症 例

尿中に Human polyomavirus 感染細胞を認めた
インスリン依存型糖尿病患者の1例大阪通信病院第2臨床検査科病理¹⁾, 大阪細胞診ラボラトリーズ²⁾阿倉 薫¹⁾ 畠中 光恵¹⁾ 竹中 正治²⁾

インスリン依存型の52歳糖尿病男性の、尿中にみられた Human polyomavirus 感染細胞について報告した。昭和59年6月から昭和61年6月までの2年間に16回の細胞診を行い、すべての標本に少数の感染細胞が散見された。感染細胞の形態学的特徴は核の腫大とクロマチンの核縁への附着であった。核内は種々の濃度の好塩基性の核内封入体が見られ、細胞質は変性傾向が著明で、奇妙な形あるいは裸核様であった。核内封入体はフォイルゲン染色陽性で均一の染色性を示しウイルス粒子のもつDNAが反応した結果と考えた。電子顕微鏡的には核内に直径約40nmのウイルス粒子が散在性にみられた。

Pap. 染色標本を脱色後に同一標本を酵素抗体法で染色した。1次抗体に抗SV40 VP1家兎血清を用い、大部分の感染細胞の核のみが陽性反応を示した。この方法はきわめて特異性が高く、検査に要する時間も短くてすみ、Human polyomavirus 感染細胞の迅速診断にはきわめて有効であると考えられる。

Key words : Urine—Cytology—Human polyomavirus—Immunocytochemistry—
Diabetes mellitus

I. はじめに

Human polyomavirus は直径約45nmの小型球形のDNAウイルスで1971年 Gardner ら⁷⁾が腎移植患者の尿中からBKウイルスを、Padgett ら¹¹⁾が進行性多巣性白質脳症患者(PML)の脳からJCウイルスを分離したのが最初である。ヒトはこれらのウイルスの感染をおもに幼児期に受けるが、大部分は無症候性で成人の70~

80%が抗体を有している。また、体内に侵入したウイルスは免疫能の低下を契機として再活性化され、尿中ウイルスおよびその感染細胞が出現するものと考えられている。再活性化時も臨床的には無症状であるが、なかには尿管閉塞^{5,7)}、および尿管間質性腎炎¹²⁾などの存在が報告されている例もある。

1973年 Coleman ら²⁾によって、免疫抑制剤使用中の腎移植患者の尿中に Human polyomavirus 感染細胞の存在が記載されて以来、このような細胞は悪性腫瘍で化学療法中の患者、自己免疫不全、妊婦⁶⁾、腎炎¹⁰⁾、糖尿病⁹⁾などの患者の尿中にもみられることが報告されている。今回われわれは糖尿病患者の尿中に長期にわたってDecoy cell を認め、細胞免疫学的、ならびに電顕的検索で Human polyomavirus 感染細胞と同定し得た症例を経験したので報告する。

II. 症 例

患 者 : 52歳男性。公務員。昭和43年秋の職場検診

Detection of human polyomavirus-infected cells in the urine of a diabetes mellitus patient

Kaoru AKURA, C.M., I.A.C., Mitsue HATAKENAKA, C.M., I.A.C.

Second Department of Clinical Pathology, Osaka Teishin Hospital

Masaharu TAKENAKA, M.D.

Osaka Cytology Laboratories

論文別刷請求先 ☎543 大阪市天王寺区鳥ヶ辻2の6の40
大阪通信病院第2臨床検査科病理 阿倉 薫

昭和61年11月18日受付

昭和62年4月24日受理

で糖尿病を指摘され、内服薬と食事療法で血糖のコントロールを行っていたが、血糖のコントロールは困難で、昭和45年1月に急激な体重減少がみられたのを機会に入院し、インシュリン（24単位/日）による血糖コントロールに切り替えた。その後血糖のコントロールは徐々に困難になり、昭和49, 53, 55, 60年と入院し徐々にインシュリンの量が増加し、昭和61年6月現在では朝夕に18単位のインシュリン注射を受けているが十分な調整は得られていない。昭和55年頃からアルコールによる肝障害もみられるようになった。昭和61年6月の臨床検査成績は、総蛋白 6.6 g/dl, A/G 1.3, GOT 72 IU/l, GTP 50 IU/l, r-GTP 216 IU/l, 血清アミラーゼ 42 IU/l, 空腹時血糖値 306 mg/dl, 尿素窒素 15 mg/dl, クレアチニン 0.9 mg/dl, 総コレステロール 199 mg/dl, HbA1C 4.8%, HbA1 8.4%。尿糖（テストテープ）2 g/dl, 尿蛋白（アルブスティック）±。眼底検査は Scott II 度で小血管瘤および出血がみられた。

尿細胞診は昭和59年6月12日から昭和61年6月10日までの24ヵ月間に合計16回施行した。

III. 標本作製法

自然尿 10 ml を 1,500 rpm 5 分間遠沈。沈渣にサコマノ氏固定液を 4 ml 加えて 5~10 分間前固定を行った。さらに前固定液を 1,500 rpm 5 分間遠沈し、得られた沈渣をすべて1枚のスライドグラスに塗抹した。標本は自然乾燥後、95% アルコールで固定し、それぞれ Pap. 染色, PAS 染色, フォイルゲン染色を行った。免疫学的染色は Pap. 標本を脱色したものを用いた。電顕標本は、沈渣をグルタルアルデヒド、オスミウム酸二重固定後、エポン包埋を行い、超薄切片を作製して観察した。

IV. Human polyomavirus 感染細胞の 光顕所見

扁平上皮, 移行上皮, 変性細胞, 細胞質内封入体細胞, 白血球, 赤血球, 壊死物質などを背景にして, 感染細胞は孤立散在性で標本中に十数個から数十個認められた。一部では集簇していたがそれらの細胞間に結合性はみられなかった（図1~3）。核は腫大し類円形あるいは不正形で直径は 11~18 μm 。なかには2核の細胞もみられ、核クロマチンは変性して核縁に不規則な集塊として付着していた。核内には好塩基性の封入体があり大部分は核内一杯に広がっていた。色調は淡染しているもの（図1）、濃染しているもの（図2）、あるいはやや濃淡

のあるものなど種々であった。細胞質は変性傾向がきわめて強く、崩壊脱落して裸核状になるものが多かった。PAS 染色は核内封入体, 細胞質内封入体ともに陰性。フォイルゲン染色では感染細胞の核辺縁のクロマチン, 核内封入体ともに陽性（図4）、細胞質内封入体は陰性であった。

V. 細胞免疫学的検索

Pap. 染色標本のカバーグラスを除去し、0.1% 塩酸 70% アルコールで脱色後、酵素抗体法（PAP 法）を行った。1次抗体には Simian virus 40 を Sodium dodecyl sulfate (SDS) で破壊し、ウサギに免疫して得られたポリクロナール抗体（抗 SV40VP1）を用いた（国立予防衛生研究所・加藤賢三博士より分与された）¹³⁾。この抗血清は BK および JC ウイルスに特異的に反応することが蛍光免疫法で確認されている。感染細胞の核のみが陽性であった（図5）。

VI. 電顕所見

細胞は変性傾向が著しく、細胞質は大小の空胞化が著明で、核は腫大し内部に直径約 40 nm の小型球型ウイルスが散在性にみられた（図6）。クロマチンは不規則な集塊状で核膜に付着していた。これらの電顕所見から Human polyomavirus 感染が疑われた。

VII. 考 察

Human polyomavirus 感染細胞の形態学的特徴は、変性した細胞質と核内封入体にあり²⁾、前者は種々な程度の変性がみられ、顆粒状のもの、不規則な尾状のもの、核の周辺にわずかに付着しあたかも裸核状にみえるものまで種々である。後者については核内一杯に広がったりガラス状にみえるもの、核縁との間に明量がみられる“owls eye”状のもの³⁾、細かいビーズ状のものなどがみられる¹⁾。特に核内一杯に充満する濃染性の封入体をもった細胞は悪性細胞と非常に類似していて、Decoy cell と呼ばれ、膀胱上皮内癌から剝離してくる細胞との鑑別が重要である。この点について、Coleman は腫瘍細胞の核は粗顆粒状であるが、Human polyomavirus 感染細胞の核は Amorphous なのが特徴としている。本例では、核内封入体の大部分は著者ら¹⁾の分類の I 型に属するもので、好塩基性で濃染あるいは淡染しているものの特別の構造をもたず、形態学的には悪性細胞との鑑

図6 核内封入体細胞の電顕像, 核内に直径約 40 nm の小型球型ウイルスを散在性に認める

別は容易であった。また、諸家の電顕所見の記述では^{1,4,5)}、核内のウイルスが結晶化している場合、規則正しく並んでいる場合、鎖状に並んでいる場合、本例のように散在性にみられる場合などその存在状態や数も種々で、このウイルス粒子の存在状態と数の違いが光顕でみる封入体の多彩性、染色態度の相違として反映されているものと考えた。特にウイルス粒子が核内一杯に充満している場合、光顕では濃染した核内封入体として認識され、悪性細胞との鑑別が必要になってくる。

長尾ら¹⁰⁾の報告によると Human polyomavirus の大きさは Negative 染色では 43~48 nm であるが、超薄切片ではやや小さく 35~43 nm になるという。本例でもウイルスの直径は約 40 nm の球型であった。

感染細胞のフォイルゲン染色については、核辺縁のクロマチンおよび核内封入体ともに陽性であったが、核内封入体は Pap. 染色同様に無構造であった。このことは Human polyomavirus が DNA ウイルスであり、核内封入体に相当する部分にウイルス粒子が認められているところから、ウイルス自身の DNA が反応した結果と考えた。

Human polyomavirus 感染の同定には、電顕によるウイルス粒子の証明とウイルスの分離同定が不可欠であるが、これらの方法は手技的にも時間的にもきわめて煩雑で恒常的なものではない。1979年に田口ら¹⁴⁾が蛍光染色を用いて Human polyomavirus 感染細胞の同定を

行っているが、酵素抗体法ではまだその報告はみられない。今回われわれが行った酵素抗体法では、第1に Pap. 染色後の標本を用いることができる、第2に光学顕微鏡レベルで観察ができる、第3により迅速な同定が可能である、第4に永久標本が得られる、などで有用な方法と考えた。この方法に関しては蛍光抗体法を用いた、田口および Hogan⁸⁾ の記載と同様に核内のみが陽性であり、電顕の所見も核内のみにウイルス粒子が存在している点を考えあわせると、酵素抗体法陽性部位はウイルス粒子そのものと想定でき、きわめて特異性の高い方法である。

糖尿病患者の Human polyomavirus 感染については Kahan ら⁹⁾が成人発症型糖尿病4例を報告している。そのうちの2例は悪性腫瘍を伴い、食事制限のみで血糖のコントロールができ、ほかの2例についても食事制限と内服薬で血糖のコントロールができたと述べている。また、感染細胞の尿中への出現は短期間であり、糖尿病では一般的に細菌や真菌の感染を受けやすいのと同様に Human polyomavirus の感染がみられたのであろうとしている。本例も同様な状態の症例と思われるが、インシュリンを使用している点や長期間にわたって感染細胞が尿中に出現し続けている点などを考えあわせると Kahan らの報告と必ずしも一致せず、今後この症例の追跡と、同様な症例の蓄積をはかり検討を加えたいと思っている。

稿を終わるにあたり、症例のご提供を頂いた当院第1内科・大本潤子医長、電顕の標本を作製して頂いた大阪府立成人病センター・田中和彦技師、抗体を提供して頂いた国立予防衛生研究所・加藤賢三博士、また適切なご指導を賜りました大阪府医師会臨床検査センター・川井一男先生、大阪通信病院第2臨床検査科・岡本茂部長に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第28回日本臨床細胞学会総会（昭和62年・大阪）にて発表した。

Summary

Human polyomavirus-infected cells were detected in the urine of an insulin-dependent diabetes mellitus patient. Sixteen cytological specimens were obtained and examined in the two-year period from June 1984 to June 1986. All the specimens examined with Papanicolaou staining contained a few decoy cells in which the nuclei had homogeneous and basophilic inclusion bodies and heavy chromatin deposits on the inner margin of nuclear membranes.

These intranuclear inclusion bodies were positive for Feulgen reaction, suggestive of DNA-enriched material. The cytoplasm was scanty and degenerated.

Electron microscopic study revealed that the nucleus was packed with freely scattered small virus particles (approximately 40 nm in diameter). After destaining Papanicolaou preparations, immunocytochemical study was carried out using a polyclonal antibody against sodium dodecyl sulfate (SDS) disrupted SV40 virion (SV40VP1). The apparently positive cells were localized in the nuclei of the inclusion body-laden cells. The correlation of polyomavirus infection with diabetes mellitus is discussed.

文 献

- 1) 阿倉 薫・他：尿中に種々な核内封入体細胞を認め、Polyoma virus の感染を疑った1例、日臨細胞誌、22：838～844, 1983.
- 2) Coleman, D.V., et al. : Human polyomavirus infection in renal allograft recipients, Brit. Med. J., 18 : 371～375, 1973.
- 3) Coleman, D.V. : The cytodagnosis of human polyomavirus infection, Acta Cytol., 19 : 93～96, 1975.
- 4) Coleman, D.V., et al. : Human papovavirus in Papanicolaou smears of urinary sediment detected by transmission electron microscopy, J. Clin. Pathol., 30, 1015～1020, 1977.
- 5) Coleman, D.V., et al. : Human polyomavirus (BK) infection and ureteric stenosis in renal allograft recipients, J. Clin. Pathol., 31, 338～347, 1978.
- 6) Coleman, D.V. : The cytologic diagnosis of human polyomavirus infection and its value in clinical practice, Advance in clinical cytology, pp. 136～155, Butterworths, London, 1981.
- 7) Gardner, S.D., et al. : New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation, Lancet, 19, 1253～1257, 1971.
- 8) Hogan, T.F., et al. : Rapid detection and identification of JC virus and BK virus in human urine by using immunofluorescence microscopy, J. Clin. Microbiology., 11 : 178～183, 1980.
- 9) Kahan, A.V., et al. : Activation of human polyomavirus infection-detection by cytological technics, Am. J. Clin. Pathol., 74 : 326～332, 1980.
- 10) 長尾貞紀・他：Nephrotic syndrome の尿沈渣にみられたBK ウイルス様の papovavirus, 臨床とウイルス, 9 : 193～199, 1981.
- 11) Padgett, B.L., et al. : Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy, Lancet, 19 : 1257～1260, 1971.
- 12) Rosen, S., et al. : Tubulo-interstitial nephritis associated with polyomavirus (BK type) infection, N. Engl. J. Med., 308 : 1192～1196, 1953.
- 13) Shah, K.V., et al. : Common structural antigen of papovaviruses of the Simian virus 40-polyoma subgroup, J. Virol., 21 : 179～186, 1977.
- 14) 田口文章・他：BK ウイルス感染の迅速診断, 臨床とウイルス, 7 : 180～182, 1979.

図 1 核内に比較的淡染する封入体がみられる多数の感染細胞 (Pap. 染色, $\times 400$)

図 4 感染細胞のフォイルゲン染色で核辺縁のクロマチンと核内封入体が陽性 ($\times 400$)

図 2 核内に濃染した封入体がみられる感染細胞, 癌細胞との鑑別が必要になってくる (Pap. 染色, $\times 400$)

図 5 抗 SV40VP1 血清を用いた酵素抗体法 (PAP 法), 感染細胞の核のみが陽性 ($\times 400$)

図 3 核内一杯に広がる封入体がみられる (Pap. 染色, $\times 1,000$)