

サイトメガロウイルス感染症の迅速DNA診断法の開発

中村 一江, 家本 敦子*

(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科 *現兵庫医科大学遺伝学教室)

Establishment of rapid diagnosis technique of Cytomegalovirus infection using polymerase chain reaction

Kazue Nakamura and Atsuko Iemoto*

*Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan*

**Department of Genetics, Hyogo College of Medicine,
Nishinomiya 663, Japan*

The conventional diagnostic procedures for CMV infections have been both isolation of viruses and titration of serum antibodies. These methods need several days for the final diagnosis, causing a delay in the diagnosis. Therefore, a rapid diagnostic procedure has been highly required.

In this study, we conducted polymerase chain reaction (PCR) using three sets of primers corresponding IE-, LA- and V-regions of the CMV genome. Using the former two sets of primers, many bands were amplified from a DNA sample isolated from the peripheral blood leukocytes of a patient with CMV infection. However, using the latter set of primers (V-region), a single band of 305bp was amplified. Using these V-region primers, no hybridization was needed to detect the specific band. No PCR amplification products were detected by using the V-region primers from DNAs isolated from normal subjects.

We also tried to use urine sedimentation samples without extraction of DNA. Sedimented cells were resuspended in water, heated by a microwave oven and used for PCR templates. A 305bp band was also detected. Subsequently, the entire procedure of our method to detect the CMV DNA requires only 4 hours. Therefore, this PCR method is reliable and useful in making rapid diagnosis of CMV infection.

はじめに

サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus: CMV) はヘルペスウイルス科の DNA ウィルスで、240kb の大きさをもつ。通常は、幼児期または小児期に初感染を起こした後、CMV は終生体内に存続し、成人の 90% が不顕性に感染している。初感染の CMV が臨床上的問題となるのは先天性巨細胞封入

体病に限られている。この疾患では、CMV は全身の細胞に感染しているが、とくに尿に排出されていることが知られている。しかし成人では CMV 感染症として発病することは稀である。最近、免疫不全症例や臓器移植の際の免疫抑制剤投与例で、不顕性感染の CMV に由来するサイトメガロウイルス肺炎 (CMV interstitial pneumonia, CMV-IP) が注目されるようになってきた。臓器移植後の間質性肺炎

のうちで CMV-IP の占める割合は大きい。特に骨髄移植では間質性肺炎のうちの 50% を CMV-IP が占め、骨髄移植後 35 日ごろに発症する。いったん発症すると、CMV-IP の死亡率は 85% と高いことが注目される¹⁾。CMV 治療には以前は γ -globulin, acyclovir 等が用いられてきたが著明な効果が認められなかった。1990 年になって ganciclovir [9-(1, 3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine] が用いられるようになり、CMV-IP 発症後早期に ganciclovir を用いた場合に限り、その予後は改善されてきている。したがって、ganciclovir を効果的に投与するには、CMV 感染発症早期の診断が必要である²⁾。しかし、これまで CMV 感染症診断は、血清診断、CMV 特異抗原の検出、およびウィルス分離、さらに病理学的に細胞質内封入体の確認等でなされてきた。これらの方法はいずれも発症後数週から数カ月の期間を要するために臨床的にほとんど有用性がなかった。

そこで我々は CMV の DNA 診断を試みた。少量の検体から診断を行うため、CMV に特異性の高いプライマーを選び polymerase chain reaction (PCR) 法を用い³⁾、迅速診断を行うことが可能となった。

材料と方法

1. 対象・検体

20 例の正常成人の末梢血をヘパリン採血して陰性コントロールとし、陽性コントロールとしては CMV の AD169 株を使用した。CMV 陽性検体には、細胞質内封入体が確認され、肝機能障害がみられる先天性 CMV 感染症の乳児の血液と尿を用いた。

2. 検体からの DNA 抽出

末梢血については、ヘパリン採血した血液を静置し、血漿と赤血球層の間の白血球層を分離後、PBS(-) (phosphate-buffered saline) で数回洗浄遠心し、さらに 40mM NaCl を加え赤血球を溶血させ、白血球 ($5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$) を PBS(-) で 3 回洗浄し、PBS(-) に再浮遊させた。この白血球浮遊液に SDS およびプロテイナーゼ K (Sigma) をそれぞれ最終濃度が 1% および 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加え、55°C で 1 時間インキュベーション後、37°C で 12 時間から 16 時間インキュベーションした。次いで、フェノール:クロロホルムの 1:1 液を等量加え、1 分間強く振盪し、上清を回収した(フェノール-クロ

ロホルム法)。この操作を 3 回繰り返した後、DNA をエタノール沈殿した。沈殿した DNA は 70% アルコールで 2 回洗浄、アルコールを充分に取り除いた後、DNA 濃度が 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように蒸留水に溶解した。

尿は 1,500rpm で 10 分間遠心し、それぞれの細胞沈渣を PBS(-) に再浮遊し、3 回洗浄後、血液と同様にフェノール-クロロホルム法で DNA 抽出した。

DNA 抽出を行わず、迅速に検体を処理する目的で、PBS(-) 洗浄後の尿細胞沈渣の 1 部は蒸留水に再浮遊し、電子レンジ (600 ワット) で 5 分間加熱、遠心後に上清を PCR のテンプレートとした。また尿の 1,500rpm 遠心後の上清は、さらに 27,000rpm で 30 分間超遠心し、この沈渣を細胞沈渣と同様に電子レンジで加熱処理し、PCR のテンプレートとした。

3. PCR 法

(1) PCR プライマーおよびハイブリダイゼーション用プローブ

プライマーは immediate early 領域 (IE) の IE-1 (IE-2⁴⁾⁵⁾、late antigen 領域 (LA) の LA-1 (LA-2⁴⁾⁶⁾、AD169 株 DNA の Hind V 領域 (領域 V) の Vp-1 (Vp-2⁷⁾ の塩基配列を合成して用いた (Fig.1)。IE のプライマーでは 159bp、LA では 139bp、Vp では 305bp の PCR 産物が期待された。

(2) PCR 反応液

反応液は、1 チューブあたり次のように調整した。10×PCR バッファー (100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂) を 5 μl 、dATP, dTTP, dCTP, dGTP の 4 種の塩基 (1.25mM) (TaKaRa) を各 2 μl 、プライマーは IE-1 と-2、LA-1 と-2 もしくは Vp-1 と-2 の組み合わせで各 100ng、Taq ポリメラーゼ (Amplitaq, Parkin-Elmer Cetus) を 1 単位、DNA (0.1~1 μg) もしくは加熱細胞浮遊液を加えて合計 50 μl とした。反応液は 500 μl の PCR 用チューブに入れ、ミネラルオイル (Sigma) を重層した。

(3) PCR 条件設定

機器としては Parkin-Elmer Cetus 社の DNA Thermal Cycler を用いた。PCR は、94°C 10 分間インキュベートした後、94°C 1 分間熱変性、60°C 30 秒間アニーリング、そし 72°C 30 秒間伸長反応の PCR サイクルを 30~50 回繰り返す、最後に

72℃で7分間インキュベートした。

(4) PCR産物の検出

PCRで増幅後の試料を電気泳動し、エチジウムブロマイド(EtBr)(Sigma)染色およびサザンプロットハイブリダイゼーションにより、CMV特異バンドを確認した。

(A)電気泳動およびEtBr染色

EtBr(0.5 μ l/ml)を加えたTAEバッファー(tris acetic acid EDTA)を用いてNuSieve Agarose(FMC)2%とAgarose(FMC)1%を加えてミニゲルを調整した。同じEtBr添加のTAEバッファーでゲル電気泳動装置(Mupid, コスモバイオ)を使用してPCRで増幅後の試料を100V 30分間電気泳動した。その後UV照射でPCR産物の有無を確認し、ポラロイドカメラで撮影した。

(B)サザンプロットハイブリダイゼーション

上記のミニゲルを0.5N NaOH, 1.5M NaCl 溶液中で30分間振盪後、ナイロンメンブラン(Hybond N, Amersham)に10 \times SSC(saline sodium citrate)を用いて4時間サザンプロットした。メンブランは5 \times SSCでリンスした後、ろ紙上で水分を切り、電子レンジで1分間ベイクした。次いでメンブランをハイブリダイゼーション液[5 \times SSPE(saline sodium phosphate EDTA), 10 \times Denhardt's solution(0.2% Ficoll, 0.2% polyvinylpyrrolidone, 0.2% bovine serum albumin), 1% SDS および 100 μ l/ml の 1 本鎖化した salmon sperm DNA(Sigma)]と共にハイブリバッグ(コスモバイオ)に入れ、37℃ 30分間プレハイブリダイゼーションした。一方、IE, LA もしくは Vp のプローブの 5' 末端標識を行うため、プローブ(10ng/ μ l)を 1 μ l, 32 P- γ ATP(Amersham)を 5 μ l, Kinase バッファー(70mM Tris-HCl pH7.6, 10mM MgCl₂, 5mM DTT)を 13 μ l, T4 Kinase(TaKaRa)を 1 μ l 加え、37℃ 60分間インキュベートした。このプローブを加えたハイブリダイゼーション液に、プレハイブリダイゼーションしたメンブランを入れ、50℃で16時間のハイブリダイゼーションを行った。メンブランは0.1% SDS を加えた 0.2 \times SSC で 40℃ 20 分の洗浄を 3 回繰り返し、オートラジオグラム用カセットに、XAR フィルム(コダック)と共に入れ、-80℃で24時間感光した。

結果

1. PCRによるCMV DNAの増幅

IE領域のプライマーを用い増幅すると、陽性コントロールのAD169株では159bpのPCR産物が検出されたが(Fig.2A, lane 1), 陽性、陰性検体の血液より抽出したDNAを用いると、ともにEtBr染色で、800bpまでの数本のバンドとスミアが検出された(Fig.2A, lane 3, 4)。しかし、 32 Pラベルしたプローブでハイブリダイゼーションを行うとAD169株より増幅された159bpバンドには強いハイブリダイゼーションバンドが認められ、陽性検体の血液から抽出したDNAからも同サイズのハイブリダイゼーションバンドが検出された(Fig.2B, lane 3)。陰性検体からはハイブリダイゼーションバンドは認められなかった(Fig.2B, lane 4)。

LA領域のプライマーを用いた場合も、陽性コントロールのAD169株では139bpのバンドが検出されたが(Fig.3, lane 1), 陽性、陰性検体の血液より抽出したDNAからはIE領域のプライマーの時と同様にEtBr染色のみでの確認は不可能であった(Fig.3A, lane 3, 4), ハイブリダイゼーションによってAD169株では明瞭なハイブリダイゼーションバンドが検出され(Fig.3B, lane 1), 陽性検体の血液から抽出したDNAからも同サイズのハイブリダイゼーションバンドが検出された(Fig.3B, lane 3)。

一方、V領域のプライマーを用いると、305bpのバンドがバックグラウンドなしにAD169株のみでなく陽性検体の血液から抽出したDNAからもEtBr染色で明瞭に検出でき(Fig.4A, lane 1, 3), 陰性検体ではバンドを認めなかった(Fig.4A, lane 4)。ハイブリダイゼーションによっても同じ結果が得られた(Fig.4B)。

2. PCRサイクル数の検討

PCRのサイクル数について、V領域のプライマーを用いて陽性検体の血液から抽出したDNAをテンプレートに30, 40, 50サイクルで検討した。いずれにおいても305bpのバンドが検出されバックグラウンドの増幅は認められなかった(データ示さず)。陰性検体20例で、50サイクルでPCRを行ったがバンドは認められなかった。一方、陽性検体の尿から抽出したDNAにおいては、40サイクルではバンドは不明瞭であった(Fig.5, lane 2)。しかし50サイクルでは明瞭に検出された(Fig.5, lane 3)。

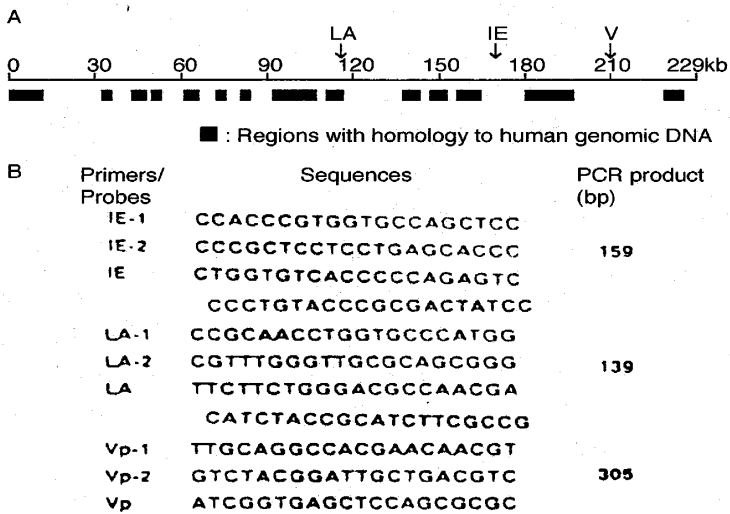


Fig. 1 Regions with homology to human CMV genomic DNA and sequences of primers and probes.

A : Regions with homology. B : Sequences of primers and probes.

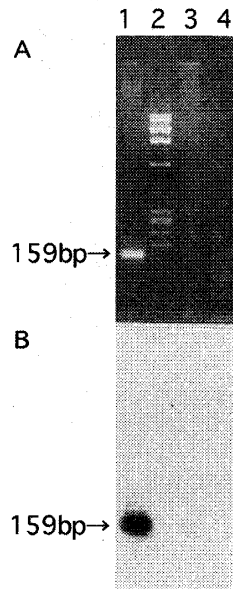


Fig. 2 Detection of CMV-DNA using IE-region primers by PCR.

A : EtBr staining. B : Southern blotting using the IE probe.

lane 1 : PCR product from the AD169 DNA.
2 : ϕ X Hae III digest. 3 : PCR product from DNA isolated from peripheral blood leukocytes of a patient with CMV infection. 4 : PCR product from DNA isolated from a normal subject.

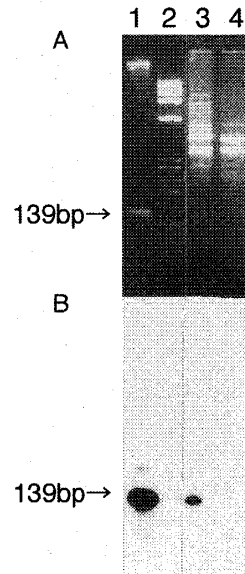


Fig. 3 Detection of CMV-DNA using LA-region primers by PCR.

A : EtBr staining. B : Southern blotting using the LA probe.

lane 1 : PCR product from the AD169 DNA.
2 : ϕ X Hae III digest. 3 : PCR product from DNA isolated from peripheral blood leukocytes of a patient with CMV infection. 4 : PCR product from DNA isolated from a normal subject.

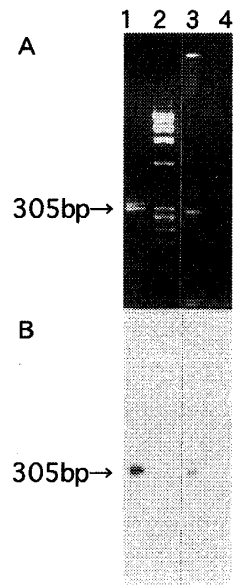


Fig. 4 Detection of CMV-DNA using V-region primers by PCR.

A : EtBr staining. B : Southern blotting using the V probe.

lane 1 : PCR product from the AD169 DNA.
2 : ϕ X Hae III digest. 3 : PCR product from DNA isolated from peripheral blood leukocytes of a patient with CMV infection. 4 : PCR product from DNA isolated from a normal subject.

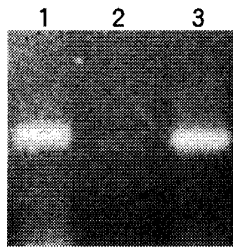


Fig. 5 PCR cycles and the intensity of the amplified bands. DNA isolated from urine sedimentation cells was used for a template. lane 1: positive control. 2: 40 cycles of PCR. 3: 50 cycles of PCR.

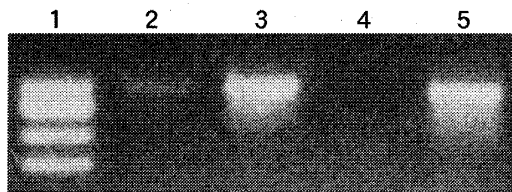


Fig. 6 CMV-DNA was detected from samples without DNA extraction. Urine samples were used for PCR after heating by a microwave oven. lane 1: ϕ X Hae III digest. 2: 1,500 rpm sedimentation (10ml). 3: 1,500 rpm sedimentation (50ml). 4: 27,000 rpm ultracentrifuged (10ml). 5: 27,000 rpm ultracentrifuged (50ml).

3. 尿検体の検討

V領域のプライマーを用い、DNA抽出を行わず、尿沈渣を電子レンジで加熱処理したものをテンプレートとして用いることが可能かを検討した。その際に尿の検体量を10mlと50mlとで比較した。1,500rpm10分間の尿沈渣細胞と、この上清の超遠心により得られた沈渣中のCMV粒子をPCRテンプレートとした。尿10mlの1,500rpmの沈渣細胞から、DNA抽出を行わず電子レンジ処理にてCMV特異DNAの増幅が可能であった(Fig.6)。

考 察

これまでの、IE領域とLA領域のPCRによるCMV DNA診断が一般的に行われていた⁸⁾。我々は今回IE、LA領域のPCRを試みたが、非特異バンドが多数増幅され、CMV由来の特異バンドの検出にはハイブリダイゼーションが必要であった(Fig.2, 3)。そのため、PCRのみを行うことに比べて時間がかかり、またアイソトープが必要で、施設に制約があり、迅速診断には問題が残ることが判

明した。

CMV DNAはヒトゲノムDNAとホモロジーのある領域が多く、IE、LA領域はその部分に位置する(Fig.1)ため、非特異バンドが多数増幅されると考えられた。母坪らの報告⁷⁾をもとに、ヒトゲノムDNAとホモロジーの少ない領域を検討し、V領域のプライマーを使用することを試みた。その結果、この領域のプライマーが非特異的にヒトゲノムDNAにアニールしないためPCRの効率が良いことによると考えられ、目的のCMV DNAがバックグラウンドなしに特異的に増幅された(Fig.4)。このためハイブリダイゼーションを行わずともゲル電気泳動のみでCMV由来のPCRバンドが1本確認された(Fig.4A)。ハイブリダイゼーションをおこなってもこのバンドのみしか検出されず(Fig.4B)、ハイブリダイゼーションの必要性がないことが判明し、迅速診断が可能となった。

また、バックグラウンドの多い領域のPCRを行う際は、PCR感度をあげる目的でPCRサイクルを増加すると、特異バンドの検出はなおさら困難になる。その欠点を補う目的でnested PCRが行われる。この際すでにamplifyされているDNAの入ったチューブのキャップをあけて、新たにPCRの反応液を作製することが必要となる。すでにamplifyされたDNAで周囲を汚染する危険性があり、そのためfalse positiveを作るおそれがあり、またPCRを2回行うため時間的にも問題が残る。そのためなるべくnested PCRをおこなわないことを今回の目的とし、V領域プライマーを用いて、PCRサイクルを30、40、50回とし、バックグラウンドを検討した。その結果35~40サイクルでバンドがみられた検体でも50サイクルとしてもバックグラウンドの上昇はなかった(データ示さず)。また30、40サイクルでは不明瞭なバンドしか検出されないが50サイクルで明瞭に検出できる検体が見出されたが、バックグラウンドは上昇しなかった(Fig.5)。

そこでサンプルのコンタミの危険性をさげ、かつ感度をあげるためにPCRサイクル数は50に固定した。Taq polymeraseは92.5℃ 130分の加熱で50%失活、95℃ 40分で50%失活する⁸⁾。ゆえに我々のもちいた50サイクルでは92℃以上が加わるのは約100分間、94℃がくわわるのが50分間であるので、50サイクル後にもまだ十分にTaq polymerase活性が残存し、反応中にTaq polymerase

を新たに加える必要はないと考えられる。またこの方法で不顕性に感染している正常人のCMVを検出する可能性がないとも限らないが、正常人の血液由来のDNA20検体からはこの方法ではCMVが検出されなかった(データ示さず)。さらにCMVは尿にもっとも排出されている。尿検体で、今回開発した加熱法でCMV由来のPCR産物が増幅された(Fig.6)。よって加熱法を用いれば、検体処理にかかる時間を30分以内に短縮できた。したがって、PCRに要する約2.5時間が終われば、あとは電気泳動を30分行い、複雑な操作を必要とせずに4時間以内でCMV感染症の診断が可能となった。このため、CMV感染症が疑われた場合、数時間以内で確定診断ができると考えられる。以上より、我々の今回行った方法は臨床的にも応用できると考えられたため、骨髄移植時のCMV-IP発症の早期迅速診断に用い、早期治療に貢献しうることを期待している⁹⁾。このようにV領域プライマーを用いたPCRによるCMVのDNA診断は臨床にも有用な方法であった。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導頂きました、兵庫医科大学 遺伝学教室 古山順一教授、玉置(橋本)知子助教授、第2内科 金丸昭久助教授(現近畿大学医学部第3内科教授)、武元良整講師に深く感謝致します。

文 献

- 1) Meyers, JD., Flournoy, N. and Thomas, ED., *J. Infect. Dis.*, **153**, 478-488(1986)
- 2) Schmidt, GM. et al, *New Engl. J. Med.*, **324**, 1005-1011(1991)
- 3) Saiki, RK., Golfando, DH., Stoffel, S., Scharf, SJ., Higuchi, R., Horn, GT., Mullis, KB. and Ehrlich, HA., *Science*, **239**, 487-491(1988)
- 4) Michael, AI., Dacid, HG., John, JS. and Thomas, JW., *PCR Protocols*, Academic Press, Inc., Toronto, pp368-371(1990)
- 5) Sternberg, RM., Thomsen, DR. and Stinski, MF., *J. Virol.*, **49**, 190-199(1984)
- 6) Pande, HS., Baak, SW., Riggs, AD., Clark, BR., Shively, JE. and Zaia, JA., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 4965-4969(1984)
- 7) 母坪智行, 吉田幸一, 札幌医誌, **59**, 153-163(1990)
- 8) Michael, AI., Dacid, HG., John, JS. and Thomas, JW., *PCR Protocols*, Academic Press, Inc., Toronto, pp129-141(1990)
- 9) Takemoto, Y., Hashimoto, T., Eizuru, Y., Ogawa, A., Furuyama, J., Okada, M., Wada, H., Kanamaru, A., Kakishita, E. and Nagai, K., *J.J.A.Inf.D.*, **67**, 295-298(1993)