

ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)DNA定量法を用いた  
腎移植患者における尿中HCMVの推移とその臨床的意義

銘 形 和 彦

ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)DNA定量法を用いた  
腎移植患者における尿中HCMVの推移とその臨床的意義

銘形和彦

## 目次

緒言	.....	2
材料および方法	.....	4
結果	.....	13
【基礎的検討】	.....	13
【臨床的検討】	.....	19
【臨床的検討のまとめ】	.....	35
考察	.....	39
まとめ	.....	45
引用文献	.....	47
謝辞	.....	56

## 緒 言

サイトメガロウイルス(cytomegalovirus,CMV)はヘルペスウイルス科(herpetoviridae)の $\beta$ -subgroupに属するDNAウイルスで、多くの動物にそれぞれ種特異性をもつCMVが存在する。ヒトサイトメガロウイルス(human cytomegalovirus, HCMV)はヒトにのみ感染する。本邦における成人の90%以上が抗体陽性(carrier)<sup>(1)</sup>であり、通常は無症候性(不顕性)の潜伏感染であるが、臓器移植、AIDS(後天性免疫不全)、血液疾患などの免疫学的防御が低下した易感染性宿主(immunocompromised host)では、しばしば致命的な局所感染ないし全身感染(播種性ウイルス血症)<sup>(2)</sup>を招くことがある。殊に、HCMV肺炎の致死率は極めて高い<sup>(3)</sup>とされている。

腎移植では、移植腎を介した再感染(superinfection/reinfection)<sup>(4)</sup>や初感染(primary infection)<sup>(5)</sup>のほかに、免疫抑制療法に伴う潜伏ウイルスの再活性化(reactivation)<sup>(6,7)</sup>が問題となっている。腎移植後の顕性HCMV感染症の頻度は施設により違いがあるが、約30~80%<sup>(8,9)</sup>で、顕性感染のうち約30%が重症例<sup>(10)</sup>である。また、移植後の腎生着率、生存率に有意に影響する<sup>(9,10)</sup>ともいわれている。

HCMV感染の診断は従来より、血清診断、免疫蛍光法、ウイルス分離、核内封入体などを組合わせておこなわれてきた。それに加え、近年、HCMV・AD169株で全塩基配列<sup>(11)</sup>が決定され、ゲノム構造の解析が進み、DNA診断法が用いられるようになってきた。なかでもポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction,PCR)法<sup>(12)</sup>は、種々の検体<sup>(13-19)</sup>からのDNA検出に用いられている。PCR法は特異性、検出感度が高く、微量検体や長期保存検体からのDNA検出に優れ、従来法で陰性の検体であってもPCR法でHCMV-DNAが検出されることもある<sup>(15,22-25)</sup>。しかし、検出感度が高いために、臨床診断においてその解釈がときに難しいことがある。PCR法で陽性の結果が得られても、顕性感染とは限らない<sup>(15,22)</sup>し、さらに健康既感染においても

陽性となることもある<sup>(20,21)</sup>ためである。殊に、本邦では既感染が高率で、腎移植でも既感染ドナー、既感染レシピエントが多く、再感染や再活性化によるHCMV顕性感染をいかに診断し予防、ないし治療するかが重要な課題となっている。PCR法が用いられるようになった今日においても、顕性感染を予測することは難しく、従来法を組合わせて診断しなければならないという事情は大きく変わっていない。

以上のことから、HCMV顕性感染の発症の予測と治療効果の判定のために、ウイルスDNAを定量的かつ経時的にとらえる必要があると考えられる。最近、アイソトープ標識プローブによるHCMV・DNA定量法の報告<sup>(19,25-27)</sup>が散見されるが、臨床例での経時的な解析は十分ではない。

本研究では、新しく確立された、PCR法とマイクロプレートハイブリダイゼーション法を併用した簡便なDNAの定量法を用いて、腎移植患者から経時的に採取した尿検体中のウイルスDNAを定量し、臨床的解析を試みた。

その結果、尿中ウイルス排泄の消長を知ることが、HCMVの体内活性を解析する上で有用な一指標となり得ることが示唆され、移植後の免疫抑制下におけるHCMV顕性感染症の予測や治療効果の判定に応用しようと考えられた。

## 材 料 お よ び 方 法

【PCR法とマイクロプレートハイブリダイゼーションの併用によるHCMV・DNA定量法の基礎的検討】

### 1. ウイルス株DNA

使用したウイルス株は、HCMV(AD169,KH株)、単純ヘルペスウイルス(herpes simplex virus,HSV)-1型(HF株)、HSV-2型(UDO株)、および水痘・帯状疱疹ウイルス(varicella-zoster virus,VZV)(H-S1株)である。各ウイルス株の感染ヒト胎児肺(human embryonic diploid lung,HEL)細胞および正常HEL細胞から抽出したDNA(国立公衆衛生院衛生微生物学部 本藤良博士より分与)を用いた。

### 2. 検体からのDNA抽出

検体(早朝中間尿)からのDNA抽出は、本藤らの方法<sup>(30)</sup>に準じ、-70℃に保存した検体2mlを室温解凍し、無菌的にピペットで数回攪拌したのち、その1mlを分注して、18,000 × gで2時間、超遠心処理をおこなった。その沈渣をTES-buffer(0.1M NaCl, 10mM EDTA, Tris-HCl(pH 8.0), 0.6% SDS) 400μlで再浮遊した。Proteinase K (200μg/ml)を加えて、37℃温浴で、2時間振盪処理した。常法によりフェノール処理2回、クロロフォルム処理1回の後、エタノール処理を1回おこなった。風乾後に、DNA-buffer(0.1M NaCl, 10mM EDTA, Tris-HCl(pH 8.4))100μlを加え、再浮遊後に、4℃で保存した。

### 3. 標準DNAおよびPCR増幅領域

標準DNAは、HCMV Towne株のクローン化Hind III B断片(21 kbp、東京大学医科学研究所ウイルス研究部渡辺慎哉博士より分与)とし、DNA-bufferで一定コピー数に調整したものをPCRの標準鋳型とした。

目標とする増幅領域は、Martinezら(1989)<sup>(31)</sup>の文献を参考に、粒子蛋白(virion protein 25)をコードする領域(610bp)とした、

プライマーは、forward primer 5'-ACTCACAACATATTCGTTTGC-3'、reverse primer 5'-TGTTTCGGAAGTGATCGTGTTC-3'とした。標準DNAおよび増幅領域を図1に示した。

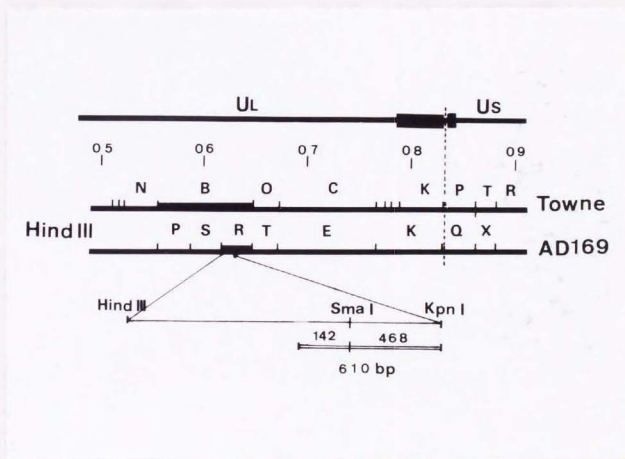


図1. 標準DNAおよび増幅領域

UL: longunique segment, US: short unique segment  
Towne: HCMV Towne株, AD169: HCMV AD169株

#### 4. PCRの反応条件と電気泳動

PCRの反応系を100 $\mu$ lの系とした。reaction buffer(50mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl(pH 8.4), 0.01%ゼラチン)、各0.2mM dNTPs mix(TOYOBO社)、各1.0 $\mu$ M土プライマー、2.5unit Taq DNA Polymerase(TaKaRa社)に、検体の鋳型および標準鋳型の各10 $\mu$ lを加え、計100 $\mu$ lとした。PCRはシーケンサー(TempCycler Model 50, COY Laboratory products社)を用いて、熱変性94°C 2分、アニーリング(鋳型・プライマー結合) 55°C 3分、伸長72°C 4分の条件を1サイクルとして、30サイクル増幅した。

PCR産物の10 $\mu$ lおよびサイズマーカー(pBR322・HaeIII, Boehringer Mannheim GmbH社)を、エチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲル(SEAKEM ME, FMC bioproducts社)で定電流75mA、120分間、水平型泳動槽を用いて電気泳動し、UVイルミネーター(TL-33型長波長365nm, ULTRA-VIOLET PRODUCTS社)で写真撮影した。

残りのPCR産物90 $\mu$ lをフェノール処理2回、クロロフォルム処理1回、エタノール処理1回後に、buffer E(2mM NaCl, 0.2mM EDTA, 2mM Tris-HCl(pH 7.8))90 $\mu$ lで再溶解し、-20°Cで保存した。

#### 5. ハイブリダイゼーション

##### 1) ビオチン標識DNAプローブの作製

ビオチン標識HCMV・DNAプローブの作製は、大沢、本藤ら<sup>92)</sup>のPCRによるビオチン標識法に準じて作製した。すなわち、標準DNAをPCRで増幅して得られたPCR産物の500ngを鋳型とし、4つのdeoxynucleotide triphosphatesのうち、ビオチン結合dUTP(Biotin-11-dUTP, ENZO DIAGNOSTICS, INC.)をTTPのかわりに用いてPCRを10サイクル行った。得られたPCR産物をクロロフォルム処理を1回、エタノール処理を1回おこなった。その後DNA回収用限外濾過フィルター付き遠心チューブ(SUPRECTM-0.2, TaKaRa社)で3回遠心し、エタノール処理の後、buffer E 100 $\mu$ lで再浮遊した。



調整したピオチン標識DNAプローブの標識度を、マイクロプレート法による直接吸着法で検定した。

## 2) マイクロプレートハイブリダイゼーション

井上、本藤<sup>(3)</sup>の方法により実施した。PCR産物を100°C 5分間で熱変性した後、固相化液(1.5M NaCl)を用い、マイクロプレート内で1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 に10倍段階希釈し、37°C、3時間固相化した。その後PBS-tween(PBST)で3回洗浄した。ピオチン標識DNAプローブ 500ng/100 $\mu$ lを熱変性後、ハイブリダイゼーションbuffer(50%Formamide, 0.75M NaCl, 5 $\mu$ g/100 $\mu$ l salmon sperm DNA, 0.1% Tween 20)で400倍に希釈し各ウェルに100 $\mu$ l加え、56°C、18時間ハイブリダイゼーションをおこなった。

ハイブリダイゼーション信号の検出は次の手順で実施した。マイクロプレートをPBSTで3回洗浄後、酵素希釈液(1% bovine serum albumin(BSA), 0.1% Triton X-100, PBST)で20000倍に希釈した streptavidin-conjugated  $\beta$ -galactosidase(Zymed Laboratories社)を加え、室温で1時間反応させた後、PBSTで4回洗浄した。酵素反応の基質として 0.2mM 4MUG(4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactoside, 0.01M phosphate buffer(pH7.0), 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1M NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 0.1% BSA)を10 $\mu$ l加えて、37°Cで2時間反応後、0.1M glycine-NaOH(pH 10.2)を100 $\mu$ l加えて反応を停止させた。反応産物 4-MU(4-methylumbelliferon)の蛍光単位値を自動蛍光測定器フルオロスキャン(Flow Laboratories社)を用いて、励起波長355nm、測定波長480nmの条件で測定した。

## 6. HCMV・DNA定量法のストラテジー

検体中のHCMV・DNA定量のストラテジーを図2に示した。

- 1) 一定量の検体を採取し、DNAを抽出する。
- 2) 抽出DNAを10倍段階希釈し、検体鋳型とする。
- 3) コピー数既知の標準DNAを10倍段階希釈し、標準鋳型とする。
- 4) 検体鋳型と標準鋳型を同時に、一定の条件でPCRを実施する。
- 5) PCR産物についてハイブリダイゼーションを実施する。
- 6) 標準鋳型のコピー数と蛍光単位値の関係を表す標準曲線を作成するとともに、検体鋳型の希釈度と蛍光単位値の関係を表す検体曲線を作成する。標準曲線と検体曲線を比較して、検体中のHCMV・DNAのコピー数を算出する。

以上の手順で、定量法を設定した。

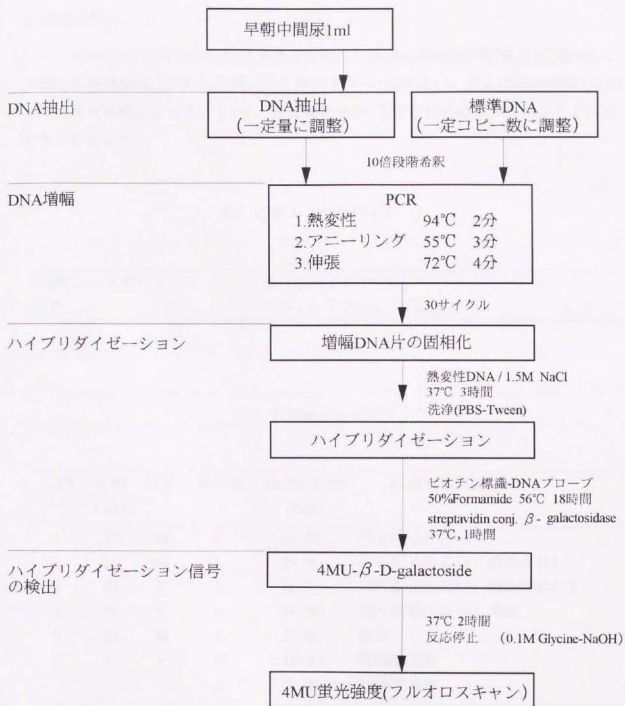


図2. HCMV・DNA定量法のストラテジー

【臨床的検討】

1. 対象症例

1986年6月より1992年11月までの期間に、東京大学医科学研究所付属病院人工臓器移植診療科を受診した術前の生体腎ドナー14例(表1)、および同診療科で加療した生体腎移植レシピエント5例、死体腎移植後・生体腎再移植レシピエント1例(表2)を対象とした。

表1. 健康人 (生体腎ドナー)

年齢(mean±SD)	60.2±10.3 (41~73)
性別	男性6人 女性8人 (計14人)

表2. 腎移植レシピエント

症例	年齢 (歳)	性別	腎移植	HCMV抗体 (D/R)	移植後合併症
1	53	M	L	D+/R+	感染症状(-)
2	38	M	L	D+/R+	急性拒絶反応(+) 感染症状(-)
3	48	F	L	D+/R+	急性拒絶反応(+) 感染症状(-)
4	38	F	L	D+/R+	急性拒絶反応(+) 発熱
5	39	M	L	D+/R+	肺炎
6	32	F	C	D?/R+	肝機能異常
			L	D+/R+	肝機能異常

M: 男性 F: 女性 D: ドナー R: レシピエント +/-: 術前血清抗体価 陽性/陰性  
C: 死体腎移植 L: 生体腎移植

## 2. 臨床検体

尿道口を0.02%グルコン酸クロルヘキシジン消毒した後、早朝中間尿をエチレンオキシドガス滅菌済みの検尿コップに20ml以上採取し、その全量を蓋付き50cc滅菌容器に移し、数回上下反転して攪拌した後、PCR用として2mlを保存容器に分注し、-70℃で凍結保存した。10mlを尿沈渣細胞の免疫蛍光法に用いた。

## 3. 免疫蛍光法

早朝中間尿10mlを2Krpm、10分間遠心し、沈渣細胞を無蛍光スライドガラス上に塗抹した。一次抗体として抗HCMVポリクロナール抗体(ウサギ血清、国立公衆衛生院衛生微生物学部 本藤良博士より分与)を用い、4℃で一昼夜反応後、PBSで3回洗浄した。二次抗体として、抗ウサギIgG抗体(ヤギ血清、anti-rabbit immunoglobulin conjugate(FITC),SIGMA Chemical Company)を用い、37℃で1時間反応させた。PBSで3回洗浄して蛍光顕微鏡で観察した。

## 4. 血清抗体価測定法

補体結合試験(CF)、間接蛍光抗体法(FA)によるIgM、IgG、酵素抗体法(ELISA)によるIgM、IgGを経時的に測定した。

## 5. 腎移植後の免疫抑制法

腎移植後の免疫抑制の導入は、シクロスポリン(ciclosporin,CYA)、アザチオプリン(azathioprine,AZA)あるいはミゾリピン(mizoribine,MIZ)、プレドニゾロン(prednisolone,PRD)の三剤併用療法を基本とし、組織適合性抗原(human leukocyte antigen,HLA)不適合の場合に、これら三剤に抗リンパ球グロブリン(Antilymphocyte globulin,ALG)を加えた四剤併用療法とした。

CYAは全血mono-FPIAのtrough levelで投与量を調整し、術後1ヶ月間は250～350ng/mlとし、3ヶ月以降は100～150ng/mlを目標とし、拒絶反応、CYA腎毒性を考慮して増減した。PRDは導入時60mgとし、徐々に漸減し、術後2ヶ月以降は10～15mgを目標とし、体重、拒絶反応、副作用を考慮して増減した。

急性拒絶反応に対して、ステロイドパルス療法(methylprednisolone high-dose therapy, MP Pulse)を第一選択とした。ステロイド抵抗性の急性拒絶反応に対しては、OKT3(CD3 monoclonal antibody)、あるいはデオキシスパーガリン(15-deoxyspergualin, 土-1-amino-19-guandino-11-hydroxy-4,9,12-triazanonadecane-10,13-dionetrihydrochloride, DSG)を投与した。

#### 6. 抗ウイルス療法

ガンシクロビル(9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]-guanine, DHPG, ganciclovir)およびガンマグロブリン(HCMV high-titer immune globulin,  $\gamma$ -gl)いずれかの単独療法、あるいは併用療法とした。

## 結 果

### 【定量法の基礎的検討】

#### 1. PCRの特異性および増幅による検出感度

HCMV(AD169,KH株)、単純ヘルペスウイルス(herpes simplex virus,HSV)-1型(HF株)、HSV-2型(UDO株)、および水痘・帯状疱疹ウイルス(varicella-zoster virus,VZV)(H-S1株)の各感染ヒト胎児肺(human embryonic diploid lung,HEL)細胞および正常HEL細胞から抽出したDNA10ngを鋳型とし、設定した増幅領域の両端の±プライマーを用いて、PCRを30サイクルおこなった。PCR産物の電気泳動結果を図3に示した。HCMV(KH株)においてのみ、目的とする610bpの単一のバンドが観察された。他の近縁ヘルペスウイルスおよびHEL細胞DNAとの相補的反応はなく、目的とする増幅DNA断片が特異的に検出された。

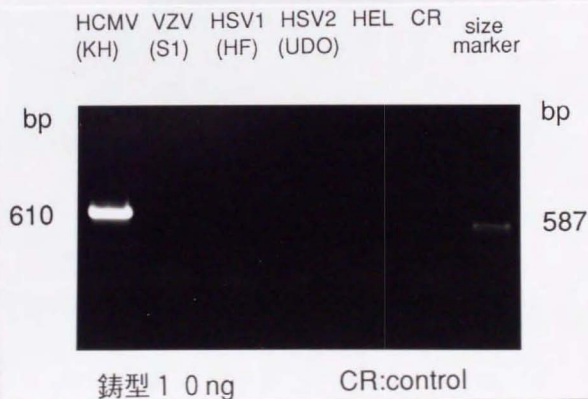


図3 PCRの特異性

HCMV(KH):ヒトサイトメガロウイルスKH株、VZV(S1):水痘・帯状疱疹ウイルスH-S1株  
HSV-1(HF):単純ヘルペスウイルス-1型(HF株)、HSV-2(UDO):単純ヘルペスウイルス-2型  
(UDO株)、HEL:ヒト胎児肺細胞、CR:コントロール(蒸留水)

## 2. 電気泳動法によるPCR産物の検出感度の検討

標準DNAを1000pgから0.001pgまで10倍段階希釈したものを鋳型として、PCRを実施した。PCR産物について、アガロースゲル電気泳動をおこない、検出感度を検討した。その結果を図4に示した。電気泳動法のバンドの肉眼判定による鋳型量の検出限界は、1pgであった。

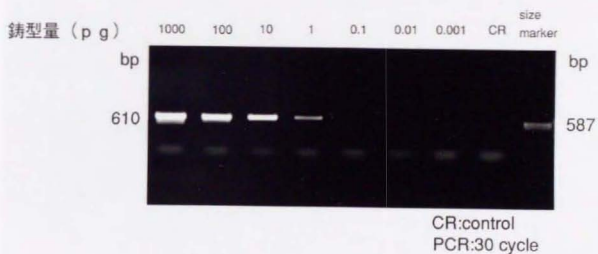


図4. 標準鋳型量とそのPCR産物の電気泳動



## 2 HCMVビオチン標識DNAプローブの特異性

標準DNAを鋳型としてPCRで増幅したPCR産物を用いて、ビオチン標識DNAプローブを作製した。その特異性を検討した。HCMV(KH株)、VZV(H-S1株)、HSV-1型(HF株)、HSV-2型(UDO株)の各ウイルス株感染正常HEL細胞および正常HEL細胞の抽出DNAの各100ngをマイクロプレートのウェル内に固相化し、ビオチン標識DNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを実施した。その結果を表3に示した。

ハイブリダイゼーション信号検出の蛍光強度から、VZV、HSV-1型、HSV-2型および正常HEL細胞のDNAとは相補性は見られず、HCMV DNAが特異的に検出された。

表3. HCMVビオチン標識DNAプローブの特異性の検討

抽出DNA	蛍光強度
HCMV (KH株)	+++
VZV (H-S1株)	-
HSV-1型 (HF株)	-
HSV-2型 (UDO株)	-
正常HEL細胞	-

HCMV(KH)	:ヒトサイトメガロウイルスKH株
VZV(S1)	:水痘・帯状疱疹ウイルスH-S1株
HSV-1(HF)	:単純ヘルペスウイルス-1型(HF株)
HSV-2(UDO)	:単純ヘルペスウイルス-2型(UDO株)
HEL細胞	:ヒト胎児肺細胞
CR	:コントロール(蒸留水)

### 3. ハイブリダイゼーション標準曲線の作成と検出感度

HCMV標準DNAを10倍段階希釈で $1\text{pg}(10^{15}\text{コピー})/10\mu\text{l}$ から $0.0001\text{pg}(10^{13}\text{コピー})/10\mu\text{l}$ まで調整し、これらを標準鋳型としてPCRを実施した。そのPCR産物の1/10量を用いて、アガロースゲル電気泳動法をおこなった。

また、PCR産物の10倍から10000倍までの各10倍段階希釈におけるハイブリダイゼーションをおこない、ハイブリダイゼーション信号の蛍光単位値を対数グラフ上にプロットすることにより、蛍光単位値と鋳型コピー数との関係を示す標準曲線を作成した。電気泳動結果と標準曲線の比較を図5に示した。

アガロースゲル電気泳動法におけるバンドの肉眼判定は、 $0.1\text{pg}(10^{13}\text{コピー})/10\mu\text{l}$ が検出限界であるのに対して、標準曲線では、10コピー程度のDNAを検出することが可能であり、検出感度は電気泳動法による検出限界よりも $10^3$ 倍程度上げることができた。

### 4. 検体中のHCMV・DNAの定量化

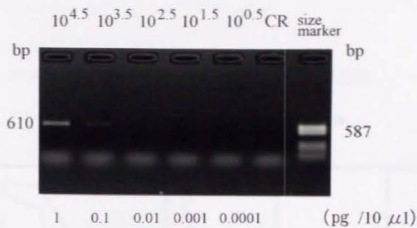
尿検体(A,B,C)の各1mlからの抽出DNA $100\mu\text{l}$ の1/10量( $10\mu\text{l}$ )を10倍段階希釈( $10^0, 10^1, 10^2$ )して検体の鋳型とし、標準鋳型と同時にPCRをおこなった。PCR産物の10倍から10000倍までの各10倍段階希釈におけるハイブリダイゼーションにより、検体曲線を作成した。標準曲線と検体曲線を図6に示した。

DNAの定量は、標準曲線と検体曲線の両者を2点以上対比して得られる数値の平均値で求めた。対比する範囲は酵素反応の安定する $100\sim 1000\text{FU}$ の範囲とした。

検体Aの場合、 $10^{1.1}\rightarrow 10^{1.0}$ 、 $10^{2.0}\rightarrow 10^{2.0}$ と対比して、 $10^{1.9(4.1)} = 10^{3.0}$ 、 $10^{2.9(4.1)} = 10^{3.0}$ コピー/ $\mu\text{l}$ となり、全抽出DNA  $100\mu\text{l}$ 中(すなわち元の検体1ml)では $10^{4.0}$ コピー/mlとなる。以上の結果から、検体中のDNAを定量することができた。また、対比する範囲における尿中DNAの検出限界は、 $10^{2.0}$ コピー/mlとした。

電気泳動

標準鋳型 (比<sup>°</sup>-/10 μl)



標準曲線

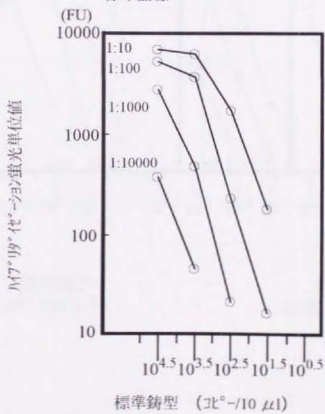


図5. 電気泳動と標準曲線

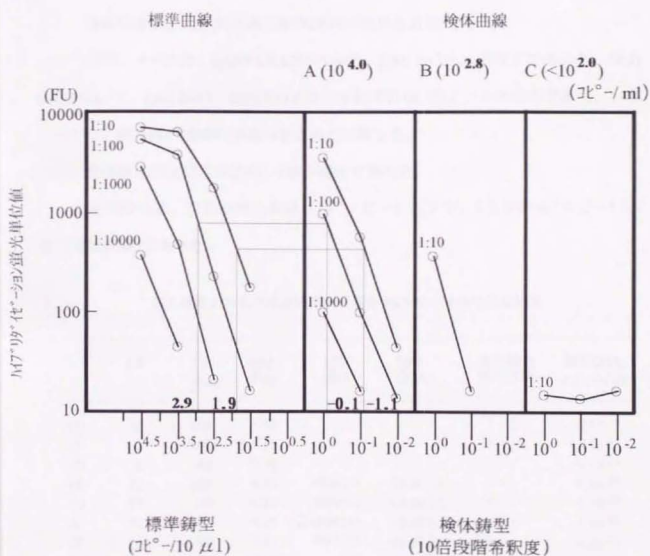


図6. 標準曲線と検体曲線との対比による検体DNAの定量

【臨床的検討】

1. 健康人(生体腎下ナー)におけるHCMV感染状況の検討

14名の健康人は、2名に軽症の高血圧がみられたほかは特に異常所見がなく、感染症を疑わせる臨床症状も認めなかった。

血清抗体価、免疫蛍光法、尿中DNAの結果を表4に示した。

CFは、4~32倍、IgG(FA)は20~160倍、IgM(FA)は10倍以下であった。なお6名について、IgG(EIA)、IgM(EIA)は、それぞれ66.5以上、0.80以下であり、14名すべてに、HCMVの既感染があったものと診断した。

免疫蛍光法は13名が陰性、1名が陽性であった。

尿中DNAは、13名が検出限界 ( $10^{2.0}$ コピー) 以下で、1名がの  $10^{2.0}$ コピー(/ml 以下同様省略)であった。

表4. 健康人14名の血清抗体価と尿中 HCMV・DNAの定量結果

	CF	IgG (FA)	IgM (FA)	IgG (EIA)	IgM (EIA)	尿沈渣免 疫蛍光法	尿中DNA (コピー/ml)
(1)	32	160	<10			(-)	<10 <sup>2.0</sup>
(2)	32	160	<10			(-)	<10 <sup>2.0</sup>
(3)	8	40	<10			(-)	<10 <sup>2.0</sup>
(4)	32	160	<10	4800(+)	<0.80(-)	(-)	<10 <sup>2.0</sup>
(5)	16	20	<10	3080(+)	<0.80(-)	(-)	<10 <sup>2.0</sup>
(6)	32	40	<10	≥4800(+)	<0.80(-)	(-)	<10 <sup>2.0</sup>
(7)	4	80	<10	66.5(+)	<0.80(-)	(-)	<10 <sup>2.0</sup>
(8)	32	20	<10			(-)	<10 <sup>2.0</sup>
(9)	16					(-)	<10 <sup>2.0</sup>
(10)	8	40	<10			(+)	<10 <sup>2.0</sup>
(11)	32	80	<10			(-)	<10 <sup>2.0</sup>
(12)	16	20	<10	1180(+)	<0.80(-)	(-)	<10 <sup>2.0</sup>
(13)	16	40	<10			(-)	<10 <sup>2.0</sup>
(14)	32	80	<10	≥4800(+)	<0.80(-)	(-)	10 <sup>2.0</sup>

## 2. 腎移植レシビエントにおける臨床的解析

### 【症例1 腎移植後、感染症状のない症例】

症例は53歳、男性。母親(73歳)をドナーとする生体腎移植をおこなった。図8に経過を示した。

移植前の尿中DNAは検出限界の $10^{2.0}$ コピー以下で、免疫抑制療法の導入1週間後に $10^{2.5}$ コピーであった。移植後、感染症状は認めなかった。1ヶ月後の退院時の尿中DNAは $10^{2.0}$ コピー以下であった。3ヶ月後も同様に $10^{2.0}$ 以下であった。

なお、血清抗体価の有意な上昇はなかった。尿沈渣細胞の免疫蛍光法(以下免疫蛍光法)は、移植前に陰性であったが、1週間後から陽性化し、3ヶ月後も陽性であった。

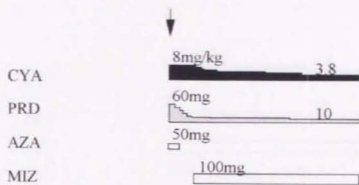
### 【症例2 ステロイドパルス療法後、感染症状のない症例】

症例は38歳、男性。母親(58歳)をドナーとする生体腎移植をおこなった。図9に経過を示した。

移植前の尿中DNAは $10^{2.0}$ コピー以下で、移植後急性拒絶反応疑いにてステロイドパルス療法を施行した。1ヶ月後に $10^{2.0}$ コピーとなったが、感染症状は認めなかった。3ヶ月後、4ヶ月後ともに $10^{2.0}$ コピー以下であった。

なお、血清抗体価の有意な上昇はなかった。免疫蛍光法は、移植1ヶ月後に一過性に陽性であった。

生体腎移植



免疫蛍光法	(-)	(+)	(+)	(+)
CF	32	16		
IgG(FA)	40	10		
IgM(FA)		<10		

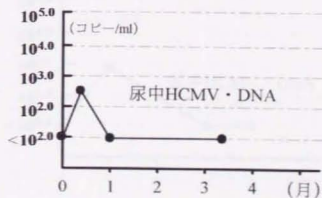
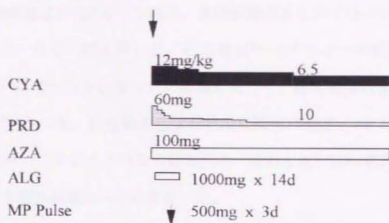


図 8. 症例1 腎移植後感染、症状のなかった症例

生体腎移植



免疫蛍光法	(-)	(+)	(-)	(-)
CF	16	4	8	
IgG(FA)			10	20
IgM(FA)	<10	<10	10	

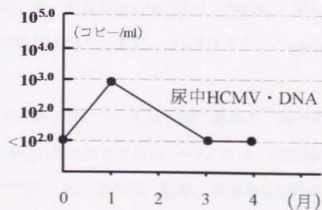


図 9. 症例2 ステロイドパルス療法後、感染症状のなかった症例



【症例3 ステロイドパルス療法後、感染症状のない症例】

症例は48歳、女性。母親（73歳）をドナーとする生体腎移植をおこなった。

図10に経過を示した。

移植2週間後に、急性拒絶反応がありステロイドパルス療法をおこなった。尿中DNAは移植直後は $10^{2.4}$ コピーであり、急性拒絶反応に対するステロイドパルス療法後に $10^{3.5}$ コピーまで一時上昇した。その後 $10^{2.4} \sim 10^{2.0}$ コピーの範囲を変動し、6ヶ月以降は、 $10^2$ コピー以下となった。経過を通じて、感染症状はなく、抗体価の変化もほとんどなかった。免疫蛍光法は移植後に陽性が続き、4ヶ月以降に陰性化した。本症例では、ステロイドパルス療法後の一時的な尿中DNAの増加がとらえられたが、明らかな感染症状はみられなかった。

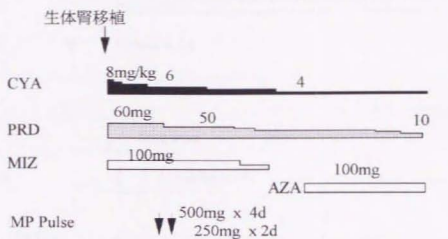
【症例4 ステロイドパルス療法後に発熱のあった症例】

症例は38歳、女性。父親（60歳）をドナーとする生体腎移植をおこなった。

図11に経過を示した。

移植1週間後、急性拒絶反応がありステロイドパルス療法をおこなった。その後、37°C台の微熱が持続した。抗体価はIgG10倍から80倍に上昇しており、免疫蛍光法は陽性であった。HCMVの関与を疑い、 $\gamma$ -グロブリンとganciclovirを投与した後、平熱化した。

尿中DNAは抗ウイルス療法前については不明であるが、抗ウイルス療法直後は $10^{2.7}$ コピーで、その後、移植5ヶ月後までは $10^{2.1} \sim 10^{2.7}$ コピーの範囲を変動し、6ヶ月以降は $10^2$ コピー以下であった。この間、細菌、真菌および他のウイルス感染を検索したが、明らかな感染病原体は検出されなかった。本症例では、抗ウイルス療法後の尿中DNAの推移をみることができた。



免疫蛍光法	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
CF	8	16	16	16	16
IgG(FA)		<10			
IgM(FA)		<10			

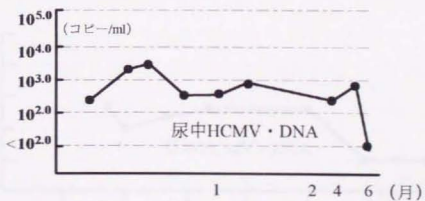
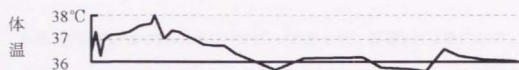
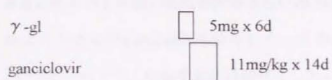
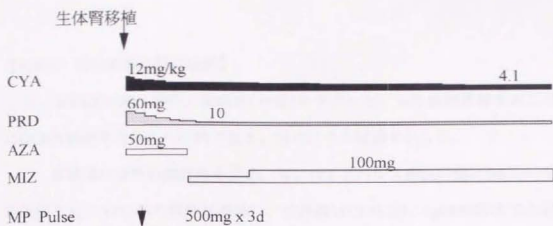


図10. 症例3 ステロイドパルス療法後、感染症状のなかった症例



免疫蛍光法	(+)	(+)	(-)	(-)
CF	<4	<4	16	16
IgG(FA)	10	80	40	20
IgM(FA)	<10	<10	<10	<10

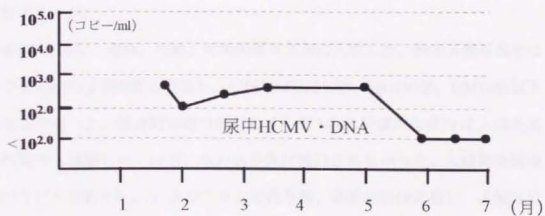


図11. 症例4 ステロイドパルス療法後の発熱

#### 【症例5 腎移植後の肺炎症例】

症例は39歳、男性。配偶者(36歳)を下ナーとする生体腎移植をおこなった後にHCMV肺炎を合併した症例である。図12にその経過を示した。

移植後に急性拒絶反応を認め、ステロイドパルス療法の他にOKT3、ALG投与を追加した。37℃台の微熱が遷延し、抗体価はCF512倍、IgG640倍まで上昇し、免疫蛍光法でも抗原陽性細胞を認めた。当初の感染症状は微熱のみであったが、急性拒絶反応に対する強い免疫抑制療法後のHCMV顕性感染症が考えられたため、 $\gamma$ -グロブリンおよびganciclovirを投与した。その後、平熱化し、尿中DNAは検出限界 $10^{2.0}$ コピー以下で、免疫蛍光法は陰性化した。移植腎機能は良好で4ヶ月後に退院した。

退院2週間後の尿中DNAは $10^{2.7}$ コピーであった。移植6ヶ月後になり、下痢と39℃台の発熱を主訴に再入院した。抗体価はCF256倍、IgG160倍で高値のままであった。免疫蛍光法で抗原陽性細胞を認めた。HCMV顕性感染症の発症が疑われたため、 $\gamma$ -グロブリンを投与した。尿中DNAは $10^{3.7}$ コピーまで上昇していた。便培養で病原性大腸菌が検出され細菌性下痢症と診断した。経口抗菌剤の投与により、下痢は消失した。退院時の尿中DNAは $10^{4.7}$ コピーであった。また、この時点の免疫蛍光法は陰性であった。

移植8ヶ月後に、発熱、咳嗽、呼吸困難を主訴に入院した。胸部X線写真では右肺野にびまん性の浸潤陰影を認めた。抗体価はCF256倍、IgG160倍、IgM10倍以下で高値のままであった。経皮的肺吸引細胞診で、HCMVに特徴的な核内封入体を認め、HCMV肺炎と診断した。なお、他の病原体は検出されなかった。入院時の尿中DNAは $10^{4.2}$ コピーであった。 $\gamma$ -グロブリンの投与後、肺炎は軽快に向い、入院20日後、肺陰影は改善した。入院から約1ヶ月にわたり微熱が遷延した。

尿中DNAは肺炎治癒から2ヶ月後、依然として $10^{4.7}$ コピーであったが、さらにその1ヶ月後には $10^{3.2}$ コピーまで減少した。肺炎治癒から7ヶ月後(移植16ヶ月後)には、 $10^{2.0}$ コピー以下となった。

以上のように、HCMV肺炎の発症前後の尿中DNAの変化をとらえることができた。すなわち、移植後早期の抗ウイルス療法後に、尿中DNAは検出限界以下となったが、その後再び増加し、肺炎発症の前に $10^{4.0}$ コピー以上のピークを認め、治癒後に徐々に減少していくのがとらえられた。肺炎の治癒から、尿中DNAが検出感度以下に達するまでに約7ヶ月を要した。

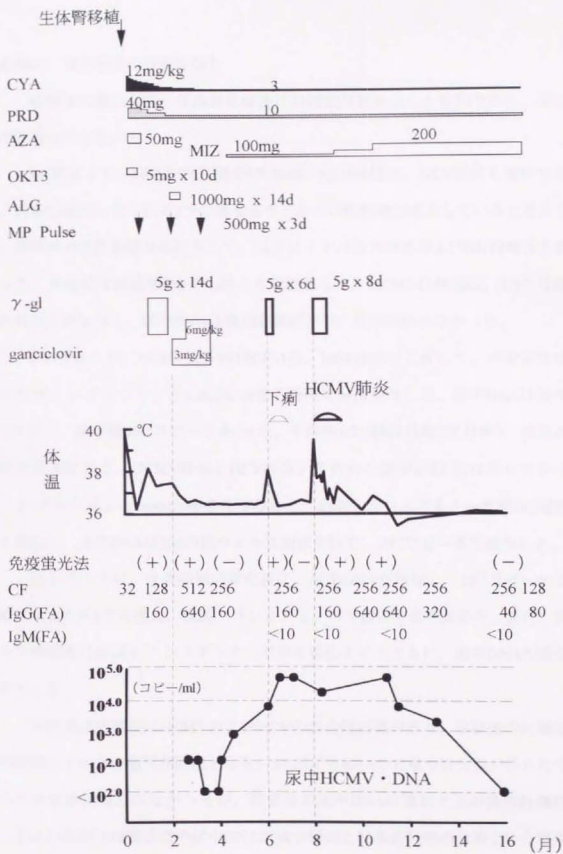


図12. 症例5 腎移植後の肺炎

#### 【症例6-1 腎移植後の肝炎症例】

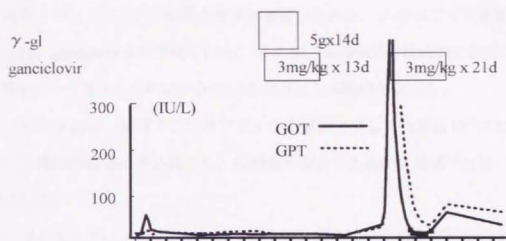
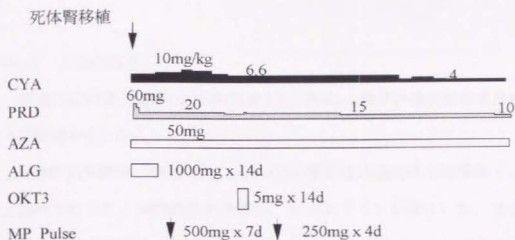
症例は32歳、女性。死体腎移植後に肝機能障害を呈した症例である。図13にその経過を示した。

移植前より、HCMV抗体価がCF 32倍、IgG160倍で、HCV抗体も陽性であった。肝炎の起因となり得る2つの異なるウイルスの既感染が成立していると考えられた。移植後の急性拒絶反応に対して、ステロイドパルス療法およびOKT3投与をおこなった。免疫抗体法は移植1ヶ月後より陽性化した。HCMV抗体価は、1.5ヶ月後まで有意な上昇はなく、尿中DNAは検出限界以下で、感染症状もなかった。

2ヶ月後より、HCMV抗体価がCF64倍、IgG320倍と上昇した。感染症状はなかったが、 $\gamma$ -グロブリンとganciclovirを予防的に併用投与した。尿中DNAは投与前 $10^{10}$ コピー、投与後 $10^{17}$ コピーであった。その約1ヶ月後(移植3ヶ月後)、発熱と肝機能異常を認めた。HCMV肝炎とHCV肝炎いずれかの確定診断には至らなかったが、 $\gamma$ -グロブリンとganciclovirを再投与した。血清トランスアミナーゼ値は2週間後に正常化し、尿中DNAは2回の抗ウイルス療法を経て、 $10^{17}$ コピーまで減少した。

以上のように、免疫抑制の強化後に、尿中DNAが増加し、 $10^{19}$ コピーのピーク値を示した約1ヶ月後に、血清トランスアミナーゼ値の上昇を認めた。また、抗ウイルス療法後に血清トランスアミナーゼが正常化するとともに、尿中DNAの減少傾向を示した。

本症例は移植前にHCMVおよびHCVの混合既感染があり、移植後の肝機能異常の起因ウイルスの鑑別が問題となる。血中HCV RNAの定量や肝生検が得られていないため確診を得られなかったが、移植後の尿中DNAの増加とその後の肝機能異常、および抗HCMV療法後の尿中DNAの減少傾向と肝機能異常の改善という経過から、尿中DNAと肝機能異常の推移との関連性が示唆された。



HCV Ab (+)

免疫蛍光法	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)				
CF	32	16	32	64	1024	256	1024	512	512	
IgG(FA)	160	40	40	320	320	640	320	640	640	320
IgM(FA)		<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

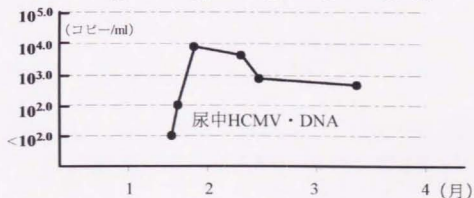


図13. 症例6-1 腎移植後の肝炎



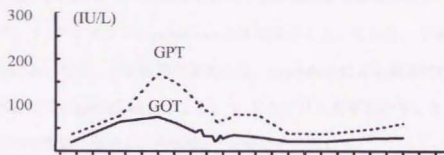
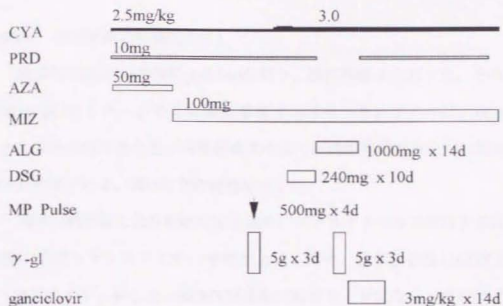
### 【症例6-2 肝炎の再発】

前述の症例は、退院3ヶ月後(移植7ヶ月後)に、再び肝機能異常を認めた。図14にその経過を示した。

HCMV抗体価は、CF512倍、IgG(FA)320倍で前回退院時と同様高く、免疫蛍光法も陽性であった。HCMV肝炎を疑い、 $\gamma$ -グロブリンを投与した。また、入院後、急性拒絶反応を認め、ステロイドパルス療法およびDSG、ALG投与をおこなった。血清トランスアミナーゼ値の異常が遷延したため、 $\gamma$ -グロブリンを再投与するとともに、ganciclovirを併用投与した。その後、肝機能異常は次第に改善し、GOT、GPT値がピークを示した時点から約1.5ヶ月後に正常範囲となった。

尿中DNAは、血清トランスアミナーゼ値が上昇した時期は $10^{4.3}$ コピーであったが、肝機能の改善に伴い低下し、肝機能が安定した時期には $10^{2.0}$ コピー以下にまで低下した。

以上のように、本症例では、抗ウイルス療法後に肝機能が正常化するとともに、尿中DNAが次第に減少し、尿中DNAと肝機能異常の推移との関連性が示された。



免疫蛍光法	(+)	(+)	(+)	(-)
CF	512	512	256	256
IgG(FA)	160	320	160	320
IgM(FA)	<10	<10	<10	<10

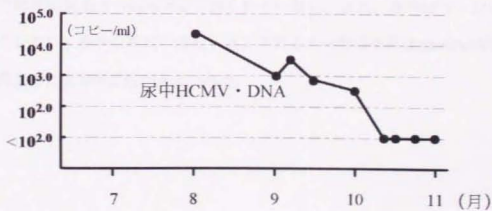


図14. 症例6-2 肝炎の再発

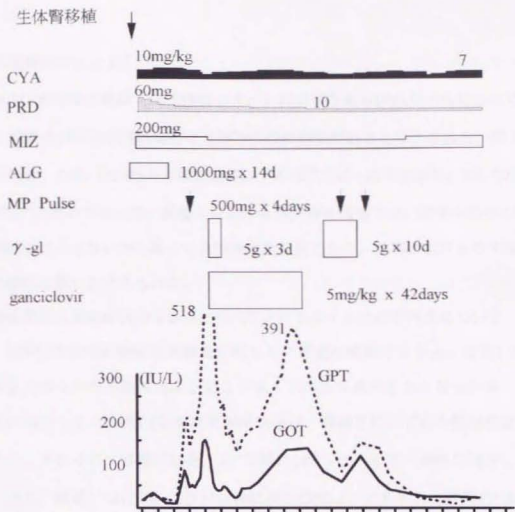
### 【症例6-3 再移植後の肝機能異常】

前述の症例は、1年後にgraft lossに陥り、透析再導入となった。その3ヶ月後、配偶者(41歳)をドナーとする生体腎移植をおこなった。ドナーは、HCMV抗体陽性、HCV抗体陰性であった。再移植後まもなく肝機能異常がみられ、鑑別診断が難しかった症例である。図15にその経過を示した。

移植2週間後に急性拒絶反応を認め、ステロイドパルス療法をおこなった。その後、血清トランスアミナーゼ値が上昇し始め、移植25日後にGOT 152 IU/L、GPT 518 IU/Lまで上昇した。HCMV抗体価は有意な上昇はなく、免疫蛍光法も陰性であった。当初、HCMVあるいはHCVに起因する肝機能異常が疑われた。HCMV肝炎を考慮して、 $\gamma$ -グロブリンとganciclovirを併用投与した。その後、肝機能異常は一旦改善傾向にあったが、その後再び悪化した。ganciclovirによる薬剤性肝障害の合併も考えられたので、ganciclovirを中止し、 $\gamma$ -グロブリンを単独投与した。肝機能異常は遷延しつつ次第に改善し、再移植4ヶ月後に正常化した。

尿中DNAは、移植後から持続して検出限界の $10^{10}$ コピー以下であり、尿中DNAと肝機能異常の推移に関連性が見られなかった。

本症例の肝機能異常の原因として、HCVの可能性が疑われるが、肝生検による病理組織学的検討は患者の同意が無く得られていない。また、血中HCV・RNA定量が得られていない。後半の再度の血清トランスアミナーゼの異常はganciclovirによる薬剤性肝障害の合併の可能性が考えられた。



免疫蛍光法 ( - ) ( - )

CF	128	64	64	64	32
IgG(FA)	640	640	640	640	640
IgM(FA)	<10	<10	<10	<10	<10

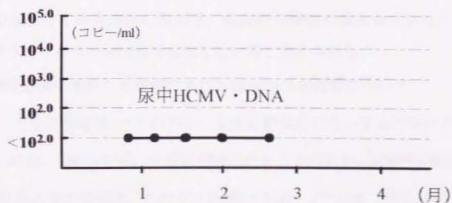


図15. 症例6-3 再移植後の肝機能異常

### 【臨床的検討のまとめ】

#### 1) HCMV既感染の健康人（生体腎ドナー）における尿中DNAレベルについて

健康人14名は血清診断によりHCMVの既感染があると考えられた。尿中DNAは、13名（92.8%）が検出感度以下の $10^{2.0}$ コピー以下であり、1名（7.1%）が $10^{2.0}$ コピーであった。健康人における潜伏感染状態では、尿中へのウイルス排泄はほとんどないか、あっても検出感度程度であり、体内におけるウイルスの活動性は低いと考えられた。

#### 2) 腎移植後に感染症状のなかった症例におけるウイルスの活性化について

症例1は急性拒絶反応も感染症状もなく経過は順調であった。症例2,3は移植後まもなく急性拒絶反応のためステロイドパルス療法をおこなったが、感染症状はなかった。症例1,2における尿中DNAは、移植前にいずれも検出感度以下であり、それぞれ、移植10日後、1ヶ月後に $10^{2.5}$ コピーまで一過性に増加した。それぞれ、移植1ヶ月以降、3ヶ月以降は検出感度以下であった。症例3では、半月後に $10^{3.5}$ コピーまで増加し、その後 $10^{2.4} \sim 10^{2.9}$ コピーの範囲を推移し、移植6ヶ月以降は検出感度以下となった。これらの症例により、移植後に明らかな感染症状を認めなくても、尿中DNAは健康人のレベルよりも高く、かつ移植後1ヶ月以内の早期より一過性に増加すること、あるいは遷延することがわかった。こうした移植後の尿中ウイルス排泄の増加は、免疫抑制療法の導入やステロイドパルス療法に伴うウイルスの活性化を反映していると考えられた。

#### 3) 腎移植後に顕性感染を発症した症例における尿中DNAの推移について

症例5,6は、ともに移植後3ヶ月以内に、急性拒絶反応にたいするステロイドパルス療法、ALG、OKT3の強い免疫抑制療法がおこなわれた。症例5の肺炎および症例6の肝炎の発症時期は、それぞれ移植8ヶ月後、3ヶ月後（再発は8ヶ月後）であった。尿中DNAは、それぞれ発症の約1ヶ月前に $10^{4.7}$ コピー、 $10^{3.9}$ コピーのピーク値を認めた。症例6では再発時に $10^{4.3}$ コピーであった。これらの顕

性感染例における尿中DNAのピーク値および再発時のレベルは、感染症状のなかった症例1,2,3のどの時期のレベルよりも高かった。また、これらの顕性感染をみた症例では、抗ウイルス療法後、経日とともに尿中DNAが減少した。

従って、尿中DNAの経時的推移は、HCMV顕性感染の臨床的経過と符号しており、HCMV顕性感染の発症の予測、および抗ウイルス剤の治療効果を判定する指標として有用であることが示唆された。

#### 4) 移植後の免疫抑制剤の量とウイルス排泄期間および顕性感染のリスクとの関係について

移植後3ヶ月以内に急性拒絶反応に対して行われた免疫抑制剤の量を、表5に示した。

表5. 移植後3ヶ月以内の急性拒絶反応に対する免疫抑制剤の量

症例	1	2	3	4	5	6
MPpulse(g)	-	1.5	2.5	1.5	4.5	4.5
ALG(g)	-	1.4	-	-	1.4	1.4
OKT3(mg)	-	-	-	-	50	70

移植後に尿中DNAが検出感度以下になるまでの月数は、感染症状のなかった症例1では1ヶ月と早く、ステロイドパルス療法をおこなった症例2,3,4では3ヶ月から6ヶ月とやや長く、肺炎の症例5、肝炎の症例6では、それぞれ16ヶ月、10ヶ月と長期に及んだ。顕性感染の症例5,6ではステロイドの総量が多く、ALGに加えてOKT3が投与されていた。免疫抑制の強化がその後のウイルス排泄の遷延とHCMV顕性感染の発症に関係している可能性が考えられた。いずれの症例も、その後、併発疾患がなく、移植腎が長期生着しており、免疫抑制剤の少量維持療法に移行した後のHCMV顕性感染の発症の危険性は少ないと考えられた。

5) 尿沈渣免疫蛍光法と尿中DNA検出感度の関係について

免疫蛍光法と尿中DNA検出感度の関係を、以下の4分表(表6)に示した。

表6. DNA検出感度と免疫蛍光法陽性細胞の有無(4分表)

	尿中DNA $\geq 10^{2.0}$	尿中DNA $< 10^{2.0}$	合計
免疫蛍光法(+)	15	3	18
免疫蛍光法(-)	3	19	22
合計	18	22	40

これによると、尿中DNAに対する免疫蛍光法のsensitivityは83.3%、specificityは86.3%、agreementは85.0%であった。症例1~6のいずれも移植後に免疫蛍光法陽性であった。また、免疫蛍光法と尿中DNAの検出との不一致がときに見られた。免疫蛍光法が陽性化しても感染症状がない症例があった。

6) 血清抗体価と尿中DNAの推移の相違について

感染症状のなかった症例では、移植後にCF、IgG(FA)およびIgM(FA)の有意な上昇は認めなかった。顕性感染を発症した症例では、IgM(FA)の有意な上昇は認めなかったが、CF、IgG(FA)の有意な上昇を認めた。しかし、症例5では移植4ヶ月後の退院から肺炎を発症するまでの期間に、尿中DNAは検出感度以下からピーク値まで急峻な増加を認めたのに対して、CF、IgG(FA)は高値のままであった。また、症例6では、移植8ヶ月後の肝炎の再発時に、CF、IgG(FA)は高値のままであった。また、治療後、血清トランスアミナーゼの正常化に伴い、尿中DNAの減少を認めたが、CF、IgG(FA)の変化は高値のままであった。

7) HCMV,HCV混合既感染レシビエントの肝機能異常における尿中DNAの診断的意義について

症例6-1では、尿中DNAのピーク値の後に血清トランスアミナーゼの上昇をみ

た。症例6-2では抗HCMV療法により尿中DNAの減少と平行して、肝機能が正常化した。ともに臨床経過と尿中DNAの推移から、HCMVの活動性と肝機能異常の関連が示された。症例6-3では、再移植前から持続して尿中DNAが検出感度以下であり、肝機能異常の推移との関連は見られず、前半はHCVによる肝炎が疑われ、後半は薬剤性肝障害が疑われた。血中HCV・RNAの定量と肝生検が得られていないため確診が得られないが、尿中DNAの推移が鑑別診断の一助となりえる可能性を示した。



## 考 察

本邦におけるドナー・レシピエントのHCMV matchingは、海外での抗体陽性率が40~50%<sup>(38,39)</sup>であるのに対して、抗体陽性ドナーから抗体陽性レシピエント(D+/R+ matching)の移植が殆どを占める。D+/R- matchingの移植では、顕性感染の発症率は6割程度と高く<sup>(9)</sup>、D+/R+およびD-/R+matchingにおいても、2~3割程度<sup>(9)</sup>と言われ、再感染や潜伏感染ウイルスの再活性化が問題となる。既感染の多い本邦においては、移植後の再活性化、再感染を念頭に置き、重篤な顕性感染にいたる前に診断し、対処することが必要である。殊に、有効な抗ウイルス剤が開発<sup>(40-42)</sup>され、その投与開始時期の有力な指標が求められている。また、長期投与に伴う薬剤耐性<sup>(43)</sup>や再発<sup>(44-47)</sup>が問題となっており、抗ウイルス剤の効果判定や再発予測のための指標が求められている。

従来より、血清診断は潜伏感染の診断のみならず、再活性化の診断に用いられるが、移植後の免疫抑制による抗体産生低下や、グロブリン製剤投与や輸血による抗体移行で修飾される<sup>(44)</sup>ため、血清診断による早期診断や再活性化の診断は必ずしも容易でない。また、培養細胞の細胞変性効果を見る従来のウイルス分離は2週間から1ヶ月の時間を要する。最近、shell vial法により約2日間で迅速に培養細胞のウイルス抗原を検出することができるようになったが、ウイルスの再活性化をとらえ顕性感染の危険性を早期より予測することは難しい。

近年になって、PCR法が開発<sup>(12)</sup>され、末梢血白血球<sup>(13)</sup>、血清<sup>(14,15)</sup>尿<sup>(16-18)</sup>、心生検組織<sup>(19)</sup>など、種々の検体材料からのHCMV・DNAの定性的検出が臨床診断に応用されている。PCR法による増幅DNAのアイソトープ標識プローブをもちいた検出感度は高い<sup>(20)</sup>。臓器移植や免疫不全状態の患者において、顕性感染を発症する前のPCR陽性化が、早期診断の指標になるとの報告<sup>(15,22-24)</sup>がある。しかし、PCRの陽性化

が認められても顕性感染に至らないものも少なからずあり、健康既感染者においても、PCR陽性となることもまれにある<sup>(20,21)</sup>ため、陽性化の意義は、従来の診断法と臨床症状を組合わせて判断しなければならない。こうした事情から、ウイルスの増殖を定量的に把握する目的で最近、アイソトープ標識を用いたPCR定量法の報告が散見されるようになった。骨髄移植患者3例の剖検肺<sup>(25)</sup>、肺移植1例および心肺移植患者1例の気管支洗浄液<sup>(26)</sup>、心移植患者の心筋生検組織<sup>(19)</sup>でのDNA定量がある。これらは、いずれも臨床検体として経時的に採取することが困難な検体であり、検体採取において検体量を一定にすることが難しいため、臨床症状とDNA量との経時的な関係の解析は十分とはいえない。肝移植患者やAIDS患者の末梢白血球、尿を材料とした報告<sup>(28)</sup>があり、DNAの量が多い検体ほどウイルスが分離されやすいことが明らかにされた。骨髄移植患者では、抗ウイルス剤の投与後に末梢白血球DNAが減少し、治療効果の判定にDNA定量法が有益であるとの報告<sup>(27)</sup>がある。このように、PCR法を応用したDNAの定量は、従来の all or none の定性的PCR法で解析し得なかったウイルスの活性を知る手がかりとして注目されているが、これまでのアイソトープ標識による定量は、多数の検体処理には不向きであり、アイソトープの力価は時間で減衰し、一定条件での定量が難しいこと、設備上の制約があることから、通常の臨床検査として普及していない。

本研究では、PCR法とマイクロプレートハイブリダイゼーション併用した簡便な定量法をHCMVにおいて確立した。本法は、マイクロプレートハイブリダイゼーションの併用により10コピー台まで検出感度をあげることが可能であった。これは、アイソトープ標識に劣らず、高い検出感度であるとともに、設備上の制約がなく簡便な方法であり、多検体を扱う日常の臨床検査に適している。また、尿中DNAの経時的な量的推移と臨床経過との関係について十分解明した報告はなく、本研究では検体として尿を選択し、臨床経過との関係を検討することとした。

尿中DNAを定量するにあたっては、freeなウイルスのほかに、腎尿路系の剥離細胞や多核白血球などの沈渣細胞中のウイルスも考慮しなければならない。HCMVの潜伏部位はさまざまな臓器や細胞が想定<sup>(7)</sup>されており、腎や多核白血球にも潜伏の可能性が指摘されている。沈渣細胞は排尿時すでに変性ないし崩壊していることもあるため、尿中のfreeなウイルスと沈渣細胞中のウイルスを区別することは難しい。このため本研究では、両者の総和からウイルスDNAを定量することとした。また、採取条件を一定とするため、早朝中間尿とした。

健康人(生体腎ドナー)14名は、血清診断によりすべて既感染があると考えられた。尿中DNAは、13名(92.8%)が検出限界以下であった。平素、感染症状のない健康人における潜伏感染では、ウイルスの増殖は低いレベルにあるものと推察された。

本研究で検討した症例のHCMV matchingは、ドナーは1例の死体腎移植の不明例を除いて陽性であり、レシビエントは全例で陽性であった。移植後の尿中DNAは、感染症状のなかった症例1,2,3では、移植後1ヶ月以内の早期に、一過性の増加を認めた。このような移植後の尿中DNAの増加は、ウイルスの再感染、あるいは免疫抑制剤の導入やその強化に伴うウイルスの再活性化のいずれかによるものと推察された。また、肺、肝の臓器顕性感染を発症した症例5,6では、いずれも発症の約1ヶ月前に尿中DNAのピークが認められ、そのピーク値のレベルは感染症のみられなかった症例のどの時期のレベルよりも高かった。従って、尿中DNAの推移は、HCMV顕性感染の危険性を予測する指標になりえる可能性が示唆された。さらに、抗ウイルス療法後、経日とともに尿中DNAが減少するのがとらえられ、抗ウイルス療法の効果を判定する指標になり得ることが示唆された。

一方、免疫蛍光法は表6にみるように、尿中DNAとの不一致がときに見られること、また、免疫蛍光法が陽性化しても感染症状がない症例があることから、免疫蛍光法による顕性感染の予測は困難であると考えられた。従って、ウイルスの活

性と疾患との関係を知る上で、尿中DNAの定量的推移は、定性的な免疫蛍光法に比べて優れていると考えられた。

血清抗体価については、移植後のCF、IgG(FA)の上昇により初期のウイルスの活性化をみる上で有用であったが、その後長期に維持され、顕性感染の再発を予測する指標にはならなかった。また、抗ウイルス療法の効果を反映していなかった。急性拒絶反応は繰り返すことが多く、免疫抑制の強化に伴う顕性感染と再発のリスクを見る上で、尿中DNAの定量的推移は血清抗体価より優れていた。

肺炎、肝炎の発症時期は、それぞれ移植8ヶ月後、3ヶ月後(再発8ヶ月後)であった。顕性感染の発症が、移植後数ヶ月以内に集中する<sup>(40)</sup>とされ、これは免疫抑制剤少量維持への移行までに約3ヶ月かかることや、急性拒絶反応に対するステロイドパルス療法が必要となる時期も3ヶ月以内が多いことを反映していると考えられた。ちなみに移植3ヶ月以内の急性拒絶反応にたいしておこなわれたステロイドパルス療法などの免疫抑制は、表5に示したように、顕性感染症例でその総量が感染症状のなかった症例に比べて多かった。免疫抑制の強さが、顕性感染のリスクを高めることが考えられ、尿中DNAの推移によって、移植後のウイルスの活動性を知ることが有益であると考えられた。

また、尿中DNAが検出感度以下になるまでの移植後月数は、感染症状のなかった症例1では移植1ヶ月後と早く、ステロイドパルス療法をおこなった症例2,3,4では3ヶ月から6ヶ月とやや長く、強い免疫抑制後に顕性感染をみた症例では、それぞれ16ヶ月、10ヶ月以降と長期に及んだ。免疫抑制の強さと、感染症状の有無によって、尿中へのウイルス排泄の期間に違いがあることが示唆された。なお、本研究の症例はいずれも、その後併発疾患がなく、移植腎が長期生着しており、免疫抑制剤の少量維持療法に移行した後の顕性感染の発症の危険性は少ないと考えられた。しかしながら、長期生着例でも、さまざまな併発疾患や身体的侵襲によって易感染性となることがあることを念頭において、経過観察する必要がある。

なお、本研究のDNA定量法とアプローチを異にするが、最近、末梢白血球のImmediate early antigen陽性細胞数を間接酵素抗体法により定量的にとらえるantigenemia法の報告<sup>(49-53)</sup>がある。antigenemia陽性細胞が多いときに、末梢白血球あるいは血漿中のDNA定性的に検出され、ウイルス分離される頻度も高い<sup>(52,54)</sup>とされる。また、顕性感染の発症時に、陽性細胞数が多く出現し、抗ウイルス剤による症状改善とともにすみやかに減少ないし陰性化することから、antigenemia法は治療効果の判定に有益な指標とされる<sup>(50,53)</sup>。しかし、少数のantigenemia陽性細胞の出現を認めても顕性感染に至らない症例も多い一方<sup>(51)</sup>で、少数の陽性細胞でも顕性感染を認めることがある<sup>(55)</sup>とされる。今後、早期診断におけるantigenemia法と尿中DNA定量との相関性を検討することが必要と考えられる。抗原と尿中DNA定量の両面からウイルスの消長を解析することは、早期診断と治療効果を判定する上で興味深い課題である。

また、HCMV以外に同一の臓器感染するウイルスの混合感染がある場合の起因ウイルスの鑑別診断において、尿中HCMV・DNAの定量が有用である可能性が示された。すなわち、症例6ではC型肝炎ウイルス（HCV）とHCMVの混合感染があり、繰り返す肝機能異常がいずれのウイルスに起因するかの鑑別診断が難しかった。症例6-1,6-2では、血清トランスアミナーゼの推移と尿中HCMV・DNAの定量結果の推移に関連性が見られ、尿中HCMV・DNAの定量によるHCMV肝炎の診断の可能性が示唆された。症例6-3では、尿中DNAは抗HCMV療法を開始する直前から持続して検出感度以下であり、血清トランスアミナーゼの推移との関連性は見いだされなかった。肝生検と血中HCV・RNAの推移が得られていないため、確診はできえなかったが、一連の所見はC型慢性活動性肝炎および併発した薬剤性肝障害による可能性が疑われた。以上のように尿中DNAの定量の推移は、異なる肝炎起因ウイルスの鑑別診断の一助となる可能性が示唆された。

移植患者は、維持透析期間に輸血を繰り返されていることが多く、これら2つの異なる肝炎起因ウイルスの混合感染が多い。一般健康人のHCV抗体保有率は2%以下<sup>(56,64,65)</sup>であるが、血液透析患者や腎移植患者では、約25%前後に及び<sup>(57,66,67)</sup>、なかでも10年以上の透析歴をもつ患者では40~50%と高率<sup>(58,59)</sup>である。C型慢性活動性肝炎に対する唯一の治療であるインターフェロン<sup>(61)</sup>は、拒絶反応を誘発するなど<sup>(60,62,63,69-71)</sup>の副作用のため、腎移植患者のC型慢性活動性肝炎に対する使用の是非については結論が出ていない。また、インターフェロンの副作用である発熱、白血球減少、血小板減少はHCMV顕性感染でもみられることがあり、肝炎の起因ウイルスを特定することが難しい。従って、混合感染例では、血中HCV・RNA量と尿中HCMV・DNAを知ることが重要と考えられた。

本研究では、尿を材料として、腎移植後のHCMVの消長をとらえることが可能であり、尿中DNAの定量は顕性感染の予測と治療効果の判定に有用であることを示した。PCR法を応用したマイクロプレートハイブリダイゼーションによるDNA定量法は、アイソトープ標識より簡便な方法であり、今後さまざまな検体でのDNAの定量に応用しうると考えられた。

## ま と め

本研究ではHCMV・DNAの定量法を用いて、早朝中間尿中のHCMV・DNA（尿中DNA）を定量し、HCMV感染症の臨床的解析を試みた。

1. HCMV・DNAの定量はPCR法とマイクロプレートハイブリダイゼーション法を併用し、以下のおこなった。一定量の早朝中間尿からDNAを抽出し一定量とし、これを鋳型とし、同時に、コピー数既知のHCMV・DNAを標準鋳型として、PCRをおこなった。得られたPCR産物を固相化液（1.5M NaCl）で37°C、3時間でマイクロプレートに固相化し、ビオチン標識DNAプローブを用いて50%Formamide、56°Cで18時間ハイブリダイゼーションをおこなった。streptavidin conjugated  $\beta$ -galactosidase を室温で1時間反応させ、酵素反応の基質として4-MUG- $\beta$ -D-galactosideを37°C、2時間反応させ、0.1M glycine-NaClで反応を停止後、反応産物4-MUの蛍光強度をフルオロスキャンで測定した。標準曲線と検体の蛍光強度を対比して、検体中のHCMV・DNAを定量することが可能となった。本方法は、簡便で多検体を扱うことが可能であり、日常の臨床検査に適していると考えられた。

2. 本法を用いて、健康人14名および腎移植患者6例の尿中DNAの定量をおこない、以下のことが明らかになった。

1) HCMV既感染の健康人における尿中DNAは、検出限界あるいはそれ以下であり、体内におけるウイルスの活動性は低いものと判断された。

2) 腎移植レシビエントでは、免疫抑制の強化後の尿中DNAの増加をとらえることができた。移植後の尿中ウイルス排泄の増加は、免疫抑制療法の導入や急性拒絶反応に対するステロイドパルス療法などの免疫抑制の強化によるウイルスの活性化を反映していると考えられた。

3) 腎移植後に肺炎、肝炎を発症した顕性感染症例では、尿中DNAのピークが先行して見られた。また、抗ウイルス療法後、経日とともに尿中DNAは減少した。尿中DNAの経時的推移は、顕性感染を予測と治療効果の判定の指標として有用であると考えられた。

4) 腎移植後の免疫抑制剤の少量維持療法に移行した後に、尿中DNAは検出感度以下となり、長期生着例では顕性感染の危険性は少ないと考えられた。

5) HCMVとC型肝炎ウイルスの混合感染における肝機能異常症例において、尿中DNAは起因ウイルスの鑑別の一助となった。



## 引用文献

- 1) 水野伸一、神谷忠: CMV陰性血の供給体制. 医学のあゆみ 165:408-410,1991.
- 2) Apperley JF, Goldman JM: Cytomegalovirus: biology, clinical features and methods for diagnosis. *Bone Marrow Transplantation* 3: 253-264, 1988.
- 3) Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED: Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis* 153: 478-488, 1986.
- 4) Chou SW: Acquisition of donor strains of cytomegalovirus by renal transplant recipients. *N Engl J Med* 314: 1418-1423, 1986.
- 5) Antoszewska H, Powell KF, Collins J, Doak PB, Williams LC, Munn S, Verran D, Croxson MC: Polymerase chain reaction in detection of CMV DNA in renal allograft recipients. *Aust NZ J Med* 22: 249-255, 1992
- 6) Winston DJ, Huang ES, Miller MJ, Lin CH, Ho WG, Gale RP, Champlin RE: Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections associated with bone marrow transplantation. *Ann Intern Med* 102: 16-20, 1985.
- 7) Chou S: Neutralizing antibody responses to reinfecting strains of cytomegalovirus in transplant recipients. *J Infect Dis* 160: 16-21, 1989.
- 8) Glenn J: Cytomegalovirus infections following renal transplantation. *Rev Infect Dis* 3: 1151-1178, 1981.
- 9) Fryd DS, Peterson PK, Ferfuson RM, Simmons RL, Balfour HH, Najarian JS: Cytomegalovirus as a risk factor in renal transplantation. *Transplantation* 30: 436-439, 1980.
- 10) 山中達彦、福田康彦、浅原利正、八幡浩、竹中正治、小野栄治、丸林誠二、杉野圭三、土肥雪彦、吉田哲也: 生体腎移植症例の術前抗サイトメガロウイルス(CMV)抗体の有無と術後CMV感染発生との関係. *移植* 26: 88-94, 1990.

- 11) Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Horsnell T, Hutchison III CA, Kouzarides T, Martignetti JA, Preddie E, Satchwell SC, Tomlinson P, Weston KM, Barrell BG: Analysis of the protein coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 154: 126-169, 1990.
- 12) Saiki RK, Sharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354, 1985.
- 13) 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* 158: 1185-1192, 1988.
- 14) Wolf DG, Spector SA: Early diagnosis of human cytomegalovirus disease in transplant recipients by DNA amplification in plasma. *Transplantation* 56: 330-334, 1993.
- 15) Patel R, Smith TF, Espy M, Wiesner RH, Krom RA, Portela D, Paya CV: Detection of cytomegalovirus DNA in sera of liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 32: 1431-1434, 1994.
- 16) Olive DM, Al Mufti S, Simsek M, Fayez H, Al Nakib W: Direct detection of human cytomegalovirus in urine specimens from renal transplant patients following polymerase chain reaction amplification. *J Med Virol* 29: 232-237, 1989.
- 17) Hsia K, Spector DH, Lawrie J, Spector SA: Enzymatic amplification of human cytomegalovirus sequences by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27: 1802-1809, 1989.

- 18) Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA: Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis* 158: 1177-1184, 1988.
- 19) Fernando S, Booth J, Boriskin Y, Butcher P, Carrington D, Steel H, Tryhorn Y, Corbishley C, Keeling P, Murday A, McKenna W: Association of cytomegalovirus infection with posttransplantation cardiac rejection as studied using the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 42: 396-404, 1994.
- 20) Bevan IS, Daw RA, Day PJ, Ala FA, Walker MR: Polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus infection in a blood donor population. *Br J Haematol* 78: 94-99, 1991.
- 21) Stanier P, Taylor DL, Kitchen AD, Wales N, Tryhorn Y, Tyms AS: Persistence of cytomegalovirus in mononuclear cells in peripheral blood from blood donors. *Br Med J* 299: 897, 1989.
- 22) Gerna G, Zipeto D, Parea M, Revello MG, Silini E, Percivalle E, Zavattoni M, Grossi P, Milanesi G: Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia, and DNAemia. *J Infect Dis* 164: 488-498, 1991.
- 23) Dorp WT, Vlieger A, Jiwa NM, Es LA, Plog M, Saase JLCM, Woude FJ: The polymerase chain reaction, a sensitive and rapid technique for detecting cytomegalovirus infection after renal transplantation. *Transplantation* 54: 661-664, 1992.
- 24) Kidd IM, Fox JC, Pillay D, Charman H, Griffiths PD, Emery VC: Provision of prognostic information in immunocompromised patients by routine application of the polymerase chain reaction for cytomegalovirus. *Transplantation* 56: 867-871, 1993.

- 25) Shibata M, Terashima M, Kimura H, Kuzushima K, Yoshida J, Horibe K, Morishima T: Quantitation of cytomegalovirus DNA in lung tissue of bone marrow transplant recipients. *Human Pathology* 23: 911-915, 1992.
- 26) Cagle PT, Buffone G, Holland VA, Samo T, Demmler GJ, Noon GP: Semiquantitative measurement of cytomegalovirus DNA in lung and heart-lung transplant patients by in vitro DNA amplification. *Chest* 101: 93-96, 1992.
- 27) Rawal BK, Booth JC, Fernando S, Butcher PD, Powles RL: Quantification of cytomegalovirus DNA in blood specimens from bone marrow transplant recipients by the polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 47: 189-202, 1994.
- 28) Drouet E, Boibieux A, Michelson S, Ecochard R, Biron F, Peyramond D, Colimon R, Denoyel G: Polymerase chain reaction detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes as a predictor of cytomegalovirus disease in HIV infected patients. *AIDS* 7: 665-668, 1993.
- 29) Hondo R, Yogo Y, Kurata T, Aoyama Y: Genome variation among varicella-zoster virus isolates derived from different individuals and from the same individuals. *Arch Virol* 93: 1-12, 1987.
- 30) 本藤良、井上栄、和山行正、伊東祐英: ポリメラーゼ連鎖反応による水痘患者材料中のウイルス定量. *臨床とウイルス* 18: 331-335, 1990.
- 31) Martinez J, Lahijani RS, Jeor SC: Analysis of a region of the Human Cytomegalovirus(AD169) Genome Coding for a 25-Kilodalton Virion Protein. *J Virol* 63: 233-241, 1989.
- 32) 大沢忍、本藤良、森茂郎、井上栄: ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法による水痘ウイルスDNAのビオチン標識プローブの作製. 第36回日本臨床病理学会(京都), 1989.

- 33) Inoue S, Hondo R: Microplate hybridization of amplified viral DNA segment. *J Clin Microbiol* 28: 1469-1472, 1990.
- 34) Paya CV, Smith TF, Ludwig J, Hermans PE: Rapid shell vial culture and tissue histology compared with serology for the rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in liver transplantation. *Mayo Clin Proc* 64: 670, 1989.
- 35) Kinney JS, Onorato IM, Stewart JA, Pass RF, Stagno S, Cheeseman SH, Chin J, Kumar ML, Yaeger AS, Herrmann KL, Hurwitz ES, Schonberger LB: Cytomegaloviral infection and disease. *J Infect Dis* 151: 772-774, 1985.
- 36) 母坪智行、千葉俊三、藤永恵: PCR法によるヒトサイトメガロウイルスDNAの検出. *蛋白質・核酸・酵素* 35: 98-104, 1990.
- 37) Toorkey CB, Carrigan DR: Immunohistochemical detection of an immediate early antigen of human cytomegalovirus in normal tissues. *J Infect Dis* 160: 741-751, 1989.
- 38) Sfameni SF, Skurrie IJ, Gilbert GL: Antenatal screening for congenital infection with rubella, cytomegalovirus and toxoplasma. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 26: 257-260, 1986.
- 39) Wilhelm JA, Matter L, Schopfer K: The risk of transmitting cytomegalovirus to patients receiving blood transfusions. *J Infect Dis* 154: 169-171, 1986.
- 40) Fletcher C, Sawchuk R, Chinnock B, Miranda P, Balfour, Jr.HH: Human pharmacokinetics of the antiviral drug DHPG. *Clin Pharmacol Ther* 40: 281-286, 1986.
- 41) Sommadossi JP, Revan R, Ling T, Lee F, Mastre B, Chaplin MD, Buhles, Jr.WC: Clinical pharmacokinetics of ganciclovir in patients with normal and impaired renal function. *Rev Infect Dis* 10: S507-S514, 1988.
- 42) Snyderman DR: Ganciclovir therapy for cytomegalovirus disease associated with renal transplants. *Rev Infect Dis* 10: S554-S562, 1988.

- 43) Sullivan V, Biron KK, Talarico C, Stanat SC, Davis M, Pozzi LM, Coen DM: A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene confers resistance to ganciclovir and phosphonyl-methoxyalkyl derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 19-25, 1993.
- 44) Gerna G, Zipeto D, Parea M, Percivalle E, Zavattoni M, Gaballo A, Milanesi G: Early virus isolation, early structural antigen detection and DNA amplification by the polymerase chain reaction in polymorphonuclear leukocytes from AIDS patients with human cytomegalovirus viraemia. *Mol Cell Probes* 5: 365-374, 1991.
- 45) Gerna G, Zipeto D, Parea M, Revello MG, Silini E, Percivalle E, Zavattoni M, Grossi P, Milanesi G: Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia, and DNAemia. *J Infect Dis* 164: 488-498, 1991.
- 46) Dunn DL, Mayoral JL, Gillingham KJ, Loeffler CM, Brayman KL, Kramer MA, Erice A, Balfour HH, Fletcher CV, Bolman RM, Matas AJ, Payne WD, Sutherland DER, Najarian JS: Treatment of invasive cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients with ganciclovir. *Transplantation* 51: 98-106, 1991.
- 47) Van den Berg AP, Van Son WJ, Haagsma EB, Klomp-maker IJ, Tegzess AM, Shirm J, Dijkstra G, Van der Giessen M, Slooff MJH, The TH: Prediction of recurrent cytomegalovirus disease after treatment with ganciclovir in solid-organ transplant recipients. *Transplantation* 55: 847-851, 1993.
- 48) 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* 6: 507-516, 1993.

- 49) The TH, Ploeg M, Berg AP, Vlieger AM, Giessen M, Son WJ: Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes-a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation* 54: 193-198, 1992.
- 50) Bitsch A, Kirchner H, Dennin R, Hoyer J, Fricke L, Steinhoff J, Sack K, Bein G: The long persistence of CMV DNA in the blood of renal transplant patients after recovery from CMV infection. *Transplantation* 56: 108-113, 1993.
- 51) 浅井隆善、小暮勝広、中世古知昭、伊藤道博、比留間潔、王伯銘、沖本由理: サイトメガロウイルス感染の早期診断におけるアンチゲネミアアッセイの有効性. *今日の移植* 7: 553-559, 1994.
- 52) Storch GA, Buller RS, Bailey TC, Ettinger NA, Langlois T, Gaudreault-Keener M, Welby PL: Comparison of PCR and pp65 antigenemia assay with quantitative shell vial culture for detection of cytomegalovirus in blood leukocytes from solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 32: 997-1003, 1994.
- 53) 田辺一成、高橋公太、尊田和徳、小山一郎、鈴木万里、三和菜穂子、大崎慎一、木全直樹、徳本直彦、古賀祥嗣、合谷信行、中沢速和、瀧之上昌平、河合達郎、寺岡慧、東間紘、太田和夫、中島治彦: Antigenemia法による腎移植後サイトメガロウイルス感染症の早期診断-Antigenemia法とPCR法の比較検討. *今日の移植* 8: 229-235, 1995.
- 54) Freymuth FE, Gennetay E, petitjean J, Eugene G, Ligny BH, Ryckelynck JP, Legoff C, Hazera P, Bazin C: Comparison of nested PCR for detection of DNA in plasma with pp65 leukocytic antigenemia procedure for diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 32: 1614-1618, 1994.
- 55) Bek B, Boeckh M, Jopenies J, Bieniek B, Arasteh K, Heise W, Deppermann KM, Bornhoft G, Stoffler-Meilicke M, Schuller I, Hoffken G: High-level sensitivity of

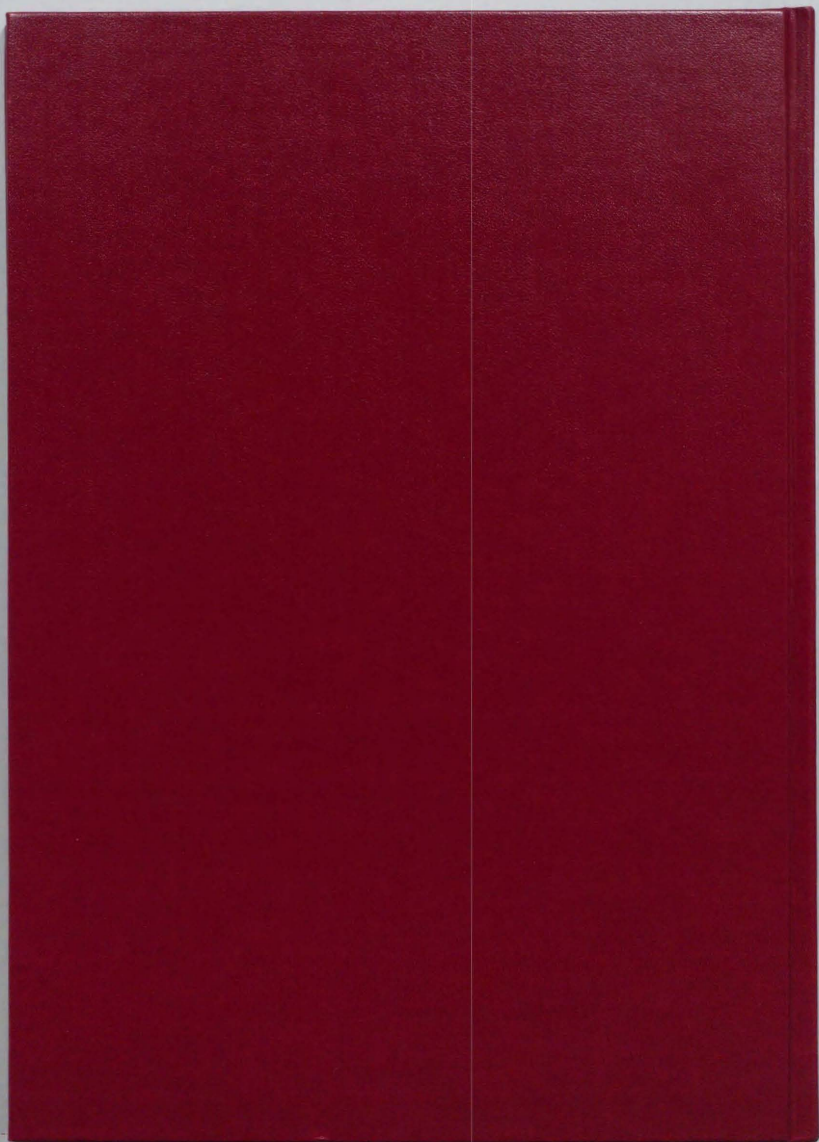
- quantitative pp65 cytomegalovirus(CMV) antigenemia assay for diagnosis of CMV disease in AIDS patients and follow-up. *J Clin Microbiol* 34: 457-459, 1996.
- 56) 田和良行: C型肝炎ウイルスの家族内感染に関する検討. *肝臓* 35: 1-9, 1994.
- 57) 秋葉 隆、川口良人、黒田満彦、二瓶 宏、日台英雄、山川 真、山崎親雄、丸茂文昭: 日本の透析施設におけるHCV感染に関する実態調査. *透析会誌* 27: 77-78, 1994.
- 58) Yamaguchi K, Nishimura Y, Fukuoka N, Machida J, Ueda S, Kusumoto Y, Futami G, Ishii T, Takatsuki K: Hepatitis C virus antibodies in hemodialysis patient. *Lancet* 335: 1409-1410, 1990.
- 59) Ponz E, Campistol JM, Barrera JM, Gil C, Pinto J, Andreu J, Bruguera M: Hepatitis C virus antibodies inpatients on hemodialysis and after kidney transplantation. *Transplant Proc* 23: 1371-1372, 1991.
- 60) Kramer P, TenKate FWJ, Bijnen AB, Jeekel J, Weimar W: Recombinant leukocyte interferon A induced steroid-resistant acute vascular rejection episodes in renal transplant recipients. *Lancet* 5: 989-990, 1984.
- 61) 荒瀬康司、茶山一彰、坪田昭人、鯉田勲、斎藤聡、池田健次、熊田博光、松本豊海、酒井洋子、小林万利子: HCV-RNA陽性のC型慢性肝炎に対するインターフェロン投与の有効性に関する検討. *肝臓* 34: 1-7, 1993.
- 62) 石本達郎、福田康彦、丸林誠二、小野英治、八幡浩、土肥雪彦: 腎移植後のC型肝炎に対しIFN療法を施行した3症例. *今日の移植* 7: 165-169, 1994.
- 63) Ortaldo JR, Mason A, Rehberg E, Moschera J, Kelder B: Effects of recombinant and hybrid recombinant human leukocyte interferons on cytotoxic activity of natural cells. *J Biol Chemist* 24: 15011-15015, 1983.

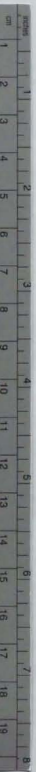


- 64) Kuhl P, Seidl S, Stangel W, Beyer J, Sibrowski W, Flik J: Antibody to hepatitis C virus in German blood donors. *Lancet* ii: 324, 1989.
- 65) Esteban JI, Esteban R, Viladomiu L, Lopez-Talavera JC, Gonzalez A, Hernandez JM, Roget M, Vargas V, Genesca J, Buti M, Guardia J: Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* ii: 294-297, 1989.
- 66) Pol S, Legendre C, Saltiel C, Carnot F, Brechot C, Berthelot P, Mattlinger B, Kreis H: Hepatitis C virus in kidney transplant recipients. Epidemiology and impact on renal transplantation. *J Hepatol* 15: 202, 1992.
- 67) Chan TM, Lok ASF, Cheng IkP, Chan RT: A prospective study of hepatitis C virus infection among renal transplant recipients. *Gastroenterology* 104: 404, 1993.
- 68) Pol S, Debure A, Degott C, Carnot F, Legendre C, Brechot C, Kreis H: Chronic hepatitis in kidney allograft recipients. *Lancet* 335: 878-880, 1990.
- 69) Rhodes J, Jones DH, Bleehen NM: Increased expression of human monocyte HLA-DR antigens and Fc $\gamma$  receptors in response to human interferon in vivo. *Clin Exp Immunol* 53: 739-743, 1983.
- 70) Kovarik J, Mayer G, Pohanka E, Schwarz M, Traindl O, Graf H, Smolen J: Adverse effect of low-dose prophylactic interferon-alpha treatment in renal transplant recipients. *Transplantation* 45: 402-405, 1988.
- 71) Attallah AM, Abdelghaffar H, Fawzy A, Alghraoui F, Alijani MR, Mahmoud LA, Ghoneim LA, Helfrich GB: Interferon-enhanced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and prediction of rejection in renal allograft recipients. *Transplant Proc* 19: 1589-1591, 1987.

## 謝 辞

本研究は、長年にわたりウイルス学に先駆的業績を挙げてこられた、国立公衆衛生院衛生微生物学部 本藤 良博士の御指導に負うところが大きく、深く感謝いたします。また本研究の遂行にあたり、東京大学医科学研究所臓器移植生理学研究部、秋山暢夫前教授、内田久則教授、長尾 桓助教授をはじめ、研究部諸先生方の御助言、御協力を頂いたことを付記し併せて感謝致します。





### Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak



### Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

