

図3 症例3の初診時前眼部写真

強い毛様充血, 大型の豚脂様角膜後面沈着物を伴う虹彩炎, 虹彩後癒着がみられた。

に角膜炎, 虹彩萎縮, 麻痺性散瞳の出現はみられず, 右眼視力 ($1.5 \times +0.50D \text{cyl} -1.25D \text{Ax}130^\circ$) に改善した。

〔症例3〕 56歳, 女性。

現病歴: 1週間前からの左眼の充血, 異物感, 霧視, 眼痛があり近医を受診した。左眼に肉芽腫性前部ぶどう膜炎がみられたため, ベタメタゾン点眼, デキサメタゾン結膜下注射を連日施行するも改善しないため2008年3月当科を紹介受診した。

初診時眼所見: 視力は右眼0.3 ($0.8 \times +2.75D \text{cyl} -5.00D \text{Ax}10^\circ$), 左眼0.6 ($0.7 \times +1.75D \text{cyl} -0.50D \text{Ax}130^\circ$), 眼圧は右眼12mmHg, 左眼14mmHg, 右眼に強い毛様充血, 大型の豚脂様角膜後面沈着物, cell 4+の虹彩炎, 虹彩後癒着がみられたが, 角膜炎はみられなかった(図3)。白内障のほか中間透光体, 眼底に異常所見はみられなかった。隅角は患眼のみに色素沈着がみられ, 角膜知覚検査では患眼で低下を示していた。ステロイド点眼に抵抗する虹彩毛様体炎よりヘルペス性を疑い, 前房水を採取し同様にPCRを試行した結果, HSV-1 DNAが $1.3 \times 10^7 \text{copy/ml}$ と高コピー数検出された。

経過: 治療はアシクロビル眼軟膏1日5回, ベタメタゾン点眼1日4回を開始したが, 前眼部炎症が遷延したため, バラシクロビル1,000mg/日の内服を開始したところ徐々に改善した。経過中に角膜炎, 虹彩萎縮, 麻痺性散瞳の出現はなく, 右眼視力 ($1.0 \times +1.50D \text{cyl} -0.75D \text{Ax}110^\circ$) に改善した。

II 考 按

単純ヘルペスウイルス (HSV) は初感染後に三叉神経節を中心に, 中脳, 上頸部交感神経節, 網膜, 角膜に潜伏感染して

いることが報告されている⁶⁾。HSVはさまざまな刺激により神経節に潜伏感染中のウイルスが再活性化し遠心性に眼組織に到達, もしくは末梢に潜伏感染するウイルスの活性化により, 眼瞼炎, 角結膜炎, 角膜炎(上皮型, 実質型, 内皮型), 線維柱帯炎, 角膜ぶどう膜炎, 虹彩毛様体炎, 急性網膜壊死といった眼疾患をひき起こす重要な原因ウイルスである。

今回の3症例では, 虹彩毛様体炎の程度は軽度から高度までさまざまであり, 3例中2例に高眼圧と隅角の色素沈着, 角膜知覚低下を全例にみられたが, 角膜炎と虹彩萎縮は経過中にみられなかった。HSV虹彩毛様体炎で典型的な角膜上皮炎や角膜内皮炎などがみられなく, 片眼性の高眼圧を伴う虹彩炎の場合, Posner-Schlossman症候群 (PSS) などとの鑑別が困難であり, 原因不明のくり返す虹彩毛様体炎と診断されていることが多いと推測される。

Van der Lelijら⁷⁾は虹彩萎縮を伴うが角膜病変はみられない特発性前部ぶどう膜炎患者31名中24名の前房水をPCRまたは抗体率で検討した結果, 20名がHSV, 4名がVZVと考えられたと報告している。この報告では90%に眼圧上昇がみられ, 32%は角膜知覚が低下しており, 20%は当初PSSと診断されていた。今回の3例中2例でも眼圧上昇がみられており, 片眼性の虹彩毛様体炎で高眼圧症がみられた場合には, 経過中に角膜炎がなくてもヘルペス感染を疑う必要があると思われる。今回の3症例では全例で角膜知覚は低下しており, 検眼鏡的に角膜病変はみられなかったが, 角膜に分布する神経内でヘルペスウイルスが活性化している可能性が考えられた。HSVやVZVによる虹彩毛様体炎による虹彩萎縮は一般的に発症後数カ月経過してから出現することが多いとされており, 今回の3症例でも, 早期から抗ヘルペス薬による適切な治療が行われなかったならば虹彩萎縮が出現していた可能性があると思われる。

以前よりPSSにはヘルペス感染の関与が示されているが, Yamamotoら⁸⁾は片眼性に軽度の虹彩毛様体炎を伴う高眼圧発作をくり返しPSSと診断された症例の前房水を採取し, HSV, VZV, CMVに対するPCRを施行し, HSV DNAが陽性であったと報告している。最近のいくつかの報告のように⁴⁻⁶⁾, PSS類似の片眼性の虹彩毛様体炎からCMV DNAやCMV特異抗体が検出されることがある。これらは免疫不全のない健康人にみられ, 発作性の高眼圧を伴う片眼性の虹彩毛様体炎を診た場合, HSV, VZV, CMVなどのヘルペス感染を念頭において診察する必要があると思われる。

杉田ら⁹⁾は, 1999年から2007年の間に当科を受診したぶどう膜炎患者100例から眼内液を採取し, ヒトヘルペスウイルス1型から8型のDNAをPCRで検討した結果を報告しており, 角膜病変を伴いHSV虹彩毛様体炎と考えられた7症例中2例でHSV DNAが陽性であり, VZV虹彩毛様体炎と考えられた16例中10例でVZV DNAが陽性であった。

角膜病変を伴う症例では角膜内でのウイルス増殖が中心となり、前房水中にウイルスが検出されにくく、角膜病変を伴わない虹彩毛様体炎では虹彩内でのウイルス増殖が中心となり、前房水中にウイルスが検出されやすいのではないかと思われた。

HSV 虹彩毛様体炎の治療は、アシクロビルやバラシクロビルといった抗ウイルス薬の局所、全身投与が基本となる。症例1と症例3ではステロイド治療のみでは改善せず、ステロイド治療抵抗性や再発性の場合には、ヘルペス性虹彩毛様体炎を考える必要があると思われた。また、抗ウイルス薬の治療は、症例3では当初抗ウイルス薬の局所投与だけでは改善が乏しく、内服を開始したところ改善がみられた。ヘルペス性虹彩毛様体炎では、症例によっては抗ウイルス薬は局所投与だけでなく内服を併用する必要があると考えられた。

以上より片眼性の高眼圧を伴う虹彩毛様体炎の鑑別疾患として、角膜病変や虹彩萎縮などのヘルペスウイルスに特徴的な所見がなくても HSV 虹彩毛様体炎を考える必要があると思われた。

文 献

- 1) Cunningham ET Jr : Diagnosing and treating herpetic anterior uveitis. *Ophthalmology* **107** : 2129-2130, 2000
- 2) Van der Lelij A, Ooijman FM, Kijlstra A et al : Anterior uveitis with sectoral iris atrophy in the absence of keratitis. *Ophthalmology* **107** : 1164-1170, 2000
- 3) Markomichelakis NN, Canakis C, Zafirakis P et al : Cytomegalovirus as a cause of anterior uveitis with sectoral iris atrophy. *Ophthalmology* **109** : 879-882, 2002
- 4) Chee SP, Bacsal K, Jap A et al : Clinical features of cytomegalovirus anterior uveitis in immunocompetent patients. *Am J Ophthalmol* **145** : 834-840, 2008
- 5) Van Boxtel LA, Van der Lelij A, Van der Meer J et al : Cytomegalovirus as a cause of anterior uveitis in immunocompetent patients. *Ophthalmology* **114** : 1358-1362, 2007
- 6) 下村嘉一 : ウイルス性状, 潜伏感染と再活性化, 伝播と播種. 月刊眼科診療プラクティス **92** : 98-102, 2003
- 7) Van der Lelij A, Ooijman FM, Kijlstra A et al : Anterior uveitis with sectoral iris atrophy in the absence of keratitis : a distinct clinical entity among herpetic eye diseases. *Ophthalmology* **107** : 1164-1170, 2000
- 8) Yamamoto S, Pavan-Langston D, Tada R et al : Possible role of herpes simplex virus in the origin of Posner-Schlossman syndrome. *Am J Ophthalmol* **119** : 796-798, 1995
- 9) 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

* * *

CLINICAL INVESTIGATION

Diagnosis of Intraocular Lymphoma by Polymerase Chain Reaction Analysis and Cytokine Profiling of the Vitreous Fluid

Sunao Sugita¹, Hiroshi Takase¹, Yoshiharu Sugamoto¹, Ayako Arai²,
Osamu Miura², and Manabu Mochizuki¹

¹Department of Ophthalmology & Visual Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; ²Department of Hematology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Abstract

Purpose: To determine whether a diagnosis of intraocular lymphoma (IOL) can be made using a combination of polymerase chain reaction (PCR) analysis to detect gene rearrangement of immunoglobulin and cytokine concentrations in the vitreous fluid.

Methods: Vitreous samples from 22 patients with clinically suspected IOL and ten control patients with acute retinal necrosis or cytomegalovirus retinitis were examined by PCR analysis and cytokine measurements. Genomic DNA was extracted from the cells in the vitreous, and the immunoglobulin heavy chain (*IgH*) gene was amplified by two PCR procedures: (1) microdissection and PCR to detect *IgH* gene rearrangement and (2) qualitative PCR to detect *IgH* VDJ gene rearrangement. The supernatants of the vitreous samples were used for enzyme-linked immunosorbent assay to determine interleukin (IL)-10 and IL-6 levels.

Results: PCR examinations detected *IgH* rearrangement in the vitreous in 21 of the 22 IOL patients (95.5%) and in none of the ten control patients. Elevated IL-10 concentrations (>100 pg/ml) and the IL-10/IL-6 ratio (>1.0) were positive in 18 of the 22 IOL patients (81.8%), but negative in all of the control patients. Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of PCR for the diagnosis of IOL were calculated to be 0.955, 1.000, 1.000, and 0.909, respectively, and those of the cytokine concentration assay to be 0.818, 1.000, 1.000, and 0.714, respectively. When both the intra-vitreous cytokine assay and PCR analysis of the vitreous samples are used, as well as diagnostic criteria of IOL defined as a positive outcome from one of the two assays together with clinical signs, the sensitivity and specificity of the criteria were 1.000.

Conclusions: A combination of PCR assay to detect gene rearrangement of *IgH* and cytokine profiling (IL-10 and IL-6) is extremely useful for the diagnosis of intraocular lymphoma. *Jpn J Ophthalmol* 2009;53:209-214 © Japanese Ophthalmological Society 2009

Key Words: IL-10, immunoglobulin gene rearrangement, intraocular lymphoma, polymerase chain reaction, vitreous fluid

Introduction

Intraocular lymphoma (IOL) is a high-grade malignant non-Hodgkin lymphoma most often of a B-cell type that

affects the retina, choroid, vitreous, or the optic nerve.¹⁻³ IOL is considered to be a subtype of primary central nervous system lymphoma (CNS lymphoma). When IOL is diagnosed and no CNS lesions are detected, the condition is referred to as primary IOL. In addition, IOL can occur as secondary lesions following systemic lymphoma and is then referred to as metastatic IOL. Histopathologically, most IOLs are classified according to the World Health Organization Classification for Hematologic and Lymphoid Neoplasms as diffuse large B-cell lymphomas.

Received: July 13, 2008 / Accepted: January 14, 2009

Correspondence and reprint requests to: Manabu Mochizuki, Department of Ophthalmology & Visual Science, Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Medicine, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan
e-mail: m.manabu.oph@tmd.ac.jp

Clinically, IOL is commonly found in elderly patients with a nonspecific corticosteroid-resistant uveitis. At the initial presentation, IOL exhibits signs and symptoms very similar to uveitis and is often treated with corticosteroids. Diagnosis of IOL cannot be made on the basis of clinical signs and symptoms. Furthermore, cytological diagnosis using vitreous samples is often negative, in part because of poor biopsy samples. Polymerase chain reaction (PCR) has been used to examine monoclonal rearrangements of immunoglobulin heavy chain (*IgH*) in B-cell lymphoma,^{4,6} and the interleukin (IL)-10 concentration^{7,8} and the IL-10/IL-6 ratio⁸ in ocular fluids have also been used. Although many reports^{9–11} support the value of these diagnostic investigations, some studies have reported false-positive or false-negative results from these diagnostic tests for IOL.¹²

The aim of the present study therefore was to determine whether a combination of these two investigational tests of vitreous biopsy samples could be used for the diagnosis of IOL.

Materials and Methods

Subjects

Vitreous fluid samples from 22 patients with clinically suspected IOL and ten controls with acute retinal necrosis (ARN) (seven patients) or cytomegalovirus retinitis (three patients) were examined between 2000 and 2007 at Tokyo Medical and Dental University Hospital. IOL was clinically suspected in a patient when either vitreous opacities or subretinal white lesions with unknown etiology or with systemic lymphoma/CNS lymphoma were observed, and when all routine diagnostic laboratory tests for uveitis were negative. As for the ten control patients, all had active intraocular inflammation at the time of sampling. An aliquot (0.8–1.0 ml) of vitreous fluids was collected at the beginning of the vitrectomy.

Informed consent was obtained from each patient before the sample collection. The research followed the tenets of the Declaration of Helsinki, and the Institutional Ethics Committees of Tokyo Medical and Dental University approved all study protocols.

Cytological Examination

Specimens were centrifuged at 7280 g for 8 min at 4°C. The cell pellet was then resuspended in fresh RPMI-1640 medium, cytocentrifuged for 10 min, and placed directly onto a gelatinized slide. Giemsa- and Gram-stained slides were prepared and examined at the Pathology Department of our hospital. The results of the cytological examination were classified according to Papanicolaou classes I–V.

Polymerase Chain Reaction for *IgH* Gene Rearrangement

Immunoglobulin heavy chain (*IgH*) gene rearrangement of B-cell lymphoma in the vitreous fluids was examined using two independent PCR assays: (1) gene rearrangement by microdissection and PCR and (2) *IgH* VDJ gene rearrangement by qualitative PCR.

Microdissection was performed by Chi-Chao Chan at the Laboratory of Immunology of the National Eye Institute (NEI) in the United States as follows. In brief, atypical cells with large nuclei were identified under a light microscope in paraffin sections stained with H&E. The histologic area of interest on the slide was gently scraped with a 30-gauge needle until the selected cells were detached from the tissue section. DNA was extracted from the microdissected cells, and PCR was performed as previously described.^{4,5,13} The search used primers for the third framework (FR3A), the second framework (FR2A), and the complementary determining region 3 (CDR3) of the V_H region. Independently, we also performed a conventional qualitative PCR for diagnosis of IOL at our laboratory. The primers for the *IgH* VDJ gene and the PCR conditions, described previously,¹⁴ differed from those used at NEI. The products were subjected to PCR in the presence of the primers (1 pmol), 200 mM deoxynucleotide triphosphates, and 2.5 U of *Taq* polymerase in a buffer containing 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl₂. Samples were subjected to 40 cycles of amplification consisting of denaturation for 1 min at 94°C, annealing for 1 min at 55°C, and polymerization for 1 min at 72°C. As a positive control, Raji cell lines (Burkitt lymphoma cells) were used. The PCR products were analyzed by 10% polyacrylamide gel electrophoresis and ethidium bromide staining. All vitreous samples were tested for the presence of β-actin as an internal control.

The PCR results for *IgH* gene rearrangement were taken as supportive of the diagnosis of IOL when either microdissection and PCR at NEI (FR3A, FR2A, or CDR3 gene) or PCR at our laboratory (VDJ gene) was positive.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measurement of IL-10 and IL-6 in the Vitreous

Using the supernatants of the vitreous samples, we determined the concentrations of IL-6 and IL-10 using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A minimum of 50 μl of each diluted vitreous sample was used for the ELISA assay. Samples were stored at –80°C until use, and cytokine assays were performed on freshly thawed samples.

The cytokine assay of the vitreous fluids of the IOL patients was taken as supportive of the diagnosis of IOL when IL-10 concentrations were >100 pg/ml and the IL-10/IL-6 ratio was >1.0.

Diagnostic Values of IgH Gene Rearrangement and Cytokine Assay of the Vitreous Samples

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of the detection of *IgH* gene rearrangement by PCR and of the cytokine assay of the vitreous samples were calculated from the clinical data.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney *U* test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Clinical Features

The clinical characteristics of the patients are summarized in Table 1. All patients had clinically suspected IOL with retinal or vitreous lesions, and in all patients uveitis was clinically excluded. Of the 22 IOL patients, 13 had primary IOL limited to the eyes at the time of diagnosis and no evidence of CNS, systemic, or spinal cord lymphoma; two had CNS lymphoma (cases 14 and 15); seven had metastatic IOL with lymphoma in organs other than the CNS. All metastatic IOL patients and CNS lymphoma patients had been previously diagnosed as having lymphoma in the respective organs when they came to our clinic.

Cytological Examination of Patients with IOL

Almost all of the vitreous samples of patients with suspected IOL were submitted to the Pathology Unit of our hospital for cytological examination. Of the 20 IOL patients, only four (20%) were histopathologically diagnosed as having lymphoma (class V); most were classified as class II or III (Table 2). The details of the diagnostic examination based on the vitreous samples are summarized in Table 2. Most samples were defined as class III (19/28, 68%), with four samples defined as class II (14%), and the one remaining sample as class IV (only 4%). In one patient (case 17 in Table 2), no cells were detected in the samples. Although case 7 was classified as primary IOL, the patient did not undergo cytological examination at the first evaluation because the patient had been clinically diagnosed as having ARN.

IgH Gene Rearrangement Detected by PCR of the Vitreous Samples

PCR to detect *IgH* gene rearrangement was carried out at either NEI or our laboratory in Tokyo in 22 patients with suspected IOL and ten control patients (Table 2). *IgH* gene rearrangements (VDJ, FR3A, FR2A, or CDR3) were detected in 21 of the 22 patients with suspected IOL (95.5%). In only one patient (case 8 in Table 2) was *IgH* gene rearrangement negative according to the PCR assays at both NEI and our laboratory. On the other hand, in none of the ten patients with ARN or cytomega-

Table 1. Intraocular lymphoma clinical details

Case	Age (years)	Sex	Primary organ	Diagnosis	Ocular lesions at initial presentation	CNS involvement	Current status
1	69	F	Eye	Primary IOL	Vitreous & retina	Yes	Deceased
2	79	F	Eye	Primary IOL	Vitreous	No	Alive
3	62	F	Eye	Primary IOL	Vitreous & retina	Yes	Deceased
4	76	F	Eye	Primary IOL	Vitreous & retina	No	Alive
5	57	M	Eye	Primary IOL	Vitreous & retina	Yes	Deceased
6	70	M	Eye	Primary IOL	Retina	No	Alive
7	56	M	Eye	Primary IOL	Vitreous & retina	Unknown	Unknown
8	82	F	Eye	Primary IOL	Retina	No	Alive
9	78	M	Eye	Primary IOL	Vitreous & retina	No	Alive
10	73	F	Eye	Primary IOL	Vitreous	No	Alive
11	75	F	Eye	Primary IOL	Retina	No	Alive
12	56	F	Eye	Primary IOL	Retina	Yes	Deceased
13	70	M	Eye	Primary IOL	Vitreous	No	Alive
14	69	M	Brain (CNS)	Primary IOL	Vitreous & retina	Yes	Deceased
15	66	M	Brain (CNS)	Primary IOL	Vitreous	Yes	Alive
16	82	F	Pharynx	Metastatic IOL	Vitreous	No	Alive
17	86	F	Neck	Metastatic IOL	Vitreous & retina	Yes	Deceased
18	45	M	Appendix	Metastatic IOL	Vitreous	No	Alive
19	67	M	Stomach	Metastatic IOL	Vitreous	No	Alive
20	38	F	Breast	Metastatic IOL	Vitreous	Yes	Deceased
21	87	M	Head	Metastatic IOL	Vitreous & retina	Yes	Deceased
22	73	M	Testis	Metastatic IOL	Retina	No	Alive

Patients 1 to 15 had primary IOL, including CNS lymphoma. Patients 16 to 22 had metastatic IOL. IOL, intraocular lymphoma; CNS, central nervous system.

Table 2. Vitreous fluid examinations of patients with intraocular lymphoma and in controls

Case	Diagnosis	Source	Cytology (R/L)	ELISA (R/L)		IL-10/IL-6 ratio	PCR (R/L)	
				IL-10 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)		Microdissection & PCR	IgH VDJ rearrangement
1	Primary IOL	VF	III	5000	50	100	(+)	nd
2	Primary IOL	VF	III	<10	<10	–	(+)	(–)
3	Primary IOL	VF	III	1075	20	54	(+)	(+)
4	Primary IOL	VF	IIIb	15000	70	214	(+)	(+)
5	Primary IOL	VF	II / V	24080 / 43479	11298 / 1245	2 / 35	nd / nd	(+) / (+)
6	Primary IOL	VF	II	33	61	0.5	nd	(+)
7	Primary IOL	VF	nt	2364	387	6	nt	(+)
8	Primary IOL	VF	III	1233	148	8	nt	nd
9	Primary IOL	VF	III / V	1923 / 138	37 / <10	52 / 14	nt / nt	(+) / nt
10	Primary IOL	VF	IV / III	109 / 172	31 / 30	4 / 6	(–)	(–) / (+)
11	Primary IOL	VF	V / III	3395 / 238	1891 / 144	2 / 2	nt / nt	(+) / (+)
12	Primary IOL	VF	III	250	50	5	(–)	(+)
13	Primary IOL	VF	III	348	5	70	nt	(+)
14	Primary IOL	VF	III / II	82 / <10	<10 / <10	8 / –	nt	(+) / (–)
15	Primary IOL	VF	V	4643	157	30	nt	(+)
16	Metastatic IOL	VF	IIIb	2053	12	171	nd	(+)
17	Metastatic IOL	VF	nd	16000	1050	15	(+)	nt
18	Metastatic IOL	VF	III	1680	119	14	nt	(+)
19	Metastatic IOL	VF	III / III	126 / 207	201 / 113	0.6 / 1.8	(–) / nt	(+) / (+)
20	Metastatic IOL	VF	IIIb / III	470 / 64	15 / 46	31 / 1.4	(+) / (–)	(–) / (+)
21	Metastatic IOL	VF	III / IIIb	380 / 580	250 / 350	1.5 / 1.7	(+) / (–)	(+) / (+)
22	Metastatic IOL	VF	II	505	733	0.7	(–)	(+)
23	ARN	VF	nt	90	1080	0.1	nt	(–)
24	ARN	VF	nt	764	956	0.8	nt	(–)
25	ARN	VF	nt	172	22759	0.01	nt	(–)
26	ARN	VF	nt	122	660	0.2	nt	(–)
27	ARN	VF	nt	375	24404	0.02	nt	(–)
28	ARN	VF	nt	201	1833	0.1	nt	(–)
29	ARN	VF	nt	188	834	0.2	nt	(–)
30	CMVR	VF	nt	<10	874	0	nt	(–)
31	CMVR	VF	II	<10	12929	0	nt	nt
32	CMVR	VF	nt	<10	724	0	nt	nt

The cytology results were classified according to the Papanicolaou classes I–V. Microdissection and PCR detected the *IgH* rearrangement gene in FR3A, FR2A, and CDR3.

PCR for B-cell lymphoma was also performed using specific primers for *IgH* VDJ rearrangement.

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; PCR, polymerase chain reaction; IL, interleukin; nd, no decision (due to lack of sufficient sample volume, insufficient cell number, or negative β -actin internal control); nt, not tested (due to limited tissue); ARN, acute retinal necrosis; CMVR, cytomegalovirus retinitis; VF, vitreous fluid; ARN, acute retinal necrosis.

lovirus retinitis, was *IgH* gene rearrangement detected by PCR.

IL-10 and IL-6 Concentrations in the Vitreous Samples

The intravitreal concentrations of IL-10 and IL-6 in the IOL patients and the control patients with ARN and cytomegalovirus retinitis are summarized in Table 2. The mean concentrations of IL-10 and IL-6 in the 30 vitreous samples of the 22 IOL patients were 4187 ± 1696 pg/ml and 617 ± 377 pg/ml, respectively. On the other hand, the mean concentrations of IL-10 and IL-6 in the ten vitreous samples of the ten control patients were 181 ± 75 pg/ml and 6705 ± 3053 pg/ml, respectively. In the patients with IOL, the IL-10 concentrations were significantly higher than those of IL-6 ($P = 0.0006$), whereas in the control patients, the IL-6 con-

centrations were significantly higher than those of IL-10 ($P = 0.0003$). The IL-10/IL-6 ratio was >1.0 in all but three of the patients with IOL (cases 2, 6, and 22), whereas it was <1.0 in all of the control patients.

Eighteen of the 22 (81.8%) patients with suspected IOL met the criteria of a cytokine profile supportive of the diagnosis of IOL, that is, IL-10 concentration >100 pg/ml and IL-10/IL-6 >1.0 . On the other hand, none of the ten control patients met the criteria.

Diagnostic Parameters of IgH Gene Rearrangement and Cytokine Profiling of the Vitreous

The diagnostic parameters of sensitivity, specificity, PPV, and NPV of the molecular examinations (*IgH* gene rearrangement by PCR) for the diagnosis of IOL were calculated to be 0.955, 1.000, 1.000, and 0.909, respectively. The

sensitivity, specificity, PPV, and NPV of the immunological tests (IL-10 >100 pg/ml and IL-10/IL-6 >1.0) in the vitreous were calculated to be 0.818, 1.000, 1.000, and 0.714, respectively. If we define the diagnostic criteria for IOL as a positive outcome in one of the two assays (intravitreal cytokine assay and PCR) together with clinical signs, all of our 22 patients with suspected IOL could be diagnosed as having IOL and all ten control patients as not having IOL, indicating that the sensitivity and specificity of the criteria were 1.000.

Discussion

The aim of the present study was to determine whether a molecular examination detecting the *IgH* gene rearrangement by PCR and an immunological test measuring the IL-10 and IL-6 concentrations in the vitreous fluid provide supportive evidence for the diagnosis of IOL. The data clearly showed that both the molecular examination and the immunological test were diagnostic of IOL, as demonstrated by the high values of sensitivity, specificity, PPV, and NPV of each investigation and of the combination of the two. In addition, positive criteria from either the molecular examination or the immunological test gave extremely high values for the diagnostic parameters.

In the present study, we used two independent PCR methods to detect *IgH* gene rearrangement: (1) microdissection and PCR to detect the FR3A, FR2A, or CDR3 genes and (2) conventional PCR to detect the VDJ gene. Because the primers and probes used in the two methods differed, we speculated that use of the two molecular investigations would increase the possibility of detecting *IgH* gene rearrangement than would use of a single PCR assay. A discrepancy was found in the PCR results between the two assays in some patients with suspected IOL, which was due in part to the differences in the methods used. However, a combination of the two PCR assays was useful in the diagnosis of IOL. *IgH* gene rearrangement was not detected by either PCR method in only one patient (case 8), but the patient had a high concentration of IL-10 (1233 pg/ml) and a low concentration of IL-6 (148 pg/ml), and an IL-10/IL-6 ratio of 8. In addition, this patient had clinically suspected IOL with multiple retinal exudates, and uveitis was clinically excluded.

With regard to the immunological testing of the vitreous fluid, all but one of the patients with suspected IOL (case 2) had detectable levels of IL-10 in the vitreous. In most of the patients with suspected IOL, the IL-10 concentration in the vitreous was very high, but in two patients (cases 6 and 14), it was <100 pg/ml. In three of these patients (cases 2, 6, and 14), the molecular investigation yielded positive results in that *IgH* gene rearrangement was detected by PCR. The IL-10/IL-6 ratio was >1.0 in all but three of the patients with suspected IOL (cases 2, 6, and 16). In the three patients with IL-10/IL-6 <1.0, the molecular test was also positive. In the control group, IL-10 was detectable in the vitreous in many patients, especially in all seven of the patients with ARN.

However, the concentration of IL-6 in the vitreous was much higher than that of IL-10 in all of the IOL patients, and the IL-10/IL-6 ratio was <1.0 in all control patients. Ongkosuwito et al.¹⁵ previously reported the cytokine profiles in the ocular fluids of 44 eyes with infectious uveitis. They found increased IL-6 levels in 44 control eyes and 43 eyes with infectious uveitis. Moreover, they detected IL-10 in ten eyes with ARN and 13 eyes with toxoplasmosis, but in only three control samples. As reported by many investigators,^{7,8,11} primary IOL is strongly associated with an IL-10/IL-6 ratio >1.0.

The present molecular and immunological data suggest the following: (1) *IgH* gene rearrangement in vitreous cells can be negative in some IOL patients; (2) low or undetectable levels of IL-10 in the vitreous or an IL-10/IL-6 ratio <1.0 can be detected in some IOL patients; and (3) high IL-10 concentrations in the vitreous can be detected in some uveitis patients such as ARN patients. Thus, the data in the present study, together with those of many previous studies,^{10,12,15,16} indicate that one cannot make a definite diagnosis of IOL on the basis solely of molecular investigations or solely of immunological tests of vitreous samples. In this study, therefore, we analyzed the values of four diagnostic parameters for the molecular investigation, the immunological test, and the combination of the two. We used the following criteria as results supportive of the diagnosis of IOL: (1) detection of *IgH* gene rearrangement by either of two PCR assays in the molecular investigation and (2) IL-10 >100 pg/ml or IL-10/IL-6 >1.0 in the immunological test. Although the sensitivity, specificity, PPV, and NPV of the molecular investigation alone were 0.955, 1.000, 1.000, and 0.909, respectively, and those of the immunological test alone were 0.818, 1.000, 1.000 and 0.714, respectively, and considered to be high, a positive outcome from one of two assays (*IgH* gene rearrangement by PCR and cytokine assay of the vitreous sample) gave much higher values for the diagnostic parameters: 1.000 for all four parameters. In the clinical situation, we need to make difficult decisions based on the diagnosis as to whether patients with suspected IOL should be treated with intraocular and systemic chemotherapy, which are very invasive. Therefore, the diagnosis should be as accurate as possible.

In conclusion, on the basis of a molecular investigation to detect *IgH* gene rearrangement and immunological testing to measure IL-10 and IL-6 in the vitreous, a patient who has the intraocular signs of suspected IOL and positive results from the molecular investigation and from the immunological testing of the vitreous sample must be considered as having IOL, and the treatment strategies should be decided accordingly.

Acknowledgments. We wish to thank Dr. S. Horie, Dr. Y. Futagami, and Mrs. I. Yamamoto for their technical assistance within our hospital. We greatly appreciate the microdissection and PCR test conducted by Dr. Chi-Chao Chan (Laboratory of Immunology, National Eye Institute, USA). This work was supported by Grant-in-Aid for Young Scientists (B) 18791263 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

References

1. Coupland SE, Heimann H, Bechrakis NE. Primary intraocular lymphoma: a review of the clinical, histopathological and molecular biological features. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;42:901–913.
2. Char DH, Ljung BM, Miller T, et al. Primary intraocular lymphoma (ocular reticulum cell sarcoma) diagnosis and management. *Ophthalmology* 1988;95:625–630.
3. Peterson K, Gordon KB, Heinemann MH, et al. The clinical spectrum of ocular lymphoma. *Cancer* 1993;72:843–849.
4. Shen DF, Zhuang Z, LeHoang P, et al. Utility of microdissection and polymerase chain reaction for the detection of immunoglobulin gene rearrangement and translocation in primary intraocular lymphoma. *Ophthalmology* 1998;105:1664–1669.
5. Miyanaga M, Kiyosawa M, Takase H, et al. Microdissection and gene rearrangement analysis of paraffin-embedded specimens of orbital malignant lymphoma. *Jpn J Ophthalmol* 2004;48:123–127.
6. Yokota M, Takase H, Imai Y, et al. One case of intraocular malignant lymphoma diagnosed by immunoglobulin gene rearrangement and translocation, and IL-10/IL-6 ratio in the vitreous fluid. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc)* 2003;107:287–291.
7. Chan CC, Whitcup SM, Solomon D, et al. Interleukin-10 in the vitreous of patients with primary intraocular lymphoma. *Am J Ophthalmol* 1995;120:671–673.
8. Whitcup SM, Stark-Vancs V, Wittes RE, et al. Association of interleukin 10 in the vitreous and cerebrospinal fluid and primary central nervous system lymphoma. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1157–1160.
9. Coupland SE, Hummel M, Müller HH, et al. Molecular analysis of immunoglobulin genes in primary intraocular lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3507–3514.
10. Merle-Beral H, Davi F, Cassoux N, et al. Biological diagnosis of primary intraocular lymphoma. *Br J Haematol* 2004;124:469–473.
11. Coupland SE, Loddenkemper C, Smith JR, et al. Expression of immunoglobulin transcription factor in primary intraocular lymphoma and primary central nervous system lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3957–3964.
12. Akpek EK, Maca SM, Christen WG, et al. Elevated vitreous interleukin-10 level is not diagnostic of intraocular-central nervous system lymphoma. *Ophthalmology* 1999;106:2291–2295.
13. Zhuang Z, Bertheau P, Emmert-Buck MR, et al. A microdissection technique for archival DNA analysis of specific cell populations in lesions <1 mm in size. *Am J Pathol* 1995;146:620–625.
14. Chhanabhai M, Adomat SA, Gascoyne RD, et al. Clinical utility of heteroduplex analysis of TCR gamma gene rearrangements in the diagnosis of T-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 1997;108:295–301.
15. Ongkosuwito JV, Feron EJ, van Doornik CE, et al. Analysis of immunoregulatory cytokines in ocular fluid samples from patients with uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:2659–2665.
16. Beahring JM, Androudi S, Longtine JJ, et al. Analysis of clonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in ocular lymphoma. *Cancer* 2005;104:591–597.

CLINICAL INVESTIGATION

Prophylactic Vitrectomy for Acute Retinal Necrosis

Tomoka Ishida^{1,2}, Yoshiharu Sugamoto², Sunao Sugita²,
and Manabu Mochizuki²

¹Department of Ophthalmology, Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Disease Center, Komagome Hospital, Tokyo, Japan; ²Department of Ophthalmology and Visual Science, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Abstract

Purpose: To evaluate the efficacy of prophylactic vitrectomy for acute retinal necrosis.

Methods: The clinical charts of 17 patients (18 eyes) with acute retinal necrosis and no retinal break or rhegmatogenous retinal detachment (RRD) were retrospectively analyzed for the efficacy of prophylactic vitrectomy. The retinal necrotic lesions at the initial presentation were classified into three groups according to the lesion site as described by Holland: zone 1 (posterior pole; $n = 3$), zone 2 (midperiphery; $n = 12$), and zone 3 (periphery; $n = 3$). All patients were treated with intravenous antiviral therapy. Three zone 1 eyes and eight zone 2 eyes underwent prophylactic vitrectomy. Four zone 2 eyes and three zone 3 eyes did not receive prophylactic vitrectomy.

Results: All zone 1 eyes developed RRD despite prophylactic vitrectomy. Among the 12 zone 2 eyes, eight of the eyes that underwent prophylactic vitrectomy did not develop RRD, whereas three of the four zone 2 eyes without prophylactic vitrectomy developed RRD. All zone 3 eyes were cured with only antiviral medication.

Conclusions: Prophylactic vitrectomy is effective in preventing the development of RRD in eyes where necrotic lesions do not extend beyond the midperiphery (zone 2). *Jpn J Ophthalmol* 2009;53:486-489
© Japanese Ophthalmological Society 2009

Keywords: acute retinal necrosis, prophylactic vitrectomy, rhegmatogenous retinal detachment

Introduction

Acute retinal necrosis (ARN) is necrotizing vaso-occlusive retinitis caused by the human herpes viruses.¹⁻¹² Although antiviral medication is effective against necrotizing retinitis, ARN may be complicated by the development of rhegmatogenous retinal detachment (RRD), which is a major contributing factor to a poor visual prognosis.^{1,13-19}

Treatment with prophylactic photocoagulation in combination with antiviral medical therapy for ARN has

decreased the incidence of RRD to 0%,²⁰ 17%,²¹ and 35%,²² considerably lower incidences than those in untreated patients (50%–75%).¹ Recently, a case in which prophylactic vitrectomy during ARN effectively prevented the development of RRD was reported.²³

Here, we report the results of prophylactic vitrectomy performed during the inflammatory phase of ARN in conjunction with antiviral treatment compared with antiviral treatment alone.

Subjects and Methods

The records of patients with ARN at Tokyo Medical and Dental University Hospital between January 1998 and September 2006 were studied. Eyes with RRD due to ARN at the initial presentation were excluded from the study. A total of 18 eyes of 17 patients (11 men and 6 women)

Received: September 19, 2008 / Accepted: March 18, 2009

Correspondence and reprint requests to: Yoshiharu Sugamoto, Department of Ophthalmology and Visual Science, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8549, Japan
e-mail: sugamoto@hotmail.com

between the ages of 17 and 81 years (mean age, 49 years) was studied. The follow-up period ranged from 3 to 80 months (mean follow-up, 30 months).

All patients were diagnosed with ARN on the basis of following ocular findings: moderate anterior uveitis with small or medium size mutton-fat keratic precipitates, mild to severe vitreous opacities, optic disc hyperemia, and multiple necrotizing areas of the retina.

An aliquot of aqueous humor from each patient was collected for the diagnosis of pathogenic viruses, conducted using qualitative multiplex polymerase chain reaction (PCR). In those patients who had had vitrectomy, virus loads were examined by real-time PCR. The details of our PCR methods are described elsewhere.²⁴

Immediately after the diagnosis of ARN, our standard antiviral medical treatment, that is, intravenous acyclovir (15 mg/kg, three times daily), oral prednisolone (40 mg daily), and oral aspirin (100 mg daily), was administered. Medical treatment continued for at least 2 months. Beta-methasone sodium phosphate, levofloxacin, tropicamide, and atropine sulfate were also applied topically to the affected eyes.

The eyes were classified according to Holland's classification for cytomegalovirus retinopathy²⁵ according to the site of the retinal necrosis as follows: zone 1, extending to the posterior pole area from the ora serrata, the posterior pole within 3000 μm (about 2 disc diameters) of the fovea (approximately the area enclosed by the major temporal vascular arcades) or 1500 μm from the margins of the optic nerve head ($n = 3$); zone 2, extending anteriorly from zone 1 to the clinical equator of the eye, identified by the anterior borders of the ampullae of the vortex veins ($n = 12$); and zone 3, extending anteriorly from zone 2 to the ora serrata ($n = 3$).

Prophylactic vitrectomy during the active inflammatory phase, based on the progression of the whitish yellow necrotic lesion, was performed in all zone 1 eyes and in eight of the zone 2 eyes in which the necrotic lesions were located very close to zone 1 either at the initial presentation or when the necrotic lesions extended to zone 1 during antiviral medical therapy. The other four zone 2 eyes that had necrotic lesions located farther from zone 1 and all zone 3 eyes were treated with antiviral medication only. In all zone 2 eyes that underwent prophylactic vitrectomy, the lesions remained in zone 2, and in all zone 3 eyes, the lesions remained in zone 3.

Prophylactic vitrectomy was performed with a 20-gauge three-port system, and retrobulbar anesthesia was administered with 2% lidocaine and 0.5% bupivacaine. The perfusate was sterile intraocular irrigating solution (BSS plus, Alcon, Fort Worth, TX, USA) with acyclovir 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and dexamethasone 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Whenever posterior vitreous detachment (PVD) was not present, it was artificially induced by suction with a vitreous cutter. Triamcinolone acetonide was used to visualize the posterior vitreous membrane, and the vitreous base was carefully shaved. After cutting of the vitreous, endolaser photocoagulation was performed 360° around the anterior edge of the healthy retina

before performing the fluid-air exchange. Silicon oil was injected into the vitreous cavity in all cases. An encircling scleral buckling procedure was performed in one eye because a retinal tear was discovered during surgery. Efforts were made to keep the crystalline lenses intact, even if there were mild cataracts. Whenever possible, the silicon oil was removed several months after surgery.

Results

The efficacy of the ARN treatment was evaluated based on the incidence of RRD according to the extent of the necrotizing area at the initial presentation.

Zone 1

Varicella zoster virus was detected in all three eyes of the three patients with necrotic lesions in zone 1. The patients were referred to our clinic within 13 to 16 days after disease onset, and the best-corrected visual acuities (BCVAs) of the three eyes were 0.1, 0.5, and 0.9 (Table 1). Immediately after a clinical diagnosis of ARN was made, antiviral medical therapy was initiated and a prophylactic vitrectomy was performed in all three eyes within a few days. PVD was not present in two eyes before the prophylactic vitrectomy, and an artificial PVD was induced during the surgery. Iatrogenic retinal breaks occurred in one eye during the surgery. RRD developed in all three zone 1 eyes within 2 months after the vitrectomy. Retinal breaks or holes were present at the margin between the healthy retina and necrotic retina in all cases. Final visual acuity ranged from hand motion to 0.04, despite the fact that the RRD was repaired by other vitreo-retinal surgery. Silicon oil could not be removed from any of the eyes.

Zone 2

Among the 12 eyes of 12 patients with necrotic lesions in zone 2, ten were considered to have surgical indications for prophylactic vitrectomy because the necrotizing retinitis was close to zone 1 or the eyes responded poorly to antiviral therapy. Two of these patients refused prophylactic vitrectomy and the remaining eight underwent the procedure. In the other two eyes surgery was not indicated because the necrotic lesions were located away from zone 1 and were not progressive. These eyes were treated with antiviral therapy alone.

Among the eight eyes that underwent prophylactic vitrectomy, PVD was not present in four eyes before the prophylactic vitrectomy and an artificial PVD was induced during surgery. Iatrogenic retinal breaks occurred in two eyes during surgery.

None of the eight eyes in zone 2 that underwent prophylactic vitrectomy developed RRD. In three of these, however, the silicon oil was not removed because the

Table 1. Profile of patients with acute retinal necrosis

Case	Sex	Age	Lesions at initial presentation	Initial BCVA	Virus	Interval between onset and medication (days)	PV	Interval between medication and PV (days)	SO removal	RRD	Interval from onset to RRD (months)	Final BCVA	Follow-up (months)
1	M	40	1	0.1	VZV	14	Yes	0	No	Yes	1	HM	14
2	M	44	1	0.5	VZV	16	Yes	1	No	Yes	1	HM	70
3	F	60	1	0.9	VZV	13	Yes	0	No	Yes	2	0.04	7
4	M	46	2	1	VZV	9	Yes	5	Yes	No		0.5	12
5	F	27	2	0.9	HSV-2	10	Yes	6	Yes	No		0.9	80
6	F	70	2	0.2	VZV	5	Yes	8	Yes	No		0.8	11
7	M	39	2	0.05	HSV-1	3	Yes	9	Yes	No		0.4	20
8	M	16	2	0.3	HSV-2	6	Yes	7	Yes	No		0.3	30
9	M	31	2	0.3	VZV	17	Yes	2	No	No		CF	26
10	M	61	2	0.1	VZV	8	Yes	0	No	No		HM	21
11	F	54	2	HM	VZV	12	Yes	2	No	No		HM	45
12	F	53	2	1.2	VZV	7	No	N/A	N/A	No		0.5	22
13	M	55	2	0.6	VZV	11	No	N/A	N/A	Yes	1	0.08	52
14	M	47	2	0.3	VZV	9	No	N/A	N/A	Yes	4	0.1	67
15	F	81	2	CF	VZV	18	No	N/A	N/A	Yes	4	CF	5
16	M	46	3	1.2	VZV	0	No	N/A	N/A	No		1.5	12
17	M	31	3	0.08	VZV	8	No	N/A	N/A	No		1.2	9
18	M	76	3	0.04	VZV	44	No	N/A	N/A	No		0.4	3

BCVA, best-corrected visual acuity; HM, hand motion; CF, counting fingers; PV, prophylactic vitrectomy; SO, silicone oil; RRD, rhegmatogenous retinal detachment; HSV, herpes simplex virus; VZV, varicella zoster virus; N/A, not applicable because the patients did not undergo vitrectomy.

patients refused further surgery due to very poor vision. At the same time, three of the four eyes in zone 2 treated with antiviral medication alone developed RRD.

The eight eyes in zone 2 treated with prophylactic vitrectomy had BCVA ranging from counting fingers or worse (three eyes) to 0.3 or better (five eyes) (Table 1); only one of four eyes treated with antiviral medication alone had a BCVA of 0.4, the other three having a poor visual prognosis.

Zone 3

Varicella zoster virus was detected in all three eyes of the three patients with necrotic lesions in zone 3. All three were treated only with antiviral medical therapy. The necrotic retinal lesions did not extend into zone 2, and the eyes did not develop RRD and had good visual prognosis (Table 1).

Discussion

ARN is a sight-threatening disease with necrotizing retinitis caused by the human herpes virus. Although the first line of treatment is antiviral medication, RRD in an atrophic retina following necrotizing retinitis is the major cause of visual loss in this disease, and this complication occurs frequently. Therefore, the treatment strategy for ARN is aimed at preventing RRD during the clinical course of the disease. Some studies report that either laser photocoagulation of the normal retina at the margin of necrotizing retinitis^{18,20–22} or prophylactic vitrectomy²³ is effective for

preventing RRD, but the efficacy of these strategies remains controversial.

In the present study, prophylactic vitrectomy performed during the active phase of necrotizing retinitis was effective for preventing RRD in some eyes with ARN. Furthermore, the data indicate that the extent of necrotizing retinitis at the initial presentation can be used as a parameter to predict the development of RRD following prophylactic vitrectomy. Although the patients with zone 1 ARN underwent prophylactic vitrectomy in addition to treatment with antiviral medication, all developed RRD within a couple of months following vitrectomy. On the other hand, none of the eight eyes with ARN in zone 2 that underwent prophylactic vitrectomy developed RRD, whereas three of four eyes with zone 2 ARN treated only with antiviral medication without vitrectomy developed RRD within 2 months following initiation of medical therapy. None of the eyes with zone 3 ARN, all of which were treated with antiviral medication alone, developed RRD. These zone 3 lesions did not extend to zone 2. These findings suggest that prophylactic vitrectomy is effective in preventing the development of RRD in eyes in which necrotizing retinitis is limited to zone 2 at the initial presentation, and ARN limited to zone 3 can be successfully treated with antiviral medication alone. Eyes with ARN extending into zone 1, however, are difficult to treat, and RRD may not be preventable, even with prophylactic vitrectomy.

Although we carefully shaved the peripheral vitreous by pressing on the sclera from the outside with triamcinolone, RRD still occurred in all zone 1 cases within several months following prophylactic vitrectomy, with new breaks at the margin between the necrotic and healthy areas of the retina. We consider that the zone 1 RRD was due to traction

caused by the remaining peripheral vitreous. Whether or not the lens should be removed to adequately withdraw the peripheral vitreous is a matter of controversy. We did not remove the lens to avoid extensive invasion caused by cataract surgery together with vitrectomy during the active inflammatory stage of the disease. When peripheral vitreous remains, another option to avoid the development of RRD is encircling buckle surgery. The zone 1 cases in the present study were not treated by encircling buckle surgery, and all these patients subsequently developed RRD. The present findings suggest that encircling buckle surgery might be a beneficial treatment for zone 1 eyes. More studies are required to determine the best treatment strategy for advanced ARN with necrotizing retinitis extending into zone 1.

Interpretation of the results of the present study is limited by the small number of patients and the fact that this was a retrospective study. The disease is not common, and few patients with new cases with ARN present annually at this clinic; therefore, a multicenter clinical study to evaluate the therapeutic strategy of this sight-threatening disease is warranted.

References

1. Chang S, Young LH. Acute retinal necrosis: an overview. *Int Ophthalmol Clin* 2007;47:145–154.
2. de Boer JH, Luyendijk L, Rothova A, et al. Detection of intraocular antibody production to herpes viruses in acute retinal necrosis syndrome. *Am J Ophthalmol* 1994;117:201–210.
3. Culbertson WW, Blumenkranz MS, Pepose JS, Stewart JA, Curtin VT. Varicella-zoster virus is a cause of the acute retinal necrosis syndrome. *Ophthalmology* 1986;93:559–569.
4. Culbertson WW, Blumenkranz MS, Haines H, Gass DM, Mitchell KB, Norton EW. The acute retinal necrosis syndrome. Part 2. Histopathology and etiology. *Ophthalmology* 1982;89:1317–1325.
5. Van Gelder RN, Willig JL, Holland GN, Kaplan HJ. Herpes simplex virus type 2 as a cause of acute retinal necrosis syndrome in young patients. *Ophthalmology* 2001;108:869–876.
6. Davis JL, Feuer W, Culbertson WW, Pflugfelder SC. Interpretation of intraocular and serum antibody levels in necrotizing retinitis. *Retina* 1995;15:233–240.
7. Freeman WR, Thomas EL, Rao NA, et al. Demonstration of herpes group virus in acute retinal necrosis syndrome. *Am J Ophthalmol* 1986;102:701–709.
8. Pepose JS, Flowers B, Stewart JA, et al. Herpes virus antibody levels in the etiologic diagnosis of the acute retinal necrosis syndrome. *Am J Ophthalmol* 1992;113:248–256.
9. de Boer JH, Verhagen C, Bruinenberg M, et al. Serologic and polymerase chain reaction analysis of intraocular fluids in the diagnosis of infectious uveitis. *Am J Ophthalmol* 1996;121:650–658.
10. Knox CM, Chandler D, Short GA, Margolis TP. Polymerase chain reaction-based assays of vitreous samples for the diagnosis of viral retinitis. *Ophthalmology* 1998;105:37–45.
11. Tran THC, Rozenberg F, Cassoux N, Rao NA, LeHoang P, Bodaghi B. Polymerase chain reaction analysis of aqueous humour samples in necrotising retinitis. *Br J Ophthalmol* 2003;87:79–83.
12. Thompson WS, Culbertson WW, Smiddy WE, Robertson JE, Rosenbaum JT. Acute retinal necrosis caused by reactivation of herpes simplex virus type 2. *Am J Ophthalmol* 1994;118:205–211.
13. Blumenkranz MS, Culbertson WW, Clarkson JG, Dix R. Treatment of the acute retinal necrosis syndrome with intravenous acyclovir. *Ophthalmology* 1986;93:296–300.
14. McDonald HR, Lewis H, Krejger AE, Sidikaro Y, Heckenlively J. Surgical management of retinal detachment associated with the acute retinal necrosis syndrome. *Br J Ophthalmol* 1991;75:455–458.
15. Matsuo T. Vitrectomy and silicone oil tamponade as an initial surgery for retinal detachment after acute retinal necrosis syndrome. *Ocul Immunol Inflamm* 2005;13:91–94.
16. Clarkson JG, Blumenkranz MS, Culbertson WW, Flynn HW Jr, Lewis ML. Retinal detachment following the acute retinal necrosis syndrome. *Ophthalmology* 1984;91:1665–1668.
17. Ahmadi H, Soheilian M, Azarmina M, Dehghan MH, Mashayekhi A. Surgical management of retinal detachment secondary to acute retinal necrosis: clinical features, surgical techniques, and long-term results. *Jpn J Ophthalmol* 2003;47:484–491.
18. Crapotta JA, Freeman WR, Feldman RM, et al. Visual outcome in acute retinal necrosis. *Retina* 1993;13:208–213.
19. Blumenkranz M, Clarkson J, Culbertson WW, Flynn HW, Lewis ML, Young GA. Vitrectomy for retinal detachment associated with acute retinal necrosis. *Am J Ophthalmol* 1988;106:426–429.
20. Han DP, Lewis H, Williams GA, Mieler WF, Abrams GW, Aaberg TM. Laser photocoagulation in the acute retinal necrosis syndrome. *Arch Ophthalmol* 1987;105:1051–1054.
21. Sternberg P Jr, Han DP, Yeo JH, et al. Photocoagulation to prevent retinal detachment in acute retinal necrosis. *Ophthalmology* 1988;95:1389–1393.
22. Lau CH, Missotten T, Salzmann J, Lightman SL. Acute retinal necrosis features, management, and outcomes. *Ophthalmology* 2007;114:756–762.
23. Berker N, Ozdal P, Batman C, Soykan E. Prophylactic vitrectomy in acute retinal necrosis syndrome. *Eye* 2007;21:104–106.
24. 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* 2008;92:928–932.
25. Holland GN, Buhles WC Jr, Mastre B, Kaplan HJ. A controlled retrospective study of ganciclovir treatment for cytomegalovirus retinopathy. Use of a standardized system for the assessment of disease outcome. *Arch Ophthalmol* 1989;107:1759–1766.

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¹⁻³⁾。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⁴⁾。

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⁵⁾。

●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

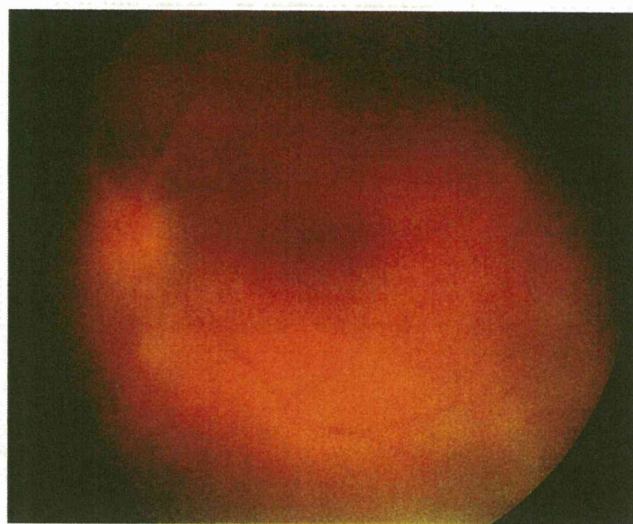


図 1 特徴的なベール状硝子体混濁所見
組織破壊はあまりなく、眼底は比較的きれいなことが多い。
本症例は網膜血管炎がみられていた。

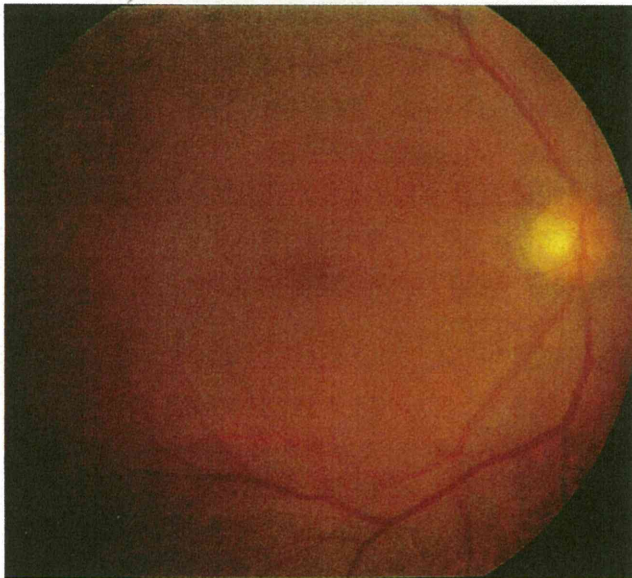


図2 びまん性硝子体混濁所見

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 1.2×10^6 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 I (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

(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¹⁻³⁾。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 T_m 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

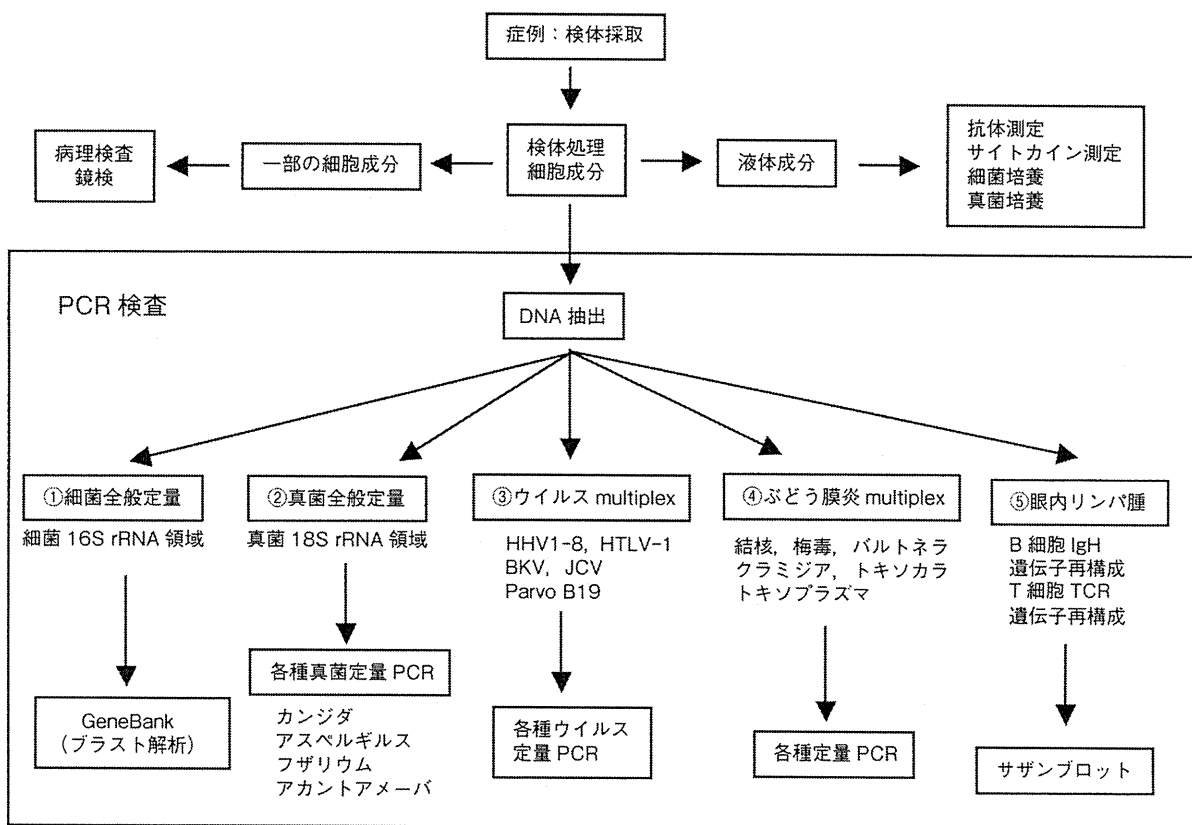


図1 眼炎症性疾患に対する網羅的PCR診断システムの検査の流れ

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リボソームRNA領域)を行います。このPCR陽性検体は、16SリボソームRNA領域を増幅させて、直接シーケンスして、その結果をGeneBankでプラスト解析を行い、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リボソーム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cant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すると、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勞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…

鹿児島大学医学部眼科 坂本泰二

☆

☆

☆

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 (内眼炎) 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¹⁻⁴⁾。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

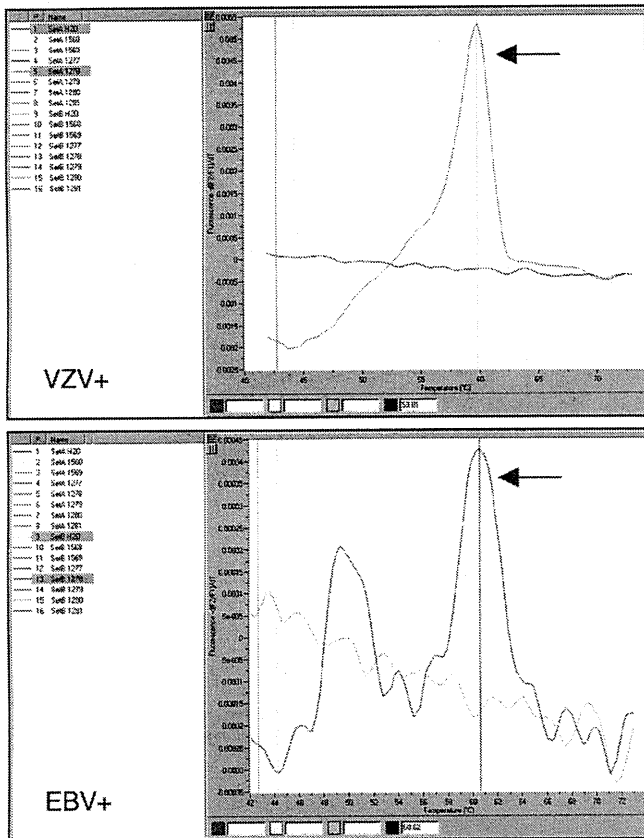


図1 マルチプレックスPCR検査結果

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ーブの混合液と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ー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¹⁻⁴⁾。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ー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ーブの混合液とPCR

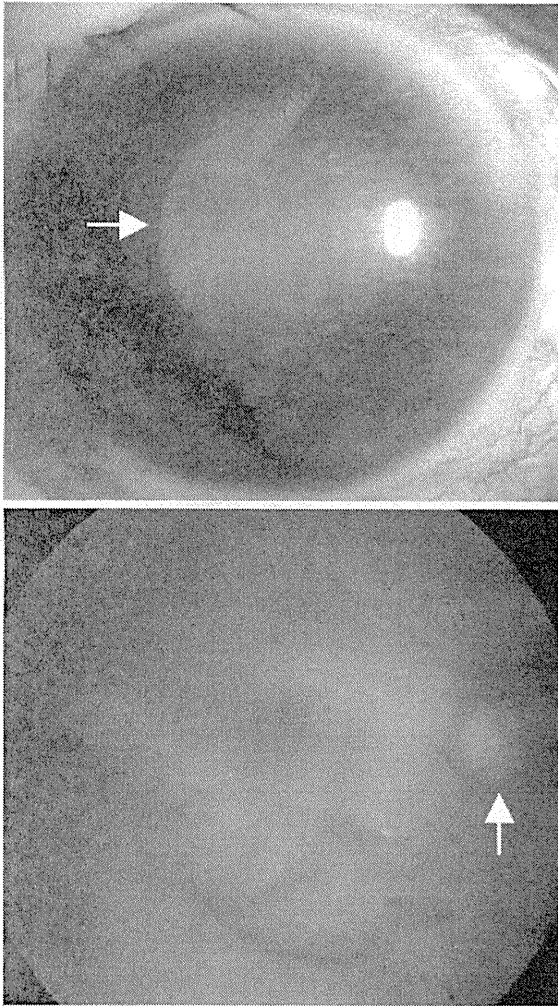


図2 眼内検体を用いてPCRを施行した代表症例写真
スリット検査で、図のような麻痺性散瞳(矢印, 上写真)があった。その他色素を含む豚脂様角膜後面沈着物, びまん性角膜浮腫, 前房出血がみられていた。眼底は硝子体混濁のため視神経乳頭(矢印, 下写真)がぼんやりと見えるほど透視不良であった。初診時の採取した前房水からVZV-DNAおよびEBV-DNAも同定され, 抗ウイルス剤の内服と眼軟膏, ステロイド点眼でやがて消炎した。

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。

前房水のマルチプレックスPCRで, VZV(水痘・帯

状ヘルペスウイルス)-DNAが検出された(図1)。また同検体からEBV(Epstein-Barrウイルス)-DNAも同定されていた(図1)。その他HSV1, HSV2, CMV, HHV6, HHV7, HHV8-DNAはすべて陰性であった。

④ リアルタイム定量PCR検査および経過

上記ウイルスのスクリーニング検査でVZV-DNAおよびEBV-DNAが陽性だったので, この2つのウイルスのリアルタイム定量PCR検査を行った。その結果, VZV-DNAが 1.1×10^8 copies/ml, EBV-DNAが 1.7×10^3 copies/mlといずれも高コピー数が検出されていた。特に, VZVのコピー数がきわめて高くVZVが主要ウイルスと考えられた。

この2つのPCR検査結果よりVZV関連ぶどう膜炎と診断し, 治療にバラシクロビル内服, ゴピラックス眼軟膏とデキサメタゾン点眼を用いた。3週後にはほぼ消炎したが, 内服中止可能かの判定のため再度前房水を採取し, リアルタイム定量PCRを行った。両ウイルスともDNAが検出限界以下(50 copies/ml)になっていたため, 治療を中止した。その後, 麻痺性散瞳と虹彩萎縮が残るも再発もなく経過良好である。

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
- 4) Kido S, Sugita S, Horie 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

* * *