

表1 CSFからのJCV DNAの検出¹⁾

症例	年齢/性別	基礎疾患 ²⁾	CSF中のJCV DNA ³⁾	検出された調節領域 ⁴⁾
2	22歳/男	ALL	+/-	J13
4	43歳/男	エイズ	+	J14a, J14b, J14c, J14d
13	70歳/男	エイズ	+/-	J7
17	30歳/女	SLE	+	J15
23	65歳/男	骨髄繊維症	+	J16
27	30歳/女	SLE	-/+	J17a, J17b, J17c

- 1) 平成11年1月から12月まで当研究室へ送られてきた35症例、50検体をnested PCR法により検査した。本表にはJCV DNAが検出された症例のみを示した。
 2) SLE、全身性エリテマトーダス。ALL、急性リンパ性白血病。
 3) +/-は継続調査により陽性から陰性へ、-/+は陰性から陽性へ変化したことを示す。
 4) 図1を参照。

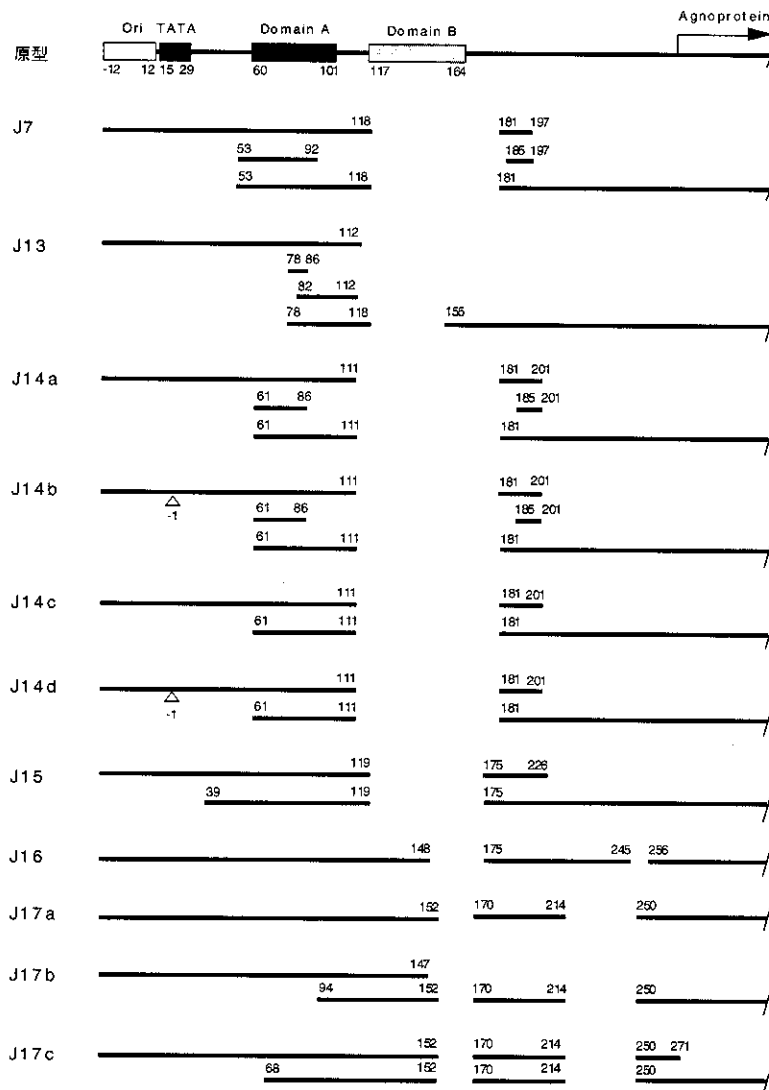


図1 患者CSFから検出されたJCV調節領域の構造

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配列を表す。また、agnoproteinの翻訳開始部位を示す。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、平成11年1月から12月に我々が患者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、欠失に出会ったら空白にし、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。△は欠失を示す。

3. 追跡調査、症例2

患者は22歳の男性。1998年にALLを発症し、平成9年に非血縁者間の骨髄移植が行われ、GVHDの出現のため、免疫抑制剤が1年間使われた。1998年12月頃から神経症状が現れ、MRI所見でも白質病変が観察された。1999年12月18日と28日に採取されたCSFから調節領域が検出された。

決定された調節領域 (J13) の構造を図1に示した。J13は原型から欠失と重複により作られた再編成型の調節領域であり、過去に同一の構造は発見されていない。

表2は約1年間にわたって行われた継続調査の結果を示す。1998年12月、1999年2月、3月、5月とJCV DNAは検出され続けた。ところが、7月に採取した検体からJCV DNAは検出されなくなった。最後に陽性であった5月7日と最初に陰性であった7月12日の間にCSF中のJCV DNAは陽性から陰性に転じたと考えられる。この頃、病態は増悪していたが、その後病態は安定し、患者はPML発症後、1年以上生存している。

4. 追跡調査、症例27

患者は30歳の女性。1987年にSLEと診断され、国立国際医療センターでfollow upされていた。1999年9月頃から神経症状が現れ、MRI所見でも白質病変が認められた。しかし、通常の検査では、10月20日と27日に採取された患者CSFはJCV DNA陰性だった。その後、神経症状の進行や病変部の

拡大などから、PMLの可能性が強く示唆されたため、11月に採取した2検体(11月8日、29日に採取)を再度検査した。11月8日のCSFは1/3の検出率で陽性、11月29日のCSFは3/3の検出率で陽性であった(なお、検出率を便宜的に陽性回数/検査回数で示した)。

そこで、その時までには得た4検体につき、JCV DNAの検出を繰り返し行った。すなわち、それぞれのCSFから4回別々にDNAを抽出し、各DNA検体につき3回(各CSFに対して計12回) nested PCRを行った。増幅断片が得られたときは、増幅断片をクローニング、シーケンシングした。

結果を表3に示した。10月20日と27日には1/12と非常に低い率ではあるが、JCV DNAが検出された。検出率は11月8日には2/12と少し上昇し、11月29日には8/12という高い水準に達した。

検出された調節領域 (J17a、J17b、J17c) を図1に示した。時期的には、欠失のみを持つ17aがまず始めに検出され、17aから作られたと思われる17bと17cがその後検出された(表3)。J17cは一回しか検出されていない。現在、その後の推移を調べている。

5. その他の追跡調査

この3年間に2回から3回追跡調査が行われた他の例を簡単に紹介する。

- (1) 症例27のように、初回陰性であったが、その後の病態進行によって再度CSFを検査した結果、陽性になった症例が1例あった。
- (2) エイズ患者で、PMLと診断された2症例(そのうちの1つは症例13[表1])では、エイズに劇的な効果があるHAART療法を行った前と後とで、CSF中のJCV DNAを調べた。両症例ともCSF中のJCV DNAは陽性から陰性に転じた。
- (3) CSFと脳生検からJCV DNAが検出された患者がその後2年以上生存した症例で、1年後と2年後にCSF中のJCV DNAを検査したが、陰性であった。

表2 症例2(CSF)からのJCV DNAの検出¹⁾—継続調査

CSF採取日	陽性回数/検査回数
1998年12月18日	2/2
1998年12月28日	2/2
1999年2月23日	3/3
1999年3月17日	3/3
1999年5月7日	2/3
1999年7月12日	0/6
1999年8月18日	0/6
1999年9月13日	0/6
1999年10月4日	0/6
1999年11月4日	0/6

¹⁾nested PCR法による。

表3 症例27(CSF)からのJCV調節領域の検出¹⁾

CSF採取日	DNA検体	検出された調節領域 ²⁾			検出率 ³⁾
		1回目	2回目	3回目	
1999.10.20	1	— ⁴⁾	—	—	1/12
	2	—	—	—	
	3	—	—	a	
	4	—	—	—	
1999.10.27	1	—	—	—	1/12
	2	—	—	—	
	3	—	—	—	
	4	b	—	—	
1999.11.08	1	a	b+c	—	2/12
	2	—	—	—	
	3	—	—	—	
	4	—	—	—	
1999.11.29	1	b	—	b	8/12
	2	b	b	—	
	3	a+b	a+b	a+b	
	4	—	—	a+b	

¹⁾nested PCRによる。

²⁾a:J17a。b:J17b。c:J17c。

³⁾陽性回数/検査回数。

⁴⁾検出されず。

考 察

1. CSFを用いたPMLのPCR診断：長所と問題点

今回6症例においてCSFから検出されたJCV調節領域は原型から欠失により、または、欠失と重複により作られたPML型調節領域であった。検出された調節領域と同じPML型調節領域はこれまでに検出されていない(即ち、コンタミネーションの可能性は除去される)。以上により、6症例はいずれもPMLと確定診断された。

以上のごとく、調節領域をターゲットとしたnested PCR法の有用性が確認された。

しかし、症例27では、MRI等の検査で白質病変が示唆された時点で採取されたCSFからは通常の検査でJCV DNAは検出されなかった。しかし、3週間経過すると、容易に検出されるようになった。以上の経緯により、CSFからJCV DNA確実に検出ができるまで、タイムラグあることが示された。

このように、初回陰性でもfollow upする必要がある、また、検出感度を上げるために、PCR施行回数を増やすことも必要である。

2. CSFからのJCV DNAの消失

エイズ患者がPMLを発症した症例に対して、エイズに劇的な効果があるHAART療法を行うとエイズのみならずPMLの病態も改善または安定化し、患者は長期生存し、CSF中のJCV DNAは検出されなくなると報じられている。(実際、我々も2名のエイズ患者においてHAART療法に伴うCSF中のJCV DNAの消失を確認した。)このことから、CSF中のJCV DNAの消長はPMLの病態進行を反映していると主張された。本研究において、エイズ以外の基礎疾患を有するPML患者においても、CSF中のJCV DNAの消失と患者の長期生存との関連が示唆された。

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。当時は、40~50bp の長さの domain A と domain B がそれぞれ重複し、欠失している調節領域が多かった。しかし、我々が3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。

今後、このような JCV 調節領域の再編成が JCV の宿主体内での存続や PML の発症などと、どう関わりをもつか、今後明らかにされなければならない。

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、平成 11 年度 8 症例 (塩基配列未決定の 2 症例を含む) の 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。

一部の症例については追跡調査が行われた。その結果、初期の検体が陰性の場合でも、その後陽性に転じる例があったことから、正確な診断には追跡調査する必要があることが明らかになった。また、数ヶ月間、JCV DNA が検出され続けたが、その後検出されなくなる例も見いだされ、CSF 中の JCV の消失が、患者の長期生存の可能性を示唆すると考えられた。

PML 患者の中樞神経系から検出される JCV 調節領域は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低下との関係は、等々、解明されるべき問題が多く残っている。

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 (本報告書、「PML 患者における JC ウイルス DNA の動態」を参照)。

謝 辞

CSF を提供していただいた全国の病院、医療機関の諸先生に深謝する。

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
- 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) Miralles, P., Berenguer, J., Garcia de Viedma, et al.: Treatment of AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy with highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 12:2467-2472, 1998
- 6) Padgett, B. L., Walker, D. L.: New human papovaviruses. *Prog. Med. Virol.* 22: 1-35, 1976
- 7) Sugimoto, C., Kitamura, T., Guo, J., et al.: Amplification of JC virus regulatory DNA sequences from cerebrospinal fluid: diagnostic value for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch. Virol.* 143:249-262, 1998
- 8) 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



PML患者におけるJCウイルスDNAの動態

余郷 嘉明¹⁾、杉本 智恵¹⁾、藤原 一男²⁾、大野 孝恵³⁾

¹⁾東京大学医科学研究所 ウイルス感染研究部

²⁾東北大学医学部附属病院 神経内科

³⁾東京大学大学院医学系研究科 神経内科

研究要旨

生前に進行性多巣性白質脳症(PML)と診断された2名の患者(K1、K2)の剖検組織を調べる機会を得た。患者K1では、中枢神経系およびその他の組織に対しJCV DNA(調節領域)を検索した。中枢神経系(大脳、小脳、脊髄)、脳脊髄液(CSF)、末梢リンパ球、尿からJCV調節領域を検出したが、腎、扁桃、リンパ節、脾、骨髄からは検出しなかった。尿から検出された調節領域は原型であった。中枢神経系、末梢リンパ球、CSFから検出された調節領域は、原型から作られた再編成型調節領域であった。検出された調節領域の構造比較から、中枢神経系に存在した、様々な調節領域を持つJCVのうち、リンパ球向性のJCVが末梢リンパ球に感染したことが示唆された。長期生存した患者(K2)では、脳のいろいろな部分から5種類の再編成型の調節領域を検出した。調節領域の構造を互いに比較することによって、再編成型調節領域は2つの経路で作られたことが示唆された。また、各調節領域の中枢神経系における分布から、JCV感染の拡大が2元的に起きたことが示唆された。

分担研究者：余郷嘉明

研究協力者：杉本智恵、藤原一男、大野孝恵

Dynamics of JC virus DNA in PML patients

Yoshiaki Yogo¹⁾, Chie Sugimoto¹⁾, Kazuo Fujihara²⁾ and Takae Matsushima-Ohno³⁾

¹⁾Department of Viral Infection, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, ²⁾Department of Neurology, Tohoku University School of Medicine, ³⁾Department of Neurology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

目 的

大部分のヒトは子供の時にJCウイルス(JCV)に感染する。初感染の後、JCVは腎に持続感染し、仔JCVは尿中に排泄される。JCVはその他、末梢リンパ球、リンパ組織などにも存続するという報告もある。持続感染(または潜伏感染)しているJCVが中枢神経系に行き、進行性多巣性白質脳症(PML)を発症させると一般に考えられている。しかし、JCVがどのようにして中枢神経系に侵入するのかは不明である。

PMLは中枢神経系での脱髄疾患である。ミエリンを形成する細胞(オリゴデンドロサイト)がJCVに感染するために脱髄が起きる。病態の進行に伴って、病巣は原発部位(例えば前頭葉)から他の部位(側頭葉、頂頭葉、後頭葉、小脳など)へ拡大する。病巣の拡大がどのように起きるかは明らかになっていない。

PML患者の脳から分離されるJCV DNAの調節領域(PML型調節領域)は例外なく、原型調節領域(初感染で体内に侵入したJCVが持つ調節領域)から欠失と重複によって作られる。原型からPML型への変化は不規則的に起きるために、PML型調節領域は患者毎に異なる。JCV調節領域の再編成はどのような意義を持つか、PMLの発症とどう関わるか、などの点は不明である。

PMLは免疫不全を伴う疾患を有する患者や免疫抑制剤が投与されている移植患者などに主として発生する。免疫低下とJCV調節領域の再編成がどう関わるかも明らかになっていない。

本研究は、以上列挙した諸問題を解明する糸口を得るために、PML患者におけるJCウイルスDNAの動態を解析することを目的とする。

方 法

1. 組織からのDNA抽出

CSFとリンパ球からはスマイテストEX-R&D(住友金属)を用いて抽出した。他の組織からは、プロテイナーースK消化、フェノール処理、クロロフォルム処理により抽出した。

2. 調節領域の増幅

nested PCRまたは標準PCRにより行った。nested PCRにはouter primerとしてA1とA2を、inner primerとしてB1とB3を用いた。標準PCRにはB1とB3またはB1とB4を用いた。B4以外の各 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と文献(Sugimoto et al., 1998)に詳しく述べた。B4(5' GCCTGCAGTTAC TTACCTATGTAGCTTT 3')はA2を修飾した配列で、5'末端にPstI 認識部位(下線)を持つ。

3. 増幅断片のクローニング

増幅断片をHindIIIとPstIで消化し、調節領域を切り出し、pBluescript II SK(+)を用いてクローニングした。

4. 制限酵素解析

増幅断片のクローンをHindIII, PstI, SstIにより消化し、3%NuSieve アガロース・ゲルで電気泳動した。

5. 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。

結果と考察

1. 中枢神経系およびその他の組織に存在するJCV調節領域(症例K1)

患者は52歳の女性。28歳の時からSLEにてステロイドを内服した。1998年の1月に両足に易疲労感が出現してから徐々に神経症状が悪化した。諸検査によりPMLが疑われ、CSF中のJCV DNAの検索が行われた結果、再編成型JCV調節領域が検出された。患者は11月末に亡くなった。

解剖の同意が得られ、中枢およびその他の組織が採取された。採取された組織は脳、小脳、脊髄、腎、扁桃、リンパ節、脾、骨髄であった。また、生前、検査のため9月と11月にCSFが、11月に末梢リンパ球が採取された。各組織からDNAが抽出され、JCV DNA(調節領域)が検索された。その結果、CSF、脳、小脳、脊髄、末梢リンパ球、尿からJCV DNA(調節領域)が検出された。

検出された調節領域の構造を図1に示す。尿から検出された調節領域は原型であった。それ以外の組織(大脳、小脳、脊髄、CSF、末梢リンパ球)から検出された調節領域は全て再編成型の調節領域(図1のAからH)であった。A~Hは共通してnt 112からnt 177までの配列が欠失していた。A、B、Cは2回繰り返し配列をもっていたが、DからHは3回繰り返し配列をもっていた。

これらの調節領域の、各組織における分布を表1に示す。以下の特徴が判明した。

(1) 中枢神経系(大脳、小脳、脊髄)では、2回繰り返し配列をもっているAが高い比率で検出された。3回反復配列をもつ調節領域(特にD)も検出されたが、比率は低かった。(2) CSFと末梢リンパ球では、2回反復配列をもつ調節領域はほとんど検出されず、代わりに3回反復配列をもつ調節領域が高率に検出された。(3) CSF-2と末梢リンパ球においては、共に3回反復配列を有するDが90%を占めた。

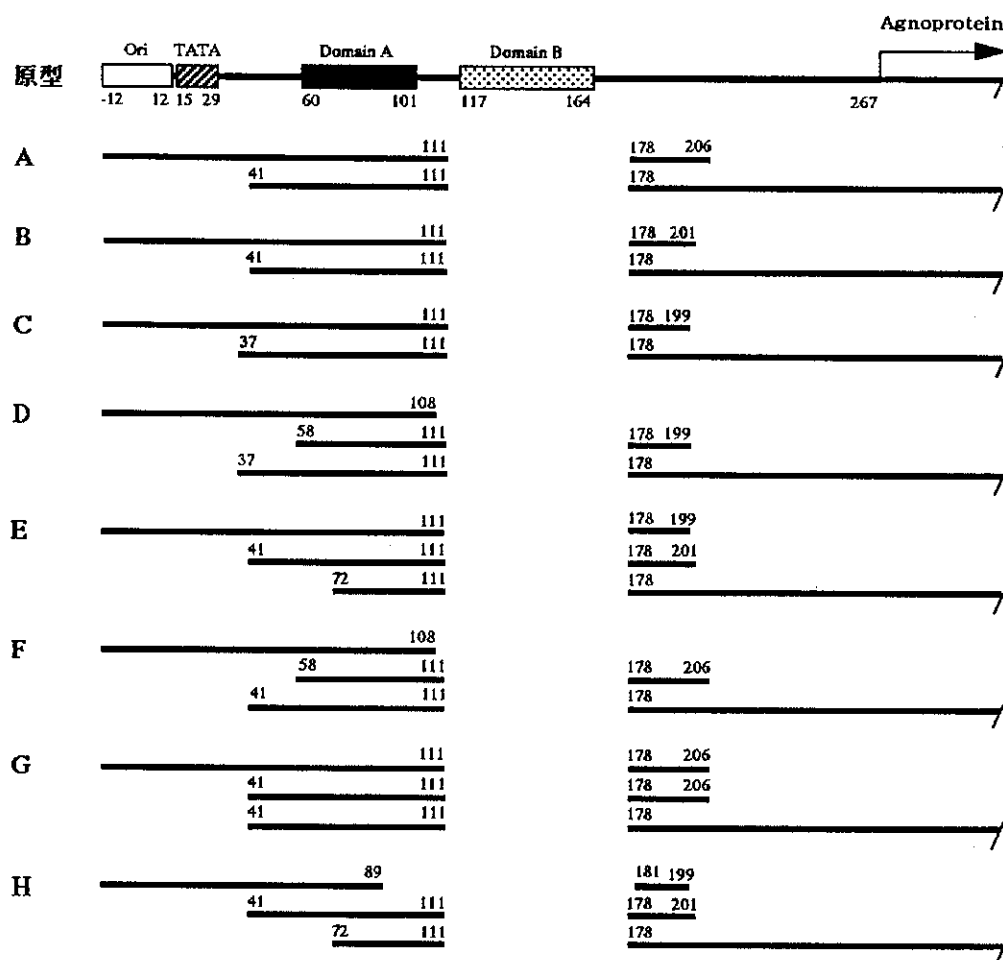


図1 患者K1から検出されたJCV調節領域の構造

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配列を表す。また、agnoproteinの翻訳開始部位を示す。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、いろいろな組織から検出された調節領域(AからH)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、左から右へ線を引く、欠失に出会ったら空白にし、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。

ほぼ同じ時期に採取されたCSF-2と末梢リンパ球に存在する調節領域はよく似ていたことから、CSFから検出されたJCVは遊離の状態にあったのではなく、感染リンパ球の中に存在していたと考えられた。

中枢神経系では、様々な調節領域を有するJCVが存在した(表1)。この知見および、異なるPML患者の脳から様々なJCV調節領域が検出される事実は、中枢神経系では多様な調節領域をもつJCVが増殖できることを示している。一方、末梢リンパ球とCSFでは、一部の調節領域(主にD)のみが検出された。このことは、中枢神経系と比べて、末梢リンパ球は許容するJCV調節領域のスペクトラムが狭いと考えられた。

以上から、中枢神経系に存在した、様々な調節領域を持つJCVのうち、リンパ球向性のJCVが末梢リンパ球に感染し、この感染リンパ球が末梢血への感染の拡大を起こしたと考えられた。

2 中枢神経系の各領域に分布するJCV調節領域(症例K2)

患者は剖検時、40歳の男性。92年9月より意識消失発作、記憶力障害が繰り返し起きた。94年1月、東大・神経内科に入院、Wiskott-Aldrich 症候

群と診断された。同年4月、書字、読字、模写は憎悪。5月、右手はほとんど動かなくなり、視覚認知障害、着衣失行も認められた。7月、病状がさらに悪化した。7月、治療方針決定のため、右前頭葉より生検が行われ、PCRとin situ hybridizationによりJCV DNAが検出された(Matsuima et al., 1995)。その後患者は、失外套状態にて4年間生存したが、1998年10月急速な心伝導系の障害を呈し、10月15日死亡した。

この患者の脳に存在するJCV DNAにつき詳しく解析した。5種の調節領域(JW-1からJW-5)が検出された(図2)。

JW-1、JW-2、JW-3の3調節領域は同じ2種類の欠失をもっていることから、互いに関連していると考えられた。図3に示したように、原型JCV(JCV-1)から中間体1(これはJW-3と同じ)ができ、次にこの中間体に別々の重複が起きてJW-1とJW-2ができたと推定される。一方、JW-4とJW-5が互いに関連していることは、両者の間で欠失または重複の末端の多くが同じであることからわかる。おそらく、原型JCV(JCV-2)から中間体2ができ、次に欠失が起きてJW-4が作られ、さらなる欠失が起きてJW-5が作られたと考えられる(図3)。

表1 各組織における各JCV調節領域の分布(症例K1)

組織	調べたク ローン数	各調節領域 ¹⁾ の比率								
		A	B	C	D	E	F	G	H	他
大脳	18	0.57	- ⁴⁾	-	0.33	-	-	-	-	-
小脳	19	0.68	-	-	0.11	-	-	0.11	-	0.11
脊髄	18	0.61	-	-	0.06	0.11	0.11	-	-	0.11
CSF-1 ²⁾	17	-	0.06	0.06	0.59	0.18	-	-	0.12	-
CSF-2 ³⁾	21	-	-	-	0.90	0.05	-	-	-	0.05
末梢リン パ球 ³⁾	21	-	-	-	0.90	-	-	-	-	0.10

¹⁾全てsequencingにより同定した。各調節領域の構造は図1に示した。

²⁾1998年9月に採取。

³⁾1998年11月に採取。

⁴⁾検出されず。

表2 中枢神経系における各JCV調節領域の分布(症例K2)

脳の領域	調べた クローン数	各調節領域 ¹⁾ の比率					
		JW-1	JW-2	JW-3	JW-4	JW-5	その他
前頭葉	32	0.91	0.09	- ²⁾	-	-	-
頭頂葉	35	0.83	0.06	0.09	-	-	0.03
側頭葉	34	0.06	0.85	0.09	-	-	-
後頭葉	27	0.67	-	0.04	0.04	0.26	-
小 脳	35	0.49	-	0.03	0.37	0.11	-
橋	28	0.89	-	0.07	0.04	-	-

¹⁾RFLP解析により同定した。各調節領域の構造は図2に示した。

²⁾検出されず。

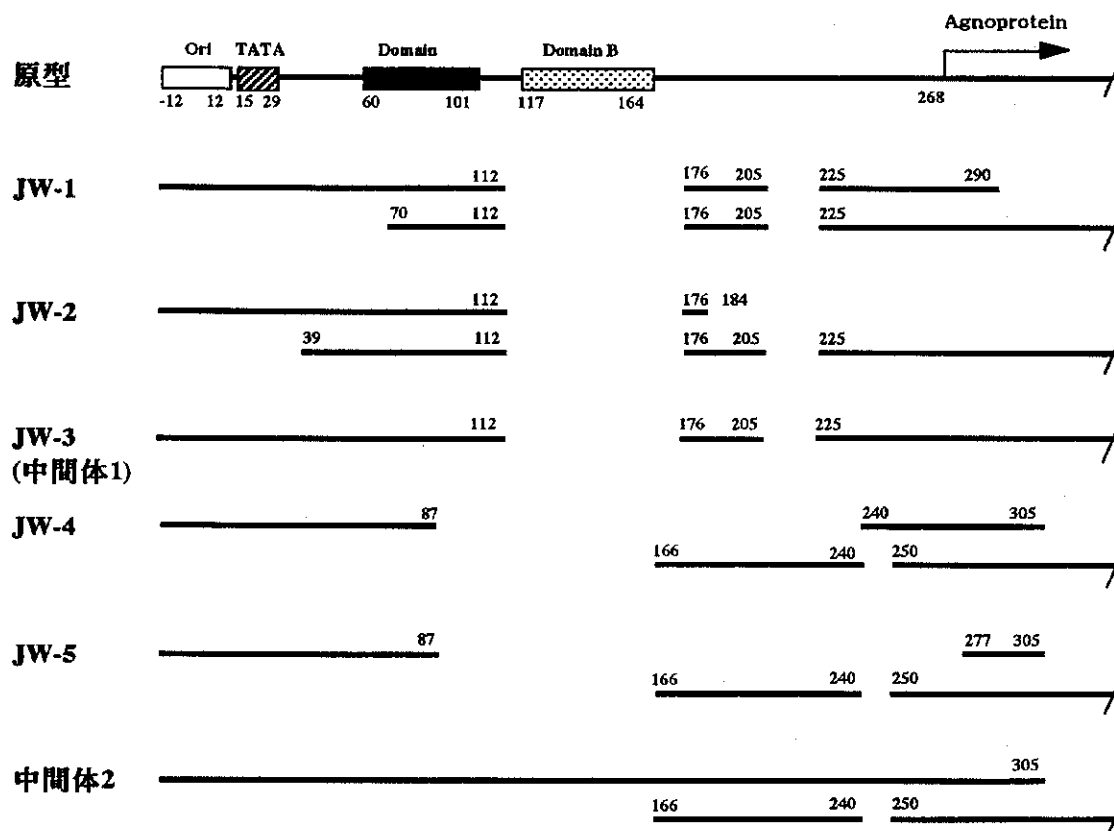


図2 患者K2から検出されたJCV調節領域の構造

最上部に原型調節領域を示す。原型調節領域の下に、いろいろな組織から検出された調節領域(JW-1からJW-5)の構造を示す。中間体1はJW-3と同じ構造である。中間体2は検出されていない仮想的な調節領域である。図の表し方は図1と同じ。

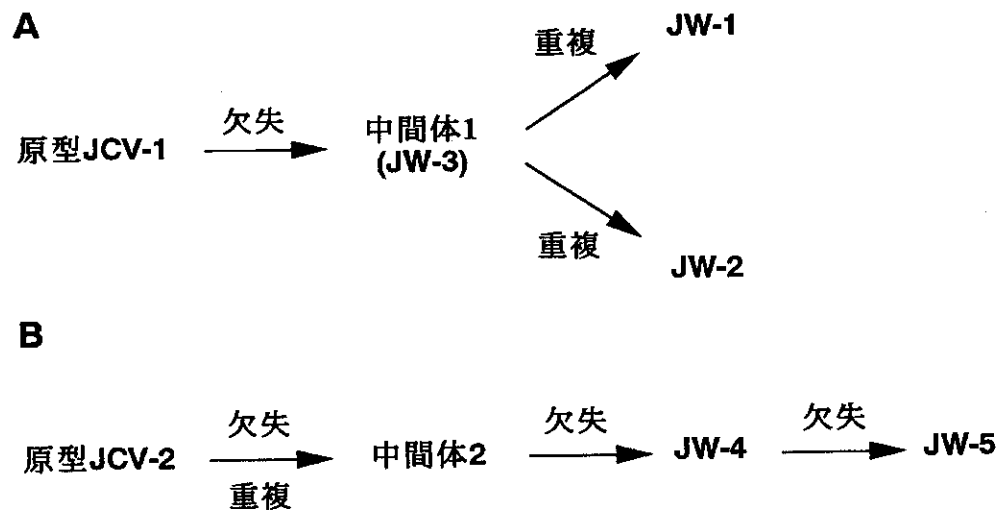


図3 患者 K2 における再編成型 JCV 調節領域の形成(推定)

各調節領域の脳における分布以下のように要約される(詳しくは表2を参照)。JW-1は脳のほぼ全領域から高い率で検出されたが、側頭葉での検出率は低かった。JW-2は側頭葉に多く検出され、前頭葉と頭頂葉では少なく、後頭葉、小脳、橋からは検出されなかった。JW-3は脳のほぼ全域から検出されたが、検出率は常に低かった。JW-4は小脳から比較的多く検出され、他に後頭葉、橋からも検出された。JW-5は後頭葉と小脳からのみ検出され、検出率は後頭葉の方が高かった。

当患者においては脳病変が前頭葉で最初に起きたことが示唆されている。また、4年前の脳生検(前頭葉)からは JW-1 と少数の JW-2 が検出された(未発表データ)。これらの知見および本研究結果から、患者脳における JCV の動態を次のように推定した。

最初に前頭葉で JW-1 が中間体1から生まれ、脳全体に拡がった。同じ頃か少し遅れて、側頭葉で JW-2 が同じく中間体1から生まれ、周辺に拡がった。後期には、小脳で JW-4 が中間体2から生まれ、周辺に拡がった。JW-4 が小脳から後頭葉に拡がる過程で、JW-5 が生まれた。

中間体がどの部位で作られ、いつ中枢神経系へ運ばれたかは不明であるが、中間体から最終産物への調節領域の変化は中枢で起きたと仮定する方が、各調節領域の脳における分布の違いをよく説明できる。

病巣の拡大という点でみると、PMLの後期においては、前頭葉で最初に現れた病巣が中枢全体に拡がっただけでなく、起源が異なる新たな病巣が小脳に出現し、一部後頭葉まで病巣は拡がったことを本研究結果は示唆している。

結 論

PML 患者の脳病変部 JCV は必ず再編成型の調節領域を有している。調節領域の再編成がどの部位で起きるかは未だ解明されていない。これと密接な関係があるが、PML型調節領域をもつ JCV はどこから来るのかも未解決である。さらに、JCV がどのようにして中枢神経系に侵入するのか、中枢神経系における病巣の拡大がどのようにして起きるのかなどの点も不明である。

これらの諸問題を解明するには、患者における JCV DNA の動態に関するデータを蓄積する必要がある。本報告は、このような臨床研究が、JCV と PML に関する諸問題の解明に有効であることを示した。例えば、中枢神経系で作られた、様々な調節領域を持つ JCV のうち、リンパ球向性の JCV が末梢リンパ球に感染し、末梢血への感染の拡大が起きたことが示唆された。また、長期生存した患者の場合、JCV 感染の拡大が2元的に起きたことが示めされた。今後、臨床の医師との共同で、さらなる解析を行っていきたい。

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) Gallia, G. L., Houff, S. A., Major, E. O., et al: Review: JC virus infection of lymphocytes-revisited. *J. Infect. Dis.* 176:1603-1609, 1997
- 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) Matsushima, T., Nakamura, K., Oka, T., et al.: Unusual MRI and pathologic findings of progressive multifocal leukoencephalopathy complicating adult Wiskott-Aldrich syndrome. *Neurology.* 48:279-282, 1997
- 6) Padgett, B. L., Walker, D. L.: New human papovaviruses. *Prog. Med. Virol.* 22: 1-35, 1976
- 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



播種性トリコスポロン症における 血清 nested PCR法によるモニタリング

山形 英司、山上由理子、永井 寛之、辛島 礼子、那須 勝

大分医科大学医学部 第二内科

研究要旨

播種性トリコスポロン症は主に *Trichosporon asahii*、*Trichosporon mucoides* によって引き起こされる致死的な日和見感染症である^{1,2)}。本症は血液悪性疾患患者や抗腫瘍化学療法を施行された患者における好中球減少期に発症し、重篤な臨床経過をとることが多い^{3,4,5,6)}。HIV患者においても症例報告が散見され^{7,8,9,10,11)}、好中球減少を認めない患者における症例という点で注目に値する。大分医科大学で経験した播種性トリコスポロン症13例について、発症時の白血球数、好中球数、リンパ球数などについて検討を行った。13例中11例に白血球減少(WBC<2000/ml)と、重度の好中球減少(Nt<500/ml)が認められた。一方、他の2例においては、白血球数・好中球数とも2000/ml以上であったが、リンパ球数の減少が認められた。これより、好中球減少が本症発症因子として重要であることが確認され、リンパ球減少に起因する症例も少数ながら存在することが示唆された。

従来、本症の診断として真菌培養検査や病理組織診断、あるいはクリプトコックスとの交叉抗原を利用した glucuronoxylomannan (GXM) 抗原検出法などが用いられている。本症の迅速診断のため血清を検体としたPCR法を開発し、モニタリングとしての有用性について従来法と比較検討する実験を行った。ICR マウスに免疫抑制剤を前投与し、臨床分離株の *T.asahii* (OMU239; 3×10^6 CFU/animal) を感染させ、経時的に採血検査を行った。その結果、真菌培養では感染14日以内に、PCR法では21日以内にそれぞれ陰性化した。GXM 抗原検出法では感染35日の時点においても持続的に陽性所見を呈した。次にマウスを3群に分けて、感染7日目(培養+; PCR+; GXM+)、14日目(培養-; PCR+; GXM+)、21日目(培養-; PCR-; GXM+) の異なるタイミングで、免疫抑制剤の再投与を行った。感染7日目と14日目に再免疫抑制した2群において、マウスの生存率の低下が認められたが、感染21日目に再免疫抑制した群においては認められなかった。血清PCR陽性時点での免疫抑制剤の再投与は生存率を低下させることから、本症のモニタリングとして血清PCR法の有用性が示唆された。

分担研究者：斎藤 厚

研究協力者：山形英司、山上由理子、永井寛之、辛島礼子、那須 勝

Monitoring of disseminated trichosporonosis by PCR detection of DNA specific for *Trichosporon* Species in serum samples

Eiji Yamagata¹⁾, Yuriko Yamakami¹⁾, Hiroyuki Nagai¹⁾, Reiko Karashima¹⁾, Masaru Nasu¹⁾ and Atsushi Saito²⁾

¹⁾Second Department of Internal Medicine, Oita Medical University, ²⁾First Department of Internal Medicine, Ryukyuu University

目的

播種性トリコスポロン症は易感染宿主の日和見感染症として重要である^{1,2,3,4,5,6}。HIV患者における合併症としては、カンジダ症やクリプトコックス症などの真菌感染症に比較して少数例である^{7,8,9,10,11}。この理由として、本症発症には、主に血液中の好中球減少が関与していることが示唆されている。しかし、IVHから直接血液中に侵入する感染経路以外では、局所組織中のリンパ球やマクロファージの減少も発症因子の一つと思われる。

我々は、自験例13例において、本症発症による死亡前の白血球数、好中球数、リンパ球数などについて検討し、リンパ減少が主に関与する症例が存在するかどうかを確認した。

本症の診断は困難で、発症後に急速に致死性的経過をとることが少なくない。また、本症の診断に関して、病理組織や培養検査による真菌の形態学的性状においてはカンジダ症との鑑別が^{6,12}、血清によるGXM抗原検出法においてはクリプトコックス症との鑑別が¹³、それぞれ問題である。このため、本症の治療において、迅速で信頼できる診断法の開発が望まれてきた。我々の血清 nested PCR 法は¹⁴、播種性トリコスポロン症診断の一助になるものと思われる。カンジダ症やアスペルギルス症においては、すでにPCR法などによる診断やモニタリングの方法が検討されている^{15,16,17}。そこで、我々は、本症におけるモニタリングとしての血清 nested PCR 法の有用性について、従来法と比較検討する実験を行った。

方法

1. 臨床検討

大分医科大学第二内科にて診断された播種性トリコスポロン症13例を対象として、死亡前7～10日と死亡前3日の二点で、白血球数、好中球数、リンパ球数の推移を確認し、本症発症におけるそれぞれの細胞減少の関連をretrospectiveに検討した。

2. 動物実験

a. 菌株

大分医科大学附属病院において慢性骨髄性白血

病患者の血液培養より分離された *T.asahii* (OMU-239) を全ての実験に使用した。スキムミルク中に80℃で保存されていた *T.asahii* を、37℃、48時間、サブロー寒天培地 (SDA) にて培養した。その後、真菌の純度と活動度を確実にするため、さらに37℃、48時間、SDA にて継代培養した。滅菌蒸留水に無菌的に回収された菌液は10倍段階希釈された後、白血球用計算板による菌数計測が行われ、さらにSDAにて確認培養された。最終的に90%以上の分生子を含む 3.0×10^7 CFU/ml の濃度の菌液が作成された。

b. 動物

全ての実験に、8週齢(28 ± 4g)の雄性ICRマウスを使用した。マウスは実験用ドライフードと、細菌感染を防止するためにVancomycin 50μg/ml と、Gentamicin 10μg/ml を含む飲料水が与えられ、1ケージに5匹ずつ飼育された。

c. 免疫抑制

実験に用いた全てのマウスに対して、cyclophosphamide (CPM) 200mg/kg/day を day -3, -2 に、prednisolone (PSL) 30mg/kg/day を day -1 に、マウスの腹腔内に注射した。5匹のマウスの尾静脈より連日採血し、免疫抑制剤投与による好中球減少を追跡した。

d. 菌接種

1×10^6 , 3×10^6 , 6×10^6 , 1×10^7 CFU/animal の各菌量を、day 0 にマウス尾静脈より注射し(各群 n=10)、80%以上の生存率が確保された菌量を、Inoculum size として決定した。同じ実験系における真菌のクリアランスは、血液培養、nested PCR 法、GXM 抗原検出法によって追跡した(day 0, 7, 14, 17, 21, 28, 35 : 各日 n=3)。

e. 再免疫抑制

トリコスポロン感染マウスは4群(R0, R1, R2, R3 : 各群 n=10)に分けられ、R1群は菌液注射後の1週間目(day 7, 8, 9)に、R2群は2週間目(day 14, 15, 16)に、R3群は3週間目(day 21, 22, 23)に、それぞれ初回免疫抑制と同様に再免疫抑制された。R0群はコントロールのため、再免疫抑制の処置は行われなかった。生存率に対する再免疫抑制の影響は、再免疫抑制後2週間の生存率の追跡によってなされた(各群 n=10)。また、真菌クリアランスは、再免疫抑制後1週間の血液培養、PCR法、GXM抗

原によって追跡された(R1:day7, 10, 12, 14. 各日 n=3)、(R2:day14, 17, 19, 21. 各日 n=3)、(R3:day21, 24, 26, 27. 各日 n=3)。

f. 血液培養

エーテル麻酔下にマウスより心採血し、0.1mlをSDAに直接塗布し培養した。残りを2500×g, 10分、室温にて遠心分離し、得られた血清を nested PCR 法および GXM 抗原検出法によって検査した。

g. Nested PCR assay

永井らの報告¹⁴⁾より、プライマーは *T.asahii* の 26s-ribosomal RNA をコードする遺伝子配列から、nested PCR が可能な 2 組を設定し用いた。single PCR step では、TB26-1 (5'AAAGATGAAAAGCA TTTGG3') と TB26-2 (5'AAGCATTATGTCAA CATCC3') を用いて DNA 増幅を行った。nested PCR step では、TB26-9 (5'AGCACTTTGGAAAGAGAG3') と TB26-10 (5'CCTAAGCTCGAACGTGCC3') を用いて DNA 増幅を行った。これによって、*T.asahii* と *T.mucooides* の 2 菌種を検出することが可能となり、*Cryptococcus neoformans* および他の basidiomycetous fungi、一般細菌においては陰性で、その特異性が確認された。

h. GXM assay

GXM 抗原はラテックス凝集反応による検出キットであるセロダイレクト栄研クリプトコックス(栄研化学株式会社、東京、日本)を用いて検出した。検出の手順は、添付文書に従って行った。

i. 統計処理

マウス(n=5)の好中球数は平均値と標準偏差で求められた。再免疫抑制後2週間のマウスの生存率については、カプランマイヤー法での検定を行い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差とした。

結 果

1. 臨床検討

播種性トリコスボロン症13例は、いずれも血液悪性疾患の基礎疾患があり、死亡時の病理解剖あるいはネクロプシーによって病理学的な確定診断が得られた(Table. 1)。

播種性トリコスボロン症13例のうち、死亡前7～10日と死亡前3日までに、2000/ml以下の白血球減少を認めたのは11例(持続的8例・間欠的3例)であった。これら11例の白血球減少時には、全例500/ml以下の重度の好中球減少が認められた。残りの2例については白血球減少は認められなかったが、持続的なリンパ球減少が認められた(Table. 2)。

2. 動物実験

初回免疫抑制によりマウスの好中球数は、day0からday4までの間は、500/μl以下に減少したが、day5からday7までに元のレベルに回復した(Fig.1)。*T.asahii* 感染後のマウスの生存率は、Inoculum size に依存しており、80%の生存率であった 3×10^6

Table 1 播種性トリコスボロン症における臨床的特徴

症例	年 / 性	基礎疾患	感染臓器(解剖/Necropsy)	転帰
1	73 / M	ALL	肺 (Necropsy)	死亡
2	55 / F	MDS	肝 (Necropsy)	死亡
3	60 / M	AML	肺, 心, 肝, 脾, 腎, 副腎, 甲状腺	死亡
4	67 / F	MM	肺, 肝, 食道, 腎, 小腸, 皮膚	死亡
5	47 / F	AML	肺, 心, 肝, 脾, 腎, 胆管, 尿管, 小腸	死亡
6	54 / M	ALL	肺, 肝, 脾, 腎, 副腎, 甲状腺, 骨髄, 睾丸	死亡
7	59 / M	AML	肺 (Necropsy)	死亡
8	53 / F	CML	肺, 腎, 甲状腺, 大腸	死亡
9	59 / M	ML	肺, 心, 肝, 脾, 腎, 甲状腺, 食道	死亡
10	55 / M	AML	腎, 食道, 甲状腺	死亡
11	73 / M	AML	腎, 甲状腺, 食道	死亡
12	62 / M	MM	肺, 腎	死亡
13	71 / M	CLL	肺 (Necropsy)	死亡

* AML/CML : acute/chronic myelogenous leukemia
ALL/CLL : acute/chronic lymphoblastic leukemia
ML : malignant lymphoma MM : multiple myeloma

CFU/animalを実験に適用した (Fig. 2)。 *T.asahii* 感染後のマウスの真菌クリアランスは、血液培養においては day14 までに、nested PCR 法においては day21 までにそれぞれ検出限界以下になったが、GXM抗原検出法においては day35 においても検出可能であった (Fig. 3)。

再免疫抑制後2週間の生存率の追跡においては、R1群0%、R2群50%、R3群80%、R0群80%であった。R1群とR0群の間では有意差 ($p<0.05$) が認めら

れた (Fig. 4)。再免疫抑制後1週間に血液培養、PCR法、GXM抗原によって追跡されたマウスの真菌クリアランスは、コントロールに比較して、R1群とR2群において遅延していた (Fig. 5)。特にR2群マウスの真菌クリアランスは、再免疫抑制直前に (培養-; PCR+; GXM+) であったが、再免疫抑制後に一過性に (培養+; PCR+; GXM+) となり、陰性化していた血液培養結果が再免疫抑制によって陽性化した。

Table 2 播種性トリコスポロン症における血液学的特徴

症例	白血球	好中球	リンパ球	白血球	好中球	リンパ球 (/ml)
1	220	107	103	150	88	54
2	370	59	303	160	35	108
3	730	73	547	300	(-)	(-)
4	300	75	207	100	22	77
5	500	(-)	(-)	300	(-)	(-)
6	300	(-)	(-)	300	(-)	(-)
7	1610	144	1416	200	(-)	(-)
8	1910	1126	477	670	26	469
9	8670	8323	86	100	(-)	(-)
10	2269	521	340	1530	413	810
11	1870	392	317	13900	1529	973
12	3100	2759	155	2900	2726	174
13	4760	3236	856	3760	2368	977

(7~10 days before death)

(3 days before death)

*アンダーライン : 白血球<2000/ml、好中球・リンパ球<1000/ml

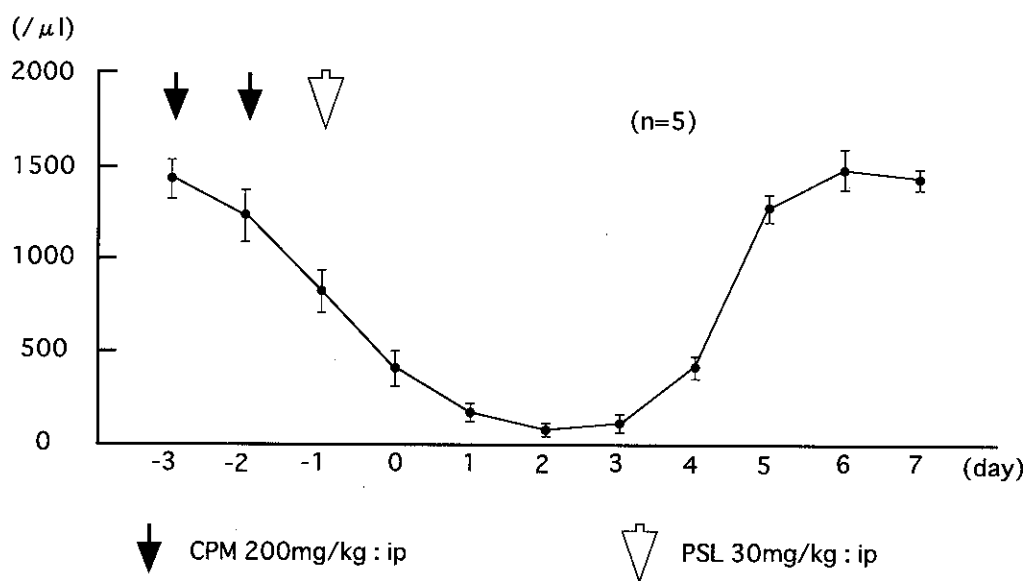


Fig.1 Neutrophile in five immunosuppressed mice was counted everyday. Number of neutrophile was described as mean \pm SD.

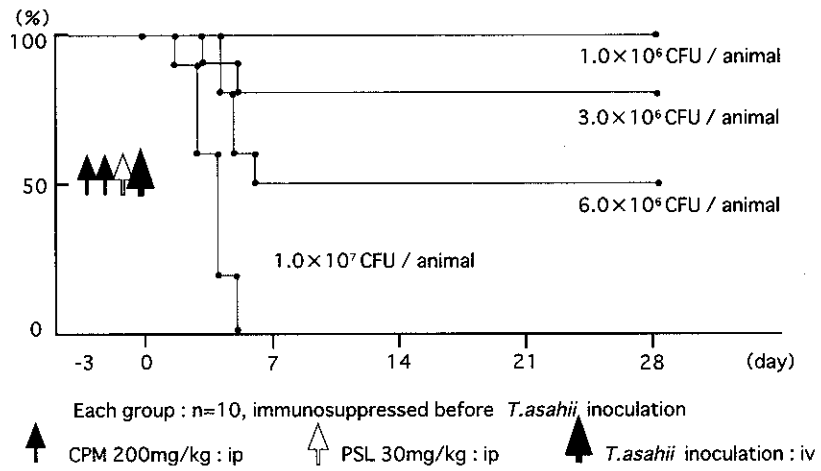


Fig. 2 Ten mice in each group were inoculated after immunosuppression. Mice in each group were observed for 28 days after inoculation.

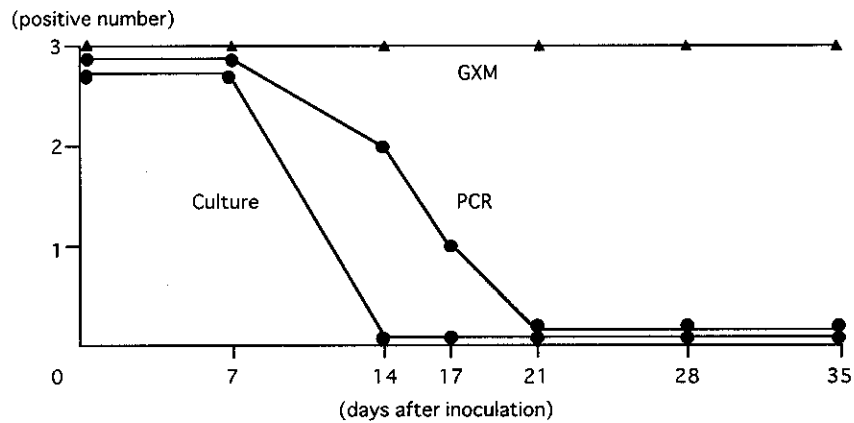


Fig. 3 Three mice were sacrificed on each day after inoculation. *T. asahii* in inoculated mice (3×10^6 CFU/animal) was monitored by blood culture, nested PCR, and GXM antigen.

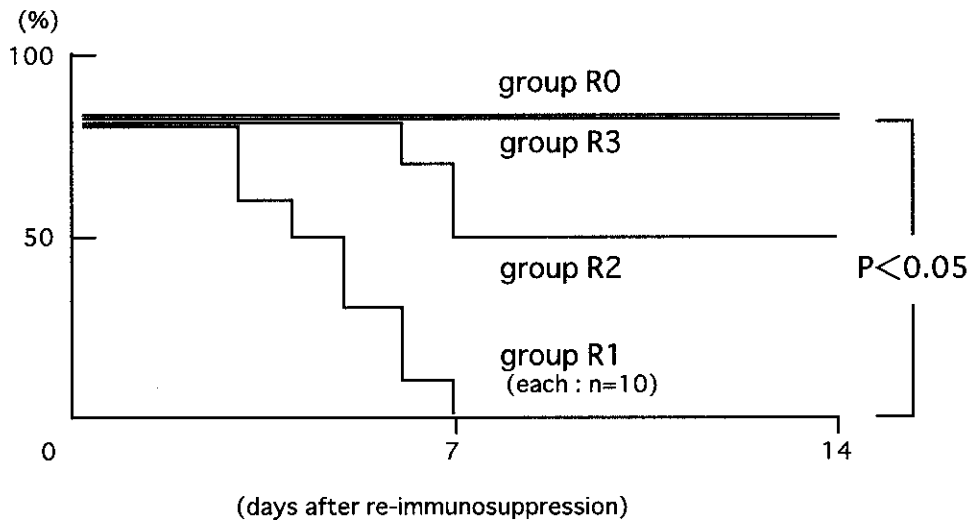


Fig. 4 Mice were observed for two weeks after re-immunosuppression. Survival of inoculated mice was decreased by re-immunosuppression.

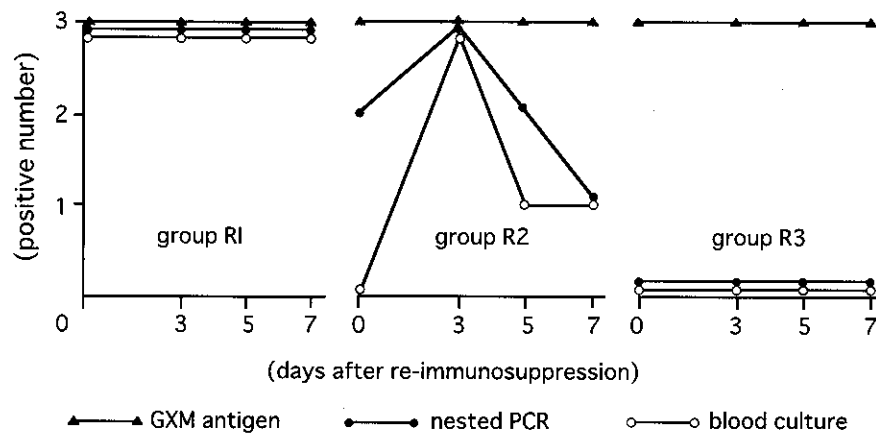


Fig. 5 The results of blood culture, nested PCR, and GXM antigen in re-immunosuppressed mice were compared with each other. They were all positive persistently in group R1 mice. Positive number of them was increased in group R2 mice, but the results in group R3 mice were not changed.

考 察

播種性トリコスポロン症の多くは血液悪性腫瘍患者や癌患者の化学療法後の骨髄抑制期に発症が認められており、好中球の減少を中心とした宿主免疫の低下が本症を致死的な日和見感染症に進展させるのは明らかである^{1,2,3,4,5,6}。現在までに報告されている播種性トリコスポロン症の動物実験モデルも好中球減少を伴う重度の免疫低下宿主に大量の真菌を感染させたものが多く、これらのモデルにおける死亡率は、感染前の免疫抑制剤の投与量や感染菌量によって規定されているように思われる^{18,19,20}。しかしながら、実際の臨床において、患者の体内に侵入する真菌は動物実験で用いる接種菌量よりもはるかに少ないことは明らかである。さらに、治療のために患者に投与される免疫抑制剤や抗癌剤は単回投与ではなく、間欠的に複数回投与されることが多い。このことから我々は、初回治療による免疫抑制の期間に体内に侵入し、生体防御によるクリアランスを免れて生存した真菌が、追加治療による持続的あるいは間欠的な好中球減少によって播種性トリコスポロン症を発症させるメカニズムを想定した。この考えは、自験例13例においても、抗癌化学療法による8例の持続的好中球減少と3例の間欠的好中球減少を認めたことから支持される。

この発症メカニズムにおいては、生体内に真菌

が存在しているが致死的な感染症には至っていない、潜在的真菌血症とも言うべき状態が想定される。我々は、報告されているマウスのトリコスポロン感染モデルにおいて、宿主免疫の回復に伴い真菌がクリアランスされる場合、血液や臓器によってクリアランスに要する時間に差があることに注目した^{19,20}。この除菌過程においては、生体内に少量の真菌が残存するが、これらはその後のマウスの生存率に影響を与えない。そこで、この期間にマウスに再免疫抑制することで、トリコスポロン感染症が致死的な感染症に進展することを想定した。

今回の実験では、真菌感染症は成立するが致死的な感染症には進展しない状況が必要としたため、80%の生存率であった 3×10^6 CFU/animal を実験に適用した。その後、再免疫抑制による生存率の低下が、R1群とR2群において認められたため、我々の想定する発症メカニズムが実験的にも証明されたものと考えられた。さらに、血液を検体とした血液培養、nested PCR法、GXM抗原検出法によるモニタリングについては、コントロールにおいて陰性化する時期が、血液培養<感染7日、PCR法<感染21日、GXM抗原 \geq 感染35日という結果であった。このため、R1群、R2群、R3群はそれぞれ(培養+;PCR+;GXM+)、(培養-;PCR+;GXM+)、(培養-;PCR-;GXM+)という時期に再免疫抑制負荷が与えられたことになる。R1群

とR2群における、生存率の低下および真菌クリアランスの遅延は、トリコスポロンの持続感染と致死感染に進展する危険性を示唆する結果として重要であると考えられた。また、モニタリングとしての感受性は、nested PCR 法と GXM 抗原検出法が血液培養よりも優れていた。一方、R3群においては、再免疫抑制負荷にもかかわらず、生存率の低下および真菌クリアランスの遅延が認められなかった。このことより、モニタリングとしての特異性は、血液培養と nested PCR 法が GXM 抗原検出法よりも優れていると考えられた。以上の結果より、マウス播種性トリコスポロン症において致死感染に進展する要因として、感染後に菌体成分が血中に存在する時期の再免疫抑制負荷が重要な因子であると考えられた。また、動物実験モデルにおいて本症の進展をモニタリングする方法としては、従来の血液培養や GXM 抗原検出法に比較して、血清 nested PCR 法が感受性および特異性の点で優れており、臨床応用の可能性が示唆された。

結 論

播種性トリコスポロン症の発症時における好中球減少症およびリンパ球減少症の割合を、臨床症例 13 例において検討した。13 例中 11 例に白血球減少と重度の好中球減少が認められた。一方、他の 2 例においては好中球数は 2000/ml 以上であったが、リンパ球数の減少が認められた。これより好中球減少が本症発症因子として重要であることが確認され、リンパ球減少に起因する症例も少数ながら存在することが示唆された。

血清 nested PCR 法を利用して、播種性トリコスポロン症のモニタリングとしての有用性について従来の血液培養・GXM 抗原検出法と比較検討する実験を行った。トリコスポロン感染マウスにおける真菌の検出限界は、GXM 抗原検出法が最も良く、ついで血清 nested PCR 法、血液培養法であった。しかし、真菌感染が再免疫抑制によって持続し増悪する場合のモニタリングとしては、血清 nested PCR 法の有用性が高いことが示唆された。

参考文献

- 1) Gueho, E., M. T. Smith, G. S. de Hoog, G. Billon-Grand, R. Christen, and W. H. Batenburg-van der Vegte. "Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*" *Antonie van Leeuwenhoek*. 1992. 61:289-316.
- 2) Itoh, T., H. Hosokawa, U. Kohdera, N. Toyazaki, and Y. Asada. "Disseminated infection with *Trichosporon asahii*" *Mycoses*. 1996. 39:195-199.
- 3) Walsh, T. J., K. R. Newman, M. Moody, R. C. Wharton, and J. C. Wade. "Trichosporonosis in patients with neoplastic disease" *Medicine*. 1986. 65:268-279.
- 4) Bohme, A., G. Just-Nubling, L. Bergmann, P. M. Shah, W. Stille, and D. Hoelzer. "Itraconazole for prophylaxis of systemic mycoses in neutropenic patients with haematological malignancies" *J. Antimicrob. Chemother.* 1996. 38: 953-961.
- 5) Krcmery, V. Jr., F. Mateicka, A. Kunova, S. Spanik, J. Gyarfazs, Z. Sycova, and J. Trupl. "Hematogenous trichosporonosis in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazole" *Supp. Care Cancer*. 1999. 7:39-43.
- 6) Tashiro, T., H. Nagai, H. Nagaoka, Y. Goto, P. Kamberi, and M. Nasu. "*Trichosporon beigeli*i pneumonia in patients with hematologic malignancies" *Chest*. 1995. 108:190-195.
- 7) Parsonnet, J. "*Trichosporon beigeli*i peritonitis" *Southern Medical Journal*. 1989. 82(2):1062-3.
- 8) Leaf, H. L., and M. S. Simberkoff. "Invasive trichosporonosis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome" *Journal of Infectious Disease*. 1989. 160(2):356-7.
- 9) Barchiesi, F., V. Morbiducci, F. Ancarani, D. Arzeni, and G. Scalise. "*Trichosporon beigeli*i fungemia in an AIDS patient" *AIDS*. 1993. 7(1):139-40.
- 10) Don, P. C., N. N. Shen, E. K. Koestenblatt, M. F. Sierra, R. K. Stone, and M. Bamji. "Mucocutaneous fungal colonization in HIV-infected children" *Acta Dermato-Venereologica*. 1995. 74(4):310-11.
- 11) Lascaux, A. S., F. Bouscarat, V. Descamps, E. Casalino, C. Picard-Dahn, B. Crickx, and S. Belaich. "Cutaneous manifestations during disseminated trichosporonosis in AIDS patient" *Annales de Dermatologie et de Venereologie*. 1998. 125(2):111-3.
- 12) Nasu, K., S. Akizuki, K. Yoshiyama, H. Kikuchi, Y. Higuchi, and S. Yamamoto. "Disseminated *Trichosporon* infection. A case report and

- Immunohistochemical study" Arch. Pathol. Lab. Med. 1994. 118:191-194.
- 13) Lyman, C. A., S. J. Devi, J. Nathanson, C. E. Frasch, P. A. Pizzo, and T. J. Walsh. "Detection and quantitation of the glucuronoxylomannan-like polysaccharide antigen from clinical and nonclinical isolates of *Trichosporon beigeli* and implications for pathogenicity" J. Clin. Microbiol. 1995. 33:126-130.
 - 14) Nagai, H., Y. Yamakami, A. Hashimoto, I. Tokimatsu, and M. Nasu. "PCR detection of DNA specific for *Trichosporon* species in serum of patients with disseminated trichosporonosis" J. Clin. Microbiol. 1999. 37:694-699.
 - 15) van Deventer, A. J., W. H. Goessens, A. van Belkum, E. W. van Etten, H. J. van Vliet, and H. A. Verbrugh. "PCR monitoring of response to liposomal amphotericin B treatment of systemic candidiasis in neutropenic mice" J. Clin. Microbiol. 1996. 34:25-28.
 - 16) Hashimoto, A., Y. Yamakami, P. Kamberi, E. Yamagata, R. Karashima, H. Nagaoka, and M. Nasu. "Comparison of PCR, (1→3)-beta-D-glucan and galactomannan assays in sera of rats with experimental invasive aspergillosis" J. Clin. Lab. Analys. 1998. 12:257-62.
 - 17) Yamakami, Y., A. Hashimoto, E. Yamagata, P. Kamberi, R. Karashima, H. Nagai, and M. Nasu. "Evaluation of PCR for detection of DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis" J. Clin. Microbiol. 1998. 36:3619-23.
 - 18) Anaissie, E. J., R. Hachem, N. C. Karyotakis, A. Gokaslan, M. C. Dignani, L. C. Stephens, and C. K. Tin-U. "Comparative efficacies of amphotericin B, triazoles, and combination of both as experimental therapy for murine trichosporonosis" Antimicrob. Agents Chemother. 1994. 38:2541-2544.
 - 19) Gokaslan, A., and E. Anaissie. "A novel murine model of disseminated trichosporonosis" Infection & Immunity. 1992. 60(8):3339-44.
 - 20) Yamamoto, K., K. Makimura, T. Sudo, K. Shibuya, K. Uchida, and H. Yamaguchi. "Experimental disseminated trichosporonosis in mice : tissue distribution and therapy with antifungal agents" J. Med. Vet. Mycol. 1997. 35:411-418.



HIV患者におけるreal-time PCR法を用いた血中ヒトサイトメガロウイルスDNA定量の有用性

吉田 敦¹⁾、人見 重美¹⁾、森澤 雄司¹⁾、岡 慎一²⁾、木村 哲^{1,2)}

¹⁾東京大学医学部附属病院 感染制御部

²⁾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

HIV患者の血中におけるヒトサイトメガロウイルス(HCMV)のDNA量をreal-time PCR法を用いて測定した。その結果、測定された全血中のDNA量が 1×10^4 コピー/mL以上において、網膜炎を初めとするHCMV感染症を発症することが明らかになり、この方法による全血中HCMV DNA量がHCMV感染症の診断に役立つことが示された。さらにDNA量はHCMV感染症に対する抗ウイルス剤の治療効果を判定する上でも有用であった。real-time PCR法を用いたDNA定量は従来の定量的PCR法に比べ、簡便性や迅速性、再現性に優れており、この点においてもreal-time PCR法を用いたHCMVのDNA定量は有用な方法と考えられた。

分担研究者：木村 哲、岡 慎一

研究協力者：吉田 敦、人見重美、森澤雄司

Diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus disease with real-time PCR assay in HIV-infected patients

Atsushi Yoshida¹⁾, Shigemi Hitomi¹⁾, Yuji Morisawa¹⁾, Shinichi Oka²⁾ and Satoshi Kimura^{1,2)}

¹⁾ Department of Infection Control and Prevention, University of Tokyo Hospital, ²⁾ AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan