

PCR法による川崎病患児末梢単核球からの EBV DNAの検出

松木 脩三，菊田 英明

要約：川崎病患児41例、対照として急性熱性疾患患児40例の末梢単核球からDNAを抽出し、核酸増幅検出法PCR法（polymerase chain reaction）を用いてEBV DNAの検出を行った。川崎病41例中23例（56%）、対照40例中7例（18%）にEBV DNAが検出された。また川崎病41例中、経時的に検索できた12例中10例からは、発症3カ月以内にEBV DNAが検出された。以上のことより、高感度のPCR法を用いると川崎病の末梢単核球中にはEBV感染細胞が異常に多く存在することが知られた。

見出し語：PCR，EBV，DNA

〔目的〕

川崎病患児の大多数は、血清学的に一過性の弱いEBV初感染の抗体反応を示すことを報告してきた。しかし、トランスフォーメーション法によりEBVが検出される例は、川崎病の10%内外であり、Southern blotting法ではEBV DNAは検出されなかった。今回、検出感度が従来のSouthern blotting法に比べ約100倍高いPCR法により、川崎病患者末梢単核球からのEBV DNAの検出を試みた。

〔対象と方法〕

川崎病発症2週間以内の川崎病患児41例（12例は経時的にサンプリング）、対照として年齢層を

ほぼ一致させた急性熱性疾患（伝染性単核症は除く）患児40例を対象とした。

末梢単核球は、ヘパリン加末梢血をFicoll-Conray比重遠心法により分離した。細胞をSDS，proteinase Kで処理し、phenolでDNAを抽出し、ethanol沈澱した。EBV DNA陽性コントロールとしてRaji細胞、EBV DNA陰性コントロールとしてMolt-4細胞、対照DNAとしてHSV-1，VZV，CMV，HHV-6感染細胞を使用した。

DNA 1 μ g，200 μ Mの各dNTP（dATP，dGTP，dCTP，dTTP），20 pMの各primer（primer W1，primer W2），2.5単位のTaq

北海道大学医学部小児科；Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine

polymeraseなどを混和し、DNA Thermal Cyclerにて熱変性(94℃, 1分)、アニーリング(55℃, 2分)、DNA合成(72℃, 3分)を1サイクルとして35サイクル行った。primer W1, W2はEBV BamHI-W断片に存在し目的とするPCR産物は410pbであり、中にPst1による切断点を持つ。

PCR産物の10 μ lを1.5% NuSeive gelを用いて電気泳動を行った。Southern blotting後、filterは、³²Pで標識したEBV BamHI-W断片とhybridizationを行った。

〔結果〕

Raji細胞DNAからのPCR産物は410bpであり、Pst1にて2つに切断された。Southern blotting法を組み合わせるによりEBV DNAにして数10コピーまで検出可能であった。他のヘルペスウイルスであるHSV-1, VZV, CMV, HHV-6感染細胞DNAからはEBV DNAは検出されなかった。以上よりprimerのEBV特異性が確認された。

川崎病41例中23例(56%)にEBV DNAが検出された。一方、対照からは40例中7例(18%)であった。また、経時的に検索できた12例中10例の川崎病患児から、発症3カ月以内にEBV DNAが検出された。

〔考察〕

今回、高感度のPCR法を用いて、川崎病患児末梢単核球中のEBV DNAの検索をおこなった。PCR法で川崎病にEBV DNAが検出されたことは、PCR法の測定感度から見てEBV感染細胞が、末梢単核球の約10²⁻⁴個に1個存在することになる。EBVに既に感染している健康成人では、EBV感染細胞が末梢単核球10⁶⁻⁷個に1個であり、PCR法においても検出することは不可能である。この事を考え合わせると、何故かは明らかではないが、川崎病では流血中に異常に多数のEBV感染細胞が存在することになる。

今後、

- 1) 今回検出されたものが本当にEBV DNAとしたら、何故トランスフォーメーション法でEBVが証明できないのか?
- 2) トランスフォーメーション能を欠くEBVが、川崎病で存在すると仮定し、PCR法によるEBV DNA検出だけでなく、何らかの方法でEBV分離を試みる予定である。
- 3) EBVが川崎病の原因として関わっているのか? 単にEBVが二次的に再活性化しているのか? など検討していく予定である。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:川崎病患児41例、対照として急性熱性疾患患児40例の末梢単核球からDNAを抽出し、核酸増幅検出法PCR法(polymerase chain reaction)を用いてEBV DNAの検出を行った。川崎病41例中23例(5脇)、対照40例中7例(18%)にEBV DNAが検出された。また川崎病41例中、経時的に検索できた12例中10例からは、発症3ヵ月以内にEBV DNAが検出された。以上のことより、高感度のPCR法を用いると川崎病の末梢単核球中にはEBV感染細胞が異常に多く存在することが知られた。