The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Consensus primer PCR法を用いたヒトヘルペスウイルスの共通増幅とその臨床応用の検討
Author(s)	宮川, 広実
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42877
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【116】

氏　　名	宮川広実（みやかわひろみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15893　号
学位授与年月日	平成13年2月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Consensus primer PCR法を用いたヒトヘルペスウイルスの共通増幅とその臨床応用の検討
論文審査委員	（主査） 教　授　岡田伸太郎 （副査） 教　授　網野　信行　　教　授　山西　弘一

論文内容の要旨

[目的]

ヒトに感染するβヘルペスウイルスを共通増幅することを目的としたConsensus primer PCR法を開発し臨床応用の有用性について検討した。

[方法ならびに成績]

ヒトに感染するβヘルペスウイルスはサイトメガロウイルス（CMV）、ヒトヘルペスウイルス（HHV）-6、HHV-7である。これらのウイルスゲノムのなかで保存性の高い領域であるlate spliced gene領域にβヘルペスウイルスDNAを共通増幅することが可能なconsensus primerをforward側2種、reverse側2種の計4種設計した。増幅条件は、アニーリング温度を45℃に設定した緩やかな条件で増幅反応を実施した後、アニーリング温度55℃の厳しい条件で増幅させる2ステップのPCRサイクルを用いた。

最初にβヘルペスウイルス標準株から抽出したDNAを用いてPCR法を施行し、ウイルスDNAからの特異的な増幅を確認した。次に、この方法の臨床的な有用性を確認する為に、βヘルペスウイルスDNAの存在が明らかな患者末梢血単核球から抽出したDNAを用いて検討を行った。この結果臨床検体においてもconsensus primerによる増幅が認められ、その増幅産物はCMV、HHV-6、HHV-7各々に特異的に設計したプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションにより増幅されたウイルスの判別が可能であった。さらに増幅産物の塩基配列をダイレクトシークエンシング法を用いて解析した結果からも、目的のウイルスからの特異的な増幅であることが確認できた。

[総括]

ヘルペスウイルスは初感染後体内に潜伏感染し、宿主が免疫不全状態になると再活性化し様々な病態をひき起こす。なかでも、βヘルペスウイルスに属するCMVは間質性肺炎や腸炎等重篤な疾患の原因となることが知られている。CMVと同じくβヘルペスウイルスに属するHHV-6も免疫不全状態で再活性化がみられ、脳炎や骨髄抑制など関連する病態も報告されるようになってきた。移植患者や、AIDS患者においては、これらのβヘルペスウイルスの再活性化をモニタリングし、適切な時期に抗ウイルス剤をはじめとする治療を行うことが重要である。

ウイルスの検出法としては、従来のウイルス分離や抗体検索に加えて、近年PCR法や抗原血症法等が用いられるようになっている。これらの結果を指標にして、症状が出現する前に治療を開始するいわゆるpreemptive therapyが行われ、その有効性も確認されつつある。予防的な抗ウイルス剤の投与等治療の長期化に伴う薬剤耐性ウイルスの

出現が問題になっているが、ウイルスが検出された期間に限定して治療をするpreemptive therapyは治療期間を短縮するという意味でも有効であると言える。その為preemptive therapyの指標となる、より鋭敏で迅速に結果が得られるモニタリング法が開発されることが重要である。

今回開発したConsensus primer PCR法はβヘルペスウイルスに保存性の高い領域にプライマーを設定することで、これらのウイルスを特異的に同時に共通増幅する方法である。プライマーの設計の際には、ウイルス間でプライマーの塩基配列とのミスマッチ数に差が生じないこと、宿主であるヒトゲノムからの増幅を抑制することに特に留意した。増幅条件は、あらかじめプライマーの多少のミスマッチを許容する緩やかな条件で増幅反応を実施した後、さらにミスマッチを許容しない厳しい条件で増幅させる2ステップのPCRサイクルを採用した。これにより、ミスマッチを含むプライマーから、βヘルペスウイルスを特異的に共通増幅することが可能となった。この方法は少量のウイルスDNAを含む臨床検体に用いた検討でもヒトゲノムからの非特異的増幅はほとんど無く、標的ウイルスからの特異的な増幅が確認できた。複数のヘルペスウイルスを同時に高感度で検出できるこの方法は、従来の個々のウイルスを増幅して検出するPCR法と比較して結果に基づいた治療をより迅速に行えるという点で非常に有用と考えている。

論文審査の結果の要旨

この論文は、複数のβヘルペスウイルスを同時に高感度で検出できるPCR法について検討したものである。βヘルペスウイルスに保存されているlate spliced gene領域にヘルペスウイルスDNAを共通増幅させるconsensus primerを設計し、臨床検体に応用可能なPCRの系を開発した。ヘルペスウイルスには初感染後体内に潜伏するという共通する特徴があるが、この潜伏ウイルスは宿主の免疫不全状態に伴い再活性化し様々な病態を引き起こす。ウイルスの再活性化に伴う感染症は、HIV感染症や移植症例が増加している今日では非常に重要な問題であり、今後ヘルペスウイルス感染症の診断と治療がますます重要になると予測され、この方法の臨床的価値は高い。βヘルペスウイルスには移植後の感染症の原因ウイルスとして重要であるサイトメガロウイルスや、近年注目されているHHV-6が含まれており、PCR法などを用いた各々のウイルスのモニタリングは既に行われている。この方法を用いれば従来の方法に比較して簡便にウイルスの検出を行うことができる。またウイルス間で保存された領域を標的としてPCR法を利用するこの方法は、未知のウイルスも含めて検出する可能性もある。検出感度も1検体に10コピー以上ウイルスが存在している検体で検出が可能であり、感染症の予測に有用である。この論文は博士（医学）の学位授与に値するものと考える。