

以上のような背景から、今回我々はヒトの結核感染防御におけるOPNの役割を明らかにするために、活動性結核患者の血漿中OPN値を、ELISA法を用いて測定し、種々の臨床病態との関連性について検討をおこなった。

## 研究方法

### 1. 対象患者

琉球大学医学部第一内科および国立沖縄病院にて、塗沫陽性あるいは培養陽性であり、ヒト型結核菌感染がPCR法にて証明された活動性結核患者を対象とした。インフォームドコンセントが得られた抗結核薬初回治療患者より治療前に採血を行った。また、HIV、HBVやHCVなどの明らかな感染症の既往がなく、糖尿病、腎不全、肝不全など免疫低下状態にある患者やステロイドなどの免疫抑制剤を使用している患者は対象外とした。OPNはトロンピンによって切断される部位を持つため、この経路を活性化してしまう血清ではなく血漿を検体とした。またOPNはヘパリン結合部位を有するためヘパリンを用いずにEDTA加採血を行った後、血漿を分離した。血漿はOPN濃度の測定までマイナス80℃で保存した。

更に、病態をより深く解析するために、結核患者を胸部レントゲン写真における肺病変の広がりをもとに分類するNTA分類を用いて分類し<sup>12)</sup>、そ

れぞれの群間でのOPN値を比較した。また、治療が奏効した患者のうち協力の得られた患者から6ヶ月後に再び採血を行い、治療前のOPN濃度と治療6ヶ月後のOPN濃度との比較を行った。

### 2. 血漿中OPN濃度の測定

血漿中OPN濃度の測定はELISAキット(免疫生物研究所より供与)を用いて測定した<sup>13)</sup>。本キットは全長型のOPNのみを測定する。

### 3. 統計処理

統計学的解析はStatview II softwareを用いて行った。治療前と治療6ヶ月の血漿中OPN濃度の統計学的解析にはWilcoxonの符号付順位検定を用いその他についてはBonferroni-Dunn法を用いて行った。いずれの場合も $p < 0.05$ を有意とした。

## 研究結果

### 1. 結核患者と健常人間での血漿中OPN濃度の比較

結核患者群と健常人群の間に年齢構成、男女比に関し有意な差は認められなかった。また、結核患者群、健常人群の両群において、血漿OPN濃度と年齢の間に有意な相関関係はなかった。図2に示すように、結核患者群の血漿OPN濃度は健常人群のそれに比べ有意に高かった( $p < 0.05$ )。

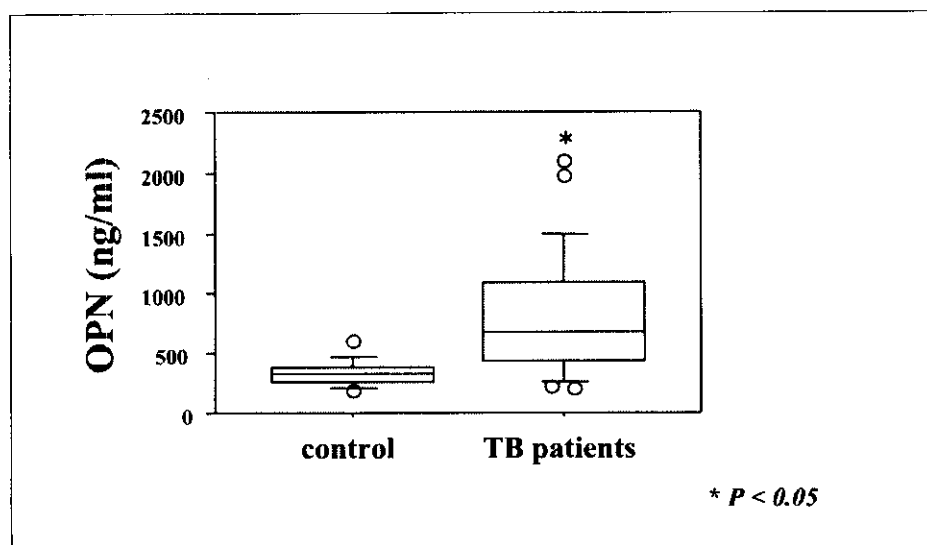


図2 結核患者群と健常人群との血漿中OPN濃度の比較。\*  $p < 0.05$

## 2. 塗沫陽性患者と陰性患者間での血漿中OPN濃度の比較

次に結核患者を塗沫陰性と陽性の2群にわけて、血漿中OPN濃度を比較すると、塗沫陽性患者の方が陰性患者に比べ血漿中OPN濃度が有意に高かった ( $p<0.05$ )。

## 3. 肺病変の広がりとは血漿中OPN濃度の関係

結核患者を表1のようなNTA分類に準じ、肺病変の広がりに応じて minimal, moderately advanced (MA), far advanced (FA) の3群に分け、それぞれの群と健常人との間で血漿中OPN濃度を比較した

(図3)。健常人と minimal 群の間には有意な差は認められなかった。MA群、FA群はいずれも健常人と minimal 群に比べ血漿中OPN濃度が有意に高かった ( $p<0.05$ )。MA群とFA群の間には有意な差は認められなかった。

## 4. 治療による血漿中OPN濃度の変化

最後に、治療前と治療6ヶ月後の血漿中OPN濃度の比較を行った。図4に示すように、治療6ヶ月後の群は治療前に比べ血漿中OPN濃度が有意に低下していた ( $p<0.05$ )。

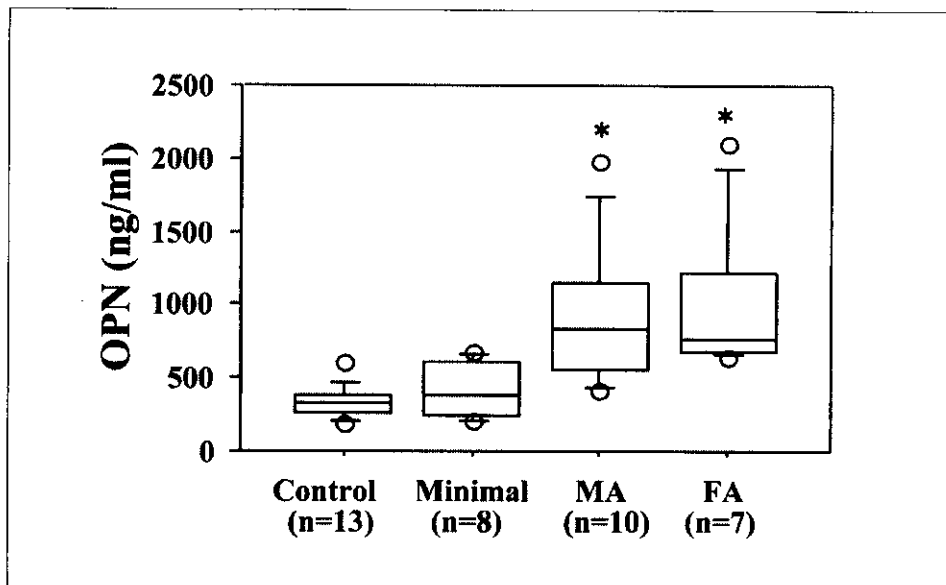


図3 結核患者における肺病変の広がりによる血漿中OPN濃度の比較。\*  $p<0.05$ , 健常人および minimal 群と比較した際

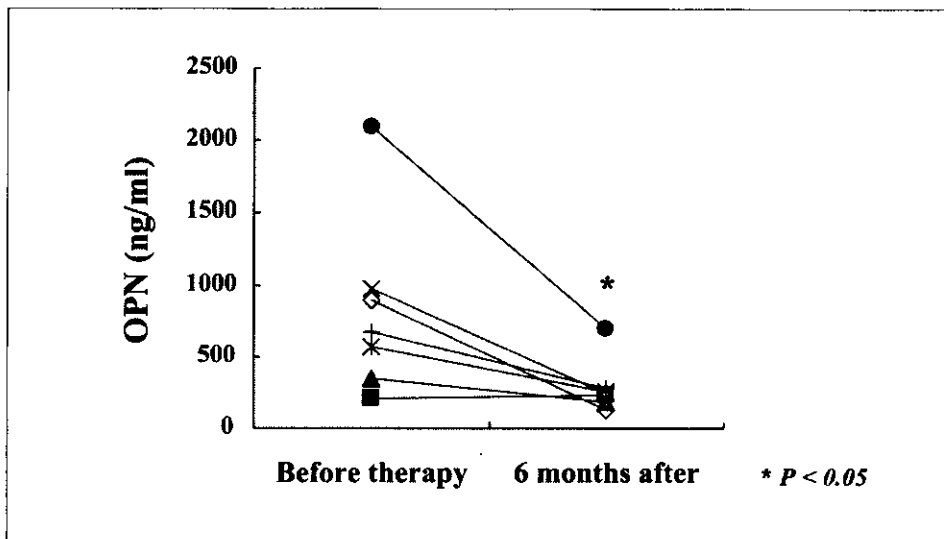


図4 結核患者における治療前後の血漿中OPN濃度の比較

## 考察と結論

今回の解析により結核患者では健常人に比べ血漿中OPN濃度が有意に高く、排菌を認める患者群や肺病変が広い患者群で血漿中OPN濃度がより高い結果が得られた。

現在のところ、血漿中OPN濃度が上昇する疾患疾患として報告されているのは、乳癌<sup>14)</sup>と透析患者<sup>15)</sup>のみである。今回の我々の報告から、結核感染症の診断に血漿中OPN濃度の測定が有用であることが明らかになったが、更に細菌性肺炎、陈旧性結核、肺癌、HIVに合併する他の呼吸器感染症との鑑別にも有用であるかを検討する必要がある。Carlsonらは、種々の肉芽腫性疾患でOPNの発現が病理組織学的に増加するが、好中球主体の病変ではOPNの発現が認められないとの報告を行っている<sup>5)</sup>。従って、細菌性肺炎の患者では血漿中OPN濃度が上昇しない可能性が高いと推測されるが、更なる解析が必要である。

今回の解析で肺病変が大きいほど血漿中OPN濃度が上昇しており、治療によってその濃度が低下するという結果が得られた。このことは結核の病態にOPNが深く関与することを示唆するものであるが、OPNが炎症を惹起するのか、あるいは反応性にOPNが産生されているのかという点に関しては不明である。この点についてはOPN遺伝子欠損マウスや抗OPN抗体を用いた動物実験によってその詳細を明らかにする必要があると考えられる。

今後は、エイズ患者に合併した結核症例についても同様に血漿中OPN濃度の検討を行い、エイズにおける結核の病態を明らかにし、新しい結核の診断マーカーとしてのOPNの可能性を探っていく必要があると考えられる。また、エイズ患者に合併した結核症例の病理組織を用いた免疫組織学的にOPNの発現について解析をおこなうことで、病態の把握を行い、結核に対する免疫補充療法のターゲットとしての可能性の両面についても解析を行っていく必要があると考えられる。

## 参考文献

- 1) World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO report 2001. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2001. WHO/CDS/TB/2001.287.
- 2) Agrawal S, N.S.Thomas, A.B.Dhanikula., et al.: 2001. Antituberculosis drugs and new drug development. *Curr Opin Pulm Med.* 7:142-147.
- 3) Rittling, S. and D. T. Denhardt. 1999. Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. *Exp. Nephrol.* 7:103-113.
- 4) Uede, T., Y. Katagiri, J. Iizuka., et al.: 1997. Osteopontin, a coordinator of host defense system: a cytokine or an extracellular adhesive protein? *Microbiol. Immunol.* 41:641-648.
- 5) Carlson, L., K. Tognazzi, E. J. Manseau., et al.: 1997. Osteopontin is strongly expressed by histiocytes in granulomas of diverse etiology. *Lab. Invest.* 77:103-108.
- 6) Nau, G. J., P. Guilfoile, G. L. Chupp., et al.: 1997. A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:6414-6419.
- 7) Nau, G. J., G. L. Chupp, J.F. Emile., et al.: 2000. Osteopontin expression correlates with clinical outcome in patients with mycobacterial infection. *Am. J. Pathol.* 157:37-42.
- 8) O'Regan, A. W., G. L. Chupp, J. A. Lowry., et al.: 1999. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J. Immunol.* 162:1024-1031.
- 9) Nau, G. J., L. Liaw, G. L. Chupp., et al.: 1999. Attenuated host resistance against *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice lacking osteopontin. *Infect. Immun.* 67:4223-4230.
- 10) Koguchi, Y., K. Kawakami, S. Kon., et al.: 2002. *Penicillium mameffei* causes osteopontin-mediated production of interleukin-12 by peripheral blood mononuclear cells. *Infect* 70:1042-1048.
- 11) Ashkar, S., G. F. Weber, V. Panoutsakopoulou., et al.: 2000. Eta-1 (osteopontin): An early component of type-I (cell-mediated) immunity. *Science.* 287: 860-864.
- 12) National Tuberculosis and Respiratory Disease Association. 1969. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. National Tuberculosis and Respiratory Disease Association, New York

- 13) Kon, S., M. Maeda, T. Segawa.,et al.: 2000. Antibodies to different peptides in osteopontin reveal complexities in the various secreted forms. *J. Cell. Biochem.* 77:487-498.
- 14) Singhal H, D.S. Bautista, K.S.Tonkin.,et al.: 1997. Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin Cancer Res.*3:605-611.
- 15) Nitta K, T. Ishizuka, S. Horita.,et al.:2001. Soluble osteopontin and vascular calcification in hemodialysis patients. *Nephron.*89:455-458.

## 健康危険情報

なし

## 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Koguchi, Y., K. Kawakami, S. Kon., et al.: 2002. *Penicillium marnieffei* causes osteopontin-mediated production of interleukin-12 by peripheral blood mononuclear cells. *Infect. Immun* 70:1042-1048.

### 2. 学会発表参考文献

- 1) 高口善信、川上和義、今 重之、前田雅弘、成見正作、上出利光、斎藤 厚：ヒト結核感染防御におけるオステオポンチン、IP-10の役割：血漿中濃度と病態との関連性について。日本免疫学会総会・学術集会記録2001;31:138.

## 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特許出願準備中



## CMV感染症の診断・経過観察・発症予知 における血中DNA定量とmRNA定量

吉田 敦<sup>1)</sup>、森澤 雄司<sup>1)</sup>、岡 慎一<sup>2)</sup>、木村 哲<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> 東京大学医学部附属病院感染制御部

<sup>2)</sup> 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感染者111例の全血、血漿中のサイトメガロウイルス(CMV) DNA量を real-time PCR法を用いて定量した。21例でCMV感染症を認めたとしたが、全血中DNA量が $3.0 \times 10^3$  copies/mL、血漿中DNA量が $1.0 \times 10^3$  copies/mLより多い場合、CMV感染症を有効に診断できることが判明した(それぞれ感度90%、85%、特異度87%、89%)。さらに治療が奏功した場合、DNA量は臨床所見に合致して低下した。またCMV感染症のない47例の血中DNA量を前向きに追跡したところ、全血中 $1.0 \times 10^4$ かつ血漿中 $2.0 \times 10^3$  copies/mLという breakpointを超えた例において、以後に高率に発症がみられた(この際の感度は100%、特異度は89%であった)。

さらに22例から血液71検体を採取し、real-time RT-PCR法により白血球中のCMV mRNAを定量した。mRNA量はCMV感染症の診断や、臨床的経過の反映には良好な成績を取めたが、発症予知についてはDNA定量以上ではなかった。

real-time PCR法による血中のDNA定量は、CMV感染症の診断・経過追跡・発症予知に有用な手段である。mRNA定量もDNA定量ほどではないが疾患活動性を反映しており、CMVの体内動態について新たな情報を付加する指標であると考えられる。

分担研究者：木村 哲、岡 慎一

研究協力者：吉田 敦、森澤 雄司

**Diagnosis, monitoring and prediction of cytomegalovirus disease in patients with HIV infection by use of a real-time PCR assay**

Atsushi Yoshida<sup>1)</sup>, Yuji Morisawa<sup>1)</sup>, Shinichi Oka<sup>2)</sup> and Satoshi Kimura<sup>1,2)</sup>

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

研究目的

HIV感染者におけるCMV感染症の診断や、治療効果の判定に役立ち、かつ臨床応用に適する簡便な指標は現在のところ少ない<sup>1,2)</sup>。我々は近年、簡便性と迅速性に優れるreal-time PCR法を応用し、定量した血中CMV DNA量が、CMV感染症の診断、治療効果の判定に有用であることを明らかにしてきた<sup>3)</sup>。今年度はさらに症例の蓄積と解析を行い、発症の予知におけるその意義をより明らかにするよう努めた。加えてreal-time PCR法を用い、CMVの増殖をより鋭敏に反映すると予想される血中CMV mRNAの定量法を開発して、その有用性についても検討した。

方法と結果

全体が4研究からなるため、それぞれについて個別に述べる。

(研究1) CMV感染症の診断と、血中CMV DNA量との相関

(方法)

CMV-IgGが陽性であるHIV感染者111例から血液を採取した。但し、既にCMV感染症の治療中

で、良好な経過を示している者は含まれていない。CMV感染症の診断はLjungmanらによる基準<sup>4)</sup>に従った。同時に、血液採取1ヶ月以内のCD4陽性リンパ球数も記録した。CMV DNA定量法は、昨年度と同一であり、全血、血漿それぞれ400μLからDNAを抽出した後、CMVゲノムのopen reading frame US17をターゲットとして、PCR反応を行うものである。定量されたCMV DNA量と、CD4陽性リンパ球数およびCMV感染症の有無との関係を検討した。

(結果)

111例中21例でCMV感染症を認めた。内訳は、網膜炎13例、腸炎2例、網膜炎と食道炎の合併例1例、食道炎1例、肺炎1例、肺炎・膀胱炎の合併例1例、肺炎・腸炎・副腎炎の合併例1例、腸炎と脳炎の合併例1例である。111例のCD4陽性リンパ球数は0.15 - 1,030 [median: 32] 個/μLであったが、CMV感染症例では0.6 - 49 [median: 9] 個/μLで、全例50個/μL未満であった。

全血中DNA量とCD4陽性リンパ球数との相関についてみると、CD4陽性リンパ球数が少なくなると、DNA量が多くなるという分布が認められ、特にCD4陽性リンパ球数が50個/μL未満になると、CMV感染症例が多く認められていた(図1)。Receiver operating characteristic (ROC) curveの作成

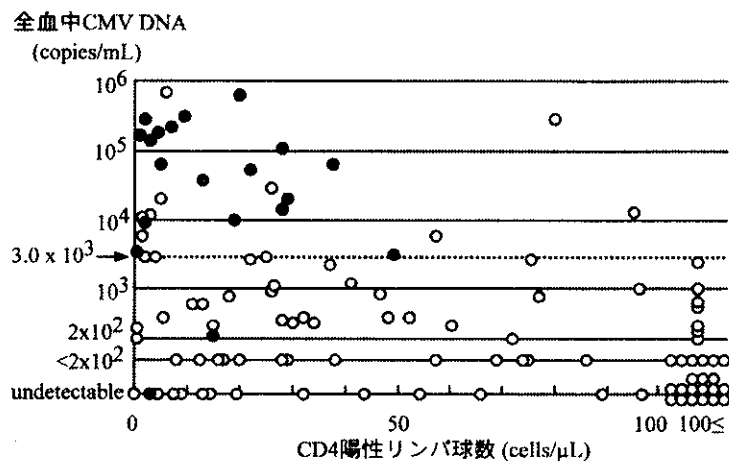


図1 全血中CMV DNA量とCD4陽性リンパ球数との関係  
 黒丸はCMV感染症診断例(n=21)を、白抜き丸はCMV感染症のない例(n=90)を示す。CD4陽性リンパ球数が少なくなると、DNA量が多くなる左上がりの分布が認められる。破線はCMV感染症診断のためのcut-off lineを示している(3.0 x 10<sup>3</sup> copies/mL)。

により、CMV感染症診断のためのcut-off lineが $3.0 \times 10^3$  コピー/mLと決定されたが、このcut-off lineの感度は90%、特異度は87%、positive predictive value (PPV)は61%、negative predictive value (NPV)は98%であった (Fisherの直接確率計算法、 $p < 0.0001$ )。

血漿中DNA量は111例中103例で測定できた。感染症例では20例で測定できた。全血中DNA量の場合と同様に、血漿中DNA量とCD4陽性リンパ球数との間には逆相関の関係が認められた (図2)。同様にROC curveの作成により、診断のためのcut-off lineは $1.0 \times 10^3$  copies/mLと決定された。このcut-off lineの感度は85%、特異度は89%、PPVは65%、NPVは96%であった ( $p < 0.0001$ )。

#### (研究II) CMV感染症の臨床経過と、血中CMV DNA量との相関

##### (方法)

研究IでのCMV感染症診断例について、引き続いて血中のDNA量を経時的に測定した。DNA定量の方法は研究Iと同一である。

##### (結果)

CMV感染症に対する治療が行われ、DNA量の追跡ができた例は14例であった。うち13例にお

いて、CMVに対する治療が奏功し、臨床症状が改善するのに伴って、全血、血漿中共にDNA量は低下し、最終的に $2 \times 10^2$  copies/mL以下になった。残りの1例はganciclovirとfoscarnetの投与中にもかかわらず網膜炎の悪化を来した例であり、DNA量は全血、血漿中共に追跡開始時からundetectableのままであって、そのままの治療続行で網膜炎の改善がみられた例である (この例では治療の中止後に、 $2 \times 10^2$  copies/mL未満の微量なDNAが検出された)。

#### (研究III) 血中CMV DNA量によるCMV感染症の発症予知

##### (方法)

CMV-IgGが陽性であるが、CMV感染症のないHIV感染者47例において、CD4陽性リンパ球数、全血・血漿中CMV DNA量を前向きに測定、追跡し、DNA量の増加と発症との相関を評価した。追跡期間は7日以上とした。CD4陽性リンパ球数の記録方法、DNA定量の方法は研究I、IIと同一である。

##### (結果)

追跡開始時のCD4陽性リンパ球数は0.2 - 195 [median: 26] 個/ $\mu$ Lであり、全血中DNA量はmedian

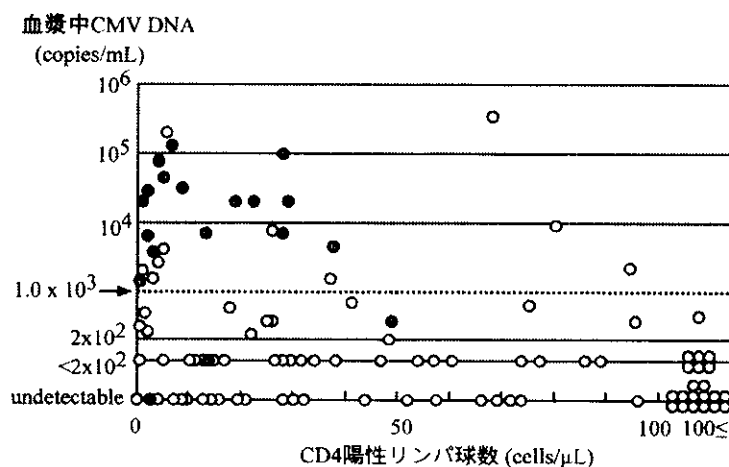


図2 血漿中CMV DNA量とCD4陽性リンパ球数との関係  
黒丸はCMV感染症診断例(n=20)を、白抜き丸はCMV感染症のない例(n=83)を示す。CD4陽性リンパ球数とDNA量とは逆相関の関係がある。破線はCMV感染症診断のためのcut-off lineを示している( $1.0 \times 10^3$  copies/mL)。

631 copies/mL、血漿中 DNA 量は median < 2 x 10<sup>2</sup> copies/mL であった。47 例を 7 - 751 [median: 53] 日追跡したところ、10 例 (21%) が 7 - 264 [median: 66] 日で CMV 感染症を発症した (網膜炎 6 例、腸炎 1 例、食道炎と網膜炎の合併例 1 例、肺炎 1 例、肺炎と腸炎と副腎炎の合併例 1 例)。発症時の CD4 リンパ球数は 0.6 - 38 [median: 12] 個 / $\mu$ L であり、全例で 50 個 / $\mu$ L 未満であった。発症時の全血中 DNA 量は 219 - 300,000 [median: 17,209] copies/mL、血漿中 DNA 量は <200 - 70,000 [median: 6,875] copies/mL であった。

一方、残りの 37 例 (79%) では発症はなかった。これら未発症例の追跡開始時の CD4 陽性リンパ球数は 0.2 - 195 [median: 30] 個 / $\mu$ L であり、追跡期間は 9 - 751 [median: 45] 日であった。追跡期間の中央値が短いのは、新規に加わる例が多かったためと、未発症の場合、早期に HAART を導入して CD4 陽性リンパ球数の増加が得られ、追跡不要となる例が多かったためである。またこれら 37 例では最終の DNA 定量の後も発症がないことを臨床的に確認している。

発症例における CMV DNA 量増加の時期と、発症時期との相関をみると、(i) DNA 量 (全血、血漿共) の増加とはほぼ一致して発症 (7 例)、(ii) DNA 量 (全血、血漿共) が増加し、ピークを過ぎて下降に転じてから発症 (3 例)、の 2 つのパターンがみられた。このため発症時までには得られた DNA 量の最

高値と、発症との相関について解析した。ロジスティック解析を行うと、CD4 陽性リンパ球数の影響を除いた場合、血中 DNA 量の増加と発症の間には独立した有意な相関関係が存在した (全血中 DNA では  $p=0.005$ 、血漿中では  $p=0.004$ )。一方、CD4 陽性リンパ球数の低下のみでは発症は直線的に増加せず、相関係数は有意水準に達しなかった ( $p=0.234$ )。

また、血中 DNA 量がどの程度まで増加すると以後の発症が増加するかについて、ROC curves を作成すると、全血中で  $1.0 \times 10^4$  copies/mL、かつ、血漿中で  $2.0 \times 10^3$  copies/mL という breakpoint が設定できた。この場合、発症例 10 例は (上記の 2 パターンのいずれであっても) 全例 breakpoint に到達してから発症に至っていた。一方で、breakpoint に達しなかった 33 例では全く発症がみられなかった。この breakpoint の感度は 100%、特異度は 89%、PPV は 71%、NPV は 100% であった (Fisher の直接確率計算法、 $p<0.0001$ ) (表 1)。

また、経過中の全血中 DNA 量と、血漿中の DNA 量の変化を比較した場合には、全血中 DNA 量が先行して増加した後に、血漿中の DNA 量が増加して、発症に至るという傾向が認められた。一方未発症例では、全血中の DNA 量が増加しても、血漿中の DNA 量が増加せず、発症に至らない例があった。

表 1 設定した breakpoint と発症との相関

DNA 量の最高値について、breakpoint を、全血中で  $1 \times 10^4$  copies/mL、かつ血漿中で  $2 \times 10^3$  copies/mL と定めると、

	CMV 感染症発症	未発症	
breakpoint に到達 (例)	10	4	14
breakpoint に到達せず (例)	0	33	33
合計 (例)	10	37	47

sensitivity	100%	positive predictive value	71%
specificity	89%	negative predictive value	100%



(研究IV) CMV 感染症と血中 CMV mRNA 量との  
 相関

血中CMV mRNAはCMVの活動性を鋭敏に反映するのではないかという推論に基づいて、現在までいくつかの study において血中の mRNA の検出が試みられた。しかしながら target とする遺伝子や用いる血液サンプルの種類がまちまちであり、かつ定性・半定量反応であったために、その意義には統一した結論がついていなかった。本研究ではまずreal-time RT-PCR法を用いてCMV mRNAの定量系を構築した。

(方法)

CMVの遺伝子はimmediate early gene、early gene、late gene の3つに大別されるが、early  $\beta 2.7$  gene 由来のmRNAは、全mRNA中に最も多量に含まれる特徴がある。このためearly  $\beta 2.7$  geneに増幅領域を設定した。さらにこの gene はCMVゲノムのHind III G fragment に属するため、CMVゲノム Hind III G fragment をサブクローニングしたプラスミドの段階希釈系列を作成して、定量の際のスタンダードとして用いた。一方で、検体の保存条件に関する基礎的検討の結果より、白血球を用いることとし、Qiagen 社の QIAmp® RNA blood Mini Kit を用いて、白血球からRNAを抽出した。early  $\beta 2.7$  gene

由来のmRNAについてreal-time RT-PCRを行い定量したが、この際ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHのmRNA量も同時に定量し、得られたCMV mRNA値を補正した。

さらに同一の血液サンプルを用いて、全血、血漿中のCMV DNA量も測定し、これらの値を比較しつつ、臨床経過との関連を検討した(DNA定量法は研究I-IIIと同一である)。CMV感染症の診断、経過追跡、発症予知の3点について検討した。

(結果)

22例から血液71検体を採取した。CMV感染症例12例中11例で診断時のmRNA量を測定でき、うち9例でmRNA量の増加を認めた。一方で、CMV感染症のない10例では1例を除いてmRNAは検出されず、両者の間には有意差を認めた(Mann-Whitney test、 $p=0.0008$ ) (図3)。またCMV感染症例のDNA量は全例で研究Iで定めたcut-off lineを超えていた。

CMV感染症例5例において、引き続きmRNA量を追跡した。うち治療によりCMV感染症の改善が得られたのは3例であったが、これら3例においてmRNA量は治療の奏功に伴って低下し、検出されなくなった。mRNA量低下の時期は、DNA量低下の時期と比べ、同じ時期であるか、またはやや早いものであった(図4、5)。

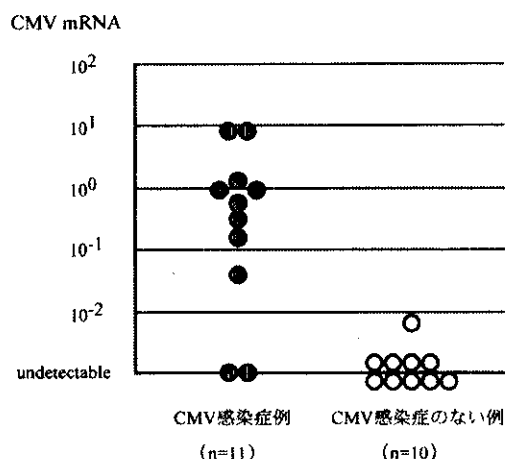


図3 各症例でのCMV mRNA量(21症例)  
 黒丸はCMV感染症例のmRNA量(診断時)を、白抜き丸はCMV感染症のない例のmRNA量を示している。また、CMV mRNA量はGAPDH mRNA量との比で示してある。CMV感染症例のmRNA量は、ない例のmRNA量に比べ、有意に高値であった( $p=0.0008$ )。

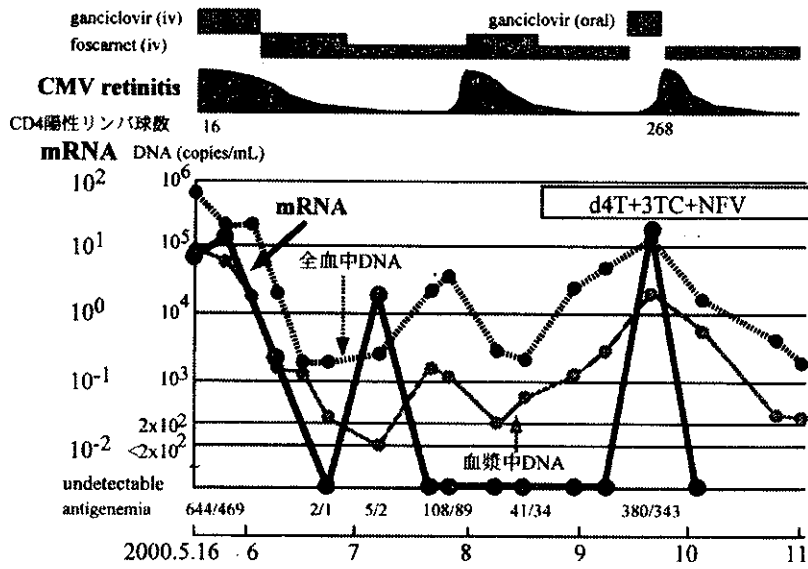


図4 36歳男性 (CMV 網膜炎) の臨床経過

実線は mRNA 量を、破線は全血中 DNA 量を、斜線は血漿中 DNA 量を示している。5月の網膜炎の治療経過においては、mRNAはDNAに比べ早期に低下し、検出されなくなった。7月には網膜炎の再燃に先立って再び検出された。

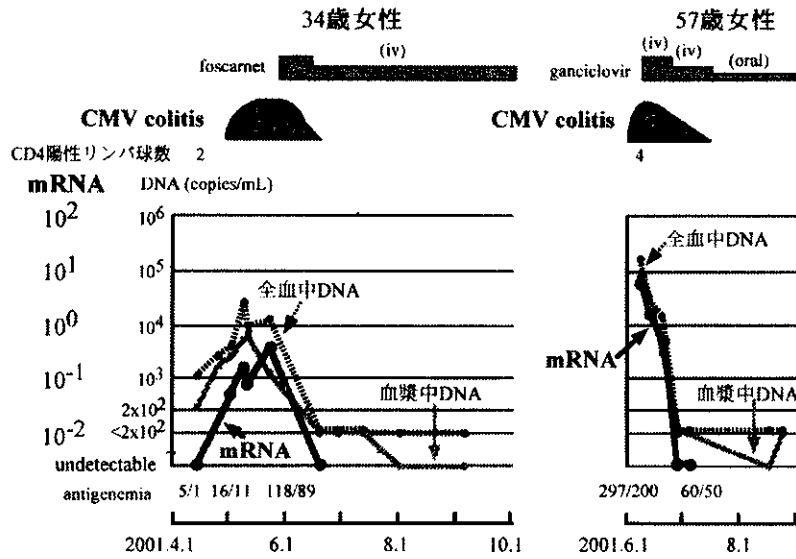


図5 34歳女性 (CMV 腸炎)、57歳女性 (CMV 腸炎) の臨床経過

実線は mRNA 量を、破線は全血中 DNA 量を、斜線は血漿中 DNA 量を示している。2例ともに治療経過に伴って mRNA 量と DNA 量とはほぼ同時期に低下し、検出されなくなった。左の例では発症前より mRNA を追跡していたが、mRNA の上昇とともに腸炎の発症をみた。

図4の例では mRNA 量は血中 DNA 量よりも早く低下して、検出されなくなった(6月23日)。しかし7月にはDNA量の再増加と網膜炎の再燃に先行して、mRNAは増加した。一方で9月の網膜炎の再燃時には、mRNAはDNA量の増加のピークと同時期に検出された。

また、CMV感染症を認めない11例を経時的に追跡したが、うち4例で発症が認められた。発症時に mRNA の上昇を検出できた例も2例あったが(例、図5左)、mRNAを検出できなかった例も2例存在した。一方で、未発症例7例ではmRNAは経過中一貫して検出されなかった。これら発症例ではまた、発症までにDNA量の増加を来していたが、DNA量の増加とmRNA量の増加の時期が一致しない例も存在した。11例についてmRNA検出自体を発症予知のポイントとした場合、その感度は50%、特異度は100%、PPVは100%、NPVは78%となった。

## 考 察

CMVは、特にCD4陽性リンパ球数が極度に低下したHIV感染者において、重篤な感染症を発症する。従来よりCMV感染症の診断、治療効果の判定、予知に有用な指標が求められてきたが、定性的PCR法による血中CMV DNA検出は、CMV感染症の疾患活動性の反映において劣り<sup>1,2)</sup>、一方で、従来の定量的PCR法は煩雑で、実際の臨床応用という点で劣っていた<sup>5)</sup>。このため本検討では、従来の定量的PCR法に比べ簡便性、迅速性、再現性に優れるreal-time PCR法を用いて、血中のCMV DNAを定量し、その有用性を評価した。

まず研究Iでは、全血、血漿中のDNA量増加とCMV感染症との間に正の相関を認め、診断のためのcut-off lineをそれぞれ決定することができ、本法がCMV感染症の診断に有用であることが示された。さらに、CD4陽性リンパ球数の低下(免疫低下)とDNA量の増加(CMVの増加)との逆相関関係をより明瞭にできた。これから本法を用いれば、以前よりもCMVの活性化と発症との間をより精密に区別できるようになるのではないかと考えた。

続いて研究IIでは、治療の奏功・臨床的改善とDNA量の減少とが相関関係にあることが示された。CMV感染症が改善したのちに、全血中DNA量が検出されなくなる傾向も認められ、全血中DNA量が検出されなくなれば急性期の治療が成功したとみなせるのではないかと推論した。

研究IIIでは発症予知における本法の有用性を検討し、DNA量のbreakpointを具体的に設定しえた(表1)。DNA量がbreakpointに達すると、以後の発症のリスクが大きくなることは、DNA量が発症のリスクの判定、発症の予知に有効であることを意味していた。さらにDNA量増加の時期と、発症時期の相関から、DNA量が一旦breakpoint以上に増加してしまえば、後にDNA量が減少に転じて発症はおこりうるということが明らかになった。この事実はShinkaiらの報告例<sup>6)</sup>と合致するが、DNA量の最高値ばかりでなく、DNA量が増加している時間が長いこと、すなわちCMVにさらされている時間が長いことも発症に関与するのではないかと考えた。

また、全血中DNA量と血漿中DNA量との経時的変化の比較から、全血中DNA量には早期に鋭敏に増加してくる特徴が、血漿中DNA量には発症のリスクとより関連した動きを示す特徴が読み取れた。さらに、全血中、血漿中DNA量がともに増加している場合(グループ1)が最も発症のリスクが高く、次いで全血中のみ増加している場合(グループ2)が発症のリスクが高いと考えられた。特にグループ2では以後の血漿中DNA量の増加を防ぐことができれば、発症のリスクを減らすことができると考えられる。グループ1、2に属する者は、HIV感染者のなかでも特にCMV発症予防が顧慮されるべき者であると予想される。

現在、CD4陽性リンパ球数の低いHIV感染者全員に、抗ウイルス薬の予防投与(primary prophylaxis)を行うことには明らかな有用性が示されていない<sup>7)</sup>。抗ウイルス薬の副作用、費用、耐性の出現といった問題から、リスクの高い症例に限った投与方法(pre-emptive therapy)が好まれるが、その際の基準はまだ定まっていない<sup>8)</sup>。本法を応用すれば上記のような発症のリスクの高いグループを明らかにでき、pre-emptive therapyの対象者が

絞り込まれる可能性がある。今後具体的に pre-emptive therapy に関する検討が必要であろうが、本法によりその検討がより容易になるであろう。

一方、研究IVではreal-time RT-PCR法を用いてCMV mRNAを定量し、その意義を検討した。mRNAは診断例で高率に検出され、CMV感染症のない例に比べ有意に高値でもあった(図3)。さらに疾患の活動性を良好に反映していた(図4、5)。DNA量の変化と比較すると、診断ではDNA量よりもやや劣っていたものの、治療開始後は急速に低下することから、治療効果の反映では同等以上といえた。これらの所見は、mRNA検出は特異度に優れるものの感度に劣るとしたGozlanらの報告<sup>9)</sup>にcompatibleでもあった。

発症予知については、mRNAが検出されずに発症した例がみられ、必ずしも十分な成績ではなかった。しかしながらPPVは高く、検出された場合にはCMV感染症の発症を強く予想させると考えられた。感度が低いことの要因として、mRNA量はCMVの活動性を鋭敏に反映するのであるが、その変化はDNA量の変化に比べておそらく短時間に生じるものであって、発症の際のmRNA量の増加を捕捉することはしばしば難しいのではないかと推論した。一方でDNA量はCMV産生の増加分というよりも、産生されたCMVの総量を反映すると予想され、CMVの総量が発症により相関するのであろうと推測した。

## 結 論

real-time PCR法により測定した全血、血漿中のCMV DNA量は、CMV感染症の診断、経過観察、発症予知に有用である。特に全血中DNA量が $1.0 \times 10^4$ copies/mL、かつ、血漿中で $2.0 \times 10^3$ copies/mLを超えて増加した例では、その後の発症のリスクが高いと推測できる。さらに全血中DNA、血漿中DNAそれぞれの変化を比較することにより、発症前のより詳細な情報を得ることができる。一方で、白血球中のmRNA量もDNA量ほどではないが疾患活動性の指標となり得、特に検出された場合にはCMV感染症の発症が予想される。

## 参考文献

1. Fischer, SH., Masur, H.:Laboratory monitoring of cytomegalovirus disease - Is polymerase chain reaction the answer? Clin Infect Dis. 24: 841-842, 1997.
2. Boeckh, M., Boivin, G.:Quantitation of cytomegalovirus: Methodologic aspects and clinical applications. Clin Microbiol Rev. 11: 533-554, 1998.
3. Yoshida, A., Hitomi, S., Fukui, T., et al.:Diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease in patients with human immunodeficiency virus infection by use of a real-time PCR assay. Clin Infect Dis. 33: 1756-61, 2001.
4. Ljungman, P., Plotkin, SA.:Workshop on CMV Disease: definitions, clinical severity scores, and new syndromes. Scand J Infect Dis. 99 (Suppl): 87-89, 1995.
5. Boivin, G., Handfield, J., Murray, G., et al.:Quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in leukocytes of human immunodeficiency virus-infected subjects with and without CMV disease by using PCR and the SHARP Signal Detection System. J Clin Microbiol. 35: 525-526, 1997.
6. Shinkai, M., Bozette, SA., Powderly, W., et al.:Utility of urine and leukocyte cultures and plasma DNA polymerase chain reaction for identification of AIDS patients at risk for developing human cytomegalovirus disease. J Infect Dis. 175: 302-308, 1997.
7. Brosgart, CL., Louis, TA., Hillman, DW., et al.:A randomised, placebo-controlled trial of the safety and efficacy of oral ganciclovir for prophylaxis of cytomegalovirus disease in HIV-infected individuals. AIDS. 12: 269-277, 1998.
8. Bowen, EF., Sabin, CA., Wilson, P., et al.:Cytomegalovirus (CMV) viraemia detected by polymerase chain reaction identifies a group of HIV-positive patients at high risk of CMV disease. AIDS. 11: 889-893, 1997.
9. Gozlan, J., Salord, JM., Chouaid, C., et al.:Human cytomegalovirus late-mRNA detection in peripheral blood of AIDS patients: diagnostic value for HCMV disease compared with those of viral culture and HCMV DNA detection. J Clin Microbiol 1993; 31: 1943-1945.

## 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshida, A., Hitomi, S., Fukui, T., et al.:Diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease in patients with human immunodeficiency virus infection by use of a real-time PCR assay., Clin Infect Dis. 33: 1756-61, 2001.

### 2. 学会発表

- 1) 吉田 敦、遠藤博久、森澤雄司、人見重美、岡 慎一、木村 哲：HIV感染者の血中CMV DNA量によるCMV感染症発症予知. 第75回日本感染症学会総会、2001、奈良.
- 2) 吉田 敦、遠藤博久、森澤雄司、人見重美、岡 慎一、木村 哲：CMV感染症におけるreal-time RT-PCR法による血中CMV mRNA定量の意義. 第15回日本エイズ学会学術集会・総会、2001、東京.



# IL-6阻害によるHHV-8 増殖抑制 —リアルタイム PCRを用いたHHV-8の早期 増殖期遺伝子発現解析と抗IL-6R抗体による抑 制効果—

宋 健<sup>1)</sup>、杉本 正道<sup>1)</sup>、吉崎 和幸<sup>1,2)</sup>、西本 憲弘<sup>1,2)</sup>

1)大阪大学健康体育部健康医学第一部門

2)大阪大学大学院医学系研究科分子病態医学専攻生理病態学

## 研究要旨

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 (KSHV/HHV-8)は、AIDSに合併するカポジ肉腫、悪性リンパ腫あるいはキャッスルマン病の病因ウイルスと考えられている。これらのHHV-8関連疾患はAIDSの免疫不全状況下において発症することが多いことから、日和見感染症と考えられる。宿主細胞内でHHV-8は通常潜伏状態にあり、ウイルスの遺伝子発現は抑制されている。ウイルスの増殖期にはウイルスの様々なlytic geneの活性化が生じ、宿主細胞が破壊され感染が拡大する。HHV-8のORF50遺伝子は、早期増殖期 (immediate early) に発現する遺伝子である。ORF50 に続いて様々な後期 (late) 遺伝子が発現することから、ORF50は"switch gene"と呼ばれる。したがって、ORF50の発現抑制はウイルス増殖を抑制するのみならず、HHV-8感染により生じる上記の疾患の発症予防につながると思われる。昨年度我々は、リアルタイムRT-PCRを用い、後期lytic gene の1つであるORF26 mRNAがhuman interleukin-6 (huIL-6)により増加することを示し、huIL-6がHHV-8の増殖を促すことを報告した。今回、HHV-8のORF50のリアルタイムPCRによる定量解析を行い、HHV-8複製におけるhuIL-6の作用点を決定するとともにhuIL-6阻害によるウイルス複製の制御の可能性を検討した。

HHV-8が潜伏感染状態にあるBCBL-1細胞においてhuIL-6はORF50の発現を増強した。したがって、huIL-6が潜伏感染期から増殖期へのスイッチに働くことを示すと考えられる。さらに、huIL-6で誘導されたHHV-8のORF50の発現がヒト型化抗IL-6R抗体によってほぼ完全に抑制された。AIDS患者では血中huIL-6の増加があることから、huIL-6の阻害は潜伏期にあるHHV-8の活性化を抑制し、ひいてはHHV-8感染により発症するAIDS合併症を予防できる可能性がある。

一方、HIV陽性患者末梢血DNAサンプル35症例計42検体についてORF26のリアルタイムPCRを行った。3症例計7検体でORF26が検出された。1例のカポジ肉腫合併HIV陽性患者では、CD4陽性細胞の減少に伴いウイルスコピー数の増加がみられた。リアルタイムPCRを用いたHIV患者末梢血のHHV-8 ORF26のモニタリングより、カポジ肉腫やキャッスルマン病、悪性リンパ腫などHHV-8関連疾患発症の危険性ならびに増悪を予見できる可能性がある。

## 研究目的

human herpesvirus-8(HHV-8)は Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)とも呼ばれ、AIDSに合併するカポジ肉腫、ある種の悪性リンパ腫(primary effusion lymphoma (PEL)、 body cavity-based lymphoma (BCBL))あるいはキャスルマン病の病因ウイルスと考えられている。これらの疾患は免疫不全状況下において発症することから、AIDSに伴う日和見感染症と考えられる。

HHV-8は宿主細胞内で通常潜伏状態にあり、ウイルスの遺伝子発現は抑制されている。HHV-8感染症の発症にはHHV-8の再活性化が生じ、ウイルスの活発な複製により感染細胞が増加する必要がある。HHV-8の再活性化には、まず、早期増殖期(immediate early)に発現する遺伝子である ORF50の活性化が必要である。ORF50は viral replication and transcription activator (RTA)をコードする遺伝子であり、RTAはすべてのlytic geneをはじめ、様々なウイルスの後期(late)遺伝子を発現させることから、ORF50はHHV-8の"switch gene"と呼ばれる。ORF50に続いてlytic geneが活性化されると、その産物により宿主細胞が融解し感染が拡大する。一方、human interleukin-6 (huIL-6)は多彩な生物活性を有するサイトカインの1つであり、HIVやHHV-8感染を契機に、患者血中において増加していること、さらにHHV-8感染BCBL細胞の増殖を促すことが知られている。昨年度、我々はリアルタイム RT-PCRを用いて、後期lytic geneの1つである ORF26 mRNAがhuIL-6刺激により増加することを示し、huIL-6がHHV-8の増殖を促すことを報告した。しかし、huIL-6が単に複製を加速するのか、あ

るいはウイルスの再活性化に関わるのか、その作用機序については不明であった。今回、HHV-8の ORF50のリアルタイム RT-PCRによる定量解析を行い、huIL-6によるHHV-8の再活性化の可能性を検討するとともに、ヒト型化抗IL-6レセプター抗体を用いたhuIL-6阻害によるHHV-8複製の制御の可能性を検討した。

また、HHV-8はHIV感染者あるいはAIDS患者に高頻度に感染しており、カポジ肉腫発症の危険因子であるばかりでなく、HHV-8のウイルス量がカポジ肉腫の臨床ステージと相関することが知られている。そこでHIV感染患者の末梢血球細胞から抽出したDNAを用い、HHV-8感染のスクリーニングを行った。また、カポジ肉腫患者血中HHV-8のウイルス量を経時的に計測し病態との関連について検討した。

## 研究方法

### 1) HHV-8の増殖とその抑制試験

ウイルス増殖の検討にはHHV-8が潜伏感染する BCBL-1細胞株を用いた。5x10<sup>4</sup>/mlの細胞を huIL-6 (100 ng/ml)、huIL-6と可溶性IL-6レセプター(sIL-6R)(各 100 ng/ml)およびヒト型化抗 IL-6R 抗体(25 µg/ml)あるいはコントロールヒトIgG (25 µg/ml)の存在下で5日ならびに7日間培養しRNAを抽出した。Immediate early および lytic geneとしてORF50ならびにORF26に対する特異的プライマーを作製し、Taqman プローブとPE Biosystem 5700を用いて定量的RT-PCRを行った。スタンダードはPCR産物をTAクローニング法でクローニングを行ったプラスミドDNAを用いた。

分担研究者：吉崎和幸

研究協力者：西本憲弘、宋 健、杉本正道

## Inhibition of HHV-8 replication by blocking interleukine-6 signal pathway: Real-time PCR analysis of HHV-8 immediate gene expression and inhibition of HHV-8 replication by anti-interleukine-6 receptor antibody

Jian Song<sup>1)</sup>, Masamichi Sugimoto<sup>1)</sup>, Kazuyuki Yoshizaki<sup>1,2)</sup>, and Norihiro Nishimoto<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Medical Science I, School of Health and Sport Sciences, Osaka University and <sup>2)</sup>Department of Clinical Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka University

2) 患者検体

患者検体は、東大病院感染症内科 木村 哲教授より供与された HIV 陽性患者末梢血 DNA サンプル 35 症例計 42 検体について検討した。末梢血 DNA 90 ng (45  $\mu$ g/ml x 2 $\mu$ l) を用いリアルタイム PCR によって、ORF26 ならびに viral IL-6(vIL-6) 遺伝子の DNA 量を定量的に解析した。また、HHV-8 は全血より抽出した DNA 1  $\mu$ g 当たりの HHV-8 コピー数で示した。ORF26 プラスミド DNA は 1  $\mu$ g 当たり  $1.5 \times 10^{11}$  コピーの HHV-8 に相当する。リアルタイム PCR を用いた ORF26 プラスミド DNA の感度は  $10^{-8}$   $\mu$ g/ml であることからこの測定系での検出感度は 1500 コピー/ml である。使用した検体の DNA 濃度が 45  $\mu$ g/ml であることから、実際の末

梢血から抽出した DNA での感度は理論上 33 コピー/ $\mu$ gDNA である。また、末梢血全血からは細胞  $10^5$  個あたり 1  $\mu$ g の DNA が抽出可能であるので有核細胞  $10^5$  当たり HHV-8 が 33 コピーあれば検出可能である。

倫理面の配慮について：

検体は目的を説明しインフォームドコンセントを得た HIV 陽性患者より採取された。患者のプライバシーには十分に配慮し、検査を行う者は CD4 細胞数以外の患者の個人情報には知らされずにブラインドで行った。検査結果については分担研究者の吉崎が管理し主治医に報告した。

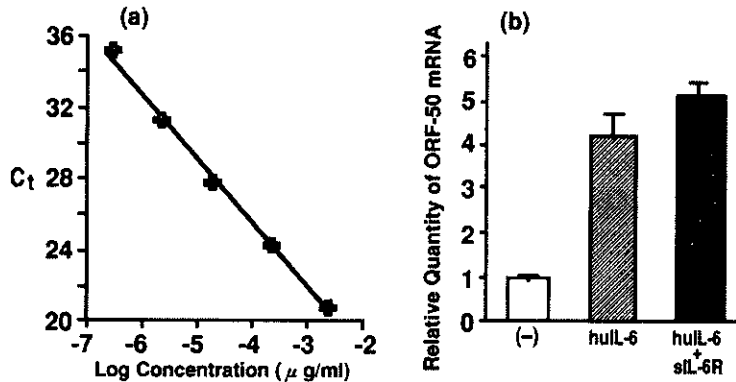


図1. リアルタイム PCR 法を用いた HHV-8 ORF-50 の定量的解析  
huIL-6 は BCBL-1 細胞における HHV-8 の ORF50 mRNA 発現を誘導した。

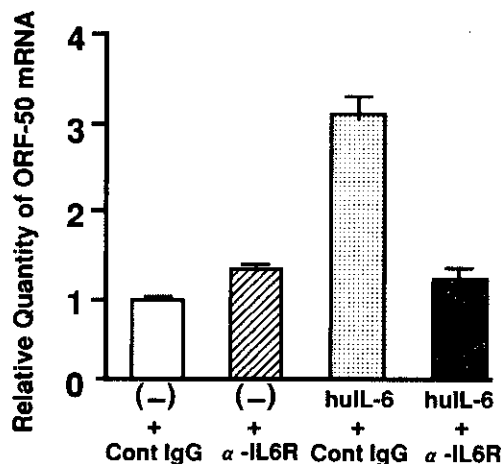


図2. huIL-6 による HHV-8 の早期増殖期遺伝子発現解析  
ヒト型化抗 IL-6R 抗体は huIL-6 により誘導された ORF50 の発現を抑制した。



研究結果

1) リアルタイムPCR システム

一定の蛍光閾値に到達したPCRのサイクル数(Ct値)はPCRに加えたORF50 プラスミドDNA量の対数値と約  $10^{-7}$  から  $10^{-2}$   $\mu\text{g/ml}$  の範囲で直線的に相関した(図1-a参照)。段階希釈を行ったORF50 プラスミドDNAを用いて作製した標準曲線からサンプル中のHHV-8 mRNAとDNA濃度を決定した。ORF26 についても同様に検討した。

2) huIL-6によるHHV-8のORF50遺伝子発現とヒト型化抗IL-6R抗体による抑制効果

BCBL-1細胞におけるHHV-8のORF50mRNAはhuIL-6 (100 ng/ml)あるいはhuIL-6とsIL-6R刺激により、無刺激の細胞に比べ5日培養でそれぞれ4.4と5.4倍に増加した(図1-b参照)。また、huIL-6により誘導されたORF50の発現は、ヒト型化抗IL-6R抗体により阻害されたことから、ORF50発現がhuIL-6分子により誘導されたことが確認された(図2参照)。

3)患者検体からのHHV-8の検出

HIV陽性患者末梢血DNA サンプル35症例計42検体を用いたHHV-8 DNAの検出では、3症例計7検体でORF26が検出された。今回の検討症例での感染率は約9%であった。うち経時的に採血を行った1例のカポジ肉腫合併 HIV陽性患者では

CD4細胞数の減少に伴いHHV-8のDNA量が約100倍に増加した(図3参照)。また同時に検討したvIL-6の発現は7検体のうち6検体で陽性であったが1検体では検出感度以下であった。

考 察

これまでの研究で我々は、HIVとHHV-8がIL-6という液性分子を介して互いにウイルス複製の調節を行い、それぞれの感染病態を悪化させるクロストークモデルを提唱してきた。その中で、huIL-6はHHV-8のlytic geneの発現を上げることを見出したが、huIL-6が単に複製を加速するのか、それとも潜伏感染にあるHHV-8を再活性化するのは不明であった。今回、huIL-6がORF50の発現を誘導したことはhuIL-6がORF50を介して再活性化に関わることを示唆する。また、AIDS患者では血中huIL-6が増加していることから、IL-6を阻害することは、ORF50の発現を抑制しHHV-8を潜伏感染状態に留めるのみならず、HHV-8関連疾患の発症を予防し増悪を阻止すると考えられる。すなわちウイルス感染はあっても発症を抑制するという新しいコンセプトによる治療法といえる。しかも、我々はすでに、ヒト体内での抗原性を減らし反復使用が可能である、ヒト型化抗IL-6R抗体を手にしており、実用化が容易である。

一方、我が国のHIV感染患者におけるHHV-8感染率をさぐり、HHV-8関連疾患の発症のリスクを

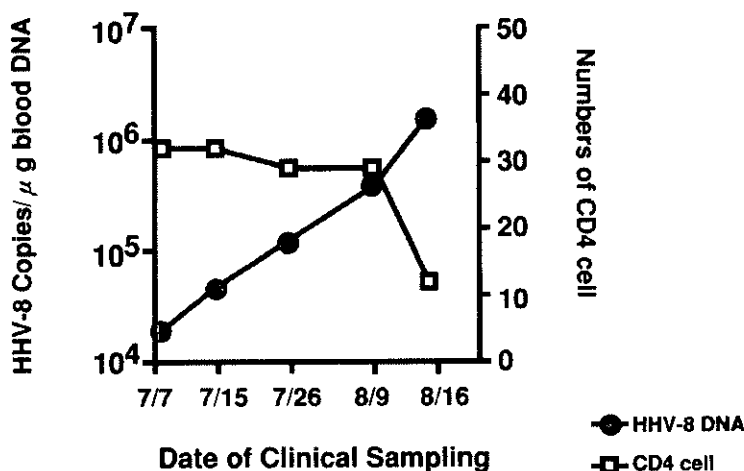


図3. AIDS-KS患者末梢血のHHV-8コピー数と末梢血CD4細胞数の変化

予見する目的で、患者末梢血球より抽出したDNAを用いてORF26とvIL-6の検索を行った。今回のHHV-8感染率は過去の報告とほぼ一致するものであった。興味深いことに、一例のカポシ肉腫合併患者において、CD4陽性細胞数の急激な減少とHHV-8のウイルス量の増加が逆相関した。このことは免疫不全状態によりHHV-8が増殖した可能性と同時に、HHV-8の増加がHIVの病態を悪化させている可能性も示唆しており、我々の提唱するクロストーク仮説を支持すると思われる。今後、HIV感染患者においてHIVウイルス量とHHV-8ウイルス量の関連を検討し、クロストーク説をin vivoで立証したい。

## 結 論

huIL-6は潜伏感染にあるHHV-8のORF50遺伝子活性化を介してウイルス複製を増強する。huIL-6の阻害はHHV-8を潜伏感染状態に留め、HHV-8感染により生じるカポシ肉腫、悪性リンパ腫、あるいはキャッスルマン病の発症と増悪を予防する可能性がある。また、患者末梢血中のHHV-8量を測定することにより、上記疾患のリスクを予測できる可能性がある。

## 健康危険情報

特記すべきこと無し

## 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 王鞍孝子、西本憲弘、松本智成、山西弘一、吉崎和幸: KSHV/HHV-8由来vIL-6によるHIV複製の増強. *Minophagen Medical Review* 46:192-194, 2001.

### 2. 学会発表

- 1) 宋健、王鞍孝子、稲城玲子、森康子、山西弘一、吉崎和幸、西本憲弘: Mutual regulation of HIV and HHV-8 replication via human and viral interleukin-6 in AIDS. 2001年9月、第2回熊本エイズセミナー(熊本).

- 2) 宋健、王鞍孝子、稲城玲子、森康子、山西弘一、吉崎和幸、西本憲弘: Inter-regulation of HIV and HHV-8 replication by interleukin-6 in AIDS. 2001年11月、第10回日本エイズ学会総会(東京).
- 3) 宋健、王鞍孝子、稲城玲子、森康子、山西弘一、吉崎和幸、西本憲弘: huIL-6 may stimulate not only the growth of HHV-8 positive B-lymphoma cells but also the replication of HHV-8 in AIDS. 2001年12月、第42回米国血液学会(Orlando, Florida).

## 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 進行性多巣性白質脳症 (PML) のPCR診断とPMLの病態解析

余郷 嘉明<sup>1)</sup>、太田 晃一<sup>2)</sup>、野田 和幸<sup>3)</sup>、源河いくみ<sup>4)</sup>、木村 昭子<sup>5)</sup>、冠木 智之<sup>6)</sup>、吉良 潤一<sup>7)</sup>

- 1) 東京大学医科学研究所感染免疫大部門・ウイルス感染分野
- 2) 水戸赤十字病院・神経内科
- 3) 順天堂大学医学部・脳神経内科
- 4) 国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター
- 5) 大分医科大学・第三内科
- 6) 埼玉県立小児医療センター・感染免疫科
- 7) 九州大学医学部付属病院・神経内科

### 研究要旨

我々は既に進行性多巣性白質脳症 (PML) の簡便で確実な診断法として、患者の脳脊髄液 (CSF) から PCR により JC ウイルス (JCV) DNA を増幅する系を樹立した。この系は JCV の調節領域をターゲットとするので、増幅断片をシーケンシングすることにより、コンタミによる偽陽性を排除でき、さらに JCV が PML 型かどうかの確認ができる。本研究の目的の一つは、実際の診断を通して我々の方法の問題点を調べ、PML 診断の改良を図ることである。もう一つの目的は、PML の診断サービスを通して収集される PML 症例を解析し、PML の発症機構を解明することである。本年度において以下の成績が得られた。(1) CSF からの JCV DNA (調節領域) の検出は簡便な方法であり、陽性の場合には、確実に PML と診断できることが確認された。(2) しかし、CSF が陰性の場合でも、脳生検から JCV DNA が検出される症例が存在することが明らかになった。(3) CSF や PBL 中の JCV DNA は、中枢神経系でのウイルス感染の終焉よりも早く下降することが明らかになった。(4) 起源が異なる複数の PML 型 JCV による病巣の出現と拡大が典型的な PML 症例で確認された。以上から、CSF 中の JCV DNA 陰性であっても、MRI による画像診断、神経症状の進行、免疫低下を伴う基礎疾患などにより、PML が強く示唆される場合には、脳生検を施行することが必要であると思われた。また、PML の発症機構の解明には、より多くの PML 症例に対して JCV DNA の動態解析を行う必要があると思われた。

分担研究者：余郷嘉明

研究協力者：太田晃一、野田和幸、源河いくみ、木村昭子、冠木智之、吉良潤一

### PCR diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) and analysis of the development of PML

Yoshiaki Yogo<sup>1)</sup>, Kouichi Ohta<sup>2)</sup>, Kazuyuki Noda<sup>3)</sup>, Ikumi Genki<sup>4)</sup>, Akiko Kimura<sup>5)</sup>, Tomoyuki Kabuki<sup>6)</sup>, Jun-ichi Kira<sup>7)</sup>

<sup>1)</sup>Laboratory of Viral Infection, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, <sup>2)</sup>Department of Neurology, Mito Redcross Hospital, <sup>3)</sup>Department of Neurology, Juntendo University Hospital, <sup>4)</sup>AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan, <sup>5)</sup>Internal Medicine 3, Oita Medical University, <sup>6)</sup>Department of Infectious Diseases, Saitama Children's Medical Center and <sup>7)</sup>Department of Neurology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

## 研究目的

PMLのPCR診断においては、一般にJCV DNAの蛋白コード領域が増幅される。それに対して、我々の系では、遺伝子発現を調節する非コード領域(調節領域と略す)が増幅される。その理由は以下の通りである。PML患者の脳病変部で検出されるJCV (PML型JCV)の調節領域は、原型調節領域(腎、尿、扁桃で検出されるJCVが持つ調節領域)から塩基配列の再構成(欠失と重複)により作られる。調節領域をターゲットとする我々の系は、検出されたJCVがPML型かどうか判断できるので、PMLを診断する上で有効である。また、PML型調節領域は各患者にユニークであるから、増幅された調節領域の塩基配列を決定することにより、偽陽性の可能性を排除できる。本研究の第一の目的は、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ながら、診断法の改善も図ることである。

PMLの発症や病態進行に関して以下の諸問題が解明されていない。(1) Majorらは「免疫が低下すると、リンパ球あるいはリンパ組織に潜伏感染しているJCVが活性化され、中枢神経系に侵入し、PMLを発症させる」という説を提唱した。しかし、この説を支持する証拠は十分あるとはいえない。(2) PMLは中枢神経系での脱髄疾患であり、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、病巣は原発部位から他の部位へ拡大する。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。(3) 上述のように、PML患者の脳病変部で検出されるJCVの調節領域は原型調節領域から塩基配列の再構成(欠失と重複)により作られる。この塩基配列の再構成とPMLの発症との関係は未だ解明されていない。(4) 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第二の目的とする。

## 研究方法

### 1. 組織からのDNA抽出

CSFからはスマイテスト EX-R&D (ゲノムサイエンス研究所)を用いてDNAを抽出した。PBLからはGENOMIX (Talent社)を用いて抽出した。脳組織からはプロテイナーゼK消化、フェノール処理、クロロフォルム処理によりDNAを抽出した。

### 2. nested PCR

outer primerとしてA1とA3を、inner primerとしてB1とB3を用いた。A3以外のprimerの配列とゲノム上の位置は文献(Sugimoto et al., 1998)に述べた。A3 (5' CATTACTTACCTATGTAGCTTTTGGTTCAGGC 3')は以前用いたA2を改変したプライマーである。また、今まで用いたTaq DNA polymeraseに代わって、HotStar Taq DNA polymerase (QIAGEN社)を用いた。反応する際、最初に95度C、15分の処理によりHotStar Taq DNA polymeraseを活性化し、その後続けて、通常増幅サイクル(Sugimoto et al., 1998)を行った。

### 3. 標準PCR

B1とB3をprimerとして用いて、40サイクル増幅した(Sugimoto et al., 1998)。

### 4. 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た。切り出された調節領域をpBluescript II SK(+)を用いてクローニングした。

### 4. 制限酵素解析

増幅断片を含むクローンをHindIII、PstI、SstIにより消化した。消化液を3%のNuSieveアガロースゲルで電気泳動した。得られた切断パターンからクローンをグループに分けた。各グループの代表クローン2または3個をシーケンシングした。

### 5. 塩基配列の決定

クローンをQIAprep 8 Turbo Miniprep kit (QIAGEN社)を用いて精製した。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。