

Title	Monitoring of Human Cytomegalovirus Infections in Pediatric Bone Marrow Transplant Recipients by Nucleic Acid Sequence-Based Amplification
Author(s)	青野, 利哉
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42998">https://hdl.handle.net/11094/42998</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">こちら</a> 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

氏 名	あおのとしや 青野利哉
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 9 5 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 9 月 30 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	Monitoring of Human Cytomegalovirus Infections in Pediatric Bone Marrow Transplant Recipients by Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA 増幅法による小児骨髓移植患者におけるサイトメガロウイルス感染症のモニタリング)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 山西 弘一 (副査) 教 授 上田 重晴 教 授 生田 和良

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目的]

ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は、臓器移植患者や AIDS 患者などの免疫機能低下患者に、肺炎や網膜炎などの重篤な症状を引き起こすことが知られている。HCMV は一般に軽微に推移する初感染の後、潜伏感染することが知られており、HCMV 症の診断法としては単に高感度だけではなく、臨床症状を反映 (活動状態の HCMV のみを検出) することが要求される。

従来、HCMV の検査は培養法や抗体価の測定が主流であった。しかしながら、前者は迅速性に欠ける点、後者は免疫機能低下患者では測定結果が信頼性に欠ける点に問題があった。近年、PCR (polymerase chain reaction) 法の普及に伴い HCMV への適用も試みられているが、高感度な系では非活動的な潜伏状態の HCMV まで検出してしまう点、低感度な系では早期診断ができない点が問題となっている。一方、白血球中の HCMV 抗原をモノクローナル抗体により検出する抗原血症 (antigenemia) 検出法が広く利用されつつあるが、早期診断には感度が不十分なこと、材料 (血液) が多量に必要なこと、結果の判定が (特に小児では) 困難な場合があることなどが問題点として指摘されている。

そこで本研究では、高感度と臨床症状反映の 2 点を両立した HCMV 検出系を構築し、小児骨髓移植患者における HCMV 症のモニタリング実施した。

### [方法ならびに成績]

高感度化のためには遺伝子増幅法の利用が必要不可欠と考えられるが、潜伏感染をする HCMV の場合、ゲノム DNA を標的とする活動状態と非活動 (潜伏) 状態の区別がきわめて困難である。そこで、活動 HCMV の直接的な指標である mRNA を標的とし、なかでも、再活性化時特異的に大量に発現が誘導される  $\beta 2.7$  transcript を選択した。また、増幅法としては RNA を増幅するために至適化された NASBA 法を採用した。比較法としては HCMV DNA polymerase 遺伝子を標的とした single および nested PCR 法を用いた。

最初に、NASBA 法の基本的な増幅能力を single および nested PCR 法と比較した。合成核酸を標的とした絶対的

な感度試験では、NASBA 法は single PCR 法には優っていたが、nested PCR 法には劣っていた。しかしながら、実際の検体の状態を反映した HCMV 陽性検体の陰性検体による段階希釈の検出限界の比較では、NASBA 法は nested PCR 法と同等以上の感度を示した。さらに、HCMV 症の高感度検出で問題点となる潜伏 HCMV の検出による偽陽性の頻度について、健常成人より採取した血液を用いて調べた。その結果、nested PCR 法では 3% の偽陽性が認められたが、NASBA 法では nested PCR 法と同等以上の感度であるにもかかわらず偽陽性は 1 例も認められなかった。

次に、実際の臨床材料における検出成績を検討するために、20 例の小児骨髄移植患者より採取された 233 検体の測定を実施し、従来の臨床診断法を基準として PCR 法と比較した。single PCR 法は特異性が高かった (100%) ものの感度が 50% と低かった。このことから single PCR 法は確定診断には有用であるが、早期診断には不適と考えられた。反対に nested PCR 法は、感度は 100% であったが特異性は 67% であった。したがって、nested PCR 法は早期診断に使用できる可能性があるものの、偽陽性の問題もあり確定診断には不向きであると考えられた。一方、NASBA 法では、感度が 100%、特異性が 83% であり、高感度と臨床症状反映の 2 点が両立されていた。

HCMV 陽性症例の経時的解析では、NASBA 法では臨床症状の出現や PCR 法による検出にさきがけて HCMV の活動を検出することが可能であった。また、投薬による症状の改善ともよく相関していることから治療効果のモニタリングにも有用であることが示唆された。さらに検体量が少量 (0.1-1.0ml) で可能な点、骨髄移植直後の白血球数が非常に少ない状態でも検出が可能であった点などから、移植患者への負担も軽減できると考えられた。

[総括]

NASBA 法により、HCMV の mRNA をモニタリングする系を構築し、20 例の小児骨髄移植患者のモニタリングを実施した。従来の臨床診断法との比較において、感度が 100%、特異性が 83% と、高感度と臨床症状反映の 2 点を同時に満足させることができた。これらの結果より、NASBA 法を用いることで HCMV 症の早期診断、および治療効果のモニタリングをよりの確に行える可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は、臓器移植患者や AIDS 患者などの免疫機能低下患者に、肺炎や網膜炎などの重篤な症状を引き起こすことが知られており、今後とも最も警戒すべきウイルス感染症のひとつである。本研究では、NASBA 法により、活動 HCMV に特異的に発現が認められる  $\beta 2.7$  mRNA を測定することで、従来は困難であった高感度かつ臨床症状を反映した HCMV 感染症の検出を可能とした。その結果、HCMV 陽性症例の経時的解析においても、臨床症状の出現や他の方法に先がけて HCMV の活動を検出することができ、投薬による症状の改善もよく反映していた。

本研究の成果は、HCMV 感染症の早期診断、治療効果のモニタリングに有用であるばかりでなく、他の感染症の診断への応用、展開も期待でき、学位の授与に値すると思われる。