82. PCR法を用いたDNAウイルス感染症の遺伝子診断の研究

DNA detection with Polymerase Chain Reaction (PCR) of DNA virus infections

埼玉県立小児医療センター 放射線部

○荒井 孝 山本 英明 小林 悟士
(Takashi Arai) (Hideaki Yamamoto) (Satoshi Kobayashi)
山口 明 池井 勝美
(Akira Yamaguchi) (Katsumi Ikei)

【目的】

サイトメガロウイルス (CMV) 感染症は、先天感染症と臓器移植時の感染が問題になっている。先天感染症は、中枢神経系障害、聴覚および知能異常、臓器移植時の感染は、不明熱、肺炎、肝炎などが知られている。CMV 感染症の診断は、主にウイルス分離と血清抗体検査によるが、いずれも結果を得るまでに長時間を要する。今回骨髄移植患児の尿中CMV の遺伝子検出に、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法の利用を試み検討を行った。

【方法および対象】

尿中からのDNA の抽出は、ガラスパウダー法を用いた。PCR 法のプライマーおよびプローブは、Yamaguchi¹⁾らが報告したMajor Immediate Early (MIE) のエクソン4 遺伝子領域、および 71Kのリン酸化タンパク質 (pp71) の遺伝子領域の 2種類を用いた。

PCR 法は、アニーリング温度、増幅回数について検討した。さらに、検出感度は陽性検体AD169 株のDNA を用い、10倍希釈系列にて行った。

対象は骨髄移植後患児から尿10検体を経時的に採取し、電気泳動法およびサザンブロット法にてCMV を検出した。

【結果および考察】

PCR 法は、DNA の変性が94℃、1.5分、プライマーの結合が60℃、2.5分、DNA の伸長が72℃、3.5分で30回の反復で良好な結果が得られた。また検出感度の検討では、MIE およびpp71領域の両プライマーとも電気泳動法では0.14pg、サザンブロット法では0.014pg までバンドが認められた。

骨髄移植患児尿は、PCR 法にて増幅後さらに電気泳動法による判定では、はっきりしたバンドは認められなかった。しかし、サザンブロット法ではMIE 領域で 6月 4日、11日、9月 3日、18日および10月 1日に採取された尿の 5検体からCMV に特異的なバンドが認められた。また同様な方法でpp71領域では、6月 4日、11日および 8月 6日に採取された尿 3検体からCMV に特異的なバンドが認められた (図1)。検出感度は、両プライマーと同等であったがCMV が検出された尿が 4検体で一致しなかった。これは、設定したプライマーが増幅する遺伝子領域の保存状態、プライマーの増幅条件の微妙な差によるものと考えられるが、さらなる検討が必要と思われた。

CMV の分離は、尿、唾液および咽頭ぬぐい液などを、ヒト胎児肺線維芽細胞に接種後、CMV 特異的細胞変性効果を観察することにより診断するため、通常1~4 週間を要する。今回検討したPCR 法は、従来の培養法に比べ、尿中CMV の検出が、迅速で高感度に鋭敏な方法であった。そして、骨髄移植患児の経過管理には特に有用と思われた。

図1. 骨髄移植患児の尿中CMV の電気泳動法およびサザンブロット法による検出結果

左: 電気泳動法 右: サザンブロット法
K: 陽性検体 (AD169) L: 陰性検体

参考文献: 1) Yamaguchi Y, et al.: J Virological Methods, 37:209-218, 1992