

原 著

Polymerase chain reaction (PCR) 法による病理組織からの Cytomegalovirus (CMV) DNAの検出

病理センター

長谷川 秀 浩、片 桐 丘 充、五十嵐 俊 彦

目的：ホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出されたDNAを用いてCMV DNAの検出をPCR法で検討し、その検出条件を確立した。

方法・成績：本法では、病理組織より直接、周囲組織とともにCMV DNAを採取することにより、PCR阻害物質も同時に回収してしまう。今回、その検出にあたってはPCR反応を阻害する夾雑物を除去し、増幅領域が短く設定されたプライマーを使用し、その検出条件を設定することができた。

結論：本法によるCMV DNAの検出は、今後の悪性腫瘍に対する化学療法、AIDS、臓器移植など生体の免疫機能低下に伴うCMVの再活性化を含めたCMV感染症に対し、有効かつ適切な情報を提供できるものと期待される。

キーワード：PCR、サイトメガロウイルス (CMV)、ホルマリン固定パラフィン包埋組織

緒 言

ヒトサイトメガロウイルス (Human cytomegalovirus: CMV) はヒトヘルペスウイルス科βヘルペス亜科に分類されるDNAウイルスであり、本邦成人の80%以上がすでに、そのウイルスを不顕性感染の状態で見つけていると言われており、その再活性化は時として重篤な間質性肺炎や肝炎を引き起こし、日和見感染の原因ウイルスであることが知られている。CMV感染症の診断にはウイルス分離ないし免疫血清学的手法に基づく抗原抗体検出が用いられているが、必ずしも十分な診断率を得られていない。感染症の原因微生物の検出法として基本的かつ確定診断となり得る方法は分離培養による同定であるが、CMVは増殖が遅いほか分離培養における管理の煩雑さもあり、その同定には長時間を要する。しかし、近年の化学療法の進歩や抗ウイルス剤の治療効果の期待感から迅速診断の必要性が望まれるウイルスである。病理組織学的には、核内に好酸性または好塩基性封入体を形成する巨大核内封入体 (owl eye cell) や、細胞質に衛星封入体と呼ばれる特徴的な封入体を形成することにより、CMVによる感染は推定されるものの、厳密には、原因ウイルスの特定は不可能である。しかし、近年の分子生物学の飛躍的な進歩により病原遺伝子の核酸をポリメラーゼ反応で増殖させ検索する方法 (Polymerase chain reaction: PCR) が用いられるようになり、各種感染症の診断法として応用されはじめている¹⁾。しかし、病理

組織標本は製作過程における固定液、有機溶媒、熱等の影響によりDNAが断片化されていることから、新鮮な組織材料に比べ分子生物学的技法を用いた遺伝子解析には不向きである²⁾。しかし、組織中における検索目的物質の存在部位や分布状況が容易に把握できることから、病理組織材料から抽出された検体による遺伝子解析法の確立が急務である。今回、我々は病理組織材料からのCMV DNAの検出法としてDNA サンプルの純粋化とCMV前初期遺伝子 (Major immediately early gene: IE) の一部をコードする増幅領域の短いプライマーを用いる事によりPCR法での検出を可能としたので報告する。

材 料 と 方 法

1: 症例

検討材料は1999年3月長岡中央総合病院にて病理解剖された67才女性である。

Fig.1に示すようにHE染色標本による組織像には巨大核内封入体を形成する細胞が確認されたことからCMV感染症による間質性肺炎が疑われたが、その病原体について断定できなかったホルマリン固定パラフィン包埋された肺組織を用いた。

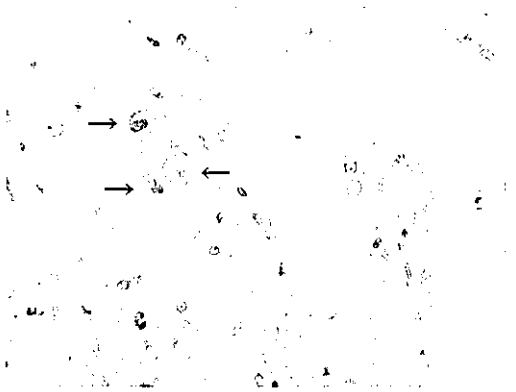


Fig.1 Histology of the CMV infection suggested.

2: DNA抽出

ホルマリン固定パラフィン包埋された肺組織を10μmの厚さに薄切し、その組織片2枚をマイクロチューブにとり、TaKaRa DXPATを約0.5ml添加し能昏に從

い得られた抽出液に対し、PCR阻害物質を除去する目的でDNA抽出液100 μ lに対し冷プロパノール250 μ l、3M酢酸ナトリウム液10 μ lを加えDNAを再度、析出沈降させた後、冷70%エタノールにより2回の洗浄をおこなった後、ヒートブロックにより乾燥し50 μ lのTE液に溶解した。

3: プライマー

Akrigg, A等³⁾によって示されたCMVの固有配列部分(UL)のうち前初期遺伝子の一部の2280-2300と2405-2425のシーケンスに相当する部位をコードするもので、その塩基配列はforward: 5'agc atg atg tga gca agg-3'reverse: 5'gaa ggc tga gtt ctt ggt aaa-3'の組み合わせにより増幅される146bpを標的領域とした。

4: PCR法

DNAサンプル1 μ lで、全量20 μ l反応液(d-DW: 14 μ l、10 \times PCR buffer with 15mM MgCl₂: 2 μ l、2mM dNTP: 2 μ l、50pM F primer: 0.5 μ l、50pM R primer: 0.5 μ l、1U Ampli Taq Gold)を調整し、DNA増幅にはプログラム テンプコントロールシステムPC707(Astec Japan)を使用した。サーマルプログラムは94 $^{\circ}$ C 10分の Hot startを行った後、①denature 94 $^{\circ}$ C 1分、②annealing 55 $^{\circ}$ C 1分、③extension 72 $^{\circ}$ C 1分を41サイクル行った後Last extensionとして72 $^{\circ}$ C 10分間伸張させた。

5: 増幅DNAの検出

PCR反応液3 μ lを12.5%ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動後、エチジウムブロマイド(EtBr)染色を行い紫外線(UV)イルミネーターにより増幅産物の確認を行った。

結 果

PCR反応液を12.5%ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動した結果をFig.2に示す。組織学的特徴からCMVの感染が示唆された本症例にDNAシーケンス上で理論的に予測された146bpの位置にバンドが検出された。陰性対象としたヒト正常肺組織には増幅されたバンドは検出されなかった。

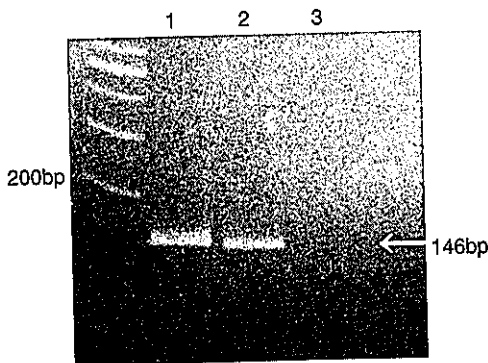


Fig.2 Amplification of the CMV gene coding for the major immediately early gene.

1: sample 2: positive control
3: negative control(lung)

考 察

近年、悪性腫瘍等に対する化学療法の結果、再活性化されたCMVによる間質性肺炎や肝炎の重篤性や抗ウイルス剤による治療効果の期待感から病原微生物検出の迅速性が重要視されている。しかし、病理組織学的特徴からウイルス感染が疑われても、病理組織を対象とした分子生物学的診断キットは市販されていないことからその同定には限界がある。これは10%ホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出されたDNAはホルムアルデヒドの影響により断片化されていることから、比較的長い領域を増幅するようなプライマーの設定では、検出感度および再現性の面において著しく不安定なためである。したがって、病理組織から抽出されたDNAを対象として遺伝子検査を行う場合、固定液による影響を出来る限り軽減させると同時に増幅領域が比較的短いプライマーを設定する必要がある⁴⁾。本法で用いたプライマーは、ホルマリン固定組織からも容易に増幅されるサイズであるとともに、非特異的なバンドの検出は確認されなかったことからCMV DNA IEの一部に特異的に存在するDNA配列であると考えられる。また、病変組織を直接検体として採取するため、組織内に混入するさまざまなPCR阻害物質の影響も考慮する必要がある。本法は市販のDNA回収キットにより回収されたDNAを再度沈降させ、その中に混入している阻害物質を除去し、再精製をおこなうことにより安定したDNA増幅を可能としている。また、臨床症状および鏡検的に得られる細胞変化の特徴からCMV感染症が疑われても適切な部位より検体を採取しなければその臨床的意義は低い。つまり、同定技術もさることながら微生物学的検索に供される検査材料はいかに適切な方法で採取されたかの方が大切である。本法は組織所見上、CMV感染が疑われる病変局所より直接検体を採取することが可能であり、病変周囲の不必要な情報は除去できる事からも臨床的価値はたかいたものと判断される。しかし、CMVは不顕性感染が多く日本人の約80%以上が既に感染しているとされている。CMVは初期感染後、組織内において潜在的なウイルスゲノムとして存在しつづけることから、潜在的CMV DNAによる偽陽性反応の可能性も完全に払拭されたわけではない^{5) 6)}。その可能性を厳密に判定するには、病理組織を対象としたPCR法による定量的解析法の確立が望まれるが、現状においては組織学的特徴とともにISH法等を併用しながら、その局在を証明し、臨床所見、経過等を熟慮したうえ総合的に判断する必要があるものと考えられる。

結 語

組織学的所見からCMV感染が示唆された症例について、肺のホルマリン固定パラフィン包埋組織より抽出されたDNAをサンプルとし、PCR法によるCMV DNAの検出を可能とした。本法は増幅領域の比較的短いプライマーの設定とPCR阻害物質の除去操作を施し、再精製された純粋なDNA用いることが重要な条件であると考えられた。本法によるCMV DNAの検出は、今後の再活性化を含めたCMV感染症の早期診断に有効であると判断された。

文 献

1. 長谷川秀浩, 五十嵐俊彦. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法による結核菌DNAの同定. 新潟県厚生連医誌 2001; 11 (1): 46-9.
2. 日本臨床検査技師会. 臨床検査遺伝子・染色体教本. 1999; 31.
3. Akrigg A, Wilkinson GW, Oram JD. The structure of the major immediate early gene of human cytomegalovirus strain AD169. Virus Res 1985; 2 (2): 107-21.
4. 長谷川秀浩, 五十嵐俊彦. PCR-SSCP法によるp53遺伝子変異の検出についての基礎的検討. 新潟県厚生連医誌 2001; 11 (1): 42-5.
5. 峰松俊夫, 南嶋洋一. サイトメガロウイルス. 臨床と微生物 1999; 26 (増刊): 104-8.
6. 本田順一, 大泉耕太郎. サイトメガロウイルス. 臨床検査 1993; 37 (2): 158-63.

英 文 抄 録

Original article

Identification of Human Cytomegalovirus (CMV) DNA

in a pathological tissue by the Polymerase Chain Reaction (PCR)

Pathology Center

Hidehiro Hasegawa, Takamitsu Katagiri, and Toshihiko Ikarashi

Objective: This study was conducted to establish the conditions for an identification of CMV DNA by PCR method.

Study design and Results: The DNA sample was from a lung tissue of 67 years old woman, which was suspected as CMV infection by pathologically. DNA was extracted from the formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. It was important that DNA was pure to enable the amplification in PCR. We used primers that amplified the short range to detection of CMV DNA.

Conclusion: This technique appears to be useful in the identification of CMV DNA from pathological specimens in terms of sensitivity and specificity

Key Words: Polymerase Chain Reaction (PCR), Human Cytomegalovirus (CMV), Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue