

Detection of Human Cytomegalovirus Genome from Blood of Newborns and Infants by Using Polymerase Chain Reaction

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8255

ポリメラーゼ連鎖反応法による新生児，乳幼児末梢血液中の ヒトサイトメガロウイルスゲノムの検出

金沢大学医学部小児科学講座（主任：谷口 昂教授）

大 野 一 郎

（平成3年1月23日受付）

ヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus, HCMV) は多数の人々に感染しその初感染は、多くの場合無症状に通過し潜伏感染へと移行する。しかし、胎児、未熟児や臓器移植患者など免疫不全状態にある宿主では多彩な症状を呈し、時には致死的になる。そのように臨床的に重要なウイルスであるにもかかわらず、培養系で増殖が遅いため臨床材料から検出することは困難である。本研究では、HCMV の初感染時期を調べるために、末梢血液細胞の HCMV ゲノムの保有状況を調べ、抗 HCMV 抗体価と比較検討した。HCMV ゲノムは末梢血液より抽出した DNA を使用し、HCMV の主要前早期抗原の一部435塩基対をポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) 法により増幅後、サザンブロットハイブリダイゼーション法にて検出した。PCR では0.1プラーク形成単位のウイルスの存在が検出可能であり、また他のヘルペス属ウイルスや HCMV 未感染細胞より抽出した DNA ではバンドはみられず、感度、特異性とも高かった。抗 HCMV 抗体価は酵素結合抗体免疫アッセイを用いて測定した。抗 HCMV 抗体陽性率は臍帯血および新生児で80~90%であった。その後抗体陽性率は減少し、生後5~6か月で33.3%と最低値をとるが、再び上昇し徐々に成人レベルに達した。HCMV ゲノムは臍帯血では検出されなかったが、生後5日目に29例中8例27.8%で検出された。抗体陽性率が減少するとともに HCMV ゲノムの検出率は上昇し、生後5~6か月で約50%の乳児の末梢血液で HCMV ゲノムが検出され、多くのものが新生児期から乳児期早期に感染していた。抗体陽性率が増加してくれると、それとは対照的に HCMV 検出率は減少し、成人では47例中2例 (4.3%) のみしか検出されなかった。更に、多数の新生児が HCMV ゲノムを有していたことから、母乳栄養を受けている経産分娩児 (生後5日目) と帝王切開分娩児 (生後6日目) の HCMV ゲノム検出率を比較した。前者が27.6%に対し、後者が4.8%で経産分娩児で有意に高く、多くの新生児が産道で HCMV の感染を受けていることが示唆された。

Key words human cytomegalovirus, polymerase chain reaction, primary infection, latent, infection, intra-cervical infection

ヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus, HCMV) は、広く人間社会に存在するヘルペス科 (Herpes viridae) のβ群 (Beta herpesviridae) に分類されるウイルスである^{1,2)}。その初感染は不顕性感染として経過することが多く、その後ヘルペス科ウイルスの特徴として持続感染や潜伏感染をきたし³⁾、Numaz-

aki ら⁴⁾によれば日本人の健康な乳児は、生後5~9か月の間に60%が尿または上気道にウイルスを排出し、健康な成人の80~90%近くがその抗体を有していると言われている。しかし、HCMV の病原ウイルスとしての意義は高く、胎児⁵⁾、未熟児^{6,7)}や免疫不全状態にある患者⁸⁾では、顕性化した場合には多彩な臨床症

Abbreviations: bp, base pair; early, E: EBV, Epstein-Barr virus; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid 2Na; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; HSV, herpes simplex virus; HCMV, human cytomegalovirus; HHV-6, human

状を呈し患者を死に至らしめることもある。特に臓器移植や悪性腫瘍の化学療法時などの免疫不全状態や輸血の際、体内に持続感染や潜伏感染により存在していたウイルスが再活性化することがあり臨床的に重要な問題になっている³⁰⁾。そのようなウイルス潜伏の場として唾液腺、腎臓などが推定されている³¹⁾が、HCMV 抗体陽性のものから抗体陰性のものに輸血すると感染する³⁰⁾ことより血液細胞も潜伏感染の場となっていると考えられる。しかし末梢血液中からのウイルスの分離の報告は少なく³⁾、わずかに Schrier³²⁾がインシチュアハイブリダイゼーション法を用いて抗体陽性の健康成人の末梢血リンパ球にウイルスが存在することを報告している。

近年、熱安定性の DNA ポリメラーゼと合成オリゴヌクレオチドのプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応法の開発により、微量な DNA を試験管内で大量に増幅させ、検出することが可能となった¹⁰⁾。ポリメラーゼ連鎖反応法は最近、感染症の診断ことにウイルスやマイコプラズマ、結核菌のような培養速度の遅い病原体や、培養困難な病原体の同定に応用されつつある¹⁰⁾⁻¹⁴⁾。本研究ではポリメラーゼ連鎖反応法を用いて、新生児、乳児を中心に末梢血液の HCMV ゲノム保有状況を調べ、抗 HCMV 抗体価と比較検討した。

対象および方法

I. 対象

金沢大学医学部付属病院または関連病院小児科においても乳児定期健康診査の際、発熱、肝脾腫、リンパ節腫脹、発育障害のないものから保護者の承諾を得て、静脈血を採取した。生後 5~6 日目の検体は異常を認めない新生児より、先天代謝異常スクリーニングの

際、保護者の承諾を得て、静脈血を採取した。臍帯血は正常分娩時に金沢日本赤十字病院及び聖霊総合病院産婦人科の協力により採取した。成人末梢血液は健康な有志者より採取した。

II. DNA の抽出

対象より得られた末梢静脈血を ethylenediaminetetraacetic acid 2Na (EDTA) を抗凝固剤として 1~2ml 採取した。採取後すみやかに遠心分離、血漿成分を抗体測定用に凍結保存、細胞成分に対しトリトン X-100 融解法¹⁰⁾にて DNA を抽出した。すなわち 4°C に冷やした細胞溶解液 (0.32M 白糖, 1% (V/V) トリトン X-100, 5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl (pH 7.5)) を 1ml 加え、2,500xg で 10 分間、4°C で遠心し核分画を得た。得られた核分画をオートクレーブ (120°C, 15 分間) した再蒸留水に浮遊後、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) を含む緩衝液 (0.2 M Tris-HCl (pH 7.5), 25mM EDTA, 0.3M NaCl, 2% SDS) 等容を加え、プロテイナーゼ K (80~100 μg/ml) を加え混和しながら 37°C で 12~24 時間処理した。等量のフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール液 (フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1) により抽出を 3 回繰り返し、更に等量のクロロホルム-イソアミルアルコール液 (クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1) で抽出を行った。水層に 2.2 溶のエタノールを加え DNA を沈殿させ、得られた DNA は 100 μl のオートクレーブした再蒸留水に溶かした。実験にはこの DNA の 1 μg をテンプレートとして使用した。

III. オリゴヌクレオチドプライマー

プライマーは、金沢大学遺伝子実験施設の DNA 合成装置 (Beckman Instrument, Inc., Palo Alto, CA,

Table 1. Sequence of synthetic oligonucleotide primers and its location in CMV genome

Primer*	Sequences (5'→3')	Length (bp)** of amplified product	Location in CMV genome***
Primer MIE-4	CCAAGCGCCTCTGATAACCAAGCC	435	731-755
Primer MIE-5	CAGCACCATCCTCCTCTTCTCTGG		1174-1150

*MIE, major immediate-early antigen region of CMV strain Towne.

**bp, base pairs.

***Expressed as nucleotide number; nucleotides are numbered sequentially within each gene.

herpes virus-6; immediate-early, IE; PBS, phosphate-buffered saline; late, L; PCR, polymerase chain reaction; pfu, plaque-forming units; SDS, sodium dodecyl sulfate; Taq, *Thermus aquaticus*; VZV, varicella-zoster virus

USA)にて合成し、NEN SORB PREP (E.I. du Pont de Nemours & Co., Inc., Boston, MA, USA)の使用説明書に従い、アンモニア処理、NENSORB PREP、高速液体クロマトグラフィーシステム (GILSON, Villierle Bel, France)でカラムM&Sパック C18 (エムエス機器株式会社、大阪)にて、移動相はA液を0.1 M 酢酸トリエチルアミン緩衝液加60%アセトニトリル、B液を70%アセトニトリルとし等速グラジエントにて溶出精製した。合成したプライマーは HCMV (Towne 株) の DNA のうち主要前早期抗原をコードする塩基配列の一部 (第4エクソンの一部)を増幅するもの¹⁶⁾であり、その塩基配列を表1に示す。このプライマーにより増幅される DNA は435塩基対である。

IV. プローブの作成

HCMV Towne 株 (金沢大学がん研究ウイルス部田中博士より供与) ウイルス液0.5ml に20% SDS を2.5 μ l, 0.5M EDTA (pH8.0) を5.0 μ l 加え68°Cで15分間熱したものをフェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿し¹⁷⁾乾燥後、10mM Tris-HCl (pH8.0), 1.0mM EDTA に溶解させた。これを以後陽性コントロールとして用いるとともにプローブの作成に用いた。この溶解液をテンプレートとし上記プライマーを用いて増幅し、増幅された DNA 断片を制限酵素 SmaI にて消化した。ベクター DNA pGEM-3Z (Promega, Corp., Madison, WI, USA) を同様に SmaI で消化した。これらを Blunt End Kit (宝酒造株式会社、京都)を用いてリゲーション反応し、塩化カルシウム法¹⁸⁾により *Escherichia coli* (*E. coli*) JM109 株をトランスフォームさせた。この *E. coli* を増殖させ、アルカリ融解法¹⁹⁾によってプラスミド DNA を回収し、制限酵素 EcoRI, BamHI で切断後、0.8%アガロースゲル電気泳動²⁰⁾にてインサートを分離した。分離した断片を DNA PREP (旭硝子株式会社、東京)にて抽出精製し、これをプローブとした。

V. ポリメラーゼ連鎖反応

ポリメラーゼ連鎖反応の反応液は 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001%ゼラチン、各オリゴヌクレオチドプライマー0.5 μ M, デオキシアデノシン 5'-三リン酸 (deoxyadenocine 5'-Triphosphate, dATP), デオキシシチジン 5'-三リン酸 (deoxycytidine 5'-Triphosphate, dCTP), デオキシグアノシン 5'-三リン酸 (deoxyguanosine 5'-Triphosphate, dGTP), デオキシチミジン 5'-三リン酸 (deoxythymidine 5'-Triphosphate, dTTP) (いずれも宝酒造) 各200 μ M, 検体 DNA 1 μ g にオートクレーブし

た再蒸留水で99.5 μ l とし、*Thermus aquaticus* (Taq) DNA ポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) 2.5単位 (0.5 μ l) を加え100 μ l とした。反応は DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus) を使用し、変性を94°C, 90秒間、アニーリングを65°C, 60秒間、DNA の伸長を72°C, 90秒間としこれを1サイクルとして40サイクル行った。

VI. 増幅された DNA の検出

上記反応後 1/10量の緩衝液²⁰⁾ (0.25%プロモフェノールブルー, 0.25%キシレンシアノール FF, 15%フィコール400 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)) を加え1.0%アガロースゲル電気泳動²⁰⁾を行った。その後 Southern 法²¹⁾に準じて以下のようにトランスファーを行った。泳動終了後のゲルを0.5M NaOH 加1.5M NaCl 水溶液に浸し30分間室温でゆっくり振盪させ、これを2回行うことで DNA を変性させた。さらに 1.5M NaCl 加 1M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) の水溶液に浸し30分間室温で2回ゆっくりし振盪し中和を行った後、0.45 μ m ニトロセルロースメンブレンフィルター (東洋濾紙株式会社、東京) に 20xSSC (3M NaCl, 0.3M ぐえん酸ナトリウム) を使ってトランスファーした。トランスファー後のフィルターは室温で風乾した後、真空オーブンで80°C 2時間ベイキングし、DNA を固定した。

ハイブリダイゼーションによる検出はジゴキシゲニン ラベリング及び検出キット (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) を使用した。フィルターを68°Cで1時間以上プレハイブリダイゼーション後ジゴキシゲニン標識プローブを 50ng/ml 含むハイブリダイゼーション液で68°C, 16時間ハイブリダイゼーションを行い、洗浄後添付文書に従い呈色反応を行った。

VII. ヒト抗ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)

IgG 抗体価の測定

ヒトの血漿中の抗 HCMV IgG 抗体価は酵素結合抗体免疫アッセイによって測定した²²⁾。

MRC-5 細胞 (国立衛生試験所、細胞バンク、東京より供与) を75cm²細胞培養フラスコ (Costar, Cambridge, MA, USA) にて、培養液 {2mM グルタミン, 0.15%炭酸水素ナトリウム, 5%非働化牛胎児血清 (heat-inactivated fetal bovine serum, FBS) (Gibco laboratories, Grand Island, NY, USA) を含むイーグル MEM 培地「ニッスイ」 (日水製薬株式会社、東京)} で、細胞がコンフルエントに達するまで静置培養した。培養液を吸引後、FBS を含まない培養液で細胞を洗浄し HCMV Towne 株を1時間炭酸ガス培

養器 (株式会社トミー精工, 東京) (37°C , $5\% \text{CO}_2$) で, 感染価 (multiplicity of infection, MOI) を 1 以上にして, 吸着させた. そこに FBS 含有培養液を加え炭酸ガス培養液で静置培養 (37°C , $5\% \text{CO}_2$) した. その後 3~4 日間に 1 度の割合で培養液を半量ずつ交換し, 90% 以上の細胞が特徴的巨細胞変性した状態 (約 10 日後) で細胞をラバーポリスマン (Costar, Cambridge, MA, USA) にて剥して回収した. 得られた細胞を 0.1M リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) で 3 回洗浄した後 5×10^8 細胞/ml に調整して, 0.1M PBS に浮遊, 凍結融解を 3 回繰り返して $1,200 \times g$, 10 分間遠心した上清を抗原として用いた. 対照として HCMV 非感染細胞も同様に処理した.

抗原を pH9.6 の 0.02% アジ化ナトリウム含有 0.05M 炭酸緩衝液で $1/200$ に希釈し, E.I.A. 用 96 穴平底マイクロタイトレーションプレート (大日本製薬株式会社, 大阪) に 0.15ml ずつ加えて, 室温で 2 時間コーティングした. ついで, 0.02% アジ化ナトリウム含有 PBS 液 (0.02% sodium azide added PBS, PBSA) に 0.05% Tween 20 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) を加えた溶液 (PBSA-Tween) で 3 回洗浄し, 1% FBS 加 PBSA-Tween で段階希釈したヒト被検血漿を 0.1ml ずつ加えて, 2 時間室温で反応させた. 反応終了後 PBSA-Tween で 3 回洗浄

し, さらに, 1% FBS 加 PBSA-Tween で 1000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Tago, Inc., Burlingame, CA, USA) を 0.1ml ずつ加えて, 2 時間室温で反応させた. その後, PBS-Tween で 3 回洗浄し, 最後に pH9.8 のジエタノールアミン緩衝液で p-nitrophenyl phosphate (Sigma) を 1mg/ml に調整したものを 0.1ml ずつ加えて, 室温で 30 分間から 1 時間反応発色させた. 呈色反応を吸光度計 EAR400 (Slt-labinstruments, Austria) により波長 492nm で測定し, 抗原側の吸光度より対照側の吸光度を減じた. 10 名以上からなるヒトブール血清の吸光度を 1.0 として被検血漿の抗 CMV 抗体価を算出した.

VIII. 統計学的処理

経産分娩児と帝王切開児の HCMV ゲノムの検出率の差異は χ^2 検定によった.

IX. 試薬類

特に会社名の記載のないアガロースおよび各種制限酵素は, 宝酒造株式会社の製品を使用した. またこれ以外の試薬で特に会社名の記載のないものは, いずれも和光純薬株式会社 (大阪) 試薬特級を使用した.

各種制限酵素の反応液組成については, 酵素を購入した際ついてくる添付書を参考にした.

成 績

I. PCR 法の感度

供与された細胞を含まない HCMV Towne 株ウイルス液は 2.8×10^7 プラーク形成単位 (plaque-forming units, pfu)/ml であった (金沢大学がん研究所ウイルス部門, 田中博士により測定). これを 15 分間煮沸し段階希釈したものを $10\mu\text{l}$ ずつポリメラーゼ連鎖反応にかけた. ポリメラーゼ連鎖反応液のうち $10\mu\text{l}$ を 1.0% アガロースゲルにて電気泳動し, ゲルを Ethidium bromide で染色後 302nm の紫外線照射下で観察したものと, 同ゲルをサザンプロットハイブリダイゼーションしたものを図 1 に示す. Ethidium bromide 直接染色では 0.1 プラーク形成単位まで検出可能出あり, さらにサザンプロットハイブリダイゼーションを行うことにより, より明確に検出できることがわかった.

II. ポリメラーゼ連鎖反応法の特異性

反応に用いたプライマーとプローブの特異性を調べるために, 他のヘルペス属のウイルスを用いた. 単純ヘルペスウイルス I 型 (herpes simplex virus, HSV-I, HF 株), 単純ヘルペスウイルス II 型 (HSV-II, 169 株), 水痘帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus, VZV, 河口株) (いずれも金沢大学がん研

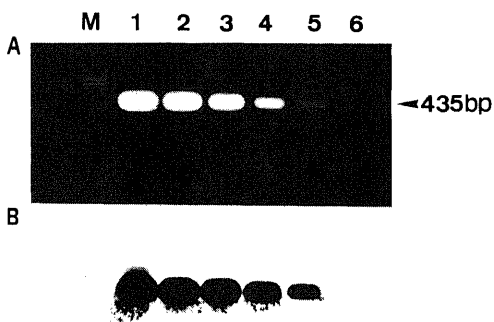


Fig. 1. Dilution experiment determining the sensitivity of PCR. Cell-free purified HCMV (2.8×10^7 pfu/ml) was boiled for 15 minutes, then serially diluted and applied in the PCR mixture. A, ethidium bromide staining of the gel; B, Southern analysis detected by using digoxigenin detection kit. Lane M, molecular weight makers, λ DNA digested by HindIII; lane 1, 2.8×10^4 pfu applied; lane 2, 2.8×10^3 pfu; lane 3, 2.8×10^2 pfu; lane 4, 1.0 pfu; lane 5, 0.1 pfu; lane 6, 0.01 pfu. PCR amplification had a sensitivity of 0.1 pfu. bp, base pairs.

究所ウイルス部門、佐藤博士より供与)、ヒトヘルペスウイルス-6 (human herpes virus-6, HHV-6, FG 106株) (藤田保健衛生大学小児科、浅野善造博士より供与) 感染培養細胞または培養上清を、10分間煮沸し短時間遠心後上清 $10\mu\text{l}$ をポリメラーゼ連鎖反応にかけた。エプスタイン-バーウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) のゲノムを保有する2つの培養細胞株、Daudi, Raji 株より通常の方法でDNAを抽出し $0.5\mu\text{g}$ をポリメラーゼ連鎖反応にかけた。またHCMV未感染の巨細胞変性を示さないMRC-5細胞のDNA $0.5\mu\text{g}$ をポリメラーゼ連鎖反応にかけた。HSV-I, HSV-II, VZV, HHV-6各ウイルス株、及びDaudi, Raji, MRC-5各細胞株からはいずれも増幅されたDNAは検出されなかった。

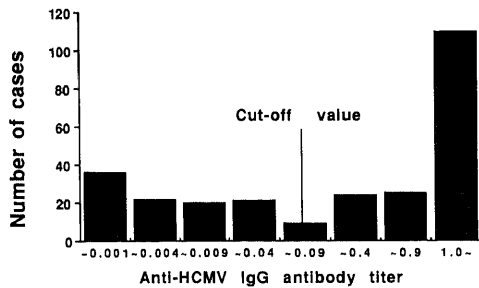


Fig. 2. Distribution of anti-HCMV-IgG antibody in plasma and cut-off value. The antibody was determined by ELISA. They formed two groups (positive and negative) across the cut-off value.

III. 抗 HCMV 抗体価の年齢による推移

酵素結合抗体免疫アッセイ法によって得られた HCMV 抗体価につき、図2に示すごとく度数分布をとった。抗体価は0.04以下と0.1以上の2群に分かれ、このあいだに抗体陽性と陰性のカットオフ値を定めた。なおこの間に存在する9検体については判定保留とした。こうして定めた抗体陽性者の各年齢群の頻度を追跡してみた。表2に示すごとく臍帯血及び新生児期には母体からの移行抗体を持ち抗体保有率は極めて高く、月齢が進むに従い漸次抗体保有率は減少し生後5~6か月で33.3%と最低となった。その後再び上昇し、1歳台になるまでには約60%のものが抗体を保有する様になり、7歳以降に次第に成人レベル(約90%)になるのがわかった。

IV. PCR 法による末梢血液中 HCMV ゲノムの検出頻度の年齢による推移

対象より得られたDNAをポリメラーゼ連鎖反応法により増幅したものを1.0%アガロースゲル電気泳動後、Ethidium bromide 染色し302nmの紫外線照射下に観察したもの、及びサザンブロットハイブリダイゼーションしたものを示す。図3に示すごとく435塩基対の位置にバンドがみられた。ハイブリダイゼーションすることによりバンドの検出の特異性と感度が上がった。

こうして HCMV ゲノムの検出率を月齢別に追ってみた、表3に示すごとく臍帯血からは HCMV ゲノムは検出されなかったが、生後5日目の経膈分娩児の血液からは既に約30%のものにゲノムが検出された。そ

Table 2. Incidence of anti-HCMV IgG antibody in various age group

age groups	Number of plasma samples tested	Number (%) of anti-HCMV IgG antibody positive plasma*
Cord	15	14 (93.3)
5-6 days	50	41 (82.0)
1-2 months	18	13 (72.2)
3-4 months	19	14 (76.9)
5-6 months	21	7 (33.3)
7-8 months	20	9 (45.0)
9-11 months	18	9 (50.0)
1 year	18	10 (55.5)
2-6 years	20	13 (65.0)
7-15 years	19	13 (68.4)
Adult	20	18 (90.0)

*Plasma anti-HCMV antibody was determined by ELISA. Antibody titers were measured with standard pool sera as 1.0. Titer of greater than 0.1 was taken as positive.

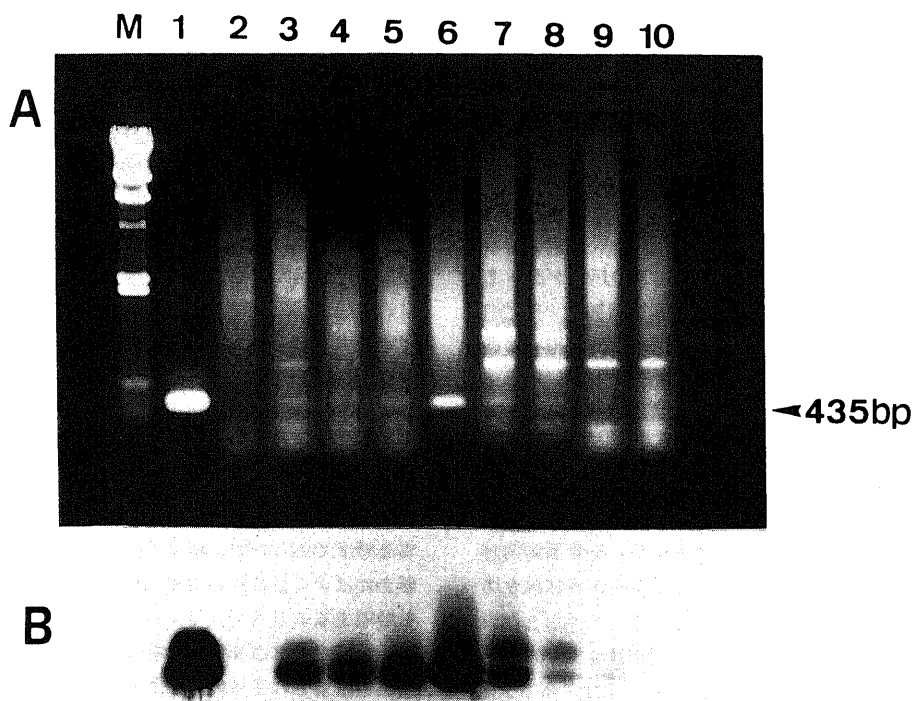


Fig. 3. Analysis of various DNA samples by PCR and electrophoresis. Lane M, molecular weight marker, λ DNA digested by HindIII; Lane 1, amplified DNA from HCMV Towne strain virion; Lane 2~10, PCR product of nine DNA samples from individuals of various age. A, ethidium bromide staining of the gel; B, Southern analysis detected by digoxigenin system. Amplified DNA could be clearly detected by Southern blot hybridization. bp, base pairs.

Table 3. Frequency of HCMV genome in blood detected by PCR amplification at various age groups

age groups	Number of blood samples tested	Number (%) of HCMV genome positive blood*
Cord	15	0 (0.0)
5-6 days	29	8 (27.6)
1-2 months	18	7 (35.0)
3-4 months	19	8 (45.0)
5-6 months	21	10 (47.6)
7-8 months	20	7 (35.0)
9-11 months	18	6 (33.3)
1 year	18	5 (27.8)
2-6 years	20	3 (15.0)
7-15 years	19	2 (10.5)
Adult	47	2 (4.3)

*One μ g of DNA extracted from peripheral blood was amplified in 100 μ l PCR mixture. Ten- μ l aliquots of PCR product were electrophoresed and transferred to nitrocellulose filter. The HCMV DNA was detected by using digoxigenin hybridization method.

の後検出率は月を追ってゆくに従い上昇し、生後5～6か月で約半数のものに HCMV ゲノムが検出された。しかし1歳より突然検出頻度が低下し2歳以降成人も検出頻度は極めて低かった。

V. 抗 HCMV 抗体保有率とポリメラーゼ連鎖反応による HCMV 検出頻度の比較

上記両者を比較すると図4に表すごとく、ちょうど逆の関係になった。すなわち母体由来の抗体が減少するとともに HCMV ゲノムの検出率は増加し、自己により抗体を産生するようになるとゲノムの検出率は低下していった。

VI. 経膈分娩児と帝王切開児のゲノム保有率の比較

生後5日目で既に HCMV ゲノムの保有が認められるものが存在することより、HCMV の感染経路の一つとして産道が考えられたため、生後5日目の経膈分娩児と生後6日目の母乳栄養をされている帝王切開分娩児とで末梢血液中の HCMV ゲノムの保有状況を比

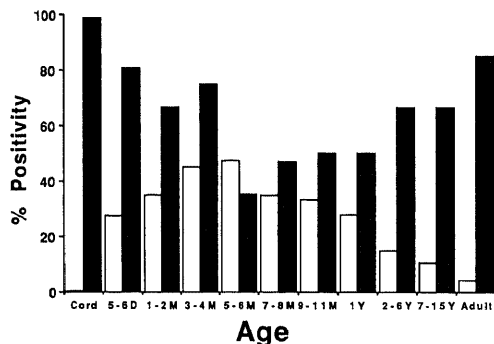


Fig. 4. Incidence of HCMV genome and anti-HCMV-IgG antibody in blood in various age groups. HCMV genome was detected by PCR and Southern analysis, anti-HCMV-IgG antibody was determined by ELISA. □, % of positivity of HCMV genome; ■, % of positivity of anti-HCMV antibody.

較した。表4に示す様に経膈分娩児では29名中8名に HCMV ゲノムが検出され、帝王切開分娩児では21名中1名に検出されたのみで、 χ^2 検定で危険率5%以下で経膈分娩児で有意に検出率が高かった。

考 察

HCMV は β ヘルペスウイルスに属し分離、同定には従来長い時間を要していた²⁾。しかし近年分子生物学的手法が感染症の診断に導入され、ウイルス核酸を対象とする DNA 診断の発達によりこの点を克服出来るようになった²⁰⁾⁻²²⁾。ことにポリメラーゼ連鎖反応法は迅速にきわめて微量のウイルス DNA の存在を確認できるため、HCMV をはじめ様々なウイルス感染の診断に用いられる様になってきている¹¹⁾¹²⁾²⁰⁾²⁷⁾。検体の処理方法についてもポリメラーゼ連鎖反応法はきわめて高感度であるため、用いる試料は簡単に DNA を処理すればよく、細胞に単に加熱処理を加え目的 DNA を増幅することも可能であったかもしれない。しかし末梢血液中にはさまざまな物質が含まれポリメラーゼ活性が阻害される可能性もあり、またヘルペスウイルスのコピー数は生体内では一般に少ないことが多く、加熱処理のみでは不十分と思われた。今回の実験では EDTA 採血のうえ充分溶血させ、できるだけ赤血球を除きプロテインアーゼK処理をし、フェノール/クロロホルムで抽出する一般的な DNA 精製方法を採用した。さらにヘパリンは Taq ポリメラーゼ活性の阻害作用が強いという報告²⁸⁾もあり、今回採用した方法は適当なものであったと思われる。

一方 HCMV の遺伝子およびその産物は前初期 (immediate-early, IE), 初期 (early, E), 後期 (late, L) の3段階に分けられ IE 蛋白質が E 遺伝子を、E 蛋白質が L 遺伝子の発現を誘導するといった段階的な制御をうけている²⁹⁾。本実験で増幅した部位は IE の一部であり、もしここに変異があるとそれ以降のウイル

Table 4. Evidence for intra-cervical infection with HCMV

Mode of delivery	Number of cases tested	Number (%) of HCMV genome positive cases*
Vaginal	29	8 (27.6)
Caesarean	21	1 (4.8)**

*HCMV DNA in blood was detected by PCR and Southern blot hybridization. Vaginally delivered newborns were 5 days old and newborns delivered by Caesarean section were 6 days old.

** $P < 0.05$ (Chi-square test)

ス遺伝子の発現が起こらないと言った可能性があり、変異が比較的多いとされる HCMV の遺伝子間で比較的高率に保存されている領域^{30,31})と思われる。また HCMV ゲノムはヒトゲノムと相同な部分もあるが、この領域では相同性は報告されていない^{32,33})。さらに Rice ら³⁴)によると血液細胞中での HCMV の発現は IE 遺伝子のみであるとされ、Demmler ら¹⁶)により既にその有用性が報告されていることより、今回用いたプライマーの組合せはこの実験に適当であったと思われる。

今回の実験で第一に興味あることは、1歳以下の乳児では非常に高率に HCMV ゲノムが検出されたということである。これまでに末梢血液細胞からの HCMV の分離は Diosi ら³⁵)が35例の抗体陽性健康人から2例分離している報告のほかには類似の報告はなく、さまざまな研究者により1,500例以上にわたり検討されたが、いずれも分離はされていない³)。Spector ら³⁶)は DNA-DNA ハイブリダイゼーション法を用いて41名の抗体陽性の供血者から3名の HCMV DNA 保有者を検出しているが、やはり成人では頻度は非常に低い。またこれまでにポリメラーゼ連鎖反応法を用いて HCMV を検出しているものは主として先天性感染児、骨髄移植患者、後天性免疫不全患者の尿や組織を用いているもの^{16,37-39})であり、Shibata ら³⁷)はポリメラーゼ連鎖反応法で15名の抗体陽性健康な供血者の末梢血液中、1名も HCMV ゲノムを検出できなかったとしている。今回の実験でも成人の HCMV ゲノム検出率はきわめて低くこれらの結果に一致している。しかし Schrier ら⁹)はインシチュアハイブリダイゼーション法で健康な抗体陽性者の末梢血液単核細胞の0.3~2.0%に HCMV のメッセンジャー RNA の転写を認めており、かつ輸血による HCMV 感染症も存在することから成人では HCMV ゲノムが末梢血液から全く消失するのではなく、ポリメラーゼ連鎖反応法の限界以下に HCMV のコピー数が減少するのかもしれない。これに対し約40%の乳児の血液から HCMV ゲノムが検出されたという事実は非常に高頻度であると言える。免疫能が未熟な乳児では HCMV の初感染が起こると、ウイルスの排除ができないため無症状ではあっても末梢血液中に多数の HCMV DNA のコピーが存在するのかもしれない。Numazaki ら⁴)の報告では5~9か月には60%の頻度で上気道、尿から HCMV が分離されるが、それが1歳以後に激減している。この原因は不明であるとしているが、今回の HCMV ゲノムの検出頻度も5か月以後1歳になるまでは高率であったが1歳台を過ぎると激減

していた。図4に示すごとく抗体保有状況とあわせて考えると、この減少は抗 HCMV 抗体が自己により産生されることに一致しており特異抗体の有無もその現象の原因のひとつかも知れない。

次に今回の研究の興味あることの一つは、生後5日目の新生児の末梢血液中に既にウイルスゲノムが検出され、経膈分娩児のほうが同時期の帝王切開分娩児に比べて有意に高率であったということである。HCMV は広く世界に蔓延しているがその感染頻度、感染経路は地域によりまた社会経済上の状態により異なる¹⁰)。わが国では地域により多少の差はあるが、成人の80~90%以上のものが抗体を保有しており⁴⁰)、これは欧米の30歳以上の成人と同程度である⁴¹)。しかしわが国においてはここでも示した様に、1歳迄に約半数以上のものが感染を受けているのに対し、欧米では抗体保有率が上昇してくるのは青年期以降になってからである⁴¹)。わが国でのこの様に早い時期からの感染経路としては、従来より産道感染、母乳を通じての感染といった垂直感染の経路があげられていた⁴)。これまでの研究によると妊娠第3期の妊婦の11~28%で子宮頸管から HCMV が分離されたという報告⁴²⁻⁴⁴)や、抗体陽性者の母乳から13~32%の割合で HCMV が分離されたという報告⁴⁵⁻⁴⁷)がみられる。今回、経膈分娩児を調べた結果、約30%のものに HCMV ゲノムが検出された。これは産道感染を強く示唆するものであり、また感染後きわめて早く流血中にウイルスが広がっていることを示す。また母乳栄養をされている生後6日目の帝王切開分娩児からは21例中1例のみにしか HCMV ゲノムが検出されなかったということは、この時期には母乳は感染経路としてあまり重要ではないということを意味し、Numazaki ら⁴)の意見と一致している。

本邦においては HCMV はおもに産道感染することを再確認するとともに、多数の乳児が1歳迄に初感染を受け、感染後、無症状ではあっても一過性にウイルスが流血中にかなりの頻度で存在することがわかった。さらに抗体の産生、免疫能の発達により多くは1~2歳以降にポリメラーゼ連鎖反応の検出限界以下に減少していくのであろう。

結 論

健康新生児、乳幼児、小児を中心に抗 HCMV 抗体価を酵素結合抗体免疫アッセイ法で測定するとともに、末梢白血球につきポリメラーゼ連鎖反応を用いて HCMV ゲノムの保有状況を調べたところ以下の結論を得た。

1. 抗 HCMV 抗体は臍帯血で100%近く陽性であったが、生後5~6か月まで陽性率は低下し、その後月齢が進むにつれ陽性率は上昇していった。

2. HCMV ゲノムは生後5日目の新生児の約30%で末梢血液にも認められ、抗体保有率の減少とともにその検出率は上昇し、生後5~6か月では約半数のものが、末梢血液に HCMV ゲノムを保有していた。その後抗体陽性率が増加してくると、検出率は低下し2歳以降では検出率は約10%となり、成人ではきわめて検出率は低かった。

3. 経陰分娩児と帝王切開分娩児の HCMV ゲノムの保有率を比較すると経陰分娩児のほうが有意に高く、HCMV の産道感染が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、研究の御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部小児科学講座谷口 昂教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、直接御指導頂きました横井 透助手はじめ小児科第7研究室の皆様、小泉晶一講師、宮脇利男講師ならびにご協力頂きました小児科教室員の皆様に深謝いたします。

さらに貴重な細胞を提供頂いたJCRB 細胞バンク、各種ウイルスを提供頂いた藤田保健衛生大学小児科浅野善造博士、金沢大学がん研究所ウイルス部門の皆様、ならびに快く臍帯血を提供くださった金沢聖霊総合病院産婦人科大下陸郎先生、金沢日本赤十字病院産婦人科病棟の皆様深く御礼申し上げます。なお、本論文の要旨は第22回日本小児感染症学会(東京)にて発表した。

文 献

- 1) Weller, T. H.: The cytomegaloviruses: Ubiquitous agents with protean manifestations. *N. Engl. J. Med.*, **285**, 203-214, 267-274 (1971).
- 2) Roizman B., Carmichael, L. E., Deinhardt, F., de-The, G., Nahmias, A. J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M. & Wolf, K.: Herpesviridae, definition, provisional nomenclature, and taxonomy. *Intervirology*, **16**, 201-217 (1981).
- 3) Forbes, B. A.: Acquisition of cytomegalovirus infection: an update. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2**, 204-216 (1989).
- 4) Numazaki, Y., Yano, N., Morizuka, T., Takai, S. & Ishida, N.: Primary infection with human cytomegalovirus: virus isolation from healthy infants and pregnant woman. *Am. J. Epidemiol.*, **91**, 410-417 (1970).
- 5) Weller, T. H. & Hanshaw, J. B.: Virologic

and clinical observations on cytomegalic inclusion disease. *N. Engl. J. Med.*, **266**, 1233-1244 (1962).

6) Ballard, R. A., Drew, W. L., Hufnagle, K. G. & Riedel, P. A.: Acquired cytomegalovirus infection in preterm infants. *Am. J. Dis. Child.*, **133**, 482-485 (1979).

7) Yeager, A. S., Palumbo, P. E., Malachowski, N., Ariagno, R. L. & Stevenson, D. K.: Sequelae of maternally derived cytomegalovirus infections in premature infants. *J. Pediatr.*, **102**, 918-922 (1983).

8) Onorato, I. M., Morens, D. M., Martone, W. J. & Stansfield, S. K.: Epidemiology of cytomegalovirus infections: Recommendations for prevention and control. *Rev. Infect. Dis.*, **7**, 479-497 (1985).

9) Schrier, R. D., Nelson, J. A. & Oldstone M. B. A.: Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science*, **230**, 1048-1051 (1985).

10) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffe, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491 (1988).

11) DeRossi, A., Amadori, A., Chico-Bianchi, L., Giacchino, C., Zaccchello, F., Buchbinder, A., Wong-Staal, F., Gallo, R. C. & Peckham, C. S.: Polymerase chain reaction and in-vitro antibody production for early diagnosis of paediatric HIV infection. *Lancet*, **2**, 278 (1988).

12) Shibata, D. K., Arnheim, N. & Martin, W. J.: Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.*, **167**, 225-230 (1988).

13) 米川博通, 多屋長治: 実験動物野のための微生物モニタリング—マイコプラズマについて. *実験医学*, **8**, 1192-1196 (1990).

14) Brisson-N, A., Gicquel, B., Lecossier, D., Levy-F, V., Nassif, X. & Hance, A. J.: Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet*, **2**, 1069-1071 (1989).

15) Vandenplas, S., Wild, I., Rabie, A., Brebner, K., Ricketts, M., Wallis, G., Bester, A., Boyd, C. & Mathew, C.: Blot hybridization analysis of

- genomic DNA. *J. Med. Genet.*, **21**, 164-172 (1984).
- 16) **Demmlere, G. J., Buffone, G. J., Schimbor, C. M. & May, R. A.**: Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J. Infect. Dis.*, **158**, 1177-1184 (1988).
- 17) **Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J.**: Extraction of Bacteriophage DNA. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1st ed., p85, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- 18) **Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J.**: Transformation by the Calcium Chloride Procedure. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1st., p250-251, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- 19) **Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J.**: Harvesting and Lysis of Bacteria, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1st ed., p89-91, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- 20) **Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J.**: Agarose Gel Electrophoresis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1st ed., p150-172, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- 21) **Southern, E. M.**: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- 22) **Sarov, I., Andersen, P. & Andersen, H. K.**: Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of IgG antibodies to human cytomegalovirus. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, **88**, 1-9 (1980).
- 23) **Chou, S. & Merigan, T. C.**: Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization. *N. Engl. J. Med.*, **308**, 921-925 (1983).
- 24) **Virtanen, M., Syaenen, Ann-C., Oram, J., Soederlund, H. & Ranki, M.**: Cytomegalovirus in urine: Detection of viral DNA by sandwich hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **20**, 1083-1088 (1984).
- 25) **Buffone, G. J., Schimbor, C. M., Demmler, G. J., Wilson, D. R. & Darlington, G. J.**: Detection of cytomegalovirus in urine by nonisotopic DNA hybridization. *J. Infect. Dis.*, **154**, 163-166 (1986).
- 26) **Buchbinder, A., Josephs, S. F., Ablashi, D., Salahuddin, S. Z., Klotman, M. E., Manak, M., Krueger, G. R. F., Wong-Staal, F. & Gallo, R. C.**: Polymerase chain reaction amplification and in situ hybridization for the detection of human Blymphotropic virus. *J. Virol. Methods*, **21**, 191-197 (1988).
- 27) **Kaneko, S., Miller, R. H., Feinstone, S. M., Unoura, M., Kobayashi, K., Hattori, N. & Purcell, R. H.**: Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**, 312-316 (1989).
- 28) **Beutler, E., Gelbart, T. & Wanda, K.**: Interference of heparin with polymerase chain reaction. *Biotechniques*, **9**, 166 (1990).
- 29) **Griffiths, P. D. & Grundy, J. E.**: Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *Biochem. J.*, **241**, 313-324 (1987).
- 30) **Akrigg, A., Wilkinson, G. W. G. & Oram, J. D.**: The structure of the major immediate early gene of human cytomegalovirus strain AD 169. *Virus Res.*, **2**, 107-121 (1985).
- 31) **Pritchett, R. F.**: DNA nucleotide sequence heterogeneity between the Towne and AD 169 strains of cytomegalovirus. *J. Virol.*, **36**, 152-161 (1980).
- 32) **Peden, K., Mounts, P. & Hayward, G. S.**: Homology between mammalian cell DNA sequences and human herpesvirus genomes detected by hybridization procedure with high-complexity probe. *Cell*, **31**, 71-80 (1982).
- 33) **Rueger, R., Bornkamm, G. W. & Fleckenstein, B.**: Human cytomegalovirus DNA sequences with homologies to the cellular genome. *J. Gen. Virol.*, **65**, 1351-1364 (1984).
- 34) **Rice, G. P. A., Schrier, D. R. & Oldstone M. B. A.**: Cytomegalovirus infects human lymphocytes and monocytes: Virus expression is restricted to immediate-early gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 6134-6138 (1984).
- 35) **Diosi, P., Moldovan, E. & Tomescu, N.**: Latent cytomegalovirus infection in blood donors. *Br. Med. J.*, **41**, 660-662 (1969).
- 36) **Spector, S. A., Rua, J. A., Spector, D. H. & McMillan, R.**: Detection of human cytomegal-

ovirus in clinical specimens by DNA-DNA hybridization. *J. Infect. Dis.*, **150**, 121-126 (1984).

37) **Shibata, D., Martin, W. J., Appleman, M. D., Causey, D. M., Leedom, J. M. & Arnheim, N.**: Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.*, **158**, 1185-1192 (1988).

38) **Cassol, S. A., Poon, Man-C., Pal, R., Naylor, M. J., Culver-James, J., Bowen, T. J., Russell, J. A., Krawetz, S. A., Pon, R. T. & Hoar, D. I.**: Primer-mediated enzymatic amplification of cytomegalovirus (CMV) DNA. Application to the early diagnosis of CMV infection in marrow transplant recipients. *J. Clin. Invest.*, **83**, 1109-1115 (1989).

39) **Jiwa, M., Steenbergen, R. D. M., Zwaan, F. E., Kluin, P. M., Raap, A. K. & van der Ploeg, M.**: Three sensitive methods for the detection of cytomegalovirus in lung tissue of patients with interstitial pneumonitis. *Am. J. Clin. Pathol.*, **93**, 491-494 (1990).

40) **西川健一**: 輸血とEB・サイトメガロウイルス感染症. *小児内科*, **21**, 389-394 (1989).

41) **沼崎義夫**: CMV の疫学-WHO の調査報告. *臨床*

とウイルス, **7**, 267-269 (1979).

42) **Montgomery, R., Youngblood, L. & Medearis, D. N. Jr.**: Recovery of cytomegalovirus from the cervix in pregnancy. *Pediatrics*, **49**, 524-531 (1972).

43) **Reynolds, D. W., Stagno, S., Hosty, T. S., Tiller, M. & Alford, C. A. Jr.**: Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N. Engl. J. Med.*, **289**, 1-5 (1973).

44) **Stagno, S., Reynolds, D., Tsiantos, A., Fuccillo, D. A., Smith, R., Tiller, M. & Alford, C. A. Jr.**: Cervical cytomegalovirus excretion in pregnant and nonpregnant women.: Suppression in early gestation. *J. Infect. Dis.*, **131**, 522-527 (1975).

45) **Hayes, K., Danks, D. M., Gibas, H. & Jack, I.**: Cytomegalovirus in human milk. *N. Engl. J. Med.*, **287**, 177-178 (1972).

46) **Stagno, S., Reynolds, D. W., Pass, R. F. & Alford, C. A.**: Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.*, **302**, 1073-1076 (1980).

47) **Dworsky, M., Yow, M., Stagno, S., Pass, R. F. & Alford, C. A.**: Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics*, **72**, 295-299 (1983).

Detection of Human Cytomegalovirus Genome from Blood of Newborns and Infants by Using Polymerase Chain Reaction Ichiro Ohno, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **100**, 204—215 (1991)

Key words human cytomegalovirus, polymerase chain reaction, primary infection, latent infection, intra-cervical infection

Abstract

The majority of persons become infected with human cytomegalovirus (HCMV) at sometime during their life. Although primary infections with HCMV are usually asymptomatic, followed by latent infection, in certain immunocompromised patients such as organ transplant recipients, fetus and preterm newborns, infections may result in severe and various sequelae and can sometimes be fatal. Despite such clinical importance, detection of this virus from clinical specimens is usually difficult because of its low replication rate. The present study was performed to document the occurrence of primary infection with HCMV. The presence of the HCMV genome in peripheral blood was examined, and compared with the data of anti-HCMV antibody. To detect the virus genome, DNA was extracted from peripheral blood and used as a template in the polymerase chain reaction (PCR), which amplified 435 base pairs at the major immediate-early antigen region in the HCMV gene. After PCR amplification, the amplified products were analysed by Southern blot hybridization. The PCR had a sensitivity of 0.1 plaque forming unit, and no band was noted in other herpesviridae or mock infected cell DNA. The PCR had high sensitivity and specificity. Anti-HCMV antibody was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The positive rate of the antibody in cord blood and during the neonatal period was about 80~90%, the rate fell down to 33.3% at 5~6 months of age and increased again gradually to adult level. Though HCMV genome was not detected in cord blood, 27.6% of 5 day-old newborns already possessed the virus genome. The positivity of the HCMV genome in the peripheral blood increased to about 50% by 5~6 months of age with the decrease of the antibody positivity. Many infants acquired the HCMV genome around the neonatal period or in early infancy. Subsequently, the positivity of the HCMV genome decreased in contrast with the increase of the antigen positivity, only 2 out of the 47 adult cases studied (4.8%) possessed HCMV genome. Furthermore, since so many newborns had HCMV genome, 6 day-old breast fed newborns delivered by Caesarean section and 5 day-old breast fed vaginally delivered newborns were compared for the possession of HCMV genome. The positivity of HCMV genome in the vaginally delivered newborns was significantly higher compared to the newborns by Caesarean section. This fact suggested the possibility of intra-cervical infection.