OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	骨髄移植後の活動性HHV-6感染評価のためのRT-PCR法の確立
Author(s)	指原, 淳志
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43752
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

【76】

氏名	指原淳志
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 16873 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学位論文名	骨髄移植後の活動性HHV-6感染評価のためのRT-PCR法の確立
論文審査委員	（主査） 教授 岡田 正 （副査） 教授 山西 弘一　教授 生田 和良

論文内容の要旨

【目的】

骨髄移植後のヒトヘルペスウイルス6活動性感染を正確に捉える方法を確立することを目的に検討を行った。

【方法ならびに成績】

大阪大学医学部附属病院小児科で骨髄移植を行った17例より移植後毎週採血を行い、一部はBoomらの方法で核酸を抽出、残りから末梢血単核球（PBMC）を分離した。抽出した核酸のうち全血10μl相当分を用い、HHV-6 U79/80領域mRNAを標的として逆転写42℃30分、cDNA変性95℃5分、PCRサイクル95℃1分、55℃1分、72℃2分を30サイクルでRT-PCRを行った。増幅産物はアガロースゲル電気泳動後特異的primerを用いたSouthern hybridization法により検出、確認した。また、別に分離したPBMC10^5個あたりのHHV-6 DNA量の半定量も同時に施行した。

17症例102検体で検査を行った結果、U79/80領域mRNAが検出されたのは8症例（47.1%）、この8症例全てで各々1回のみの検出（計8検体）であった。mRNAが検出された時のDNA量は、DNA半定量が出来なかった1検体を除く7検体中1000コピー以上が4検体（57.1%）、100から1000コピーが2検体（28.5%）、100コピー未満が1検体（14.3%）であった。逆にmRNAが検出されなかった94検体のうち、DNA半定量が出来なかったものは7検体、残る84検体中1000コピー以上であったものはなく、100から1000コピーは15検体（17.2%）、100コピー未満は72検体（82.8%）であった。100から1000コピーであった15検体のうち10検体には、それ以前にmRNA検出のエピソードがあった。

【総括】

HHV-6はCMV同様、骨髄移植後に致命的な疾患を引き起こすことが報告されている。こういったHHV-6による重篤な症状も、的確に診断しHHV-6に有効な抗ウイルス剤を早期から使用すれば、発症阻止や症状の軽減が大いに期待できる。それにもかかわらず、CMVに比較して再活性化を評価できる検査法は少ない。しかも、現在一般的なPBMCからDNAを検出する方法では、ウイルス量からその活動性を類推しなければならず、活動性か非活動性かを正確に見極めるのは困難であり、抗ウイルス剤の開始時期や中止のタイミングに苦慮することも多い。

今回我々が用いた方法は、ウイルス増殖時に出現するmRNAを捉えるもので、ウイルスの活動性を直接反映すると考えられる。本研究では骨髄移植後47.1%の患者に平均20.3日でHHV-6の増殖に関係するmRNAが検出された。これは従来の方法で報告されているHHV-6再活性化の率とほぼ同様の結果であり、再活性化を正確に検出するのに十分な感度があると考えられる。

また、mRNAが検出されるのは、ほとんどの場合でPBMC10^5個あたりウイルスDNA量が100copies以上の時であった。一般に無症候性のときは100copies未満であることが多いこと、またPBMC10^5個あたりのウイルスDNA量が1000copies以上検出され、再活性化が強く疑われるときはすべてmRNAが検出されていることなどから、ウイルスDNA量で再活性化が示唆される時期に一致してmRNAも検出されると考えられた。これはDNA量で判断する方法と比較しても、ウイルス増殖とmRNA検出が相関することを示唆している。

ウイルスDNAが100～1000copies検出されているにもかかわらず、mRNAは検出されなかった15検体のうち10検体に、先行するmRNA検出のエピソードがあった。これらは増殖後に沈静化したものの、PBMC中に留まっている非活動性のウイルスDNAを捉えていることに起因した現象であると考えられる。

mRNA検出時に一致した臨床症状は発疹、発熱が多く、間質性肺炎と肝機能障害が1例ずつ認められた。また、明らかな症状を示さなかったものは2例存在した。

臨床の場においては、今回の検討のようにHHV-6感染のモニタリングとしての有用性が期待できることに加え、活動性をよく反映すると考えられることを利用して、HHV-6感染を疑わせる症状が見られた時点での迅速診断にも利用可能で、抗ウイルス薬の投与開始、終了を判断するのに極めて有用であると考えられる。

以上より今回われわれが確立した方法は、従来の方法では困難であったHHV-6の活動性の判定に有用であり、骨髄移植後のHHV-6再活性化の的確な診断および適切な投薬のために重要な情報を与える、優れた検査法であると思われる。

論文審査の結果の要旨

この論文で報告され、検討されている新しいヘルペスウイルスの検出法は、従来のDNA半定量法では困難であったHHV-6の活動性感染を検出する優れた方法である。

HHV-6のU79/80遺伝子は感染後早期から大量のmRNAを産生すること、またこのmRNAにコードされるタンパクはHHV-6のDNA複製に関与すると考えられていることを利用し、骨髄移植後の患者17例で検討している。

その結果、そのうちの8例（47.1%）に中央値で18日目にU79/80領域mRNAが検出された。これは文献的にも、また同時に施行したDNA半定量法でも再活性化の率と時期に一致していた。さらに、非活動性と思われるウイルスは検出せず、活動性の感染だけを特異的に捉えていると考えられた。

潜伏しているHHV-6の再活性化に伴う感染症は、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る。副作用の強い抗ウイルス剤を使うべきか否かの検討の際などに重要な情報を与えるこの方法の臨床的価値は極めて高い。よって博士（医学）の学位授与に値するものと考える。