497. PCR法を用いた尿中サイトメガロウイルスの遺伝子診断

DNA detection of cytomegalovirus (CMV) in urine with polymerase chain reaction (PCR)

埼玉県立小児医療センター 放射線部

○小林 悟士

山本 英明

荒井 孝

(Satoshi Kobayashi)

(Hideaki Yamamoto)

(Takashi Arai)

小島 英之

池井 勝美

(Hideyuki Kojima)

(Kastumi Ikei)

【目的】従来、ウイルス感染症の診断にはウイルス分離や血清抗体検査等が用いられている。前者はウイルス増殖が非常に緩徐であるため分離までに1～4週間を要し、さらに手技的にも難しいとされている。また後者は感染してから抗体価が上がるのに10日前後かかると言われており、ウイルス感染の早期診断には必ずしも満足の行くものとは言えなかった。しかし近年 polymerase chain reaction (PCR)法が開発され、迅速に目的とするウイルス遺伝子を増幅し、検出できるようになった。今回、われわれは尿中サイトメガロウイルス (CMV) ゲノムの検出に PCR法を用い、従来のウイルス検査法との比較検討を行った。

【対象および方法】対象は当センター血液腫瘍科受診患児の尿33検体(12例)および健常児尿18検体(18例)とした。

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遺伝子領域を増幅し、電気泳動法およびサザンブロット法により判定した。また同時に測定された血清CMV抗体および尿中CMV培養(SRL社)との関連についても検討した。検出感度はCMV感染陽性細胞AD169株を用い、10倍希釈系列にて行った。

【結果および考察】検出感度の検討ではサザンブロット法で0.014pg/5μlまでバンドが確認でき検出可能であった。

2症例の臨床経過、ウイルス検査法ならびにPCR法の結果を表1、2に示した。

症例1: 自家骨髄移植患児(1歳男)の尿中CMVの培養は5月21日に検出されたが、8日目には検出されなかった。しかしPCR法により増幅後のサザンブロット法の判定では陽性であった。その後、14日目、28日目、42日目は培養およびPCR法の判定が一致した。培養の56日目は陰性であったが、PCR法による増幅後のサザンブロット法では陽性を示した。このことからPCR法は高感度にCMVの検出

表1

PCR 採取日	PCR 判定	培養 採取日	培養 判定	採取日	抗体 IgG	IgM
91. 5. 29	+	91. 5. 7	—	91. 5. 29	3+	—
6. 4	—	5. 21	+			
6. 18	—	5. 29	—	6. 18	3+	—
7. 2	+	6. 4	—	7. 2	3+	—
7. 16	+	6. 18	+	7. 16	3+	—
		7. 2	—			
		7. 16	—			

症例2: 自家骨髄移植患児(7歳男)の尿中CMVの培養はすべて陰性であったが、PCR法による増幅後のサザンブロット法による判定では6月4日に検出され、その後6月11日、9月3日、9月18日、10月1日と4回検出された。抗CMV-IgG抗体価は4+および3+であった(表2)。

PCR法を用いた患児の尿中CMVゲノムの検出結果は、33検体中13検体(39.4%)にCMVの遺伝子増幅が認められた。一方、健常児尿は18検体中1検体(5.6%)に遺伝子が検出された。PCR法にてCMVの検出された13検体中2検体のみから培養でウイルスが検出された。

以上より、今回検討したPCR法は、健常児に比べ患児からCMV MIE遺伝子が高率に検出され、しかも1～4日間以内で結果が得られ、従来の培養法に比べ感度・迅速性に優れ、臨床への応用の可能性が示唆された。

表2

PCR 採取日	PCR 判定	培養 採取日	培養 判定	採取日	抗体 IgG	IgM
91. 6. 4	+	91. 5. 29	—			
6. 11	+	6. 11	—	91. 6. 25	4+	—
		6. 25	—	7. 3	4+	—
7. 9	—	7. 9	—	7. 9	4+	—
7. 23	—	7. 23	—	7. 24	4+	—
8. 6	—	8. 6	—	8. 6	4+	—
8. 20	—	8. 21	—	8. 21	4+	—
9. 3	+	9. 3	—	9. 3	3+	—
9. 18	+	9. 18	—			
10. 1	+	10. 1	—	10. 1	4+	—

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