

201027039A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）

難治性眼炎症性疾患に対する網羅的迅速診断システムの開発（H21-感覚-一般-005）に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 望月 學

平成23（2011）年 3月

## 13. HTLV-I ぶどう膜炎

杉田 直

東京医科歯科大学大学院  
医歯学総合研究科眼科学

HTLV-I ぶどう膜炎は CD4 陽性 T リンパ球の眼内浸潤でなる眼内炎症性疾患である。硝子体の炎症が中心で、軽度～中等度の微塵状、顆粒状、雪玉状、小塊状、ひも状、ベール状、あるいはびまん性などの多彩で特徴的な混濁がみられる。診断に必要なのは血清の HTLV-I 抗体価で、治療には副腎皮質ステロイド薬の局所または全身投与を行う。

## はじめに

HTLV-I は成人 T 細胞白血病の原因ウイルスとして同定された human T-lymphotropic virus type I である。HTLV-I ぶどう膜炎 (HTLV-I uveitis: HU または HTLV-I associated uveitis: HAU) とは、わが国で検討が進んでいる疾病である<sup>1-3)</sup>。この疾患は、ヘルペスウイルスなど他のウイルス眼感染症とは異なり、直接的に眼組織を障害するのではなく、リンパ球の眼内浸潤が病像形成の中心的役割をしていると考えられている。生体内ではおもに CD4 陽性 T リンパ球に感染している。

## ●HTLV-I レトロウイルス

HTLV-I は、CD4 陽性 T リンパ球を標的宿主細胞とする RNA ウイルスである。染色体 DNA にランダムに組み込まれてプロウイルス (provirus) になるが、細胞障害効果は弱く、感染細胞は増殖可能であるから持続感染が容易に成立する。感染細胞が癌化して増殖しつづける場合 (成人 T 細胞白血病: ATL) と遅発性ウイルス感染症 (HTLV-I 関連脊髄症: HAM および HTLV-I 関連症候群) の病像を示す場合とがある。HTLV-I の感染経路には、胎盤や母乳を介した垂直感染、輸血を介した水平感染が知られている。感染は世界に広がり、日本、カリブ諸島、南米、中央アフリカなどに濃厚感染地域がある。わが国では九州、沖縄で感染率が特に高い。感染頻度と疾病集積度との間には明らかな相関がある。HTLV-I 感染リンパ球は接着分子や炎症性サイトカインを構成的に過剰発現していることが知られており、この性質がリンパ球の組織浸潤に重要なかわりをもっていると考えられている<sup>4)</sup>。

本症の特徴の一つとして、女性の HTLV-I ぶどう膜炎患者の 1/4 に Graves 病 (バセドウ病) の既往が認め

られている。Graves 病を発症したキャリアが、なぜぶどう膜炎を起こしやすくなるのか、その詳細は不明である。近年の分子生物学的研究により、甲状腺ホルモンが HTLV-I の転写活性化因子である *Tax* などのウイルス遺伝子発現を誘導することが明らかになっている<sup>5)</sup>。

## ●HTLV-I ぶどう膜炎の臨床像

HTLV-I ぶどう膜炎は、HAM や HTLV-I 関連症候群のみならず HTLV-I キャリアにもみることがある。一般に急性に発症し、肉芽腫性ぶどう膜炎の病像をとることが多い。発症年齢は 20～50 歳で、性差はない。患者は軽度～中等度の霧視、異物感、飛蚊を訴える。片眼性罹患と両眼性罹患とがある。両眼性罹患の場合は間隔をおくことが多い。

眼科的検査所見として、角膜は異常なく毛様充血は軽



図 1 特徴的なベール状硝子体混濁所見  
組織破壊はあまりなく、眼底は比較的きれいなことが多い。  
本症例は網膜血管炎がみられていた。

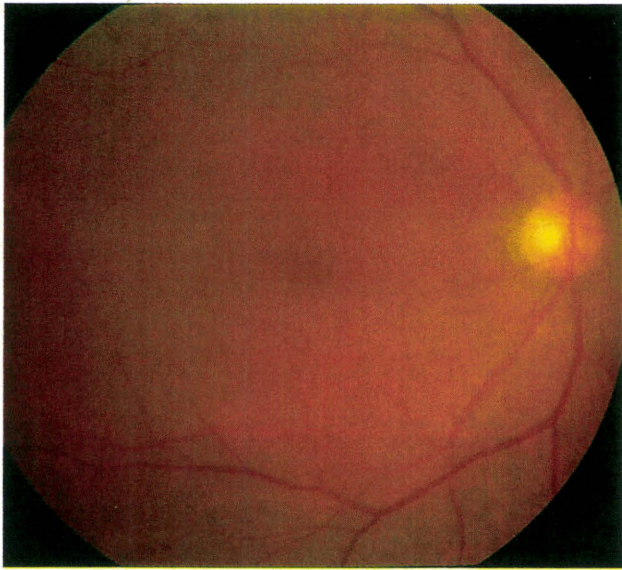


図2 びまん性硝子体混濁所見

本症例はその後硝子体混濁が増悪し、硝子体手術を施行した。硝子体から $1.2 \times 10^6$  copies/mlと高コピー数のHTLV-I proviral DNAが定量PCRにて検出された。

度である。前房中に軽度の細胞遊出、フレアをみる。角膜の後面に白色、小型の豚脂様沈着物、瞳孔縁に小型の虹彩結節をみることがある。硝子体には軽度～中等度の混濁があり、混濁の形状は、微塵状、顆粒状、雪玉状、小塊状、ひも状、ベール状とさまざまである(図1)。眼底検査では網膜の大小血管に、拡張、血管壁の白鞘、黄白色斑点や白色顆粒状混濁物の数珠状付着などをみる。後極部に綿花状白斑が散在することもある。蛍光眼底血管造影検査では、おもに網膜血管から蛍光色素の漏出や網膜血管壁の蛍光色素染色、いわゆる網膜血管炎所見や視神経乳頭の過蛍光などをみる。

全身検査所見で最も重要なのは血清中の抗HTLV-I抗体価所見である。HTLV-Iキャリアでも高値を示す。HAMに罹患していれば、該当する神経学的異常をみる。HTLV-Iキャリアの場合では、全身的には健康で、諸

検査所見にも異常をみない。ただし、HTLV-I関連症候群としての乾性角結膜炎や関節炎を合併することがある。筆者らの施設ではHTLV-I proviral DNAの定量PCR (polymerase chain reaction) 検査を行っており、眼内から高コピー数のHTLV-I proviral DNAが検出されれば診断的価値は高いと考えられる(図2)。

鑑別診断はいくつかのぶどう膜炎があげられる。ぶどう膜炎で血清の抗HTLV-I抗体が陽性だからといって直ちにHTLV-Iぶどう膜炎とみなすのは無理である。上記の臨床像に加えて、既知の疾病(特にサルコイドーシス)を除外することが大切である。

### ●治療および経過

副腎皮質ステロイド薬の局所または全身投与によって数週で寛解する事例が多い。自然寛解することもある。硝子体混濁を残して飛蚊症や視力低下が持続する事例があり、この場合、硝子体手術を行う。炎症の再燃・再発がまれではない。

### 文 献

- 1) Nakao K, Ohba N, Matsumoto M : Noninfectious anterior uveitis in patients infected with human T-lymphotropic virus type I. *Jpn J Ophthalmol* **33** : 472-481, 1989
- 2) Mochizuki M, Yamaguchi K, Takatsuki K et al : HTLV-I and uveitis. *Lancet* **339** : 1110, 1992
- 3) Watanabe T, Mochizuki M, Yamaguchi K : HTLV-I uveitis (HU). *Leukemia* **11** : 582-584, 1997
- 4) Sagawa K, Mochizuki M, Masuoka K et al : Immunopathological mechanisms of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) uveitis. Detection of HTLV-I-infected T cells in the eye and their constitutive cytokine production. *J Clin Invest* **95** : 852-858, 1995
- 5) Matsuda T, Tomita M, Uchihara JN et al : Human T cell leukemia virus type I-infected patients with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* **90** : 5704-5710, 2005

☆

☆

☆

難治性眼炎症性疾患に対する  
網羅的 PCR 診断システムの可能性

杉田 直

---

あたらしい眼科 *Atarashii Ganka (J. Eye)*  
Vol. 26 No. 5 2009 別刷

---

(株) メディカル葵出版

## 難治性眼炎症性疾患に対する網羅的 PCR 診断システムの可能性

杉田 直

(東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科眼科学)

### はじめに

眼科の失明原因となる代表疾患にぶどう膜炎や感染性眼内炎があります。またこれらの疾患と鑑別がむずかしい眼内リンパ腫は生命予後に直結する疾患です。近年、ウイルス学や分子生物学の進歩により眼科領域でも原因不明の疾患に外来性抗原(ウイルス, 細菌, 寄生虫, 腫瘍など)が関与していることが判明してきています。筆者らの施設では, 眼の微量な検体を用いて, これらの難治性眼炎症性疾患の病因となる多様な外来抗原を網羅的にスクリーニングし診断する検査システムを開発し, 正確な診断とそれに合う適切な治療を行うことを検討しています。眼感染症は失明, 眼内リンパ腫は生命予後にかかわるので正確で, かつ迅速な診断システムの開発が必要であると考えます。

### 新しい polymerase chain reaction (PCR) 検査

筆者らは, ヒトヘルペスウイルス 1~8 型の多項目迅速定性 PCR (別名, マルチプレックス PCR) とリアルタイム定量 PCR を組み合わせた遺伝子検査システムを確立し, その有効性についての報告を行いました<sup>1-3)</sup>。最近では, このウイルスで有効であった検査システムを応用し, ウイルスだけではなく眼炎症すべてに関与していると思われる外来性抗原のほとんどすべてを網羅できる検査システムを構築することを検討しています。

PCR の具体的な方法ですが, マルチプレックス PCR は Accuprime Taq を用いてそれぞれの特異的プライマーを混合して, LightCycler で PCR を行います。PCR 後, ハイブリダイゼーションプローブの混合液と PCR 産物を混合し, melting curve 解析を行い, ウイルスなどの抗原の検出を行います。これらは Tm 値 (melting temperature, 融解温度) が重ならないように設定したプローブによってその種類を判定します。以前の定性 PCR ではゲル内の増幅バンドで判定していましたが,

それとは異なり融解曲線で判定します。また, 定性 PCR で陽性であった外来抗原に関してその定量化を行います。real-time PCR を用いて解析します。PCR 試薬として Amplitaq Gold を用いて ABI 社 7300 system で定量 PCR を行います。偽陽性を避ける目的で, プライマーとプローブ配列はマルチプレックス PCR とは異なるように設定します。

### 新しい PCR 検査システムの特徴

マルチプレックス PCR の利点は, 陽性曲線が大きい場合, 抗原量が多いことがわかり半定量できることです。サンプル調整から PCR にかかる所要時間はわずか 1 時間 40 分程度ととても迅速で, 場合によっては 10 項目以上の外来性抗原 DNA が同時に陽性か陰性かの判定ができ, スクリーニング検査として使用されます。その他の利点は, 眼表面炎症性疾患 (角膜炎, 結膜炎など) の涙液検体は複数の外来性抗原が検出される可能性があり, この PCR は有用と思われます。今までは国内外での眼検体を用いた PCR は, 眼局所の各病原体の定性または定量 PCR 検査のみで, この検査のように多項目を同時にかつ迅速に眼の微量検体から行う報告はほとんどなされていません。定量リアルタイム PCR の利点は, 治療前に眼局所の DNA コピー数を把握できるために治療薬の量の決定, 使用タイミングの参考になります。さらに, 原因不明の難治性眼炎症性疾患の検体から多種類の外来性抗原感染の有無をスクリーニングができるので, 感染症が除外でき, 症例によってはステロイド中心の抗炎症療法を行えるようになります。

### 具体的な PCR 検査の流れ

具体的な PCR 検査の流れは図 1 にまとめました。ぶどう膜炎, 眼内炎など活動性眼内炎症を有する患者からインフォームド・コンセントを得て前房水, 硝子体, 虹彩などの眼内組織を採取します。眼表面炎症性疾患では, 角膜擦過物や涙液, 結膜組織などを採取します。検体の処理ですが, 検体を遠心, 分離し, 沈渣の細胞成分は自動核酸抽出装置と DNA 抽出キットを使用し核酸 DNA を抽出します。検体の上清は PCR 以外の検査 (サイトカイン測定, 特異抗体測定, 培養など) に使用します。

(1) 細菌性眼内炎の診断には, 一般的な培養, グラム染色, ギムザ染色に加えて, Broad-range 定量 PCR (細

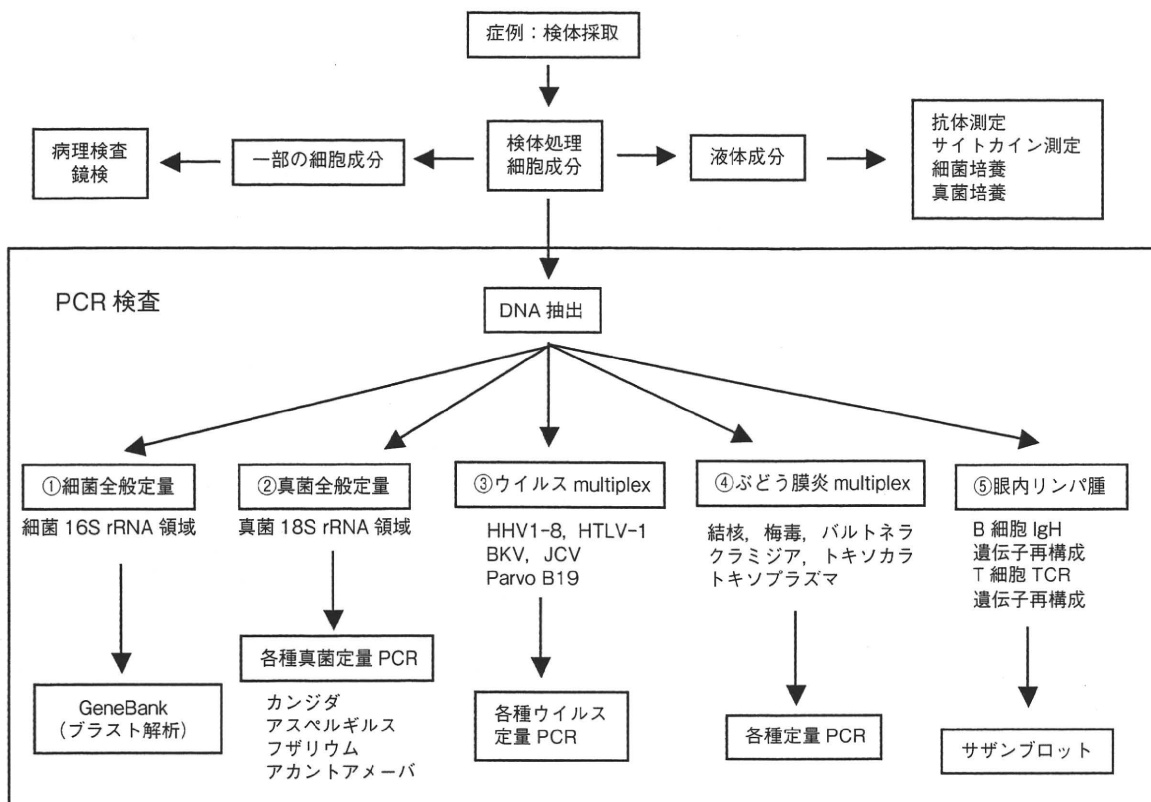


図1 眼炎症性疾患に対する網羅的PCR診断システムの検査の流れ

①細菌全般定量 PCR, ②真菌全般定量 PCR, ③ウイルス multiplex PCR, ④ぶどう膜炎 multiplex PCR, ⑤眼内リンパ腫 PCR の5種類の PCR 検査は迅速(24時間以内)に行う。その後の検査も48時間以内を目標とする。

菌全般保存領域の増幅：16S リボゾーム RNA 領域) を行います。この PCR 陽性検体は、16S リボゾーム RNA 領域を増幅させて、直接シーケンスして、その結果を GeneBank でブラスト解析を行い、菌の同定までを行います。眼科の遅発性眼内炎の代表細菌、*Propionibacterium acnes* は別に定量 PCR 検査を行います。

(2) 真菌が疑われる場合、真菌培養および Broad-range 定量 PCR (真菌全般保存領域の増幅：18S リボゾーム RNA 領域) も行います。その他、眼科関連性が高いと思われるカンジダ、アスペルギルス、フザリウム、アカントアメーバのそれぞれの定量 PCR も行います。

(3) ウイルスの診断は、ヘルペスウイルス属 1 型から 8 型 (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8) までとレトロウイルスでぶどう膜炎の原因の HTLV-1 (proviral DNA) の検索を行います。また、眼科関連性は不明の BKV, JCV, パルボウイルス B19 についても検討します。上記ウイルスはいずれも

マルチプレックス定性 PCR およびリアルタイム定量 PCR を用いてゲノムの同定を行います。

(4) 眼内寄生虫の診断には、代表的なトキソプラズマとトキソカラの PCR を行います。トキソプラズマは定性・定量 PCR を用いて眼内ゲノムの同定を、トキソカラはトキソカラチェック (簡易定性検査) を用いて眼内特異抗体の同定および定性および定量 PCR も行います。その他ぶどう膜炎の原因となる病原体で、結核、梅毒トレポネーマ、バルトネラ菌 (ネコひっかき病)、クラミジアがあります。これらの外来性抗原の定性および定量 PCR を用いてゲノムの同定を行います。

(5) 眼内腫瘍の診断として、仮面症候群を呈する眼内リンパ腫と白血病眼内浸潤の診断システムを確立させます。一般的な病理診断以外に、眼内液を利用した定性 PCR で T 細胞受容体 (TCR) 再構築 (T 細胞系) と IgH (免疫グロブリン H) 再構築 (B 細胞系) を行います。PCR で陽性の検体はサザンブロットで二重解析を行います。同時に検体の上清を使用して ELISA 法 (酵素免

疫測定法)によるサイトカイン測定も行います。

### 期待される効果

この新しい検査システムの期待される効果として、眼炎症の原因となる外来性抗原を迅速に短時間で同定することができ、早期治療へとつながります。また、眼局所の遺伝子の定量化を行い治療薬の決定や量の参考となります。また、原因不明の眼炎症性疾患から新しい外来性抗原の同定される可能性があります。さらには原因特定以外に感染性疾患や腫瘍性疾患を除外することができることから、臨床の場で重要な検査となることが期待されます。

[本稿で用いたウイルスの略語のフルターム]

BKV : BK virus, CMV : cytomegalovirus, EBV :

Epstein-Barr virus, HHV : human herpes virus, HSV : herpes simplex virus, HTLV-1 : human T-lymphotropic virus 1, JCV : JC virus, VZV : varicella-zoster virus.

### 文 献

- 1) 杉田 直, 岩永洋一, 川口龍史ほか: 急性網膜壊死患者眼内液の多項目迅速ウイルスPCRおよびリアルタイムPCR法によるヘルペスウイルス遺伝子同定. *日眼会誌* 112: 30-38, 2008
- 2) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K et al : Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol* 92 : 928-932, 2008
- 3) Sugita S, Shimizu N, Kawaguchi T et al : Identification of human herpesvirus 6 in a patient with severe unilateral panuveitis. *Arch Ophthalmol* 125 : 1426-1427, 2007

### ■「難治性眼炎症性疾患に対する網羅的PCR診断システムの可能性」を読んで■

本稿で紹介されている multiplex polymerase chain reaction (PCR) は、通常のPCRから発展したものです。PCRは、遺伝子解析に革命的発展をもたらしましたが、それでも一つの操作で、一つの遺伝子しか増幅できませんでした。1990年当時は、遺伝子解析に関する激しい競争が世界中で行われ、各研究室では“昼夜”を徹して作業が行われていました。当時の現場を知る人は、「研究というよりも肉体労働に近いものであった」と述べるほど過酷なものであり、その状況を改善するための深刻な要求が、遺伝子解析の自動化を一気に進めました。一方、別の解決策として、PCRの際に多くの遺伝子の増幅を一度に行うという multiplex pressure cycling technology (PCT) 法を、Chamberlain たちが提案しました。この基本的なコンセプトは、杉田 直先生が述べられているように、いくつかのプライマーを同時に用いて遺伝子増幅をさせるというものです。この方

法は、作業を効率化させるだけでなく、検体の網羅的な解析が可能であるので、単なる遺伝子検索よりもむしろ診断の正確性向上、迅速化に大きな力を発揮すると期待されました。しかし実際に運用するとなると、multiplex 法は条件設定が非常にむずかしく、ある程度検体の純度が保障されている遺伝子解析の一部には使えましたが、検体の純度・濃度に大きな差がある臨床検体の探索には信頼性のある結果を残せませんでした。本稿では、この問題についてほとんど触れられていませんが、臨床検査に使用可能なレベルの方法を確立するまでには、杉田先生たちの相当な苦労があったはずですが、かつての未来小説には、唾液を1滴採取するだけで患者の病氣、生命予後が詳細に診断できるという話がありました。眼科領域でもこのレベルに近づいているのです。ただし、眼内液を1滴採ることです。

鹿児島大学医学部眼科 坂本泰二

☆

☆

☆



# broad-range PCR

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科視覚応答調節学 杉田 直

## ■broad-range PCRとは？

眼感染症の診断、治療を行う上で病原体の検出は重要である。しかしながら、眼局所から得られる検体試料は量的に少ないためその病原体の検出が困難なことは少なくない。そのため、日常診療の眼感染症の診断において少ない検体から外来性抗原を高感度に、さらに迅速に検出する方法が求められてきている。polymerase chain reaction (PCR) とはDNAポリメラーゼ反応を利用したDNAの増幅方法である。2種類のプライマーを用いてDNAの特定部位の合成反応を起こさせる。DNA合成のプロセスには数分しかかからないことから、このPCRの利用が急速に広まっている。近年、そのPCRを応用した新しい方法のbroad-range PCRが開発された。broad-range PCRは、リボゾームRNA (rRNA) 遺伝子を標的にしたPCRで、原核生物では16S rRNA、真核生物では18S rRNAといったそれぞれの種で保存された遺伝子を標的にしたものである。ほとんどの細菌が保有する遺伝子であるハウスキーピング遺伝子、16S rRNA (リボゾームの蛋白合成に関与、真菌の場合は18S) はよく用いられるハウスキーピング遺伝子の一つであり、これを検出することで菌の存在が証明できる。このbroad-range PCRを用いて、検体から細菌や真菌を迅速に検出できるようになった。また定量PCRを組み合わせることで菌の定量化ができ、さらにこの遺伝子の

シーケンス解析を行うことで、菌の同定までが可能である。例えば細菌では、菌すべてが共通で保有する遺伝子領域(保存領域)と菌種によって異なる遺伝子領域(非保存領域：可変領域)が交互に存在し、その領域に16S rRNAがあり、その保存領域を使用してPCRを行うと理論的には細菌すべてを検出できる。実際には、世の中に存在する3万種以上の細菌の約60～80%を網羅できるとされ、臨床の場でも非常に重要な検査になる可能性がある。

## ■broad-range PCRの方法

われわれの施設では、図1に示すような検査の流れでbroad-range 定量PCRを行っている。DNA抽出にはDNA Mini Kit(キアゲン社)を用いて抽出し、定量PCR機械はABI 7300を使用している。PCRは過去の報告を参考に細菌16Sの特異的なプライマーとTaqManプローブを設計した<sup>1)</sup>。PCRの条件は、denature 95℃とannealingとextensionは60℃で50サイクル行う(図1)。このPCRの検出感度を100 copies/mlに設定し、100コピー以上を陽性、1から100コピーを偽陽性、1コピー未満を陰性とした。検体採取あるいはPCR作業中は、細菌やDNAのコンタミネーションには細心の注意を払いながら行っている。

上記PCRでの陽性検体は、菌の同定目的でブラスト解析(BLAST検索)を行っている。16S rRNA

### <細菌 broad-range PCRの手順>

1. 検体からDNA抽出：DNA Mini Kit (キアゲン社)
2. 細菌 broad-range PCR：細菌16S rRNA領域を増幅
3. PCR使用機器：ABI 7300 (ABI社)
4. プライマー：sense primer (Bac349)：5'-AGGCAGCAGTDRGGAAT-3'  
antisense primer (Bac806)：5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT-3'
5. TaqMan probe (Bac516F)：5'-FAM-TGCCAGCAGCCGCGTAATACRDAG-TAMRA-3'
6. PCRの条件：50 cycles, denaturation 95℃, annealing and extension 60℃
7. 使用試薬：TaqMan PCR Core Reagents Kit (パーキンエルマー社)
8. 検出限界の設定：100 copies/ml (1検体あたり100コピー以上を陽性)
9. 陽性検体はブラスト解析(BLAST解析)へ

[図1] broad-range PCRの方法、手順

細菌16S rRNA領域の特異的なプライマーとTaqManプローブを設計し、定量PCRを施行した。



[表1] 感染性眼内炎と診断された7症例の眼内液を用いた細菌 broad-range PCR結果のまとめ

症例	最終診断名	細菌 16S rRNA 領域 定量 PCR	培養結果	塗抹結果
1	感染性眼内炎	$1.3 \times 10^7$ copies/ml	陽性 ( <i>Pseudomonas</i> spp.)	グラム陰性桿菌
2	感染性眼内炎	$1.5 \times 10^8$ copies/ml	陰性	陰性
3	感染性眼内炎	$1.4 \times 10^6$ copies/ml	陽性 ( <i>Enterococcus</i> )	グラム陽性球菌
4	感染性眼内炎	$1.1 \times 10^4$ copies/ml	陰性	グラム陽性球菌
5	術後感染性眼内炎	$2.8 \times 10^8$ copies/ml	陽性 ( <i>Staphylococcus</i> )	陰性
6	術後遅発性眼内炎	$8.1 \times 10^7$ copies/ml	陰性	陰性
7	術後遅発性眼内炎	$1.7 \times 10^3$ copies/ml	陰性	陰性

臨床診断で眼内炎と診断された7症例の硝子体または前房水を用いて細菌 broad-range PCRを施行した。同検体の培養と塗抹検査も施行した。

遺伝子のPCRによる増幅は、25Fプライマーを用いて16S rDNAの前半約500bpを解析する。その増幅したPCR産物をダイレクトシーケンシングする。シーケンシングにはABIアナライザーを用いて配列を解析し、その後genbank blastで一致性を検索する。100%一致(あるいは98%以上)する菌を同定菌としている。われわれの施設では、真菌の中で眼科関連性が高いとされるカンジダとアスペルギルスの18S rRNA遺伝子領域のbroad-range PCRも行っている。

#### ■感染性眼内炎眼内液を用いた細菌 broad-range 定量 PCRの有用性の検討

感染性眼内炎の診断には一般的には眼内液の培養、塗抹標本などが行われるが、われわれは感染性眼内炎患者の眼内液検体を用いて細菌 broad-range 定量 PCR法を施行し、それらについて解析した。対象は、眼内手術や眼外傷後の感染性眼内炎と臨床診断された7眼の感染性眼内炎患者で、それらの眼内液(硝子体液または前房水)からDNA抽出後、細菌 broad-range 定量 PCRを行った。また同検体を同時に培養、塗抹標本(スミア)検査も行った。

結果のまとめは表1に示す。感染性眼内炎の7眼すべて(100%)で高コピー数の細菌DNAが検出された( $1.7 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^8$  copies/ml)。この感染性眼内炎の7眼で培養陽性は3例で、陰性は4例であった。同様に、塗抹標本でも3例で陽性、4例で陰性であった(表1)。また、この感染性眼内炎7眼中

6眼は抗菌薬の全身投与と局所投与により軽快した。これらの結果より、感染性眼内炎の眼内液を用いた診断で培養や塗抹検査では陰性になることもあり、この細菌16S broad-range 定量 PCR法は有用と考えられる。Chiquetらによると、術後感染性眼内炎患者の眼内液検体の多くは早期から抗生物質が投与されており培養検査では陰性になることが多く、しかし菌DNAは残存していることからbroad-range PCRは有用であると報告している<sup>2)</sup>。次の項でこのbroad-range PCRが有用であった症例を紹介する。

#### ■broad-range PCRが有用であった代表症例

##### 症例1

42歳、女性、術後眼内炎疑いで紹介。右眼PEA + IOL施行、その後急激な視力低下を自覚した。右眼光覚弁、前房内フィブリンと前房蓄膿を伴う眼内炎症がみられた(図2)。硝子体を用いた検査では、培養で*S. aureus*以外の*Staphylococcus*が検出されたが、塗抹は陰性だった。細菌16S rRNA領域 broad-range 定量 PCRで、細菌DNAが $2.8 \times 10^8$  copies/mlと陽性を示していた。最終診断は術後細菌性眼内炎とし、硝子体手術(硝子体切除 + IOL除去 + 前房洗浄 + 術中抗生物質還流)に術後抗生物質全身投与で軽快した。

##### 症例2

53歳、男性、芝刈り後の眼内炎疑いで紹介、受診。右眼手動弁、前房蓄膿の激しい眼内炎症がみられた

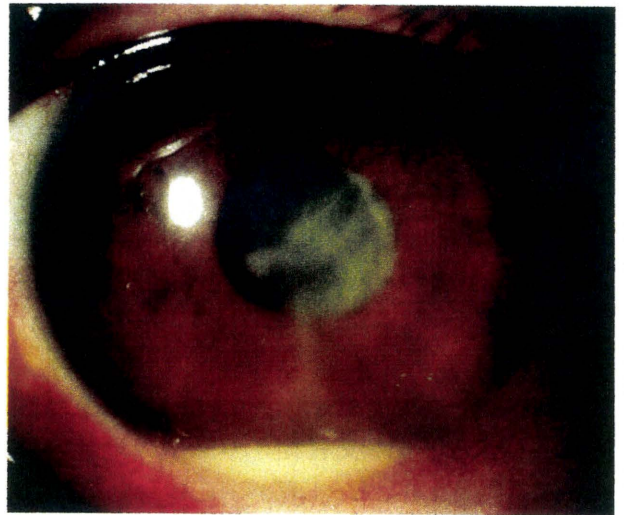
(図3). 硝子体を用いた検査では, 培養で *Enterococcus* 属が検出され, 塗抹でグラム陽性球菌が同定された. 同 broad-range PCR で, 細菌 DNA が  $1.4 \times 10^6$  copies/ml と高コピー数を示していた. 手術時の所見や画像上では眼内異物が発見できなかったが, 最終診断は外傷性感染性眼内炎とした. その後のプラスト解析にて *Enterococcus faecalis* が同定された.

#### ■broad-range PCR 検査システムの今後の検討課題

この新しい PCR 検査システムは, 細菌は 16S rRNA 領域, 真菌は 18S rRNA 領域を増幅させることができ臨床の場では多いに役に立つことが推定される. これらは何の菌までかはわからなくてもこれらの感染を否定することができ, 治療の中心がステロイドのぶどう膜炎分野ではこれらの PCR が広く使用されるようになってきている. また将来的にはプラスト解析の組み合わせで培養よりも早期に菌の同定まで行えるようになるであろう. 今後の課題は, 症例数を増やして有効性を検討する必要があること, また PCR で陽性であった場合, コンタミネーションと病因抗原との判別が重要となる. 加えて他の検査結果との一致性, 例えば細菌培養で検出された菌と PCR で同定された菌との一致性, あるいは臨床所見との一致性や治療効果との一致性など検討する課題は少なくない.

#### 文献

- 1) Takai, K et al : Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl Environ Microbiol* 66 : 5066-5072, 2000
- 2) Chiquet, C et al, French Institutional Endophthalmitis Study Group : Eubacterial PCR for bacterial detection and identification in 100 acute postcataract surgery endophthalmitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 1971-1978, 2008



[図2] broad-range PCRが有用であった代表症例1  
術後細菌性眼内炎の症例. 硝子体を用いた細菌 16S rRNA 領域 broad-range 定量 PCR で, 細菌 DNA が  $2.8 \times 10^8$  copies/ml と陽性を示した.



[図3] broad-range PCRが有用であった代表症例2  
外傷性感染性眼内炎の症例で, 同様の broad-range 定量 PCR で  $1.4 \times 10^6$  copies/ml と高コピー数を示した.



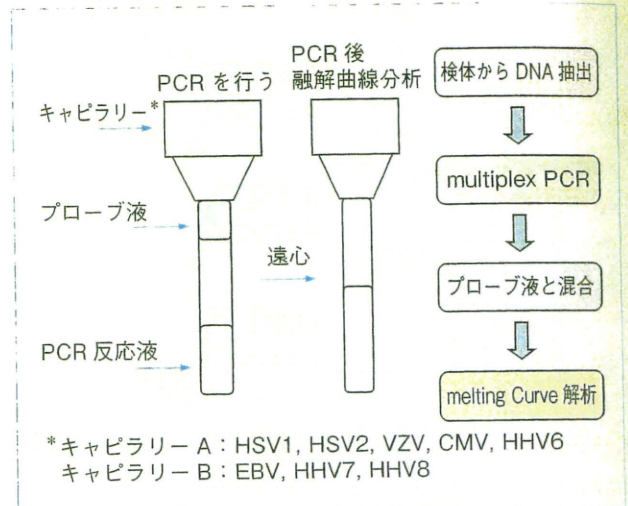
# multiplex PCR

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科視覚応答調節学 杉田 直

## ■multiplex PCR法とは？

polymerase chain reaction (PCR) とはポリメラーゼ連鎖反応のことで、DNAポリメラーゼ反応を利用した微量DNAの増幅方法である。2種類のDNA断片のプライマーを用いてDNAの特定部位を挟みながらDNAを合成するDNAポリメラーゼ酵素を用いてDNA鎖の合成反応を起こさせる。この反応の繰り返しにより、目的のDNA特定部位を約数百万倍程度まで増幅させることが可能である。このDNA合成のプロセスには数分しかかからないことから、このPCRの利用が急速に広まっている。PCR法は遺伝子配列の決定や遺伝子の定量など、遺伝子研究の基本技術として確立されている。臨床の場では、ウイルス、クラミジア、細菌、真菌などの診断方法として応用されている。眼科領域ではぶどう膜炎、眼内リンパ腫には診断目的で、緑内障あるいは網膜色素変性症では原因遺伝子検索が目的で広く応用されている。現在、ぶどう膜炎、特にウイルス感染で確定診断のためにはPCRは有効な検査手段となっている。実際ウイルスDNAのゲル内の検出までには数時間で可能であること、さらにサンプルプロットを行えば、感度を上昇させることもできる。

近年、このPCRを応用して開発されたのがmultiplex PCR(多項目迅速PCR)検査である(図1)<sup>1)~3)</sup>。このmultiplex PCR検査の最大の特徴は、数種類のウイルスなどの外来性抗原を同時に迅速に検出できる。以前の一般的に行われていたPCRのようなゲル内のバンド検出で判定するのではなく、融解曲線で陽性か陰性かの判定を行う(図2)。曲線が大きい場合、DNA量が多いことがわかり半定量できる利点がある。サンプル調整からPCRにかかる所要時間はわずか2時間弱と従来のPCRの中でも迅速で、場合によっては10項目以上の外来性抗原DNAが陽性か、あるいは陰性かの判定ができる。眼科領域での利点は、眼表面炎症性疾患(角膜炎、結膜炎など)の涙液検体は複数の外来性抗原が検出される可能性があり、このmultiplex PCR検査は有用と思われる(図2)。また、眼科検体が多くの症例



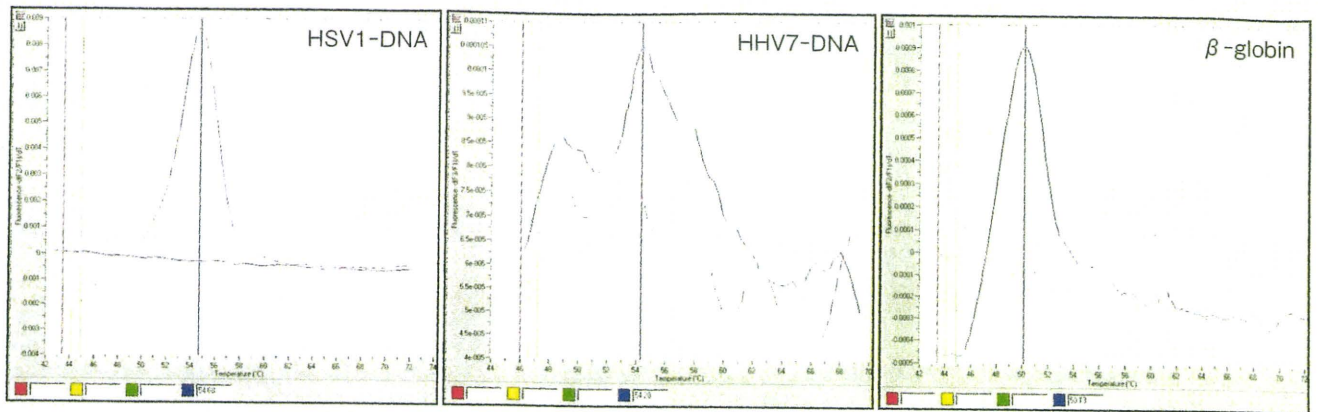
【図1】 multiplex PCR検査法

このmultiplex PCR(多項目迅速PCR)検査は、数種類(多い場合は10種類以上が可)のウイルスなどの外来性抗原を同時に迅速に検出できる新しいPCR検査システムである。眼局所検体からDNAを抽出後、Accuprime Taqを用いてそれぞれのウイルス特異的プライマーを混合して、multiplex PCRを行う。数種類のウイルスを2つのキャピラリーを用いて同時に検査する。PCR反応後、ハイブリダイゼーションプローブの混合液とPCR産物を混合し、melting Curve解析(融解曲線分析)を行い、ウイルスの同定を行う。これらはTm値(melting temperature, 融解温度)が重ならないように設定したプローブによってウイルスの種類を判定する。

で微量であるので、この手法は検体量の少ないこの領域ではきわめて有用である。

## ■方法および利点・欠点

multiplex PCRにより増幅されたDNA断片が目的の遺伝子に特異的であるかを測定するために、そのPCR産物は遺伝子特異的プローブを用いたハイブリダイゼーションによる検出を行う。ほとんどすべてのPCR産物に対して通常のプローブとビオチン標識プローブの両方を用いて証明される。検体より核酸抽出にmultiplex PCRを行うが、Accuprime Taq(インビトロジェン社など)を用いて、それぞれの検出したい目的の抗原特異的プライマーを混合してPCRを行う(図1)。その後、ハイブリダイゼー



【図2】 multiplex PCRの結果グラフ

融解曲線カーブで陽性が陰性かの判定を行う。この症例はヘルペス性角膜炎疑い患者の涙液をインフォームド Consentのもと採取して、患眼涙液からHSV1-DNAが検出された。HSV1-DNAはT<sub>m</sub>値が約55°Cで曲線が検出されるように設定している。加えて、同検体からHHV7-DNAも検出されていた。他のヘルペスウイルスDNA(HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV8)はすべて陰性で、健眼の涙液はHHV1-HHV8すべて陰性であった。β-globin-内因性コントロールで、検体からDNAが十分取れていることを示す。

ションプローブの混合液とPCR産物を混合し、melting Curve解析(融解曲線分析)を行う。melting Curve解析とは、実際には95°CでPCR産物を1本鎖にしたところから40°Cに温度を下げてプローブとハイブリダイズさせるとFRET(fluorescence resonance energy transfer)により蛍光が発せられる。再び温度を徐々に上昇させながら蛍光強度をモニタリングしていくとFRETにより発する蛍光が上昇温度により各種抗原プローブ固有のT<sub>m</sub>値に達したところでFRETが解消し消光する。時間に対する蛍光強度グラフを微分して得られた異なる各種抗原プローブのピーク値によって外来抗原種を判定することができる。

このPCRの欠点は、複数のPCR反応が同時に一つの反応系で進むようにするため、プライマーの設定、プライマー混合比の複雑な検討が必要であり、技術と時間を要する。また、陽性の外来性抗原種はT<sub>m</sub>値によって判定されるため、検出するT<sub>m</sub>値はハイブリプローブのT<sub>m</sub>値に依存している。このT<sub>m</sub>値の算出が複雑で正確な設計には多くの作業が必要となる。

一般的なPCRは通常、特異的な配列を増幅するプライマーを1組しか使用していない。一方、multiplex PCRは同時に多くの配列を増幅するための複数組のプライマーを使用する。最大の利点は、同時に迅速に複数の外来性抗原を網羅した検査システムが確立できる。しかし、1つのチューブ中に多数のPCRプライマーが存在することは、ミスプラ

イミングPCR産物、プライマーダイマー、短いDNA断片に偏った増幅などの多くの問題の原因になる可能性がある。

#### ■multiplex PCR法を用いた検査手順

(具体例—ウイルススクリーニングPCR検査—)

##### 1. 症例

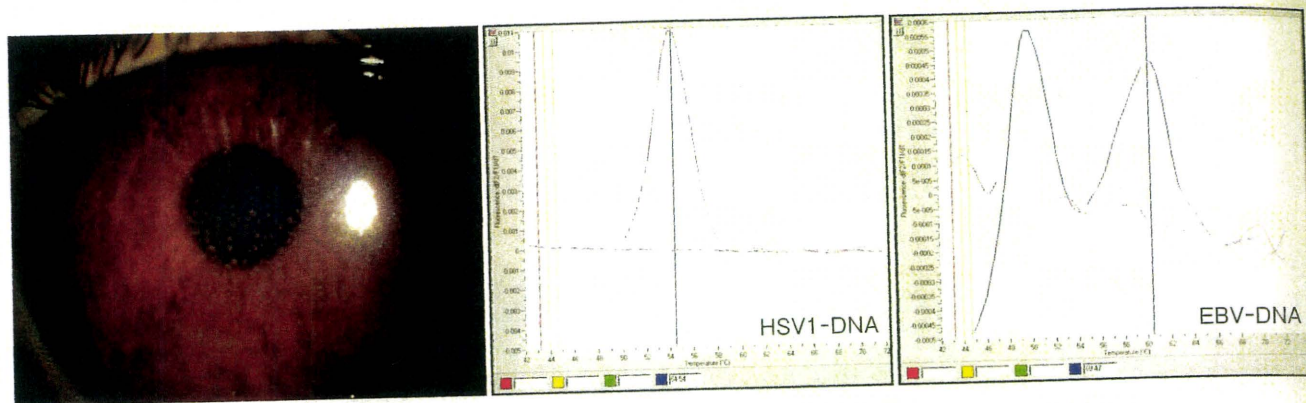
症例は58歳、女性。原因不明の右眼ぶどう膜炎、高眼圧症でステロイド点眼と眼圧降下薬の点眼を長期に点眼されていた。特発性ぶどう膜炎の診断で紹介、受診。スリット検査で、豚脂様角膜後面沈着物及びまん性に付着していた(図3)。右眼に高眼圧症と軽度の前房内炎症がみられた。ウイルス感染を疑い、インフォームド Consentによる同意のもと前房水0.1mlを採取した。

##### 2. 核酸抽出

前房水から核酸抽出キット(EZ1 Virus Mini Kit(キアゲン社))および自動核酸抽出装置(BioRobot E21)を用いて核酸を抽出した。

##### 3. multiplex PCR検査

ヘルペスウイルス感染を考え、ヒトヘルペスウイルス属HSV1(HHV1), HSV2(HHV2), VZV(HHV3), EBV(HHV4), CMV(HHV5), HHV6, HHV7, HHV8を検討した。multiplex PCRを用いて上記8種類のウイルスを2組に分けて下記の2つのキャピラリーを用いて同時にスクリーニングした(図1)。キャピラリーA: HSV1, HSV2, VZV, HHV6, CMV, キャピラリーB: EBV, HHV7, HHV8。PCR条件



〔図3〕 眼内検体を用いて multiplex PCR を施行した代表症例

症例は58歳、女性。原因不明のぶどう膜炎、高眼圧症でステロイド点眼と眼圧降下薬の点眼を長期に点眼されていた。スリット検査で、写真のような豚脂様角膜後面沈着物及びまん性に付着していた。初診時に採取した前房水から HSV1-DNA が検出された。同検体から EBV-DNA も同定され、抗ウイルス薬の内服と眼軟膏、ステロイド点眼でやがて消炎した。

は、denature 95°C 2秒, PCR 95°C 2秒, 58°C 15秒, 72°C 15秒を40サイクル, extension 40°C 30秒行った。その後、ハイブリダイゼーションプローブの混合液と PCR 産物を混合し、melting Curve 解析を行い、ウイルスの検出を行った。これらは Tm 値 (melting temperature, 融解温度) が重ならないように設定したプローブによってウイルスの種類を判定した。なお、HSV の検出に関しては、プライマーは HSV1 と HSV2 の両方の型に共通な部分に設定している。しかし、プローブは HSV2 のゲノム配列とは完全一致しているのに対し、HSV1 のゲノム配列とは2塩基不一致となっている。そのため、HSV2 陽性の場合には HSV1 陽性の場合よりも Tm 値がおよそ15°C 低くなり、両者を明確に判別できるようにした。

#### 4. 検査結果

前房水から multiplex PCR 検査で、HSV1-DNA が検出された(図3)。また同検体から EBV-DNA も同定された。その他 HSV2, VZV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8-DNA はすべて陰性であった。治療にバラシクロビル内服とデキサメタゾン点眼を用いてやがて消炎した。

#### ■multiplex PCR の今後の展望

近年の PCR システムの改良により、多種のウイ

ルスなどの外来性抗原を同時にかつ迅速にスクリーニングして、その後異なったプライマーとプローブの組み合わせでウイルス量の定量化検査(リアルタイム PCR)をする検査システムが報告されている<sup>1-3)</sup>。その他の利点として、多くの感染性ぶどう膜炎や眼内炎を否定する目的で使用でき、治療の中心がステロイドのぶどう膜炎分野ではこれらの PCR が広く使用されるようになってきている。理論的にはすべての外来性抗原を PCR で検出することが可能で、今後は眼科関連性のある外来性微生物をすべて網羅できる検査システムの開発が待たれる。

#### 文献

- 1) Sugita, S et al : Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. Br J Ophthalmol 92 : 928-932, 2008
- 2) 杉田 直ほか : 急性網膜壊死患者眼内液の多項目迅速ウイルス PCR およびリアルタイム PCR 法によるヘルペスウイルス遺伝子同定. 日眼会誌 112 : 30-38, 2008
- 3) Kido, S et al : Association of varicella-zoster virus (VZV) load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. Br J Ophthalmol 92 : 505-508, 2008

# PCR法の利点・欠点 (定性PCR, RT-PCR, multiplex PCR, real-time PCR, broad-range PCR)

杉田 直

東京医科歯科大学医学部眼科学教室

## PCR法とは

眼科領域では検体量が特に微量なためこのPCR遺伝子検査は欠かせない診断方法となった。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法は、DNAポリメラーゼ反応を利用した微量DNAの増幅方法である。2種類のDNA断片、プライマーを用いてDNAの特定部位を挟みながらDNAを合成する酵素 (DNAポリメラーゼ) を用いてDNA鎖の合成反応を起こさせる。この反応の繰り返しにより、目的のDNA特定部位を数十万～数百万倍程度まで増幅させることが可能である。このDNA合成のプロセスには数分しかかからないことから、近年このPCR法の利用が急速に広まった。

PCR法は遺伝子配列の決定や遺伝子の定量など、遺伝子研究の基本技術として確立されている。最近では臨床の場で、ウイルス、クラミジア、細菌、結核菌などの診断方法として応用されている。眼科領域では、ぶどう膜炎、眼ウイルス感染症、

眼内リンパ腫には診断目的で、緑内障あるいは網膜色素変性症では原因遺伝子検索が目的で広く応用されている。現在、ぶどう膜炎、特にウイルス感染症では迅速な確定診断のためにはPCR法はきわめて有効な検査手段となっている。実際ウイルスDNAのゲル内の検出までには数時間で可能であること (1)、さらにSouthernブロット法を行えば、感度を上昇させることもできる。

## PCR法の種類とその利点・欠点

臨床診断のための検査法としてすでに定着しているPCR法は、基礎実験の領域でも最も一般的な実験手法である。

以下に、現在の代表的なPCR法についてその目的や方法、その利点・欠点などを述べる。

### 定性PCR法

以前は多くの眼内炎症性疾患で、病因抗原が病巣 (眼局所) から検出されずに疑いのまま加療されていた時代があった。ぶどう膜炎の場合、眼局



### 1 定性PCR写真

PCR検査で診断された単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) 感染による角膜ぶどう膜炎の症例。初診時に採取された前房水検体からゲル内の330bpのところからHSV-DNAの陽性バンドが検出されている (左ゲル写真)。右ゲル写真は再発時の前房水検体と初診時の検体を使用してHSV-1とHSV-2を別々に判別できるプライマーを使用してPCRを施行した結果。HSV-1-DNAが初診時および再発時の前房水の両方で陽性 (106bp)、HSV-2は陰性。M:100bpマーカー、N:negative control (陰性コントロール)、P:positive control (陽性コントロール)、S:前房水検体、S1:前房水検体 (再発時)、S2:前房水検体 (初診時)。

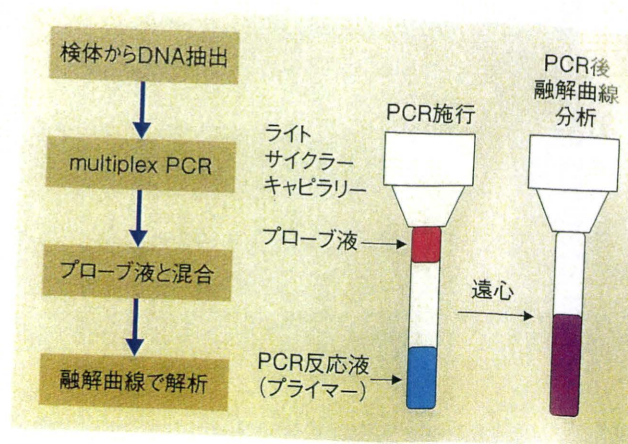
所からウイルスなどの外来性抗原DNAが同定できれば、ウイルス性ぶどう膜炎と診断でき、その病因的価値が高くなる。診断検査目的には通常前房水が用いられるが、得られる検体量は0.1mL程度であることから可能な検査は限られる。硝子体の場合は約0.5～1.0 mLあり、PCR法だけでなく抗体測定、細胞診、培養など多くの検査が可能である。1に示すように、ゲル内に目的のバンドが検出されれば「陽性」と判断される。

PCR法の全般にいえる利点として、微量検体でも検査可能である点があげられる。眼科検体には前房水、硝子体液、涙液、網膜下液あるいは虹彩、角膜擦過物などの眼組織などがある。いずれも少量であるが、PCR法の検体としては十分に行える。また、検体を凍結しておけば、後日利用することもできるので、疑わしい検体は凍結保存しておき再利用できる。

最大の留意点として、この反応の成否は、増幅対象DNAとプライマーの塩基配列、サイクル中の各設定温度・時間などに依存する。それらが不適切な場合、無関係なDNA配列を増幅したり、あるいは増幅が見られないことがある。また、微量検体の場合は従来の定性PCR法では多くの項目の核酸を網羅的には検査できない。さらに、その病巣からPCR法で特定のDNAが検出されたとしても、その陽性という結果はPCR法の感度がよいためコンタミネーションなどが避けられないことから、偽陽性が含まれる場合があるので注意が必要である。

### RT-PCR法

逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応法の略。RT-PCR法はcDNAクローニングや遺伝子発現解析に有用な手法である。細胞や組織からRNAを抽出した後、プライマーDNA、逆転写酵素によりcDNAを合成する。このcDNAをテンプレートにして上記のような一般的なPCR法を行う。cDNA合成からPCRまでを連続して行う方法(one-step法)と、cDNA合成とPCRのステップを



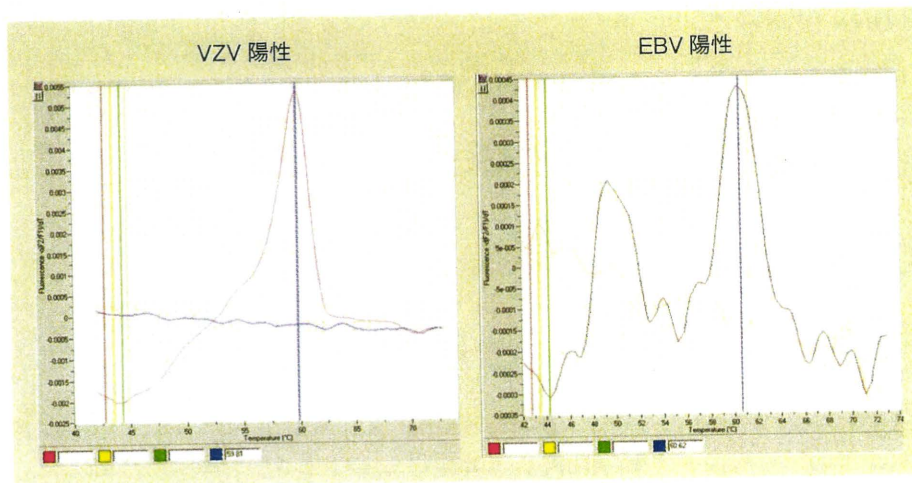
### 2 multiplex PCR(多項目迅速PCR検査)法

multiplex PCRは、数種類のウイルスなどの外来性抗原を同時に迅速に検出できる新しいPCR検査システム。眼局所検体からDNAを抽出後、Accuprime Taqを用いてそれぞれの特異的プライマーを混合し、ライトサイクラーキャピラリーを用いてPCRを行なう。PCR反応後、ハイブリダイゼーションプローブの混合液とPCR産物を混合し、融解曲線解析を行う。これらはTm値(melting temperature, 融解温度)が重ならないように設定したプローブによってウイルスの種類を判定する。

別途行う方法(two-step法)とがある。RT-PCR法を使う利点は、DNAは余分な情報も含まれているが、スプライシングがされた後のRNAは使用する情報しか含まれていないので、特定したい目的の蛋白構造情報が解析できる点である。最大の欠点は、RNAの不安定さにある。手技が安定した熟練の人ではないと結果の信頼性に欠ける。

### multiplex PCR法

近年、開発されたのが多項目迅速PCR検査(multiplex PCR法)である(2)<sup>1-3</sup>。multiplex PCR法の最大の特徴は、数種類のウイルスなどの外来性抗原を同時に迅速に検出できることである。以前の一般的に行われていたPCR法のようなゲル内のバンド検出で判定するのではなく、融解曲線で陽性か陰性かの判定を行う(3)。曲線が大きい場合、ウイルス量が多いことがわかり半定量できる利点がある。サンプル調整からPCR法にかかる所要時間はわずか2時間弱と迅速で、場合によっては10項目以上の外来性抗原DNAが陽性か陰性か判定できる。その他の利点は、眼表面炎症性疾患(角膜炎、結膜炎など)の涙液検体は複数の外来性抗原が検出される可能性があり、このmultiplex PCR法は有用と思われる。欠点は、複



数のPCR反応が同時に一つの反応系で進むようにするため、プライマーの設定、プライマー混合比の複雑な検討が必要であり、技術と時間を要する。また、陽性の外来性抗原種はTm値によって判定されるため、検出するTm値はハイブリプローブのTm値に依存している。このTm値の算出が複雑で正確な設計には多くの作業が必要となる。

### real-time PCR法

近年、核酸の量を定量化するPCR検査法、real-time PCR法が出現した。サンプル調整からPCRにかかる所要時間はおおよそ5時間で、DNA量が定量的に判明することが最大の魅力である(⇒Point!)。欠点は、PCR機器の手技の難しさと定量PCR法で得られる数字の解釈である。たとえば、特発性ぶどう膜炎患者の前房水からVZV-DNAが $1.2 \times 10^3$  copies/mL検出された場合、このウイルス量がどこまで眼内炎症の病態にかかわっているのか、などである。定量PCR法で得られる数字はあくまでもウイルスゲノムのコピー数に関する情報であり、ウイルスの感染性とは直接的な関係はない。自分たちで症例を重ねて検出感度を設定する必要がある。

### broad-range PCR

PCR法を用いた検査の利点として、感染性ぶどう膜炎や眼内炎を否定する目的で使用できる。最近では、ウイルスだけではなく、broad-range PCR法という細菌や真菌の共通保存領域をPCRで増幅させる方法が報告されている<sup>4)</sup>。細菌は

### 3 multiplex PCRを施行した代表症例

融解曲線カーブで陽性が陰性の判定を行う。この症例は虹彩毛様体炎の炎症が激しく前房蓄膿と前部硝子体混濁まで出現していた。その硝子体液からVZV-DNAが検出され、VZV関連虹彩毛様体炎と診断した。また同検体からEBV-DNAも検出されていた。VZVはTm値が60°Cで曲線が検出されるように設定して、別セットに含まれているEBVは61°Cで曲線のピークが検出されるように設定している。同検体の他のヘルペスウイルスDNA(HSV-1, HSV-2, CMV, HHV-6, HHV-7, HHV-8)はすべて陰性であった。

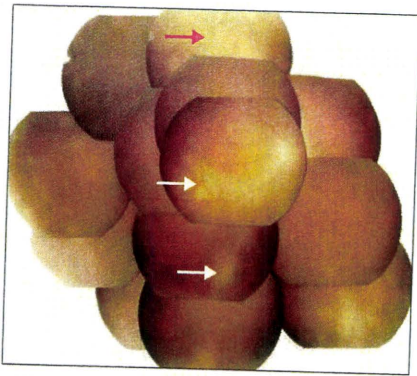
16SリボゾームRNA領域、真菌は18SリボゾームRNA領域を増幅させる。これにより何の菌までかはわからなくても、これらの感染を否定することができ、治療の中心がステロイドのぶどう膜炎分野ではこれらのPCR法が広く使用されるようになってきている。理論的にはすべての外来性抗原をPCR法で検出することが可能で今後は眼科関連性のある外来性微生物をすべて網羅できる検査システムの開発が待たれる。

## 眼科領域での臨床診断への実際の使用

従来の一般的な眼の検体を用いた検査、たとえばウイルスでは抗体測定や蛍光抗体法、細菌や真菌では培養やスメアなどで、これらの検査では確定診断をつけるのが困難な症例がある。

ヒトヘルペスウイルス(human herpesvirus: HHV)は、急性網膜壊死をはじめ多くのぶどう膜炎の原因ウイルスとして知られている。急性網膜壊死患者の前房水や硝子体液からは、高率に単純ヘルペスウイルス[herpes simplex virus: HSV(HSV-1またはHSV-2), 4],あるいは、水痘・帯状疱疹ウイルス(varicella-zoster virus: VZV)特異的なDNAがPCR法により検出される(5)。われわれは急性網膜壊死患者の眼内液から、PCR法により、上記ウイルスに特異的なDNAを検出した<sup>1)</sup>。これらの症例では、このPCRの結果よりHSVまたはVZVが眼内炎症の主たる原因と





#### 4 HSV-2が検出された急性網膜壊死の1例

原因不明のぶどう膜炎，網膜血管炎で紹介，受診．網膜血管に沿った滲出斑（⇒）と眼底周辺に壊死病巣（→）が見られている．real-time PCR法で前房水からHSV-2-DNAが $1.1 \times 10^6$ copies/mLと高コピー数検出された．multiplex PCR法によるスクリーニングPCR法では他のヘルペスウイルスはすべて陰性であった．



#### 5 VZVが検出された急性網膜壊死の一例

初診時，視神経乳頭出血（⇒），硝子体混濁，周辺部に淡い滲出斑（網膜壊死病巣，→）が見られていた．外来時での前房水検査でVZV-DNAが陽性で，そのコピー数が $7.3 \times 10^4$ copies/mLであった．その後の手術時の硝子体検体からもVZV-DNAが $5.6 \times 10^6$ copies/mLと高コピー数検出されていた．

### なぜreal-time PCR法が近年盛んに行われるようになったのか



real-time PCR法はどの分野でも最も積極的に行われるようになった検査法の一つである．経過中に何度か検体を採取できればこのPCR法を用いてその経過中のDNAコピー数が把握できたり，また，治療前に局所の抗原DNA増幅コピー数を把握できるために，実際の治療薬の量の決定の参考にもなる．われわれは，水痘・帯状疱疹ウイルス（VZV）虹彩毛様体炎の前房水から高コピー数のVZV-DNAが検出されその眼局所のウイルス量と虹彩萎縮や麻痺性散瞳などの組織破壊が相関し，早期診断が重要であることを報告している<sup>3)</sup>．

なっているといえる．また，サイトメガロウイルス（CMV）網膜炎患者の眼内液からはCMV-DNAが検出される．CMV眼感染症は後天性免疫不全症候群患者の日和見感染症のなかでは高頻度で出現すること，また臓器移植や，悪性腫瘍治療中に免疫抑制薬を使用する頻度が増えるにつれ，注意を要する．

ヘルペスウイルス属は，原因不明の虹彩毛様体炎を引き起こしていると考えられる．再発性で片眼性の虹彩炎を起こし，中等度の眼圧上昇を伴い，経過中に，虹彩色素脱出，麻痺性散瞳，あるいは虹彩後癒着を伴う虹彩炎では，ヘルペスウイルスの関与が疑われる．多くの場合，ステロイド点眼単独投与では治療に抵抗性する．実際，このような症例の前房水から，PCR法により，HSVやVZV-

DNAを検出することができる<sup>23)</sup>．これらの症例では，アシクロビル局所投与（ゾピラックス®眼軟膏）やバラシクロビル内服の投与を併用することにより，治癒させることが可能である．

その他に，ヘルペスウイルスの関与が疑われている疾患としては，角膜内皮炎，Posner-Schlossman症候群などがあげられる．最近では，Posner-Schlossman症候群類似の高眼圧，軽度の虹彩炎患者のなかにCMV-DNAが検出されたとの報告がある<sup>2)</sup>．臨床所見的にはPosner-Schlossman症候群と酷似しており，その鑑別は困難である．また，角膜内皮炎でも前房水からCMV-DNAが検出される報告もある．その他，PCR法での報告がある眼科関連ウイルスはEpstein-Barrウイルス（EBV），HHV-6<sup>5)</sup>，レトロウイルスのHTLV-1などがあげられる．

#### 引用文献

1. 杉田 直，ほか：急性網膜壊死患者眼内液の多項目迅速ウイルスPCRおよびリアルタイムPCR法によるヘルペスウイルス遺伝子同定．日眼会誌 2008; 112: 30-38.
2. Sugita S, et al: Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. Br J Ophthalmol 2008; 92: 928-932.
3. Kido S, et al: Association of varicella-zoster virus (VZV) load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. Br J Ophthalmol 2008; 92: 505-508.
4. Chiquet C, et al: Eubacterial PCR for bacterial detection and identification in 100 acute postcataract surgery endophthalmitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008; 49: 1971-1978.
5. Sugita S, et al: Identification of human herpesvirus 6 in a patient with severe unilateral panuveitis. Arch Ophthalmol 2007; 125: 1426-1427.

眼感染症研究最前線

ぶどう膜炎の病因としてのウイルスに関する  
最近の研究について教えてください

杉田 直

---

あたらしい眼科 *Atarashii Ganka* (J. Eye)  
Vol. 26 臨時増刊号 2009 別刷

---

(株)メディカル葵出版

## Q8 ぶどう膜炎の病因としてのウイルスに関する最近の研究について教えてください

杉田 直\*

1. ウイルスが病因のぶどう膜炎の診断には特徴的な眼所見に加えて眼内液を用いたゲノムの同定が必要である。
2. そのウイルス性ぶどう膜炎の診断には多項目のウイルス抗原を同時に迅速に行うスクリーニング検査、マルチプレックス PCR が有用である。
3. ウイルスの眼局所での定量化 (ウイルスコピー数を検出) にはリアルタイム定量 PCR が使用される。
4. このマルチプレックス PCR とリアルタイム PCR の組み合わせがウイルスの関与するぶどう膜炎の最新の検査法として登場した。

### はじめに

近年、検査技術の著しい進歩に伴い、原因不明のぶどう膜炎 (内膜炎) のなかにウイルスの眼内炎症への関与が徐々に報告されている。感染が関与しているぶどう膜炎の原因の中心となる外来性抗原はウイルスで、なかでもヘルペスウイルスによるぶどう膜炎は臨床の現場でしばしば遭遇する疾患である。ヒトヘルペスウイルス属の多くは眼内組織に潜伏していて、何かを契機にウイルスが再活性化する。眼内組織がウイルスレセプターを発現し、ヘルペスウイルスはそのため眼親和性が高いとされている。その他のウイルスとしてレトロウイルスの HTLV (ヒト T 細胞白血病ウイルス)-1 や風疹ウイルスなどが眼内炎症を引き起こす。これらのウイルスが病因のぶどう膜炎の診断には、特徴的な眼所見 (豚脂様角膜後面沈着物、高眼圧、角膜浮腫、虹彩萎縮、硝子体混濁、網膜血管炎など) に加えて眼内液を用いたゲノムの同定や抗体検査が有用である。本稿では、ウイルス poly-

merase chain reaction (PCR) を用いたぶどう膜炎の最新の検査・診断法を述べる。

### 最新のウイルス PCR 法とは？

PCR とはポリメラーゼ連鎖反応のことで、DNA ポリメラーゼ反応を利用した DNA の増幅方法である。2 種類のプライマーを用いて特定部位をはさみながら DNA 鎖の合成反応を起こす。この反応の繰り返しにより、目的の特定部位を数百万倍程度まで増幅させることができる。この DNA 合成のプロセスには数分~数十分しかかからないことから、この PCR の利用が急速に広まっている。PCR は遺伝子配列の決定や遺伝子の定量など、遺伝子研究の基本技術として確立されている。臨床の場では、ウイルスだけではなく細菌、真菌、クラミジアなどの診断方法として応用されている。眼科領域ではぶどう膜炎には診断目的で、緑内障あるいは網膜色素変性症では原因遺伝子検索目的で広く利用されている。

近年、この PCR を応用して開発されたのがマルチプレックス PCR (多項目迅速 PCR) 検査である<sup>1-4)</sup>。このマルチプレックス PCR の最大の特徴は、数種類のウイルスを同時に迅速に検出できる。一般的に行われていた定性 PCR のようにゲル内のバンド検出で判定するのではなく、融解曲線で陽性か陰性かの判定を行う (図 1)。曲線が大きい場合、DNA 量が多いことがわかり半定量できる利点がある。サンプル調整から PCR にかかる所要時間はわずか 2 時間弱と従来の PCR のなかでも迅速で、場合によっては 10 項目以上のウイルス DNA の判定ができる。また、多くの症例で眼科検体が微量である

\* Sunao Sugita : 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科眼科学講座  
[別刷請求先] 杉田 直 : 〒113-8519 東京都文京区湯島 1 丁目 5-45 東京医科歯科大学眼科学教室

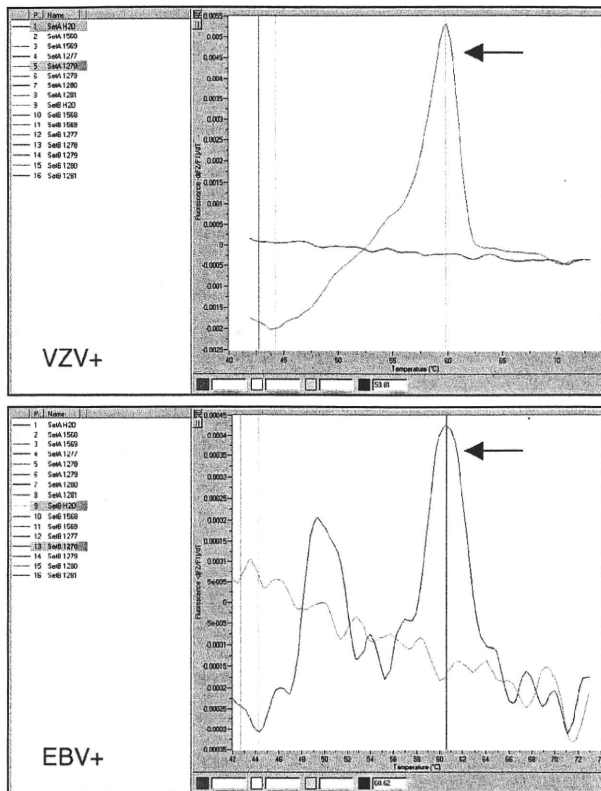


図1 マルチプレックスPCR検査結果

このマルチプレックスPCRは、数種類のウイルスを同時に迅速に検出できる新しいPCR検査システムである。眼局所検体からDNAを抽出後、Accuprime Taqを用いてそれぞれのウイルス特異的プライマーを混合してPCRを行う。PCR反応後、ハイブリダイゼーションプロブの混合液とPCR産物を混合し、融解曲線分析を行い、ウイルスの同定を行う。結果は図のように融解曲線カーブで陽性か陰性かの判定を行う。この症例は原因不明のぶどう膜炎で、前房水からVZV-DNAが検出された(上グラフ)。また同検体からEBV-DNAも検出されていた(下グラフ)。その他HSV1、HSV2、CMV、HHV6、HHV7、HHV8-DNAはすべて陰性であった。

ので、この手法は検体量の少ないこの領域ではきわめて有用と思われる。

近年は眼科ウイルスPCRシステムの改良により、次のPCR検査が実際行われるようになってきている。まず、検体採取、DNA抽出後、マルチプレックスPCRにて多種のウイルスを同時にかつ迅速にスクリーニングする。検体採取からPCR結果判明までのすべての作業が数時間で行うことが可能である。その後、陽性検体はウイルス定量PCRを行う。これは、マルチプレックスPCRとは異なったプライマーとプロブの組み合わせでウイルス量の定量化(リアルタイムPCR)をする検査システムで、眼科領域でも多数の報告がなされている<sup>1-4)</sup>。こ

の2つのPCRは検体採取から結果が判明するまで長くても2日以内と迅速な検査と言える。定量化の利点は、局所のウイルス量がわかるので治療効果の判定にも使用できる。またマルチプレックスPCRとリアルタイムPCRの組み合わせではプライマーとプロブを別に設計しているので偽陽性の心配も少ない。その他の利点として、ウイルスが否定できることから治療の中心がステロイドのぶどう膜炎分野ではこれらのPCRが広く使用されるようになってきている。理論的にはウイルス以外にもすべての外来性抗原をPCRで検出することが可能で今後は眼科関連性のある外来性微生物をすべて網羅できる検査システムの開発が待たれる。

## ウイルスPCR検査を用いた具体症例

### 1 症 例

症例は82歳、女性。原因不明の右眼ぶどう膜炎、高眼圧症でステロイド点眼と眼圧降下剤の点眼を長期に使用されていた。炎症の改善がなく、特発性ぶどう膜炎の診断で紹介、受診となった。スリット検査で、色素を伴う豚脂様角膜後面沈着物、角膜浮腫、前房出血、および麻痺性散瞳がみられていた(図2)。また右眼に高眼圧症と前房内炎症、また中等度の硝子体混濁がみられていた(図2)。ウイルス感染を疑い、インフォームド・コンセントによる同意のもと前房水0.1mlを採取した。

### 2 核酸抽出

前房水からウイルス核酸抽出キットおよび自動核酸抽出装置を用いて核酸を抽出した。

### 3 マルチプレックスPCR検査

ヘルペスウイルス感染を考え、ヒトヘルペスウイルス属HSV1(HHV1)、HSV2(HHV2)、VZV(HHV3)、EBV(HHV4)、CMV(HHV5)、HHV6、HHV7、HHV8のPCR検査を検討した。マルチプレックスPCRを用いて上記8種類のウイルスを2組に分けて下記の2つのキャピラリーを用いて同時にスクリーニングした。キャピラリーA:HSV1、HSV2、VZV、HHV6、CMV、キャピラリーB:EBV、HHV7、HHV8。PCR条件は、denature 95°C 2秒、PCR 95°C 2秒、58°C 15秒、72°C 15秒を40サイクル、extension 40°C 30秒行った。その後、ハイブリダイゼーションプロブの混合液とPCR