

学 位 論 文 題 名

Polymerase chain reaction for diagnosis of infectious diseases

（ポリメレイズ チェイン リアクション法を
用いた感染症の診断）

学位論文内容の要旨

【はじめに】

Polymerase chain reaction（以下 PCR）法は、ごく微量の遺伝子検出法として広く一般に普及し、基礎研究室のみならず臨床教室においても日常的な実験技術として定着した。本研究においては、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型（以下 HTLV-I）、ヒト型結核菌（以下 Tb 菌）、肺炎マイコプラズマ（以下 Mp）の 3 病原微生物について、PCR による臨床検体からの検出法を検討した。これは臨床教室の研究においては、その結果が疾病の予防あるいは治療を通して患者の利益に直接寄与することに、重要な意義があると考ええるからである。

現在においては、HTLV-I の主要感染経路は母子感染にあると考えられることから、この経路を遮断し、その伝搬を極力抑えることが、予後不良の成人型 T 細胞白血病予防対策として最も重要な課題である。また Tb 菌、Mp について、現在のところ信頼し得る迅速診断法が無く、かつこれらによる疾病には、特効的化学療法薬が存在する。このことから、病初期にこれらを他のウイルス・細菌感染症と識別し得るとすれば、その治療法選択の上で非常に有利な条件となる。以上の理由から検出微生物として HTLV-I、Tb 菌、Mp を選択し、PCR 法を用いて高感度かつ迅速な診断を行うため、以下の研究を行ったのでその要約を述べる。

【材料と方法】

材料は血液（血球、血清）、脳脊髄液、胸水、喀痰、胃内吸引物、関節腔液、生検組織（凍結保存、パラフィン包埋）などである。HTLV-I プロウイルスゲノムはヒト単核球核内に存在しており、また Mp は細胞壁を有しないことから、これらの DNA の抽出法として通常行われる蛋白分解酵素処理、フェノール抽出、エタノール沈澱による方法を用いた。一方、Tb 菌につ

いては、その疾病部位が全身の諸臓器にわたり、多種類の臨床検体を処理しなければならないこと、また脂質に富んだ強固な細菌の細胞壁が DNA 抽出を阻害することなどの理由から蛋白分解酵素処理の前後にリゾチーム処理、熱処理を加えた。

HTLV-I の検出は、gag 及び pol 領域のプライマーを用いて35サイクル（94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分）の増幅後、ビオチン標識プローブを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法を行った。Tb 菌、Mp の検出は、それぞれ Shankar ら、Bernet らが発表したプライマーを外側のプライマーとして、さらに内側にもう 1 組のプライマーを独自に作製し 2 段階の増幅を行う、いわゆる nested amplification 法を用いた。

Tb 菌に関しては外側のプライマーにて 1 回目35サイクル（94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分）の増幅を行い、内側のプライマーを用いた 2 回目15サイクル（合計50サイクル）の増幅により特異的断片が得られた場合を陽性、2 回目25サイクル（合計60サイクル）の増幅により初めて特異的断片が得られた場合を判定保留とした。この理由は既述のごとく、臨床検体からの Tb 菌 DNA 抽出効率が悪く、微量しか得られない脳脊髄液などから肉眼で確認できる陽性結果を得るには、ある程度多数回の増幅が必要とされ、そのことによる偽陽性の出現を考慮したためである。

Mp については 1 回目、2 回目、ともに25サイクル（合計50サイクル）の増幅（94℃ 1分、45℃ 1分、72℃ 1分）を行った。Tb 菌、Mp ともに増幅結果はエチジウムブロミド染色アガロースゲルにて検討し、必要に応じ各種制限酵素による切断を加えて、特異性を確認した。

【結 果】

それぞれの検出感度は、HTLV-I は非感染細胞 10^5 に感染細胞 1 個、Tb 菌は 1 増幅反応あたり 2 菌体、Mp は 1 増幅反応あたり 50 個体であった。

HTLV-I プロウイルスゲノムの検索を行った 9 例の HTLV-I キャリアー妊婦中、3 例から得られた臍帯血単核球において gag, pol, いずれのプライマーによっても陽性結果が得られた。

結核菌培養が陽性、BCG 接種歴無くツベルチリン反応が陽性、他の抗生剤が無効で抗結核療法が著効を奏したこと、のいずれかあるいはいくつかの根拠により、臨床的に結核症と診断された小児 8 例中、6 例が陽性、2 例が判定保留との結果が得られた。内訳は肺結核 2 例、リンパ節炎 3 例、髄膜炎 2 例、関節結核 1 例であった。非結核症から得られた検体を用いた PCR 法によって陽性あるいは判定保留となった例は無かった。

中枢神経系症状を呈して発症し、血清学的に Mp 感染症と診断された髄膜炎 1 例、髄膜脳炎

5例から得られた、6例中4例の脳脊髄液、4例中3例の血清中に、MpDNAが検出された。脳脊髄液中からMpDNAが検出されたのは、中枢神経系症状発症後6日から22日までの範囲であった。

【考 察】

HTLV-Iの母児感染ルートは母乳中の感染細胞を介するものが主要経路と考えられているが、人工乳哺育でも約3%の児に感染が成立することが知られ、経胎盤感染の可能性が示唆されていた。今回明らかにしたように、臍帯血単核球中にプロウイルスゲノムが存在したことにより経胎盤感染の可能性がより明確になった。今後はこのような微量のプロウイルスゲノムの侵入経路の解明、あるいはこの存在が実際に感染の成立に結びつくのか否かを究明する必要がある。

Tb菌の検出に対するPCR法の応用に関しては、培養法が時間を要するだけでなく分離率が検査者の熟練度に影響される点、診断のgold standardとはならない。このためPCR結果の評価が困難な症例も存在した。この度の検索では8例中6例が肺外結核症であり、肺外結核症における結核菌の関与を証明する意味でPCR法の重要性が認識された。今後症例数を増し、またprospectiveな検討も加えることにより、本法の有用性を確立していけるものと考えられた。

中枢神経系症状を呈して発症した患児の脳脊髄液及び血清中からMpDNAが高率に検出されたことは、Mpの中枢神経系への直接浸潤、及びその経路としてのマイコプラズマ血症の存在を証明するものである。しかしながら中枢神経系症状の発現機序としてMpが直接神経細胞を障害したものか、免疫応答を介する二次的機序によるものかは、本研究においては明らかにし得なかった。

PCR法はその鋭敏な感度ゆえに増幅産物の混入（コンタミネーション）による偽陽性の出現が最大の短所とされてきた。しかしながら今回の研究において、その高感度・迅速性はとりわけ検体中に微量にしか存在せず、培養も困難な病原微生物による疾病の診断に有用であることが示され。本法の長所・短所を常に念頭に置きながら実施するならば、臨床の場に重要な情報を提供し得る手段になると考えられた。

【まとめ】

1. PCR法を用いたHTLV-I、結核菌、肺炎マイコプラズマの臨床検体からの検出法を検討した。

2. HTLV-Iの母子感染に関して、臍帯血単核球中に本ウイルスが検出され、母子感染経

路としての経胎盤感染の可能性が示唆された。

3. 結核菌の臨床検体からの検出においては、臨床的に結核症と診断された患者検体中から本法にて結核菌 DNA が高率に検出され、迅速診断法としての本法の有用性が確認された。

4. 中枢神経系症状を合併したマイコプラズマ感染症において、脳脊髄液および血清中から高率にマイコプラズマ DNA が検出され、本病原体が血行性に中枢神経系内に直接侵入していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 皆 川 知 紀

本研究においては、PCR 法による HTLV-I、ヒト型結核菌、肺炎マイコプラズマの 3 病原微生物の臨床材料からの検出法が検討された。主な研究成果は以下の 3 点である。

第 1 点は、HTLV-I キャリアー妊婦 9 例から得られた臍帯血単核球 DNA の検索において、3 例から HTLV-I プロウイルスゲノムが検出されたことは、母乳以外の感染経路として以前から推測されていた胎盤を経由するルートが存在を、より明確に示唆する所見と考えられる。さらに本実験においては、従来行われてきた放射性同位元素により標識したプローブを用いたサザンブロッティングに替わり、非放射性のビオチン標識 DNA プローブを用いていることが注目される。このことは放射性同位元素の使用に伴う施設・時間の制約に対処する意味で重要である。今後の課題としては、この微量のプロウイルスゲノムの存在が実際に感染の成立に結びつくか否かを究明する必要があるものと考えられる。

第 2 点は、本研究においては、結核菌培養が陽性、BCG 接種歴なくツベルクリン反応が陽性、他の抗生剤が無効で抗結核療法が著効を奏したこと、などの理由から臨床的に結核症と診断された 8 例中、PCR により 6 例が結核菌陽性とされ、一方、臨床的に結核症が否定された症例においては PCR 陽性例は存在しなかった。またこの 8 例中 6 例が肺外結核症であり、培養が陽性であったのはリンパ節炎の 1 例のみであった。このことから、本法は結核症の迅速診断、とりわけ従来培養法にても確定診断が困難であった肺外結核症の診断において有用であることが示され

た。今後さらに症例数を増やして検討することにより、臨床検査法のひとつとしての本法の有用性を確立していくことが期待される。

第3点としては、肺炎マイコプラズマ感染による中枢神経系合併症において、髄液中および血清中から高率に本病原体のDNAが検出されたことが注目される。この合併症の機序として、従来は免疫応答を介した二次性脳炎であるとの説を支持する所見が多く発表されてきた。しかしながら今回の研究においては、本病原体は血行性に呼吸器粘膜から中枢神経系に運ばれ、直接中枢神経系内に侵入し、症状を発現していることが示唆された。今後の課題としては、本質的にPCR法はDNAの存在を検出する方法であるため、本法により陽性結果が得られてもそれをもって症状の発現に直接結びつけることはできず、さらにどのような方法でその因果関係を証明していくか、その方法論の追求にあると考えられる。

第1にHTLV-I母子感染に関して、母乳以外の感染経路、すなわち経胎盤感染の可能性について具体的に指摘した点、第2に結核菌感染症のPCR法を用いた迅速診断について、実際の臨床検体を用いてその有用性を明らかにした点、および第3に肺炎マイコプラズマ感染症における中枢神経系合併症において、脳脊髄液中に本病原体の存在を証明した点はいずれもPCR法の感染症領域における新しい利点を具体的に明示したものであり、学位授与に充分の価値を持つものである。