

## 腎移植患者 17 例における血中サイトメガロウイルスの PCR による検出とその臨床的意義

松本 雅 則・藤 村 吉 博・辻 内 智 美・島 正 幸  
下 山 丈 人・成 田 亘 啓・小 林 恵 子<sup>\*4</sup>・吉 田 佳 嗣<sup>\*1</sup>  
谷 口 繁 樹<sup>\*1</sup>・北 村 惣 一 郎<sup>\*1</sup>・米 田 龍 生<sup>\*2</sup>  
平 尾 佳 彦<sup>\*2</sup>・吉 田 克 法<sup>\*3</sup>・岡 島 英 五 郎<sup>\*2</sup>

### PCR-detection of Cytomegalovirus in 17 Patients with Renal Transplantation

Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Tomomi Tsujiuchi, Masayuki Shima,  
Taketo Shimoyama, Nobuhiro Narita, Keiko Kobayashi<sup>\*4</sup>, Yoshitsugu Yoshida<sup>\*1</sup>,  
Shigeki Taniguchi<sup>\*1</sup>, Soichiro Kitamura<sup>\*1</sup>, Tatsuo Yoneda<sup>\*2</sup>,  
Yoshihiko Hirao<sup>\*2</sup>, Katsunori Yoshida<sup>\*3</sup>, Eigoro Okajima<sup>\*2</sup>

*Department of Blood Transfusion, <sup>\*1</sup>Department of Surgery III, <sup>\*2</sup>Department of Urology  
and <sup>\*3</sup>Department of Dialysis, Nara Medical University  
<sup>\*4</sup>Pharmaceutical Research Laboratory, Kirin Brewery Co., Ltd.*

### 【Summary】

Reinfection or reactivation of cytomegalovirus (CMV) is a critical issue to determine the prognosis in patients who received renal transplantation. In this study, therefore, we have examined a total of 259 buffy coat-derived DNA specimens from 17 renal transplant-recipients by nested PCR. Of these patients, 9 were received the transplantation during February 1986-January 1993, and 8 after this period. In the former "long-term observed" patients, 3 out of 9 showed sporadic positive results on CMV-PCR at the period between 14 months and 3-2/3 years after the transplantation, but without significant clinical manifestations. In the latter "short-term observed" patients, 7 out of 8 indicated frequent positive results (34 in 108 specimens, 31.5%) on CMV-PCR within 8 weeks after the transplantation. One case of the latter, with persistent positive results on CMV-PCR soon after the transplantation, died of interstitial pneumonia. Throughout these experiments, all the buffy coat specimens from 25 healthy labo-workers showed consistently the negative results on CMV-PCR. Thus, it is clear that a high risk of severe CMV infection remains within the first 8 weeks after the renal transplantation.

**Key words :** Renal transplantation,  
CMV,  
PCR

奈良県立医大 輸血部

<sup>\*1</sup>同 第3外科

<sup>\*2</sup>同 泌尿器科

<sup>\*3</sup>同 人工透析部

<sup>\*4</sup>キリンビール(株)医薬探索研究所

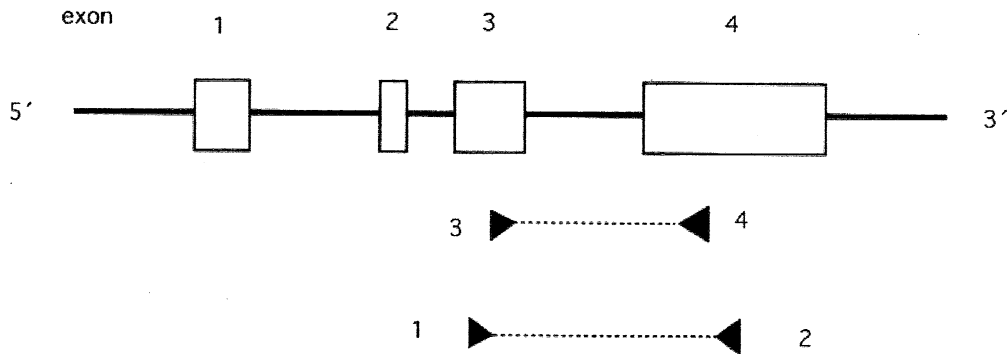
(1995・2・10 受領)

(1995・6・23 受理)

### I. はじめに

免疫抑制剤投与下にある骨髄・臓器移植患者においてはサイトメガロウイルス(以下CMV)感染症が最も頻度が高く、重篤な経過をたどることにより、臨床問題となることが多い<sup>1-4)</sup>。従来CMV感染の診断法と

## Human cytomegalovirus major immediate early gene



primers(20mer oligonucleotides) by Dr.Yamane

1:TTGGCCGAAGAATCCCTCAA

2:GGAGCACTGAGGCAAGTTCT

3:CAAGTGACCGAGGATTGCAA

4:TTAGGGAAGGCTGAGTTCTT

図 1 PCR のデザインおよびプライマー

して血清学的方法やウイルス分離などが主として用いられてきたが、検出時間や感度の問題より迅速な診断方法とはいえ、近年、polymerase chain reaction(以下 PCR)を用いた CMV 検出法が確立され、その有用性が報告されている<sup>5-8)</sup>。今回われわれは、当院で経験した腎移植患者 17 例において、血中 CMV の推移を PCR を用いて観察し、興味ある知見を得たので報告する。

## II. 方 法

### 1. デザインおよびプライマー選択

PCR で増幅する部位はウイルス株間での相同性が高い CMV major immediate early (IE) gene を用いた山根<sup>9)</sup>の報告に基づき、図 1 に示す 4 種のプライマーを作成し nested PCR にて行った。

### 2. 検 体

9 ml の全血に 1 ml のクエン酸を加え、3,000 回転、15 分間遠心し buffy coat を分離後、TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) にて 4 回洗浄した。このペレットを、それぞれ最終濃度が 0.5% SDS と 142 μg/

表 1 対象腎移植患者

No.	性別	移植時年齢	移植年月日	提供者	PCR の回数
1	男	39	94. 5. 3	死体	28
2	男	46	94. 4.21	死体	16
3	男	34	94. 4.17	死体	24
4	男	40	93.11. 3	死体	17
5	男	41	93.10. 2	死体	34
6	男	45	93. 9. 6	死体	22
7	女	37	93. 7.20	父親	15
8	男	41	93. 4.20	母親	24
9	男	31	93. 1.15	死体	9
10	女	45	92. 3. 8	死体	9
11	女	27	91.11. 6	母親	12
12	男	35	91. 9. 6	死体	13
13	男	39	90. 8. 7	死体	8
14	男	43	90. 2.17	死体	7
15	男	13	89.12. 5	母親	7
16	男	34	89. 4.22	死体	9
17	女	35	86. 2.25	父親	5

ml のプロテナーゼKに再懸濁し、37°Cで12時間から24時間インキュベーションした。その溶液に、フェノールを等量加え vortex 後、12,000 回転 10 分遠心し、上清を回収した。続いてフェノール：クロロフォルム：イソアミルアルコール (25:24:1) 混合液を用いて、同様の操作を2回行って、上清を回収した。得られた上清よりDNAをエタノール沈殿させ、蒸留水にて100 µg/ml の濃度となるように調製した。

### 3. Nested PCR

抽出したDNA 3 µl, 10×PCR 緩衝液 [150 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 500 mM Tris-HCl (pH 8.8), 80 mM

MgCl<sub>2</sub>, 2 mg/ml 牛血清アルブミン, 112 mM 2-mercaptoethanol] 10 µl, 各 2.5 mM のデオキシヌクレシド三リン酸 10 µl, 20 µM 各 primer 2.5 µl および 2 units の Taq DNA polymerase を加えて全量 100 µl とした。第2回目のPCRは、第1回目のPCR産物の3 µl を使用した。

Nested PCR の条件は、第1回目、第2回目ともに denature 94°C 1分, annealing 55°C 2分, polymerization 72°C 3分の25サイクルであった。

### 4. 判定

増幅したDNAを10 µg/ml ethidium bromide 存

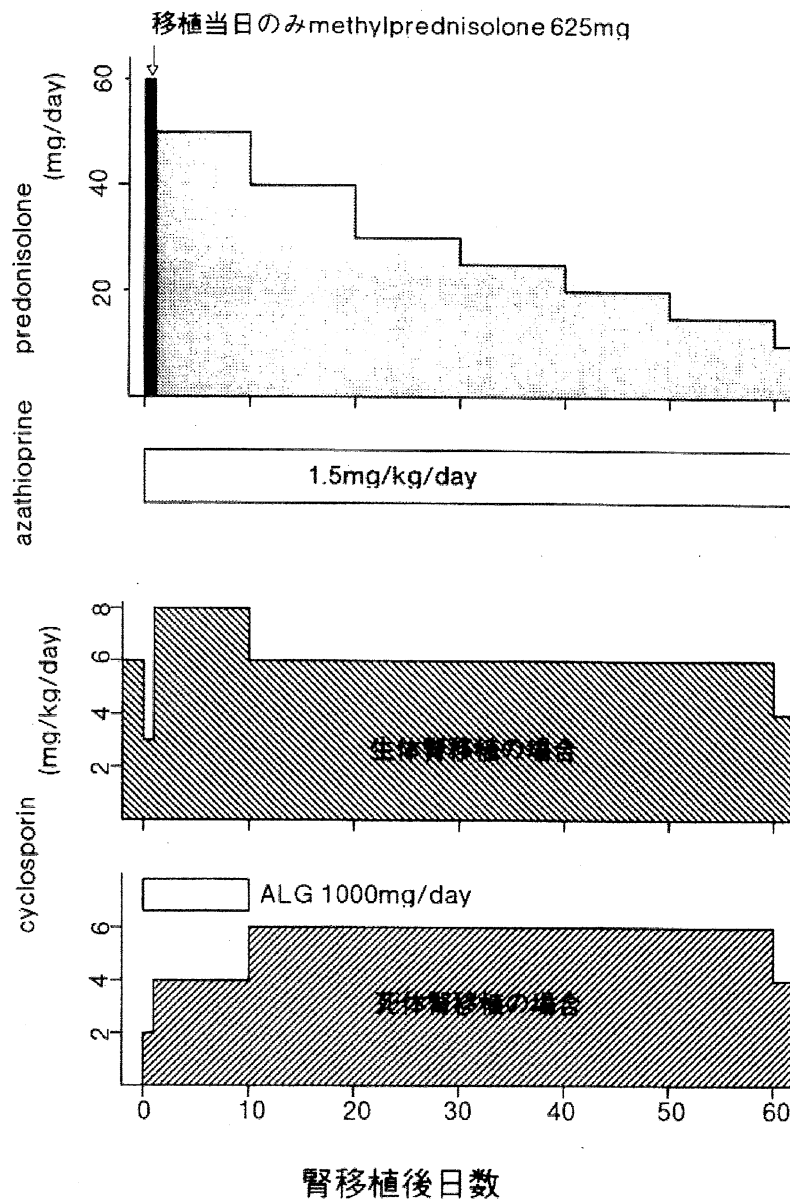


図2 腎移植後の免疫抑制療法

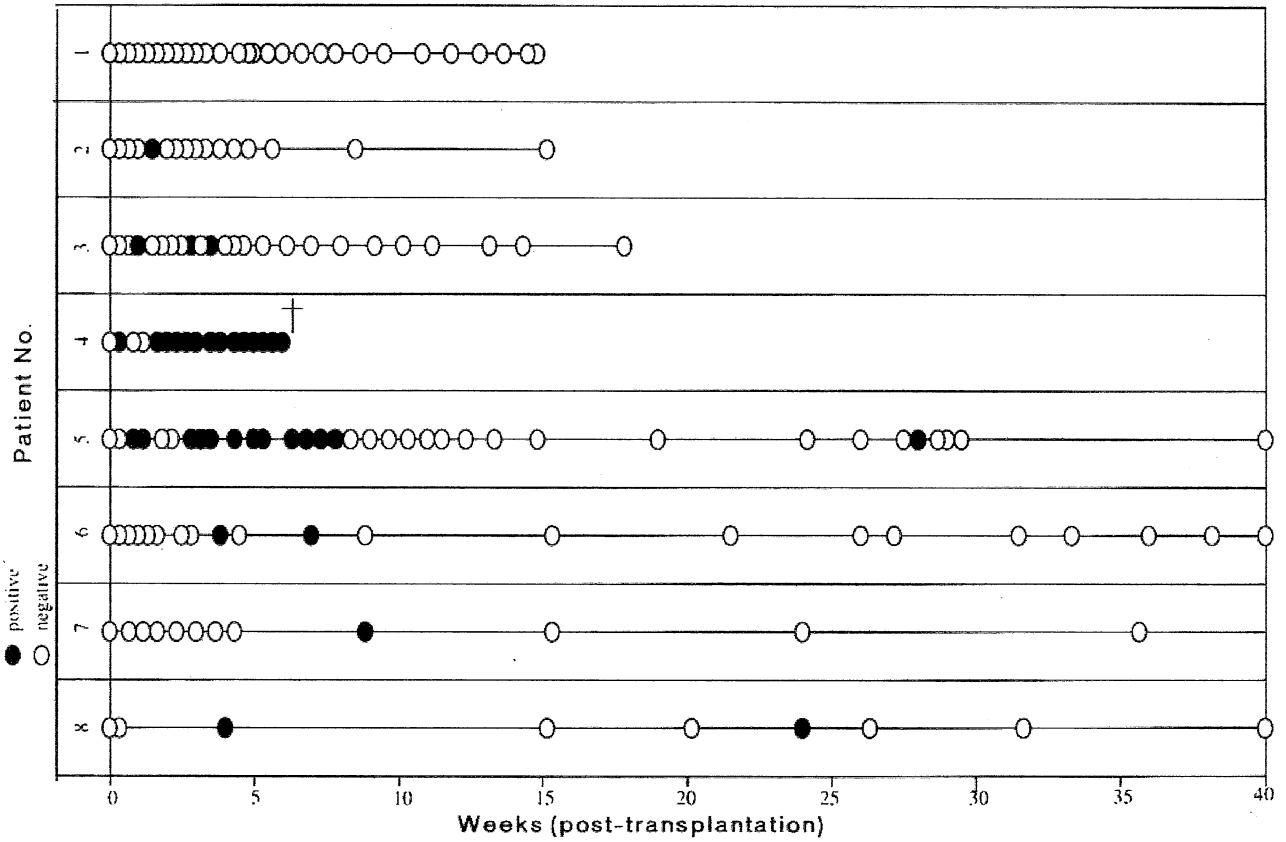


図 3 腎移植後の CMV-DNA の PCR の結果 (I)

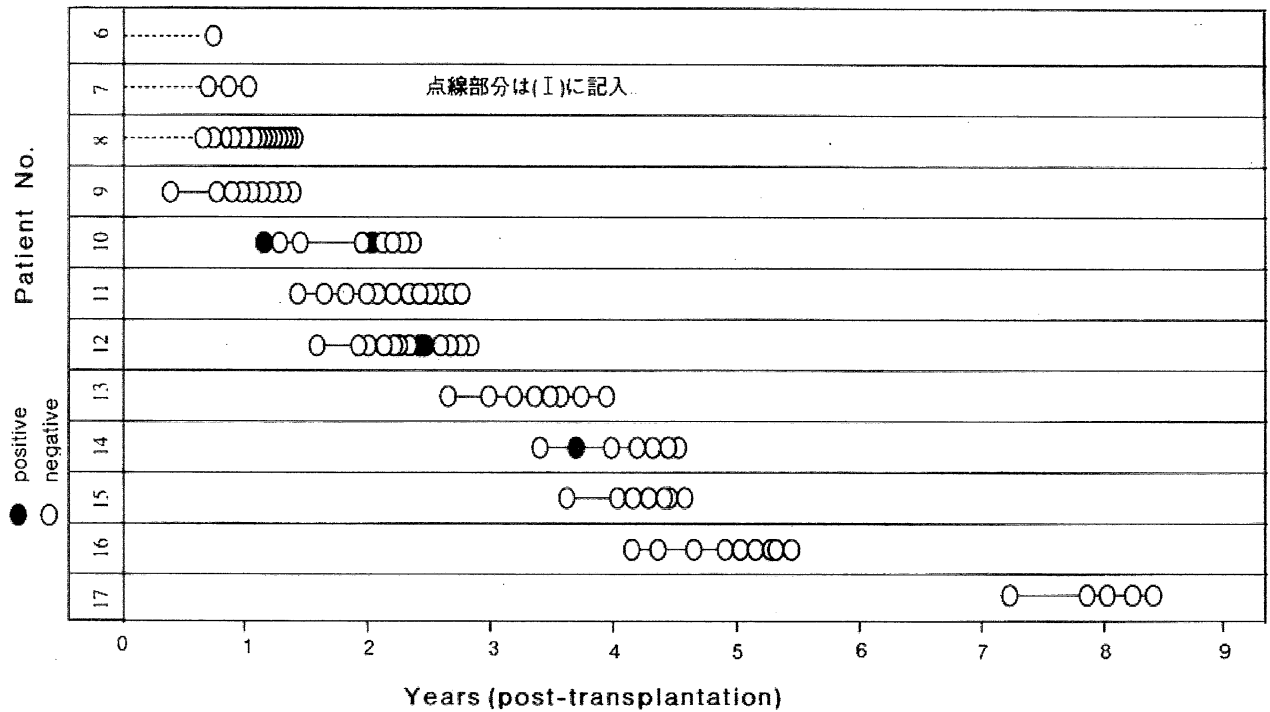


図 4 移植後の CMV-DNA の PCR の結果 (II)

在下, 2%アガロース電気泳動し, 636 bp にバンドが検出されたものを CMV 陽性と判定した。

### 5. CMV 抗体価測定

補体結合反応による抗体価 (CF 抗体価) および酵素免疫測定 (EIA) 法による IgG, IgM の各抗体価は SRL 社にて行った。

### III. 対象症例

対象症例は 1986 年 2 月より 1994 年 5 月まで奈良県立医科大学附属病院泌尿器科にて腎移植を施行された 17 例 (男性 13 例, 女性 4 例) で, 年齢は 13~46 歳で, 生体腎移植 5 例, 死体腎移植 12 例であった (表 1)。腎移植後の免疫抑制療法は図 2 に示すように, 原則として生体腎移植の場合, cyclosporin, azathioprine, steroid の 3 剤併用が, また死体腎移植の場合はこれに anti-lymphocyte globulin (ALG) を加えた 4 剤併用が施行された。

移植症例 17 例中, PCR 法による検査を移植直後より施行したのは 8 例で, 残りの 9 例は移植後約 6 カ月~6 年 4 カ月経過後に施行している。PCR 法による検査の回数は, 1 症例につき 5~34 回, 平均 15.2 回で総回数は 259 回であった。

なお, PCR 法による検査の施行についてはすべて患者の同意を得て行った。

### IV. 成績

腎移植直後より CMV-PCR を追跡しえた 8 症例 (症例 1~8) の結果を図 3 に, その他 9 症例 (症例 9~17) の結果を図 4 に示す。

図 3, 4 に示すごとく, PCR 検査 259 回の中で陽性を示したのは計 40 回で, そのほとんどが腎移植 8 週以内に認められた。移植後 8 週以内では 8 症例中 7 症例 (87.5%) 108 検体中 34 検体 (31.5%), それ以降では 12 症例中 3 症例 (25.0%), 151 検体中 6 検体 (4.0%) に PCR 陽性を認めた。なお, 健康成人 25 例においても PCR 検査を施行したが, すべて陰性であった (図 5)。また, 移植前に PCR を行っているのは症例 6, 7, 8 のみであるが, すべて陰性であった。PCR 陽性検出時期と CMV 抗体価の変化および臨床症状について, 表 2 に示す。

症例 1 は, PCR 陽性および CMV 抗体価の変化ともに認めなかった。症例 2 は, PCR が一度陽性を呈したが, 有意な抗体価の変化および臨床症状は認めなかつ

た。症例 3 は移植後 4 週までに 3 回 PCR が陽性になっている。詳細は図 6 に示すが, 移植後 37°C 台の微熱および移植 2 週目頃より汎血球減少を認め, 免疫抑制剤の変更が行われた。移植後 7 週目に EPO, G-CSF を使用し, 汎血球減少は軽快した。また, 移植後 6 週目頃より, 3 種類の CMV 抗体価は有意に上昇した。症例 4 は, 移植後 51 日目に間質性肺炎にて死亡した。死亡直前には連続して PCR 陽性となった。CMV 抗体価は CF, IgG, IgM とも明らかな上昇はみられなかったものの, PCR が連続して陽性となった頃より, 発熱および胸部レントゲン上の陰影が出現した。症例 5 は, 移植後 8 週目頃まで連続して PCR 陽性であったが, その後は陰性となった。図 7 にその経過を示すが, PCR 陽性時期に一致して発熱がみられている。CMV 抗体価は移植前には, CF, IgG とも陰性であったが, 移植後 33 日目に両者とも陽性となり, また移植後 40 日目には IgM も陽転し, 初感染例と判断した。なお, 症例 4, 5 において, CMV 高力価ではない pH 4 処理酸性人免疫グロブリンを使用した。症例 6, 7, 8 については, PCR 陽性および CMV 抗体価の上昇を認め

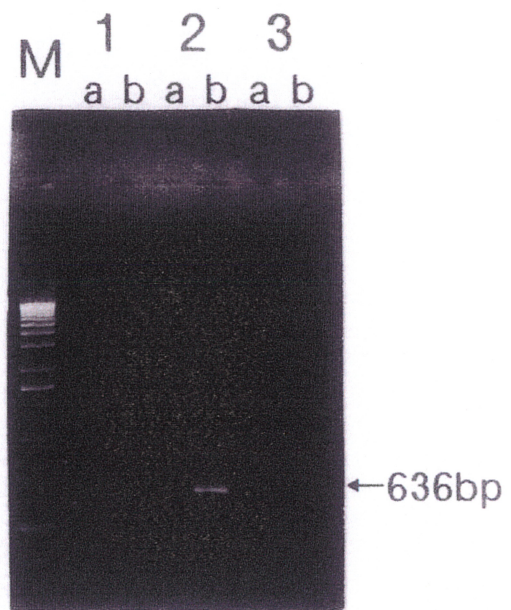


図 5 アガロースゲル電気泳動

M=分子量マーカー (1 Kb DNA Ladder)  
1. 正常人 2. 陽性者 3. 陰性者  
a. 1st PCR 産物  
b. 2nd PCR 産物  
陽性者の 2nd PCR 産物のみ 636bp のバンドを認めた。1st PCR 産物は他の陽性者においても明らかなバンドは認めなかった。

表 2 CMV 感染症の診断

No.	PCR陽性 検出 <sup>1)</sup>	CMV抗体価		CMV感染症に関 する臨床症状 <sup>3)</sup>
		CF抗体または IgG抗体価上昇 <sup>2)</sup>	IgM抗体 検出	
1	—	—	—	—
2	14日	—	—	—
3	4日	64日	43日	発熱、汎血球減少症
4	2日	—	—	発熱、肺炎（死亡）
5	4日	33日	40日	発熱
6	28日	49日	—	—
7	56日	—	58日	—
8	27日	114日	114日	—

(移植後日数)

- 1) 最初の陽性検出（移植前PCRは、症例6,7,8は陰性。他は不明）
- 2) 抗体陽転あるいは4倍以上の抗体価の上昇
- 3) 不明熱、白血球減少症、血小板減少症、白血球増多症、肺炎、網膜炎、肝炎、消化管潰瘍、臍炎、腎症（文献13）

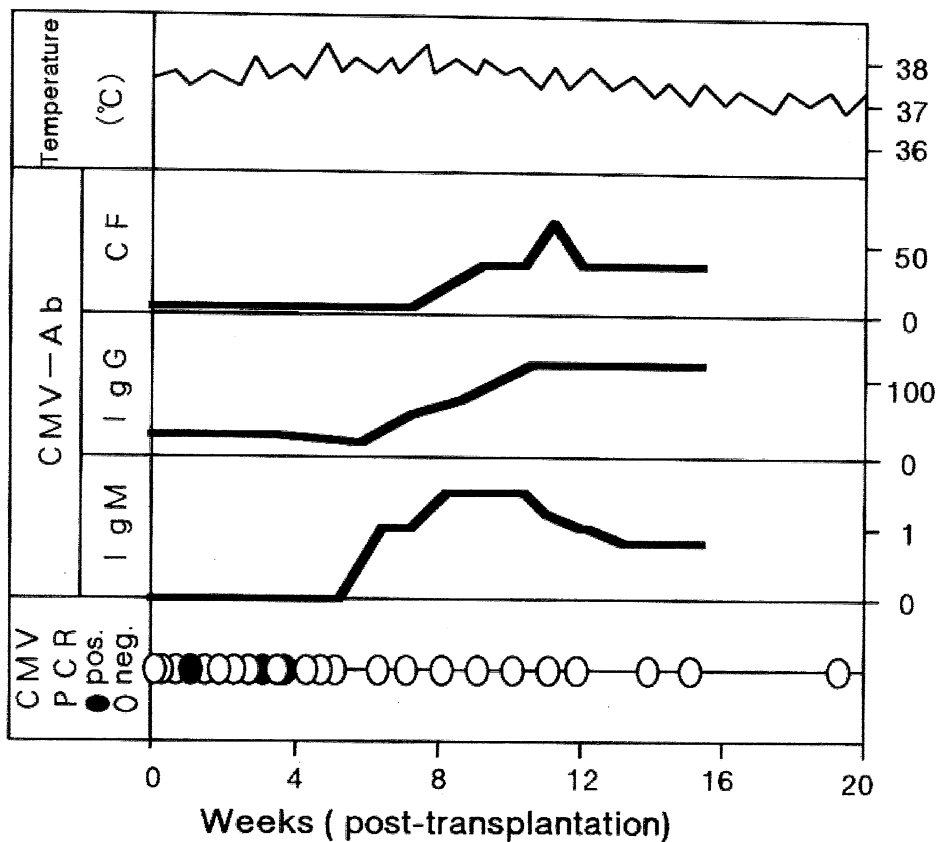


図 6 症例3の経過表

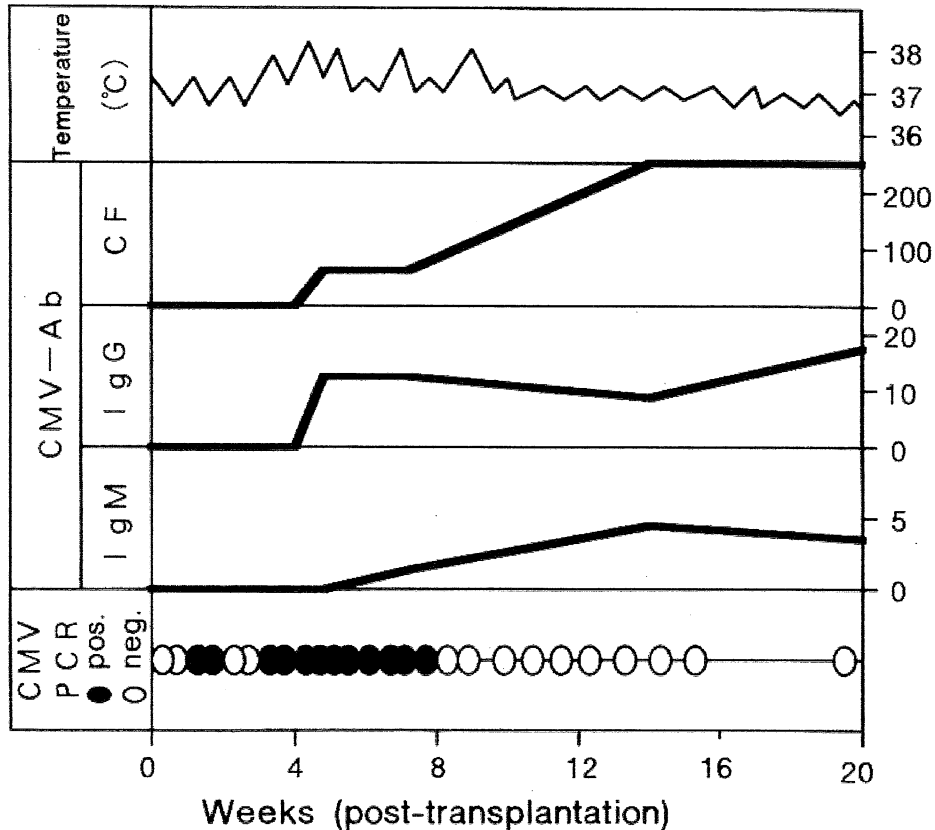


図 7 症例5の経過表

ているが、明らかな臨床症状はみられなかった。

移植後1年以上では、最高3年8カ月でPCR陽性となっている症例もあるが、ほとんど散発的で、明らかな抗体価の上昇および臨床症状を伴うものはなかった。

### V. 考 察

CMVはほとんどが不顕性感染であり、本邦の健康成人の95%がCMVキャリアである<sup>9)</sup>。エイズ患者や臓器移植患者など易感染性宿主においては、しばしば致死的な感染症となるが、従来腎移植患者においては、移植後4～8週に多く発症するという報告が散見される<sup>10)</sup>。今回のPCR検査においてもPCR陽性となる時期は、ほとんど移植後8週以内であり、CMV感染の好発時期と一致することが確認された。したがって、移植後8週間まではCMV感染症に対して特に注意が必要であることが示された。

しかし、興味あることに3症例において、腎移植後1年2カ月から3年8カ月の間にPCR陽性となったことが確認された。陽性は単発的であり、観察期間内

の輸血歴もなく、しかも臨床症状や有意の抗体価の上昇を伴っておらず偽陽性の可能性も考えられるが、患者は免疫抑制剤の持続的服用による免疫低下状態にあるために、CMVの再活性化の可能性は十分に考えられる。これらの意味づけに関しては今後さらに検討が必要である。

なお、今回われわれは末梢血を用いてPCRを行ったが、尿を用いた報告もみられる<sup>11)</sup>。しかし、尿を用いた場合、無菌的な検体の採取が困難であること、一定の検体量が得られにくいことなどにより末梢血を用いて検査を行った。また、高橋ら<sup>12)</sup>が述べているように腎臓局所におけるウイルス増殖の可能性のある尿より全身症状を反映すると考えられる末梢血のほうが有用と考えた。

PCR陽性例のうち、CMV抗体価の有意の上昇が認められた症例3, 5, 6, 7, 8の5症例では、抗体価が上昇するより2日から12週前にPCRが陽性となっており、そのうち臨床症状が出現した2例では症状を認めた時期と一致してPCR陽性を確認している。このことより、PCR陽性を検出する時期はCMV抗体価

の上昇より早く、しかも臨床症状の出現時期と一致しており、PCR 検査は CMV 感染症の早期診断に有用であることが示された。さらに、症例 4 は PCR の結果および臨床症状より CMV 感染症が強く疑われる。しかし、CMV 抗体価が上昇しなかったのは、免疫グロブリン自体が著しく低値であったことより、CMV 抗体を含め抗体産生能が著しく低下していたためと予想され、このような症例においては PCR 法の有用性はさらに増すと考えられる。

本研究にて明らかなように、CMV-PCR 陽性を示す時期は CMV 抗体価の上昇がみられる時期よりも 2 日から 12 週間先行し、極めて鋭敏である。

以上より腎移植後 8 週以内に CMV-PCR が頻回に陽性を示し、かつ発熱、間質性肺炎などの臨床症状を伴えば、CMV 感染症と考え、ただちに ganciclovir などの投与に踏み切る必要があると考えられる。

## VI. ま と め

当院にて、腎移植を施行された 17 例において、PCR 法を用いて血中 CMV-DNA を検出した。その結果、腎移植後 8 週以内に PCR 陽性となることが多く、この時期に CMV 感染症に対する注意が必要と考えられた。また、PCR 法は、CMV 感染症の早期診断に有用であることが示された。

本研究の一部は、厚生省循環器病研究委託事業 5 指 -1 (心臓・心肺移植に関する総合研究、班員 北村惣一郎) の研究費を用いた。

## 文 献

- 1) Hill RB, Rowlands DT, Rifkind D. Infectious pulmonary disease in patients receiving immunosuppressive therapy for organ transplantation. *N Engl J Med* 1964 ; 271 : 1021-1027.
- 2) Simmons RL, Lopez C, Balfour H, Kalis J, Rattazzi LC, Najarian JS. Cytomegalovirus : Clinical virological correlations in renal transplant recipients. *Ann Surg* 1974 ; 180 : 623-634.
- 3) Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis* 1986 ; 153 : 478-488.
- 4) 高橋公太. 腎移植におけるサイトメガロウイルス感染症. *今日の移植* 1993 ; 6 : 507-516.
- 5) Jiwa NM, Van Gemert GW, Raap AK, Van De Rijke FM, Mulder A, Lens PF, Salimans MMM, Zwaan FE, Van Dorp W, Van Der Ploeg M. Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction. *Transplantation* 1989 ; 48 : 72-76.
- 6) Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM, Arnheim N. Detection of Cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988 ; 158 : 1185-1192.
- 7) Lorino G, Lilli D, Dicuonzo G, Rivanera D, Mancini C, Filadoro F, Alfani D, Berloco P, Bruzzone P, Pretagostini R, Cortesini R. Cytomegalovirus infection follow-up in renal transplant patients by the polymerase chain reaction. *Transplant Proc* 1993 ; 25 : 2280-2281.
- 8) 山根 章. PCR 法によるサイトメガロウイルス肺感染症診断の試み—骨髄移植患者での検討—。化学療法の領域 1992 ; 8 : 37-43.
- 9) 沼崎義夫. サイトメガロウイルスの疫学. *今日の移植* 1993 ; 6 : 501-505.
- 10) 宍戸清一郎, 小川 修, 我喜屋宗久, 佐久間孝雄, 川村 猛, 川村 研, 上山泰淳, 本田雅敬, 伊藤拓, 浅村信二, 星長清隆, 長谷川昭, 中嶋治彦, 石古博昭. 腎移植患者における CMV 感染の早期診断に対する shell vial 法による尿中 CMV 検出の有用性. *移植* 1993 ; 28 : 46-51.
- 11) 武元良整, 橋本知子, 栄鶴義人, 小川敦子, 藤原弘, 井上信正, 古山順一, 永井清保, 金丸昭久, 垣下栄三. サイトメガロウイルス感染症の迅速 DNA 診断. *移植* 1992 ; 27 : 745-751.
- 12) 高橋公太, 尊田和徳, 田辺一成, 菅野 徹, 鳥居知子, 塩原一隆, 峰松俊夫, 南嶋洋一. HRP-C 7 を用いた腎移植後のサイトメガロウイルス (CMV) 抗原血症のモニタリング. *今日の移植* 1994 ; 7 : 369-378.
- 13) 南嶋洋一. サイトメガロウイルス (CMV) の特徴 : CMV・CMV 感染・CMV 感染症. *今日の移植* 1993 ; 6 : 495-499.