

# サイトメガロウイルス肺炎患者の血漿中ウイルス DNA の PCR 法による検出と定量化

<sup>1)</sup>大分医科大学第2内科, <sup>2)</sup>長崎大学医療技術短期大学部, <sup>3)</sup>大分医科大学輸血部

時松 一成<sup>1)</sup> 田代 隆良<sup>2)</sup> 山上由理子<sup>1)</sup> 山崎 透<sup>1)</sup>  
長岡 博志<sup>1)</sup> 永井 寛之<sup>1)</sup> 橋本 敦郎<sup>1)</sup> 後藤陽一郎<sup>1)</sup>  
佐分利能生<sup>1)</sup> 菊地 博<sup>3)</sup> 那須 勝<sup>1)</sup>

(平成7年5月1日受付)

(平成7年6月13日受理)

---

Key words: PCR, cytomegalovirus, cytomegalovirus pneumonia,  
immunocompromised patient

---

## 要 旨

病理組織学的に確認されたサイトメガロウイルス (CMV) 肺炎17例, 非 CMV 肺炎15例と, 健常人24例の血漿を材料として, nested polymerase chain reaction (PCR) 法による CMV 遺伝子の検出と半定量化を行い, CMV 肺炎の診断およびモニタリングにおける PCR 法の有用性について検討した。

CMV 肺炎患者17例全例, 非 CMV 肺炎患者15例中1例の血漿から CMV DNA が検出され, 健常人では全例陰性であった。PCR 陽性の非 CMV 肺炎患者は成人 T 細胞白血病患者で, 死亡2日前の血漿より CMV DNA が検出された。血漿 CMV DNA は入院時は全例陰性であったが, 肺炎発症の1~28日前(平均14日前)に陽性化し, その時の血漿 CMV DNA 量は $10^3 \sim 10^5$ コピー/ml (平均 $10^{4.0}$ コピー/ml)だった。CMV 肺炎発症時には $10^4 \sim 10^6$ コピー/ml (平均 $10^{5.3}$ コピー/ml)と増加し, 抗ウイルス剤治療に反応した患者では臨床症状の改善と共に減少していた。

血漿中の CMV DNA は肺炎発症前に出現し, その DNA 量は病勢と相関していたことより, 血漿 PCR 法は易感染性宿主における CMV 肺炎の診断とモニタリングに有用であると思われる。

## 序 文

サイトメガロウイルス (CMV) は, 日本人成人の95%以上が抗体を有しているごくありふれたウイルスである<sup>1)</sup>。初感染の後, 潜伏感染し, 様々な要因により再活性化されるが, 健常人では初感染時, 回帰感染時, あるいは再感染時でも不顕性であり, 臨床的に問題となることはほとんどない。しかし, AIDS 患者<sup>2)</sup>や成人 T 細胞白血病 (ATL) 患者<sup>3)</sup>, 骨髄・臓器移植患者<sup>4)5)</sup>などの易感染性宿主では全身性に CMV による巨細胞封入体症を発症し, 特に間質性肺炎はしばしば致死的な経過をと

るため, その早期診断法と抗ウイルス剤の治療効果を的確に評価するモニタリング法の確立が急務となっている。

Polymerase chain reaction (PCR) 法は特異性の高い迅速診断法であるが, 極めて感度が高いため, PCR 法による末梢血白血球からの CMV DNA の検出が必ずしも顕性の CMV 感染症を意味しないという問題点を有している<sup>5)~8)</sup>。

本研究では, nested PCR 法により血漿からのウイルス DNA の検出を行い, その臨床的意義について検討した。

## 材料と方法

### 1. 患者

対象は CMV 肺炎患者17例, 非 CMV 感染症患

---

別刷請求先: (〒879-55) 大分県大分郡挾間町大ケ丘  
1-1

大分医科大学第2内科 時松 一成

平成7年9月20日

Table 1 Characteristics of study subjects by PCR assay

Characteristics	Patients with CMV pneumonia (n=17)	Patients without CMV pneumonia (n=15)	Healthy volunteers (n=24)
Age, yr, mean(range)	55.4(34~74)	64.5(42~81)	29.5(25~46)
Sex, male/female	9/8	12/3	18/6
No. of samples for CMV pneumonia	146	115	24
Days for monitoring, mean(range)	29.8(18-155)	35.8(24-98)	
No. of samples for monitoring, mean(range)	8.6(3-20)	7.7(5-12)	1
Underlying diseases*(No.)	ATL(11) LC(2) NHL(1) MH(1) NS(1) IPF(1)	ATL(7) LC(8)	none

\*ATL=adult T-cell leukemia, LC=lung cancer, NHL=non Hodgkin's lymphoma, MH=malignant histiocytosis, NS=nephrotic syndrome, IPF=idiopathic pulmonary fibrosis.

者15例と健常人24例であり、全例補体結合反応法によるCMV抗体は陽性であった(Table 1)。CMV肺炎患者とは、①臨床的およびレントゲン学的に間質性肺炎の所見があり、②病理組織学的に明瞭なハローで囲まれた“owl eye”と呼ばれる大型の好塩基性核内封入体が認められ、その封入体が、③CMV初期抗原に対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色陽性の症例である<sup>9)</sup>。非CMV感染症患者とは、剖検が行われ、全ての臓器においてCMV感染細胞を認めない易感染性宿主(ATL患者と抗癌剤投与後の肺癌患者)である。

CMV肺炎の発症日は抗生物質投与に反応しない発熱があり、急激に呼吸困難が出現、あるいは動脈血酸素分圧が低下した日、または胸部レントゲン写真にびまん性間質性陰影が出現した日とした。

## 2. 血漿検体の調整。

患者群から入院中約1週間隔にてEDTA加末梢血液を採血し、800×gにて30分遠心して血漿を分離後、0.22 $\mu$ mのフィルター(Millipor社)にて濾過した後、-70°Cにて保存した。

血漿中のDNAはIshigakiら<sup>10)</sup>の方法により抽出した。即ち、血漿100 $\mu$ lに抽出緩衝液(100mM KCl, 20mM Tris HCl (pH 8.3), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mg/ml gelatin, 0.9% Tween20, 60 $\mu$ g/ml

proteinase K (Sigma Chemical社) 100 $\mu$ lを加え、55°Cで1時間反応させた。その後proteinase Kを10分間の煮沸処理にて失活させ、12,000×g, 10分の遠心、その上清をPCR検体とした。

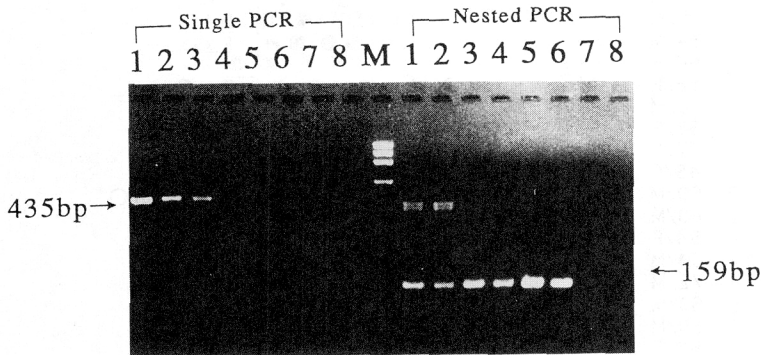
## 3. Nested PCR法

検体中のCMV DNAの増幅は、2セットのプライマーを用いたnested PCR法により行った。外側プライマーはCMV前初期抗原遺伝子1(IE-1)の435bpを増幅するように<sup>11)</sup>、内側プライマーはさらに内側の159bpを増幅するように<sup>12)</sup>設定した。

PCR反応液の組成は、50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, Triton X-100, 400 $\mu$ M dNTPとunit Taq DNA polymerase (和光純薬社)とし、single PCR段階では各50pmoleの外側プライマーとPCR検体5 $\mu$ lを加えて全量を50 $\mu$ lとした。自動thermal cycler (岩城硝子社)を用いて、熱変成94°C 1分、アニーリング55°C 2分、伸長反応を72°C 2分にてより35回のDNA増幅反応を行った。Nested PCR段階では、各50pmoleの内側プライマーとsingle PCR増幅産物5 $\mu$ lを新しい反応液に加え、上記の方法にて35回の増幅反応を行った。

PCR産物はエチジウムブロマイドを含む4%アガロースゲルで電気泳動し、紫外線下で写真撮

Fig. 1 Sensitivity of PCR assay. Serial dilutions of plasmid DNA containing the immediate-early antigen gene 1 of CMV were amplified by single PCR and nested PCR. Lane 1, 700fg; lane 2, 70fg; lane 3, 7fg; lane 4, 0.7fg; lane 5, 0.07 fg; lane 6, 0.007fg; lane 7, 0.0007fg; lane 8, negative control; lane M, DNA molecular size marker ( $\Phi$ 174/Hae III digest).



影を行い、増幅の有無を確認した。

#### 4. Nested PCR 法の感度の検討と血漿 CMV DNA の半定量化

CMV の IE-1 を含むプラスミド溶液を作成し、吸光度よりプラスミド溶液の DNA 濃度を測定した。このプラスミド溶液を CMV 抗体陰性の血漿で段階希釈し、nested PCR 法を行いその感度を検討した。

この nested PCR 法の感度を基にして血漿中の CMV DNA の半定量化を行った。即ち、血漿検体を滅菌蒸留水にて10段階に希釈し、nested PCR により検出可能な最終希釈段階を求めた。この最終希釈段階より血漿1mlあたりの CMV DNA のコピー数を算出した。DNA のコピー数は、プラスミドの分子量より算出した。

### 成 績

#### 1. Nested PCR 法の感度

Single PCR 法では CMV の IE-1 は 7.0fg まで検出された。Nested PCR 法では 0.007fg まで検出可能であり、single PCR に比べ約 1,000 倍の高い感度であった (Fig. 1)。本条件下では nested PCR 法により血漿 1ml あたり最小限  $10^3$  コピーの CMV DNA を測定することができた。

#### 2. 血漿からの CMV DNA の検出

CMV 肺炎患者では 17 例全例、非 CMV 肺炎患者では 15 例中 1 例の血漿中から CMV DNA が検

Table 2 CMV DNA in plasma in correlation with CMV pneumonia

CMV DNA in plasma*	No. of patients		No. of healthy volunteers (n=24)
	with CMV pneumonia (n=17)	without CMV pneumonia (n=15)	
Positive	17	1**	0
Negative	0	14	24

\*CMV DNA was detected by nested PCR.

\*\*CMV DNA became positive 2 days before death.

出された。非 CMV 肺炎患者における PCR 陽性の 1 例は ATL 患者で、死亡直前 (2 日前) の血漿より CMV DNA が検出されたが、剖検による病理組織学的検査では活動性の CMV 感染症は認められなかった。また健康人 24 例全てにおいて血漿中に CMV DNA は検出されなかった (Table 2)。

#### 3. 血漿 CMV DNA 検出時期

血漿中 CMV DNA は入院時には全例陰性だったが、16 例で肺炎発症の 28 日前から 1 日 (発症前平均 14 日) 前に、1 例 (症例 11) で肺炎発症 3 日後に血漿 PCR が陽転した (Fig. 2)。

#### 4. 血漿 CMV DNA 量の推移

血漿中 CMV DNA の量は、CMV 肺炎発症前では  $10^3 \sim 10^5$  コピー/ml (平均  $10^{4.0}$  コピー/ml) であり、CMV 肺炎発症時の血漿中の CMV DNA 量は 15 検体で  $10^5$  コピー/ml 以上 (平均  $10^{5.3}$  コピー/ml)

Fig. 2 Follow-up of CMV DNA by nested PCR in plasma of 17 immunocompromised patients with CMV pneumonia.

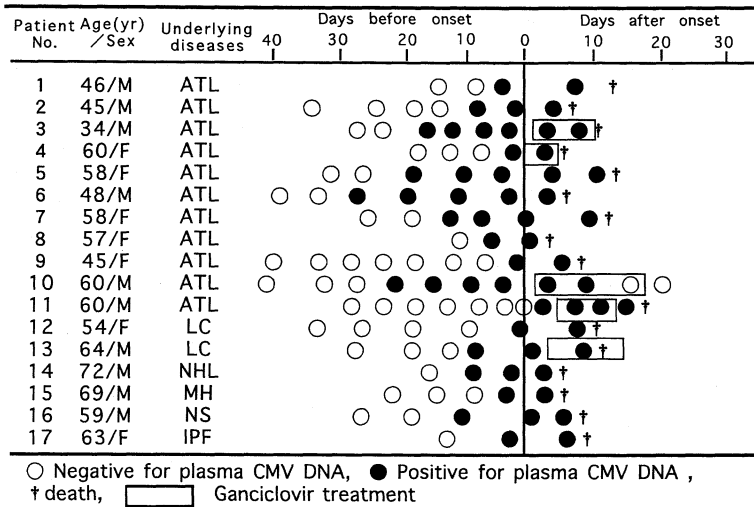
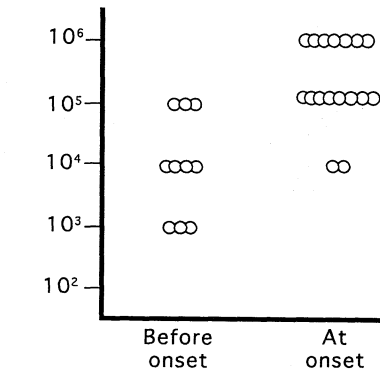


Fig. 3 CMV DNA titer in plasma. (copies/ml)



に増加した (Fig. 3). CMV 肺炎で死亡した症例では、死亡時まで血漿 PCR は陽性で、CMV DNA 量の減少もみられなかったが、ganciclovir の投与により軽快した症例 (症例10) では10<sup>6</sup>コピー/ml から10<sup>3</sup>/コピー/ml へと減少し、治療開始後2週間で陰性化した。

考 察

CMV 肺炎の最も確実な診断法は、生検あるいは気管支肺胞洗浄液により得られた検体から CMV 感染細胞を検出することであるが<sup>13)</sup>、肺局所から繰り返し検体を得ることは困難である。末

梢血白血球からウイルスを培養する方法 (viremia)<sup>14)</sup>や、ウイルス抗原を検出する方法 (antigenemia)<sup>5)6)15)</sup>は活動性 CMV 感染症に対する特異性の高い診断法であるが、研究室での組織培養系細胞の維持・管理と、検体採取後の速やかな検体処理が必要である。

PCR 法により末梢血白血球からのウイルス DNA を検出する方法 (DNAemia) は特異性の高い迅速診断法であるが、極めて感度が高いため不顕性感染でも陽性となり<sup>7)8)</sup>、活動性 CMV 感染症の診断には不適である。

CMV の感染様式は細胞間伝播であると考えられ、通常血漿や血清からは分離培養されない。Ishigaki ら<sup>10)</sup>は CMV 肺炎を発症した骨髄移植患者の血清から初めて CMV DNA を検出し、血清中の CMV は感染力のない defective virions の状態で存在すると推測した。Brytting らも<sup>16)</sup>PCR 法により活動性 CMV 感染症患者の血清から CMV DNA を検出し、CMV 感染細胞の融解により血清中に遊出された CMV DNA の存在を想定した。しかし、Spector ら<sup>17)</sup>は0.2μm フィルターで濾過した cell free の血漿より、CMV DNA を検出し、さらにウイルスの分離培養に成功した。即ち、活動性 CMV 感染患者の血漿中には感染性

CMV が存在し、細胞間伝播だけでなく、cell-free CMV によるウイルス伝播の可能性を示唆した。

本研究で我々は、PCR 法による血漿からの CMV DNA の検出は、感度・特異度に優れているのみではなく、CMV 肺炎の早期診断に有用であることを明らかにした。即ち、CMV 肺炎では大部分の症例で胸部異常陰影の出現以前に血漿 PCR は陽転化していた。しかし、CMV 肺炎を認めない症例や健常人では陰性であり、今回の測定法を用いれば、血漿 PCR 法が陽転化した時期に抗ウイルス剤の投与すべきであることが示唆された。

血漿 CMV DNA の半定量法の検討では CMV 肺炎発症時におけるウイルス DNA 量は発症前にくらべ増加し、治療反応例では臨床所見の改善と相関して減少しており、抗ウイルス剤の治療効果を判定するうえにも役立つものと考えられた。

今回検討した方法では、DNA の抽出法にフェノール抽出・エタノール沈殿や、DNA の半定量法に放射線性同位元素・ビオチンプローブの使用など、複雑な操作法は用いていない。この簡便な方法の導入により、検査の短時間化や一般検査室でのルーチン検査化が可能であると思われた。

以上より、従来行われていた末梢血白血球を用いた PCR 法に比べ、血漿 PCR 法は易感染性宿主における CMV 肺炎の診断とモニタリングに極めて有用であり、またウイルス DNA 量は病勢と相関することが示唆された。今後さらに症例が集積されれば、血漿 PCR 法と血漿 CMV DNA の定量化が抗ウイルス剤投与の優れた指標となるものと考えられる。

謝辞：CMV AD169株、胎児肺線維芽細胞をご供与いただいた宮崎医科大学微生物学講座、南嶋洋一先生に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 沼崎義夫：サイトメガロウイルス感染症。周産期医学, 17: 369—372, 1987.
- 2) Schooley, R.T.: Cytomegalovirus in the setting of infection with human immunodeficiency virus. *Rev. Infect. Dis.*, 12: s811—s819, 1990.
- 3) Tashiro, T., Yamasaki, T., Nagai, H., Kikuchi, H. & Nasu, M.: Immunological studies on opportunistic infection and the development of adult T-cell leukemia. *Internal Medicine*, 31: 1132—1136, 1992.
- 4) Meyers, J.D., Flournoy, N. & Thomas, E.D.: Nonbacterial pneumonia after allogeneic marrow transplantation. A review of ten years' experience. *Rev. Infect. Dis.*, 4: 1119—1132, 1982.
- 5) Gerna, G., Zipeto, D., Parea, M., Revello, M.G., Silini, E., Percivalle, E., Zavattoni, M., Grossi, P. & Milanese, G.: Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia, and DNAemia. *J. Infect. Dis.*, 164: 488—498, 1991.
- 6) 花房秀次, 松田文子, 田中葉子, 上杉妙子, 太田俊彦, 佐藤敏美, 野守裕明, 峰松俊夫, 南嶋洋一, 森 良一: AIDS に合併したサイトメガロウイルス (CMV) 感染症の早期診断及び治療効果判定における CMV 抗原検索の有用性. *感染症誌*, 68: 1105—1112, 1994.
- 7) 時松一成, 田代隆良, 村上純子, 一宮朋来, 平松和史, 増田 満, 山崎 透, 永井寛之, 後藤陽一郎, 那須 勝: 肺癌に合併した CMV 肺炎およびカリニ肺炎—Polymerase chain reaction による診断—. *感染症誌*, 67: 1126—1130, 1993.
- 8) Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J.G.P., Borysiewicz, L.K. & Sinclair, H.: Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.*, 72: 2059—2064, 1991.
- 9) 田代隆良, 後藤陽一郎, 重野秀明, 後藤 純, 那須 勝: サイトメガロウイルス感染症の臨床病理学的研究. *感染症誌*, 63: 1171—1177, 1989.
- 10) Ishigaki, S., Takeda, M., Kura, T., Ban, N., Saitoh, T., Sakamaki, S., Watanabe, N., Kohgo, Y. & Nittsu, Y.: Cytomegalovirus DNA in the sera of patients with cytomegalovirus pneumonia. *Br. J. Haematol.*, 79: 198—204, 1991.
- 11) Demmler, G.J., Buffone, G.J., Schimbor, C.M. & May, R.A.: Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J. Infect. Dis.*, 158: 1177—1184, 1988.
- 12) Shibata, D., Martin, W.J., Appleman, M.D., Causey, D.M., Leedom, J.M. & Arnheim, N.: Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.*, 158: 1185—1192, 1988.
- 13) 南嶋洋一: サイトメガロウイルスに関する最近の話題. *感染症誌*, 20: 81—88, 1990.
- 14) Gleaves, C.A., Smith, T.F., Shuster, E.A. &

- Pearson, G.R.: Comparison of standard tube and shell viral cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 21: 217—221, 1985.
- 15) van der Bij, W., Schirm, J., Torensma, R., van Son, W.J., Tegzess, A.M. & The, T.H.: Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 2531—2535, 1988.
- 16) Brytting, M. Xu, W., Wahren, B. & Sundqvist, V.: Cytomegalovirus DNA detection in sera from patients with active cytomegalovirus infection. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 1937—1941, 1992.
- 17) Spector, S.A., Merrill, R., Wolf, D. & Dankner, W.M.: Detection of human cytomegalovirus in plasma of AIDS patients during acute visceral disease by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 2359—2365, 1992.

### Detection and Quantitation of Cytomegalovirus DNA in Plasma from Patients with Cytomegalovirus Pneumonia

Iseei TOKIMATSU<sup>1)</sup>, Takayoshi TASHIRO<sup>2)</sup>, Yuriko YAMAKAMI<sup>1)</sup>, Tohru YAMASAKI<sup>1)</sup>, Hiroshi NAGAOKA<sup>1)</sup>, Hiroyuki NAGAI<sup>1)</sup>, Atsuro HASHIMOTO<sup>1)</sup>, Yoichiro GOTO<sup>1)</sup>, Yoshio SABURI<sup>1)</sup>, Hiroshi KIKUCHI<sup>3)</sup> & Masaru NASU<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Second Department of Internal Medicine, Oita Medical University

<sup>2)</sup>The School of Allied Medical Sciences, Nagasaki University

<sup>3)</sup>Blood Transfusion Service, Oita Medical University

Detection and semiquantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in plasma from 17 immunocompromised patients with CMV pneumonia diagnosed histopathologically, 15 CMV-seropositive patients without CMV pneumonia and 24 CMV-seropositive healthy volunteers were evaluated, using the polymerase chain reaction (PCR).

CMV DNA was detected in plasma from all of 17 patients with CMV pneumonia, from 1 of 15 patients without CMV disease, but from none of healthy volunteers. One patient without CMV disease exhibited positive CMV DNA by PCR 2 days before death. Plasma CMV DNA was negative at the time of admission in all patients, however, it became positive 1–28 days (mean, 14 days) before the onset of CMV pneumonia in 16 patients. The amount of viral DNA in plasma were  $10^3$ – $10^5$  copies/ml (mean,  $10^{4.0}$  copies/ml) when first detected by PCR. At the onset of CMV pneumonia, they were  $10^4$ – $10^6$  (mean,  $10^{5.3}$  copies/ml), and increased with disease progression and decreased with disease improvement because of treatment with antiviral agents.

We succeeded in detection of CMV DNA in plasma before the development of CMV pneumonia, and showed the amount of viral DNA reflected the extent of active CMV pneumonia. Thus, PCR amplification of CMV DNA in plasma is a useful tool for early diagnosis and monitoring of immunocompromised patients.