原 著

同種骨髓移植患者末梢血におけるサイトメガロウイルス DNA の PCR による検出：CMV 抗体陰性血液輸血との関連

権 吉源¹⁾ 池田 久實¹⁾⁷⁾ 高橋 恒夫¹⁾ 加藤 俊明¹⁾
笠井 正晴²⁾ 比嘉 敏夫²⁾ 石川 順一³⁾ 今村 雅寛⁴⁾
工藤 亨⁵⁾ 河野 通史⁶⁾ 関口 定美¹⁾

北海道赤十字血液センター¹⁾, 札幌北楡病院内科²⁾

北海道大学医学部小児科³⁾, 第三内科⁴⁾, 札幌医科大学医学部小児科⁵⁾

市立札幌病院第二内科⁶⁾, 旭川医科大学臨床検査医学⁷⁾

(平成 6 年 3 月 4 日受付)

DETECTION OF CYTOMEGALOVIRUS DNA IN PERIPHERAL BLOOD OF ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANT PATIENTS BY THE NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION

Kil-Won Kwon¹⁾, Hisami Ikeda¹⁾⁷⁾, Tsuneo A. Takahashi¹⁾, Toshiaki Kato¹⁾, Masaharu Kasai²⁾,
Toshio Higa²⁾, Yorikazu Ishikawa³⁾, Masahiro Imamura⁴⁾, Toru Kudoh⁵⁾,
Michifumi Kono⁶⁾ and Sadayoshi Sekiguchi¹⁾

¹⁾Hokkaido Red Cross Blood Center

²⁾Department of Internal Medicine, Sapporo Hokuyu Hospital

³⁾Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine

⁴⁾The Third Department of Internal Medicine, Hokkaido University School of Medicine

⁵⁾Department of Pediatrics, Sapporo Medical University School of Medicine

⁶⁾The Second Department of Internal Medicine, Sapporo City General Hospital

⁷⁾Department of Laboratory Medicine, Asahikawa Medical College

In order to investigate the contribution of transfusion to CMV infection, 20 CMV-seropositive and 3 seronegative patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation were studied for their CMV infection. All the patients received cellular blood component transfusion through a leukocyte depletion filter. CMV infection is defined as positive results with a nested double polymerase chain reaction (PCR) and/or IgM antibody testing. Blood samples of 10 healthy marrow donors and 10 pretransplant patients were available for PCR examination. No CMV-DNA was demonstrated. In contrast, among a total of 122 peripheral blood specimens from the 23 posttransplant patients, 51 from 14 patients were positive for CMV-DNA. Of 20 seropositive patients, 15 were transfused with CMV-seronegative blood which consisted of 14.3% of blood donors and 5 were transfused with CMV-unscreened blood. Four (80%) of the latter 5 seropositive patients showed CMV infection. Of 15 seropositive patients transfused with CMV-seronegative blood, 11 (73.3%) exhibited CMV infection. There was no significant difference in the incidence of CMV infection between the two seropositive patient groups (Fisher's exact probability test). In most cases, CMV infection occurred after 30 days post BMT. Interstitial pneumonia developed in two seropositive patients who had received CMV-seronegative blood products, and had positive results on both PCR and IgM testing. Regardless of transfusing

CMV-unscreened or seronegative blood, none of the seronegative patients were infected with CMV. Our present observations suggest that the CMV-seronegative blood component contributes little if any to prevent seropositive patients from CMV infection.

緒 言

骨髄移植 (BMT) 後のサイトメガロウイルス (CMV) 感染症を予防する手段のひとつとして輸血血液を CMV 抗体陰性製剤に限定することがあげられる。特に患者が CMV 抗体陰性の場合には、CMV 抗体陰性血流製剤の絶対的適応とされている^{1)~3)}。一方、CMV 抗体が移植前に陽性の患者に対しては陰性血液使用の適応があるか否かについては明確な見解が存在しない。欧米では陰性血液輸血の必要性が特に考慮されていないが、本邦では抗体陽性者に対しても抗体陰性血液製剤が CMV 感染症予防に同じく有効とする報告⁴⁾が見られる。

CMV 浸淫の高い本邦においては、骨髄移植を行っている医療機関からの抗体陰性血液供給の要請に対し、血液センター側で充分量の陰性血液を用意することに困難を伴う場合がある。またその抗体陰性血液の適応に関しても上述のように相反する対応がなされている状況である。そこで本研究では既に CMV 抗体が陽性の患者への抗体陰性血液輸血が、同種骨髄移植後の CMV 感染顕在化、再感染防止にどのように影響し、効果を有するかを検討する目的で、移植後の患者検体から CMV-DNA 検出を行ったので報告する。

対象と方法

1. 被験患者

被験者は北海道赤十字血液センターで調製されたシングルドナーアフェレーシス由来血小板製剤を使用した同種骨髄移植患者である。医療機関より要請のあった患者に対しては、アフェレーシス血小板製剤、濃厚赤血球製剤ともに CMV 抗体陰性のものが供給された。その中で、BMT 後に末梢血検体を採取し得た CMV 抗体陰性血液輸血患者 17 例、未スクリーニング血液輸血患者 6 例の計 23 例を対象とした。その内訳を Table 1 に示した。両群の患者における当センター調製アフェレーシス血小板製剤の平均輸血回数は、本検討期間内で

Table 1. Patient characteristics

	Transfused blood	
	CMV-seronegative	Unscreened
Total patients	17	6
Sex (male : female)	14 : 3	4 : 2
Median age (y) (range)	17 (3-38)	25.5 (9-35)
Underlying disease		
ALL	7	2
ANL	3	2
CML	3	1
AA	3	0
Lymphoma	1	1

前者が15.3回、後者が15.9回であった。なお、白血球除去赤血球製剤以外の血球製剤は全てベッドサイドで白血球除去フィルター (旭メディカル社製セパセル R-500, セパセル PL-10, Pall 社製 PL100) を通して患者に輸血された。また、患者は全例とも CMV 感染症予防のため CMV 抗体高力価の γ -グロブリン製剤の投与を受けていた。

2. CMV 抗体の測定

献血者血液からの抗体陰性輸血用血液は CMV 抗原感作ゼラチン粒子を用いた凝集法 (PA)⁵⁾でスクリーニングし、CMV 抗体 EIA「アボット」(ダイナボット) で陰性であることを確認した。骨髄移植患者検体についてはエンザイグノストーサイトメガロ EIA (ヘキストジャパン) により IgG, IgM 抗体を分別測定した。

3. CMV-DNA の検出

既報⁶⁾のように CMV ゲノムの前初期抗原コード領域 exon 4 を標的とした二重ポリメラーゼ連鎖反応増幅法 (PCR) を実施し、420塩基対 (bp) の増幅産物の有無をアガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色により検討した。この増幅産物は内部に制限酵素 Bgl II の反応部位を有しており (Fig. 1A), 酵素消化により 150bp と 270bp の二つの断片を生ずることで増幅産物の特異性を確認した。

4. CMV 感染の定義

Fig. 1 (A) Amplification of the CMV-IE region by the nested double PCR. (B) Specific PCR product confirmed by restriction enzyme (Bgl II) digestion.

骨髓移植患者より得られた検体で、上述のPCRおよびIgM抗体EIAの一方または両方が陽性となった場合、これを本検討では「CMV感染」と定義した。この定義は別報⁶⁾⁷⁾の如く今回用いたPCRの系では健康人においてCMV-DNAの有意な増幅がみられないこと、また特異的IgM抗体はウイルスの初感染、再活性化時の重要な血清学的マーカーであることに基づく。

5. 有意差検定

Fisherの直接確率計算法により $p < 0.05$ の場合を有意とした。

結 果

1. BMT関連末梢血検体からのCMV-DNA検出

移植後の患者では23例の計122検体中、14例51検体がPCR陽性となった。これらの検体の増幅産物は制限酵素Bgl II消化により270bpと150bpのバンドを生ずることから、CMVゲノムに由来する特異的増幅産物であることが確認された。その代表例をFig. 1Bに示した。一方、対照群としてPCRによる検討が可能であった健康な骨髓ドナー10例(内CMV抗体陽性者7例)およびBMT施行前の患者10例(同9例)の末梢血検体では

CMV-DNAは全例検出されなかった。

2. BMT後の患者における輸血血液別CMV感染頻度

BMT患者をCMV-Ab(-)血液輸血群と未スクリーニング血液輸血群とに分け、末梢血液でのPCRの結果をFig. 2, Fig. 3に時系列で示した。CMV-IgM抗体は、前者群においてPCRが陽性であった2例(#34, #37)とPCR陰性の#50の計3例で検出され、後者群ではPCR陽性の1例(#36)で検出された。

CMV感染が認められた患者数をBMT患者、骨髓ドナーおよび輸血血液のCMV抗体の有無で分類してTable 2に示した。移植前にCMV抗体陰性であった患者3例(#27, #30, #39)においては、未スクリーニング血液が輸血された1例(#39)も含めてPCRは陰性であった。一方、移植前にCMV抗体陽性の患者では骨髓ドナーもCMV抗体陽性の場合、輸血血液の違いによる感染頻度(8/11 vs 4/4)に差は認められなかった($p = 0.36$)。骨髓ドナーがCMV抗体陰性の場合例数が少ないため比較できないが、抗体陰性血液の輸血を受けた患者4例中3例にCMV感染がみられた。輸血血液の要因のみを考慮して検討すると

Fig. 2 Detection of CMV-DNA in BMT patients receiving CMV-seronegative blood products. + or - indicates CMV serostatus in BMT recipient (R) and donor (D).

Table 3 に示したように、抗体陽性の患者においては輸血血液の CMV 抗体の有無に関わらず CMV 感染頻度に有意差を認めなかった (p=0.63)。

Fig. 3 Detection of CMV-DNA in BMT patients receiving CMV-unscreened blood products. + or - indicates CMV serostatus in BMT recipient (R) and donor (D).

CMV 感染症は、追跡期間中に CMV-DNA、IgM 抗体ともに陽性となった #34 の患者で移植後約 60 日目以降に、また #37 の患者で移植後 29 日目に間質性肺炎の発症がみられた。

3. IgM 抗体の消長

経時的に複数の血清検体について検討しえた患者 #34、#36、#50 における CMV-IgM 抗体の消長を Fig. 4 に示した。移植直後より PCR が陽性であった #34 の患者では、IgM 抗体はそれより遅れて約 50 日から 80 日目にかけて検出され、この IgM 抗体出現中に間質性肺炎の発症がみられた。#36 の患者においても IgM の出現より CMV-DNA の検出が先行した。しかし #50 の患者では IgM 抗体の出現の有無に関わらず、本検討で用いた PCR では CMV-DNA は検出されなかった。

Table 2 Incidence of CMV infection in allogeneic bone marrow transplant patients

CMV serostatus	Transfused blood	No. of patients	CMV infection			
			Total	PCR (+)/IgM (+)	PCR (+)/IgM (-)	PCR (-)/IgM (+)
R +	D +	CMV-Ab (-)	11	8	0	8
		Unscreened	4	4	1	3
R +	D -	CMV-Ab (-)	4	3	2	0
		Unscreened	1	0		1
R -	D +	CMV-Ab (-)	1	0		
		Unscreened	Nil			
R -	D -	CMV-Ab (-)	1	0		
		Unscreened	1	0		

R (recipient) : D (donor)

Table 3 Incidence of CMV infection in CMV sero-positive patients having received allogeneic bone marrow transplantation

Transfused blood	No. of patients	CMV infection ¹⁾ (%)
CMV-Ab (-)	15	11 (73.3) *
Unscreened	5	4 (80.0) *

¹⁾ CMV infection is defined as positive results with PCR and/or IgM antibody testing.

* Not significant (Fisher's exact probability test).

Fig. 4A CMV antibody status of BMT patients (#34, #36). The dashed line on absorbance 0.2 represents cut-off level of IgM antibody testing. Circles in the upper straight line show PCR result (○: negative, ●: positive).

考 察

今回の検討は、同種骨髄移植前に CMV 抗体陽性である患者において、CMV 感染の発生頻度が移植後に使用した輸血血液の CMV 抗体の有無によりどのような影響を受けるかを明らかにするために行われた。現実的には、ほとんどの骨髄移植実施病院で移植患者へ用いる血液は全てベッドサイドで白血球除去フィルターを通して輸血されて

Fig. 4B CMV antibody status of BMT patient (#50).

いるため、本研究もその条件下での比較検討となった。

健康人の末梢血における CMV-DNA の存在頻度は、本検討で用いた二重 PCR の検出限界である白血球 10^5 個に 1 コピー以下であることを既に報告した⁶⁾⁷⁾。実際、CMV 抗体陽性者 7 例および 9 例をそれぞれ含む骨髄ドナー 10 例、BMT 施行前の患者 10 例はいずれも PCR 陰性であった。従って今回用いた PCR による陽性の判定結果は、CMV 抗体陽性健康人において免疫系による監視、排除を免れている CMV-DNA の存在頻度、存在様式を逸脱していることを意味していると考えられる。CMV-DNA 検出や IgM 抗体検出によって認められる CMV 感染の顕在化が直ちに間質性肺炎のような CMV 感染症につながるわけではないが、発症にはウイルスの増殖、顕在化が前提となる。

北海道センターでの献血者の CMV 抗体陽性率は 85.7% (7022/8193) であり、未スクリーニング血液輸血患者群に使用されたアフエレーシス血小板を含む血液製剤の大半は CMV 抗体陽性者由来とみなせる。移植前に CMV 抗体が陽性であった患者においては、この未スクリーニング血液製剤を輸血された群と抗体陰性製剤輸血群とで CMV 感染頻度に有意差を認めなかった (Table 3)。その理由としては、同種骨髄移植において患者自身 CMV 抗体陽性であることが CMV 感染重篤化の最大のリスクファクターであり、この場合の輸血

血液は二次的な影響しかもたらしえない¹¹⁾²⁾ということ、また、ベッドサイドでの白血球除去フィルター使用により末スクリーニング血液と CMV 抗体陰性血液が CMV 感染防止効果において等価となった可能性などが考えられる。

時系列の検討では両群の患者とも移植後およそ 30 日以降に PCR 陽性となる例が多く見られた (Fig. 2, Fig. 3)。これは CMV 感染症、特に肺炎が好発する時期⁹⁾と重なりあっており、PCR 検査所見の臨床的意義を示唆するものとして興味深い。

EIA により IgM 抗体が検出された症例のうち #50 は末梢血検体すべてで PCR 陰性となった。PCR の標的とした部位は CMV 臨床株間でも良好に保存¹¹⁾されている前初期抗原コード領域 exon 4 であるが、#50 の患者に IgM 産生を惹起した CMV 株はこの領域に変異を起こしているために検出できなかった可能性が考えられる。またこのことは、PCR のみで CMV 感染を検討しようとする場合には異なった 2 つ以上の領域を標的とすることが必要であり¹⁰⁾¹²⁾、あるいは PCR に加えて IgM 検査などを併用することが不可欠であることを示している。なお今回 IgG 抗体も測定したが、抗 CMV 抗体高力価の γ -グロブリン製剤投与により EIA の吸光度が変動し影響を受けたため (Fig. 4 参照)、その上昇をもって患者における CMV 感染と判断する基準は採用しなかった。

PCR、IgM 抗体ともに陽性となった #34 と #36 の 2 例ではいずれも IgM 抗体の出現に先駆けて PCR で CMV-DNA が検出された (Fig. 4)。この結果は、患者における迅速な CMV 感染モニタリングとして PCR が有用であるとするこれまでの報告^{13)~17)}を支持するものと思われる。ただし上述のようにウイルス遺伝子の 1 領域のみを標的とした場合には検出不能となる例があること、2 カ所以上を標的とした場合でも領域によって PCR の検査結果、陽性頻度に違いがみられるという報告⁸⁾¹²⁾があることを考慮する必要がある。

一部の患者では末梢血検体と併せて尿検体を PCR で検討したが、多くの場合尿検体において PCR 陰性となった (結果は表示せず)。この理由と

して、尿中には PCR 阻害物質が存在すること¹⁰⁾、新鮮尿ではなく凍結保存尿で検討したため阻害物質の影響が大きくなったこと等が考えられる。本 PCR の尿検体への適用には、阻害物質除去等の前処理を検討することが必要と思われる。

移植前に既に CMV 抗体が陽性の患者の場合、移植後の CMV 感染症発症は主として患者に潜伏感染していたウイルスの再活性化によると考えられている¹⁸⁾¹⁹⁾。本研究においても、骨髄ドナーおよび輸血血液の CMV 抗体がともに陰性であった 4 例の抗体陽性患者のうち 3 例にウイルス顕在化が認められたことから、既感染患者での移植後の CMV 感染は患者自身の CMV 再活性化に起因する可能性が高いと思われる。輸血を通じての異なった CMV 株による再感染が CMV 感染症発症の危険性に大きく関与しているという分子生物学的根拠は、これまでのところ示されていない。また今回の検討でみられた、移植直後の検体で CMV-DNA が検出され間質性肺炎を発症した #34 の患者のような例では、CMV 抗体陰性血液を輸血し続けることに臨床的意義を見いだすのは難しい。

結 論

ベッドサイド白血球除去フィルター使用のもとで行われた今回の検討では、CMV 抗体陽性患者への同種骨髄移植後の輸血において CMV 抗体陰性血液と末スクリーニング血液の CMV 感染予防効果に差を認めなかった。抗体陰性血液製剤の使用については血液センター側と医療機関の間で十分なコンセンサスを形成することが必要と思われる。

文 献

- 1) Preiksaitis, J.K.: Indications for the use of cytomegalovirus-seronegative blood products. *Transfus. Med. Rev.*, 5: 1-17, 1991.
- 2) Hillyer, C.D., Snyderman, D.R. and Berkman, J.E.M.: The risk of cytomegalovirus infection in solid organ and bone marrow transplant recipient: Transfusion of blood products. *Transfusion*, 30: 659-666, 1990.
- 3) Sayers, M.H., Anderson, K.C., Goodnough, L.T., Kurts, S.R., Lane, T.A., Pisciotto, P. and Silberstein, L.E.: Reducing the risk for

- transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *Ann. Intern. Med.*, 116: 55—62, 1992.
- 4) 矢部みはる, 矢部普正, 満田るみ, 小松田光真, 加藤俊一, 田中重明: 同種骨髄移植後のサイトメガロウイルス感染症発症の要因と予防. *移植*, 24: 493—497, 1989.
 - 5) 大矢健一, 都築陽子, 船戸悦二, 鈴木具子, 倉知透, 村瀬隆治, 水野伸一, 山口 博, 長谷川岩三, 森島泰雄, 神谷 忠, 小久保幸雄: ゼラチン粒子を用いたサイトメガロウイルス抗体測定法の確立. *日輸血会誌*, 37: 44—47, 1991.
 - 6) 漆原範子, 権 吉源, 高橋恒夫, 関口定美: PCRによる末梢血からのCMV-DNA検出の試み. *日輸血会誌*, 39: 544—549, 1993.
 - 7) Urushibara, N., Kwon, K.W., Takahashi, T.A. and Sekiguchi, S.: Human cytomegalovirus DNA is not detectable with nested double PCR in healthy blood donors. *Vox Sang.*, in press.
 - 8) 大熊重則, 宮原正行, 佐藤博正, 宮本寛治, 福田俊一, 永井 宏, 瀬崎達雄: CMV-DNA検出法の検討—骨髄移植等患者群と健康人の比較. *日輸血会誌*, 40: 296, 1994.
 - 9) 加藤俊一: 骨髄移植とサイトメガロウイルス肺炎. *日本臨床*, 47: 446—451, 1989.
 - 10) Demmler, G.J., Buffone, G.J., Schimbor, C.M. and May, R.A.: Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J. Infect. Dis.*, 158: 1177—1184, 1988.
 - 11) Shibata, M., Morishima, T., Terashima, M., Kimura, H., Kuzushima, K., Hanada, N., Nishikawa, K. and Watanabe, K.: Human cytomegalovirus infection during childhood: Detection of viral DNA in peripheral blood by means of polymerase chain reaction. *Med. Microbiol. Immunol.*, 179: 245—253, 1990.
 - 12) Shibata, D., Martin, W.J., Applemann, M.D., Causey, D.M., Leedmann, J.M. and Arnheim, N.: Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.*, 158: 1185—1192, 1988.
 - 13) Jiwa, N.M., Van Gemert, G.W., Raap, A.K., Van de Rijke, F.M., Mulder, A., Lens, P.F., Salimans, M.M.M., Zwaan, F.E., Van Dorp, W. and Van der Ploeg, M.: Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction. *Transplantation*, 48: 72—76, 1989.
 - 14) Cassol, S.A., Poon, M.-C., Pal, R., Naylor, M.J., Culver-James, J., Bowen, T.J., Russell, J.A., Krawetz, S.A., Pon, R.T. and Hoar, D.I.: Primer-mediated enzymatic amplification of cytomegalovirus (CMV) DNA: Application to the early diagnosis of CMV infection in marrow transplant recipients. *J. Clin. Invest.*, 83: 1109—1115, 1989.
 - 15) Rowley, A.H., Wolinsky, S.M., Sambol, S.P., Barkholt, L., Ehrnst, A. and Andersson, J.P.: Rapid detection of cytomegalovirus DNA and RNA in blood of renal transplant patients by in vitro enzymatic amplification. *Transplantation*, 51: 1028—1033, 1991.
 - 16) Einsele, H., Steidle, M., Vallbracht, A., Saal, J. G., Ehninger, G. and Mueller, C.A.: Early occurrence of human cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation as demonstrated by the polymerase chain reaction technique. *Blood*, 77: 1104—1110, 1991.
 - 17) Zipeto, D., Revello, M.G., Silini, E., Parea, M., Percivalle, E., Zavattoni, M., Milanese, G. and Gerne, G.: Development and clinical significance of a diagnostic assay based on the polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus DNA in blood samples from immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 527—530, 1992.
 - 18) Winston, D.J., Huang, E.-S., Miller, M.J., Lin, C.-H., Ho, W.G., Gale, R.P. and Champlin, R.E.: Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections associated with bone marrow transplantation. *Ann. Intern. Med.*, 102: 16—20, 1985.
 - 19) Kanesaki, T., Baba, K., Tanaka, K., Ishibashi, M. and Yabuuchi, H.: Characterization of cytomegalovirus isolates recovered during repeated infection in renal transplant recipients. *J. Med. Virol.*, 28: 140—143, 1989.