

論文の内容の要旨

論文題目：リアルタイム PCR 法を用いたサイトメガロウイルス遺伝子
定量の有用性に関する研究

指導教官： 木村 哲 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 吉田 敦 (41-87351)

1. はじめに

ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)は、広くヒトに感染している普遍的なヘルペスウイルスである。初感染時に単核球症を発症することがあるが、多くは不顕性感染で、生涯にわたって体内に潜伏・持続感染する。そして免疫低下時に再活性化し、体内に播種して、肺炎、網膜炎、食道炎、網膜炎等を発症する（日和見感染）。

このため特に immunocompromised host（易感染宿主）における重篤な日和見感染症が問題となるが、その際の HCMV 感染症の診断、治療およびその効果判定には難渋する場合が多い。これは確定診断できる手段が少なく煩雑なことや、治療効果を反映する指標が少ないためである。近年、HCMV の遺伝子検査法の検討が進み、その有用性が評価されたが、潜伏・持続感染と再活性化の区別が不十分である、測定が煩雑であるといった理由から、臨床応用された方法はなかった。

本研究では、近年開発され、簡便性、迅速性、再現性に優れる real-time PCR 法を用い、血液中の HCMV 遺伝子定量を行って、臨床的に有用な HCMV の遺伝子検査法の確立を試みた。

2. 対象患者と血中の遺伝子定量

易感染宿主として HIV 感染者 111 例，移植患者 6 例，免疫抑制薬投与中の患者 12 例，化学療法中のがん患者 1 例と，免疫低下のない入院患者 22 例，健常成人 26 人を対象とした．HCMV 感染症は Ljungman らの基準により診断した．HIV 感染者では免疫抑制の指標となる CD4 陽性リンパ球数も測定した．

血中 HCMV DNA の定量については，全血，血漿それぞれ 400 μ L から DNA を抽出し，HCMV genome の open reading frame US17 の一部を target として PCR 反応を行った．ABI PRISM[®] 7700 System を用い，PCR 増幅産物中の蛍光色素からの光量を測定し，HCMV DNA コピー数を算出した．なおこの際，サブクローニングした HCMV genome 断片の希釈系列を作成し，定量のスタンダードとした．

一部の検体については白血球中の HCMV mRNA の定量を行った．血中 mRNA の検出は，現在まで 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・半定量反応であるために，その意義には統一した結論がなかった．本研究では HCMV early gene を target として real-time RT-PCR 法を用い定量した．同時に GAPDH mRNA も定量し，得られた HCMV mRNA 値との比で示した．

3. HIV 感染者における HCMV 感染症の診断と血中 DNA 量

21 例で HCMV 感染症を認めた．111 例全例の CD4 陽性リンパ球数は 0.15 - 1030 [median: 32]個/ μ L，全血中 DNA は undetectable(UD) - 7.0×10^5 ，血漿中 DNA は UD - 1.3×10^5 コピー/mL であったが，CD4 陽性リンパ球数が少なく (<50 個/ μ L)，全血中，血漿中の DNA 量が多い例において，発症例を多く認めた．HCMV 感染症の有無と DNA 量の相関について，ROC curve を作成し，至適な cut-off line を全血中 DNA 量 3.0×10^3 ，血漿中 DNA 量 1.0×10^3 コピー/mL と定めると，診断の感度はそれぞれ 90%，85%，特異度は 87%，89%，positive predictive value (PPV)は 61%，65%，negative predictive value (NPV)は 98%，96%となった($p < .0001$)．よって診断に有用であることが明らかになった．なお健常人では全員定量限界 (200 コピー/mL) 以下ないし UD であった．

4. HIV 感染者における HCMV 感染症の推移と血中 DNA 量

診断例 14 例について，DNA 量を経時的に測定したところ，13 例で治療の奏功と臨床症状の改善に伴って DNA 量は低下し，最終的に定量限界以下となった．血漿中 DNA には全血中 DNA よりも早期に低下する傾向があり，全血中 DNA には病変が鎮静化してもしばらく検出される傾向があった．

5. HIV 感染者における HCMV 感染症の発症予知と血中 DNA 量

未発症である例が今後発症するリスクを、血中 DNA 量で判定できるかどうか検討を加えた。未発症例 47 例において、CD4 陽性リンパ球数、全血・血漿中 DNA 量を前向きに測定、追跡した。開始時の CD4 陽性リンパ球数は median 26 個/ μL であり、全血中 DNA 量は median 631、血漿中 DNA 量は median <200 コピー/mL であった。

7-751 [median: 53]日追跡したところ、10 例が 7-264[median: 66]日で発症した。発症時の CD4 陽性リンパ球数は median 12 個/ μL であった。発症例 10 例の DNA 量は、発症までに全血中 1.0×10^4 かつ血漿中 2.0×10^3 コピー/mL というレベルを超えていた。一方、経過中 DNA 量がこのレベルに達しなかった 33 例では発症はなかった。このレベルを発症予知に対する breakpoint として設定すると、breakpoint の感度は 100%、特異度は 89%、PPV は 71%、NPV は 100% となり ($p < .0001$)、良好な結果が得られた。

DNA 量増加の時期と発症時期との関係を見ると、(i) DNA 量の増加とほぼ一致して発症、(ii) DNA 量が増加し、ピークを過ぎて下降に転じてから発症、の 2 パターンがみられた。さらに全血中 DNA 量が先行して増加し、後に血漿中 DNA 量が増加して、発症に至る傾向があり、全血中 DNA 量は早期に鋭敏に増加する特徴を、血漿中 DNA 量は発症のリスクとより関連する特徴を有した。

6. HIV 感染者における HCMV 感染症と血中 HCMV mRNA 量

22 例から血液 71 検体を採取し、白血球中の HCMV mRNA 量を定量し、同時に測定した DNA 量と比較しつつ、臨床経過との関連を検討した。発症例 12 例中 11 例で診断時の mRNA 量が測定でき、うち 9 例で mRNA 量が増加していたが (DNA 量は 11 例全てで高値)、HCMV 感染症のない 10 例では 1 例を除いて UD であった。HCMV 感染症の臨床的改善に伴って mRNA 量は DNA 量よりも早く低下するケースが多かった。未発症例 11 例を追跡した場合には、4 例で発症がみられたが、mRNA を検出できたのは 2 例であり、発症のリスクとの相関性は DNA 量に比べ低かった。

7. HIV 感染者以外の易感染宿主における HCMV 感染症と血中 DNA 定量

移植患者の発症例 3 例、免疫抑制薬投与下の患者の発症例 4 例の全血、血漿中 DNA 量は $1.8 \times 10^3 - 6.8 \times 10^6$ 、 $4.8 \times 10^2 - 5.8 \times 10^6$ コピー/mL であり、高値であった。免疫低下のない入院患者の DNA 量は、ほとんどが定量限界以下ないし UD であった。

8. 考察

HCMV 感染症における遺伝子検査では、まず定性的 PCR 法が検討されたが、特異

度に劣り、疾患活動性の反映という点で不十分であった。次いで検討された定量的 PCR 法も、煩雑であるという欠点があった。近年開発された real-time PCR 法は、従来の定量的 PCR 法に比べ簡便性、迅速性に優れており、適切な cut-off 値を定めることができれば、これらの欠点を克服しうると予想した。実際第 3 章では、cut-off line 以上に血中の DNA 量が増加した HIV 感染者において、良好な感度、特異度で HCMV 感染症を診断できた。

次いで第 4 章では、治療の奏功と臨床的改善とともに DNA 量が減少し、最終的に定量限界以下になった。これは定性的 PCR 法の欠点を克服するものである。さらに臨床所見と DNA 量の比較から、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と推論した。

さらに第 5 章では HCMV 感染症の発症予知における DNA 量の breakpoint を設定した。DNA 量が breakpoint に達すると、以後の発症のリスクが大きくなっており、後に DNA 量が減少しても発症がおりうることも明らかになった。DNA 量が増加している時間（HCMV にさらされている時間）と発症とが相関する可能性が示唆された。また全血中、血漿中 DNA 量の時間的推移の比較から、発症前の DNA 量の増加のパターンが明らかにされ、全血中 DNA 量のみが増加者も発症予備群とでもいうべきグループであることが明らかになった。現在 HIV 感染者における HCMV に対する抗ウイルス薬の予防投与（1 次予防）は CD4 陽性リンパ球数に頼っており、不必要な投与がなされている可能性がある。本研究の所見が、リスクの高い症例に対するターゲットを絞った投与方法（pre-emptive therapy）の開発につながる可能性がある。

第 6 章での real-time RT-PCR 法による HCMV mRNA 定量は、診断や経過観察には比較的良好な成績をおさめたが、予知においては DNA 定量以上ではなかった。mRNA の増加は、HCMV の活動性の亢進をより鋭敏に反映するのであろうが、しばしば短期間におこるため、検査による捕捉が難しいのではないかと推測した。

また移植患者、免疫抑制薬投与下の患者においても、DNA 量の高値が HCMV 感染症の診断に役立つと考えたが、この場合障害される免疫機構の種類や程度が様々であり、病態毎に cut-off line を設定することが必要であろうと推論した。

9. 結論

real-time PCR 法による HCMV 遺伝子定量は、HCMV 感染症の診断、経過観察、予知に有用であり、今後、HCMV 感染症の遺伝子診断法における有用な一法となりうる。本法を使用することで、抗ウイルス薬の予防投与の開始時期等、臨床上有益な情報が得られるといえる。