

図4 各種薬剤の累積MIC分布

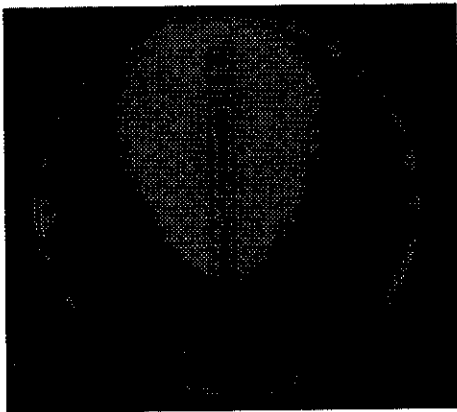


図5 E Test

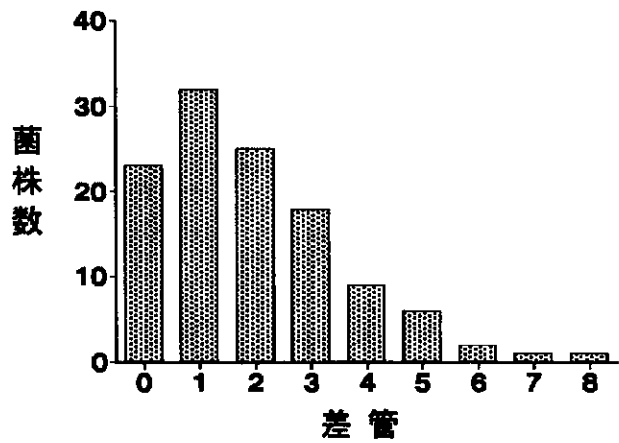


図6 E Testの判定者による測定値のばらつき

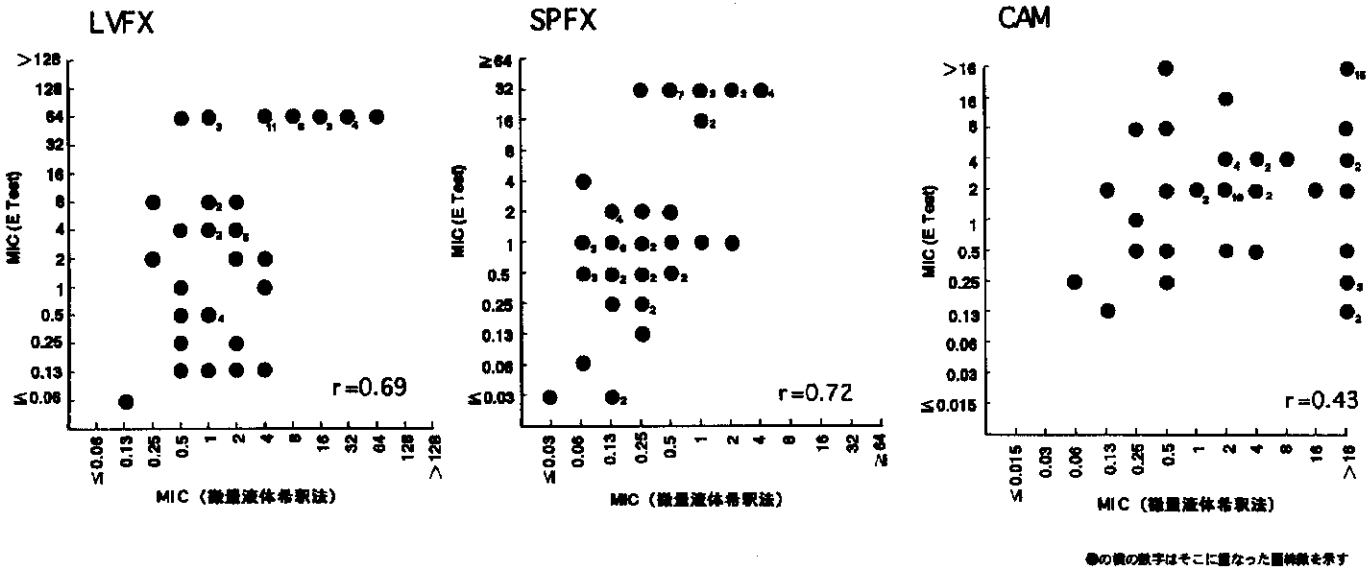


図7 E Testと微量液体希釈法で測定したMICの相関

●の横の数字はそこに重なった菌株数を示す

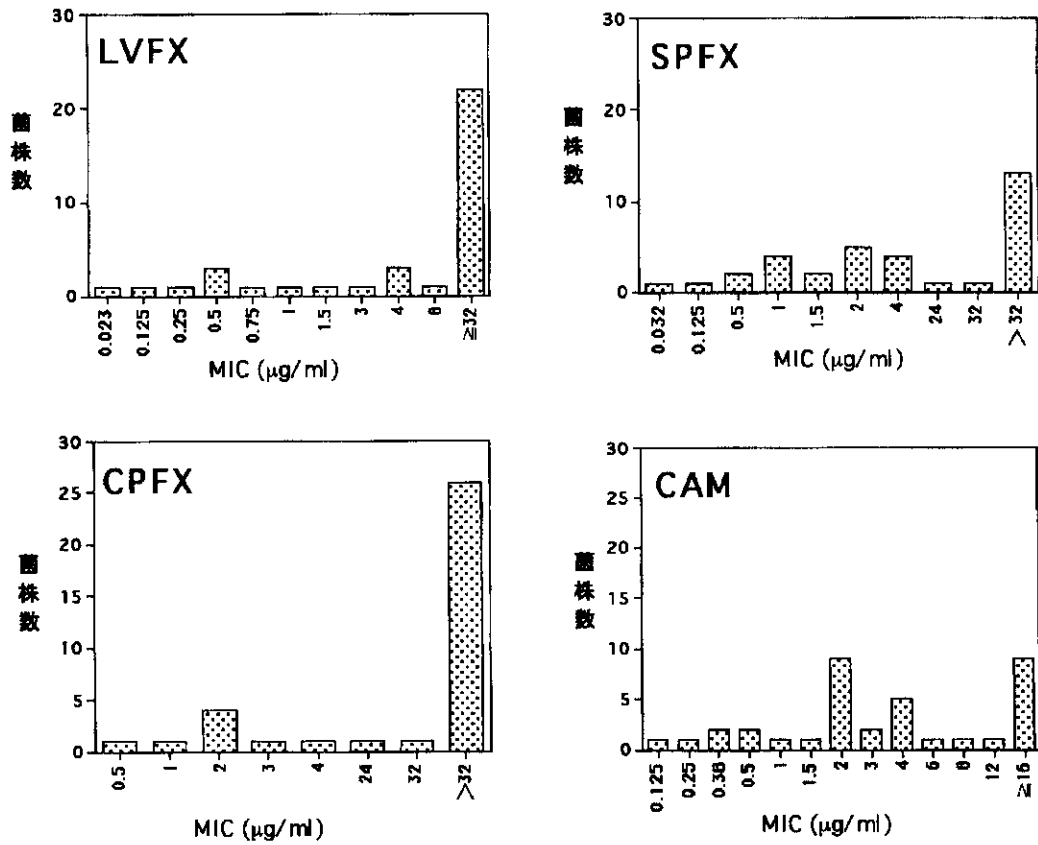
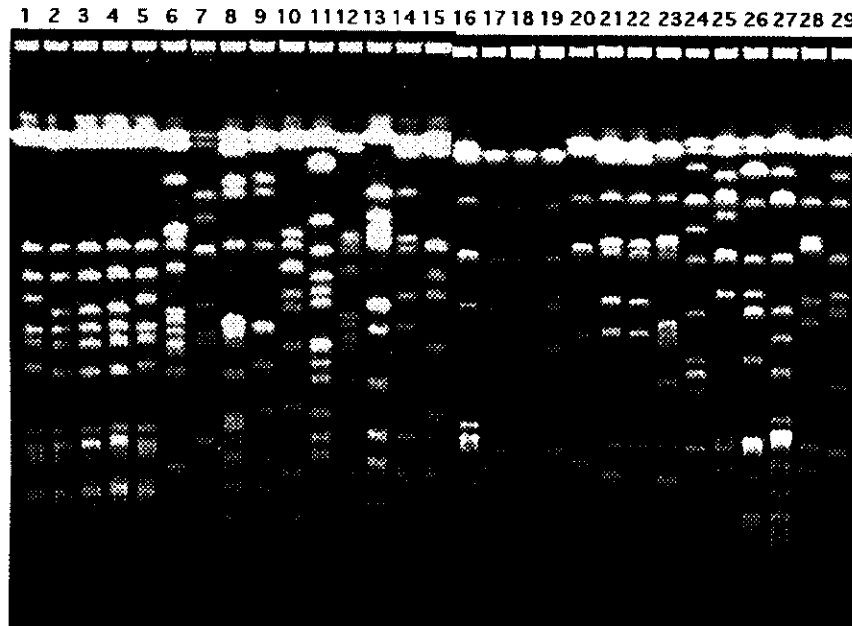


図8 E Testで測定した各種薬剤のMIC



2, 3, 4, 5: 1と同一患者

図9 パルスフィールド電動泳動パターン (A病院)

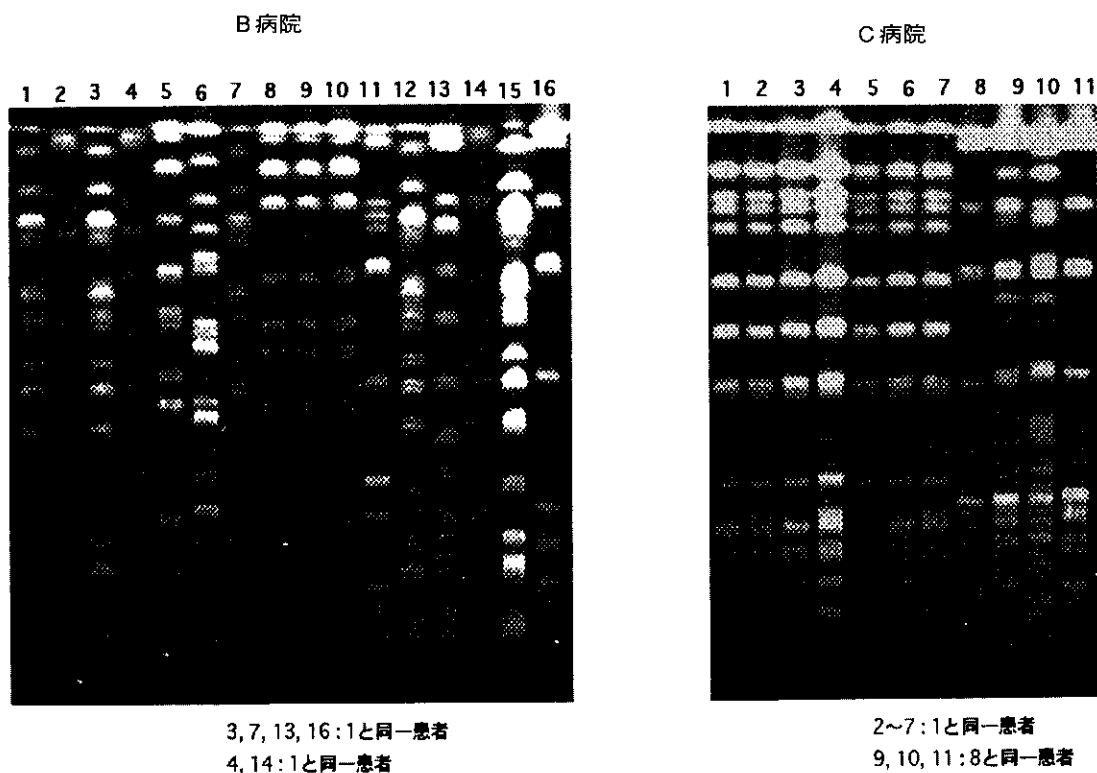


図 10 パルスフィールド電動泳動パターン (B, C 病院)

考 察

微量液体希釈法による非定型抗酸菌の薬剤感受性試験法を確立し、臨床分離株を対象に抗結核薬やニューキノロン剤、clarithromycin、azithromycin の MIC 値を検討した。Middlebrook 7H9 medium を用いた微量液体希釈法は早ければ4日、遅くとも7日間で判定でき、判定者による測定誤差も少なく、標準とすべき検査法と思われた。検討した薬剤の中ではRFP、LVFX、SPFXが比較的有効と考えられる。非定型抗酸菌に対し通常の抗結核薬は効果がよくないとされるが、RFPは高い抗菌活性が認められた。CAMは非定型抗酸菌症の治療や予防に用いられる薬剤であるが、今回の検討では高いMICを示す菌株が40%程度認められた。これらの菌が分離された患者の基礎疾患やCAMの投与歴についても今後検討する予定である。AZMは今後使われるようになる可能性があるが、MICの分布はCAMに似通っていた。どの薬剤についてもMIC値がどの程度であれば臨床的に有効かという

breakpointはまだ知られておらず、今後多くの菌株について測定を行い、臨床効果をあわせて検討されるべきと思われる。

またMICを求めることができるディスク拡散法であるE Testについても微量液体希釈法と比較検討した。判定までに要する日数は小川培地を用いたこともあって10～16日であった。培地にSTCを加え菌が発育したところを判別しやすくしたが、菌の発育の様子によってMIC値の読みとりに際しての判定者間の誤差が大きくなる場合もあった。E Testを用いる施設では判定者間の誤差を少なくするようにトレーニングが必要である。微量液体希釈法との相関はLVFX、SPFXについては比較的良好であった。CAMについては相関がやや不良であったが、この原因は不明である。また相関が比較的良好でもMICの絶対値にはかなりの違いがみられる場合もあり注意が必要と思われる。非定型抗酸菌は一般細菌に比べ発育に時間がかかる

ため、E Test においてはその間における薬剤の失活や拡散によってMIC値の測定が不正確になる可能性があり、小川培地を用いる場合は蛋白と薬剤の結合も問題になりうる。E Test は特殊な設備を必要とせずに検査できることが利点であるが、非定型抗酸菌に用いる場合は上記のような点をふまえて慎重に判断すべきと思われる。

結 論

Middlebrook 7H9 medium を用いた微量液体希釈法による非定型抗酸菌の薬剤感受性試験法を確立した。臨床分離株について検討したところ、RFP、LVFX、SPFX が比較的有効と思われた。E Test については問題点に注意して利用すべきと思われた。今後は微量液体希釈法を中心にさらに多数の菌株について検討し、日本の MAC の薬剤感受性の実態を把握し、有効な治療法を探りたい。また薬剤の併用効果についても、微量液体希釈法による FIC index を用いて検討したい。

参考文献

- 1) Biehle JR et al: Evaluation of Etest for susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria. J. Clin. Microbiol. 33: 1760-1764, 1995
- 2) Lebrun L et al: Evaluation of the ETest for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium avium* to clarithromycin. J. Antimicrobial Chemotherapy 37: 999-1003, 1996
- 3) 富岡治明ほか：各種キノロン剤の *in vitro* *Mycobacterium avium* 並びに *Mycobacterium intracellulare* 活性の比較。結核 68: 367-370, 1993
- 4) 山根誠久ほか：Middlebrook合成培地での抗酸菌薬剤感受性試験(第2報)臨床病理。46: 719-727, 1998
- 5) Slutsky AM et al: Polyclonal infections due to *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS detected by pulsed-field gel electrophoresis of sequential clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 32(7): 1773-1778, 1994



HIV/AIDS日和見疾患における 脳脊髄液PCR法の半定量的検討

立川 夏夫、菊池 嘉、平林 義弘、青木 眞、安岡 彰

国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター

研究要旨

トキソプラズマ脳炎・中枢神経系リンパ腫・進行性多巣性白質脳症は AIDS 患者においてそれぞれ *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*)、Epstein-Barr virus (EBV)、Jc virus (JCV) が関与すると考えられており、また中枢神経局在性病変を呈する主要な3疾患である。前回我々は HIV 患者 23 症例において、PCR (polymerase chain reaction) 法による脳脊髄液からの *T.gondii*・EBV・JCV の検出をおこない、剖検による病理学的診断との比較をおこなった。

今回我々はさらに症例を増やし脳脊髄液の PCR 法における感度と特異度を検討した。*T.gondii* に関しては、53 例が検討可能であり、感度は 100%・特異度 67% であった。EBV に関しては、52 例が検討可能であり、感度は 91%・特異度 85% であった。ただしこの EBV を全身の病変を含めたリンパ腫のマーカーとすると、感度は 88%・特異度 94% であった。JCV に関しては、57 例が検討可能であり、感度は 83%・特異度 100% であった。

更に検討可能な患者脳脊髄液を用いて、原液・1/10・1/100 と 10 倍希釈を施行し半定量的検討をおこなった。この半定量的検討では、*T.gondii* の PCR においては 4 例が検討可能であった。原液・1/10・1/10・1/10 と 1/100 以上の希釈では陽性は認められなかった。このように遺伝子量が多くないことが *T.gondii*-PCR の検出感度の良くない理由の 1 つと考えられた。EBV の PCR においては 3 例のみが検討可能であった。原液・1/100・1/1000 と 3 段階で陽性であった。JCV の PCR においては 4 例が検討可能であった。1/10³・1/10⁶・1/10⁷・1/10⁸ と 4 段階で陽性であった。進行性多巣性白質脳症において多量の JCV のウイルスが存在することが示唆された。

分担研究者：安岡 彰

研究協力者：立川夏夫、菊池 嘉、平林義弘、青木 眞

Semi-quantitative polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, Epstein-Barr virus, and JC virus from cerebrospinal fluid by and pathillogical diagnosis in patients with HIV/AIDS.

Akira Yasuoka, Natsuo Tachikawa, Yoshimi Kikuchi, Yoshihiro Hirabayashi, Makoto Aoki

AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan

目 的

HIV/AIDS(human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome)患者において中枢神経系は日和見感染・腫瘍の代表的な標的臓器である。AIDS患者はその臨床経過中に約40%が神経学的症状を経験し、これらの患者の75%以上において剖検所見で中枢神経系に病変を検出したとの報告もある^{1,2)}。AIDS患者の中枢神経局在性病変の鑑別において以下の3疾患の鑑別がまず重要である。トキソプラズマ脳炎(TE: toxoplasmic encephalitis)・中枢神経系リンパ腫(PCNSL: primary central nervous system lymphoma)・進行性多巣性白質脳症(PML: progressive multifocal leukoencephalopathy)の3疾患である。MartinezらはHIV患者の脳病変200症例の検討においてTEは34%、PCNSLは14%、PMLは8%の合併が認められたことを報告している³⁾。Martinezらはさらに22%の症例において複数疾患の合併が認められたことを報告している。これら3疾患間においてTEとPCNSL、TEとPML、PCNSLとPMLの合併がそれぞれ4%、1%、0.5%に認められている。これら3疾患は生命予後に関与する重篤な疾患であり、初期に的確な診断をすることが不可欠である。TEの責任病原体は*T.gondii*と考えられており、PMLの責任病原体はパポバウイルスのJCウイルス(JCV)と考えられている。PCNSLは腫瘍性疾患であるが、Epstein-Barr virus (EBV)との関連が非常に強いことが知られている^{4,5)}。確定診断のためには脳生検が不可欠であるが、脳生検自体侵襲性があり、そのような侵襲的な方法なしで診断が可能であることが望ましい。

PCR (polymerase chain reaction) 法は多くの感染症において、感度と特異度に優れた迅速方法として知られている。前回我々は脳脊髄液を検体として、PCR法によるTE・PCNSL・PMLの診断を試み、剖検による病理診断の結果とPCR法との結果を比較し、PCR法の有用性の検証を試みた。しかし前回の症例数は各疾患に関して考慮すると症例数が少なく、臨床的に感度と特異度を検討するには症例数の積み重ねが必要と考えられた。しかし、最近のHAART(highly active antiretroviral therapy)の開始により、日和見疾患の発症は低下している。我々が検討している3疾患は基本的には

CD4数が低下した状態で発症する日和見疾患である。TEの90%以上がCD4数が $200/\text{mm}^3$ 以下で発症し、2/3は $100/\text{mm}^3$ 以下で発症すると報告されている⁶⁾。PCNSLもPMLも多くはCD4数が $50/\text{mm}^3$ 以下で発症すると考えられる。そのためこの1年間での症例の自然増加はあまり期待できなかった。そのため我々は他施設での今までの脳脊髄液検体を加えて症例数を増やし、各PCR法による感度と特異度の検討とした。

また今回は、さらに脳脊髄液中の*T.gondii*・EBV・JCVに関して半定量的な遺伝子量の検討をおこなった。*T.gondii*に関しては検出感度上の問題があり、EBV・JCVに関しては特異度上の問題があることより、それらの問題に関してこの半定量的な検討が何らかのsuggestionを示唆する可能性が考えられた。

方 法

1. 患者と検体

前回報告した病理学的に診断されたHIV患者23例の脳脊髄液に加えて、36例が追加された。ただしこれらの36例の診断は病理学的に診断された症例も臨床的診断のみの症例も含まれている。これらの追加された症例に関しては、HIV感染のrisk factorやCD4数等の詳しい背景は不明である。

2. 脳脊髄液からの核酸抽出・各nested PCR・対応バンドの検出

脳脊髄液からの核酸抽出・各 nested PCR・対応バンドの検出は前回報告と同様の報告にておこなった。脳脊髄液100 μl よりDNA抽出キットにて抽出、脳脊髄液由来DNAは最終的に10 μl の蒸留水に溶解させ、この10 μl をテンプレートとしてPCRを施行した。*T.gondii*の場合には脳脊髄液を凍結・融解を3回施行後DNA抽出キットを用いた。*T.gondii*におけるnestedPCR法では*T.gondii*のB1遺伝子を増幅させるSchoondermarkの方法に改変を加えてnestedPCR法とした⁷⁾。EBVにおけるnestedPCR法では、Cinqueらの方法に基づいてEBVのEBNA-1遺伝子の増幅させるnestedPCR法を施行した⁸⁾。JCVにおけるnestedPCR法では、Weber

らの方法を改変してJCVのlarge T遺伝子の増幅させるnested PCR法を施行した⁹⁾。前回検討より、各PCR法の検出能力 detection limit は *T.gondii* は 4tachyzoite(増殖虫体)、EBVは5~15genome、JCVは10genomeであった。検出方法は10 μ lのPCR増幅産物を2%アガロースゲル(0.5g/mlのエチジウム・ブロマイドを含む)に電気泳動させ紫外線にて検出する方法であった。想定するサイズのバンドが検出された場合に陽性と判定した。PCRによる検査であるため2回施行して陽性・陰性を判定した。

3. 脳脊髄液中の*T.gondii*・EBV・JCVに関する半定量的遺伝子量の検討

更に検討可能な患者脳脊髄液を用いてまずDNA抽出液を作成。この抽出液を原液として蒸留水にて希釈していった。原液・1/10・1/10・1/100と10倍希釈をしてゆき、陽性バンドが検出されなくなるまでの希釈を施行した。

結果

今回検討した脳脊髄液は59例であった。各PCRの結果は表1に示してある。この内3疾患につき検討可能であったのが51例、他の8例では1つまたは2つの疾患に関してしか検査されなかった。今回検討した3疾患を発症した患者は33例(TEは12例、PCNSLは11例、PMLは12例、この内1例はTEとPCNSLの合併例であり、もう1例はTEとPMLの合併例)であった。他の26例において15例は他の脳病変(3例はHIV脳症、1例はアスペルギルス脳膿瘍、8例はサイトメガロウイルス脳炎、クリプトコッカス髄膜炎2例、VZV脳炎1例)を合併しており、11例では明らかな脳病変は認められなかった。6例は脳以外の部位での悪性リンパ腫を合併していた。

1. *T.gondii*におけるnestedPCR法の結果

*T.gondii*に関しては、53例が検討可能であり、12例のトキソプラズマ脳炎に対して8例が陽性であり、4例が陰性であり、偽陽性は認められなかった。感度は100%・特異度67%であった。ある症

例ではTEとPCNSLとの合併があり、PCR法により2つの遺伝子(*T.gondii*とEBV)が両方とも検出された。しかし他のもう1つの症例ではTEとPMLとの合併があったが、PCR法にて検出されたのはEBVとJCVであり、*T.gondii*は検出されなかった。

脳脊髄液中の*T.gondii*に関する半定量的遺伝子量の検討に関しては4例が検討可能であった。原液・1/10・1/10・1/10と陽性であり1/10までの希釈では陽性でも1/100以上の希釈では陽性は認められなかった。

2. EBVにおけるnestedPCR法の結果

EBVに関しては、52例が検討可能であり、11例の中中枢神経系リンパ腫に対して10例が陽性であり、1例が陰性であり、偽陽性が6例に認められた。感度は91%・特異度85%であった。ただしこのEBVを全身の病変を含めたリンパ腫のマーカーとすると、16例のリンパ腫に対して14例が陽性であり、2例が陰性であり、偽陽性が2例に認められたこととなった。感度は88%・特異度94%であった。脳脊髄液中のEBVが中枢神経系以外のリンパ腫の場合に陽性となる場合があることが前回指摘された。ただし今回の追加症例の中には中枢リンパ腫(-)かつ末梢リンパ腫(+)の症例はなく、前回よりも検討はできていない。脳脊髄液中のEBVを全身の病変を含めたリンパ腫のマーカーとすると、感度は88%・特異度94%であった。

脳脊髄液中のEBVに関する半定量的遺伝子量の検討に関しては3例が検討可能であった。原液・1/100・1/1000と陽性であった。1/100にて陽性であった症例はPCNSL診断時の脳脊髄液であり、1/1000にて陽性であった症例はPCNSLがコントロール不良となり直接死因となった解剖時の脳脊髄液であった。それに対し原液にて陽性であった症例はTEと診断されており、偽陽性と考えられる症例であり、TE-PCRも陽性であった。

3. JCVにおけるnestedPCR法の結果

JCVに関しては、57例が検討可能であり、12例の進行性多巣性白質脳症に対して10例が陽性であり、偽陽性は認められなかった。感度は83%・特異度100%であった。

表1 Results of PCR for *T. gondii*, EBV, and JCV from CSF

Patient	DNA in CSF			CD4	clinical diagnosis (pathology)
	<i>T.gondii</i>	EBV	JCV		
1	positive	(-)	(-)	18	TE
2	positive	positive	(-)	53	TE+PCNSL
3	(-)	positive	(-)	4	PCNSL
4	(-)	positive	(-)	7	liver lymphoma
5	(-)	positive	(-)	3	liver lymphoma+CMV encephalitis
6	(-)	positive	(-)	8	lung lymphoma
7	(-)	positive	(-)	6	muscle lymphoma
8	(-)	(-)	(-)	5	heart lymphoma+CMV encephalitis
9	(-)	(-)	(-)	239	stomach lymphoma
10	(-)	(-)	(-)	6	CMV encephalitis
11	(-)	(-)	(-)	6	CMV encephalitis
12	(-)	(-)	(-)	1	CMV encephalitis
13	(-)	(-)	(-)	1	CMV encephalitis
14	(-)	(-)	(-)	2	HIV encephalitis
15	(-)	(-)	(-)	1	brain aspergillosis
16	positive	(-)	(-)	2	TE
17	positive	(-)	(-)	4	TE
18	(-)	(-)	(-)	58	TE
19	(-)	positive	(-)	2	PCNSL
20	(-)	positive	(-)	25	PCNSL
21	(-)	positive	(-)	40	PCNSL
22	(-)	(-)	positive	14	PML
23	(-)	(-)	positive	1	PML
24	positive	positive	(-)	ND	TE
25	(-)	positive	(-)	ND	PCNSL
26	(-)	positive	(-)	ND	PCNSL
27	(-)	(-)	(-)	ND	HIV encephalitis
28	(-)	(-)	positive	ND	PML
29	(-)	positive	positive	ND	PML+TE
30	(-)	(-)	(-)	ND	none
31	(-)	positive	(-)	ND	PCNSL
32	(-)	positive	(-)	ND	PCNSL
33	(-)	(-)	(-)	ND	none
34	(-)	(-)	(-)	ND	HIV encephalitis
35	(-)	(-)	positive	ND	PML
36	(-)	(-)	(-)	ND	CMV encephalitis
37	(-)	(-)	(-)	ND	none
38	(-)	(-)	(-)	ND	TE
39	(-)	positive	(-)	ND	PCNSL
40	(-)	(-)	(-)	ND	none
41	(-)	(-)	(-)	ND	none
42	(-)	(-)	(-)	ND	CMV encephalitis
43	(-)	(-)	(-)	ND	VZV encephalitis
44	(-)	(-)	(-)	ND	TE
45	(-)	(-)	(-)	ND	cryptococcal meningitis
46	(-)	(-)	(-)	ND	none
47	(-)	(-)	(-)	ND	cryptococcal meningitis
48	(-)	(-)	(-)	ND	none
49	positive	(-)	(-)	ND	TE
50	(-)	(-)	(-)	ND	PML
51	(-)	positive	(-)	ND	PCNSL
52	positive	ND	(-)	ND	TE
53	ND	ND	(-)	ND	PML
54	positive	ND	ND	ND	TE
55	ND	ND	positive	ND	PML
56	ND	(-)	ND	ND	PCNSL
57	ND	ND	positive	ND	PML
58	ND	ND	positive	ND	PML
59	ND	ND	positive	ND	PML
total case	53	52	57		
true positive	8	10	10		
false positive	0	6	0		
false negative	4	1	2		
true negative	41	35	45		
specificity	1.00	0.85	1.00		
sensitivity	0.67	0.91	0.83		

更に検討可能な検体を用いて、半定量的検討をおこなった。この半定量的検討では、JCVのPCRにおいては4例が検討可能であった。 $1/10^3 \cdot 1/10^6 \cdot 1/10^7 \cdot 1/10^8$ と高い希釈検体でも陽性で

考 察

今回は前回より症例数があり、より感度と特異度に関して有意義な結果になったと考えられる。さらに、症例は少ないが半定量的検討を加えることにより、より詳しい検討が可能であった。

本来 *T.gondii* に対する nested PCR の検出能力 detection limit は 4tachyzoite (増殖虫体) であり、それほど検出能力が劣るわけではない。実際 TE の場合に脳脊髄液中に *T.gondii* 自体が検出される場合も報告としてはあるが、非常にまれな現象である。このことより患者脳脊髄液中の *T.gondii* 自体の量は少ないことが予想されていたが、今回のこの半定量的遺伝子量の検討では、そのような予想を支持する結果となったと考えられる。こように遺伝子量が多くないことが *T.gondii*-PCR の検出感度の良くない理由の 1 つと考えられた。

EBV の場合、中枢神経系以外の部位にリンパ腫を合併し中枢神経系にリンパ腫の存在が剖検上認められなかった症例で、脳脊髄液中に EBV の DNA の検出されたことが前回は問題となった。今回もこれに関しては示唆のある症例・結果はみいだせなかった。

JCV の場合、 $1/10^8$ まで希釈して陽性だった検体の場合、PCR の検出能力 detection limit は JCV の 10 genome であることより、 $10^9/100\mu\text{l}$ のウイルス遺伝子が存在することとなる。即ち進行性多巣性白質脳症において脳脊髄液中に多量の JCV のウイルスが存在することが示唆された。天児らの報告では核内に多数のウイルス粒子が存在することが電子顕微鏡写真で示されており¹⁰⁾、PML はその細胞内でのウイルスの増殖が oligodendroglia の髄鞘形成保持機構を障害し、脱髄を生じると考えられている¹¹⁾。脳脊髄液中に多量の JCV のウイルスが存在することとの対応が見られると考えられる。PCR 法を用いた検査においては、常に false positive が問題となる。余郷らは regulatory region の遺伝子配列が重要なマーカーになることを報告してい

る。その他に、このような定量的(今回は半定量的)な検討を加えることにより特異度に関する新たな知見が得られると考えられた。

結 論

症例数を増やすことにより各 PCR 法の感度と特異度の傾向が認められた。特に *T.gondii* の場合感度に問題があり、EBV の場合特異度に問題のあることが判明した。今後は半定量的による検討を増やして、これらの問題につき改善を加えてゆく予定である。

今回の脳脊髄液の検討につき都立駒込病院神経内科岸田修二医師より検体の提供をして頂いたことに関しまして深謝いたします。

参考文献

- 1) Moskowitz LB, Hensley GT, Chan JC, et al. The neuropathology of acquired immune deficiency syndrome. Arch Pathol Lab Med. 1984;86:867-872.
- 2) Rosenblum ML, Levy RM, Bredesen DE. Neurosurgical implications of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Clin Neurosurg. 1988; 34:419-45
- 3) Martinez AJ, Sell M, Mitrovics T, Stoltenburg-Didinger G, Iglesias-Rozas JR, Giraldo-Velasquez MA, Gosztonyi G, Schneider V, Cervos-Navarro J. The neuropathology and epidemiology of AIDS. A Berlin experience. A review of 200 cases. Pathology, Research & Practice. 1995;191:427-423
- 4) Hamilton-Duitot S, Pallesen G, Franzman MB, et al. AIDS-related lymphoma. Histopathology, immunophenotype, and association with Epstein-Barr virus as demonstrated by in site nucleic acid hybridization. Am J Pathol. 1991;138:149-163
- 5) MacMahon EME, Glass JD, Hayward SD, et al. Epstein-Barr virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma. Lancet. 1991;338:969-973
- 6) Grant IH, et al : Toxoplasma gondii serology in HIV-infected patients-development of central nervous system toxoplasmosis in AIDS-. AIDS 4: 519 ,1990.
- 7) Schoondermark E, Galama J, Kraaijeveld C, van Druuten J, Meuwissen J, Melchers W. Value of the polymerase chain reaction for detection of Toxoplasma gondii in cerebrospinal fluid from patients with

- AIDS. Clin Infect Dis. 1993;16: 661-666
- 8) Cinque P, Brytting M, Vago L, Castagna A, Parravicini C, Zanchetta N, Monforte AD, Wahren B, Lazzarin A, Linde A. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. Lancet 1993;342: 398-401
 - 9) Weber T, Turner RW, Frye S, Luke W, Kretzschmar HA, Luer W, Hunsmann G. Progressive multifocal leukoencephalopathy diagnosed by amplification of JC virus-specific DNA from cerebrospinal fluid. AIDS 1994;8:49-57
 - 10) Amako K, Mori R : Serological and morphological studies on progressive multifocal leukoencephalopathy virus. Japan J Microbiol.,16, 155-8, 1972.
 - 11) 長谷川靖, 長嶋和郎:JCウイルスとPML.実験的脳腫瘍.「遅発性ウイルス感染症とその類縁疾患」,Medical View,東京,1996,pp111-124



脳局在病変を合併したエイズ患者の脳脊髄液からの *Toxoplasma gondii*, Epstein-Barr virus, JC virus の DNA 検出

立川 夏夫¹⁾、岡 慎一¹⁾、潟永 博之¹⁾、木村 哲²⁾、安岡 彰¹⁾、

¹⁾国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター

²⁾東京大学大学院医学系研究科 感染制御学、感染症内科

研究要旨

Object: Toxoplasmic encephalitis (TE), primary central nervous system lymphoma (PCNSL) and progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) are major central nervous system (CNS) diseases in patients with AIDS. We assessed the diagnostic value of polymerase chain reaction (PCR) in the detection of DNAs of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), Epstein-Barr virus (EBV) and JC virus (JCV) in the cerebrospinal fluid (CSF).

Methods: We compared the PCR results with those of pathological findings at autopsy.

Patients or Materials: The present study included 23 autopsies representing those in whom CSF samples were obtained before death while the patient was hospitalized or at autopsy.

Results: The threshold levels for PCR detection were 4 tachyzoites of *T. gondii*, 5-15 genomes of EBV and 10 genomes of JCV. We identified *T. gondii* DNA in 4 out of 5 autopsy-defined cases of TE, EBV DNA in 5 out of 5 cases with PCNSL, and JCV DNA in 2 out of 2 cases with PML. The specificity of PCR was 100% in TE, 78% in PCNSL, and 100% in PML.

Conclusion: Although the number of cases was relatively small in this study, PCR correctly identified *T. gondii* DNA in those cases in which PML or PCNSL was the sole clinical diagnosis. Our results indicate that PCR examination of CSF is a clinically useful tool for the diagnosis of focal brain lesions in patients with AIDS.

分担研究者：安岡 彰、木村 哲

研究協力者：立川夏夫、岡 慎一、潟永博之

Detection of *Toxoplasma gondii*, Epstein-Barr virus, and JC virus DNAs in the cerebrospinal fluid in AIDS patients with focal CNS complications.

Natsuo Tachikawa¹⁾, Hiroyuki Gatanaga¹⁾, Akira Yasuoka¹⁾, Shinichi Oka¹⁾, Satoshi Kimura²⁾

¹⁾AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan, Tokyo, ²⁾Department of Infection Control & Prevention, Department of Infectious Diseases, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

目的

The central nervous system (CNS) in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is a frequent site of infections caused by opportunistic microorganisms and/or neoplasms. About 40% of AIDS patients develop significant neurological symptoms during the course of their illness, and CNS lesions are found at autopsy in more than 75% of these patients^{1, 2)}. Although cytomegalovirus (CMV) encephalitis and AIDS dementia complex are very important complications of CNS, these diseases usually do not show focal CNS lesions. Toxoplasmic encephalitis (TE), primary CNS lymphoma (PCNSL), and progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) are the major focal brain diseases in AIDS patients. Davies *et al*³⁾ reported that the frequencies of TE, PCNSL and PML were 9.2%, 11.7% and 5.7%, respectively, in their study of 349 cases with HIV-associated brain pathology. Martinez *et al*⁴⁾ also reported that frequencies of the above diseases were 34%, 14% and 8%, respectively, in 200 cases with HIV-associated brain pathology. They also showed that multiple infections were present in 22% of patients and among the above three diseases, simultaneous development of TE and PCNSL, TE and PML, or PCNSL and PML was found in 6%, 1% and 1% of their patients, respectively⁴⁾. These are life-threatening diseases and, thus, early diagnosis is important for commencement of effective therapies. However, a definitive diagnosis is usually very difficult or even impossible by radiological examination and/or routine clinical examination. Brain biopsy is the only procedure that provides a definitive diagnosis, however, the procedure is invasive and carries a risk of further complications particularly in AIDS patients^{5, 6)}.

The polymerase chain reaction (PCR) is well recognized as a sensitive, specific, and rapid diagnostic technique for the diagnosis of a variety of infections. We have applied this method previously for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia⁷⁾ and *Mycobacterium tuberculosis* infections⁸⁾. Partial or whole DNA sequences of *Toxoplasma gondii*, Epstein-Barr virus (EBV) and JC virus (JCV), representing the pathogenic microbes for TE, PCNSL and PML, respectively, are already known^{9, 10)}. In this study, we amplified the DNA of these microorganisms using samples of cerebrospinal fluid (CSF). Here, we report

the sensitivity and specificity of PCR as a diagnostic tool for the above infections, and compare the results with those obtained by other diagnostic tests.

方法

1. Patients and samples

Autopsy was performed in 37 HIV-1-infected patients in the hospital of the Institute of Medical Science, University of Tokyo, from March 1989 through October 1997. The present study included 23 autopsies representing those in whom CSF samples were obtained before death while the patient was hospitalized or at autopsy (20 males and 3 females). All patients were Japanese and diagnosed as AIDS. The risk factors for infection in this group included the following; hemophilia (n=6), homosexual relationship (n=10), and heterosexual relationship (n=7). The mean count of CD4⁺ T lymphocytes (CD4) was 22.5/ μ l (range, 1 to 239). In 11 autopsies, focal brain diseases (4 TE, 4 PCNSL, 2 PML, and 1 with PCNSL and TE) were confirmed pathologically. In 12 patients without these three diseases, 9 had other brain lesions (2 AIDS dementia complex, 1 cerebral aspergillosis, and 6 cytomegalovirus encephalitis). Six had peripheral lymphoma without CNS involvement and one had both PCNSL and peripheral muscle lymphoma. In two patients, consecutive samples of CSF were examined for EBV or JCV.

2. DNA extraction from CSF

DNA was extracted from 100 μ l of CSF using a DNA extraction kit (Smitest EX-R&D, Sumitomo Metal Industries, Tokyo) according to the instructions provided by the manufacturer. DNA was re-suspended in 10 μ l of distilled water and used for one nested PCR. In the case of PCR for *T. gondii*, CSF samples were frozen and thawed three times before DNA extraction.

3. Nested PCR

a. *T. gondii* (Toxo-nested PCR)

PCR for B1 gene of *T. gondii* was performed as described previously¹¹⁾. The primers and specific conditions used in the assay are summarized in Table 1. Tachyzoites of *T. gondii* of RH-strain (donated by Prof. S. Kojima, Department of Parasitology, Institute

of Medical Science, University of Tokyo) were used as the positive control. DNA was extracted from 4×10^6 tachyzoites, which were propagated in the peritoneum of a ddY mouse. The DNA was suspended in 100 μ l of distilled water and the positive control of 10-fold dilutions was used to determine the detection threshold of Toxo-nested PCR.

b. EBV (EBV-nested PCR)

The EBNA-1 (Epstein-Barr virus nuclear antigen-1) gene of EBV was amplified using the method described previously¹². The primers and conditions used in the assay are listed in Table 1. One Namalwa cell contains one to three copies of EBV genome¹³. DNA was extracted from 1×10^6 Namalwa cells and 10-fold dilutions of DNA extraction were used to determine the detection threshold of EBV-nested PCR.

c. JCV (JCV-nested PCR)

The large T antigen gene of JCV was amplified as described previously¹⁴. The primers and conditions used in the assay are listed in Table 1. The DNA of Mad-1, an isolate of JCV from the brain of a PML patient¹⁵, was amplified and used for positive controls. Ten-fold dilutions of 0.01 pg of Mad-1 genome, which roughly corresponds to 2×10^3 copies of the genome, were used to determine the detection threshold of JCV-nested PCR.

4. Electrophoresis

One-tenth of the amplified product was applied to an agarose gel (2%) containing ethidium bromide (0.5 μ g/ml) for electrophoresis and it was visualized with ultraviolet illumination. To avoid false-positive results, all procedures were performed very carefully and every third sample served as a DNA-free control. Each sample was examined in at least two separate experiments.

結果

We first determined the detection threshold of the three nested PCRs using diluted positive controls. The detection threshold values were 4 tachyzoites of *T. gondii*, 5-15 genomes of EBV and 10 DNA copies of JCV. The detection threshold values of our system were relatively similar or even better than those of previous reports^{11,12,14}. The results of nested PCR analysis are summarized in Table 2 together with the pathological diagnosis. These results were compared with the pathological findings at autopsy.

1. Toxo-nested PCR

The diagnosis of TE was confirmed pathologically in five cases. Toxo-nested PCR was positive in four of

Table 1. Primers and conditions of nested PCRs for *T. gondii*, EBV and JCV used in this study

target	PCR	primers	mixture	cycle condition
<i>T. gondii</i>	first PCR(11)	5'-CAT TTT CGC AGT ACA CCA GG-3' 5'-GGA GTG AAG TCA TCC GCA GT-3'	primer 0.5pmol/ μ l MgCl ₂ 2.5mM dNTP 0.2mM	40 cycles (each) 60s at 94°C 60s at 42°C 60s at 72°C
	second PCR	5'-GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG-3' 5'-TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC-3'	Taq 0.02U/ μ l	
EBV	first PCR(12)	5'-AAG GAG GGT GGT TTG GAA AG-3' 5'-AGA CAA TGG ACT CCC TAA GC-3'	primer 0.5pmol/ μ l MgCl ₂ 2.5mM dNTP 0.2mM	30 cycles (each) 60s at 95°C 60s at 55°C(first) 60s at 60°C(second)
	second PCR (12)	5'-ACT GTG GTC AAG GAG GTT CC-3' 5'-ACT CAA TGG TGT AAG ACG AC-3'	Taq 0.02U/ μ l	60s at 72°C
JCV	first PCR	5'-AGA TCC CTG TAG GGG GTG TCT CC-3' 5'-ACT CCA CCC TGA TAA AGG TGG-3'	primer 0.5pmol/ μ l MgCl ₂ 1.5mM dNTP 0.2mM	40 cycles (each) 45s at 94°C 45s at 55°C 45s at 72°C
	second PCR (14)	5'-GAG CTT CTT GGG TTA AGT CA-3' 5'-CCT GAT TTT GGT ACA TGG AA-3'	Taq 0.02U/ μ l	

Numbers in brackets indicate reference numbers.

these cases. The specificity was 100% with no false positives. One false negative case was identified (Patient 18, Table 2). Repeated nested PCRs on different occasions in this patient were all negative. In Patient 16, computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) showed a focal lesion in the white matter of the frontal lobe. The brain lesion was of low density, showed no contrast enhancement on CT and was of high intensity on T2-weighted MRI, suggesting a clinical diagnosis of PML. Since Toxo-nested PCR was positive, treatment with pyrimethamine and clindamycin was initiated and the brain lesion regressed markedly within four weeks, as confirmed by MRI. However, the patient died of other unrelated complications four months later. Residual TE but not PML was confirmed at autopsy. In Patient 2, CT scan of the brain strongly suggested

PCNSL. The general condition deteriorated rapidly and the patient died three weeks after admission. At autopsy, TE was found in addition to PCNSL. Both DNAs of *T. gondii* and EBV were detected in this patient, retrospectively, by the nested PCRs of CSF obtained at autopsy.

2. EBV-nested PCR

All five patients who were positive for EBV in nested PCR of CSF were confirmed to have PCNSL at autopsy (Patients 2, 3, 19, 20, 21, Table 2). However, PCNSL could not be confirmed at autopsy in another group of four PCR positive patients (Patients 4- 7, Table 2), although all four had lymphomas in other areas, including the lung, liver, and muscles. Patient 3 had both PCNSL and muscle lymphoma. We categorized this patient as a PCNSL case. These results

Table 2 Results of PCR and pathological diagnosis in patients in patients with AIDS and CNS complications

Patient	DNA in CSF			CD4	pathology	clinical diagnosis	other pathological diagnosis and comments
	<i>T. gondii</i>	EBV	JCV				
1	positive	(-)	(-)	18	TE ^a	TE	
2	positive	positive	(-)	53	TE and PCNSL ^b	PCNSL	
3*	(-)	positive	(-)	4	PCNSL	PCNSL	P-lymphoma ^d (muscle)
4	(-)	positive	(-)	7			P-lymphoma (liver), AIDS dementia ^e
5	(-)	positive	(-)	3			P-lymphoma (liver), CMV encephalitis ^f
6	(-)	positive	(-)	8			P-lymphoma (lung)
7	(-)	positive	(-)	6			P-lymphoma (muscle)
8	(-)	(-)	(-)	5			P-lymphoma (heart), CMV encephalitis
9	(-)	(-)	(-)	239			P-lymphoma (stomach)
10	(-)	(-)	(-)	6			CMV encephalitis
11	(-)	(-)	(-)	6			CMV encephalitis
12	(-)	(-)	(-)	1			CMV encephalitis
13	(-)	(-)	(-)	1			CMV encephalitis
14	(-)	(-)	(-)	2			AIDS dementia
15	(-)	(-)	(-)	1			brain aspergillosis
16*	positive	(-)	(-)	2	TE	TE or PML?	PCR supported the diagnosis
17*	positive	(-)	(-)	4	TE	TE	
18*	(-)	(-)	(-)	58	TE	TE	
19*	(-)	positive	(-)	2	PCNSL	PCNSL	
20*	(-)	positive	(-)	25	PCNSL	PCNSL or TE?	PCR supported the diagnosis
21*	(-)	positive	(-)	40	PCNSL	PCNSL or TE?	PCR supported the diagnosis
22*	(-)	(-)	positive	14	PML ^c	PML	
23*	(-)	(-)	positive	1	PML	PML	

Patient 1-15: CSF samples and CD4 count were obtained at autopsy.

Patient 16*-23*: CSF samples and CD4 count were obtained at the onset of the diseases.

Patient 3*: PCNSL and P-lymphoma were diagnosed at the same time.

^aTE: toxoplasmic encephalitis. ^bPCNSL: primary CNS lymphoma. ^cPML: progressive multifocal leukoencephalopathy.

^dP-lymphoma: peripheral lymphoma not affecting CNS. ^eAIDS dementia: AIDS dementia complex.

^fCMV encephalitis: cytomegalovirus encephalitis

indicate that the specificity of the EBV-PCR was 78%. However, assuming that EBV-nested PCR of CSF was the indicator of both CNS and peripheral lymphomas, the specificity was 100%. On the other hand, Patients 8 and 9 had lymphoma of the heart and stomach, respectively, but EBV-nested PCR of CSF yielded negative results. In total, EBV-nested PCR of CSF was positive in 9 out of 11 autopsy-confirmed organ lymphomas. In Patient 21, anti-toxoplasma IgG antibody was detected and brain imagings of the focal lesion were compatible with TE. Then, the treatment for TE was started. However, the clinical features and brain focal lesion deteriorated; PCR of CSF detected DNA of EBV but not *T. gondii*. According to this result, the treatment for TE was stopped and whole brain radiation therapy (total, 30Gy) and chemotherapy (m-BACOD) were started. In good response to these therapies, the focal brain lesion disappeared, temporarily. However, Patient 21 died of recurrence of PCNSL and other opportunistic infections after 11 months. In Patient 19, four consecutive samples were collected at 209 (-209) and 113 (-113) days before the diagnosis of PCNSL by CT and at 2 (+2) and 231 (+231) days after the diagnosis. EBV-nested PCRs were negative at -209 and positive at -113, +2 and +231. CT scan of the brain at 105 days before the diagnosis showed no focal lesions. Lymphoma cells in CSF were detected only at +231 days.

3. JCV-nested PCR

In two patients with autopsy confirmed PML, we detected JCV-DNA in CSF by JCV-nested PCR. There were no false positive results, giving a specificity of 100%. In Patient 23, four consecutive samples were collected at 472 (-472) and 7 (-7) days before the diagnosis of PML by MRI and 49 (+49) and 176 (+176) days after the diagnosis. JCV-nested PCR was negative at -472 but positive at -7, +49 and +176. Brain MRI at 126 days before the diagnosis showed no focal lesions.

考 察

Focal CNS complications are life-threatening diseases in patients with AIDS. TE, PCNSL and PML are major diseases of focal CNS complications. In the present study, the diagnosis of TE, PCNSL and PML in the CNS was usually made clinically, based on clinical signs and symptoms, serological tests,

radiology and response to therapy. However, clinical signs and symptoms cannot accurately differentiate between these three diseases. Serological studies are very important especially for the diagnosis of TE¹⁶⁾, however, the antibody cannot be detected in 16% of patients with TE¹⁷⁾. Radiologic studies, although indispensable for the diagnosis, are often misleading. TE and PCNSL can hardly be distinguished by radiology alone^{5,18)}. Furthermore, Gray *et al*¹⁹⁾ reported four patients who had diffuse TE without abnormal changes in CT. PML usually shows typical imaging patterns on MRI. However, demyelinating lesions of AIDS dementia complex, cytomegalovirus encephalitis, and TE can also show MRI patterns similar to those of PML²⁰⁾. In Patient 16 who had a definitive pathological diagnosis of TE, images of MRI were instead suggestive of PML. While the response to specific therapy is sometimes a clinically useful diagnostic tool, it usually requires at least one or two weeks before the desirable response becomes evident²¹⁾. Based on these difficulties in the diagnosis of focal CNS lesions, a positive result using PCR would be considered an additional useful tool for the establishment of clinical diagnosis.

Opportunistic infections occur in advanced AIDS patients with very low CD4 counts, either in isolation or sometimes caused by more than one organism. Martinez *et al*⁴⁾ reported that more than one of these three diseases could occur simultaneously in the brain of patients with AIDS. Clinical diagnosis is sometimes very difficult in these complex situations. In our study, Patient 2 was such a case with TE and PCNSL. The nested PCR showed both DNAs in the CSF although only PCNSL was suspected clinically.

Focal brain lesions identified in the present study are always fatal when a specific therapy is not provided. Fortunately, specific treatment is available, specially for TE and PCNSL. Brain biopsy may sometimes be required because this procedure is the only method that offers a definitive diagnosis while the patient is alive. Several studies have examined the utility and morbidity of brain biopsy²²⁻²⁴⁾ although the procedure itself is very invasive.

PCR is a valuable tool for the detection of specific DNA fragments. However, we must consider whether or not the detection of such organisms reflects infection of the tissue and a clinically important disease entity. Among the three organisms investigated in our study, the presence of antibodies

for JCV and EBV in Japanese patients is very high, suggesting that these two are ubiquitous antibodies. However, we were unable to detect JC viral DNA in CSF in all 23 patients examined, except for two autopsy-defined PML patients. Therefore, the presence of the JCV DNA in CSF might not be ubiquitous and might be of clinical significance, although the number of positive cases was small in the present study. In the case of EBV, we could not detect EBV DNA in CSF of patients who did not have lymphoma. However, the exact reason for the presence of the DNA in CSF in our patients with peripheral lymphoma without CNS lesion remains unknown. AIDS lymphomas have been regarded as EBV-driven lymphoproliferations arising in the context of highly disrupted cytotoxic control directed against EBV²⁵). Many reports showed that the prevalence of EBV DNA in PCNSL tissue was almost 100% and in peripheral lymphoma tissue, 40% (9,26). Furthermore, even in peripheral lymphoma tissue, a high prevalence (79% to 100%) of EBV DNA was reported in Japan^{27,28}). If patients with peripheral lymphoma harbored EBV viremia and EBV would invade into CNS, our result would be explained.

In total, the specificity of our PCR system for these three organisms was 100% in our study, if the presence of EBV DNA in CSF was considered as an indicator of peripheral lymphoma as well as CNS lymphoma. Thus, the positive result of each DNA in CSF by PCR might have some clinical significance. Further studies are necessary to confirm the diagnostic value of PCR for detection of CNS infection in AIDS patients.

Peripheral blood leukocytes can be considered as the clinical material for the detection of these three organisms. However, detection of *T. gondii*, EBV and JCV in the blood is still difficult to interpret^{29,30}). In contrast to the high specificity of PCR in this study, we could not provide reliable data on the sensitivity of our PCR system because the number of positive cases was relatively small (five, five, and two for TE, PCNSL, and PML, respectively). It is noteworthy that negative results using our system could not exclude each diagnosis based on our results. Further studies are necessary to confirm the results of the present study.

Acknowledgment

Authors thank Dr. F.G. Issa (Word-Medex, Sydney, Australia) for the careful reading and editing of the

manuscript. This study was supported in part by the Ministry of Health and Welfare and the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

参考文献

- 1) Moskowitz LB, Hensley GT, Chan JC, Gregorios J, Conley FK. The neuropathology of acquired immune deficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 108: 867-872, 1984.
- 2) Rosenblum ML, Levy RM, Bredesen DE. Neurosurgical implications of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Neurosurg* 34: 419-445, 1988.
- 3) Davis J, Everall IP, Weich S, McLaughlin J, Scaravilli F, Lantos PL. HIV-associated brain pathology in the United Kingdom: an epidemiological study. *AIDS* 11: 1145-1150, 1997.
- 4) Martinez AJ, Sell M, Mitrovics T, et al. The neuropathology and epidemiology of AIDS. A Berlin experience. A review of 200 cases. *Pathol Res Pract* 191: 427-443, 1995.
- 5) Ciricillo SF, Rosenblum ML. Use of CT and MR imaging to distinguish intracranial lesions and to define the need for biopsy in AIDS patients. *J Neurosurg* 73:720-724, 1990 (see comments).
- 6) Cohn JA, McMeeking A, Cohen W, Jacobs J, Holzman RS. Evaluation of the policy of empiric treatment of suspected *Toxoplasma* encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 86:1989, 521-7.
- 7) Kitada K, Oka S, Kimura S, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* sequences by polymerase chain reaction: Animal models and clinical application to noninvasive specimens. *J Clin Microbiol* 29: 1985-1990, 1991.
- 8) Kikuchi Y, Oka S, Kimura S, Mitamura K, Shimada K. Clinical application of the polymerase chain reaction for a rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Intern Med* 31: 1016-1022, 1992.
- 9) Hamilton-Duitot SJ, Pallesen G, Franzmann MB, et al. AIDS-related lymphoma. Histopathology, immunophenotype, and association with Epstein-Barr virus as demonstrated by in situ nucleic acid hybridization. *Am J Pathol* 138:149-163, 1991
- 10) MacMahon EME, Glass JD, Hayward SD, et al. Epstein-Barr virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma. *Lancet* 338: 969-973, 1991.

- 11) Schoondermark-van de Ven E, Galama J, Kraaijeveld C, van Druten J, Meuwissen J, Melchers W. Value of the polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 16: 661-666, 1993.
- 12) Cinque P, Brytting M, Vago L, et al. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet* 342: 398-401, 1993.
- 13) Saeki K, Mishima K, Horiuchi K, et al. Detection of low copy numbers of Epstein-Barr virus by in situ hybridization using nonradioisotopic probes prepared by the polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 2: 108-115, 1993.
- 14) Weber T, Turner RW, Frye S, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy diagnosed by amplification of JC virus-specific DNA from cerebrospinal fluid. *AIDS* 8: 49-57, 1994.
- 15) Howley PM, Rentier-Delrue F, Heilman CA, et al. Cloned human polyomavirus JC DNA can transform human amnion cells. *J Virol* 36: 878-882, 1980.
- 16) Council of State and Territorial Epidemiologist; AIDS Program, Center for Infectious Diseases. Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 36 Suppl 1: 1S-15S, 1987.
- 17) Porter SB, Sande MA. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 327: 1643-1648, 1992 (see comments).
- 18) Ciricillo SF, Rosenblum ML. Imaging of solitary lesions in AIDS. *J Neurosurg* 74: 1029, 1991 (letter; comment).
- 19) Gray F, Gherardi R, Wingate E, et al. Diffuse "encephalitic" cerebral toxoplasmosis in AIDS. Report of four cases. *J Neurol* 236: 273-277, 1989.
- 20) Olsen WL, Longo FM, Mills CM, Norman D. White matter disease in AIDS: findings at MR imaging. *Radiology* 169: 445-448, 1988.
- 21) Luft BJ, Hafner R, Korzun AH, et al, and Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 329: 995-1000, 1993.
- 22) Zimmer C, Marzheuser S, Patt S, et al. Stereotactic brain biopsy in AIDS. *J Neurol* 239: 394-400, 1992.
- 23) Chappell ET, Guthrie BL, Orenstein J. The role of stereotactic biopsy in the management of HIV-related focal brain lesion. *Neurosurgery* 30: 825-829, 1992 (see comments).
- 24) Feiden W, Bise K, Steude U, Pfister HW, Moller AA. The stereotactic biopsy diagnosis of focal intracerebral lesions in AIDS patients. *Acta Neurol Scand* 87: 228-233, 1993.
- 25) Birx DL, Redfield RR, Tosato G. Defective regulation of Epstein-Barr virus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related disorders. *N Engl J Med* 314: 874-879, 1986.
- 26) Kovach NL. Non-Hodgkin's Lymphoma. in: *The HIV Manual. A Guide to Diagnosis and Treatment*, Spach DH, Hooton TM, Eds. Oxford University Press, New York, 1996.
- 27) Katano H, Morishita Y, Cui LX, Watanabe T, Hirai K, Mori S. Expression of latent membrane protein 1 (LMP1) in clinically isolated cases and animal models of AIDS-associated non-Hodgkin's lymphomas. *Pathol Int* 46: 568-574, 1996.
- 28) Hishima T, Fukayama M, Hayashi S, et al. AIDS-related Lymphomas. *Pathology and Clinical Medicine* 16: 826-831, 1998 (in Japanese).
- 29) Pelloux H, Dupouy-Camet F, Derouin F, Aboulker JP, Raffi F and the Bio-Toxo Study Group. A multicentre prospective study for the polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood samples from 186 AIDS patients with suspected toxoplasmic encephalitis. *AIDS* 11: 1888-1890, 1997 (letter).
- 30) Dubois V, Lafon ME, Ragnaud JM, et al. Detection of JC virus in the peripheral blood leukocytes of HIV-infected patients. *AIDS* 10: 353-358, 1996.



臨床経過を見る上でのMT2-assayの有用性

井田 節子、酒井 敦子、岡 慎一

国立国際医療センター エイズ治療研究・開発センター

研究要旨

SIウイルスの検出が、HIV治療開始時期のマーカーとなりうるかどうかについての臨床研究を1995年から行ってきた。177名から得た487検体について検査した結果20名が陽性であり、陽性者には直ちに治療を開始して経過を観察した。そのうち長期にわたり追跡可能であった無治療でSIウイルス陽性の患者3名はいずれも4年間の追跡調査中に急激な病状の進行は認められなかった。SIウイルス検出率はCD4数と逆相関、ウイルス量とは相関していた。直ちに治療を開始したSIウイルス陽性患者群とSIウイルス陰性患者群とでCD4,CD8の減少傾向に差はみられなかった。しかし耐性変異が高率に検出された。SIウイルス保有者においては特に耐性SIウイルスの出現に注意が必要である。SIウイルスの有無は臨床経過を見る上で重要な情報であることが示唆された。

分担研究者：岡 慎一

研究協力者：井田節子、酒井敦子

Usefulness of MT2-assay as a marker of progressive AIDS

Setsuko Ida, Atsuko Sakai, Shinichi Oka

AIDS Clinical Center International Medical Center of Japan.

目 的

近年治療開始時期の判断材料としてウイルス量の重要性が強調されているが、ウイルスがSIウイルスであるかNSIウイルスであるかという生物学的性状も病状進行に関わる因子である^{1,2)}。本研究は、1995年5月からスタートしたもので、CD4数300/mm³以上の未治療の患者についてSIウイルスのみが感染するMT2 cellを用いてウイルス培養を行いSIウイルスの出現の有無を追跡した。SIウイルスが出現した場合は早急に積極的な治療を開始し、経過観察を行いSIウイルスの出現を治療開始の判断材料とする事の有用性について検討したものである。また近年耐性ウイルスの出現が大きな問題となっている事から、SIウイルス陽性患者における耐性ウイルス出現についても併せて検討した。

方 法

1. 対象患者

CD4リンパ球数が300/mm³以上で無治療の患者3名を対象とし1995年から経過を追跡している。本研究の対象となる事の同意は口頭で患者から得ている。

2. MT-2 cell assay

- 1) EDTA採血された患者の血液からリンパ球を分離し 1×10^6 /mlに調製。
- 2) 患者リンパ球とMT-2 cell 5×10^5 /0.5mlを混合しRPMI培地で培養。
- 3) 週に2回培地交換を行い4週間培養。
- 4) 顕微鏡下にsyncytiaの観察を行うとともに、培養上清中のP24抗原を測定し陽性のものをSIウイルス陽性とした。
- 5) p24 assayで判定保留検体についてはシーケンス解析を行い判定をした。

3. V3領域のシーケンス解析

患者血漿100 μ lからRNAを抽出し、RT-nested PCR法でV3領域を増幅してPCR産物のクローニングを行い、塩基配列を調べた。genotypeからphenotypeを推定した。

4. 薬剤耐性

患者血漿100 μ lからRNAを抽出し、RT-nested PCR法でpol領域を増幅後、PCR産物について塩基配列を調べシーケンスから感受性の有無を推定した。

5. ウイルス量

アンプリコア法によった。

結 果

現在までに177名の487検体について検査を行い、20名からSIウイルスが検出された。そのうちCD4数が300/ μ l以上で長期間追跡出来た無治療の者は3名であった。この3名は当時としてはSIウイルスが検出されなければ治療対象外の症例である。今回はこれら3名の経過と合わせて、現在までに行った検査全体について総括する。

症例1(図1)は、治療が行えなかったSIウイルス保有者である。1992年に受診した時のCD4数は600/ μ lであった。1994年4月にはPBMC培養でSIウイルスが分離されCD4数は350/ μ lに減少した。1995年5月のMT-2 assayでもSIウイルスが検出され、CD4数は100/ μ l以下に減少し急激に病状は進行していた。

症例2(図2)は1995年12月にMT-2 assayでSIウイルスが検出され、この時点のウイルス量は 10^3 /ml、CD4数は400/ μ l以上であった。ただちにAZT、ddIの投与を開始し、97年2月からはSQVを加えた3剤投与とした。その後のMT-2 assayではSIウイルスは検出されなかった。1998年に3TC、d4T、NFVに変更しウイルス量は検出限界の400copies/ml以下となった。ウイルス量の急激な上昇、CD4数の急激な減少は見られなかった。

plasma中のHIV RNAのV3領域についてシーケンス解析を行った(図3)。1995、1996、1997、1998年の全ての血漿から継続してSI genotypeが検出された。SI genotypeの出現頻度はMT-2 assay陰性の時にもNSI genotypeより優勢であった。またV3領域の塩基配列は時間の経過とともに次々と変異をしていた。97年9月の血漿を用いた耐性検査ではddI、SQVに対しては感受性であったがAZT耐性部位のうちコドン215の位置に耐性変異のある

genotype が優勢であり、1998 年 5 月には 215 位に加えて 41 位にも耐性変異が加算されていた。SI genotype と耐性 genotype がどちらも優勢であることから、どちらの時点でもこの患者は AZT 耐性の SI ウイルスが優勢であるといえる。98 年 8 月に治

療を d4T、3TC、NFV に変更し良好な結果を得ている。しかし 1998 年 8 月の耐性検査では primary mutation ではないが NFV 耐性に関与しているコドン 77 位に変異が見られた。

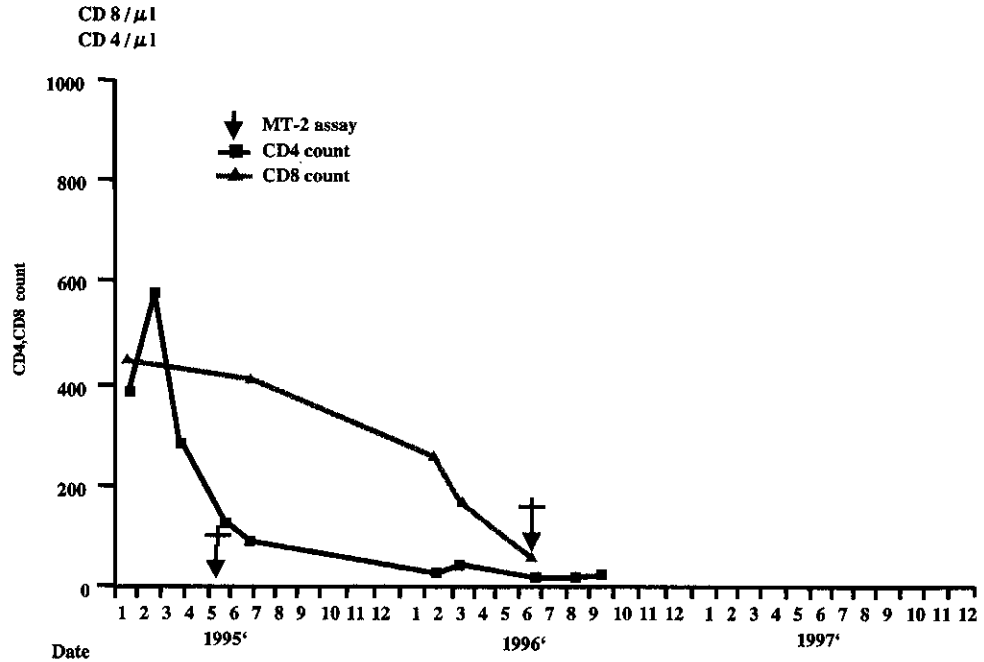


図1 症例1

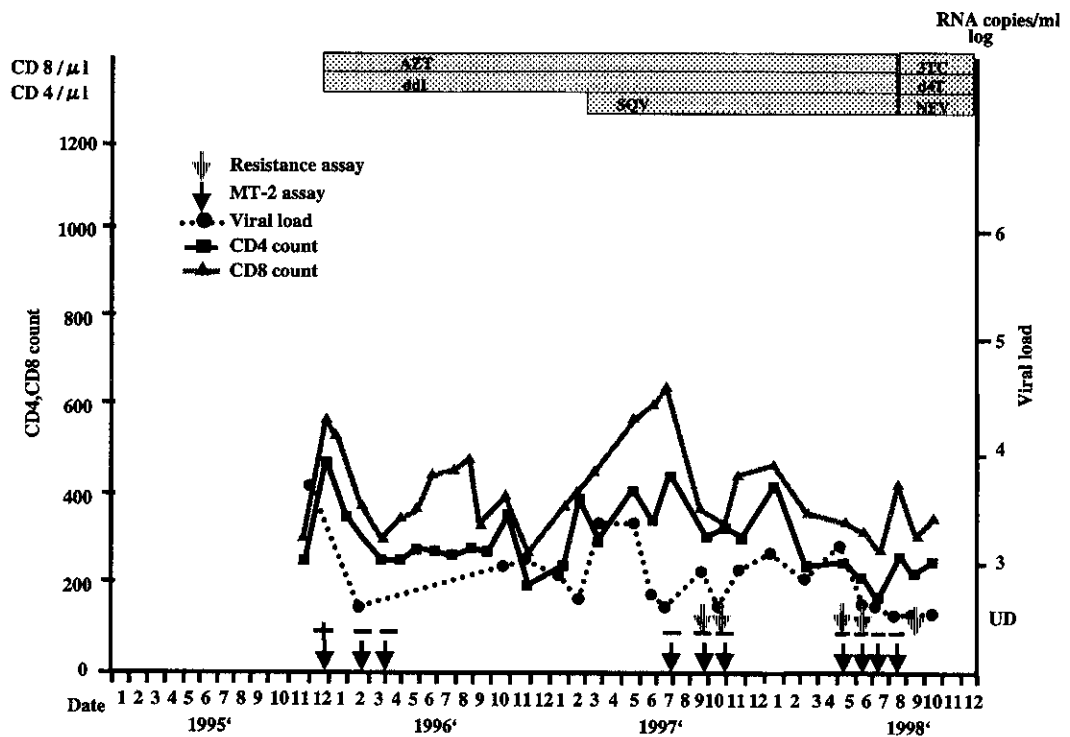


図2 症例2