

氏名	富田 徳子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬学
学位授与番号	博乙第3063号
学位授与の日付	平成8年9月30日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)
学位論文題目	非放射性標識法を用いたヒトレトロウイルスの高感度検出法の開発と応用
論文審査委員	教授 山本 格 教授 亀井 千晃 教授 大森 晋爾 教授 丹羽 皓二 教授 大崎 紘一

### 学位論文内容の要旨

Human T-cell lymphotropic virus type I, type II (HTLV-I, -II) および human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) 等のレトロウイルス感染の検出には、通常、抗ウイルス抗体を測定する方法が用いられているが、感染初期で抗体が産生されていない検体の見逃しや、低力価領域では検査法の違いにより結果の不一致がみられるという問題があった。そこで、これらの検体について感染の有無を明らかにするためにヒトの遺伝子内に組み込まれたプロウイルス遺伝子の検出を試みた。しかしながら、キャリアの状態ではウイルス感染細胞がわずかしか含まれていないため高感度の検出法が必要である。そこで、polymerase chain reaction (PCR) を用いてプロウイルス遺伝子の一部を特異的に増幅させた後、ジゴキシゲニン標識したプローブと酵素標識した抗ジゴキシゲニン抗体を用いたELISA法で検出するという系を考案した。この方法により、HTLV-I抗体検査では非特異反応が疑われていた検体中にも真の陽性者がいることがわかった。また、この方法はHTLV-II、HIV-1の検出にも応用できた。さらに、HIV-1の逆転写酵素活性を放射性標識を用いず感度良く検出する系を開発した。この方法は、逆転写反応時に、ビオチンとジゴキシゲニンを相補的DNA鎖の両端に取り込ませ、ビオチン-ストレプトアビジンとジゴキシゲニン-酵素標識抗ジゴキシゲニン抗体の特異的反応を用いて検出し、さらに酵素的に発色を増幅させ感度を上げるものである。その結果、HIV-1感染者からのウイルス分離の確認ができ、また、培養上清中の逆転写活性すなわちウイルス量の経時変化を測定しウイルスの悪性度を知る手がかりを得ることができた。さらに、この方法は新規抗HIV-1薬の開発にも応用可能であった。

## 論文審査結果の要旨

ヒトT-細胞白血病ウイルスタイプIおよびタイプII (HTLV-I, II) 並びにヒト免疫不全症ウイルス (HIV-1) 等のレトロウイルス検出には通常、ウイルス抗体を測定するための種々な方法が用いられている。しかしながら、測定感度や妨害物質のため、初期感染や低力価領域での測定結果が、施設や検査法の違いにより一致しないことが認められている。上記の様なレトロウイルス感染の有無の結果は患者本人に与える影響は大きく、信頼できる測定法の開発が急務であった。

そこで、申請者は、ポリメラーゼチェーン反応(PCR)を用いてプロウイルス遺伝子の一部を増幅させ、それにジゴキシゲニン標識したプローブと酵素標識した抗ジゴキシゲニン抗体を用いたELISA法で検出する新しい方法を開発した。本測定法によりHTLV-I抗体検査では非特異的反応が疑われていた検体中にも真の陽性者のいることを明らかにされた。また、本法はHTLV-IIやHIV-1の検査にも応用できることが示された。

申請者はさらに、HIV-1の逆転写酵素活性を非放射性標識法を用いて感度よく測定できる系を開発した。この方法は、逆転写反応時にビオチンとジゴキシゲニンをcDNA鎖の両端に取り込ませ、ビオチン-ストレプトアビジンとジゴキシゲニン-酵素標識抗ジゴキシゲニン抗体の特異的反応を用いて検出し、さらに酵素的に発色を増幅し感度上昇を図ったものである。本手法は逆転写酵素活性のみならず、感染者からのウイルス分離の確認並びに抗HIV-1薬の開発にも応用できるものでその意義は大きい。

このように、申請者の開発した非放射性標識法を用いたレトロウイルスの検出法は、広く医療現場で応用されることが期待出来るものであり、よって本論文は博士論文に値することを認める。