS-12(野性型)あるいは TS-8/TS-12(変異型)を用いた。

(Outer primer pair)

TS-51 5'-TTC CCA TTA GTC CTA TTG A-3'

TS-53 5'-TGG ATA AAT CTG ACT TGC CC-3'

(Inner primer pair)

TS-12 5'-ACT TAG AAA TAG GGC AGC AT-3'

TS-7 5'-TGT TTT TTG TCT GGT GTG GT-3' (野性型、W)

TS-8 5'-TGT TTT TTG TCT GGT GTG AA-3' (変異型、M)

4. 結果

Figure 1 はキャリア 20-18 の AZT 使用前6ヶ月、使用后1、4、9、12、16ヶ月の耐性変異出現を各々W、Mプライマーを用いて調べた nested PCR の結果の1例を示している。2回目の PCR 終了後に 88bp の PCR 産物が得られる。AZT 使用とともに時間の経過に従って、WよりMへの移行、さらにWの消失している像が認められる。

5. 考察

我が国においても AZT、ddI、ddC が HIV キャリアの治療に用いられるようになり、薬剤の使用に際して簡単に耐性ウイルスの血漿中への出現を検出する方法が必要となった。今回用いた方法は結果が判るまで約 2日を要するが比較的簡単であり、一方 AZT 耐性出現は生体内において数時間を争うレベルで生じる問題ではないので、この方法は現実的に用いうる手段であると考えられる。

この方法を用いて 10人の HIV キャリアについて行った結果では、耐性株の出現と薬剤投与期間との関連性に対する明らかな結論は得られなかったが、AZT 耐性変異を示す genotype のウイルス株は巨細胞などの細胞変性効果(cytopathic effect)を起こしやすい phenotype である傾向にあり、ウイルス分離もされやすいことから、耐性株が検出されたキャリアでは体内の virus load の高いことが示唆される。このことから耐性株の出現は病気が進行する前の一つの兆候として深く関わっていることが推察される。従って耐性株が検出された時点で投与中止、あるいは他剤への変更、他剤との併用を検討するのが望ましいと思われる。耐性株出現の時期はキャリアによって異なり、野性株と耐性株の比率は同じキャリアでも様々であるため、実際個々のキャリアについて調べる必要がある。この方法は血漿中のウイルス RNA の分布を対象にし、直接血漿からビーズで RNA を効率良く分離できるので in vitro で培養する方法と比べて短時間で判定できる。In vitro で培養する方法では培養することによって in vitro で増殖しやすい株が選択される可能性があり、AZT のターゲットとなる血漿中 RNA の分布の方がより生体内の AZT 耐性を反映するものと思われる。

AZT 感受性、耐性株の両方が連続して検出された場合(W、M各々のプライマーを用いてその両方で目的とするバンドが確認された場合)、AZT が本当に効いているのかを知るためには quantitative PCR 法等を用いて血漿中ウイルス RNA を定量する必要がある。ddI や ddC 耐性検出についてもこの方法を応用することができる。また Dynabeads Oligo(dT)₂₅ で抽出した血漿中の mRNA を逆転写後、ビオチン化したプライマーを用いて nested PCR を行い、Dynabeads M-280 streptavidin を用いることによりクローニングせずに直接塩基配列決定を行うことも可能である²⁾。

6. 参考文献

- 1) Larder, B.A. and Kemp, S.D. 1989. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidobudine (AZT). *Science* 246 : 1155-1158.
- 2) Albert, J., Wahlberg, J., Lundeberg, J., Cox, S., Sandstrom, E., Wahren, B. and Uhlen, M. 1992. Persistence of Azidothymidine-resistant human immunodeficiency virus type 1 RNA genotype in posttreatment sera. *J.Virol.* 66 : 5627-5630.

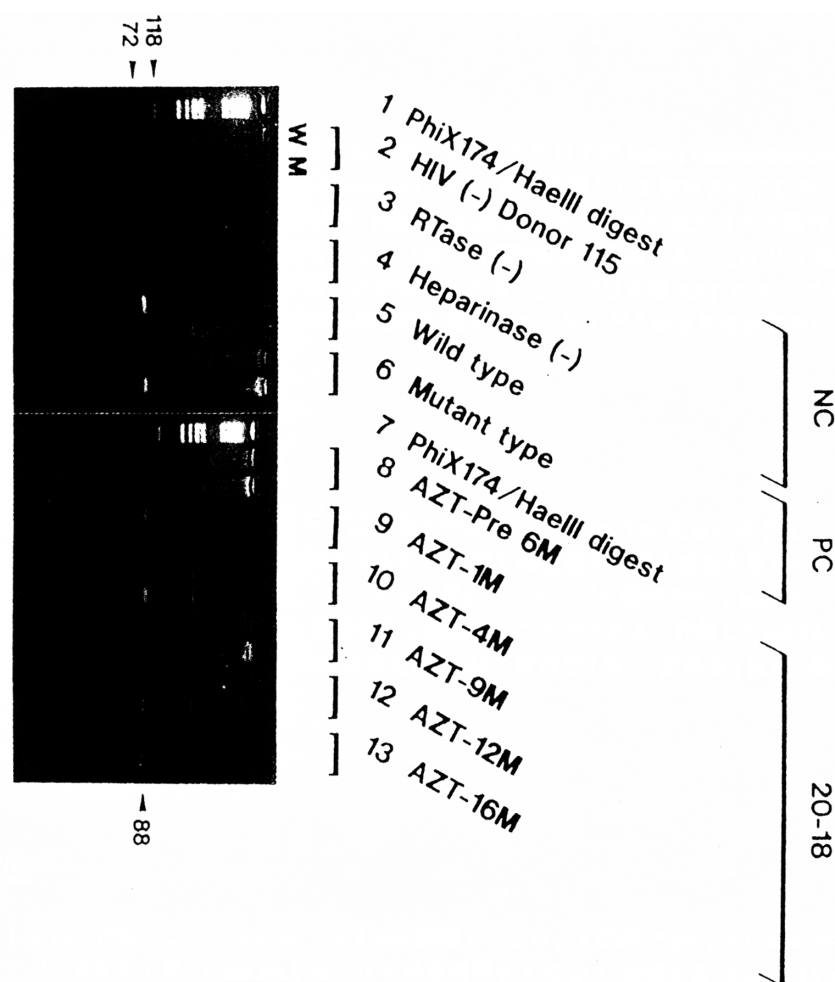


Figure 1. Nested PCR analysis of mutations at codon 215.

NC : negative control, PC : positive control,

lane 1, 7 : DNA size marker, lane 2 : anti-HIV-1 antibody negative sample, lane 5 : wild type,

lane 6 : mutant type positive control, lane 3 : wild type without reverse transcriptase,

lane 4 : wild type without heparinase, lane 8-13 : carrier 20-18.

お問合せは 日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL(03)593-3211【代】 FAX(03)593-3216