

## 2. ベーチェット病患者の $\gamma\delta$ T細胞の解析と口腔内細菌の解析

分担研究者 内山 竹彦 (東京女子医大・微生物学免疫学)

共同研究者 田中 義正, 加藤 秀人 (東京女子医大・微生物学免疫学),  
宮永 嘉隆, 氏原 弘 (同大学・第二病院・眼科), 稲葉 午朗 (仁厚会病院・  
内科), 阿部 廣幸, 安藤 智博 (東京女子医大・第二病院・歯科口腔外科),  
三浦 直, 奥田 克爾 (東京歯大・微生物学)

### 【はじめに】

ベーチェット病は東洋、ことにわが国に多く発症が見られ、HLA-B51 と正の相関が言われている疾患である。ベーチェット病患者では、末梢血 $\gamma\delta$ 型T細胞の増加がみられる<sup>1)</sup>。その増加の機序はまだ不明なことが多いが、いくつかの感染症やある種の癌の患者におけるその増加を考えると、 $\gamma\delta$ 型T細胞の増加の原因の解析はベーチェット病の発症あるいは病態を説明するための手がかりを与える可能性がある。また、ベーチェット病患者は虫歯が多く、抜糸で病状が悪化することが知られている。そのために、ある種の口腔内細菌がベーチェット病の病原因子として、あるいは増悪因子として作用するという考えがある。過去には、患者口腔内好気性菌、例えば *Streptococcus sanguis* がベーチェット病の病原因子として解析されたが<sup>1)</sup>、まだ解決は見られていない。それ故に、本研究課題では、ベーチェット病患者末梢血 $\gamma\delta$ 型T細胞の解析、患者口腔内好気性、嫌気性細菌について、健常者と比較しながら解析した。さらに、スーパー抗原はいくつかの細菌感染症の病原因子として知られているので、分離された口腔細菌についてスーパー抗原の産生について解析した。

### 【材料と方法】

ベーチェット病患者の末梢血 $\gamma\delta$ 型T細胞の変動の解析：患者末梢血T細胞を各種抗体で染色し、フローサイトメーターを用いて解析した。ベーチェット病患者の口腔内細菌の検索：歯垢(plaque) から菌を採取した。スーパー抗原の産生：細菌培養露液のヒト末梢血T細胞の増殖促進を指標として解析した。

### 【結果】

ベーチェット病患者末梢血 $\gamma\delta$ T細胞の変動：健常人ではその10%に末梢血 $\gamma\delta$ 細胞の高値(全T細胞中10%以上)が見られたが、ベーチェット病患者ではその25%に高値が見られた(図1)。発症経過の長さとも $\gamma\delta$ T細胞の割合の高さには弱い相関が見られ、発症直後に $\gamma\delta$ T細胞の高値を示す患者は見られなかった(図2)。

ベーチェット病患者口腔内細菌の検索：8名のベーチェット病患者の口腔歯垢細菌の検索ではレンサ球菌群, *Actinocycyes*, *Eubacterium*, *Prevotella* から多種の細菌が検出されたが、この分布は健常者歯垢細菌分布と大きな差異はみられなかった。8名の患者中4名の解析結果を表1に示した。また分離嫌気性菌の中でスーパー抗原産生菌は見られなかった。

### 【考察】

サルモネラ感染症や原虫感染症の患者<sup>2)</sup>、結核患者や結核病棟勤務医療従事者<sup>3)</sup>、あるいはある種の癌を担う患者、サルコイドーシス患者等では $\gamma\delta$ T細胞の上昇が見られている。担癌患者では、腫瘍の摘出後に $\gamma\delta$ T細胞が正常値(10%以下)に減少することをわれわれは観察している(論文作成中)。これらの所見から、ベーチェット病患者では $\gamma\delta$ T細胞が上昇する病態が誘導されていると思われる。しかし、ベーチェット病患者の75%に $\gamma\delta$ T細胞の増加は見られず、発症初期の $\gamma\delta$ T細胞の増加を示す症例は見られないことから、このT細胞群がベーチェット病の発症機序に大きく関与するとは考えにくいようである。

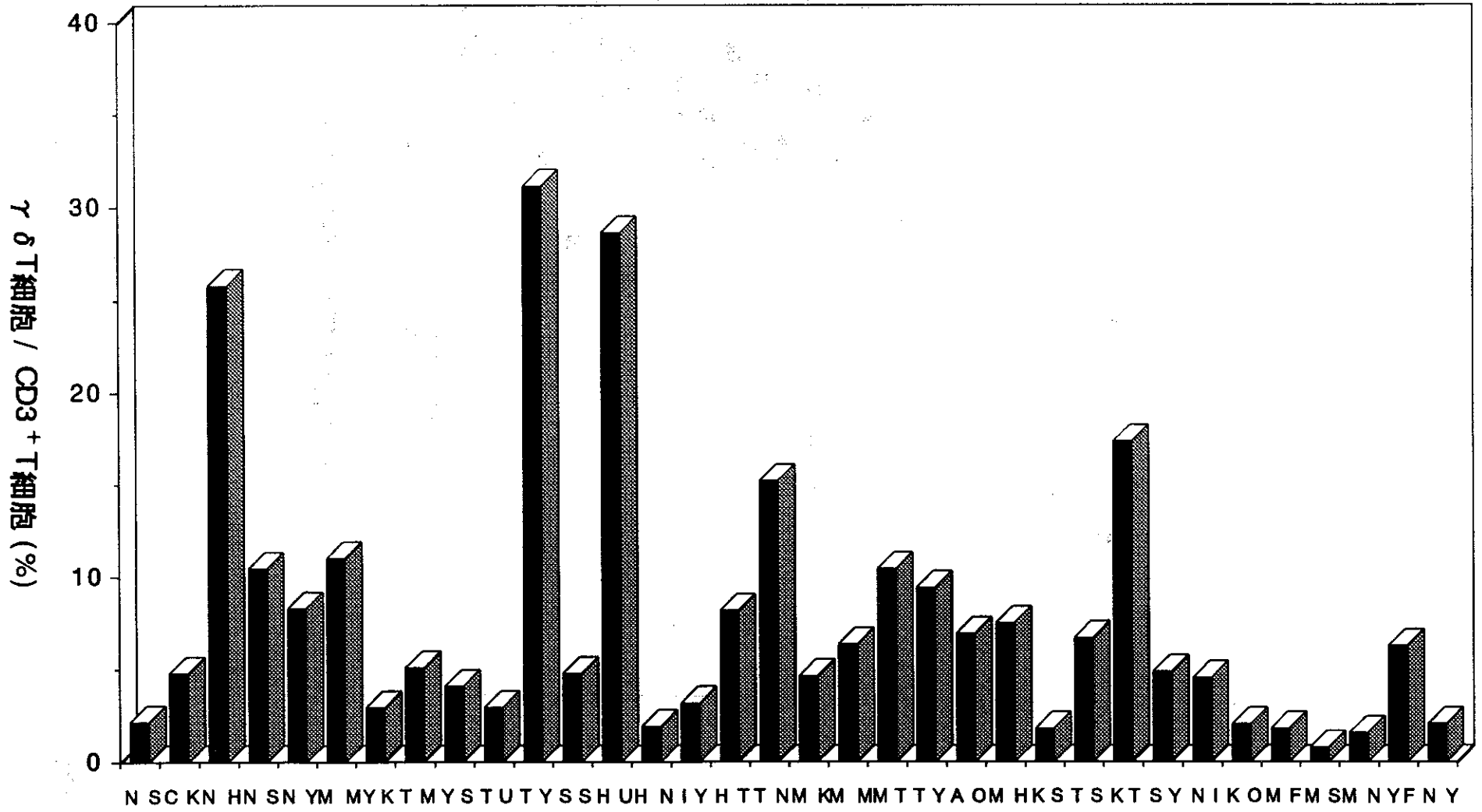
$\alpha\beta$ 型T細胞の役割についてはどうであろう

か。ベーチェット病患者末梢血の $\alpha\beta$ 型T細胞はヒト熱ショック蛋白60 (heat shock protein60, HSP 60) のある特定の部分のペプチドによって強く活性化される<sup>4,5,6)</sup>。抗酸菌 HSP65 中に存在するペプチドはこのヒト HSP60 ペプチドのアミノ酸配列と類似性があり、同様にベーチェット病患者末梢血 T細胞を活性化する<sup>4,5,6)</sup>。また、最近の知見で、ベーチェット病の発症機序には HLA 遺伝子関連の MICA 遺伝子、あるいは HLAB51 遺伝子近辺の異常とリンクしているという報告がなされた<sup>7)</sup>。これらの知見を総合して考えると、ベーチェット病の発症機序には下記の機序が関与しているかもしれない。ある種の細菌に長期間感染を受けることにより、感染個体の T細胞はその細菌由来の HSP ペプチドにより活性化される。しかし、それだけでは個体はベーチェット病が発症することはない。ベーチェット病を発症する個体では、上記の想定される遺伝子の制御のもとで、細菌由来 HSP ペプチドによって活性化された T細胞が自己 HSP ペプチド (細菌由来 HSP ペプチドと免疫学的な類似性をもつ) と強い反応性、すなわち自己抗原応答性を獲得して、ベーチェット病の発症が顕在化する。

#### [参考文献]

1. 宮永嘉隆ほか. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班平成3年度研究業績.101.
2. Y. Tanaka et al. J. Mol. Med. 74: 223,1996.
3. 露口泉夫. 結核の免疫. 1998.
4. K. Pervin et al. J. Immunol. 151: 2273, 1993.
5. W.V. Eden et al. Immunological Rev. 164: 169, 1998.
6. 坂根剛, 三浦浩平. 日本臨床. 54: 870, 1996.
7. N. Mizuki, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 1298, 1997.

図 1



ベーチェット病患者の末梢血γδT細胞

图 2

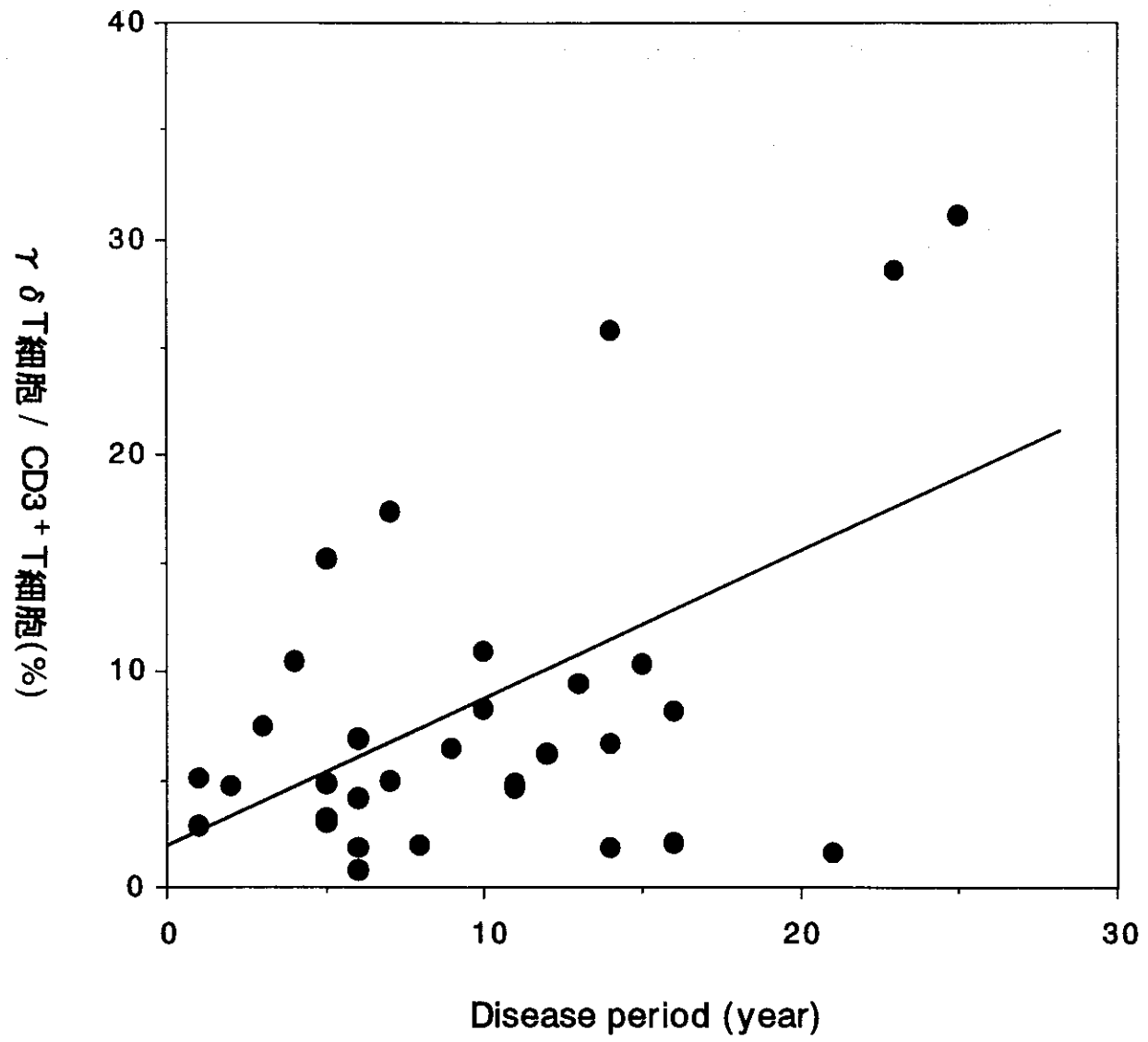


表 1

Bacterial floras in dental plaques in patients with Behcet Disease

	Perunit of bacterial floras			
	A	B	C	D
<i>S.mitis</i> group			26.1	17.5
<i>S.mutans</i> group	1.9		4.63	10.0
<i>S.salivarius</i> group			4.3	
$\beta$ -hemolytic Gram(+) cocci	1.9			
<i>Actinomyces israelii</i>	44			
<i>Actinomyces naeslundii</i>		23.0	13.0	5.0
<i>Eubacterium</i> species		15.4		
<i>Prevotella intermedia</i>	1.0			7.5
<i>Prevotella melaninogenica</i>	22.2		8.7	
<i>Prevotella denticola</i>		3.8		
unidentified <i>Prevotella</i> species		11.5		12.5
<i>Capnocytophaga</i> species	11.1		4.4	5.0
<i>Leptotridia buccalis</i>		7.7		
<i>Fusobacterium nucleatum</i>		7.7	4.3	
<i>Eikenella corrodens</i>				10.0
unidentified Gram (+) cocci	1.9		8.7	
unidentified Gram (+) rods	444			
unidentified Gram (-) rod				
unidentified bacteria	11.0	31.0	22.0	32.5

### 3. サルコイドーシス病変部リンパ節におけるマイコバクテリアおよびプロピオニバクテリア菌体 DNA の QPCR 法による定量解析

分担研究者 江石義信 (東京医科歯科大学医学部病理)

研究協力者 石下郁夫、白井 裕 (東京医科歯科大学医学部病理)  
武村民子 (日赤医療センター病理部)

#### 【はじめに】

サルコイドーシス (サ症) は原因不明の全身性肉芽腫性疾患であり、その臨床的、組織学および免疫学的類似性から結核菌をその原因とする説が欧米を中心に唱えられてきたが 1)、病変部から結核菌が培養された報告はほとんど存在しない 2)。また、最近では PCR 法等の分子生物学的手法を用いて結核菌をはじめとする抗酸菌の検出が試みられているが 3)4)5)6)、それらの結果は必ずしも結核菌説を支持するものばかりではない。また、これらの報告は、検出感度を重点とした定性的検出であり、病変部に存在する菌量についての報告は未だなされていない。

一方、約 15 年前、日本の文部省難病研究班の阿部ら 7)によってサ症病変部から嫌気性菌である *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) が唯一高率 (40 例中 31 例) かつ多量に培養されることが報告されたが、本菌が健常人の皮膚常在菌であることや、対照群でも検出される (180 例中 38 例) ことなどから、本菌をサ症の原因菌とする結論には至っていない。

本研究ではサ症肉芽腫起因菌として可能性が提唱されている結核菌と *P. acnes* に関して quantitative PCR (QPCR) 法を用いた定量解析を行い、サ症リンパ節・結核症リンパ節・対照群リンパ節 (非転移胃癌所属リンパ節) における定量結果を比較検討した。

#### 【対象と方法】

病理組織学的に診断されたサ症リンパ節 15 例、結核症リンパ節 15 例および対照群として非転移胃癌所属リンパ節 15 例の中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用した。これらの組織切片から抽出した一定量 (1  $\mu$ g) の組織 DNA について結核菌および *propionibacteria* (*P. acnes*, *P. granulosum*) に特異的なピオチン標識プラ

イマーを用いた PCR 増幅を実施し、電気泳動にて増幅バンドの有無について確認した。この時、抽出 DNA の質的問題による偽陰性反応を除外するために、 $\beta$ -globin に対する PCR 反応を並行して行い、その陽性バンドが確認できない症例に関してはこれを検索対象から除外した。PCR 増幅後に、各菌に特異的な TBR 標識プローブを用いて液相ハイブリダイゼーションを行った後、QPCR システム (PE Applied biosystems 社製) によって、その DNA 量を TBR の蛍光強度として測定した。また、本システムにおける各菌の検出に関する菌種特異性に関しては、種々の細菌標準株を用いて検討を行った。また、サンプル中の最終的な菌体 DNA 含有濃度に関しては、菌体抽出 DNA の希釈系列を作製して同様な定量解析を行い、その定量性を確認すると共に、含有菌体数についても概算値を算出した。

#### 【結果】

##### 定量システムの特異性

結核菌および *P. granulosum* に関しては他の菌種において PCR 後に増幅バンドは認められず、QPCR 解析においても特異性が確認できた。*P. acnes* に関しては同じ *cutaneous propionibacteria* である *P. avidum* において増幅バンドを認め、QPCR 解析においても高値を示した。そこで、双方の塩基配列において、*P. avidum* にのみ認識部位のある制限酵素を用いて PCR 産物の切断の有無を確認したところ、遺伝子的に相同性の高いこれら 2 菌種の鑑別が可能であることが判明した。

##### 組織材料の解析

結核菌 DNA に関しては、PCR 後のバンド検出率が結核群で 15 例中 15 例で、サ症群での 15 例中 3 例および対照群での 15 例中 1 例に比べ高率であり、その定量解析では結核群で中央値中

中央値 924 (25%値と 75%値はそれぞれ 657, 1380) を示し、サ症群の中央値 59 (42, 45) および対照群の中央値 59 (45, 75) に比べ高値であった <e3814102(表 2)>。他方、P acnes DNA の PCR では、サ症リンパ節 15 例中 12 例で陽性バンドが検出され、これは結核リンパ節 15 例中 2 例および胃癌所属リンパ節の 15 例中 3 例に比べ高率であった。また、ここで検出された DNA は制限酵素解析の結果、すべて P acnes 由来であることが確認された。P acnes DNA の定量解析においては、サ症群では中央値 510 (415, 658) を示し、結核群の中央値 51 (39, 66) および対照群の中央値 57 (36, 74) に比べ高値であった。また、P granulosum DNA については、PCR 後にサ症群で 15 例中 9 例に陽性バンドが確認され、他群での陽性は皆無であった。さらに、P acnes 陰性であった 3 例はいずれも P granulosum 陽性で、定量解析の結果も他の 6 例の陽性例よりも高値であった。

以上の定量結果を菌 DNA の希釈系列を用いて作成した検量線に当てはめて、サンプル中に存在する菌ゲノム数の概算値 (8) を求めたところ、P acnes 陽性であったサ症群での P acnes のゲノム数は、抽出した組織 DNA 1 $\mu$ g あたり、平均で  $5 \times 10^5$  個と対照群で検出されるゲノム数の約 1,000 倍と高濃度であり、結核群における結核菌 DNA のゲノム数にほぼ匹敵した。

#### 【考案・結論】

これまでの種々の報告および今回我々が行った定性解析から類推しうる事実として、病原性細菌である結核菌においても、その DNA レベルを標的として PCR 検出を行った場合、結核性病変の有無に関係なく、ヒトの組織中にはごく微量の結核菌 DNA が検出されうる事が判明した。これは、BCG 接種の既往だけの問題と言うよりもヘルペスウイルス等の場合と同様、結核菌初感染後のリンパ組織内には炎症を引き起こすことなく微量の結核菌あるいはその DNA が存在しうる可能性を示唆している。しかしながら実際に結核菌が原因となって肉芽腫性炎症を引き起こしている結核性病変においては、これらのバックグラウンドとは重複が認められないほど多量の結核菌が病変部から検出されること

も判明した。この、結核性病変と結核菌量との関係は、サ症病変と P acnes 菌量との関係に酷似していることから、サ症発症に P acnes が関与している可能性は高いと推察される。

しかしながら、以上の推論には弱点が存在する。なぜなら、結核において結核菌は全症例において検出されたのに対して、サ症においては P acnes が検出されない症例が存在したからである。過去の文部省難病研究班の培養結果報告 (9) ではサ症 24 例中 12 例で P acnes が検出されるとともに、他の 2 例で P granulosum が検出されている。この報告結果に基づいて P granulosum に関しても同様な QPCR 解析を行ったところ、P acnes 陰性のサ症例においては代わりに P granulosum が大量に検出された。すなわち、サ症において P acnes あるいは P granulosum のいずれかが例外なく検出されるという結果となった。本研究では、過去の細菌培養法と異なりパラフィン包埋の組織切片を使用していること、および菌が高濃度に検出されるのがサ症群のみであったことから、生検時における皮膚からのコンタミネーションの可能性は低い。また、結核病変部からほとんど検出されずサ症病変部のみから多量に検出されたことから、肉芽腫形成に伴う二次的な菌増殖は考えにくい。現在のところ理由は不明であるがサ症においては多量の propionibacteria が異所性に存在あるいは増菌している可能性がある。

近年、胃潰瘍における Helicobacter pylori の関与が注目されつつあるが、サ症を引き起こす結核菌等の病原性細菌だけでなく propionibacteria など病原性の低い常在性細菌にも、もっと関心を払う必要がある。今後、常在性細菌である propionibacteria 由来の何らかの細菌抗原に対して、サ症患者に特異的な IV 型アレルギー素因が存在するとすれば I 型アレルギー疾患である花粉症等に代表されるように、環境中に常在する抗原物質に対するアレルギー疾患としてサ症の病因を理解することが可能になるかもしれない。従って、今後、サ症の病因を、常在性細菌 propionibacteria による内因性感染症あるいは Intrinsic allergic disease として今後解析していく必要がある。

【参考文献】

- 1) James DG. Etiology of sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1994; 11 (suppl 1): 43-51
- 2) Graham DY, Markesich DC, Kalter DC. Isolation of cell wall-defective acid-fast bacteria from skin lesions in patients with sarcoidosis. Grassi C, Rizzato G, Pozzi E, eds. *Sarcoidosis and other granulomatous disorders*. Amsterdam: Elsevier, 1988: 161-4
- 3) Saboor SA, Johnson NM, McFadden J. Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. *Lancet* 1992;339:1012-5
- 4) Popper HH, Winter E, Hoefler G. DNA of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculosis and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 738-41
- 5) Bocart D, Lecossier D, De Lassece A, Valeyre D, Battesti J-P, Hance AJ. A search for mycobacterial DNA in granulomatous tissues from patients with sarcoidosis using the polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 1142-8
- 6) Vokurka M, Lecossier D, du Bois RM, Wallaert B, Kambouchner M, Tazi A, Hance AJ. Absence of DNA from mycobacteria of the *M. tuberculosis* complex in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1000-3
- 7) Abe C, Iwai K, Mikami R, Hosoda Y. Frequent isolation of *Propionibacterium acnes* from sarcoid lymph nodes. *Zbl Bakt Hyg* 1984; 256: 541-7
- 8) Baess I. Determination and re-examination of genome sizes and base ratios on deoxyribonucleic acid from mycobacteria. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1984; 92: 209-11
- 9) Suzuki S. Basic search for the point of anaerobe infection. Reports of basic studies of intractable disease at the Ministry of Education; 1975 (in Japanese)



## 4. パーキンソン病患者脳内ボルナ病ウイルス

生田和良<sup>1,2</sup>、渡辺真紀子<sup>1</sup>、高橋宏和<sup>1</sup>、林宏恵<sup>1</sup>、森若文雄<sup>3</sup>、  
田代邦雄<sup>3</sup>、近藤智善<sup>4</sup>、水野美邦<sup>4</sup>、山崎俊三<sup>5</sup>、久野貞子<sup>5</sup>

### はじめに

ボルナ病ウイルス (BDV) はマイナス鎖、1 本鎖の RNA をそのゲノムとして持ち、神経細胞親和性を示すウイルスである。現在までにウマ、ウシ、ネコ、ダチョウをはじめとする多くの動物に自然感染していることが判っているが<sup>1, 2, 3)</sup>、その病原性はその主たる自然宿主であるウマにおいて最も良く観察されている。急性感染したウマは約 4 週間の潜伏期の後、脳膜脳脊髄炎を原因とする運動失調、抑うつ等の神経症状を呈し、その約 80% が死亡する。しかし一方で、BDV 陽性動物の大部分は不顕性に経過することも明らかにされている。

1985 年、ドイツで行われた BDV の疫学調査の結果、ヒトの BDV 感染と精神分裂病やうつ病等の精神疾患との高い関連性が報告された<sup>4)</sup>。以後、同様の研究結果が相次いだが<sup>5, 6, 7, 8, 9)</sup>、BDV に対する抗体価やウイルス RNA 量が検出限界境界程度の低いことが原因となり、依然、精神疾患と BDV 感染との明瞭な関連性はつかめていない。しかし、これまでの研究、ならびに我々の行った精神分裂病患者の一部より感染性 BDV の分離など、BDV がヒトに感染し、脳内においてその持続感染が存在することは明らかである。我々は、この脳内に持続感染し、動物に病原性を発揮しうる BDV のヒトへの影響、特に神経変性疾患への関与に関する研究を行っている。

本研究では特に、ヒトの運動性疾患の代表であるパーキンソン病と BDV との関連に着目し検討を行った。一般に、黒質から線条体にのびるドーパミンニューロンの一部は線条体内アセチルコリンニューロンとの間にシナプスを形成し、アセチルコリン系に対して抑制的に働いている。パーキンソン病においては、黒質線条体ニューロンに変性・脱落が生じてドーパミンによる抑制が解かれるため、相対的にアセチルコリン系が優位になるとされている。BDV 感染によるドーパミンレセプターやアセチルコリン系の異常は、BDV のモデル動物であるラットにおいても示唆されている<sup>9, 10)</sup>。今回、パーキンソン病患者由来剖検脳の黒質および前頭葉領域における BDV 感染の可能性を検討した。

### 対象と方法

順天堂大学・脳神経内科および国立宇多野病院より 9 名のパーキンソン病患者 (P1~P9; 61~81 歳) の剖検脳由来黒質および前頭葉領域 (P1~P4 のみ) を対象とし、BDV

- 1 北海道大学免疫科学研究所血清学部門
- 2 大阪大学微生物病研究所免疫生体防御研究部門
- 3 北海道大学医学部神経内科学講座
- 4 順天堂大学医学部脳神経内科学講座
- 5 国立宇多野病院臨床検査部

RNA の検出ならびに、その黒質領域のホモジネートを新生スナネズミに脳内接種し、パーキンソン病患者由来 BDV の伝播、増殖能を検討した。

BDV RNA の検出は、p24 および p40 領域の nested RT-PCR、その後のサザンブロット法により行った。また、患者黒質領域 (P1~P4 のみ) を接種した新生スナネズミの脳内の BDV RNA 検出には、p24 および p40 領域プローブを用いた in situ hybridization によって解析した。PCR 増幅遺伝子産物はクローニング後、その塩基配列の決定を行った。

### 結果

#### 1. パーキンソン病患者剖検脳由来黒質領域の BDV RNA 検出

パーキンソン病患者 9 名 (表 1) の黒質 (P1~P9) および前頭葉領域 (P1~P4 のみ) について、BDV 遺伝子検出を nested RT-PCR 法により行った。その結果、BDV p24 遺伝子領域では P2、P6、P7 および P8 の患者の黒質、P2 と P4 の前頭葉に、一方 BDV p40 遺伝子領域では P1、P4 および P6 の黒質、P2 および P4 の前頭葉にシグナルが検出された (表 2)。

患者	死亡年齢/性	発症年齢	罹病期間	家族性	アマンタジン服薬
P1	78/M	63	15	(-)	(+)
P2	75/M	65	10	(-)	(+)
P3	67/M	34	34	(-)	(-)
P4	81/F	<73	>8	(-)	不明
P5	77/F	65	13	uk	(+)
P6	66/F	49	17	uk	(+)
P7	74/M	57	18.6	uk	(+)
P8	61/M	47	13.5	uk	(+)
P9	66/F	42	23	uk	(+)

\*若年性パーキンソン症候群  
uk, unknown

表 1 BDV 検出を行ったパーキンソン病患者の内訳

#### 2. パーキンソン病患者剖検脳由来黒質領域を脳内接種した新生スナネズミの BDV RNA 検出

パーキンソン病患者剖検脳の黒質領域に認められた BDV の感染性を検討するため、患者黒質領域 (P1~P4 のみ) のホモジネートを新生スナネズミに脳内接種した。対象としては PBS 接種を行った。接種後 19 日目にスナネズミの解剖を行い、その大脳と小脳における BDV の存在を nested RT-PCR により検討した。その結果、P2 患者黒質接種スナネズミの小脳、および P4 患者の黒質接種スナネ



## 5. 神経変性疾患におけるボルナ病ウイルス感染の検索

田代真人<sup>1</sup>、西藤岳彦<sup>1</sup>、大原義朗<sup>2</sup>、齋藤 博<sup>3</sup>、佐光一也<sup>4</sup>

### <はじめに>

1985年にRottらのグループ(1)によって精神疾患患者の血清中に抗BDV抗体が検出されて以来、精神疾患と本ウイルス感染症の関連が示唆されているが、血清疫学的解析ではこれまでのところ確定的な情報は得られていない。一方で、1996年de la Torreらのグループによって(2)、剖検で海馬硬化症と診断された患者の剖検脳サンプルからBDVゲノムRNAが検出され、またその組織免疫染色によってもBDV抗原の発現が認められたことから、BDV感染の神経変性疾患への関与が疑われている。

近年RT-PCRによって末梢血単核球(PBMC)から本ウイルスRNAを検出する事が試みられているが(3)、実験室内コンタミネーションが本ウイルスの感染疫学的調査に重大な影響を与えている可能性が指摘されている(4)。我々は、昨年度の本研究班での研究において、RT-PCRにおける実験室内コンタミネーションを低減させるために、新たなプライマーセットの解析を行った。その結果、1)実験室継代ウイルス由来RNA、2) PCR操作に用いる陽性対照からのコンタミネーション、3) リコンビナントBDV蛋白発現ベクターからのコンタミネーション(3)の可能性を低減できることを示してきた。

また、BDVの血清疫学調査においても、使用するアッセイ方法の違いによって非特異反応のレベルが異なっている可能性が指摘されていた。Horimotoらは(4)、新たに大腸菌で発現させたBDV p40蛋白質を用いたReverse type Sandwich enzyme immunosorbent assay (RS-ELISA)を開発し、非特異反応の低減と感度を上昇させることに成功した。そこで本研究では、上記の二種のアッセイ系を用いてパーキンソン病患者におけるBDVウイルス感染症の疫

学調査を行い、パーキンソン病とBDV感染との関連の可能性について検討した。

### <材料と方法>

#### Nested RT-PCR

Reverse transcriptaseによるcDNA合成およびTaq polymeraseをもちいた第一段階PCRにはBDVp40-701, BDVp24-172Rを用い、第二段階PCRにはBDVp40-748, BDVp24-43Rを用いたNested RT-PCRを行った(3)。cDNAの合成は、MuLV Reverse Transcriptase (Perkin-Elmer社)を用いて行い、第一段階PCR及び第二段階PCRは、Sawady Technology社のSuper Taq Premix Kitを用いた。

#### Reverse type sandwich ELISA (RS-ELISA)

Horimotoらの方法(4)に準じて行い、被検血漿はブロックエース(大日本製薬)で10倍希釈したものをを用いた。

#### 検体

札幌中村記念病院、仙台国立療養所西多賀病院、金沢医科大学病院の外来及び入院患者の末梢血単核球(PBMC)由来全RNA中におけるBDVゲノムおよび血漿中の抗BDV p40抗体の解析を行った。内訳は、パーキンソン病患者48例、筋萎縮性側索硬化症の4例の計52例であった。プロフィールは、パーキンソン病患者については男性23名、女性25名で平均年齢63歳、平均罹病期間は7.8年であった。筋萎縮性側索硬化症の4例に関しては男性1例、女性3例で平均年齢57歳であった。各患者から採血したEDTA-処理血液は、各病院から冷蔵保存で国立感染症研究所に輸送され、国立感染症研究所において、リンフォセパール(IBL)を用いてPBMCと血漿に分離された。分離されたPBMCはRNA分離のため-80℃に保存後、ISOGEN(日本ジーン)を用いて全RNA画分を精製した。

### <結論>

材料と方法に記載された札幌、金沢、仙台的各病院から得られた52検体の末梢血由来RNAをもちいての

所属 1) 国立感染症研究所 2) 金沢医科大学  
3) 国立療養所西多賀病院 4) 札幌中村記念病院

Nested RT-PCRによる検索では、上述の検体いづれからもBDV RNA特異的なPCR産物の増幅は認められなかった。

一方、患者血清を用いたRS-ELISAの結果、52検体中1検体が、他の検体より明らかに高い吸光度を示した。すなわち、他の53検体の吸光度は0.04以下であり、さらに大部分の検体においてはバックグラウンドの吸光度が認められなかったのに対して、1検体のみが0.12という値を示した。この患者は61歳のパーキンソン病の患者で、男性、罹病期間は5年であった。しかし、カリフォルニア大学のDr. Lipkinから分与されたBDV実験感染ラットの血清を $3 \times 10^6$ 倍希釈した陽性対象では吸光度が、0.55を示していたことから、この患者血漿で認められた値が他の検体と比較して有意であると結論づけるのは困難であろう。

#### <考察>

近年、BDV感染の分子疫学的検索にNested RT-PCRの手法が多用されているが、一方でこのアッセイ系の感度が非常に高いことから、実験室内コンタミネーションがその解析結果に重大な影響を与えている可能性を危惧するむきもある(4)。また、ラット実験感染モデルにおいても、感染時期によっては末梢血中に現れるウイルス量が標的器官である脳でのウイルス量を反映しないなど、疫学調査の対象として末梢血中のウイルスRNAの検出が妥当であるかどうかと言った議論も存在する(6)。本研究では、パーキンソン病患者にお

けるBDV感染の可能性を検討するため血清疫学調査と、末梢血中のRNAの検索を行った。

今回の検索では、パーキンソン病の患者末梢血中にはBDVのRNAの存在は証明されなかった。このことは、検索対象とした末梢血RNA中のBDV RNA量が検出限界以下であった可能性も含めて、慎重に評価する必要があるだろう。また今後の方向性としては、そのような可能性を排除するためにBDVの標的器官である脳検体での検索が重要な意義を持つであろう。また、血清中の抗体検索において他の検体より高いELISAでの吸光度を示した例についても、健常者や他の疾患の患者などとのAge-match controlを取るなどが、今後の課題であろう。

#### <参考文献>

- 1) Rott et al. Science 228. 755-756 1985
- 2) de la Torre et al. Virology 223. 272-282 1996
- 3) 田代真人 平成9年度厚生省特定疾患神経変性疾患調査研究班報告書
- 4) Horimoto et al. J. Clin. Microbiol. 35 : 1661-1666 1997
- 5) Richt et al. J. Neurovirol. 3. 174-178 1997
- 6) Sauder C et al. J Virol Methods 71(2):229-245 1998

## 6. Crohn 病発症の引き金としての麻疹ウイルス

分担研究者 中込 治 (秋田大・微生物)

共同研究者 飯塚政弘 (秋田大・一内)

### 【はじめに】

Crohn 病(CD)は口腔から肛門までのすべての消化管を侵す難治性炎症性腸疾患であり、その病因候補として最近麻疹ウイルスの持続感染<sup>1-3)</sup>が注目されている。この“麻疹ウイルス説”は、主として免疫組織化学および疫学調査の二つの証拠により支持されている。このうち疫学的証拠は、周産期に麻疹に罹患した母親から生まれた子供<sup>2)</sup>や麻疹ワクチン接種群<sup>3)</sup>は有意に CD に罹患しやすいというものであるが、麻疹ワクチンと CD との関連については最近否定的な報告<sup>4)</sup>もみられる。一方、免疫組織化学的証拠とは、CD 腸組織内に麻疹抗原が特異的に存在することである。<sup>1)</sup>われわれも原著者と同一の抗麻疹モノクローナル抗体を用い麻疹抗原を確認した。しかし、われわれが RT-PCR 法により、CD 患者腸組織から麻疹ウイルスゲノムの検出を試みたところ、ウイルス遺伝子は全く証明されなかった<sup>5)</sup>。この免疫組織化学、RT-PCR の矛盾した結果を説明するためには、免疫組織化学法で CD 腸組織に認められた“麻疹抗原”の本体を明らかにすることが不可欠である。本研究では分子クローニング法によりこの“麻疹抗原”の hunting を試みた。そしてその塩基配列を決定するとともに遺伝子解析を行い、“麻疹抗原”が真に麻疹ウイルスに由来するものなのかそれとも他のタンパクが antigen mimicry などの機序を介して反応しているのかを明らかにし、さらにはこの物質が CD の病因にどのように関与しているのかを解明することを試みた。

### 【対象と方法】

典型的な CD 患者腸組織を材料に、λgt11 ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作製。ライブラリー中の 150 万個の遺伝子を抗麻疹モ

ノクローナル抗体(MAS 182r)でイムノスクリーニングし、得られた陽性クローン (CDX と命名)の塩基配列を決定後データベースを用いて遺伝子解析を行った。CDX でマウスを免疫し、抗 CDX モノクローナル抗体を作製した(4F12)。さらに抗 CDX モノクローナル抗体(4F12)と抗麻疹モノクローナル抗体(MAS182r)を用いて CD 腸組織を免疫組織化学法により二重染色し、これらの抗体が認識する細胞を観察した。

CDX 発現細胞(麻疹抗原陽性細胞)の疾患特異性をみるために、4F12 を用いて CD20 例、潰瘍性大腸炎(CU)20 例、その他の腸炎(non-IBD colitis)11 例、正常コントロール 9 例の大腸組織の免疫組織染色を行った。

### 【結果】

- 1) イムノスクリーニングにより抗麻疹モノクローナル抗体(MAS182r)と反応する 1 個の陽性クローンを得た。
- 2) この陽性クローンの塩基配列を決定し遺伝子解析を行った結果、陽性クローンは麻疹ウイルスとはホモロジーを認めず、データベースに登録されている未同定のヒトタンパク(AA449055)と高いホモロジーを有していた。
- 3) 陽性クローンが発現している未同定のタンパクを CDX と命名し、これに対するモノクローナル抗体を作製した(4F12)。
- 4) 免疫組織化学法による二重染色の結果、4F12 は MAS182r と同一の細胞を認識していた。さらに、4F12 は MAS182r と全く同様の染色パターンで麻疹ウイルス感染細胞を染色した。
- 5) 大腸組織中の CDX 抗体陽性細胞は、CD で最も多くかつ強く染色されたが、UC,non-IBD colitis でも増殖しており、正常コントロールにも少数ながら認められた。
- 6) CDX は食道、十二指腸、回腸、肺にも少数み

られた。さらに正常組織における CDX 陽性細胞の存否を調べるために、食道、胃、十二指腸、回腸、肝臓、肺、腎臓、脾臓、心臓の剖検組織標本を 4F12 を用いて、免疫組織化学的に検索した。

#### 【考 察】

CD の麻疹ウイルス病因説の根拠は CD 腸管組織内に特異的に見出される麻疹ウイルス抗原の存在である。しかし、本研究の結果は麻疹抗原の本体が麻疹ウイルスではなく、これと共通抗原性をもつヒトタンパク(CDX)であることを明らかにした。このことは、CD の腸組織から麻疹ウイルスゲノムが検出できないこと、また、抗麻疹抗体である MSA128r によっても、抗 CDX 抗体である 4F12 によっても、麻疹ウイルス感染時に出現する特異的巨細胞が見出されなかったこととよく合致する。CDX は CD 腸組織中に最も多く存在するが、CD 以外の炎症性腸疾患の腸組織でも増加し、またヒトの正常大腸および大腸以外の臓器にも少数存在することが確認され、CD に特異的に認められる物質ではなかった。

本研究により、CD 腸組織中に見出された麻疹抗原は、炎症にともなって増加するなんらかの宿主タンパクが麻疹ウイルスと共通抗原性を有するために、麻疹ウイルスと誤認されたものであることが明らかになった。従って、麻疹ウイルスは CD 発症に関与していないと結論される。

#### 【参考文献】

1. Wakefield AJ, Pittilo RM, Sim R, Cosby SL, Stephenson JR, Dhillon AP, Pounder RE. Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol* 1993; 39: 345-353.
2. Ekbohm A, Daszak P, Kraaz W, Wakefield AJ. Crohn's disease after in-utero measles virus exposure. *Lancet* 1996; 348: 515-517.
3. Thompson NP, Montgomery SM, Pounder RE, Wakefield AJ. Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease? *Lancet* 1995; 345: 1071-1074.
4. Feeney M, Clegg a, Winwood P, Snook J. A case-

control study of measles vaccination and inflammatory bowel disease. *Lancet* 1997; 350: 764-766.

5. Iizuka M, Nakagomi O, Chiba M, Ueda S, Masamune O. Absence of measles virus in Crohn's disease. *Lancet* 1995; 345: 199.
6. Iizuka M, Masamune O. Measles vaccination and inflammatory bowel disease. *Lancet* 1997; 350: 1774-1775.

10 20 30 40 50  
 TIEKALADAK ALVERLRDHD DAAESLIEQT TALNKRVEAM KQYQEEIQEL  
 60 70 80 90 100  
 NEVARHRPRS TLVMGIQQEN RQIRELQEN KELRTSLEEH QSALELIMSK  
 110  
 YREQMFRLLM ASKKDDP

		10	20	30	40	50	
Positive clone	1	GCACAATTGA	GAAGGCACTT	GCCGACGCTA	AAGCTCTTGT	TGAAAGATTA	50
AA449055	224	GCACAATTGA	GAAGGCACTT	GCGANCGCTA	AAGCTCTTGT	TGAAAGATTA	273
		60	70	80	90	100	
Positive clone	51	AGAGATCATG	ACGATGCAGC	AGAATCTCTG	ATTGAGCAAA	CCACAGCTCT	100
AA449055	274	AGAGATCATG	ACGATGCAGC	AGAATCTCTG	ATTGAGCAAA	CCACAGCTCT	323
		110	120	130	140	150	
Positive clone	101	CAACAAGCGA	GTAGAAGCCA	TGAAACAGTA	TCAGGAAGAA	ATTCAAGAAC	150
AA449055	324	CAACAAGCGA	GTAGAAGCCA	TGAAACAGTA	TCAGGAAGAA	ATTCAAGAAC	373
		160	170	180	190	200	
Positive clone	151	TTAATGAAGT	CGCGAGACAT	CGGCCACGGT	CCACGTTAGT	TATGGGAATC	200
AA449055	374	TTAATGAAGT	CGCGAGACAT	CGGCCACGGT	CCACGTTAGT	TATGGGAATC	423
		210	220	230	240	250	
Positive clone	201	CAGCAAGAAA	ACAGACAAAT	CAGAGAGTTG	CAACAAGAAA	ACAAAGAATT	250
AA449055	424	CAGCAAGAAA	ACAGACAAAT	CAGAGAGTTG	CAACAAGAAA	ACAAAGAATT	473
		260	270	280	290	300	
Positive clone	251	ACGTACATCT	CTGGAAGAAC	ATCAGTCGGC	CTTGGAACTT	ATAATGAGCA	300
AA449055	474	ACGTACATCT	CTGGAAGAAC	ATCAGTCGGC	CTTGGAACTT	ATAATGAGCA	523
		310	320	330	340	350	
Positive clone	301	AGTACCGAGA	ACAAATGTTT	AGATTGCTAA	TGGCTAGCAA	A=AAAGATGA	350
AA449055	524	AGTACCGAGA	ACAAATGTTT	AGATTGCTAA	TGGCTAGCAA	AΔAAAGATGA	573
		360	370	380	390	400	
Positive clone	351	TCCGGG...	.....	.....	.....	.....	400
AA449055	574	TCCGGGTATA	ATAATGAAGT	TAAAAGA...	.....	.....	400

図 Positive clone (CDX)のアミノ酸配列および塩基配列とこれと高い相同性を有するヒトタンパク(AA449055)の比較

## 7. クローン病の発症に関する微生物研究：

### スーパー抗原産生細菌についての検討

分担研究者 阿部 淳 (国立小児・研究センター・小児生態)

共同研究者 高添正和 (社会保険中央総合病院内科)

松本誉之 (大阪市大・医・三内)

星野 恵津夫、帯刀 誠 (帝京大・医・内)

(はじめに)

潰瘍性大腸炎とクローン病は、慢性炎症性腸疾患の代表的な疾患である。クローン病は消化管粘膜に生じる肉芽腫性病変を特徴とし、その発症機序として粘膜内T細胞の免疫制御機能異常が近年注目されている<sup>1,2)</sup>。本研究は、*Staphylococcus aureus*、*Yersinia pseudotuberculosis* (*Y. pdt*)などのスーパー抗原産生菌による腸管感染が、宿主の腸管免疫系の制御機構を破壊させることによりクローン病の発症に関与する可能性について検討することを目的とする<sup>3)</sup>。

昨年度は、クローン病患者150例について血清中の*Y. pdt*由来スーパー抗原 (YPM, *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen) に対するIgG抗体価をELISA法で測定した。その結果、クローン病患者群でのELISA値は健常小児対照群に比べて有意に上昇していた。本年度は、健常成人での基準値が未確定だったので、消化性潰瘍患者を含む93例の成人対照群について抗YPM抗体価を測定しクローン病患者群と比較した。また抗YPM抗体価の高かった患者の血清について、YPMのリンパ球増殖刺激作用に対する中和活性を測定した。さらに、患者の直腸拭い液からの*S. aureus* および*Y. pdt*の検出を試みた。

(対象と方法)

クローン病患者169例および成人対照93例を対象として、血清中の抗エルシニア菌由来スーパー抗原 (YPM) 抗体価を2つの精製rYPM分画 (微量の大腸菌菌体成分を含む分画1、微量のマルトース結合蛋白を含む分画2) を固相としたELISA法で測定した<sup>4)</sup>。

YPMに対する血清中の中和活性は、健常成人の末梢血単核球をYPMおよび患者血清とともに培養し、<sup>3</sup>H-thymidineの摂取率を測定して算出した。さらに、クローン病患者32例から直腸拭い液を綿棒に採取して、増菌培養後に寒天培地上での菌の分離を行った。また、増菌培養した菌のDNAを抽出して、*S. aureus*

および*Y. pdt*由来スーパー抗原遺伝子をPCR法により検出した<sup>5)</sup>。

(結果)

1. IgG抗体については、第1分画を用いたELISAでは、クローン病患者の吸光度 (mean ± SE) は0.508 ± 0.027、成人対照では0.175 ± 0.015であり、クローン病患者で有意 (p = 0.0001) に高かった。また第2分画を用いたELISAでは、クローン病患者で0.236 ± 0.031、成人対照では0.028 ± 0.007であり、クローン病患者で有意 (p = 0.0001) に高かった。

2. クローン病患者の中でIgG抗体陽性者 (健常成人平均値+2SD以上) は第1分画で74名、第2分画で54名おり、第1、第2分画ともに陽性者 (抗YPM抗体陽性者) は39名 (23.1%) だった。

3. YPMに対する血清中の中和活性は、*Y. pdt*感染症患者では7例中6例で陽性だったが、クローン病患者では19例中4例のみ陽性だった。

4. *Y. pdt*は患者の直腸拭い液からは分離されなかった。また、増菌培養後の遠心沈渣からもYPM遺伝子は検出されなかった。

5. クローン病患者の直腸拭い液からの*S. aureus* 検出率は、直接菌が分離されたもの16.7%、PCR法 (*coagulase*遺伝子、*proteinA*遺伝子) で遺伝子が検出されたもの62.5%だった。菌あるいは遺伝子が検出されたクローン病患者からの、*S. aureus* 由来スーパー抗原遺伝子の検出率は、*sea* 6.7%、*seb/c* 26.7%、*sed* 0%、*see* 0%、*seg* 80.0%、*seh* 0%、*sei* 66.7%、*tsst-1* 20.0% だった。どのスーパー抗原遺伝子も検出されないものが20.0%みられた。

(考察)

健常対照成人群と比較して、クローン病患者の23.1%で抗YPM-IgG抗体が陽性だった。これらの患者は過去に*Y. pdt*に感染した可能性があると考えられる。しかし、クローン病患者の血清では各種の腸内細菌の菌



体成分に対する抗体価が上昇していることがこれまでに報告されているので、ELISAでみられた抗YPM抗体の抗原特異性をさらに確認する目的で、YPMのリンパ球増殖刺激作用に対する患者血清中の中和活性を測定した。その結果、中和活性は抗体陽性者の一部にしかみられなかった。したがって、特異性の高い抗YPM抗体を有するクローン病患者は全体の数%に過ぎず、残りの抗YPM抗体陽性者は他の腸内細菌との交差反応による偽陽性であるか、あるいは *Y. pdt.* 感染からの時間経過とともに中和活性が測定限界以下に低下してしまった可能性が示唆された。抗YPM抗体を測定した患者とは別に、新たにクローン病患者32例の直腸拭い液を採取して、*Y. pdt.* 菌あるいは菌由来遺伝子を直接検出しようと試みたが、陰性だった。*Y. pdt.* がクローン病患者の多くに持続感染している可能性は少ないと考えられた。

交差抗体の存在からも明らかのように、クローン病患者では自己の腸内細菌叢に対する免疫反応が異常亢進していると考えられる<sup>6)</sup>。この理由として、従来、腸炎局所での感染防御機構の破綻により菌が腸管粘膜を通過しやすくなること、あるいはクローン病活動期にはポリクローナルなB細胞活性化が生じていることが挙げられてきた。近年、クローン病患者では腸管粘膜での免疫抑制性のT細胞の機能異常があり、経口トレランスが破綻してTh 1型T細胞の異常活性化が起きているのではないかと疑われている<sup>7) 8)</sup>。今回我々は、このような病態を惹起する因子の一つとして、細菌性スーパー抗原毒素の役割に注目して研究を行った。クローン病患者の数%に *Y. pdt.* 感染の既往が証明されたこと、また患者の直腸拭い液から高頻度に *S. aureus* が検出され、陽性例の80%からいずれかのスーパー抗原遺伝子が検出されたことは、これらの菌が産生するスーパー抗原毒素が、腸管粘膜の炎症の増悪、慢性化に関わる可能性があることを示唆する。細菌性スーパー抗原毒素がクローン病患者の腸管粘膜での免疫抑制性のT細胞の機能異常を惹起するかどうか、今後検討したい。

#### (参考文献)

1) Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, et al: CD4<sup>+</sup> T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 1993; 178: 237-244.

- 2) Powrie F, Leach MW, Mauze S, et al: Inhibition of Th1 response prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RB<sup>hi</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunity* 1994; 1:553-562.
- 3) Ibbotson JP, Lowes JR: Potential role of superantigen induced activation of cell mediated immune mechanisms in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 1995; 36:1-4.
- 4) Abe J, Onimaru M, Matsumoto S, et al: Clinical role for a superantigen in *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *J Clin Invest* 1997; 99:1823-1830.
- 5) Konishi N, Baba K, Abe J, et al: A case of Kawasaki disease with coronary artery aneurysms documenting *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Acta Pediatr* 1997; 86:661-664.
- 6) Blaser MJ, Miller RA, Lacher J, et al: Patients with active Crohn's disease have elevated serum antibodies to antigens of seven enteric bacterial pathogens. *Gastroenterol* 1984; 87:888-894.
- 7) Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, et al: Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995; 102:448-455.
- 8) Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, et al: Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 1997; 150:823-832.

## 8. 特定疾患に関連するウイルスの検索システムの構築

分担研究者 山西 弘一 (阪大医)

共同研究者 近藤 一博、青野 利哉、宮川 広実 (阪大医)

### 【はじめに】

最近、分子生物学的技術を応用することにより、新種の病原ウイルスが発見されてきている。ヒトヘルペスウイルスを例にとっても、8 種中 3 種は最近十年に発見されたものである。そこで、特定疾患患者末梢血からの病原ウイルスの hunting を目的として、既知ヘルペス遺伝子配列を元にした consensus primer PCR 法の開発、応用を試みた。

### 【材料と方法】

ウイルス標準株として B95-8 株(EBV)、AD169 株(CMV)、HST 株(HHV-6)、KHR 株(HHV-7)、BCBL-1 株(HHV-8)を用いた。また臨床検体への応用の検討には、それぞれのウイルスに特異的なプライマーを用いた PCR で、CMV、HHV-6、HHV-7 の DNA の存在が確認された患者末梢血単核球を proteinase K 処理したものをを用いた。未知ウイルスのハンティングには ITP を含み未知のウイルス疾患が疑われる患者末梢血を、proteinase K 処理したものをを用いた。未知ウイルスのハンティング用のプライマーは、b (CMV,HHV-6,7) および g (EBV,HHV-8) ヘルペスを主な標的とし、それらに保存性の高い DNA polymerase 遺伝子と late spliced gene 領域に設定した。共通していない部分の配列については、A/C,C/T,G/T,T/T を許容ペアとし、またウイルス間でミスマッチ数に差がでないよう留意した上で、forward 側、reverse 側、各々 2 種、計 4 種のプライマーを設計した。PCR は総量 50ml、核酸試料 5ml とし、2 units / test の Taq DNA polymerase を使用した。この時、各プライマーおよび dNTP 濃度は、それぞれ 0.5 mM および 160 mM で実施した。PCR 産物の解析は増幅産物を 2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、えられた増幅産物を direct sequencing 法により解析し、

既知ウイルスとの遺伝子配列の比較を行った。

### 【結果】

#### 1. 標的遺伝子の選択と共通プライマーの設計

標的遺伝子には進化的に保存性の高い遺伝子を選択することが重要で、ウイルスの場合、DNA 複製関連遺伝子や virion 構成タンパク遺伝子などの保存性が高いことが知られている。今回、我々はコンピューター解析の結果、DNA polymerase gene と late spliced gene 領域を選択し、 $\beta$  (CMV, HHV-6, 7) および  $\gamma$  (EBV) ヘルペス配列を用いて特に保存性の高い領域を限定して標的的部位とした。共通プライマーの設計の際には、ウイルス間でミスマッチ数に差が生じないこと、宿主であるヒトゲノムからの増幅を抑制することに特に留意した。また、hunting の確率を高めるために、forward 側、reverse 側、各々 2 種、計 4 種のプライマーを設計し、これらを混合使用することとした。プライマー中の共通していない部分の配列については、A/C, C/T, G/T, T/T を許容ペアとしそれぞれ適当な塩基で置換した。

#### 2. 基本増幅条件の設定

増幅条件としては、ミスマッチを含むプライマーから効率よく増幅されるように、あらかじめ非峻厳条件(プライマーの多少のミスマッチを許容する緩やかな条件)で増幅反応を実施した後、さらに峻厳条件(プライマーのミスマッチを許容しない厳しい条件)で増幅させる 2 ステップの PCR サイクルを採用した。この時、共通増幅反応に大きく影響する要因である、非峻厳条件のアニール温度、および、非峻厳/峻厳条件のサイクル数の検討を行った。最初に、非峻厳条件におけるアニール温度の検討を HHV-7 標準株 (KHR 株)より調製した核酸を材料として行った。峻厳条件では 55℃であるアニール温度を 40、45、50℃に下げて増幅産物を比較したところ、40℃

では非特異増幅が認められ、50℃では増幅産物量が減少傾向にあることから、45℃が適当であると判断した。次に非峻厳/峻厳条件のサイクル数がそれぞれ 10/40、20/30、30/20 である時の増幅効率を比較したところ、10/40 と 20/30 の条件では増幅効率に差は認められなかったが、30/20 の条件では著しく増幅効率が低下していた。これは峻厳条件のサイクル数の不足のためと考えられ、少なくとも 30 サイクル以上は必要であることが示唆された。最終的には、非峻厳条件でのプライミングの機会と、その後の峻厳条件での十分な増幅効率を考慮して、20/30 の系を採用することとした。

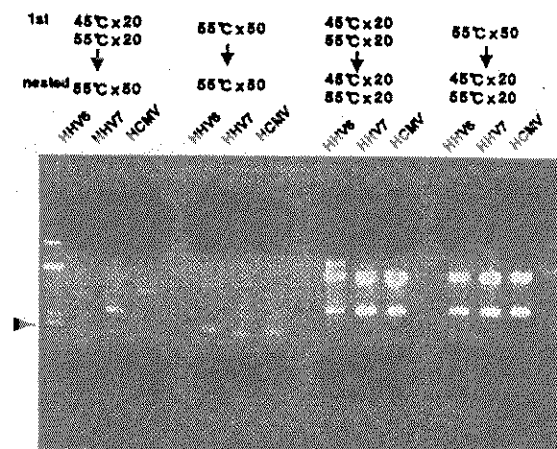
### 3. 共通増幅と汎用性、実用性の検討

基本的な増幅サイクルが定まったところで、各標準株より調製した核酸を用いて、共通増幅が可能かどうか検討した。その結果、EBV, CMV, HHV-6B, HHV-7, HHV-8 から同じ位置に増幅産物が得られ、またヒトゲノムからの増幅は認められなかったことにより、本システムがウイルス特異的に共通増幅可能であることが確認された。また、得られたバンドを direct sequencing 法により解析し、既知ウイルスとの遺伝子配列の比較を行ったところ、そのホモロジーは高く、増幅産物がウイルス由来であることが確認された。

### 4. 臨床検体に対する実用性の検討

次に臨床検体にこの PCR を施行したところ、主な増幅産物の塩基配列は、ヘルペスウイルス由来ではなく、データベースと比較したところヒトゲノムとホモロジーが高くヒトゲノム由来と考えられた。増幅条件を検討するために、特異的プライマーによる PCR ですでにウイルス DNA の存在が明らかな検体を用い至適 PCR 条件の検討を行った。このヒトゲノムに対する非特異的な増幅を抑制するために、より特異性を高めた PCR 条件(アニール温度 55℃、50 サイクル)とし、その変更に伴う感度の低下は nested 法の利用により補った(図 1)。その結果、臨床検体を材料とした時にも、急性期の検体においては、ウイルス由来の増幅産物を得ることが可能となった。

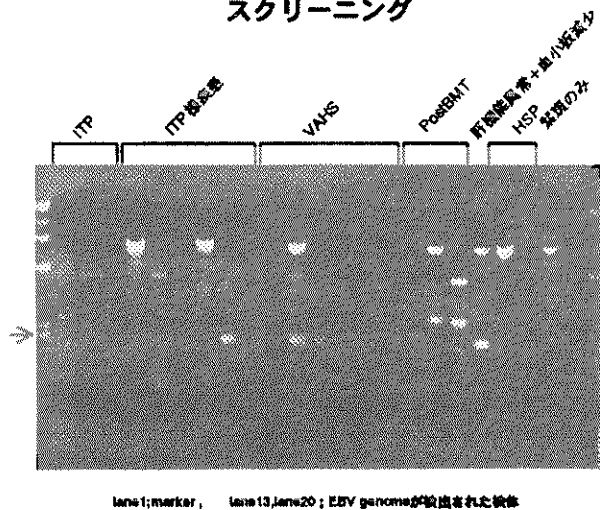
### 臨床検体での consensus primers による PCR 条件の検討



### 5. 未知ウイルスのハンティング

この方法を用いて未知のウイルス性疾患が疑われる臨床検体をスクリーニングしたところ、一部の検体からは目的とする長さの増幅産物が得られ、その塩基配列をみたところ一部は既知ヘルペスウイルスであったが、その他はヒトゲノム由来の非特異的増幅と考えられた(図 2)。

### 臨床検体での consensus primer PCR 法によるスクリーニング



### 【考 察】

PCR 法は、微量の核酸を高感度に特異的に増幅することが可能で、試料中の病原体の検出、同定に有効な技術である。この PCR 法の感度や特異性がプライマーの配列により規定されており、進化的に保存性の高い遺伝子を標的として選択することで、1 組のプライマーで複数の病原体を同時に検出することが可能となる

(consensus primer PCR 法)。今回、我々は特定疾患患者の病原体の hunting のために、この consensus primer PCR 法を採用し、標的遺伝子として DNA polymerase 遺伝子と late spliced gene 領域を選択した。このシステムを用いることにより、既知のウイルスではあるが病態との関連が未解明であった場合や、未知ウイルスが原因である特定疾患を幅広くスクリーニングすることが可能になると考えられる。しかしウイルス量の少ない検体に応用するためにはまだ特異性が不足していると考えられる。対象とする臨床検体をウイルスのコピー数が多いと予想される急性期のものとし、この条件での未知ウイルスのハンティングのためのスクリーニングを開始した。これと平行して primer の変更を含めた PCR 条件の調整や、ヒトゲノムの除去策、非特異的増幅と特異的増幅を判別するための consensus hybridization probe の作成についても、検討中である。

【参考文献】

- 1) VanDevanter DR, Warrenner P, Bennett L, et al : Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. J Clin Microbiol 1996 ; 34 : 1666-1671.
- 2) Aono T, Murakami S, Yanagihara N, et al : Detection of human alpha-herpesvirus DNA using consensus primers and specific probes. Acta Otolaryngol Suppl (Stockh) 1994 ; 514 : 132-134.
- 3) Lawrence GL, Chee M, Craxton MA, et al : Human herpesvirus 6 is closely related to human cytomegalovirus. J Virol 1990 ; 64 : 287-299. 4) Karlin S, Mocarski ES, Schachtel GA : Molecular evolution of herpesviruses: genomic and protein sequence comparisons. J Virol 1994 ; 68 : 1886-1902.