

定量 PCR を用いたアデノウイルス B 亜群感染症の早期診断の試み

寺村知子¹, 竹上修平¹, 藪内秀雄²

Early diagnosis of Adenovirus subgroup B infection using real-time quantitative PCR

Tomoko TERAMURA, Shuhei TAKEGAMI, Hideo YABUUCHI

Key words : アデノウイルス B 亜群 adenovirus subgroup B, 定量 PCR real-time quantitative PCR

I はじめに

アデノウイルス感染症は、患者の分泌物（涙、鼻汁、唾液、喀痰、糞便）を介してヒトからヒトに感染する。その感染力は強く、一旦流行すると集団発生することがある。

現在、アデノウイルスは51種類の血清型が同定されており、その生物学的特性から A ~ F の6亜群に分類されている。特に B 亜群に分類されているアデノウイルスは、新生児や AIDS 患者、移植後患者など免疫低下あるいは不全状態の人に感染すると、重篤な症状を惹起する。我々は、アデノウイルス感染症の流行を早期に診断することが健康被害の縮小および重症感染症の予防につながると考えている。

現在、アデノウイルスの検出には、ウイルス分離、ラテックス凝集反応、ELISA 法、血清中和反応、電子顕微鏡などが用いられている。近年では PCR (polymerase chain reaction) 法による遺伝子診断も多施設で試みられている。

しかし、これらの方法には一長一短があり、迅速、確実に診断するには問題がある。1999年より従来の PCR に、蛍光色素を付加したプローブを用いる定量 PCR¹⁾が、様々なウイルス感染症の早期診断に有効であったとする報告^{2, 3, 4)}が多数見られる。そこで我々は、アデノウイルス感染症の早期診断にも定量 PCR が有効ではないかと考え、この方法を用いてアデノウイルスゲノムの定量を試みた。

II 方法

1. 検体

造血幹細胞移植後アデノウイルス出血性膀胱炎を発症した患者3名の有症状期尿18検体（3名の患者のうち2名は、ウイルス分離でアデノウイルス35型および11型が同定され、残る1名は遺伝子解析により34型または11型感染症が疑われた）。対象としては平成13年6月から9月までに、中京

区役所保健部（中京保健所）に乳幼児健診を受けにきた3歳児の随時尿を使用した。尿は保護者の承諾のもと採取した。採取した検体数は109検体であった。

2. DNA 抽出

検体は DNA を抽出するまで、-20℃で保存した。尿2ml を限外ろ過（3000rpm, 30min）し、それを精製水140μl に溶解したものを DNA 抽出に使用した。

尿中 DNA 抽出には、QIAamp Viral RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用い、抽出した DNA は120μl の精製水に溶解後、10μl をテンプレートとして PCR に使用した。抽出した DNA の質を確認するためβ-actinPCR を行い、目的とする増幅産物が得られた DNA のみ、定量 PCR のサンプルとして使用した。

3. 定量 PCR

定量 PCR に使用した primer 及び probe は upstream : 5'-CAGGTAGACTGCCTCGATGATG-3', downstream : 5'-GCCCACCCTGCTTTATCTTCTC-3', probe は5'-(Fam) TGCACTCTGACCACGTCGAAAACCTTC (Tamra) -3'であり、アデノウイルスに共通している hexon 領域に設定した。

検出感度は5 copies/μgCre であった。CV (coefficient of variation) 値の平均は9.5%であった。

なお、当研究所微生物部門で分離されたアデノウイルス19, 1, 2, 3, 40/41, 5, 6, 7, 11, 35型培養上清を用いて、定量 PCR を行ったところ、B 亜群に分類されている3, 7, 11, 35型のみ検出可能であることが確認できた。

4. 統計

ウイルスゲノム数の比較には、Mann-whitney U 検定を、検出率の比較には Fisher の直接確率計算法を使用した。

III 結果

対象109検体中β-actinPCR で目的産物の増幅を認めたのは75検体であった。そのうち72検体については、アデノウイルスゲノムは検出感度以下であったが、3検体にウイ

¹ 京都市衛生公害研究所 調査研究部門

² 京都市衛生公害研究所 次長事務取扱

ルスゲノムを検出した($2 \times 10^2 \sim 9 \times 10^2$ copies/ μ gCre)。それに対して、アデノウイルス出血性膀胱炎症状を認める18検体では、すべてにウイルスゲノムが検出され、その値は中央値 1.0×10^5 copies/ μ gCre (範囲: $21 \sim 7.3 \times 10^6$)と、対象と比較して有意に高かった($p < 0.001$)

(Fig. 1)。

本方法によるウイルスゲノム検出率 (Table 1) は、有症状期検体に有意に高い検出率を認めた ($p < 0.001$)。

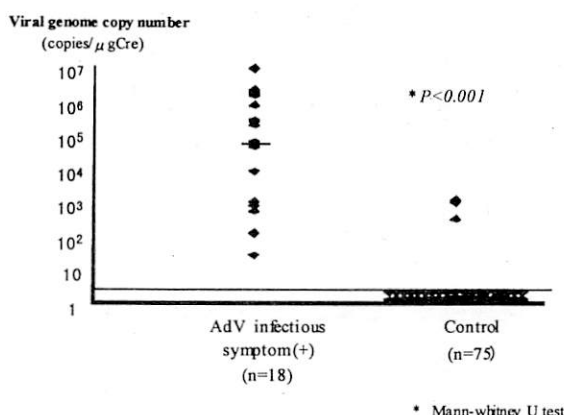


Fig. 1 Comparison of adenovirus (AdV) genome copy number in urine between AdV infectious symptom positive and control groups

Table 1 AdV genome detection by real-time quantitative PCR

		AdV infectious symptom positive	control	
Real-time PCR	+	18	3	* $P < 0.001$
	-	0	72	
Total		18	75	

* Fisher ratio

IV 考察

今回、検体として採取が簡単な尿を使用した。抽出したDNA109検体中34検体 (31%) が β -actin PCRで増幅産物を確認できず、定量PCRに使用できなかった。尿中DNAの抽出方法については、今後検討が必要と考えられた。

有症状期検体からは、対象検体に比べると有意に高いウイルスゲノム数が検出されていること (Fig. 1)、有症状期検体に有意にウイルスゲノムの検出率が高かったこと (Table 1) から、今回使用した定量PCRはアデノウイルスB亜群感染症の検出に有効であることが示唆された。

Echavarriaら⁵⁾は1ヶ月前に流行性角結膜炎 (アデノウイルス8型感染症) をおこした既往のある健康妊婦尿からアデノウイルスゲノムをPCRで検出したと報告している。

今回の結果では、感染症状のない対象75検体中3検体にアデノウイルスゲノムを検出しており、採尿する以前にアデノウイルス感染症を疑わせる既往があった可能性が考えられた。

現在、アデノウイルス感染症の診断には、患者検体からウイルス分離で証明する方法のほかに、multiplexPCR⁶⁾や制限酵素法⁷⁾、電子顕微鏡⁸⁾などで証明する方法が試みられている。我々の定量PCRでは、B亜群3, 7, 11, 35型が検出可能であることが判明しているが、詳細な遺伝子型別同定は困難である。今後は、アデノウイルス感染症を正確に把握する上で、これらの遺伝子解析方法を使って、定量PCRでウイルスゲノムが検出された検体については、遺伝子型の同定も行っていく必要があると考えている。

V 参考文献

- 1) Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. and Williams, P. M. Real Time quantitative PCR, Genome Res, 6, 986-994 (1996)
- 2) Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y., Kuzushima, K., Kato, K., Kojima, S., Matsuyama, T., and Morishima, T. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay, Journal of clinical Microbiology, 37, 132-136 (1999)
- 3) Lo, Y. M., Chan, L. Y., Lo, K. W., Leung, S. F., Zhang, J., Chan, A. T. C., Lee, J. C. K., Hjelm, N. M., Johnson, P. J. and Huang, D. J. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma, Cancer research, 59, 1188-1191 (1999)
- 4) Stevens, S. J., Verschuuren, E. A., Pronk, I., van Der Bij, W., Harmsen, M. C., The, T. H., Meijer, C. J., van Den Brule, A. J., and Middeldrop, L. M. Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of post-transplant lymphoproliferative disease in high risk patients, Blood, 97, 1165-1171 (2001)
- 5) Echavarria, M. Forman, M. Ticehurst, J. Dumler, J. S., and Charache, P., PCR method for detection of adenovirus in urine of healthy and human immunodeficiency virus-infected individuals, Journal of clinical microbiology, 36, 3323-3326 (1998)
- 6) Wanhong, X. U., McDonough, M. C., and Erdman, D. D. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay, Journal of clinical microbiology, 38, 4114-4120 (2000)
- 7) Allard, A., Albinson, B., Wade, H. G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis, Journal of clinical microbiology, 39, 498-505 (2001)
- 8) Ito, M., Hirabayashi, N., Uno, Y., Nakayama, A., Asai, J. Necrotizing tubulointerstitial nephritis associated with adenovirus infection, Human pathology, 22, 1225-1231 (1991)