

3. 臨床検体におけるnested PCRと抗原検出法の経時変化

PCR および galactomannan 抗原の経過を追跡しえた9症例を Fig. 2 に示した。

PCR は9例中7例において侵襲性アスペルギルス症に特徴的な胸部X線像が得られてから7日以内に陽性化していた。しかしながら症例2や7のようにamphotericin Bが少量予防投与的に点滴静注されていた症例ではPCRの陽性化が遅れていた。さらに、症例3、5、13のように治療が開始され、amphotericin Bの投与量が30 mg/日を越える量になると病勢は悪化しているにもかかわらずPCRが陰性化する症例も認められた。

考 察

侵襲性アスペルギルス症の予後の改善には早期診断、早期治療が重要とされているが、現時点では本症の迅速で確実な診断法は確立されていない。近年の感染症分野における分子生物学的診断法の進歩に伴い、PCR法による遺伝子診断法は実際の臨床の場合においても、結核⁵⁾、カリニ肺炎⁶⁾、サイトメガロウイルス感染症⁷⁾などの診断に用いられ、有用性が確認されつつある。侵襲性アスペルギルス症の診断においても気管支肺胞洗浄液を用いたPCRによる診断が積極的に報告されている⁸⁻¹²⁾。これらは、培養などの既存の診断法に比して迅速で確実な診断法として注目されているが、重篤な基礎疾患を有する患者に対する気管支肺胞洗浄などの侵襲的な手技の適応には制限があり、実際の臨床の場合においては問題を有している。今回、我々が用いたPCR法は最小限の侵襲で繰り返し得ることのできる血清を検体に*Aspergillus* 属に特異的なDNAを検出することが可能である。さらに、気道材料を検体とした場合はcolonizationと感染症との鑑別が困難であるのに対して、本来、無菌である血清を検体としたことにより、colonizationを否定できる点でも有利であると考えられる。

現在までに、血清からの本症の診断法としてはgalactomannan抗原検出法や(1→3)-β-D-glucan検出法¹³⁾が開発され、一定の評価を得ている。nested PCR法は動物実験においては、galactomannan抗原

検出法や(1→3)-β-D-glucan検出法と同様に、菌接種1日後より陽性を示しており、これらの診断法と同等の感度を有していた。さらに、臨床検体を用いた検討でも、すでに臨床応用されているgalactomannan抗原検出法と同等以上の感度を示しており、臨床応用の可能性が示唆された。さらに、ラテックス凝集反応を用いたgalactomannan抗原検出法の感度が十分とはいえないこと、および(1→3)-β-D-glucanはほとんどの深在性真菌症で陽性化する¹⁴⁾ために特異性の面で問題を残しているのに対して、本法は感度、特異性ともに優れ、侵襲性アスペルギルス症の診断法として有用であると考えられた。

一方、今回の検討により、本法の問題点も明らかになった。第一にamphotericin Bの予防投与例においてはPCRの陽性化が遅れる傾向が認められたことである。このことは、免疫不全宿主においては予防的にまたはempiric therapyとしてamphotericin Bの投与が行われる場合が少なくないことから、今後、さらに検討を要する課題であると思われる。さらに治療開始され、amphotericin Bの投与量が比較的大量になると病勢とは無関係にPCRが陰性化する症例も認められており、治療効果のモニタリングとしては使用しづらい可能性も示唆された。これらの現象の原因として、amphotericin BによりPCR法そのものが阻害された可能性については他の研究者の報告からは否定的である¹⁵⁾。本法が血清中のDNAを検出する方法であることから考えると、amphotericin Bの投与により、血液中への真菌の浸潤が抑制された可能性は否定できないと考えられる。

近年、侵襲性アスペルギルス症の血清診断法として、今回使用したラテックス凝集反応を用いたgalactomannan抗原検出法にかわり、より高感度なSandwich ELISA法を用いた抗原検出法が開発されている^{16,17)}。Sandwich ELISA法では(1→3)-β-D-glucan検出法と同様に定量が可能なることから、前に述べたPCR法の問題点を補う可能性がある。またPCR法と抗原検出法、さらに(1→3)-β-D-glucan検出法は、各々検出のターゲットとする物質が異なるため、これらの検査を組み合わせることで、侵襲性アスペルギルス症の診断においてより良い感度と特異性を得ることが可能であると考

えられる。

結 論

侵襲性アスペルギルス症の診断における血清を検体としたnested PCR法の有用性について報告した。本症の迅速診断法については、様々な施設から多彩な方法が報告されている¹⁸⁻²⁰⁾が、large populationを用いた適切なevaluationを行った報告は乏しく、診断法として確立されたとは言いがたい。今後は、いくつかの方法を組み合わせ多施設間における検討を行い、現時点で最良の診断法を確立することが急務であろう。

参考文献

- 1) Khoo, S., Denning, D.: Invasive aspergillosis in patients with AIDS, *Clin. Infect. Dis.* 19(Suppl 1): S41-8, 1994
- 2) Hashimoto, A., Yamakami, Y., Kamberi, P., et al.: Comparison of PCR, (1→3)-β-D-glucan and galactomannan assays in sera of rats with experimental invasive aspergillosis, *J. Clin. Lab. Anal.* 12: 257-262, 1998
- 3) Yamakami, Y., Hashimoto, A., Tokimatsu, I., et al.: PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis, *J. Clin. Microbiol.* 34: 2464-2468, 1996
- 4) Yamakami, Y., Hashimoto, A., Yamagata, E., et al.: Evaluation of PCR for detection of DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis, *J. Clin. Microbiol.* 36: 3619-3623, 1998
- 5) Hashimoto, A., Koga, H., Kohno, S., et al.: Rapid detection and identification of mycobacteria by combination method of polymerase chain reaction and hybridization protection assay, *J. Infection* 33: 71-77, 1996
- 6) 橋本敦郎、水之江俊治、時松一成、他：Polymerase chain reaction法を用いた *Pneumocystis carinii* 肺炎発症機序に関する検討、*感染症誌* 72: 870-875, 1998
- 7) Tokimatsu, I., Tashiro, T., Nasu, M.: Early diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus pneumonia in patients with adult-T cell leukemia by DNA amplification in serum, *Chest* 107: 1024-1027, 1995
- 8) Spreadbury, C., Holden, D., Aufauvre-Brown, A., et al.: Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction, *J. Clin. Microbiol.* 31: 615-621, 1993
- 9) Reddy, L., Kumer, A., Kurup, P.: Specific amplification of *Aspergillus fumigatus* DNA by polymerase chain reaction, *Mol. Cell Probes*, 7: 121-126, 1993
- 10) Tang, M., Holden, D., Aufauvre-Brown, A., et al.: The detection of *Aspergillus* spp. by polymerase chain reaction and evaluation in bronchoalveolar lavage fluid, *Am. Rev. Respir. Dis.* 148: 1313-1317, 1993
- 11) Merchers, W., Verweij, E., Hurk, P. et al.: General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species, *J. Clin. Microbiol.* 32: 1710-1717, 1994
- 12) Bretagne, S., Costa, J., Marmorat-Khuong, A., et al.: Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR, *J. Clin. Microbiol.* 33: 1164-1168, 1995
- 13) Mitsutake, K., Kohno, S., Miyazaki, T., et al.: Detection of (1→3)-β-D-glucan in a rat model of aspergillosis, *J. Clin. Lab. Anal.* 9: 119-122, 1995
- 14) Miyazaki, T., Kohno, S., Mitsutake K., et al.: Plasma (1→3)-β-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3115-3118, 1995
- 15) Deventer, A., Goessens, W., Belkum, A., et al.: PCR monitoring of response to liposomal amphotericin B treatment of systemic candidiasis in neutropenic mice, *J. Clin. Microbiol.* 34: 25-28, 1996
- 16) Verweij, P., Stynen, D., Rijs, A. et al.: Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients, *J. Clin. Microbiol.* 33: 1912-1914, 1995
- 17) Verweij, P., Latge, P., Rijs, A., et al.: Comparison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies, *J. Clin. Microbiol.* 33: 3150-3153, 1995
- 18) Einsele, H., Herbart, H., Roller, G., et al.: Detection and identification of fungal pathogen in blood by using molecular probes, *J. Clin. Microbiol.* 35: 1353-1360, 1997
- 19) Bretagne, S., Costa, J., Bart-Delabesse, E., et al.: Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis, *Clin. Infect. Dis.* 26: 1407-1412, 1998
- 20) 前崎 繁文、河野 茂：起炎微生物の分離・同定が難しい感染症の診断法④ 深部真菌症、*日内会誌*、87: 2211-2217, 1998



Candida glabrata の薬剤 efflux pump 遺伝子のクローニング

河野 茂¹⁾、宮崎 義継²⁾、宮崎 治子²⁾、前崎 繁文¹⁾

¹⁾長崎大学医学部 第二内科

²⁾長崎大学医学部附属病院 検査部

研究要旨

Candida glabrata の薬剤耐性に関与する膜輸送ポンプ^oをコードする遺伝子をクローニングした。特定の HIV 患者から、経時的に分離された *C. glabrata* で徐々にアゾール耐性が増していった一連の *C. glabrata* 株を得た。そこで、ABC (ATP binding cassette) type の drug efflux pump に保存されているアミノ酸配列を利用して、PCR で DNA probe を作成した。これを用いて *C. glabrata* の標準株 NCCLS84 の DNA ライブラリーから ABC type membrane transporter をコードしていると考えられる遺伝子、*PDHI*、をクローニングした。アゾール系抗真菌薬に対して高度耐性の株がより感受性の株と比較して、*PDHI* の mRNA 量が増加していた。また、より感受性の株ではフルコナゾール暴露により *PDHI* の mRNA は増加したが、高度耐性株では薬剤暴露による mRNA 量の変化は認められなかった。

分担研究者：河野 茂

研究協力者：宮崎義継、宮崎治子、前崎繁文

Cloning of a drug efflux pump gene from *Candida glabrata*

Shigeru Kohno¹⁾, Yoshitsugu Miyazaki²⁾, Haruko Miyazaki²⁾, and Shigefumi Maesaki¹⁾

¹⁾The Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine. and ²⁾ Department of Laboratory Medicine

目的

進行したHIV感染症に合併する口腔咽頭カンジダ症(OPC)では、アゾール系抗真菌薬が有効でない場合もよく経験される。アゾールに反応しないOPCを合併するHIV陽性患者の多くはCD4陽性細胞数が $50/\text{mm}^3$ 以下で長期に渡りアゾール投与を受けている。アゾール耐性は徐々に起こり、より多量の薬剤が必要となり再発も高頻度となる。*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*においてアゾールのeffluxの亢進が耐性に関係していることが示されている。*C. glabrata*では、耐性株の細胞内アゾール濃度の低下とそれがATP依存性であることが示され、また、*C. albicans*や*S. cerevisiae*では多剤耐性遺伝子*CDR1*, *CDR2*, *PDR5*などの発現の増加が報告されている。*C. albicans*では*CDR1*の不活化により、*S. cerevisiae*では*PDR5*の不活化により、フルコナゾールの細胞内濃度が増加し薬剤感受性が増加する。

我々は、フルコナゾールの増量に抵抗性であったOPCを合併したHIV患者を経験した。この患者から経時的に分離された*C. glabrata*株はアゾール耐性が高度化し、細胞内フルコナゾール濃度が減少していた。*PDR5*と*CDR1*の相同性を利用して、我々は多剤耐性に関連すると考えられる*C. glabrata*の遺伝子をクローニングしシーケンスを行い、耐性と遺伝子発現の関係について調べた。

方法

1. 臨床分離株

45歳男性のHIV陽性患者でCD4陽性細胞数が $60/\text{mm}^3$ 、4年間のOPCに対する治療歴があったが、フルコナゾールの1日200mg経口投与により症状の改善がみられなくなった。口腔の真菌培養では*C. glabrata*と*C. albicans*が分離された。OPCに対してフルコナゾール1日400mg経口投与が4週間行われ、約20%の病変が残存していたため、フルコナゾール1日800mg経口投与が2週間おこなわれ病変は消失した。その後、1日200mg投与で予防投与が行われたが2週間後にOPCの再発を見た。この間に分離された*C. glabrata*株のMICを表1に示す。MIC測定はNCCLSの微量希釈法によった。

2. フルコナゾール細胞内濃度

細胞内フルコナゾール濃度は生理食塩水に100 nM [^3H]fluconazole (714GBq/mmol)を添加し37°Cで80分培養後に測定した。

3. *PDH1*クローニング

ATP binding domainの一部を含む*PDR5*と*CDR1*に保存された領域からDegenerate primer H12{GTC GTT TTA GGT AG(A/G) CCN G}とH13{CCT TGT AGC (A/G)TT (A/G)TC CCA}を作成し、これを用いてNCCLS84株のgenomic DNAから0.4kbのPCR産物を得たが、この中でPdr5pと相同性の認められたクローンをH1213とした。PCRの条件は、denature 94°C 1分、annealing 48°C 80秒、extension

表1 *C. glabrata*株の分離背景とMIC

strains	Week for therapy	Fluconazole dose (mg/day)	Blood Fluconazole level (mcg/ml)	MIC (mcg/ml)	
				Fluconazole	Itraconazole
NCCLS84				32	2
Clinical isolates					
35a	0	200	7	32	2
36a	2	400	17	128	>16
37a	4	400	40	128	>16
38a	6	800	55	128	>16
40a	8	800	65	128	>16
41a	10	200	18	128	>16

72°C1分を25サイクルで、Taq DNAポリメラーゼ (Boehringer Mannheim) を用いた。PCR産物は2度、等量のフェノール・クロロフォルム処理を行った後、T4DNAポリメラーゼ処理し、pCR-Script SK(+) ヴェクター(Stratagene)に組み込み、E. coli JM109の transform を行った。各クローンは ABI Prism 377 (Perkin-Elmer) を用いてシーケンスを行った。得られたシーケンスは GCG (Genetics Computer Group) ソフトウェアを用いて解析した。H1213 は *PDR5* との相同性が確認された後、 $[^{32}\text{P}]$ -dCTP により標識し、*C. glabrata* NCCLS84 の genomic library (Lambda Zap II library: Stratagene) のスクリーニングを行い、CGlib18を得た。一方、NCCLS84 genomic DNA の *Cla*I digest による DNA library から、*Cla*I-1 および *Cla*I-4 を得た。

4. DNAプローブ

プライマー{TCA GAA GCA ATC TTC CAT TGG C}および{C(G/T)(A/G)TACAT(A/G) AA(A/G/T) A TC CA(A/G) AA}により genomic DNA から増幅された H3228 をテンプレートとして、{CAG ATG CAG TTG TTG GTG TC}および{AGC CAA TAT AAA TGC CTT CC}を用いて増幅した H4546 を Southern、Northern analysis に用いた。コントロールとして *ACT1*¹⁾を用いた。

5. Southern analysis

C. glabrata の genomic DNA を精製^{1,2)}し制限酵素で処理後に、アガロースゲル電気泳動を行い、denature (1M NaCl, 0.5M NaOH)、中和(1M Tris-HCl pH7.5, 1M NaCl)し、ナイロンメンブレン(Hybond N; Amersham)に転写した。プローブは Prime It II (Stratagene)を用いて $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (Amersham)により標識した。メンブレンは65°Cで hybridization を行い、wash (2x SSC, 0.1 % SDS を室温および 0.2x SSC, 0.1 % SDS, 室温および 65°C) で行った。

6. Northern analysis

C. glabrata を 30°C で YEPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) 内で培養し $\text{OD}_{600}=1.0\sim 1.5$ で集菌した。フルコナゾール暴露は、その後 RPMI1640 のフルコナゾール 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液内で4時間培養した。RNAは50mgの *C. glabrata*

細胞から FastRNA kit (Bio 101) を用いて採取した。アガロースゲル電気泳動後、ナイロンメンブレンに転写した。

結果

1. 薬剤感受性

患者の血中フルコナゾール濃度は処方量と関連していた(表1)。6回の検査で真菌分離を行い、5コロニー(*C. glabrata* 2コロニー, *C. albicans* 3コロニー)を採取したが、6週目と8週目は *C. glabrata* のみが分離された。*C. glabrata* 株の薬剤感受性は経過とともにフルコナゾールとイトラコナゾールに対しては低下したが、アムホテリシンBに対する感受性は不変であった。同一検体から分離された複数の *C. glabrata* 株の感受性の差は一管以内であった。最初に分離された *C. albicans* の感受性は 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、標準株の *C. albicans* B311 の 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ よりはるかに高値であった。*C. glabrata* は、8週目に病変がみられなかった時を含め毎回分離され、2週目以降の株は高度アゾール耐性を示していた。

2. 細胞内アゾール濃度

2週目以降の *C. glabrata* 分離株は細胞内フルコナゾール濃度は 1.1~1.4 pmol/OD₆₀₀ unit と、最初の分離株である 35a の 3.2 pmol/OD₆₀₀ unit と比較して減少していた。

3. *PDH1* シークエンス

PDH1 の全シーケンスは CGlib18 と *Cla*I-4 の二つのクローンから得た。これらのクローンは 315bp のオーバーラップを有していた。6225bp のシーケンスから 4626bp の open reading frame (ORF) がみられ 1542 のペプチド(175kDa)が推定された。イントロンは認められなかった。5'側の配列には、-105の部位に TATAA box がみられ、CAAT が ATG から -365 と -136 に存在していた。Katzmann らが報告している *S. cerevisiae* における *PDR5* のプロモーター配列と同一の 10bp の TTCCGTGGAA 配列³⁾が -200 ~ -190 に認められた。また、Pdr1p と Pdr3p の binding に重要な配列とされる 18bp の配列もみられ、*PDR5* プロモーターの regulatory cis element と提唱されているパリンδροームも *PDH1*

の5'側上流に見られた。TTGCA配列が-468~-502に4回みられたが、機能については不明であった。ORFの下流には、transcription termination signalがみられ、stop codon から+234の位置にAATAAA⁴⁾が、+175の位置にTAGN₂₈TAG±TN₆TTT⁵⁾が認められた。さらに、推定されるアミノ酸配列は、C末端側とN末端側の二つの homologous half から成り、ABC signatureとWalker motifも有していた。これらは、*S. cerevisiae* の *PDR5*, *SNQ2*, *YOR1*, *C. albicans* の *CDR1*, *CDR2*, *CDR3* などの ABC transporter に共通して保存されている。Kyte-Doolittle hydropathy plotでは、両方の half が6つの疎水性の transmembrane domain を有していた。Fasta searchの結果では *PDR5* が最も相同性の高いペプチドであり72.5%、*CDR1* とは53.9%、*SNQ2* とは39.1%の相同性を有していた。

4. Southern and Northern analysis

H4546 プローブによる Southern analysis では *Eco* RV 処理のプロットで1.8kbのバンドを認め、*Pst*I 処理のプロットでは約10kbの単一のバンドがみら

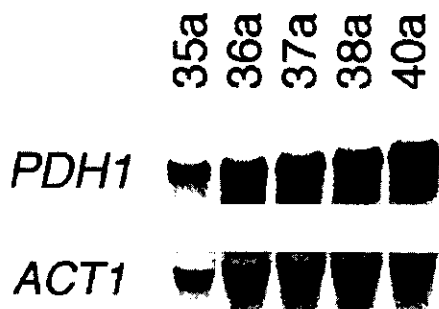


図1

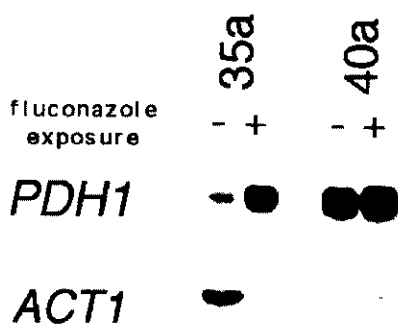


図2

れ、両者ともシーケンスから予測される結果と一致した。Southern analysis で *PDH1* が予測されるサイズで single band としてみられたことから、*PDH1* が multi copy 存在する可能性は低いと考えられた。Northern analysis では、フォスフォイメージングによる *PDH1* mRNA の定量を行ったところ、最初に分離された最もアゾール感受性の高かった 35a 株では、フルコナゾールと共に培養することにより *PDH1/ACT1* 比が3.5から32.3へ上昇した。8週後に分離されたアゾールにより耐性を示した 40a 株ではフルコナゾールとの培養による *PDH1/ACT1* 比の上昇は認められず、培養前後でそれぞれ26.6と24.1であった。40a株の *PDH1/ACT1* 比は、薬剤暴露のない場合、35a 株と比較して7.5倍高かった。このことは、よりアゾール高度耐性の株では *PDH1* の転写が upregulate されていることを示唆していた(図2)。別に行った、薬剤による刺激をしない Northern の実験系では、一連の *C. glabrata* 株 35a, 36a, 37a, 38a, 40a の *PDH1* の transcription 量は、漸次増加しそれぞれ、2.3, 2.7, 2.8, 3.4, 4.5 であった(図1)。

アゾール耐性 *C. glabrata* の *ERG11* transcription の増加は、染色体の *ERG11* 遺伝子のコピー数の増加が原因であることが知られているため、我々は 35a 株と 40a 株で *PDH1* のコピー数を *ACT1* を対照として定量的に測定し、*PDH1/ACT1* 比は1.6および1.7とほぼ同じであり、この二つの株で *PDH1* 遺伝子の染色体上のコピー数は等しいことがわかった。したがって、40a株の *PDH1* mRNA 量の増加はコピー数の増加によらないことが示された。

考 察

C. glabrata 35a株が分離されたとき、患者は1日200mgの予防的フルコナゾール投与中で薬剤の血中濃度も期待されるレベルであったにも関わらず、臨床的に明らかな OPC を発症した。この患者から分離された 35a 株のフルコナゾールの MIC 値は標準株の MIC 値とほぼ同等であった。そして、36a 株以降にみられたアゾール耐性は、パルスフィールドゲル電気泳動(CHEF)により2番目のバンド以外のバンドは全て一連の株で同一であったことから(データ未提示)、別系統の *C. glabrata* 株に

変化したわけではないと考えた。*C. glabrata* の CHEF では 1.6Mb 以上のサイズのバンドは、同一患者の分離株でもサイズに変化が見られるのは一般的である。これは、rDNA のコピー数の変化によると考えられており、我々も、サイズの違いのみられた 2 番目のバンドに rDNA のコピーが存在することを Southern で確認した(データ未提示)。

アゾールに対する MIC の上昇は、フルコナゾール投与量が増加したときにみられており、RI ラベルしたフルコナゾールの細胞内濃度は 36a 以降のより耐性の高度な株では 35a 株の約 30 ~ 40% であった。ATP 阻害剤である carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) の添加により、細胞内のフルコナゾール濃度は増加し active efflux の関与を示唆したが(データ未提示)、35a と同等のレベルまでは増加しなかったことは、active efflux 以外の要因も関与している可能性を示していた。

フルコナゾール細胞内濃度の低下のみで、MIC の 4 倍の上昇の説明がつかないかもしれないが、調べた株の細胞内濃度の差は、*C. glabrata* アゾール感受性標準株 Y3390 と耐性標準株 Y3391 の細胞内濃度差と同程度であった。また、すでに報告されている AIDS 患者から分離された *C. albicans* の感受性株と耐性株の細胞内濃度の差⁹⁾とも同等であった。我々の得た結果はこれらの報告を支持するが、いくつかの相違点があり、Y3390 と Y3391 は CHEF により違う株であることが示されており、*C. albicans* の報告とはタイピングの方法が違い一概に比較できない。しかし、我々の得た結果から考えれば、efflux の増加に伴う薬剤感受性の低下が先ず初めに 36a 株で起こっており、*C. glabrata* におけるアゾール耐性の主な機序は drug efflux であるとの仮説を支持する。さらに、高度の耐性株は、アゾールのターゲットである 14 α -demethylase に multiple mutations を有している可能性があり、われわれの調べた株も ABC transporter の関与と同時にそれらの変異がある可能性がある。

アゾール耐性株では *PDH1* の upregulation が存在することを示したが、35a 株以降の分離株でその原因を調べることは有益であると考え。そのひとつの可能性として *PDH1* コピー数の増加がある。アゾールのターゲットをコードする *ERG11* の mRNA が 8 倍増加しているアゾール耐性の *C.*

glabrata で *ERG11* 自身のコピー数が 3.7 倍増加していたとの報告があるが⁷⁾、われわれの調べた耐性株では *PDH1* のコピー数の増加は Southern analysis では認められなかった。そこで、高度耐性株における *PDH1* の overexpression を説明する機序として、*PDH1* の転写制御に関与する遺伝子の変異が考えられる⁸⁾。*PDH1* 発現が *S. cerevisiae* *PDR5* と同様に調節遺伝子の影響を受けていれば、フルコナゾール暴露は、*PDH1* をはじめとする ABC transporter の発現を増加させる調節遺伝子に影響すると考えられる。35a 株のフルコナゾール暴露の際にみられた *PDH1* mRNA の増加も同様の機序と推定する。シーケンス解析でも、*PDH1* の ORF の 5' 側には、*PDR5* の発現を調節する *PDR1* や *PDR3* の binding domain³⁾ に類似した塩基配列が見出された。ただし、*PDR1* や *PDR3* は *PDR5* のみの調節だけでなく、少なくともいくつかの構造遺伝子の発現にも関与していることを考慮すれば、*Pdh1p* が必ずしもフルコナゾールの直接の transporter ではない可能性も十分に考えられる。この点を明らかにするために、*PDH1* の disruption を現在行っている。いずれにしても、*PDH1* は *C. glabrata* における ABC transporter の薬剤耐性に対する影響を研究する手段となるであろう。

結 論

PDH1 の transcription のレベルはアゾール耐性と関連がみられたが、分子レベルでの関与の有無については今後の課題である。*PDH1* は *C. glabrata* の ABC transporter として初めてクローニングされた遺伝子であり、薬剤耐性に関与する分子生物学的アプローチの一手段として有用である。

参考文献

- 1) Geber A, C Hitchcock, J Swarts et al. Deletion of the *C. glabrata*. *ERG3* and *ERG11* genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition and antifungal susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:2708-2717. 1995.
- 2) Miyazaki H, Y Miyazaki, A Geber et al. Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, *PDH1*, in

- Candida glabrata*. Antimicrob. Agents Chemother 42: 1695-1701.1998
- 3) Katzmann D, T Hallstrom, Y Mahe et al. Multiple Pdr1/Pdr3p binding sites are essential for normal expression of the ATP binding transporter protein-encoding gene PDR5. J. Biol. Chem.271:23049-23054. 1996.
 - 4) Henikoff S, J Kelly, and E Cohen. Transcription terminates in yeast distal to a control sequence. Cell 33:607-614. 1983.
 - 5) Zaret S and F Sherman. DNA sequence require for efficient transcription termination in yeast. Cell 28: 563-573. 1982.
 - 6) Sanglard D, K Kuchler, F Ischer et al. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. Antimicrob. Agents Chemother. 39:2378-2386. 1995.
 - 7) Marichal P, H Vanden Vosch, F Odds et al. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 2229-2237. 1997.
 - 8) Carvajal E, H van den Hazel, A Cybularz-Kolackzkowska et al. Molecular and phenotypic characterization of yeast *PDR1* mutants that show hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes. Mol. Gen. Genet. 256:406-415. 1997.



血清PCR法による免疫不全患者の サイトメガロウイルス感染症モニタリング

時松 一成¹⁾、平松 和史¹⁾、那須 勝¹⁾、斎藤 厚²⁾

¹⁾大分医科大学 第二内科

²⁾琉球大学医学部 第一内科

研究要旨

HIV抗体陽性者を含む30例の免疫不全患者において、血清PCR法を用いたサイトメガロウイルス(CMV)感染症のモニタリングを行った。30例中12例に本法モニタリングに基づくganciclovir投与を行った。12例中7例でganciclovir投与後2週間以内でPCRは陰性化した。2例でPCRが陰性化するまで2週間以上ganciclovir投与を続けた。1例で副作用のためganciclovir投与を4日目に中断した。臨床像および死亡時の肺の組織学的検査より、ganciclovir投与を中断した1例を除いて、CMV感染に関連した死亡は認められなかった。以上より、血清PCR法は、免疫不全患者におえる抗ウイルス剤投与の有用な指標になると思われた。

分担研究者：斎藤 厚

協力研究者：那須 勝、時松一成、平松和史

Monitoring of cytomegalovirus infections in immunocompromised hosts by PCR in serum

Issei Tokimatsu¹⁾, Kazufumi Hiramatsu¹⁾, Masaru Nasu¹⁾, Atsushi Saito²⁾

¹⁾Second Department of Internal Medicine, Oita Medical University and ²⁾First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Ryukyus

目 的

サイトメガロウイルス(CMV)感染症は、AIDSにおける日和見感染症の病原体として非常に重要である。特にCMV網膜炎はCD4⁺リンパ球が50cells/ μ l以下に低下した患者の30～40%に発症し、更に、脳、大腸、肺、副腎に致死的な病巣をつくることで知られている。AIDS患者における剖検での検討で、近年、このような致死的なCMV感染症が増加傾向にあると報告されている¹⁾。

CMV治療薬であるganciclovirの早期投与は、CMV感染症の治療に重要であるが、その早期診断は極めて困難である。また、抗ウイルス剤の副作用の軽減や、薬剤耐性ウイルス誘導防止、患者のquality of lifeの点から抗ウイルス剤投与期間の短縮は重要であるが、その投与開始、終了の指標となる優れたモニタリング法がない。

近年、PCR法や、白血球中のCMV抗原の検出(antigenemia)法によるCMV感染症の補助診断が利用されている。我々は、CMV肺炎を発症した成人T細胞白血病(ATL)患者の血清を用いてnested PCR法にて検討したところ、CMV肺炎を発症する2週間前に血清中のCMVDNAが陽転化するすることを報告した^{2,3)}。

今回、我々はAIDSやATL、や骨髄移植レシピエントにおいて、血清PCR法によるCMV感染症モニタリングを行い、陽性例においてganciclovirによる早期治療を行ったので、その意義について検討し報告する。

方 法

HIV抗体陽性者6例、ATL15例、骨髄移植レシピエント9例の計30例において、約1～2週間間隔でnested PCR法にて血清CMVDNAの検出を行った。採取血液は、遠心後、血清を分離し、細胞の混入が無いよう0.22 μ mのフィルターで濾過した。血清はproteinase Kを加えた溶解液で55℃1時間反応、10分間の煮沸処理にてproteinase Kを失活させ、遠心後、その上清をPCR検体とした。

PCR反応は、熱変成94℃1分、アニーリング55℃2分、伸長反応72℃2分で、35回の増幅した。PCRプライマーはCMV前初期抗原遺伝子部分を増幅

するよう設定し、前後2組のプライマーによるnested PCRを行った。

PCR産物は4%アガロースゲルで電気泳動し、紫外線下で観察し、特異的な増幅の有無を確認した。

2回以上連続してPCRが陽性であった場合、あるいは臨床的にCMV感染症が疑われ、CMVPCRが陽性であった場合は、ganciclovir 5～10mg/kg/dayの経静脈内投与を開始し、PCR法が陰性化するまで投与を続けた。

モニタリング中の患者は定期的に眼底検査を行い、網膜炎の有無を調べた。死亡症例については、CMV感染症の有無をより客観的にとらえるために、肺の剖検・ネクロプシー検査を行い、免疫組織学的にCMV抗体陽性細胞の有無を検索した。

結 果

1. 血清PCR法の推移

30例のモニタリング患者において、15例が経過中にPCR陽性を呈した。その血清PCR法の結果の推移とganciclovir投与期間をFig.1に示す。

血清PCR法陽性患者15例中12例にganciclovir投与を行った。12例中7例は、ganciclovir投与後2週間以内でPCRは陰性化したため、投与を2週間で終了した。症例4と症例11は、2週間のganciclovir投与後もPCR陽性であったため、PCRが陰性化するまで投与を続けた。症例6はPCR陽性化のため、経過中にganciclovir投与を2回行った。症例8はganciclovir治療中に死亡した。症例10は副作用のため、ganciclovir投与を4日目に中止した。

全ての患者は経過中、CMV腸炎を疑わせる腹痛や血便を認めなかった。症例3は入院時の眼底検査にて網膜炎を認め、CMV網膜炎と診断し、ganciclovirの投与を開始した。その他の症例については、経過中に網膜炎は認めなかった。

2. 死亡症例の検討

死亡症例9例の死因、死亡時の肺の病理学的所見をTable1に示す。9例中5例の死因は呼吸不全であった。うち、症例6、10、11に間質性肺炎を認め、臨床的にはCMV肺炎が疑われた。しかし、肺の免疫組織学的検査では、副作用のため

ganciclovir 投与を4日間で中止していた症例10にのみCMV抗原陽性細胞が認められ、症例6、11には、ATL細胞の肺組織への浸潤はあったが、CMV抗原陽性細胞は認められなかった。

肺以外の臓器にはCMV感染を疑う所見はなく、症例10を除いて、臨床的にCMV感染に関連した死亡は認められなかった。

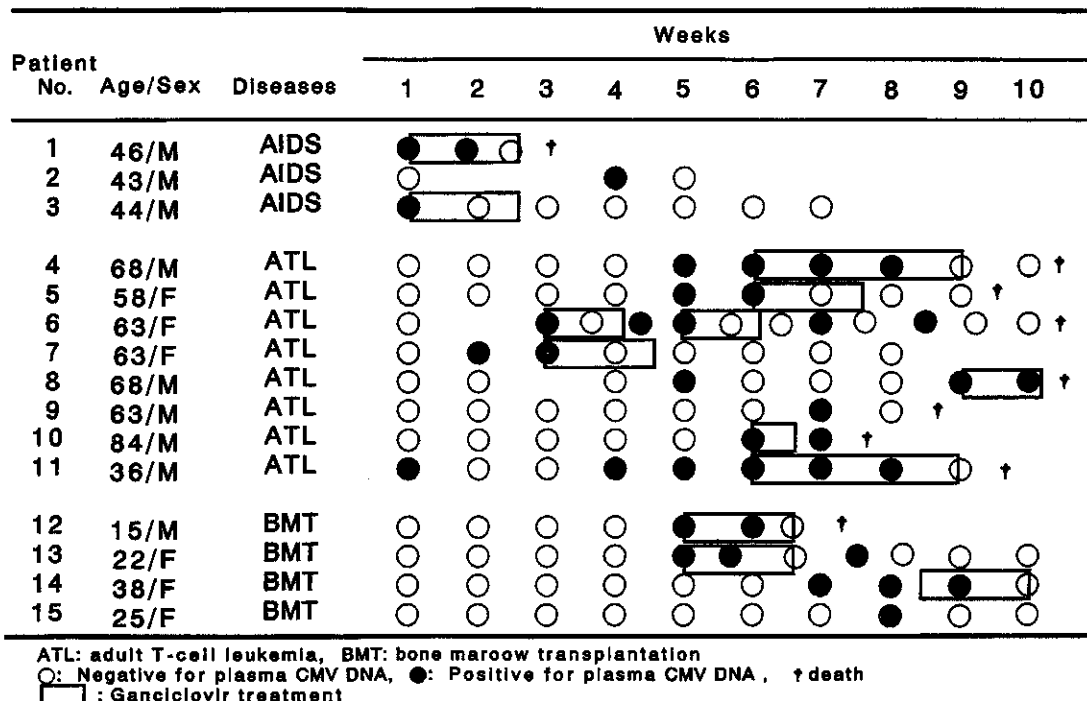


Fig.1 Follow-up CMV DNA by PCR in serum samples

Table1 Cause of death and pathological findings of lung in patients of this study

Patient No	Diseases	Cause of death	Pathological findings of lung in autopsy
1	AIDS	Respiratory failure	Bacterial pneumonia
4	ATL	Hepatic failure	ATL infiltration
5	ATL	Renal failure	
6	ATL	Respiratory failure	ATL infiltration
8	ATL	Hepatic failure	ATL infiltration
9	ATL	Respiratory failure	Bacterial pneumonia
10	ATL	Respiratory failure	CMV pneumonia
11	ATL	Respiratory failure	ATL infiltration
12	BMT	Cerebral hemorrhage	

考察および結論

CMVはヘルペスウイルス科に属するDNAウイルスで、日本人成人の90%は既に感染し、また、そのほとんどが不顕性感染として経過する。しかし、AIDS患者など、いわゆる易感染性宿主においてCMV感染症は重要な問題である。

一方、ganciclovirなどの抗ウイルス剤により、CMV感染症の治療も可能になり、治療効果を得るためには早期診断が重要であるが、CMV感染症の早期診断は困難である。現在、様々な検査法が補助診断として利用されているが、近年、検体採取が容易で、頻回に行われる検査法として、antigenemia法やPCR法が行われてる。

PCR法は極めて高感度であり、潜伏感染しているCMVを検出する可能性が指摘されている一方、検体の処理法や操作法、検体中のPCR阻害物質の存在により偽陰性を呈し、臨床経過との相関性が低いことが報告されている⁴⁾。

しかしながら、我々はCMV肺炎を発症したATL患者において、PCR法で検討してところ、CMV肺炎を発症する2週間前より、血清中にCMVDNAが検出することを見いだした^{2,3)}。さらに、ATL患者において、血清PCR法を用いたCMV感染症モニタリングを行い、ganciclovirの早期投与は、CMV肺炎の防止について有用であることを報告した⁵⁾。

今回、HIV陽性者を含む易感染性宿主においても同様のモニタリングを行ったが、副作用のためganciclovir投与を4日間で中止したATL患者におけるCMV肺炎の1例を除いて、CMV感染症を発症することなく経過しており、ATL以外の免疫不全患者においても、血清PCR法によるCMV感染症モニタリングは有用であると思われる。

AIDSにおいては他の免疫不全疾患に比べ、活動性CMV肺炎は少なく、逆に網膜炎や消化管潰瘍が多いと報告されている^{6,7)}。今回モニタリングを行ったHIV陽性患者6例中1例(症例3)のみに、入院時CMV網膜炎を認めたが、他の症例に網膜炎や消化管出血は認められなかった。この症例3では、ganciclovir投与により血清PCRは陰性化し、眼底検査でも網膜炎は軽快したが、AIDS患者に頻発するCMV網膜炎における血清PCR法によるモニタリングの有用性については、更に症例を重

ね、検討する必要があると思われる。

antigenemia法は、保険適応になり、臨床の場で利用されることが多くなってきた。antigenemia法は、血清PCR法に比べ、定量性で優り、より客観的なウイルス動態の推移を提供し、また、検体中のPCR阻害物質の存在による偽陰性や、コンタミネーションによる偽陽性の心配はないという利点がある。しかし、速やかな検体処理が要求されることに加え、モニタリングに際し、抗ウイルス剤の投与開始や終了の指標となるCMV抗原レベルの具体的な数値(cut off 値)をどこにするか、という問題点も有している。今後、血清PCR法とantigenemia法の比較については、症例を重ねて、検討していく必要があると思われる。

参考文献

- 1) 森 茂郎他：エイズ剖検例に見られたサイトメガロウイルス感染症について、エイズと日和見感染症に関する臨床研究（平成7年度研究報告書）：149-155, 1996.
- 2) Tokimatsu, I., Tashiro, T. and Nasu, M: Early diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus pneumonia in patients with adult T-cell leukemia by DNA amplification in serum. *Chest* 107: 1024-1027, 1995.
- 3) 那須 勝他：成人T細胞白血病におけるサイトメガロウイルス感染症、エイズと日和見感染症に関する臨床研究（平成7年度研究報告書）：149-155, 1996.
- 4) 本田順一他：フローサイトメーターを用いた末梢血細胞のサイトメガロウイルス抗原検出。感染症学雑誌 70(9): 923-930, 1996.
- 5) 大塚英一他：成人T細胞白血病患者のサイトメガロウイルス肺炎防止におけるNested PCR法の有用性。癌と化学療法 25(8): 1609-1611, 1998.
- 6) 長岡博志他：成人T細胞白血病剖検例でのサイトメガロウイルス感染症の病理学的検討。感染症学雑誌 71(8): 222-228, 1997.
- 7) Millar, AB., Patou, G., Miller, RF., et al. : Cytomegalovirus in the lung of patients with AIDS: Respiratory pathogen or pathogen? *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 1474-1477, 1990.



PMLのDNA診断とその発症機構

余郷 嘉明¹⁾、杉本 智恵¹⁾、保田 由喜治²⁾

¹⁾東京大学医科学研究所 ウイルス感染研究部

²⁾東海大学医学部 小児科学教室

研究要旨

臨床経過とMRI所見により進行性多巣性白質脳症(PML)が示唆された14名の患者の髄液からJCV調節領域を検出し、PMLの診断に貢献した。今回検出したJCV調節領域はいずれも原型からできたと考えられる再編成型調節領域であった。以前よく検出された、domain Aの重複とdomain Bの欠失を持つ調節領域は、検出された調節領域全体の1/4~1/3であった。再編成が何回も起きた調節領域がしばしば検出された。欠失だけを持つ調節領域が数例検出された。1名のPML患者の剖検脳組織を調べる機会を得て、3種の異なる再編成型のJCV調節領域を小脳、大脳後頭葉、脳幹から検出した。各調節領域の脳における分布は異なった。これらの調節領域は患者体内で同じ原型JCV株から独立に作られたことが示唆された。PMLの診断サービスを通して得た、さまざまなPML型調節領域をもつキメラJCVを作成し、それらの増殖能をCOS-7細胞を用いて検討した。COS-7細胞はSV40のT抗原を発現しているサル腎細胞であり、原型JCVはこの細胞でよく増殖する。キメラウイルスは原型JCVと同じくらいよく増殖するもの、やや遅れて増殖するもの、大幅に増殖が遅れるものに分かれた。以上により、PML患者中枢神経系から検出されるJCV調節領域は、構造的にも、機能的にも多様であることが判明した。

分担研究者：余郷 嘉明

研究協力者：杉本 智恵、保田 由喜治

DNA diagnosis of PML and mechanism of its pathogenesis

Yoshiaki Yogo¹⁾, Chie Sugimoto¹⁾ and Yukiji Yasuda²⁾

¹⁾Department of Viral Infection, the Institute of Medical Science, the University of Tokyo, ²⁾Department of Pediatrics, School of Medicine, Tokai University

目 的

進行性多巣性白質脳症(PML)は、患者の基礎疾患、神経症状の進行、CTやMRIによる画像から示唆されるが、脳病変部(生検または剖検)を直接検査しない限り、確実な診断を下せなかった。最近、脳脊髄液(以下CSFと記す)からのJCV DNAの検出がPMLの診断に有効であるという報告が相次いでなされている。しかし、CSFからのJCV DNAの検出には高感度のPCR(nested PCR)を用いるので、陽性結果が出て、コンタミによる偽陽性の心配がつきまとう。我々は、JCVの調節領域を増幅する新しいnested PCR法を確立した。この方法を用いれば、PCRにありがちな偽陽性を除外にすることができる(平成9年度本研究報告書)。

本研究の目的は二つある。第一の目的は、「HIV感染症に関する臨床研究班」の分担課題の一つとしてPMLの診断サービスを全国の病院、医療施設に対して行うことである。第二の目的は、PMLの発症機構を解明することである。PMLの動物モデルは存在しないので、PMLの発症機構の解明には、患者におけるJCVの動態を詳細に解析することが不可欠である。

本報告では先ず、この2年間に、診断のために全国から送られてきた患者CSFに対してJCVの検索を行った結果について報告する。次に、PMLと診断された患者の剖検脳組織から検出された、多様な調節領域について報告する。最後に、CSFから検出された調節領域を持つJCVの*in vitro*における増殖性を検討した結果について報告する。

方 法

1. CSFからのDNA抽出

スマイテスト EX-R&D(住友金属)を用いて抽出した。

2. 脳組織からのDNA抽出

プロテインースK消化、フェノール抽出、クロロフォルム抽出により行った。

3. CSFからの調節領域の増幅

nested PCRにより行った。outer primerとしてA1とA2を、inner primerとしてB1とB3を用いた。各primerの配列とゲノム上の位置、nested PCRの反応条件は平成9年度の当班の報告書に詳しく述べた。第一ラウンドのPCRを40サイクル、第二ラウンドのPCRを30サイクル行った。

4. 脳からの調節領域とIG領域の増幅

B1とB3(調節領域)またはP1とP2(IG領域)を用いて、上述の第二ラウンドのPCRのみを30サイクル行った。

5. 増幅断片のクローニング

増幅断片をHindIIIとPstIで消化し、調節領域またはIG領域を切り出した。切り出され調節領域をpUC19を用いてクローニングした。

6. 制限酵素解析

増幅断片を含むクローンをHindIII、PstI、SstIにより消化した。消化液を3%のNuSieveアガロース・ゲル(FMC BioProducts社)で電気泳動した。得られた切断パターンからクローンをグループに分けた。

7. 塩基配列の決定

精製クローンを蛍光式自動シーケンサーを用いてシーケンシングした。

8. キメラDNAの作成

全塩基配列が決定されており、かつCOS-7細胞でよく増殖することがわかっているMad-1株のコード領域とCSF由来のさまざまなPML型調節領域とのキメラDNAを作成した。

9. ウイルスの増殖法

キメラJCV DNAはpUC19にEcoRIサイトでクローニングされているので、EcoRIでベクターから切り離し、FuGENEを用いて、COS-7細胞にトランスフェクションした。COS-7細胞はSV40のT抗原を発現しているサル腎細胞であり、原型JCVはこの細胞でよく増殖する。トランスフェクション後、2日目に25cm²フラスコに移し替え、3~4

日ごとに細胞を1:5で継代した。7日ごとに細胞を回収し、ヒトO型赤血球を用いて赤血球凝集能(HA)を測定した。

結果

1. CSFを用いたPMLのDNA診断と検出された調節領域

nested PCR法を用いて、この2年間に、診断のために全国から送られてきた約50検体の患者CSFに対してJCVの検索を行った。その結果、14名の

患者のCSFからJCV DNA(調節領域)を検出し、PMLの診断に貢献することができた。

JCV DNAが検出された患者はいずれも臨床経過とMRI所見によりPMLが強く示唆された患者である。これらの患者の基礎疾患は以下の通りである(括弧内の数字は例数)。エイズ(6)、成人T細胞白血病(1)、急性リンパ性白血病(1)、全身性エリテマトーデス(1)、Wiskott-Aldrich症候群(1)、分類不能型免疫不全(1)、慢性腎不全(1)、原因不明の成長不良(1)、原因不明のCD4減少(1)。

検出されたJCV調節領域の構造を図1に示した。

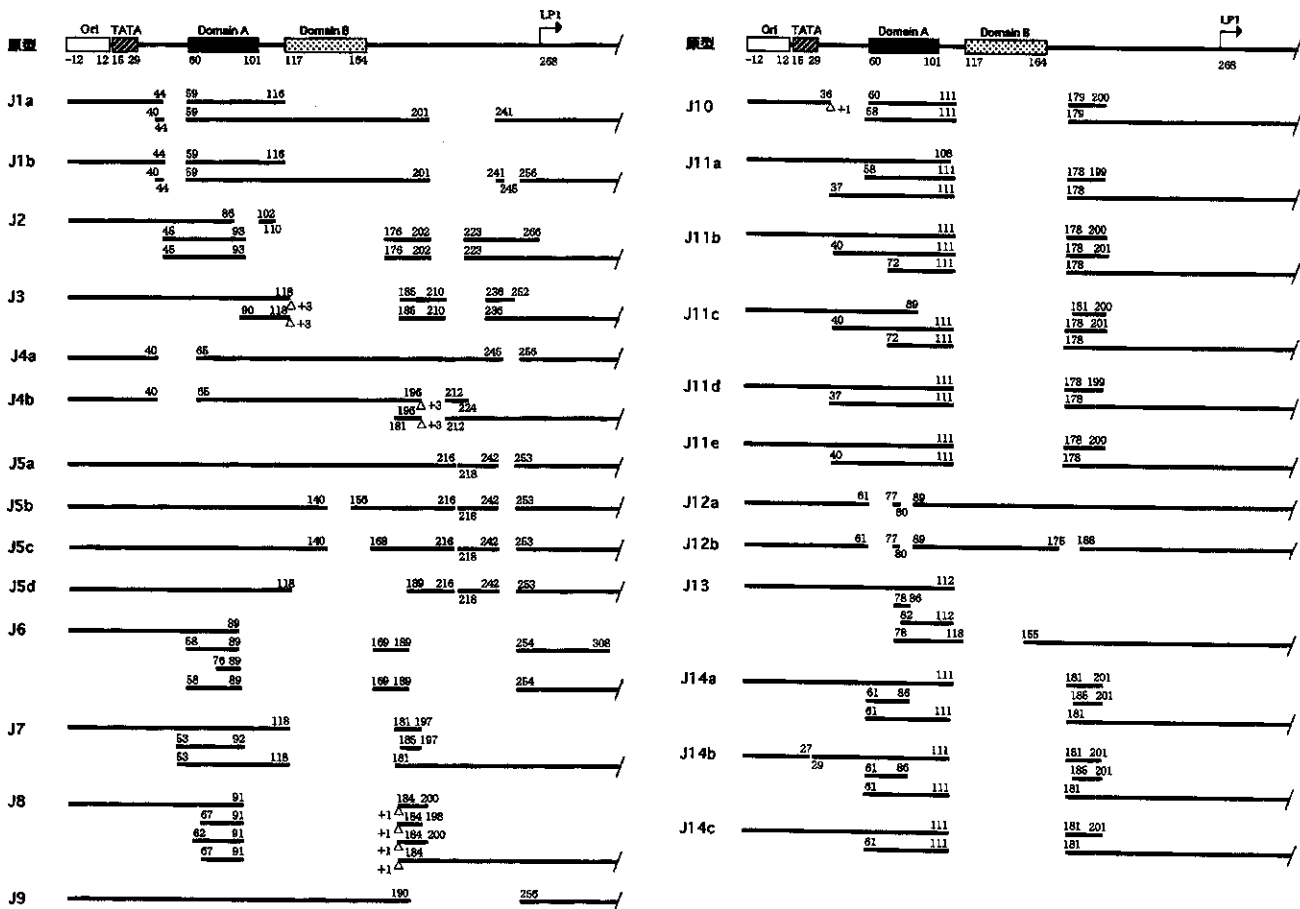


図1 患者のCSFから検出されたJCV調節領域の構造

最上部に原型調節領域を示す。OriはDNA複製の開始点、TATAはTATA配列、LP1はagnoproteinを表す。domain Aは多くのPML型調節領域で重複し、domain Bは欠失している。数字はヌクレオチド番号を示す。原型調節領域の下に、過去2年間に我々が患者のCSFから検出した調節領域の構造を示す。図の表し方は以下の通りである。原型調節領域と同じ配列なら、左から右へ線を引き、欠失に出会ったらブランクにし、重複に遭遇したら、一段下の、重複配列が開始する位置へ戻り、再び右へ線を引く。白三角は側に示したヌクレオチド数の配列が挿入されていることを示す。調節領域の命名法についてJ5aとJ5bに例をとって説明する。Jの次の数字(この場合は5)は患者のコードである。この患者CSFからは2種類の調節領域が検出されたので、これらを数字の後のアルファベット(a, b)で区別する。

全てユニークな再編成型調節領域であった。但し、J9に対しては少し説明がある。J9はnt191からnt255までの配列を欠失している(図1)。実は、これと全く同じ配列を欠失している調節領域(#212)がアメリカ人PML患者の脳から検出されている。そこで、J9と#212の配列を詳しく比較したところ、nt107とnt159の塩基が両者で違っていた。J9では、nt107とnt159の塩基はそれぞれAとAで、#212ではTとCであった。このことから、J9と#212は異なる原型JCVから独立に作られたと推定された。

その他、図1に示した調節領域の構造には以下の特徴が認められた。

- (1) 4名の患者CSFから検出された調節領域は domainA の重複と domain B の欠失を持っていた。
- (2) 6名の患者CSFから検出された調節領域は高度に変化していた。
- (3) 4名の患者CSFから検出された調節領域は欠失だけを持っていた。

このように、PML患者のCSFから検出されたJCV調節領域は極めて多様であることがわかった。

2. PML患者の脳におけるJCウイルスの多様性

患者は男性、14歳で、生後2ヶ月でWiskott-Aldrich症候群と診断された。平成10年同種骨髄移植を行った。平成10年11月中旬頃から左半身の

麻痺、意識障害が出現、眼球運動異常、構語障害が出現。12月、頭部MRIを再検し、脳幹部、両側中小脳脚・小脳白質、右後頭葉、放射冠頭頂葉、左側頭葉、両側基底核にT2強調画像で高信号を示す病変を認めた。この病変は造影効果を認めず。11月末に採取したCSFからJCV調節領域(図1、J12aとJ12b)が検出され、PMLと診断された。平成10年暮れに永眠。

頭部の病理解剖が行われ、小脳、大脳後頭葉(以下では単に後頭葉という)、脳幹の各組織からDNAを抽出し、PCRを行った。その結果、3種のJCV調節領域(J12a、J12c、J12d)が検出された(図2)。J12aとJ12cは原型から欠失のみによって作られ、J12dは原型から欠失と重複によって作られた構造をしていた。3調節領域の欠失はどれも独特であった。以上から、これらの調節領域は原型調節領域から独立に作られたと考えられた。

各調節領域の脳における分布は異なった(図3)。J12aは小脳に多く、その他、後頭葉と脳幹にも分布した。J12cは主として後頭葉に分布し、J12dは主として脳幹に分布した。このように、3種のJCV調節領域はそれぞれ、中枢神経系での特有の分布域を有することがわかった。

小脳、後頭葉、脳幹の各組織に分布するJCV DNAのIG領域の配列を調べた(IG領域は長さ610塩基対で、点変異に富む領域であり、株の識別に汎用されている)。小脳、後頭葉、脳幹の各組織か

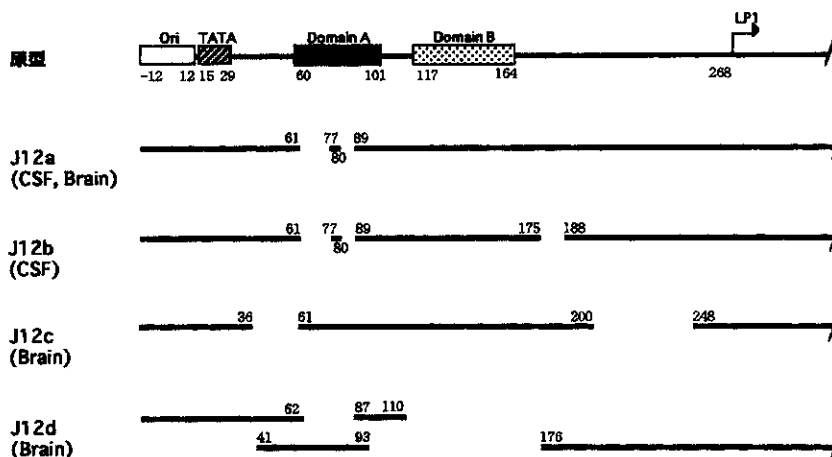


図2 患者(コード12)のCSFと脳組織から検出されたJCV調節領域の構造図の表し方は図1と同じである。

ら単一のIG配列が検出された。この結果は3種の調節領域が同じJCV株からできたことを示唆している。

3. PML型JCウイルスに*in vitro*における増殖性

天然の細胞でPML型JCVがよく増える細胞は、入手困難な初代ヒト胎児グリア細胞に限られている。そこで次善の策として、最近我々が原型JCVがよく増殖することを発見したCOS-7細胞(SV40のT抗原を発現しているサル腎細胞)を用いた。

CSF由来の各種の調節領域を、COS-7細胞でよく増殖するMad-1株のコード領域に結合させたキメラJCV DNAを作った。今回用いた調節領域は、J1a、J1b、J2、J3、J4a、J4b、J5a、J5b、J5c、J5d(図1)であった。キメラDNAをCOS-7細胞にトランスフェクションした後、3~4日ごとに細胞を1:5で継代した。7日ごとに細胞を回収し、HAを測定した(表1)。

コントロールとして用いた原型JCVであるCYとPML型JCVであるMad-1は14日でHAが検出

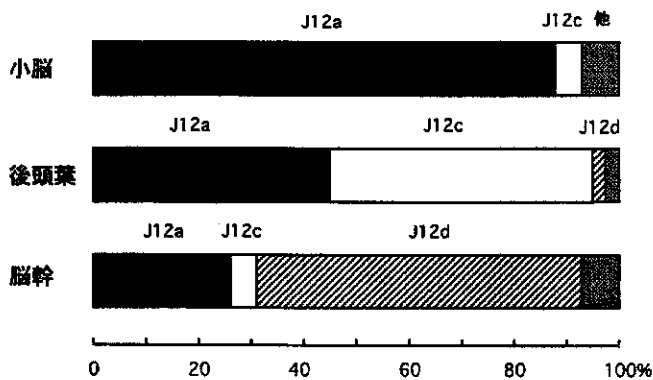


図3 中枢神経系における各種JCV調節領域の分布

通常のPCRにより脳各組織のDNAから調節領域を増幅し、得られた増幅断片をpUC19にクローニングした。脳組織当たり24クローンに対して制限酵素解析とシーケンシングを行い、それらの構造を決定した。

表1 さまざまな調節領域を持つJCVのCOS-7における増殖能¹⁾

調節領域	トランスフェクション後の日数						
	7	14	21	28	35	42	49
CY	8	128	512	-2)	—	—	—
Mad-1	2	8	512	—	—	—	—
J3	4	128	256	—	—	—	—
J1a	2	32	512	—	—	—	—
J1b	<2	2	32	256	—	—	—
J2	<2	2	16	128	—	—	—
J4a	<2	2	32	128	—	—	—
J4b	<2	8	16	32	—	—	—
J5b	<2	<2	16	128	—	—	—
J5d	<2	<2	8	256	—	—	—
J5a	<2	<2	8	32	64	—	—
J5c	<2	<2	<2	<2	16	32	512

¹⁾表中の数字はヒトO型赤血球を用いて測定したHA価を示す。

²⁾測定せず。

され始め、21日から28日にピークに達した。今回CSFから得たPML型調節領域を持つJCVの増殖パターンは3つに分かれた。第一は、CYやMad-1と同じように増殖するパターンで、J3とJ1aがこれにあたる。第二は、CYやMad-1より増殖が1週間ほど遅れるパターンで、J1b、J2、J4a、J4bがこれにあたる。第三は、増殖がさらに1,2週遅れるパターンで、J5a～J5dがこれにあたる。

以上により、調節領域の構造の違いにより、COS-7での増殖に差があることが明らかになった。

考 察

1. CSFを用いたPMLのDNA診断

ヒトの腎に持続感染しているJCVは原型調節領域を持つ。一方、PML患者の脳病変部にいるJCVは原型から作られた再編成型の調節領域(PML型調節領域)を持つ。PML型調節領域の構造は患者毎に異なる。言い換えれば、PML型調節領域は患者に特異的であって、同じPML型調節領域は異なるヒトからは見つからない。従って、もし検出された調節領域が今までに発見されたとのPML型調節領域とも異なっていれば、既存のPML型調節領域のコンタミの可能性は排除できる。実際、この2年間に14名の患者のCSFから検出されたJCV調節領域は全て新規なものであった。このように、我々が確立した調節領域を増幅する nested PCR法がPMLの診断に有用であることが確認された。

2. CSFに存在するJCVと脳組織に存在するJCVとの関係

脳組織で増えたJCVが一部CSFへ漏れ出たという可能性が考えられる。もしそうなら、CSF中のJCV調節領域と脳組織のJCV調節領域とは一致するはずである。実際、本班の昨年度の報告書に述べたように、2名のPML患者からはCSFから増幅された調節領域は同じ患者の脳組織(生検または剖検)からも検出された。しかし、別の2名の患者のCSFから検出された調節領域の1つは同患者の脳組織からも検出されたが、CSF由来の他の調節領域は脳組織から検出されなかった。

本研究において、1名のPML患者のCSFと剖検脳から検出されたJCV調節領域の解析する機会を得た。この患者のCSFからは2種のJCV調節領域(J12aとJ12b)が検出された。一方、小脳、後頭葉、脳幹から3種類の調節領域(J12a、J12c、J12d)が検出された。J12c、J12dはCSFから検出されていない。一方、CSFから検出されたJ12aは小脳、後頭葉、脳幹からも検出されたが、CSFから検出されたもう一つの調節領域(J12b)は調べた脳組織から検出されなかった。

以上から、次のように考えることができる。脳に存在するJCVの調節領域が全てCSFから検出されるわけでない。脳で活発に増えているJCVがCSFから検出されやすい。逆に、CSFから検出されたJCV調節領域の全てが必ずしも脳組織から検出されない。本研究で示したように、JCV調節領域は中枢神経系での特有の分布域を有することがあるから、CSFから検出された調節領域が摘出された脳組織からは見つからないことがあるであろう。

3. PML型調節領域の多様性

1990年に原型調節領域が発見され、JCVの調節領域は患者体内で原型からPML型への変化することが明らかになった。当時、構造が明らかにされたPML型調節領域は約10個であり、これらと原型調節領域との比較から、PML型調節領域の多くは、40～50塩基対の長さの特定の配列、domain Aとdomain Bがそれぞれ重複し、欠失していた。しかし、我々が2年間に検出したPML型調節領域の構造は極めて多様であった。domain Aの重複とdomain Bの欠失を持つ調節領域は検出された調節領域の1/4～1/3にすぎず、それ以外の構造を有する調節領域が数多く検出された。欠失や重複が何回も起きた調節領域、欠失だけを持つ調節領域などが次々と検出された。欠失はdomain B以外のいろいろな領域でも起きていた

それ加えて、同一PML患者の中枢神経系での多様なJCV調節領域が発見された。即ち、我々は、PMLの診断サービスでPMLと診断された1名の患者の剖検脳組織を調べる機会を得た。小脳、大脳後頭葉、脳幹からJCV調節領域の検索を行った結果、3種の異なるPML型の調節領域(J12a、J12c、

J12d)を検出した。これらの調節領域は原型調節領域から独立に作られたと考えられた。

以上により、患者間でみても、同一患者でみても、PML型調節領域が極めて多様であることがわかった。

4. PML型調節領域を持つJCVの増殖能

PMLの診断サービスを通して得た、さまざまなPML型調節領域をもつキメラJCVを作成し、COS-7細胞での増殖能を検討した結果、一部のキメラウイルスはよく増殖したが、他のクローンは原型JCVより増殖が遅れることが判明した。

COS-7細胞でのJCVの増殖はSV40のT抗原に依存しており、JCV自身のT抗原の発現を必要としないので(杉本ら、未発表データ)、COS-7でのJCVの増殖のスピードは主として後期蛋白(LP1、VP1、VP2、VP3)の発現に相関していると考えられる。従って、観察されたCOS-7細胞での増殖能の違いは、調節領域に存在する後期転写に対するプロモーター活性の違いを示していると考えられる。即ち、一部のPML型調節領域の後期プロモーター活性が原型調節領域のそれと同程度であるが、他のPML型調節領域のプロモーター活性は原型調節領域のそれより劣ると結論できる。

5. 調節領域の再編成の意味

PMLは体内に持続感染していたJCVが患者が免疫不全に陥ったときに惹起する脳症であり、一般に日和見感染症の一つと考えられている。しかし、単純にそう割り切れないのは、PML患者の脳病変部のJCVの調節領域には必ず再編成起きているからである。なぜ、PML患者の脳で必ず再編成型の調節領域が検出されるのかを解明することはJCV研究の重要課題の一つである。本研究で、中枢神経系から検出されるJCV調節領域は、構造的にも、機能的にも極めて多様であることが明らかにされた。この多様性の意義は何かを以下で考える。

PML型調節領域の多様性は、JCVが患者に存続している長い期間における、ウイルスと宿主との攻防を物語っているように思える。宿主の免疫的な監視から逃れるために、JCVは増殖力を弱めることが必要であるかもしれない。このようなJCV

の弱毒化が複数の潜伏組織(リンパ球が有力)で独立に起きる場合もあるであろう。しかし、一端患者の免疫力が低下すれば、中枢神経に運ばれ、そこでJCVは勝手気ままに増殖するであろう。その際、JCVの調節領域にさらなる再編成が起きて、強毒ウイルスが出現することもあるであろう。このように、ウイルスと宿主との攻防により、患者間における、あるいは患者個体内でのPML型調節領域の構造的、機能的多様性を説明できる。

結 論

「HIV感染症に関する臨床研究班」の分担課題の一つとしてPMLの診断サービスを全国の病院、医療施設に対して行い、14名の患者CSFからJCV調節領域を検出し、PMLの診断に貢献した。このように、我々が確立したDNA診断法の有用性が確認された。

本研究により、PML患者の中枢神経系から検出されるJCV調節領域は、構造的にも、機能的にも極めて多様であることが判明した。この多様性の意義は何か。なぜ、PML患者の脳で必ず再編成型の調節領域が検出されるのか。調節領域の再編成と患者の免疫との関係があるのか。等々、本研究により、解明されるべき、新たな問題が出てきた。

PMLの動物モデルは存在しないので、PMLの発症機構の解明には、患者におけるJCVの動態を詳細に解明することが不可欠である。このような臨床ウイルス学的な研究を臨床に携わる医師との共同で始めている。近い将来、PML患者におけるJCVの動態の全貌が明らかになるであろう。

他方で、PMLの発症機構の解明にはPML型JCVのウイルス学的な検討が必須である。PML型調節領域の多様性を考えると、さまざまなPML型調節領域を入手することが必要であるが、これらはPMLの診断サービスをひきつづき行うことによって得られるであろう。

謝 辞

CSFを提供していただいた全国の病院、医療機関の先生方に感謝します。

参考文献

- 1) Agostini, H. T., Ryschkewitsch, C. F., Singer, E. J., et al.: JC virus regulatory region rearrangements and genotypes in progressive multifocal leukoencephalopathy : two independent aspects of virus variation. *J. Gen. Virol.* 78: 659-664, 1997
- 2) Frisque, R. J., Bream, G. L., Cannella, M. T.: Human polyomavirus JC virus genome. *J. Virol.* 51: 458-469, 1984
- 3) Hara, K., Sugimoto, C., Kitamura, T., et al.: Archetype JC virus efficiently replicates in COS-7 cells, simian cells constitutively expressing simian virus 40 T antigen. *J. Virol.* 72:5335-5342, 1998
- 4) Iida, T., Kitamura, T., Guo, J., et al.: Origin of JC virus variants associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 5062-5065, 1993
- 5) Padgett, B. L., Walker, D. L.: New human papovaviruses. *Prog. Med. Virol.* 22: 1-35, 1976
- 6) Sugimoto, C., Ito, o., Tanaka, k., et al.: Amplification of JC virus regulatory DNA sequences from cerebrospinal fluid: diagnostic value for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch. Virol.* 143: 249-262, 1998
- 7) Yogo, Y., Kitamura, T., Sugimoto, C., et al.: Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J. Virol.* 64: 3139-3143, 1990