〈特集 2〉 細胞診材料を用いたウイルス診断

サイトメガロウイルス (CMV) 感染症の
迅速診断法の確立と骨髄移植への適応兵庫医科大学遺伝学¹⁾, 京都府立医科大学小児科²⁾, 宮崎医科大学微生物³⁾和歌山県立医科大学第2病理⁴⁾, 兵庫医科大学第2内科⁵⁾橋本 知子¹⁾ 外園 泰弘^{1,2)} 小川 敦子¹⁾ 栄鶴 義人³⁾覚道 健一⁴⁾ 古山 順一¹⁾ 武元 良整⁵⁾

サイトメガロウイルス (HCMV) の成人での顕性感染 (CMV 感染症) はまれであるが, 臓器移植, 特に骨髄移植の際の免疫抑制状態では, CMV による間質性肺炎が高い死亡率をもたらす。Ganciclovir (GANC) 投与で予後が改善されてきたが, 予防的長期投与は骨髄抑制の点より好ましくない。したがって GANC 投与には CMV 感染症の迅速診断が不可欠となるため, CMV-DNA を PCR で検出し CMV 感染症を確定診断する試みを行った。検体として, 末梢血・骨髄液・尿沈渣・唾液・気管洗浄液細胞の DNA を用い, PCR には CMV の V 領域のプライマーを使用し, 検体採取から約 4 時間での診断を可能とした。この PCR の結果はウイルス培養等の結果ともよく一致した。CMV 感染症の有無を骨髄移植後のスクリーニングとして行い, 陽性例にただちに GANC を投与し, 骨髄移植後の CMV 感染症による死亡を 0 とすることができた。

Key words : Cytomegalovirus (CMV) infection—Polymerase chain reaction (PCR)—Bone marrow transplantation—Interstitial pneumonitis—Ganciclovir (GANC)

I. はじめに

サイトメガロウイルス (human cytomegalovirus,

Polymerase chain reaction for detection of cytomegalovirus after bone marrow transplantation

Tomoko HASHIMOTO¹⁾, M.D., Ph.D., Yasuhiro SOTOZONO^{1,2)}, M.D., Atsuko OGAWA¹⁾, Yoshito EIZURU³⁾, Ken-ichi KAKUDO⁴⁾, M.D., Ph. D., Jun-ichi FURUYAMA¹⁾, Ph. D., Yoshinobu TAKEMOTO³⁾, M.D., Ph. D.

¹⁾Department of Genetics, Hyogo College of Medicine

²⁾Department of Pediatrics, Kyoto Prefectural University of Medicine

³⁾Department of Microbiology, Miyazaki Medical College

⁴⁾IInd Department of Pathology, Wakayama Medical College

⁵⁾IInd Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine

論文別刷請求先: ☎ 663 兵庫県西宮市武庫川町 1-1 兵庫医科大学遺伝学 橋本知子

平成 5 年 3 月 18 日受付

平成 5 年 6 月 18 日受理

HCMV) はヘルペスウイルス科の DNA ウイルスで, 成人の 90% が不顕性に感染している。初感染後, CMV は終生体内に存続するが, 顕性の感染として発症することはまれである。しかし, 免疫不全状態では, 不顕性感染の CMV が顕性の感染症を引き起こすことがある。特に間質性肺炎 (CMV interstitial pneumonitis, CMV-IP) が高い死亡率をもたらすことでよく知られている。免疫不全をもたらす原因としては, 後天性の免疫不全状態 (AIDS など) のほか, 抗癌剤治療や臓器移植の際の免疫抑制剤投与があげられる。われわれは臓器移植のひとつ, 骨髄移植に携わっているが, 移植の際の免疫抑制剤投与に加えて放射線照射を併用することも多く, 免疫担当細胞の減少が著しい。骨髄移植症例では間質性肺炎の 50% を CMV-IP が占め, その死亡率は 90% と, ほかの臓器移植に比べて著しく高い¹⁾。骨髄移植症例では移植後約 25 日でウイルス血症²⁾, 移植後約 50 日で CMV-IP

が発症することが多い。

CMV 治療には1990年からganciclovir (9-(1,3-dihydroxy-20 propoxymethyl)guanine, GANC) を用いることができるようになり、早期治療が可能な場合はその予後が改善されてきた。しかし、この薬剤は長期投与により骨髓抑制が必発であり、CMV-IPの予防を目的としたGANCの長期投与は、ほかの臓器移植では推奨されているが骨髓移植後には好ましくない。したがって、GANCを効果的に投与するにはCMV 顕性感染 (CMV 感染症) の診断が不可欠といえる。

CMV 感染症の診断にはウイルスの分離法が最も特異的で診断確定に有効であるが、1ヵ月以上の期間を要し、早期からの治療方針決定には有効ではない。また、血清中のCMV 抗体価の上昇による診断、CMV 特異抗原の検出、細胞質内封入の病理学的な検出はinformativeでないことが多く、またいずれも数日から数週間の日数を要する。CMV 前初期抗原・初期抗原をモノクローナル抗体で染色して観察する直接免疫ペルオキシダーゼ法やMicro Track 法はサンプリングの翌日には結果が判定でき、迅速性に優れているが、判定に熟練を要する。そこでわれわれは、CMV 感染症をCMV-DNAを検出することで確定診断することを試みた。

II. CMV-DNA の検出法の検討

CMV-DNA の検出には、PCR (polymerase chain reaction) 法が報告されていたが³⁾、シグナルの検出にはハイブリダイゼーションが必要で迅速性の点から問題が残ったため、ハイブリダイゼーションを行わずにすむ診断法を検討した。また、PCR のテンプレートとなるDNAの抽出法にも検討を加えた。

1. 検 体

骨髓移植患者の末梢血 (PB)、骨髓液 (BM)、尿、唾液、肺胞洗浄液 (BALF) を用いた。陽性コントロールとしてCMV-AD 169株DNAを用いた。

ヘパリン採血したPB、BMはPBS (-) で2-4倍に希釈、バッフィーコート部分を血漿を含めてデイスポ遠沈管にとり、PBS (-) で3回洗浄する。ヘパリンはPCRを阻害するので、この洗浄は3回行ったほうがよい。赤血球が多い場合は溶血試薬で溶血し、同様に洗浄する。5×10⁵ ないし5×10⁶ 細胞を用いた。BALFはデイスポ遠沈管にとり遠心、沈渣細

胞を用いた。尿は10~20 ml を、唾液は採取できた量をデイスポ遠沈管をとって遠心、沈渣細胞をPBS (-) で3回洗浄して用いた。

2. DNA 抽出

1. フェノール・クロロフォルム法: PBS (-) に再浮遊した細胞にSDS (1%) とproteinase K (200 µg/ml, Sigma) を加えて55°C 1時間、37°C 12~16時間インキュベートし、等量のフェノール・クロロフォルムで3回抽出した。DNAをエタノール沈澱して回収し、十分量の70% エタノールで2回洗浄後、蒸留水に溶解した。

2. Iso Quick Nucleic Acid Isolation Kit (Micro Probe 社, タネハシ取扱い) を用いる方法: PBS (-) 100~200 µl に再浮遊した細胞を2倍量のグアニジウムイソチオシアネート液 (6 M guanidine isothiocyanate (BRL), 10 mM Na-citrate pH 7.0, 0.5% sarkosyl (いずれも和光純薬) 100 ml に2-mercaptoethanol 0.71 ml を加えたもの) で溶解、Kitの2液、3液をプロトコールに準じて700 µl, 400 µl 加え、1分間ボルテックスし、室温で10分間遠心する。上清に1/10量の3 M 酢酸ナトリウム液 (pH 6.5) を加え、等量のイソプロピルアルコールでDNAを沈澱させ、十分量の70% エタノールで2回洗浄後、蒸留水に溶解した。

3. 電子レンジによる加熱法: 一部の尿検体は沈渣をPBS (-) 洗浄後、蒸留水 (50~200 µl) に再浮遊し、電子レンジで5分間加熱して用いた。

3. PCR プライマーとハイブリダイゼーションブロー

CMV ゲノムのimmediate early (IE)⁴⁾、late antigen (LA)⁵⁾、AD 169株DNAのHindIII V領域⁶⁾の3部位を用いた (図1)。それぞれ、159 bp, 139 bp, 305 bpのPCR産物が期待された。

4. PCR 反応

50 µl の系で行った。Taq polymerase はParkin-Elmer-Cetus社のAmpliTaqを1ユニット、添付の10×bufferを用いた。dNTP (各1.25 mM) (Pharmacia)、プライマーはIE-1と-2、La-1と-2、Vp-1と-2の組み合わせで各100 ngとした。DNAは0.1~1 µg、尿の電子レンジ加熱検体は1~10 µlを加えた。

PCR条件は、熱変性94°C 1分、アニーリング60°C 30秒、エクステンション72°C 30秒としていたが⁷⁾、1992年より、AmpliTaqの熱耐性の向上のデータに

図1 HCMV ゲノム DNA と PCR プライマー

I : LA : late antigen 領域, IE : immediate early 領域, V : Hind III V 領域

II : PCR プライマーとプローブオリゴマーの塩基配列

ともなっており、熱変性 95°C 30 秒、アニーリング 60°C 10 秒、エクステンション 72°C 30 秒と改変した。サイクル数は 50 とした。機器は Parkin-Elmer-Cetus 社の DNA Thermal Cycler を用いた。

5. PCR 産物の検出

1. エチジウムブロマイド (ethidium bromide, EtBr) による染色: PCR 後のサンプル 10 μ l を Nu-Sieve GTG agarose 2% と SeaKem agarose 1% (いずれも FMC) を用いて EtBr (0.1 μ g/ml) を加えた TAE バッファーで作製したミニゲル (Mupid gel, コスモバイオ) で 100 V, 20~30 分電気泳動した。泳動後トランスイルミネーターで観察、ボラロイドカメラで写真撮影した。

2. サザンブロットハイブリダイゼーションによる検出: 上記の電気泳動後のミニゲルを 0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl 中で 30 分間ソーキングし、10 XSSC を用いてナイロンメンブラン (HyBond N, Amersham) に 4 時間以上サザントランスファーした。その後メンブランを 5 XSSC でリンス、濾紙上にとり、電子レンジで 2 分ペーキングを行った。メンブランをプラスチックバッグに入れ、ハイブリダイゼーション液 (5 XSSC, 10 XDenhardt's solution, 1% SDS, 100 μ g/ml sonicated denatured salmon sperm DNA (Sigma)) を加え、50°C 5 分間プレハイブリダイゼーションを行う。プローブは 100 ng を 32 P- γ ATP 50 μ Ci (Amersham) で T4 kinase (タカラ) を用いて 37°C 30 分インキュベートし 5'-末端標識して作成した。新たなハイブリダイゼーション液 5~10 ml にプ

ローブを加え、50°C で 4 時間以上ハイブリダイゼーションを行った。その後メンブランは 0.2 XSSC, 0.1% SDS で 40°C, 20 分 3 回洗浄し、X 線フィルムに感光させた。

III. 結果と臨床への利用

1. 3 種類のプライマーの比較

AD 169 株 DNA では、3 種いずれのプライマーでも、期待されたサイズのバンドがバックグラウンドなしに EtBr 染色のみで確認できた (図 2 A, C, 図 3 A)。しかし、患者検体 DNA を用いると、IE, LA 領域プライマーでは、種々のサイズの PCR 産物が増幅され (図 2 A, C), EtBr 染色のみでの特異バンドの確認は不可能であった。サザンハイブリダイゼーションを行うと、陽性コントロールと同じサイズのバンドが検出された (図 2 B, D)。一方、V 領域プライマーを用いると、バックグラウンドが少なく、陽性バンドが EtBr 染色のみで明瞭に確認でき (図 3 A), サザンハイブリダイゼーションでも同様の結果が得られ、検出感度にも差が認められなかった (図 3 B)。

このように V 領域プライマーを用いるとハイブリダイゼーションを行わずに診断が可能となった。その理由として、V 領域プライマーは CMV ゲノム DNA がヒトゲノム DNA と相補性を持たない領域に由来することがあげられよう (図 1)。すなわちプライマーが非特異的にアニールすることがなく、CMV-V 領域 DNA が効率よく増幅されるものと考えられる。

また、PCR のサイクル数を 35 回、40 回、50 回として検討したが、35、40 回では陽性バンドが検出されない、もしくは明瞭に写真上で確認されないことがあったため、50 サイクルとした。酵素活性が高温で十分保たれないことが問題にされることもあるが、われわれの方法の温度・時間設定を行った場合、70 サイクルまでは十分に増幅できることを確認している。陽性バンドが明瞭でない時の確認法として、re-

amplification がしばしば用いられている。しかし、すでに 100 万倍以上に増幅されている DNA を PCR チューブを開けてとりだす操作は、操作にきわめて慎重を要し、しかも陰性検体を汚染し false positive をもたらす危険性が大変強い。この点からも一般的に用いられる 35 サイクルを用いず 50 サイクルとし re-amplification を避けた。

2. 陽性率と不顕性感染の検出

PCR による診断を直接免疫ペルオキシダーゼ法⁸⁾、ウイルス分離法と比較し表 1 に示した。尿の検体の一部をのぞき、結果は一致した (表 1)。

骨髄移植患者で移植前に PB、BM、尿を検査しているが、陽性例は見出されていない。骨髄移植ドナーの PB の検索も移植前に行っているが、それでも陽性例は見出されていない。このことから、われわれの検討では CMV 感染の診断の際つねに問題とされる不顕性感染状態での CMV-DNA 検出の可能性は少ないと考えられた。

図 2 IE, LA 領域プライマーを用いた PCR による CMV-DNA の検出

A: IE 領域の PCR 産物, EtBr 染色, B: IE 領域の PCR 産物をプローブでハイブリダイゼーションとして検出したオートラジオグラフィー, C: LA 領域の PCR 産物, EtBr 染色, D: LA 領域の PCR 産物をプローブで検出したオートラジオグラフィー

図 3 V 領域プライマーを用いた PCR による CMV-DNA の検出

A: EtBr 染色を行った PCR 産物, B: PCR 産物をプローブでハイブリダイゼーションして検出したオートラジオグラフィー

表 1 CMV 診断法の比較

症例	骨髄移植後 日数	PCR			直接免疫ペルオキシダーゼ法			ウイルス分離		
		BAL	PB	U	BAL	PB	U	BAL	PB	U
1	33	+	+	+	+	+	-	+	+	-
2	32	+	-	-	+	-	+	+	-	+
3	398	+	-	+	+	-	NT	+	-	NT
4	46	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-

BAL: 肺胞洗浄液細胞, PB: 末梢血白血球, U: 尿沈渣細胞, NT: 検査せず

症例 3 は IP 臨床症状を認めたため検査を施行した。ほかの 5 例は無症状の時期に検査した

3. 結果判定に要する時間と予後

細胞を得てから結果判定までの時間を検討した。DNA 分離に関しては、フェノール・クロロフォルム法を用いると、proteinase K 処理に 12 時間近くを要する。尿沈渣細胞に関しては、電子レンジ処理で大幅に PCR テンプレート調整時間を短縮できた。しかし検体によっては塩が多く混入していることがあり、1 例で PCR 陰性、直接免疫ペルオキシダーゼ法陽性例があったことから (表 1)、このような不純物が PCR 反応を阻害した可能性が考えられた。

そこでわれわれは DNA 抽出の市販キットを用いた。DNA の purity をあげるとともに、数検体なら DNA 分離時間を 30 分とすることができた。DNA 抽出が簡便化されたことにより同一患者で複数の検体を経時的に検索しスクリーニングで見逃しなく診断することが容易となった。

以上から、細胞が得られれば、DNA 抽出に 30 分、PCR 反応液調整に 10 分、PCR に 2 時間、アガロースゲル電気泳動に 30 分、結果判定に 10 分と 4 時間以内に結果が判定できた。

4. PCR による迅速診断の臨床への利用と効果

表 1 の症例のうち PCR 陽性の 3 例のうち 1 例が明らかな IP 像を認めた。ほかの 2 例では、IP は認められなかったものの、CMV 感染症の症状である骨髄抑制による白血球減少を認めた。BALF で PCR 陽性が確認された後、GANC を投与し、3 例とも陰性化を確認した。1 例は白血病再発のため死亡したが、2 例は CMV 感染症再発もなく生存している。ウイルス血症は骨髄移植後の 25 日以降に発生²⁾、CMV-IP が最も発症するのは移植後の 50 日前後であることから、われわれは移植後 30~35 日に IP 症状が見出されなくてもスクリーニング検査として BALF 採取を行うこととした。この結果、クリーニング BALF 採取で 9 例中 3 例の陽性が見出され、ただちに GANC 投与を開始、PB、BM など PCR 陰性となるまで投与を継続した。われわれの施設で PCR 法を診断に利用してから以降 PCR 陽性 12 例が見出されているが、CMV 感染症が直接の死亡原因となった症例はなく、われわれの迅速診断法はきわめて有効であったと考えている。

IV. おわりに

以上のようにわれわれの CMV 感染症迅速診断は抗

CMV 剤投与の決定にきわめて有効であった。治療中に免疫不全状態を引き起こす可能性がある場合には、非侵襲的に検体が得られる PB、尿、唾液細胞から CMV-DNA を定期的にスクリーニングし、必要に応じて BM、BALF 細胞を得て診断を迅速に確定することが推奨される。

CMV 感染症診断には CMV 感染が疑われる臓器のバイオプシー標本から DNA を抽出することが推奨されているが³⁾、われわれが肺剖検材料から DNA 抽出し検出したところ、乳児を除き成人のほぼ全例で PCR 陽性で (橋本、未発表データ)、成人の CMV 感染症診断に肺バイオプシー標本を用いるにはさらに検討を要するものと考えられる。

Summary

For rapid detection of an active stage of human cytomegalovirus (HCMV) infection, the polymerase chain reaction (PCR) technique was used to amplify CMV-DNA existing in cells of patients after bone marrow transplantation (BMT). DNAs were extracted from peripheral blood leukocytes, bone marrow cells, urine sedimentation cells, bronchoalveolar lavage fluid cells, and salivary cells using a DNA isolation kit and 0.1 - 1 μ g of DNA was used for PCR. PCR-primers had CMV-specific sequences corresponding to the HindIII V-region of CMV, and PCR-amplified bands were detected by agarose gel electrophoresis. Therefore, in order to detect CMV-DNA, four hours were required after sample collection.

All samples found to be CMV-positive by PCR were also positive by both direct immuno-peroxidase staining and CMV isolation using cultivation. Although approximately 90% of adults are reported to have latent CMV infection, no bands were amplified from samples obtained from normal adults or from patients before BMT. Since interstitial pneumonia caused by CMV is highly lethal for post-BMT patients, we periodically screened for active CMV infection in these patients by PCR. When patients were found to be CMV-positive, ganciclovir was administered until CMV-DNA was no longer detected by PCR. Twelve post-BMT patients were found to have active CMV infection without symptoms, and all of them survived after rapid diagnosis followed by ganciclovir administration. Consequently, the rapid diagnostic method described here was valuable for determining whether ganciclovir should be prescribed for these patients.

文 献

- 1) Meyers, J.D., Flournoy, N., Thomas, E.D. : Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J. Infect. Dis.*, 153 : 478~488, 1986.
- 2) Müller, C.A., Einsele, H. : Influence of human cytomegalovirus on immune reconstitution after bone marrow transplantation. *Ann. Hematol.*, 64 : A 142~150, 1992.
- 3) Shibata, D. : Detection of human cytomegalovirus. pp 368~371, in PCR protocols, Academic Press, Ed. by Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J., 1990.
- 4) Sternberg, R.M., Thomsen D.R., Stinski, M.F. : Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *J. Virol.*, 40 : 190~199, 1984.
- 5) Pande, H.S., Baak, S.W., Riggs, A.D., et al. : Cloning and physical mapping of a gene fragment coding for a 64-kilodalton major late antigen of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81 : 4965~4969, 1984.
- 6) 母坪智行, 吉田幸一 : Polymerase chain reaction 法によるヒトサイトメガロウイルス DNA 検出法の開発. *札幌医誌*, 59 : 159~163, 1990.
- 7) 武元良整, 橋本知子, 柴鶴義人・他 : サイトメガロウイルス感染症の迅速 DNA 診断. *移植*, 27 : 745~751, 1992.
- 8) Eizuru, Y., Minematsu, T., Minamishita, Y., et al. : Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection by direct immunoperoxidase staining with human monoclonal antibody against an immediate-early antigen. *Microbial Immunol.*, 35 : 1015~1022, 1991.
- 9) 柴田元博 : PCR 法を用いた CMV 感染症の遺伝子診断. *日本臨床*, 1992 年特別号, 感染症—遺伝子診断と分子疫学 : 170~175, 1992.