

201122027B

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21年度～平成23年度 総合研究報告書

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 21 年度～平成 23 年度 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 13

III. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 15

# 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

炎の起因菌)、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 rRNA 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<sup>0</sup>CFU/PCR、黄色ブドウ球菌の検出感度は10<sup>1</sup>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; 55: 495-501.
- 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 名古屋市
  - 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 回ぶどう膜炎カンファランス 東京 3.4.2011
  - 20) 小川学、杉田直、井上静、望月學、渡邊健、



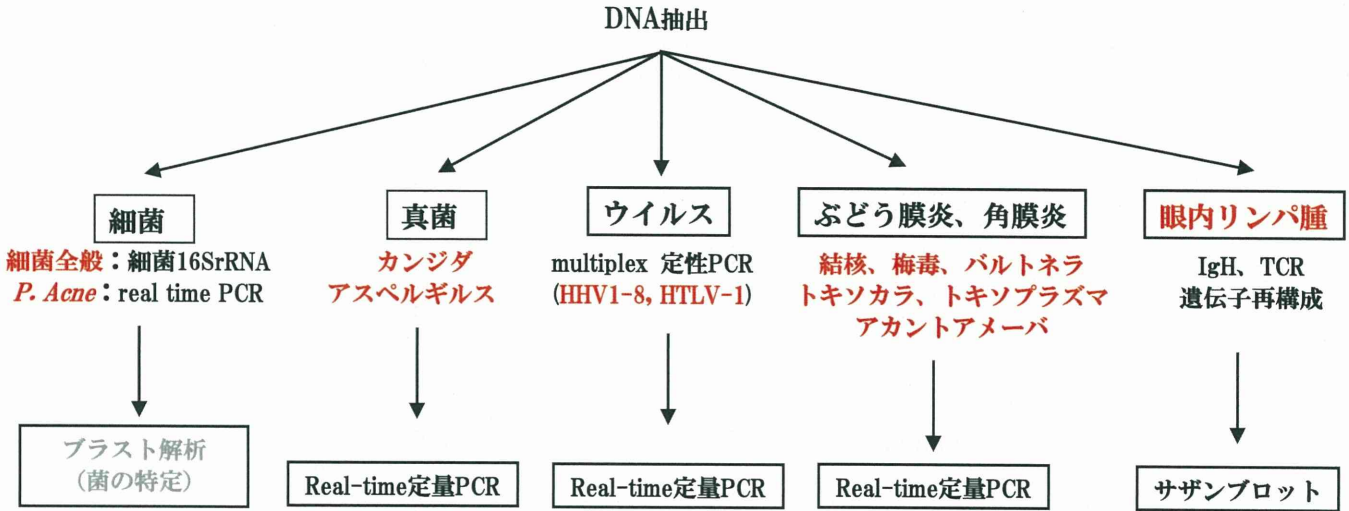
- 清水則夫、中川一路 眼科領域での細菌 Broad-range 定量 PCR の有用性の検討 第 115 回日本眼科学会総会 東京 5.12-15.2011
- 21) 三重野洋喜、米田一仁、丸山和一、永田健児、小森秀樹、小嶋健太郎、木下茂、杉田直、望月學 眼内炎に対する PCR の有用性の検討 第 45 回日本眼炎症学会 京都 7.8-10. 2011
- 22) 坂本俊哉、臼井嘉彦、横井克俊、坂井潤一、後藤浩、杉田直 持続的な前房畜膿を伴った原因不明ぶどう膜炎の 1 例 第 45 回日本眼炎症学会 京都 7.8-10. 2011
- 23) 窪野珠央、高瀬博、杉田直、望月學、横井匠、仁科幸子、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	$9.39 \times 10^4$
サンゲイス菌 ( <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)	Ct 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. 研究成果の刊行に関する一覧表



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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		2009	255-257
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		2009	258-260
杉田 直	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)		眼科検査のグノーティー・セアウトン	シナジー出版		2010	274-277

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugita S, Ogawa M, Inoue S, Shimizu N, Mochizuki M.	Diagnosis of ocular toxoplasmosis by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiplex and quantitative real-time.	Jpn J Ophthalmol	55	495-501	2011
Sugita S, Kamoi K, Ogawa M, Watanabe K, Shimizu N, Mochizuki M.	Detection of candida and Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis.	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	In press		2011
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, Fujiwara S.	Novel mouse xenograft models reveal a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells.	PLOS Pathogenes	7	1-14	2011
杉田 直	検体検査	あたらしい眼科	28	469-475	2011
杉田 直	ぶどう膜炎の網羅的診断法	臨床眼科	65	332-338	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	92	179-185	2010
Ito M. Yokoi T, Sugita S, Shinohara N, Nishida S, Azuma N.	Azuma N. Endogenous candida chorioretinitis in a healthy infant.	Jpn J Ophthalmol.	54	629-31	2010
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	94	336-340	2010
山本 紗也香	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	63	707-710	2009
山本 紗也香	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	27	252-255	2010
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	53	209-214	2009
Ishida T, Sugamoto Y, Sugita S, Mochizuki M.	Prophylactic vitrectomy for acute retinal necrosis.	Jpn J Ophthalmol.	53	486-9	2009
杉田 直	HTLV-1 ぶどう膜炎	あたらしい眼科	26	73-74	2009
杉田 直	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	26	653-655	2009
杉田 直	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	26	235-237	2009
渡邊 健, 新井文字, 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	50	182-6	2009

### Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

# 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、リボゾーマル 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、菌の同定目的でプラスト解析(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-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACRDAG-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. 陽性検体はプラスト解析 (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。