

201122027A

厚生労働科学研究費補助金

(障害者対策総合研究)

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)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 望月 學

平成24(2012)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 望月 學

平成 24 (2012) 年 3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 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に関する研究 ……1  
望月 學

## II. 分担研究報告

1. 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に関する研究 …… 11  
森尾 友宏
2. 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に関する研究 …… 13  
清水 則夫
3. 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に関する研究 …… 17  
杉田 直
4. 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に関する研究 …… 19  
中井 慶
5. 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に関する研究 …… 20  
臼井 嘉彦
6. 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に関する研究 …… 21  
武田 篤信
7. 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に関する研究 …… 22  
丸山 和一

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …… 25

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 …… 27

# I . 総括研究報告

## 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に関する研究

研究代表者 望月 學

東京医科歯科大学医歯学総合研究科教授

### 研究要旨

Polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて、眼内の微量の検体より眼内感染症に関連する大部分の病原微生物、あるいは眼内リンパ腫を一度に診断もしくは除外できるシステムを構築し、そのシステムの臨床的有効性を検討する。

### 網羅的迅速診断システムの開発とその有用性の検討

#### A. 研究目的

##### 1) PCR 法による迅速診断システム

感染性眼内炎と眼内リンパ腫は失明あるいは生命予後に直結する重篤な疾患である。これらの診断は培養や病理細胞診などにより行われているが、迅速性と検体量に問題がある。即ち、眼内検体は極微量であり、多項目を網羅的に検査することが出来ない。本研究は、眼内の微量検体から Polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて眼内感染症病原体と眼内リンパ腫を網羅的かつ迅速に診断もしくは除外できるシステムを開発し、臨床的有用性を検討することを目的とする。

#### B. 研究方法

##### 1) PCR 法による迅速診断システム

臨床症状から眼内感染症あるいは眼内リンパ腫が疑われた患者から前房水、または硝子体を採取し以下の PCR を全症例で行った。①ウイルス診断セット：herpes simplex virus1 (HSV-1), HSV-2, varicella-zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV), human herpes virus (HHV)-6, HHV-7, HHV-8, ②ぶどう膜炎診断セット：結核菌、梅毒、Bartonellahenselae (ネコ引っ掻き病)、犬回虫幼虫、トキソプラズマ原虫、クラミジア、③細菌診断セット (細菌 16S rRNA 領域; 細菌全般 DNA)、④真菌診断セット：(真菌 28S rRNA 領域; 真菌全般 DNA)、⑤アクネ菌診断セット (Propionibacterium acnes、遅発性眼内炎の起原菌)、⑥その他：アカント・アメーバ、風疹ウイルス、HTLV-1 ウイルス、⑦眼内リンパ腫診断セット：B 細胞重鎖遺伝子再構成、T 細胞受容体遺

伝子再構成である (図 1)。これらのウイルス、細菌、真菌の病原微生物の塗抹標本・培養の陽性率は高くなく、感染症診断の Gold standard が現状では存在しない。そのため、症例を次の 3 つの項目に分けてシステムの有効性を検討した。即ち、(1) 確定診断例：PCR の結果が陽性となり臨床所見と一致し確定診断に至ったもの、(2) 感染症除外診断例：PCR の全項目陰性で臨床所見、他の検査と一致し眼感染症、眼内リンパ腫が除外できたもの、(3) 無効例：PCR の結果が臨床所見、他の検査と一致しないものである。対照として、炎症とリンパ腫がない老人性白内障や網膜剥離などの患者 100 名の前房水、硝子体、涙液を検査した。PCR はライトサイクラー (Roche 社) を用いて multiplex PCR 法で定性検査を行い、定性で陽性となった項目を real-time PCR 法で定量し、DNA 量が  $10^2$  copy/ml 以上を陽性と判定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言を遵守し、本学ならびに協同研究施設の倫理委員会の承認を得て、患者からインフォームド・コンセントを得た上で行われ、UMIN 臨床試験登録システムに登録された (受付番号：R000002708、試験名：難治性眼炎症性疾患に対する網羅的迅速 PCR 診断システムの多施設共同研究)

#### C. D. 研究結果及び考察

##### 1) PCR 法による迅速診断システム

2009 年 4 月から 2011 年 10 月までの 2 年 8 ヶ月間の検査結果は以下の如くである。眼感染症が疑われた患者 292 例、ならびに眼内リンパ腫が疑われた患者 68 例の検体を本診断システムで検査した。(1) 本システムで確定診断できた症例は 142

例(表 1)、(2)本システムの全 PCR 検査が陰性で、感染症ならびに眼内リンパ腫が除外診断できた症例は 187 例(表 2)、(3)本システムの結果と臨床症状ならびに他の検査結果とが一致しなかった症例は 31 例(表 3)であった。一方、対照の 100 例は本診断システムの全ての結果が陰性であった。

本診断システムにより、感染症あるいはリンパ腫と確定診断あるいは除外診断され、その結果が治療に反映できた症例が 360 例中 329 例(91%)もあり、本診断システムは臨床的に有用と考えられた。対照症例は全て陰性であった。多施設協同臨床試験の結果、本診断システムの利点として、(1)定性 PCR は DNA 抽出から結果報告まで 24 時間以内に行えた事、(2)定量結果も 48 時間以内に行えた事、(3)前房水 0.1ml、硝子体 0.5ml という極微量の検体でも、全症例で多くの PCR が行えた事、(4)眼局所での抗原 DNA 量(コピー数)が把握でき治療法の決定に有効であった事などが挙げられる。PCR 検査の結果、確定診断例は 142 例、感染除外例は 187 例、無効例は 31 例であった。その感度は 83%、特異度は 99%で、臨床所見から眼内感染症あるいは眼内リンパ腫が疑われる症例に対してこの網羅的迅速 PCR 診断システムは有効であった。

## E. 結論

感染症あるいは眼内リンパ腫が疑われる症例に対して網羅的迅速 PCR 診断システムは有効性であった。

## 細菌 16S r RNA Broad-range PCR の有効性の検討

### A. 研究目的

細菌 Broad-rangePCR の眼科分野での有効性を検証する目的で、i)感染性眼内炎の主要な起炎菌を網羅できるか、およびii)PCR 検出感度について検討した。

### B. 研究方法

#### i) 眼内起炎菌の検証

細菌性眼内炎(術後眼内炎、内因性眼内炎、外傷性眼内炎)の起炎菌として頻度の高い 12 種類のグラム陽性菌(*Staphylococcus aureus*, *MRSA*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus*

*pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, *Nocardia asteroides*)と 4 種類のグラム陰性菌(*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Moraxella lacunata*)の計 16 種類の細菌より DNA を抽出し、DNA 濃度を 1~10ng/mL に調整し、細菌 16S rRNA Broad-range real-time PCR を施行した。

#### ii) PCR 検出感度

*E. coli*および *S. aureus* の  $2.5 \times 10^7$  CFU/mL ( $10^6$  CFU/PCR) ~  $2.5 \times 10^1$  CFU/mL ( $10^0$  CFU/PCR) 溶液から DNA 抽出後に細菌 16S rRNA Broad-range real-time PCR を施行した。

#### (倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言の趣旨を尊重し、学内倫理委員会の承認のもと患者のインフォームド・コンセントを得た上で施行した。

## C. D. 研究結果及び考察

起炎菌の検出 : グラム陽性菌 11 種類およびグラム陰性菌 5 種類の計 16 種類を検査した。その結果 PCR に用いた DNA 濃度は 1.4~8.7ng/ml で、Ct 値は全て 30 以下、Ct 値より算出した DNA コピー数は  $10^3 \sim 10^5$ copies/ml であった。またコントロールに用いた滅菌水のコピー数は 10 以下であった(表 4)。

PCR 検出感度 : 大腸菌の検出感度は  $10^0$ CFU/PCR、黄色ブドウ球菌の検出感度は  $10^1$ CFU/PCR で良好な感度であった(表 5、表 6)。

## E. 結論

今回使用した PCR は主要な眼内炎起炎菌を検出し、その感度は良好であった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

1) 国内	
口頭発表	33 件
原著論文による発表	11 件
それ以外(レビュー等)の発表	11 件

## 論文発表

- 1) Sugita S, Takase H, Sugamoto Y, Arai A, Miura O, Mochizuki M. Diagnosis of intraocular lymphoma by polymerase chain reaction analysis and cytokine profiling of the vitreous fluid. *Jpn. J. Ophthalmol.* 2009; 53: 209-214.
- 2) 渡邊健、新井文子、高瀬博、高橋任美、岩永洋一、菅本良治、杉田直、望月學、三浦修 眼病変に methotrexate 硝子体内注入が著効したが早期に中枢神経へ進展した原発性眼内リンパ腫 臨床血液. 2009; 50: 182-6.
- 3) 山本紗也香、杉田直、森尾友宏、清水則夫、望月學 眼部帯状疱疹の涙液中の水痘・帯状疱疹ウイルス DNA 量 臨床眼科 2009; 63: 707-710.
- 4) Ishida T, Sugamoto Y, Sugita S, Mochizuki M. Prophylactic vitrectomy for acute retinal necrosis. *Jpn J Ophthalmol.* 2009; 53: 486-9.
- 5) Miyanaga M, Sugita S, Shimizu N, Morio T, Miyata K, Maruyama K, Kinoshita S, Mochizuki M. A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. *Br. J. Ophthalmol.* 2010; 94: 336-40.
- 6) Nakauchi Y, Takase H, Sugita S, Mochizuki M, Shibata S, Ishiwata Y, Shibuya Y, Yasuhara M, Miura O, Arai A. Concurrent administration of intravenous systemic and intravitreal methotrexate for intraocular lymphoma with central nervous system involvement. *Int J Hematol.* 2010; 92: 179-185.
- 7) Ito M, Yokoi T, Sugita S, Shinohara N, Nishina S, Azuma N. Endogenous candida chorioretinitis in a healthy infant. *Jpn J Ophthalmol.* 2010; 54: 629-31.
- 8) 山本紗也香、杉田直、堀江真太郎、清水則夫、森尾友宏、望月學 角膜炎を伴わない単純ヘルペスウイルス 1 型虹彩毛様体炎の 3 例 あたらしい眼科 2010; 27: 252-255.
- 9) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Takase H, Sugamoto Y, Mochizuki M. Diagnosis of

bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol.* 2011; 95: 345-349.

- 10) Sugita S, Ogawa M, Inoue S, Mochizuki M. Diagnosis of ocular toxoplasmosis by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiplex PCR and quantitative real-time PCR. *Jpn J Ophthalmol.* 2011, in press.
- 11) Sugita S, Kamoi K, Ogawa M, Watanabe K, Shimizu N, Mochizuki M. Detection of *Candida* & *Aspergillus* species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011, in press.

## 学会発表

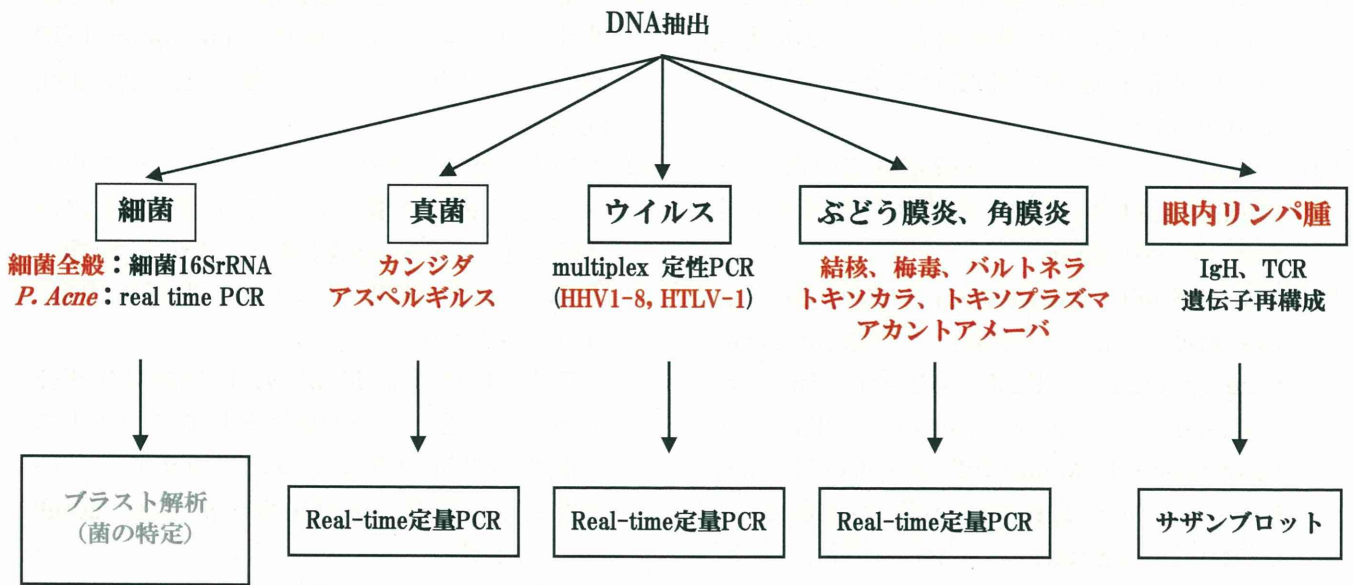
- 1) 杉田直、堀江真太郎、山田由季子、望月學、渡邊健、片山未来、清水則夫 感染性眼内炎の眼内液を用いた細菌 Broad-range 定量 PCR システムの有用性の検討 第 113 回日本眼科学会総会 東京
- 2) 永田健児、丸山和一、小嶋健太郎、稲富勉、杉田直、木下茂 全層角膜移植後眼に急性網膜壊死を発症した一例 第 63 回臨床眼科学会 福岡
- 3) 伊藤牧子、横井匠、田中三知子、野田英一郎、小林百合、小川学、杉田直、篠原尚美、仁科幸子、東範行 乳児に見られたカンジダ性網脈絡膜炎の一例 第 63 回臨床眼科学会 福岡
- 4) 丸山和一、杉田直、中井義秀、中森良樹、森尾友弘、望月學、木下茂 眼内液 Multiplex PCR システムにより胃悪性リンパ腫を発見できた一例 第 63 回臨床眼科学会 福岡
- 5) 高瀬博、福田香織、島田典明、杉田直、望月學 視神経網膜炎像を呈した眼内リンパ腫の一例 第 63 回臨床眼科学会 福岡
- 6) 杉田直 シンポジウム『眼と CMV—そのすべて』CMV による前部ぶどう膜炎とその対応 第 46 回日本眼感染症学会 大阪
- 7) 杉田直 3 学会合同シンポジウム『クロスオーバーディスカッション』Suspected Infectious Eye Disease への対応 スリーサム・イン なにわ 大阪
- 8) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K,

- Katayama M, Horie S, Takase H, Sugamoto Y, Mochizuki M. Use of broad-range quantitative polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis. 10<sup>th</sup> International Ocular Inflammation Society Congress, Prague, 5/30-6/2, 2009.
- 9) 小川学、杉田直、井上静、望月學、片山未来、渡邊健、清水則夫、森尾友弘 ヘルペスウイルスの関与が疑われるぶどう膜炎に対する眼内液PCR検査の有用性の検討 第114回日本眼科学会 名古屋市
  - 10) 横井由美子、山崎仁志、目時友美、鈴木宏幸、木村智美、鈴木香、伊藤忠、中澤満、高畑武功、和田龍一、杉田直 眼内悪性リンパ腫を契機に発見されたT細胞リンパ腫の一例 第114回日本眼科学会 名古屋市
  - 11) 宮永将、杉田直、望月學 成人T細胞白血病患者にみられた角結膜腫瘍の1例 第80回九州眼科学会 佐賀市
  - 12) Ogawa M, S. Sugita S, Shimizu N, Morio T, Mochizuki M. Use of Human Herpes Virus (HHV) PCR Assays to Detect Viral DNA in Ocular Fluids of Patients with Herpetic Eye Diseases. ARVO 2010, Fort Lauderdale, Florida.
  - 13) 小川学、杉田直、井上静、清水則夫、赤尾信明、望月學 PCR法を用いたアカント・アメーバ角膜炎の補助診断 第21回臨床寄生虫学会 東京
  - 14) 岩間真由美、堀純子、平岡美紀、高橋浩、小川学、杉田直、望月學 免疫抑制下のネフローゼ児に発症した片眼性滲出性網脈絡膜炎の一例 第64回日本眼科学会 神戸市
  - 15) 高瀬博、新井文子、岩永洋一、菅本良治、川口龍史、高橋仁美、横田真子、鴨居功樹、宮永将、杉田直、望月學 眼内リンパ腫治療と眼外進展の後方視的検討 第64回日本眼科学会 神戸市
  - 16) 横井匠、田中美知子、杉田直、村田敏規、望月學、東範行 新型インフルエンザ(A/H1N1)感染後に非定型的網膜炎を呈した1例 第49回日本網膜硝子体学会 大阪市
  - 17) 杉田直 サブスペシャリティーサンデー ぶどう膜炎診療の進歩<感染性ぶどう膜炎の網羅的診断> 第114回日本眼科学会 名古屋
  - 18) 杉田直 シンポジウム『難治性眼炎症性疾患に対するPCR法を用いた診断検査システムの開発』第64回日本眼科学会 神戸市
  - 19) 杉田直 ブロードレンジPCRで診断がついた細菌性眼内炎の1例 第23回ぶどう膜カンファランス 東京 3.4.2011
  - 20) 小川学、杉田直、井上静、望月學、渡邊健、清水則夫、中川一路 眼科領域での細菌Broad-range 定量PCRの有用性の検討 第115回日本眼科学会総会 東京 5.12-15.2011
  - 21) 三重野洋喜、米田一仁、丸山和一、永田健児、小森秀樹、小嶋健太郎、木下茂、杉田直、望月學 眼内炎に対するPCRの有用性の検討 第45回日本眼炎症学会 京都 7.8-10. 2011
  - 22) 坂本俊哉、臼井嘉彦、横井克俊、坂井潤一、後藤浩、杉田直 持続的な前房畜膿を伴った原因不明ぶどう膜炎の1例 第45回日本眼炎症学会 京都 7.8-10. 2011
  - 23) 窪野珠央、高瀬博、杉田直、望月學、横井匠、仁科幸子、東範行 骨髄移植後免疫抑制状態の小児に生じた壊死性ヘルペス性網膜炎の1症例 第45回日本眼炎症学会 京都 7.8-10. 2011
  - 24) 小川学、杉田直、鴨居功樹、望月學、渡邊健、清水則夫 真菌18S rRNA領域定量PCRの真菌性眼内炎診断における有効性の検討 第65回臨床眼科学会 東京 10.7-10. 2011
  - 25) 龍井苑子、市邊義章、池田哲也、清水公也、(北里大)、杉田直、望月學 小児に発症し急激な変化をきたした原因不明の網膜血管炎の一例 第65回臨床眼科学会 東京 10.7-10. 2011
  - 26) 永田健児、丸山和一、小嶋健太郎、稲葉亨、木下茂、杉田直、望月學 硝子体解析で診断に至った成人T細胞白血病(ATL)眼内浸潤 第65回臨床眼科学会 東京 10.7-10. 2011
  - 27) 杉田直 眼内リンパ腫の診断 第3回東京眼炎症フォーラム 東京 2.4. 2011
  - 28) Sunao Sugita Application of research tools in clinical disease: Comprehensive PCR system for the diagnosis of ocular diseases ARVO/JOS Symposium The 115th Annual Meeting of the Japanese Ophthalmological Society Tokyo 5/12-5/15, 2011.
  - 29) 杉田直 スリーサム・イン京都 基調講演



- 感染症はここまで眼内炎症に関与する - 眼内液を用いた網羅的検査でわかったこと - 第45回日本眼炎症学会 京都 7.8-10. 2011.
- 30) 杉田直 特別講演：難治性眼炎症性疾患に対するPCR法を用いた診断検査システムの開発 第2回北海道眼炎症免疫セミナー 札幌市 8.19. 2011.
- 31) 杉田直 シンポジウム【眼感染症の進歩】：Multiplex PCRの応用 第65回臨床眼科学会 東京 10.7-10. 2011
- 32) Sunao Sugita Symposium：“Translational Research in Ocular Inflammation: Comprehensive PCR system for the diagnosis of ocular diseases” The 11<sup>th</sup> International Ocular Inflammation Society Congress and International Assembly of Ocular Inflammation Societies (Nov 13-16, 2011, Goa, India)
- 33) Sunao Sugita, Manabu Ogawa (Tokyo Medical and Dental University) Symposium：“Molecular Diagnosis in Intraocular Inflammation: Bacterial Infection” The 11<sup>th</sup> International Ocular Inflammation Society Congress and International Assembly of Ocular Inflammation Societies (Nov 13-16, 2011, Goa, India)
- 著書
- 1) 杉田直 眼感染アレルギーセミナー —感染症と生体防御— HTLV-1 ぶどう膜炎 あたらしい眼科，メディカル葵出版，2009：26：73-74.
- 2) 杉田直 眼科医のための先端医療「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」あたらしい眼科，メディカル葵出版，2009：26：653-655.
- 3) 杉田直 眼感染症の謎を解く III. 検査を駆使する！ 4. 遺伝子検索 broad range PCR 眼科プラクティス 文光堂 28：255-257, 2009.
- 4) 杉田直 眼感染症の謎を解く III. 検査を駆使する！ 4. 遺伝子検索 multiplex PCR 眼科プラクティス 文光堂 28：258-260, 2009.
- 5) 杉田直 眼科検査のグノーティイー・セアウトン ぶどう膜 PCR法の利点・欠点（定性PCR、RT-PCR、multiplex PCR、real-time PCR、Broad-range PCR 各々）シナジー出版，2010：掲載予定
- 6) 杉田直 眼感染症 Now! VIII. 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 あたらしい眼科，メディカル葵出版，2009：26：235-237
- 7) 杉田直 Chapter 2 感染部位から診る眼感染症 5) 眼内「30 ウイルス性虹彩毛様体炎」 Ocular infection Navigator インフォロント株式会社 2010：134-135
- 8) 杉田直 Chapter 3 Column 「Multiplex PCR」 Ocular infection Navigator インフォロント株式会社 2010：184-185
- 9) 杉田直 眼科検査のグノーティイー・セアウトン ぶどう膜 PCR法の利点・欠点（定性PCR、RT-PCR、multiplex PCR、real-time PCR、Broad-range PCR）シナジー出版，2010：18-21.
- 10) 杉田直 ぶどう膜炎診療の新たな動向 - 検体検査 あたらしい眼科 28：469-475, 2011 メディカル葵出版
- 11) 杉田直 「眼科診療：5年前の常識は、現在の非常識」 ぶどう膜炎の網羅的診断法 臨床眼科 65：332-338, 2011 医学書院.
- H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。) なし

# 現在の網羅的迅速診断システム 図1



## PCR 測定 (東京医科歯科大眼科研究室)

表1：確定診断例

陽性項目	症例数
HSV-1	19
HSV-2	4
VZV	37
CMV	35
EBV	0
HTLV-1	0
細菌 16SrDNA	12
真菌 28S r DNA	6
トキソプラズマ	4
アカントアメーバ	1
IgH 遺伝子再構成	22
TCR 遺伝子再構成	2
計	142

表2：除外診断例

最終診断	症例数
サルコイドーシス	14
ポスナー・シュロスマン症候群	12
水疱性角膜症	5
無菌性眼内炎	4
Fuchs 虹彩異色性虹彩炎	3
糖尿病虹彩炎	3
Behcet 病	3
急性前部ぶどう膜炎	2
原田病	2
水晶体起因性眼内炎	2
アミロイドーシス	1
脈絡膜腫瘍	1
薬剤性角膜障害	1
特発性	80
計	133

表 3：無効例

PCR 陰性の感染性疾患 (=偽陰性)

臨床診断	症例数
細菌性眼内炎	9
眼内リンパ腫	7
ウイルス性ぶどう膜炎	4
眼トキソプラズマ症	3
結核性ぶどう膜炎	2
真菌性眼内炎	2
眼トキソカラ症	1
梅毒性ぶどう膜炎	1
計	29

PCR 陽性の非感染性疾患 (=偽陽性)

陽性項目	症例数
細菌 16S rDNA	1
IgH 遺伝子再構成	1
計	2

表 4：細菌 16S Broad-range PCR を用いた眼内炎起炎菌の検出結果のまとめ

細菌種	Clone No	DNA 量 (ng/ml)	Ct 値*	Copies/ml
黄色ブドウ球菌 ( <i>S.aureus</i> )	NBRC12732	7.3	28.67	$1.32 \times 10^4$
メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant <i>S.aureus</i> MRSA)	JCM8702	7.0	29.10	$9.95 \times 10^3$
表皮ブドウ球菌 ( <i>S.epidermidis</i> )	JCM2414	6.0	27.96	$1.65 \times 10^4$
肺炎レンサ球菌 ( <i>S.pneumoniae</i> )	NBRC102642	8.2	25.68	$9.39 \times 10^4$
サングイス菌 ( <i>S.Sanguis</i> )	JCM5708	3.6	29.12	$9.68 \times 10^3$
A 群レンサ球菌 (group A <i>streptococcus</i> )	RIMD 3123004	7.2	27.97	$1.64 \times 10^4$
腸球菌 ( <i>E. faecalis</i> )	JCM20313	2.0	23.97	$1.05 \times 10^5$
ジフテリア菌 ( <i>Corynebacterium diphtheriae</i> )	JCM1310	4.4	25.15	$6.08 \times 10^4$
セレウス菌 ( <i>B. cereus</i> )	JCM20266	4.9	26.78	$2.86 \times 10^4$
クロストリジウム属 ( <i>Clostridium perfringens</i> )	JCM1290	6.1	29.92	$5.81 \times 10^3$
アクネ菌 ( <i>P. acnes</i> )	JCM6425	1.4	28.25	$1.45 \times 10^4$
緑膿菌 ( <i>P. aeruginosa</i> )	NBRC13275	5.6	23.71	$3.44 \times 10^5$
肺炎桿菌 ( <i>K. pneumoniae</i> )	JCM1662	7.5	26.79	$2.85 \times 10^4$
モラクセラ属 ( <i>M. lacunata</i> )	JCM20914	3.2	25.77	$8.88 \times 10^4$
大腸菌 ( <i>E. coli</i> )	JCM20135	8.7	23.18	$1.51 \times 10^5$
ノカルジア属 ( <i>N. asteroides</i> )	NBRC14403	8.0	28.66	$1.33 \times 10^4$
NC (滅菌水)		0		<10

表 5 : 大腸菌を用いた PCR 感度測定

濃度 (CFU/PCR)	Ct 値
10 <sup>6</sup>	16.84
10 <sup>5</sup>	19.81
10 <sup>4</sup>	23.18
10 <sup>3</sup>	26.79
10 <sup>2</sup>	26.78
10 <sup>1</sup>	28.25
10 <sup>0</sup>	28.94
Negative control	—

図 6 : 黄色ブドウ球菌を用いた PCR 感度測定

濃度 (CFU/PCR)	C t 値
10 <sup>6</sup>	18.83
10 <sup>5</sup>	23.62
10 <sup>4</sup>	27.71
10 <sup>3</sup>	29.65
10 <sup>2</sup>	29.73
10 <sup>1</sup>	30.07
10 <sup>0</sup>	—
Negative control	—

## II. 分担研究報告

## 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

研究分担者 東京医科歯科大学附属病院細胞治療センター センター長 森尾 友宏

### 研究要旨

Polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて微量な眼内液検体から難治性眼科炎症性疾患に関連する病原微生物と眼内リンパ腫を網羅する検査する網羅的迅速診断システムを開発した。

### A. 研究目的

Polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて眼科炎症性疾患に関連するほとんど全ての病原微生物ゲノムを網羅的に微量の検体から検出することにより、疾患の診断をするシステムを開発し、そのシステムの有効性を検討する。

### B. 研究方法

臨床所見から眼内感染症あるいは眼内リンパ腫が疑われた患者より眼検体を採取し全例で PCR 検査にてウイルス（ヘルペスウイルス属）、細菌（細菌全般 16S rDNA）、寄生虫（トキソプラズマ、トキソカラ）、真菌（カンジダ、アスペルギルス）などを調べた。また、臨床所見より必要症例に対し眼内リンパ腫の PCR を施行した。

これらのウイルス、細菌、真菌の病原微生物の塗抹標本・培養の陽性率は高くなく、感染症診断の Gold standard が現状では存在しない。そのため、症例を次の 3 つの項目に分けてシステムの有効性を検討した。即ち、(1) 確定診断例：PCR の結果が陽性となり臨床所見と一致し確定診断に至ったもの、(2) 感染症除外診断例：PCR の全項目陰性で臨床所見、他の検査と一致し眼感染症、眼内リンパ腫が除外できたもの、(3) 無効例：PCR の結果が臨床所見、他の検査と一致しないものである。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言の趣旨を尊重し、学内倫理委員会の承認のもと患者のインフォームド・コンセントを得た上で施行した。UMIN 臨床試験登録システムへの登録を行った。

### C. 研究結果と考察

PCR 検査の結果、確定診断例は 142 例、感染除外例は 187 例、無効例は 31 例であった。その感度は 83%、特異度は 99% で、臨床所見から眼内感染症あるいは眼内リンパ腫が疑われる症例に対してこの網羅的迅速 PCR 診断システムは有効であった。

### E. 結論

網羅的迅速診断システムは難治性眼炎症性疾患の診断に有用である。

### F. 研究発表（平成 23 年度）

#### 1. 論文発表

- 1) 山本紗也香、杉田直、森尾友宏、清水則夫、望月學 眼部帯状疱疹の涙液中の水痘・帯状疱疹ウイルス DNA 量 臨床眼科 2009; 63: 707-710.
- 2) Miyanaga M, Sugita S, Shimizu N, Morio T, Miyata K, Maruyama K, Kinoshita S, Mochizuki M. A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. *Br. J. Ophthalmol.* 2010; 94: 336-40.
- 3) 山本紗也香、杉田直、堀江真太郎、清水則夫、森尾友宏、望月學 角膜炎を伴わない単純ヘルペスウイルス 1 型虹彩毛様体炎の 3 例 あたらしい眼科 2010; 27: 252-255.

#### 2. 学会発表

- 1) 田中沙季、松原知代、三浦真梨子、田中登、鈴木恭子、大日方薫、清水俊明、森尾友宏：血球貧食症候群を呈した重症複合型免疫不全症の乳児例、第 43 回日本小児感染症学会総



会・学術集会、岡山、2011年10月29日-30日

2011年5月11日-15日

- 2) 内田佳子、岩田あや、仁紙宏之、森尾友宏：  
MRI で小脳に一過性異常信号を呈した  
HPV-B19 による急性脳炎小脳炎、第 43 回日  
本小児感染症学会総会・学術集会、岡山、2011  
年 10 月 29 日-30 日
- 3) 森尾友宏：ウイルス特異的 T 細胞とその維持、  
第 18 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジ  
ウム、埼玉、2011 年 10 月 21 日
- 4) 小川学、杉田直、中川一路、森尾友宏、清水  
則夫、渡邊健、井上静、望月學：眼内炎主要  
起炎菌に対する細菌 Broad-range 定量 PCR 感  
度の検討、第 115 回日本眼科学会総会、東京、

**G. 知的財産権の出願・登録状況**  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 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

分担研究者：清水 則夫  
(東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス治療学准教授)

### 研究要旨

感染症による眼科疾患の原因微生物を網羅的・迅速・高感度に検出することが可能な新しい検査系の構築を目的に、真菌および細菌の網羅的検査系の研究開発を行った。多様な菌種間での保存性が高い ribosomal RNA 遺伝子の共通配列を利用し(真菌: 18SrRNA、細菌: 16SrRNA)、様々な種類の真菌および細菌を網羅的・迅速に検出する事が可能な検査系を構築した。

### A. 研究目的

感染症による眼科疾患の原因微生物を網羅的・迅速・高感度に検出することが可能な新しい検査系を構築し、その有効性・信頼性を検証して臨床現場に提供することにより、失明を防ぎ患者の QOL を高めることを目的として研究を行っている。

これまで行ってきたウイルス感染症の検査系の開発に引き続き、本年度は真菌・細菌の検査系の確立を目標に研究を行った。

### B. 研究方法

多くの細菌・真菌株で保存されている共通領域を標的とした網羅的・迅速検出系の作成を試みた。標的としては、16SrRNA 遺伝子(細菌)や 18SrRNA 遺伝子(真菌)を選択した。また、作製した網羅的細菌・真菌検査系の性能検証用に、細胞製剤製造管理上重要と思われる真菌や細菌の個別検出・定量系の作成もあわせて行った。

#### 1. 個別検出系の作成

##### A. 対象菌種

- *Aspergillus* sp (*A.fumigatus*, *A.flavus*, *A.nidulans*, *A.niger*, *A.terreus*)
- *Candida* sp (*C.albicans* *C.parapsilosis* *C.tropicalis* *C.guilliermondii* *C.glabrata* *C.krusei*)
- *Pneumocystis carinii*
- *Cryptococcus neoformans*
- *Trichosporon asahii*
- *Acanthamoeba* sp (*A.castellanii* *A.rhysodes* *A.lugdunensis* *A.polyphaga* *A.hatchetti*)

- *Propionibacterium acnes*
- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumonia*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Streptococcus griseus*
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumonia*

##### B. スタンダードの作製

PCR 産物を pGEM-T Easy Vector(プロメガ)にクローニングし、プラスミド精製後シーケンス解析により配列を確認した。確認後制限酵素 ScaI で消化後電気泳動法により濃度を確認し、MS2RNA 溶液(10ng/ $\mu$ l: ロッシュ)に段階希釈し、感度検定スタンダードとした。

#### 2. 核酸抽出

菌体からの DNA を抽出には細胞壁分解酵素(リチカーゼ: ザイモリエース)を使用した。酵素を添加後 37°C 1hr 静置して細胞壁を分解し、その後通常の DNA 抽出キット(キアゲン DNA mini kit)を用いて DNA 抽出を行った。

#### 3. PCR

- a. 細菌 16SrRNA 遺伝子検出用プライマー・プローブ配列(大文字は LNA: 高い結合親和性を有するため、プライマー・プローブの DNA 塩基を LNA で置換することにより、同じ Tm 値を維持しながらプローブの長さを短くすることが可能なる)

Primer : F-aggcagcagtDRggaat

Primer : R-ggaactacYVgggtatctaatt

Probe : FAM-tgccagcagccgcggtaatac  
RDag-iowaBK

- b. 真菌 18SrRNA 遺伝子検出用プライマー・プローブ配列

Forward Primer :

F-gcaaggctgaaacttaagRaattg

Reverse Primer :

R-cccctgttgagtcaaattaage

Probe : FAM-cggAagGgcAcca-TAMRA

- c. PCR 条件

細菌

Denature 95°C10 分

PCR (50cycle) 95°C15 秒、60°C1 分

真菌

Denature 95°C0 秒

PCR (45cycle) 95°C0 秒 60°C20 秒

- d. 反応液組成

1mM dNTPs

3mM MgCl2

25ng/μl Non-acetylated BSA

0.5U taq DNA polymerase (ABI)

Anit-taq antibody (toyobo)

Total volume 20 μl

(倫理面への配慮)

検査系の性能検証用の臨床検体は、病原体検査以外の検査(遺伝子検査などを明記してインフォームドコンセントを得たうえで取得した検体を匿名化した上で受け取り、患者の個人情報と解析結果との連結が不可能なように配慮した。

## C : 結果

### 1. 細菌定量用スタンダードの作製と感度検定

黄色ブドウ球菌由来の PCR 増幅産物を pGEM-T にクローニングし、シーケンス解析により配列を確認した。その後、ScaI 消化後に電気泳動法により濃度を確認し、MS2RNA 溶液に段階希釈し検査系の感度検定に用いた。実験を行った結果、作成した検査系は 10 copies/reaction の感度を持っていることを確認した。

### 2. 真菌定量用スタンダードの作成と感度検定

定量系の感度測定にするスタンダードとして利用するため、7 種の菌種 (*Aspergillus* sp, *Candida* sp, *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon asahii*,

*Acant-amoeba* sp, *Propionibacterium acnes*) に対する合成 DNA を作製した。

作製したスタンダードを使用した実験により検査系は 10 copies/reaction の感度と十分なダイナミックレンジを持つ事を確認した。

### 3. 検査系の特異性の確認

検査対象細菌および真菌間の交差反応性を確認するため、作製した個別定量系および GenBank の BRAST 解析した結果、検査系は交差反応性を持たないことを確認した。

### 4. ブロードレンジ定量 PCR 系の構築

「研究方法」に記載したように、多くの菌種に共通な領域が存在する真菌 18SrRNA 遺伝子、細菌 16SrRNA 遺伝子領域にプライマー・プローブを設定して真菌・細菌のブロードレンジ定量 PCR 系の構築を試みた。

図 1 : 細菌定量系の感度測定

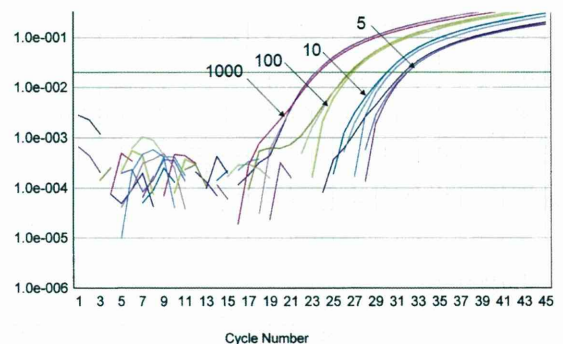


図 2 : 真菌定量系の感度測定

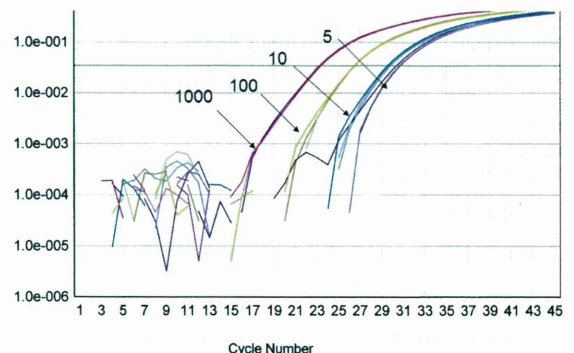


図 1 は細菌のブロードレンジ定量系の感度測定結果で (*Staphylococcus aureus* DNA を使用)、5 copies/reaction 以上の感度で細菌 DNA の定量が可能なが示された。本検査系は PubMed による BLAST 解析には、ARB sequence data base の細菌 41,016 配列において 64% 完全一致

している。

また、図2は真菌のブロードレンジ定量系の感度測定結果で(C.albicansのDNAを使用)、細菌検査系と同様に5 copies/reaction以上の感度で真菌DNAの定量が可能なが示された。

本検査系は、PubMedによるBLAST解析により真菌の配列30,000個との比較では完全一致が90%以上だった。

#### D. 考察

1. 細菌・真菌の中には体外で簡単に培養できない菌種も多く、細菌・真菌を網羅的に検出し増幅産物の配列解析から菌種を特定する方法は非常に有用性が高いと思われる。
2. 市販の酵素は菌体由来や組換え体であるためhostの大腸菌のゲノムDNAが混入している可能性が高いことが知られており、菌体のrRNA遺伝子の相同性を利用した検出系では、検査に使用する酵素の汚染による擬陽性反応が懸念される。本研究で使用した、ABI社製のAmpliTaq Gold® DNA Polymerase LDは高度に精製されているため、実用上問題ないことが確認された(公表されている本酵素2.5U [1反応の標準使用量]中に含まれる16SrRNA遺伝子は10コピー未満)。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Sugimoto Y and Mochizuki M. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95: 345-349.
- 2) Ng SB, Selvarajan V, Huang G, Zhou J, Feldman AL, Law M, Kwong YS, Shimizu N, Nagami Y, Aozasa K, Salto-Tellez M and Chng WJ. Activated oncogenic pathways and therapeutic targets in extranodal nasal-type NK/T cell lymphoma revealed by gene expression profiling. *J Pathol*. 2011; 223: 496-510.
- 3) Abe T, Segawa Y, Watanabe H, Yotoriyama T, Kai Y, Yasuda A, Shimizu N and Tojo N. Point-of-Care Testing System Enabling 30-min Detection of Influenza Genes. *LAB CHIP*. 2011; 11: 1166-1167.
- 4) Yagasaki H, Kato M, Shimizu N, Shichino H, Chin M and Mugishima H. Autoimmune hemolytic anemia and autoimmune neutropenia in a child with erythroblastopenia of childhood (TEC) caused by human herpesvirus-6 (HHV6). *Ann Hematol*. 2011; 90(7): 851-852.
- 5) Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, Shimizu N and Sawada K. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia*. 2011; 25(8): 1324-1334.
- 6) Sugita S, Ogawa M, Inoue S, Shimizu N and Mochizuki M. Diagnosis of ocular toxoplasmosis by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiples and quantitative real-time. *Jpn J Ophthalmol*. 2011; Jul 13. 55(5): 495-501.
- 7) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Sugimoto Y and Mochizuki M. Detection of Candida & Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefe Arch Clin Exp*. in press.
- 8) Ng SB, Yan J, Huang G, Selvarajan V, Tay J, Lin B, Bi C, Tan J, Kwong YL, Shimizu N, Aozasa K, Chng W. Dysregulated MicroRNAs Affect Pathways and Targets of Biological Relevance in Nasal-type Natural Killer / T-cell Lymphoma. *Blood*. 118(18):4919-4929. 2011 Nov 3.
- 9) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, and Fujiwara S. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK