

本研究においては、まず平成 23 年度の研究で急性網膜壊死の診療に豊富な経験を有する研究班員の意見を合わせる事により「急性網膜壊死の診断基準（案）」を作成した。次に、この診断基準（案）の妥当性を検証するために、平成 24 年度には研究班員の所属 7 施設における後ろ向き調査研究を施行し、その結果を基に診断基準（案）の改訂を行った。その結果、「急性網膜壊死の診断基準」最終案は、感度 91.0%、特異度 100%、PPV 100%、NPV 99.0%という高い診断パラメータを持つものとなった。

今回これを用いて全国 40 施設が参加する後ろ向き全国調査研究を行い、本診断基準の妥当性に関する更なる検討を行った結果、本診断基準の全国調査における診断パラメータは、感度は 80.0%、特異度は 100%、PPV 100%、NPV 93.0%となった。この結果は研究班員の所属 7 施設のみで行った調査と比べて感度が約 10%低いものであった。ここで本診断基準を満たさなかった症例について解析すると、その大部分が網膜病変に関する初期臨床所見項目と経過項目を満たしていない事が分かった。この中には、PCR が陽性である事に加え、網膜病変以外の項目の多くを満たす症例も多く含まれており、これらは臨床的に急性網膜壊死として診断されるべきであると考えられた。このような症例の存在は、今後、本診断基準に対する更なる改訂の必要性を示すものと言える。

全国調査研究の中で施行した治療内容に関する調査では、大多数の症例で、単純ヘルペスウイルスや水痘帯状疱疹ウイルスに感受性の高い、アシクロビルの点滴またはバラシクロビルの内服と、それに加えてステロイドの全身投与が行われており、これが現在の急性網膜壊死に対する標準的治療である事が確認された。また、硝子体手術は 82.9%の症例で施行されており、これも急性網膜壊死の治療の一環として広く行われている事が明らかとなった。しかし、硝子体手術の適切な施行時期およびその方法には未だ議論の余地が多く残されており、今後の研究課題であると言える。

E. 結論

急性網膜壊死の診断基準を作成、改訂した。後ろ向き全国調査研究により、本診断基準は妥当性の高いものである事が示された。現在、本診断基準に基づき治療指針を作成中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 高瀬博、大黒伸行、岡田アナベルあやめ、後藤浩、園田康平、富田誠、南場研一、水木信久、

望月学. 急性網膜壊死のあたらしい診断基準の作成. 日眼会誌. 2013;117:935.

2. 学会発表

- 1) 高瀬博、大黒伸行、岡田アナベルあやめ、後藤浩、園田康平、富田誠、南場研一、水木信久、望月学. 急性網膜壊死の診断基準の作成. 第47回日本眼炎症学会,大阪,2013.7.13.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

急性網膜壊死の診断基準に関する調査研究

研究分担者 山口大学大学院医学系研究科 眼科学 教授 園田 康平

研究要旨：感染性ぶどう膜炎の一つである急性網膜壊死は、免疫健全者の網膜に壊死病巣が生じ、急速に進行する極めて予後不良な疾患である。その原因には単純ヘルペスウイルスと水痘帯状疱疹ウイルスが知られている。我々はこれまでに「急性網膜壊死の診断基準」を作成、改訂し、その妥当性を検証した。今年度は、全国の大学病院および基幹病院を対象とした全国調査を行った。その結果、「急性網膜壊死の診断基準」の診断パラメータは、感度は79.0%、特異度は100%、PPV 100%、NPV 93.0%となった。これは研究班員の所属7施設のみで行った調査と比べて感度が約10%低い結果であり、将来の改訂のために更なる解析が必要であると考えられた。また、治療内容に関する調査では、大多数の症例でアシクロビルの点滴またはバラシクロビルの内服、それに加えてステロイドの全身投与が行われており、これが現在の急性網膜壊死に対する標準的治療である事が確認された。今後、急性網膜壊死の治療指針を作成、啓蒙を行う予定である。

A. 研究目的

急性網膜壊死は免疫健全者の網膜に壊死病巣が生じ、急速に進行して続発性網膜剥離や視神経萎縮をきたし失明する極めて予後不良な疾患で、ヒトヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルス1型・2型、水痘帯状疱疹ウイルス)の眼内感染が原因と考えられている。本疾患はぶどう膜炎患者全体のわずか1%前後の極めて稀な疾患とされるがその実態の詳細は不明である。早期診断、早期治療が必要であるが、未だ診断基準がなく、発病早期における正確な診断と適切な治療がなされずに失明に至る症例が非常に多い。本研究は、我が国における急性網膜壊死の実態調査と治療指針作成に向けて基盤となる診断基準を作成するための多施設協同研究である。平成23年度から平成25年度までの3年間に厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業の助成を受けて、平成23年度には研究組織を作り研究会議を開催して急性網膜壊死の診断基準の骨子を作成した。平成24年度には診断基準の妥当性を検討する事を目的に研究班員の所属施設における急性網膜壊死の後ろ向き調査を行い、それに基づき診断基準の改定を行った。平成25年度は、最終的な診断基準を用いて本疾患の患者数、治療内容、予後について全国規模の後ろ向き調査研究を行った。これにより急性網膜壊死の我が国における実態を明らかにし、治療指針の骨子を作成中である。

B. 研究方法

本調査研究のモニタリング・監査・データマネジメントのため、まず山口大学倫理委員会に研究の安全性と倫理性の審査を申請し承認を得て、次に共同研究を行なう各研究施設の倫理委員会審査

を受けて開始した。

今年度は、平成23年度に作成・平成24年度に改訂した急性網膜壊死の診断基準(表1)に基づいて、全国大学病院眼科を対象に後ろ向き調査研究を行った。調査内容には、急性網膜壊死の診断基準に合致し急性網膜壊死の確定診断群または臨床診断群に分類された患者数、それらの患者について診断基準に挙げられている眼所見6項目、経過5項目、検査2項目の合致の有無に加え、それぞれの患者の視力予後、急性網膜壊死に対する各施設の治療内容を含む。

表 1. 急性網膜壊死の診断基準

<診断基準の考え方>

初期眼所見項目、経過項目、検査項目を総合して診断する。初期眼所見項目の1aと1bを認めた場合には急性網膜壊死を強く疑い、必要な検査と治療を開始することが望ましい。その後の経過と検査結果に基づいて診断を確定する。急性網膜壊死は免疫健全人に発症する疾患であるが、免疫不全の背景を有する患者においては、以下に限らない多彩な眼所見を呈する事に留意する。

1. 初期眼所見項目
 - 1a. 前房細胞または豚脂様角膜後面沈着物がある
 - 1b. 一つまたは複数の網膜黄白色病変（初期は顆粒状・斑状、次第に癒合して境界明瞭となる）が周辺部網膜に存在する
 - 1c. 網膜動脈炎が存在する
 - 1d. 視神経乳頭発赤がある
 - 1e. 炎症による硝子体混濁がある
 - 1f. 眼圧上昇がある
2. 経過項目
 - 2a. 病巣は急速に円周方向に拡大する
 - 2b. 網膜裂孔、網膜剥離を生じる
 - 2c. 網膜血管閉塞を生じる
 - 2d. 視神経萎縮を来す
 - 2e. 抗ヘルペスウイルス薬に反応する
3. 眼内液検査 前房水または硝子体液を用いた検査（PCR法あるいは抗体率算出など）で、HSV-1、HSV-2、VZVのいずれかが陽性
4. 分類
 - (1) 確定診断群：1. 初期眼所見項目のうち1aと1b、および2. 経過項目のうち1項目を認め、かつ3. 眼内液検査でHSVまたはVZVが病因と同定されたもの
 - (2) 臨床診断群：眼内液においてウイルスの関与を証明出来ない、あるいは検査未施行であるが、初期眼所見項目のうち1aと1bを含む4項目と経過項目のうち2項目を認め、他疾患を除外できるもの。

急性網膜壊死の診断基準には、眼内液を用いてヒトヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルス1型、2型、水痘帯状疱疹ウイルス)のDNAを検査するシステムを診断に取り入れる。DNA検査には、ヒトヘルペスウイルスを網羅的に検出する定性マルチプレックスPCRと、ウイルス量を測定する定量リアルタイムPCRを組み合わせて行う。

この後ろ向き調査研究の結果を用いて、本邦における急性網膜壊死の実態として報告するとともに、現在行われている治療内容についての共通のコンセンサスを確立し、治療指針を作成する。(倫理面への配慮)

山口大学医学部附属病院倫理審査委員会に研究の安全性と倫理性的の審査を申請し、承認を得たのちに各研究施設の倫理審査委員会による審査を受けた。

C. 研究結果

全国調査研究には、研究班員の所属する7施設に加えて、全国34の大学病院および基幹病院(表2)

表2. 全国調査参加施設一覧

東京医科歯科大学
北海道大学大学院
山形大学医学部
東北大学大学院医学系研究科
福島県立医科大学
群馬大学大学院医学系研究科
獨協医科大学
筑波大学医学医療系
防衛医科大学校
千葉大学大学院医学研究院
東京大学大学院
東京医科大学
東京慈恵会医科大学
昭和大学医学部
東邦大学医療センター
杏林大学医学部
横浜市立大学
横浜市立大学
新潟大学大学院
松本歯科大学
岐阜大学大学院
名古屋大学大学院医学系研究科
三重大学大学院医学系研究科
滋賀医科大学
京都府立医科大学
大阪大学大学院医学系研究科
川崎医科大学
広島大学大学院
山口大学大学院医学系研究科
徳島大学大学院
高知大学医学部
九州大学大学院
福岡大学医学部
福岡歯科大学
久留米大学医学部
大分大学医学部
鹿児島大学大学院
(医)明德会 総合新川橋病院眼科
大阪厚生年金病院
東京厚生年金病院 眼科
(医)誠明会 永田眼科

が参加した。これらの施設で調査対象となった急性網膜壊死患者は、101名だった。これを前年度に行った後ろ向き調査研究結果に加え、急性網膜壊死患者148名、対照疾患患者409名(表3)として、これらの臨床所見のデータから「急性網膜壊死の診断基準」の診断パラメータを算出した。その結果、感度は80.0%、特異度は100%、PPV 100%、NPV 93.0%となり、感度は約8割と7施設での検討に比べて低下したものの高い診断パラメータを示し、本診断基準が妥当なものである事が示された。(表4)各施設で急性網膜壊死と診断したものの本診断基準に合致しなかった症例は、そのほとんどで網膜病変が診断基準と不一致であった事に起因していた。また、硝子体混濁が強いために眼底の観察ができなかったもの、

表3. 全国調査研究における疾患内訳

診断名	患者数	男性:女性
急性網膜壊死	148	86:62
対照疾患	(409)	(221:188)
サイトメガロウイルス網膜炎	32	16:6
サルコイドーシス	135	38:97
眼トキソプラズマ症	48	31:17
ベーチェット病	111	81:30
結核	30	19:11
梅毒	5	5:0
眼内リンパ腫	48	31:17
計	454	246:208

前房や角膜に全く炎症所見がみられなかったものなども診断基準を見たとさなかった。

今回の全国調査では、各施設における急性網膜壊死の治療法についても調査を行った。その結果、アシクロビルの点滴が83.6%、バラシクロビルの内服が77.1%、ステロイドの全身投与が94.3%の症例で施行され、これらが急性網膜壊死に対する治療の主流である事が明らかとなった。また、アスピリン内服は65.7%で行われた。少数に対する治療例としては、アシクロビルやガンシクロビルの硝子体注射は5.7%で施行され、またガンシクロビル点滴が2.1%、バルガンシクロビルの内服が1.4%で行われた。硝子体手術は、全体の84.3%で施行された。これらの結果を基に、急性網膜壊死の治療ガイドラインを現在作成中である。

表4. 全国調査における急性網膜壊死の診断パラメータ

	診断基準との合致の有無		計
	合致あり (確定:臨床)	合致なし	
急性網膜壊死	118 (110:8)	30	148
対照疾患	0	409	409
計	118	439	557

D. 考察

急性網膜壊死は、主に免疫健全者の眼内において、単純ヘルペスウイルスまたは水痘帯状疱疹ウイルスの網膜感染を生じる疾患であり、その予後は極めて不良である。その治療法に確固たるものは未だ確立されておらず、早期発見と早期の治療開始が唯一、急性網膜壊死の予後を向上させる因子となりえる。本研究は、我が国における急性網膜壊死の実態調査と治療ガイドライン作成に向けて、その基盤となる診断基準を作成することを目的として行われた。

本研究においては、まず平成 23 年度の研究で急性網膜壊死の診療に豊富な経験を有する研究班員の意見を合わせる事により「急性網膜壊死の診断基準(案)」を作成した。次に、この診断基準(案)の妥当性を検証するために、平成 24 年度には研究班員の所属 7 施設における後ろ向き調査研究を施行し、その結果を基に診断基準(案)の改訂を行った。その結果、「急性網膜壊死の診断基準」最終案は、感度 91.0%、特異度 100%、PPV 100%、NPV 99.0%という高い診断パラメータを持つものとなった。

今回これを用いて全国 41 施設が参加する後ろ向き全国調査研究を行い、本診断基準の妥当性に関する更なる検討を行った結果、本診断基準の全国調査における診断パラメータは、感度は 80.0%、特異度は 100%、PPV 100%、NPV 93.0%となった。この結果は研究班員の所属 7 施設のみで行った調査と比べて感度が約 10%低いものであった。ここで本診断基準を満たさなかった症例について解析すると、その大部分が網膜病変に関する初期臨床所見項目と経過項目を満たしていない事が分かった。この中には、PCR が陽性である事に加え、網膜病変以外の項目の多くを満たす症例も多く含まれており、これらは臨床的に急性網膜壊死として診断されるべきであると考えられた。このような症例の存在は、今後、本診断基準に対する更なる改訂の必要性を示すものと言える。

全国調査研究の中で施行した治療内容に関する調査では、大多数の症例で、単純ヘルペスウイルスや水痘帯状疱疹ウイルスに感受性の高い、アシクロビルの点滴またはバラシクロビルの内服と、それに加えてステロイドの全身投与が行われており、これが現在の急性網膜壊死に対する標準的治療である事が確認された。また、硝子体手術は 82.9%の症例で施行されており、これも急性網膜壊死の治療の一環として広く行われている事が明らかとなった。しかし、硝子体手術の適切な施行時期およびその方法には未だ議論の余地が多く残されており、今後の研究課題であると言える。

E. 結論

急性網膜壊死の診断基準を作成、改訂した。後ろ向き全国調査研究により、本診断基準は妥当性の高いものである事が示された。現在、本診断基準に基づき治療指針を作成中である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 園田康平. 免疫と眼疾患. アレルギーの臨床. 2013

;33(3):13

- 2) 園田康平. 後部・汎ぶどう膜炎. Monthly Book OCULISTA. 2013;5(8):46-56
- 3) 園田康平、吉田倫子、近藤峰生. ヒト、マウスの網膜色素変性症における眼内炎症反応. Retina Medicine. 2013;2(2):83-90
- 4) Sugita S, Ogawa M, Shimizu N, Morio T, Ohguro N, Nakai K, Maruyama K, Nagata K, Takeda A, Usui Y, Sonoda KH, Takeuchi M, Mochizuki M. Use of a comprehensive polymerase chain reaction system for diagnosis of ocular infectious diseases. Ophthalmology. 2013;120(9):1761-8
- 5) Kimura K, Morita Y, Orita T, Haruta J, Takeji Y, Sonoda KH. Protection of human corneal epithelial cells from TNF- α -induced disruption of barrier function by rebamipide. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013;54(4):2752-60
- 6) Hasegawa E, Sonoda KH, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Oshima Y, Takeda A, Yoshimura T, Yoshida S, Ishibashi T, Yoshimura A. IL-23-independent induction of IL-17 from $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells promotes experimental intraocular neovascularization. J Immunol. 2013;190(4):1778-87
- 7) Zhang H, Yang Y, Takeda A, Yoshimura T, Oshima Y, Sonoda KH, Ishibashi T. A Novel Platelet-Activating Factor Receptor Antagonist Inhibits Choroidal Neovascularization and Subretinal Fibrosis. PLoS One. 2013;8(6):e68173
- 8) Morita Y, Kimura K, Fujitsu Y, Enomoto A, Ueno S, Kondo M, Sonoda KH. Autoantibodies against TRPM1 in Japanese Patient with Melanoma-associated Retinopathy. Jpn J Ophthalmol. 2013
- 9) Kaburaki T, Namba K, Sonoda KH, Kezuka T, Keino H, Fukuhara T, Kamoi K, Nakai K, Mizuki N, Ohguro N and the Ocular Behçet Disease Research Group of Japan. Behçet's disease ocular attack score 24: Evaluation of ocular disease activity before and after initiation of infliximab. Jpn J Ophthalmol. 2014 in press.
- 10) Takeda A, Sonoda KH, Ishibashi T. Regulation of Th1 and Th17 cell differentiation in uveitis. Inflamm Regen. 2013
- 11) Takeda A, Yoshimura T, Oshima Y, Sonoda KH, Ishibashi T. IL-10 is significantly involved in HSP70-regulation of experimental sub retinal fibrosis. PLoS One. 2013;8(12):e80288

2. 学会発表

- 1) 園田康平. ぶどう膜炎：ぶどう膜炎診療の進歩. 第 117 回日本眼科学会総会, 東京都, 2013.4.7.

- 2)園田康平. ぶどう膜炎治療の進歩. 第 117 回日本眼科学会総会,東京都,2013.4.7.
- 3)園田康平. ぶどう膜炎の診断の進歩. 第 117 回日本眼科学会総会,東京都,2013.4.7.
- 4)園田康平. ぶどう膜炎診療の実際. 第 119 回長崎県眼科集談会,長崎県,2013.4.21.
- 5)園田康平. ぶどう膜炎の実践治療. 第 6 回北海道眼科医会臨床懇話会,北海道,2013.5.11
- 6)園田康平. ぶどう膜炎治療の進歩. 5th Eye Center Summit,東京都,2013.6.1.
- 7)園田康平. 眼炎症疾患のマネージメント. 第 9 回大阪角膜フォーラム,大阪府,2013.6.22.
- 8)園田康平. 小児全身炎症疾患と眼. 周南小児科医学会学術講演会,山口県,2013.7.4.
- 9)高瀬博、大黒伸行、岡田アナベルあやめ、後藤浩、園田康平、富田誠、南場研一、水木信久、望月學. 急性網膜壊死の診断基準の作成. 第 47 回日本眼炎症学会,大阪府,2013.7.13.
- 10)能美典正、折田朋子、藤津揚一朗、木村和博、園田康平. 成人 T 細胞白血病に対する化学療法後に両眼のサイトメガロウイルス網膜炎を生じた 1 例. 第 47 回日本眼炎症学会,大阪府,2013.7.13.
- 11) 園田康平. ぶどう糖炎診療の実際. 第 21 回とやま眼科学術講演会・富山大学研究会,富山県,2013.7.20.
- 12)園田康平. ぶどう膜の実際の診療. ファイザー眼科若手医師セミナー in 中国～7part Series～,山口県,2013.7.26.
- 13)園田康平. 難治性ぶどう膜に対する挑戦. 第 395 回大阪眼科集談会,大阪府,2013.8.3.
- 14) 園田康平. 生理/病理・「IL-27 と網膜疾患」. Japan Macula Club,愛知県,2013.8.18.
- 15) 園田康平. ベーシックぶどう膜診療. 第 31 回道北眼科集談会,北海道,2013.8.31.
- 16) 園田康平. 外因性ぶどう膜炎:最近の治療方針. 第 33 回日本眼薬理学会,東京都,2013.9.21.
- 17)園田康平. 全身病と眼. アルコン社内研修,山口県,2013.10.17.
- 18)園田康平. インストラクションコース 1 実践!ぶどう膜炎症例のプライマリーケア. 第 67 回日本臨床眼科学会,神奈川県,2013.10.31.
- 19) 波多野誠、原田大輔、畑辺なな実、寺西慎一郎、木村和博、園田康平. ステロイド全身投与が奏功した ANCA 陽性強膜炎の 1 例. 山口県リウマチ・膠原病(YRC)研究会,山口県,2013.11.20.
- 20)園田康平. ぶどう膜炎の実践診療. 第 49 回北里大学・神奈川県眼科医会 合同リサーチカンファ,神奈川県,2013.11.26.
- 21) 園田康平. 合同シンポジウム 2 講演「Human Immunology:疾患理解から治療へ」ぶどう膜炎の病態と新規治療. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会 合同シンポジウム 2 講演,山口県,2013.11.28.
- 22)永井智彦、佐古田幸美、玉田耕治、園田康平. B7-H1

ノックアウトマウスにおける実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎. 第 122 回山口県眼科医会秋季総会,山口県,2013.12.1.

- 23)園田康平. ぶどう膜炎治療の実際. 第 61 回川崎医科大学眼科学術会,岡山県,2013.12.15.
- 24) 園田康平. ぶどう膜炎治療の実際. 第 24 回兵庫臨床眼科研究会,兵庫県,2014.1.11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

急性網膜壊死の診断基準に関する調査研究

研究分担者 北海道大学 眼科 講師 南場 研一

研究要旨：急性網膜壊死は早期診断、早期治療が重要な疾患である。我々はこれまでに急性網膜壊死に関する知識と経験が豊富な眼科医の意見を取りまとめ、急性網膜壊死診断基準（案）を作成し、その妥当性について検証をおこなった。今年度は、全国の大学病院および基幹病院を対象とした全国調査を行い、急性網膜壊死の診断基準の感度、特異度に関する検討をおこなった。今後、急性網膜壊死の治療指針を作成する予定である。

A. 研究目的

急性網膜壊死は眼疾患の中でも視力予後が悪く、特に早期診断、早期治療が重要な疾患である。本研究では多施設協同研究を組織し、我が国における急性網膜壊死の実態調査と治療指針作成に向けて、急性網膜壊死の標準的な診断基準を明確にする。平成24年度までに研究班員の所属施設における急性網膜壊死の後ろ向き調査を行い、それに基づき診断基準を作成した。平成25年度は、その診断基準の妥当性について検証することを目的に全国規模の後ろ向き調査研究を行った。

B. 研究方法

平成24年度までに作成した急性網膜壊死の診断基準（表1）に基づいて、全国大学病院眼科を対象に後ろ向き調査研究を行った。急性網膜壊死の他、その対照としてサルコイドーシス、ベーチェット病、サイトメガロウイルス網膜炎、眼トキソプラズマ症など後部ぶどう膜炎を伴う疾患について検討した。調査内容は、眼所見および眼内液検査に基づく診断基準の合致率である。

（倫理面への配慮）

当院の自主臨床研究審査委員会にて承認を得て実施している。

表 1. 急性網膜壊死の診断基準

<診断基準の考え方>

初期眼所見項目、経過項目、検査項目を総合して診断する。初期眼所見項目の1aと1bを認めた場合には急性網膜壊死を強く疑い、必要な検査と治療を開始することが望ましい。その後の経過と検査結果に基づいて診断を確定する。急性網膜壊死は免疫健全人に発症する疾患であるが、免疫不全の背景を有する患者においては、以下に限らない多彩な眼所見を呈する事に留意する。

1. 初期眼所見項目
 - 1a. 前房細胞または豚脂様角膜後面沈着物がある
 - 1b. 一つまたは複数の網膜黄白色病変（初期は顆粒状・斑状、次第に癒合して境界明瞭となる）が周辺部網膜に存在する
 - 1c. 網膜動脈炎が存在する
 - 1d. 視神経乳頭発赤がある
 - 1e. 炎症による硝子体混濁がある
 - 1f. 眼圧上昇がある
2. 経過項目
 - 2a. 病巣は急速に円周方向に拡大する
 - 2b. 網膜裂孔、網膜剥離を生じる
 - 2c. 網膜血管閉塞を生じる
 - 2d. 視神経萎縮を来す
 - 2e. 抗ヘルペスウイルス薬に反応する
3. 眼内液検査 前房水または硝子体液を用いた検査（PCR法あるいは抗体率算出など）で、HSV-1、HSV-2、VZVのいずれかが陽性
4. 分類
 - （1）確定診断群：1. 初期眼所見項目のうち1aと1b、および2. 経過項目のうち1項目を認め、かつ3. 眼内液検査でHSVまたはVZVが病因と同定されたもの
 - （2）臨床診断群：眼内液においてウイルスの関与を証明出来ない、あるいは検査未施行であるが、初期眼所見項目のうち1aと1bを含む4項目と経過項目のうち2項目を認め、他疾患を除外できるもの。

C. 研究結果

全国34の大学病院および基幹病院から回答を得た。調査対象となった急性網膜壊死患者は研究班員の所属施設の患者と合わせて148名、サルコイドーシス、ベーチェット病、サイトメガロウイルス網膜炎、眼トキソプラズマ症など後部ぶどう膜炎を伴う対照疾

患患者は409名であった。我々の作成した「急性網膜壊死の診断基準」との合致率について検討した結果、感度は80.0%、特異度は100%、PPV 100%、NPV 93.0%であり、本診断基準が妥当なものである事が示された。

D. 考察

これまでの調査研究により我々の作成した診断基準が妥当なものであることが確認された。今後はこれらの結果に基づき新たな急性網膜壊死の治療ガイドラインを作成する予定である。

E. 結論

急性網膜壊死の診断基準を作成し、それが妥当性について検証された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takemoto Y, Namba K, Mizuuchi K, Ohno S, Ishida S. Two cases of subfoveal choroidal neovascularization with tubulointerstitial nephritis and uveitis (TINU) syndrome. *Eur J Ophthalmol.* 2013; 23: 255-257
- 2) Mizuuchi K, Kitaichi N, Namba K, Horie Y, Ishida S, Ohno S. Trabecular meshwork depigmentation in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Jpn J Ophthalmol.* 2013; 57: 245-251
- 3) Jin XH, Namba K, Saito W, Iwata D, Ishida S. Bacterial endophthalmitis caused by an intraocular cilium in a patient under treatment with infliximab. *J Ophthalmic Inflamm and Infect.* 2013; 3:50
- 4) Iwahashi -Shima C, Azumi A, Ohguro N, Okada A. A, Kaburaki T, Goto H, Sonoda K, Namba K, Mizuki N, Mochizuki M. Acute retinal necrosis:

factors associated with anatomic and visual outcomes. *Jpn J Ophthalmol.* 2013; 57: 98-103

- 5) Kase S, Namba K, Kitaichi N, Iwata D, Ohno S, Ishida S. Clinical features of human T lymphotropic virus type-1 associated uveitis in Hokkaido, Japan. *Jpn J Ophthalmol.* 2013; 57: 379-384
- ##### 2. 学会発表
- 1) Namba K. Subclinical impairment of choroidal circulation in the patients with anterior segment recurrence of VKH disease. International Workshop on Granulomatous Uveitis and Ocular Behcet's disease and Asia-Pacific Intraocular Inflammation Study Group: Kaohsiung, Taiwan. 2013/4/13
 - 2) Hase K, Namba K, Saito W, Takemoto Y, Mizuuchi K, Ohno S, Ishida S. A Case of tuberculous endophthalmitis. International Workshop on Granulomatous Uveitis and Ocular Behcet's disease and Asia-Pacific Intraocular Inflammation Study Group: Kaohsiung, Taiwan; 2013/4/12-14
 - 3) Shinmei Y, Chin S, Yamamoto M, Nitta T, Namba K, Ohno S, Ishida S. Outcome of a modified 360-degree trabeculotomy for uveitic glaucoma with peripheral anterior synechiae. International Workshop on Granulomatous Uveitis and Ocular Behcet's disease and Asia-Pacific Intraocular Inflammation Study Group: Kaohsiung, Taiwan; 2013/4/12-14
 - 4) 宇野友絵、南場研一、齋藤 航、水内一臣、福原崇子、田川義晃、石田 晋. ぶどう膜炎を合併した急性帯状潜在性網膜外層症の1例. 第67回臨床眼科学会、横浜、2013/10/31-11/3
 - 5) 水内一臣、南場研一、齋藤 航、堀江幸弘、田川義晃、宇野友絵、竹本裕子、福原崇子、北市伸義、石田 晋. ぶどう膜炎に続発した血管増殖性網膜腫瘍の2症例. 第67回臨床眼科学会、横浜、2013/10/31-11/3
 - 6) 南場研一、北市伸義、安藤 亮、竹本裕子、水内一臣、堀江幸弘、大野重昭、天野麻穂、西村紳一

郎、石田 晋. ぶどう膜炎における網羅的糖差解析. 第117回 日本眼科学会、東京、2013/4/4-7

- 7) 水内一臣、竹本裕子、南場研一、宇野友絵、大野重昭、石田 晋. ベーチェット病眼炎症発作とインフリキシマブトラフ値・サイトカイン血中濃度との相関. 第117回 日本眼科学会、東京、2013/4/4-7

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

和文著書・総説

1. 南場研一. Behcet病. 「ぶどう膜炎」. 眼科疾患最新の治療2013-2015. 243, 2013
2. 南場研一. 内因性ぶどう膜炎の診断と治療. 「特集 アレルギーと眼疾患-診断と治療-」. アレルギーの臨床 33: 35-39, 2013
3. 南場研一、水内一臣. 小児ぶどう膜炎. 特集ぶどう膜炎 外来診療. Monthly Book OCULIST A 5: 65-68, 2013

急性網膜壊死の診断基準に関する調査研究

研究分担者 東京医科歯科大学 臨床試験管理センター 特任准教授 富田 誠

研究要旨：急性網膜壊死は、単純ヘルペスウイルスまたは水痘帯状ヘルペスウイルスによって起こるぶどう膜の感染性炎症である。前研究によって提案された「急性網膜壊死の診断基準（案）」について、EBMに基づいた妥当性を検討する必要がある。分担研究者の所属施設における患者を対象とした case-control study を基に、我々は「急性網膜壊死の診断基準」を作成・改訂し、その妥当性も検証され、これらについて分担研究者として統計的な側面より検証した。

A. 研究目的

急性網膜壊死は、単純ヘルペスウイルスまたは水痘帯状ヘルペスウイルスによって起こるぶどう膜の感染性炎症であり、早期の正確な診断が必要とされる。平成25年度は、最終的な診断基準を用いて本疾患の患者数、治療内容、予後について全国規模の後ろ向き調査研究を行った。これらについて統計的診断を考慮し、情報収集を行うとともに、診断基準の妥当性を検討する。

B. 研究方法

研究代表者・研究分担者らと、収集された患者データを基に、臨床分野からの列挙された項目で、診断基準を作成し、統計的整合性を判断する。今年度は、平成23年度に作成・平成24年度に改訂した急性網膜壊死の診断基準に基づいて、全国大学病院眼科を対象に後ろ向き調査研究を行った。また、統計的診断に関連する統計学界の会議での出席や海外の統計専門家との打合せで情報収集を行った。

C. 研究結果

全国調査研究を行い、前年度に行った後ろ向き調査研究結果に加えると、急性網膜壊死患者 148 名、対照疾患患者 409 名となり、これらの患者の診断名および臨床データより、急性網膜壊死の診断基準のための診断パラメータを想定されたものを検証した。また、眼科領域でのデータ解析について、統計的な判別に関係する論文発表を行っている(岩崎他, 2013; Iwasaki, *et al.*, 2013; Yokoi, *et al.*, 2013)。

D. 考察

第 2 回班会議において、「急性網膜壊死の診断基準」最終案を用いた確定診断法では、感度および特異度も良好に保たれた。今回これを用いて全国 40 施設

が参加する後ろ向き全国調査研究を行い、本診断基準の妥当性に関する更なる検討を行った結果、研究班員の所属 7 施設のみで行った調査と比べて感度が約 10%低くなったが、そもそも除外すべきサンプルが混入していた可能性が示唆された。これを踏まえて、本診断基準に対する更なる改訂を行う必要があると考えられた。

E. 結論

急性網膜壊死の診断基準を作成、改訂した。後ろ向き全国調査研究により、本診断基準は妥当性の高いものである事が示された。全国調査研究での結果を踏まえて、本診断基準に対する更なる改訂を行う必要があると考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yuko IWASAKI, Narumichi YAMAMOTO, Tatsushi KAWAGUCHI, Noriko OZAKI, Makoto TOMITA, Atsushi AJISAWA, Manabu MOCHIZUKI and Kimio MURAKAMI, Human immunodeficiency virus-related retinalmicroangiopathy and systemic cytomegalovirus disease association, Japanese Journal of Ophthalmology, 2013;57(4):372-378.
- 2) Tae YOKOI, Muka MORIYAMA, Kengo HAYASHI, Noriaki SHIMADA, Makoto TOMITA, Naoki YAMAMOTO, Toru NISHIKAWA and Kyoko OHNO-MATSUI, Predictive factors for comorbid psychiatric disorders and their impact on vision-related quality of life in patients with high myopia, International Ophthalmology, In press, 2014.

- 3) 岩崎 優子, 高瀬 博, 諸星 計, 宮永 将, 川口 龍史, 富田 誠, 望月 學, ぶどう膜炎の白内障手術における術後前眼部炎症の予測因子, あたらしい眼科, 2013;30(1):123-126.
- 4) 高瀬博、大黒伸行、岡田アナベルあやめ、後藤浩、園田康平、富田誠、南場研一、水木信久、望月学. 急性網膜壊死のあたらしい診断基準の作成. 日眼会誌. 2013;117:935.

2. 学会発表

- 1) 高瀬博、大黒伸行、岡田アナベルあやめ、後藤浩、園田康平、富田誠、南場研一、水木信久、望月学. 急性網膜壊死の診断基準の作成. 第47回日本眼炎症学会,大阪,2013.7.13.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 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

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, Shimizu N, Morio T, Ohguro N, Nakai K, Maruyama K, Nagata K, Takeda A, Usui Y, Sonoda KH, Takeuchi M, Mochizuki M.	Use of a comprehensive polymerase chain reaction system for diagnosis of ocular infectious diseases.	Ophthalmology.	120	1761-8	2013
Iwahashi-Shima C, Azumi A, Ohguro N, Okada AA, Kaburaki T, Goto H, Sonoda KH, Namba K, Mizuki N, Mochizuki M.	Acute retinal necrosis: factors associated with anatomic and visual outcomes.	Jpn J Opyhatlmol	57	98-103	2013
Okada AA, Jabs DA.	The SUN Project: the future is here.	JAMA Ophthalmol	131	787-789	2013
Hirukawa K, Keino H, Watanabe T, Okada AA.	Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in new-onset acute posterior scleritis.	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	251	2273-2275	2013
Taki W, Keino H, Watanabe T, Okada AA.	Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in recurrent unilateral posterior scleritis.	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	251	1003-1004	2013
Kaburaki T, Namba K, Sonoda K, Kezuka T, Keino H, Fukuhara T, Kamoi K, Nakai K, Mizuki N, Ohguro N and the Ocular Behcet Disease Research Group of Japan	Behcet's disease ocular attack score 24: evaluation of ocular disease activity before and after initiation of infliximab.	Jpn J Ophthalmol			2013
Kimura K, Morita Y, Orita T, Haruta J, Takeji Y, <u>Sonoda KH.</u>	Protection of human corneal epithelial cells from TNF- α -induced disruption of barrier function by rebamipide.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	54	2752-60	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hasegawa E, <u>Sonoda KH</u> , Shichita T, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Oshima Y, Takeda A, Yoshimura T, Yoshida S, Ishibashi T, Yoshimura A.	IL-23-independent induction of IL-17 from $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells promotes experimental intraocular neovascularization.	J Immunol.	190	1778-87	2013
Zhang H, Yang Y, Takeda A, Yoshimura T, Oshima Y, <u>Sonoda KH</u> , Ishibashi T.	A Novel Platelet -Activating Factor Receptor Antagonist Inhibits Choroidal Neovascularization and Subretinal Fibrosis.	PLoS One.	8	e68173	2013
Morita Y, Kimura K, Fujitsu Y, Enomoto A, Ueno S, Kondo M, <u>Sonoda KH</u> .	Autoantibodies against TRPM1 in Japanese Patient with Melanoma-associated Retinopathy.	Jpn J Ophthal.			2013
Takeda A, <u>Sonoda KH</u> , Ishibashi T.	Regulation of Th1 and Th17 cell differentiation in uveitis.	Inflamm Regen			2013
Takeda A, Yoshimura T, Oshima Y, <u>Sonoda KH</u> , Ishibashi T.	IL-10 is significantly involved in HSP70-regulation of experimental sub retinal fibrosis.	PLoS One.	8	e80288	2013
Takemoto Y, <u>Namba K</u> , Mizuuchi K, Ohno S, Ishida S.	Two cases of subfoveal choroidal neovascularization with tubulointerstitial nephritis and uveitis (TINU) syndrome.	Eur J Ophthalmol.	23	255-257	2013
Mizuuchi K, Kitaichi N, <u>Namba K</u> , Horie Y, Ishida S, Ohno S.	Trabecular meshwork depigmentation in Vogt-Koyanagi-Harada disease.	Jpn J Ophthalmol.	57	245-251	2013
Jin XH, <u>Namba K</u> , Saito W, Iwata D, Ishida S.	Bacterial endophthalmitis caused by an intraocular cilium in a patient under treatment with infliximab.	J Ophthalmic Inflamm and Infect.	3	50	2013
Kase S, <u>Namba K</u> , Kitaichi N, Iwata D, Ohno S, Ishida S.	Clinical features of human T lymphotropic virus type-1 associated uveitis in Hokkaido, Japan.	Jpn J Ophthalmol.	57	379-384	2013
Iwasaki Y, Yamamoto N, Kawaguchi T, Ozaki N, Tomota M, Ajisawa A, Mochizuki M, Murakami K	Human immunodeficiency virus-related retinalmicroangiopathy and systemic cytomegalovirus disease association	Jpn J Ophthalmol.	57	372-378	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yokoi T, Moriyama M, Hayashi K, Shimada N, Tomita M, Yamamoto N, Nishikawa T, Ohno-Matsui K	Predictive factors for comorbid psychiatric disorders and their impact on vision-related quality of life in patients with high myopia	Int Ophthalmol.	In press		2014
高瀬博、大黒伸行、 岡田アナベルあや め、後藤浩、園田康 平、富田誠、南場研 一、水木信久、望月 学	急性網膜壊死のあたらしい診 断基準の作成	日眼会誌	117	935	2013
窪野玲央、高瀬博、 横井匡、仁科幸子、 東範行、望月学	免疫抑制状態の小児に生じた 水痘帯状疱疹ウイルスによる 壊死性網膜炎の一例	眼臨紀	6	585-8	2013
高瀬博	【ぶどう膜炎 外来診療】感染 性ぶどう膜炎	OCULISTA	5	69-77	2013
高瀬博	網羅的PCRシステムによる感 染性ぶどう膜炎の診断	東京都眼科医会報	226	2-6	2014
園田康平	免疫と眼疾患	アレルギーの臨床	33	13	2013
園田康平	後部・汎ぶどう膜炎	OCULISTA	5	46-56	2013
園田康平、吉田倫 子、近藤峰生	ヒト、マウスの網膜色素変性症 における眼内炎症反応	Retina Medicine	2	83-90	2013
岩崎優子、高瀬 博、 諸星 計、宮永 将、 川口龍史、富田 誠、 望月 学	ぶどう膜炎の白内障手術にお ける術後前眼部炎症の予測因 子	あたらしい眼	117	935	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Use of a Comprehensive Polymerase Chain Reaction System for Diagnosis of Ocular Infectious Diseases

Sunao Sugita, MD, PhD,^{1,2} Manabu Ogawa, MD, PhD,¹ Norio Shimizu, PhD,³ Tomohiro Morio, MD, PhD,⁴ Nobuyuki Ohguro, MD, PhD,⁵ Kei Nakai, MD, PhD,⁶ Kazuichi Maruyama, MD, PhD,⁷ Kenji Nagata, MD,⁷ Atsunobu Takeda, MD, PhD,⁸ Yoshihiko Usui, MD, PhD,⁹ Koh-Hei Sonoda, MD, PhD,¹⁰ Masaru Takeuchi, MD, PhD,¹¹ Manabu Mochizuki, MD, PhD¹

Purpose: To measure the genomic DNA of ocular infectious pathogens in ocular fluids and to analyze the clinical relevance of these pathogens in uveitis and endophthalmitis.

Design: Prospective clinical case series.

Participants: A total of 500 patients with infectious uveitis and endophthalmitis were examined at Tokyo Medical and Dental University, Tokyo Medical University, Kyushu University, Osaka University, and Kyoto Prefectural University, all in Japan.

Methods: Genomic DNA of bacteria, fungi, parasites, and viruses in collected intraocular samples were examined by comprehensive polymerase chain reaction (PCR). Samples were analyzed first by multiplex PCR and quantitative real-time PCR for human herpes viruses (HHVs) 1 through 8 and toxoplasma. Subsequently, samples were examined by broad-range real-time PCR for bacterial 16S and fungal 18S/28S ribosomal DNA (rDNA).

Main Outcome Measures: Infectious uveitis and endophthalmitis diagnoses were obtained when using the PCR system. Calculations of the positivity and the diagnostic parameters such as sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) also were evaluated.

Results: In all of the tested infectious uveitis and endophthalmitis patients, either herpes simplex virus type 1 (n = 18), herpes simplex virus type 2 (n = 4), varicella-zoster virus (n = 55), Epstein-Barr virus (n = 17), cytomegalovirus (n = 68), HHV type 6 (n = 2), toxoplasma (n = 6), bacterial 16S (n = 33), or fungal 18S/28S (n = 11) genome was detected. Neither HHV type 7 nor HHV type 8 DNA was detected in any of the samples. Of the 21 false-negative results found during the PCR analyses, 12 cases were negative for patients clinically suspected of having bacterial endophthalmitis. Conversely, false-positive results for the comprehensive PCR examinations occurred in only 3 cases that subsequently were found to have bacterial 16S rDNA. Diagnostic parameters for the sensitivity, specificity, PPV, and NPV of our PCR examinations were 91.3%, 98.8%, 98.6%, and 92.4%, respectively.

Conclusions: Use of our comprehensive PCR assay to examine ocular samples in patients with endophthalmitis and uveitis seems to be clinically useful for detecting infectious antigen DNA. Thus, this PCR method is a reliable tool for both diagnosing ocular disorders and further screening of patients for intraocular infections.

Financial Disclosure(s): The author(s) have no proprietary or commercial interest in any materials discussed in this article. *Ophthalmology* 2013;120:1761–1768 © 2013 by the American Academy of Ophthalmology.

Infectious uveitis and endophthalmitis are sight-threatening diseases caused by human pathogenic agents. Virus infections, especially herpes viruses, are known to cause ocular inflammations such as retinitis, uveitis, retinal vasculitis, conjunctivitis, corneal endotheliitis, and keratitis. Parasitic infections (e.g., ocular toxoplasmosis) are known to cause intraocular inflammations such as uveitis, whereas bacterial and fungal infections are known to cause endophthalmitis, uveitis, and keratitis. However, when infectious pathogens cause ocular inflammatory disorders, the clinical findings can be very diverse, thereby making the diagnosis of the infection both difficult and time consuming. To ensure that appropriate treatments are performed that will prevent these

infectious agents from causing irreversible ocular tissue damage, early examinations that correctly identify the cause of the infections are a necessity.

For more than a decade, diagnostic evaluations of patients with uveitis and endophthalmitis diagnoses have included the use of conventional qualitative polymerase chain reaction (PCR). A PCR diagnosis has proven to be very useful because only a very small sample is required for detection of the infectious agents. However, in the past, the relatively small volume of sample that can be obtained (such as aqueous humor) has made it impossible to conduct comprehensive examinations for ocular inflammatory diseases. Nevertheless, comprehensive diagnoses are needed

because ocular inflammatory diseases can include various infectious antigens. Additionally, because sudden changes can occur in ocular infectious diseases, it is imperative that patients be diagnosed as early as possible. Therefore, a comprehensive, rapid, and accurate diagnosis using ocular samples is of great importance, and if such a comprehensive PCR system for the diagnosis of ocular infectious disorders could be established, this would be a tremendous help for many clinicians. However, this research tool has not been widely available for use in clinical laboratories. Therefore, this study attempted both to establish novel tests that would be widely available to clinical laboratories and to develop a comprehensive PCR system that could be used to examine bacteria, fungi, parasites, and viruses for the purpose of diagnosing ocular infectious disorders.

Methods

Patients

Intraocular samples of aqueous humor and vitreous fluid were collected from 500 patients with uveitis and endophthalmitis. Underlying pathologic features included endophthalmitis, anterior uveitis or iridocyclitis, acute retinal necrosis (ARN), progressive outer retinal necrosis, cytomegalovirus (CMV) retinitis, human T lymphotropic virus type 1 uveitis, ocular toxoplasmosis, scleritis, Posner-Schlossman syndrome, Fuchs' iridocyclitis, sarcoidosis, Vogt-Koyanagi-Harada disease, Behçet's disease, intraocular lymphoma, idiopathic uveitis, idiopathic retinal vasculitis, bacterial endophthalmitis, and fungal endophthalmitis. At the time of sampling, these patients displayed active intraocular inflammation. In addition, control samples were prepared for this study (n = 100). The control group included noninflammatory diseases such as diabetes, retinal detachment, glaucoma, and others.

An aliquot of 0.1 ml aqueous humor was aspirated with a 30-gauge needle. Nondiluted vitreous fluid samples were collected from uveitis patients who were undergoing vitreous surgery (diagnostic pars plana vitrectomy). Samples were transferred into presterilized microfuge tubes and used for PCR. To ensure that no contamination of the PCR preparation occurred, the DNA amplification and the analysis of the amplified products were carried out in separate laboratories according to a method reported in a previous study.¹

We consecutively enrolled endophthalmitis and uveitis patients from 2006 through 2010 for a prospective study that was conducted at both our hospital facility (Tokyo Medical and Dental University) and its associated hospitals (Tokyo Medical University, Kyushu University, Osaka University, and Kyoto Prefectural University). After informed consent was obtained from all patients, we collected aqueous humor and vitreous fluid samples. The research followed the tenets of the Declaration of Helsinki and all study protocols were approved by the Institutional Ethics Committees of Tokyo Medical and Dental University and its associated hospitals. The clinical trial was registered on September 7, 2009 (available at: www.umin.ac.jp/ctr/index/-j.htm; study no.: R000002708).

Polymerase Chain Reaction Analyses

The sampling procedure and the PCR methodology are shown in Figure 1. DNA was extracted from the samples using a DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) installed on a robotic workstation that

was set for automated purification of nucleic acids (BioRobot EZ1 Advanced; Qiagen). Genomic DNA of human herpes virus (HHV), toxoplasma, bacteria, and fungi in the aqueous humor and vitreous fluids was measured through the use of 2 independent PCR assays: (1) a qualitative multiplex PCR that was performed in conjunction with a quantitative real-time PCR, and (2) a broad-range real-time PCR (Fig 1). The multiplex PCR qualitatively measured the genomic DNA of 8 HHVs: herpes simplex virus (HSV) type 1 (HHV-1), HSV-2 (HHV-2), varicella-zoster virus (VZV; HHV-3), Epstein-Barr virus (EBV; HHV-4), CMV (HHV-5), HHV-6, HHV-7, HHV-8, and toxoplasma. The PCR was performed using a LightCycler 480 II instrument (Roche, Basel, Switzerland). If the multiplex PCR results were positive, we then conducted real-time PCR. The real-time PCR was performed using the Ampliqa Gold and the Real-Time PCR 7300 system (Applied Biosystems, Foster City, CA) or the LightCycler 480 II instrument (Roche). Primers and probes for HHV types 1 through 8 and the PCR conditions have been described previously.^{2,3} The toxoplasmosis primers and probes also have been reported previously.⁴

To detect DNA for bacterial species (Fig 1), broad-range PCR was performed using the Ampliqa Gold and the Real-Time PCR 7300 system or the LightCycler 480 II instrument in accordance with our previously reported methodology.¹ Primers and probes for the fungal species (fungal 18S or 28S ribosomal DNA [rDNA]) along with the PCR conditions also have been reported previously.^{5,6}

Amplification of the human β -globulin gene served as an internal positive extraction and amplification control. The value of the HHV copy number in the sample was considered to be significant when more than 50 copies/ml were observed. Significant differences in the copy number were defined as more than 10 copies/ml for toxoplasmosis, more than 100 copies/ml for bacterial 16S, and more than 10 copies/ml for fungal 18S/28S.

Results

Step 1 of our comprehensive PCR examinations consisted of qualitative multiplex PCR combined with quantitative real-time PCR, whereas step 2 used broad-range real-time PCR (Figs 1 and 2). As seen in the results for a representative positive aqueous humor sample, although we observed a high copy number of bacterial 16S rDNA, the PCR examination indicated that the sample showed negative results for DNA from all other infectious antigens (Fig 2).

In the uveitis and endophthalmitis patients, our comprehensive PCR system results demonstrated positivity in the ocular fluids. As seen in Table 1, multiplex PCR and real-time PCR detected 18 patients with HSV-1 DNA (18 of 500 cases; 3.6% positive). Herpes simplex virus type 2 DNA was detected in only 4 patients (0.8% positive), with all of these patients subsequently diagnosed with ARN. Varicella-zoster virus DNA was detected in the ocular fluid samples of 55 patients (11% positive), whereas EBV DNA was detected in 17 patients (3.4% positive) with various ocular inflammatory disorders. Cytomegalovirus was detected in 68 patients (13.6% positive) with disorders that included corneal endophthalmitis, iridocyclitis, and necrotic retinitis. However, our PCR methods detected only 2 HHV-6 DNA cases (0.4% positive), with none of the patients found to have HHV-7 or HHV-8. In addition, toxoplasmosis DNA was detected in only 6 samples (1.2% positive), with all of these patients found to have active uveitis with ocular toxoplasmosis. Overall, our multiplex PCR and real-time PCR analyses identified 170 PCR-positive patients (34% positive; Table 1).

However, when we used broad-range real-time PCR to screen for detection of bacterial 16S and fungal 18S/28S rDNA in infec-

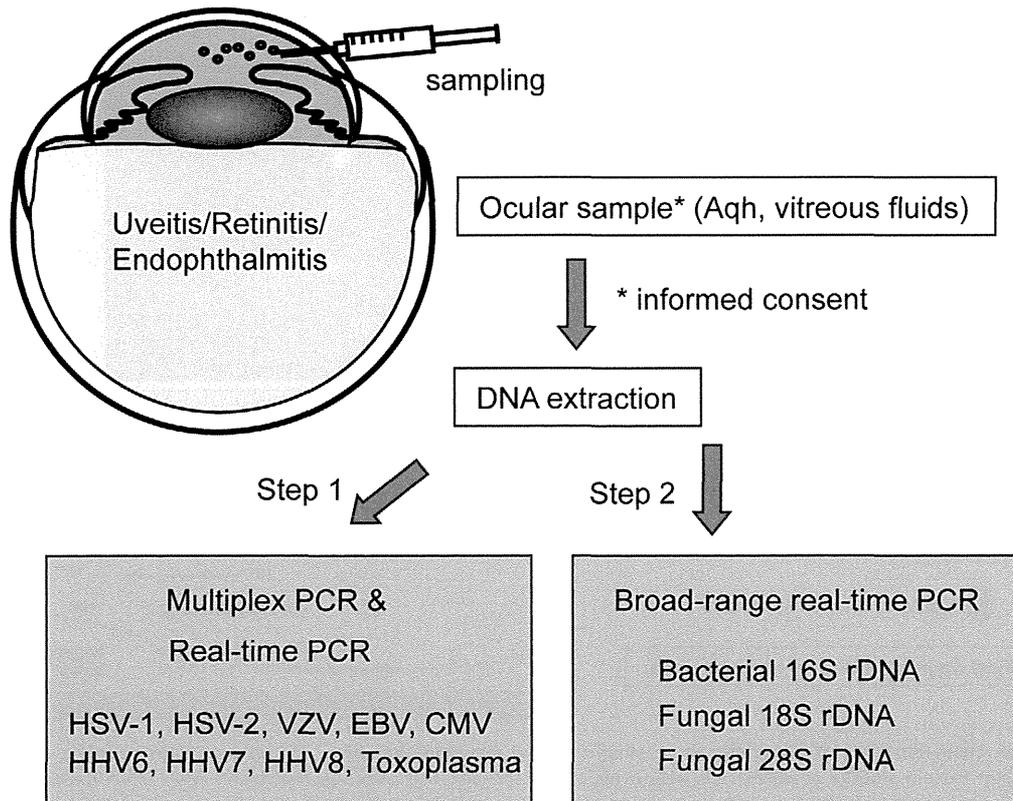


Figure 1. Diagram showing the use of a comprehensive polymerase chain reaction (PCR) system for the analysis of various infectious genomic DNA in the ocular fluids of patients with uveitis and endophthalmitis. To detect various infectious agents, we used independent PCR methods, with step 1 using multiplex PCR and real-time PCR and step 2 using broad-range real-time PCR. After DNA extraction from each of the samples, multiplex PCR was performed first to screen for human herpes virus type 1 (HHV1) to human herpes virus type 8 (HHV8) and for toxoplasmosis via the use of 3 LightCycler capillaries (Roche, Basel, Switzerland). If positive results were observed, real-time PCR was performed subsequently to measure the DNA load. Step 2 used broad-range real-time PCR for detection of bacterial 16S, fungal 18S, or fungal 28S ribosomal DNA (rDNA). To be able to detect the various bacterial and fungal DNAs, primers and probes for the unvariable regions in the sequences were used. Aqh = aqueous humor; CMV = cytomegalovirus; EBV = Epstein-Barr virus; HHV6 = human herpes virus type 6; HHV7 = human herpes virus type 7; HSV-1 = herpes simplex virus type 1; HSV-2 = herpes simplex virus type 2; VZV = varicella-zoster virus.

tious endophthalmitis, we detected 33 patients with bacterial 16S rDNA (33 of 500 cases; 6.6% positive; Table 1). In 11 patients, fungal 18S/28S rDNA was detected in the ocular fluid samples (2.2% positive). Overall, broad-range real-time PCR analysis identified 44 PCR-positive endophthalmitis patients (8.8% positive; Table 1). Analysis of the control samples from patients without intraocular inflammation ($n = 100$) showed that all had negative results.

Subsequently, we analyzed the results for each of the infectious antigens, including HHV-1 through HHV-8, toxoplasma, bacteria, and fungi. Table 2 shows a summary of the results. Herpes simplex virus type 1 was detected in 1 case of keratouveitis, in 16 cases of anterior uveitis, and in 1 case of ARN, whereas HSV-2 was detected in 4 cases of ARN. Varicella-zoster virus was detected in two cases of keratouveitis, 26 cases of anterior uveitis, 24 cases of ARN, and in two cases of progressive outer retinal necrosis. Epstein-Barr virus was detected in 5 cases of idiopathic uveitis. In addition, EBV also was detected in patients with various ocular inflammatory disorders and intraocular lymphoma (Table 2).

Cytomegalovirus was detected in many cases of corneal endotheliitis (11 of 12 patients), iridocyclitis (anterior uveitis; 32 of 76 patients), and CMV-associated necrotic retinitis (23 of 23 patients). Human herpes virus type 6 was detected in 2 cases of bacterial endophthalmitis. Both of these cases exhibited typical

bacterial infections of the eye. Human herpes virus type 7 and HHV-8 DNA were not detected in any of the patients in this study (Table 2). Toxoplasma DNA was detected in active uveitis with ocular toxoplasmosis ($n = 6$), but not in any of the other ocular inflammatory cases.

Broad-range real-time PCR examinations found bacterial 16S rDNA in 26 cases of bacterial endophthalmitis, in 3 cases of idiopathic uveitis, and in 4 cases of other types of infections. Fungal 18S/28S rDNA was detected in 9 cases of fungal endophthalmitis, in 1 case of idiopathic uveitis, and in 1 case with another infection (Table 2).

We also analyzed whether this PCR examination included any false-negative or false-positive results. A false-negative result indicated that although the PCR results were negative, the patient ultimately was diagnosed with an ocular infection by other examinations or clinical findings or by their responses to treatment. Overall, we determined there were 21 false-negative results in this analysis (Table 3). Among these, the PCR results were negative in 12 cases even though the patients were suspected clinically of having bacterial endophthalmitis. However, false-positive results indicated there were positive PCR results, even though patients finally were diagnosed as having a clinically noninfectious disorder. Overall, there were 3 false-positive results for the PCR anal-

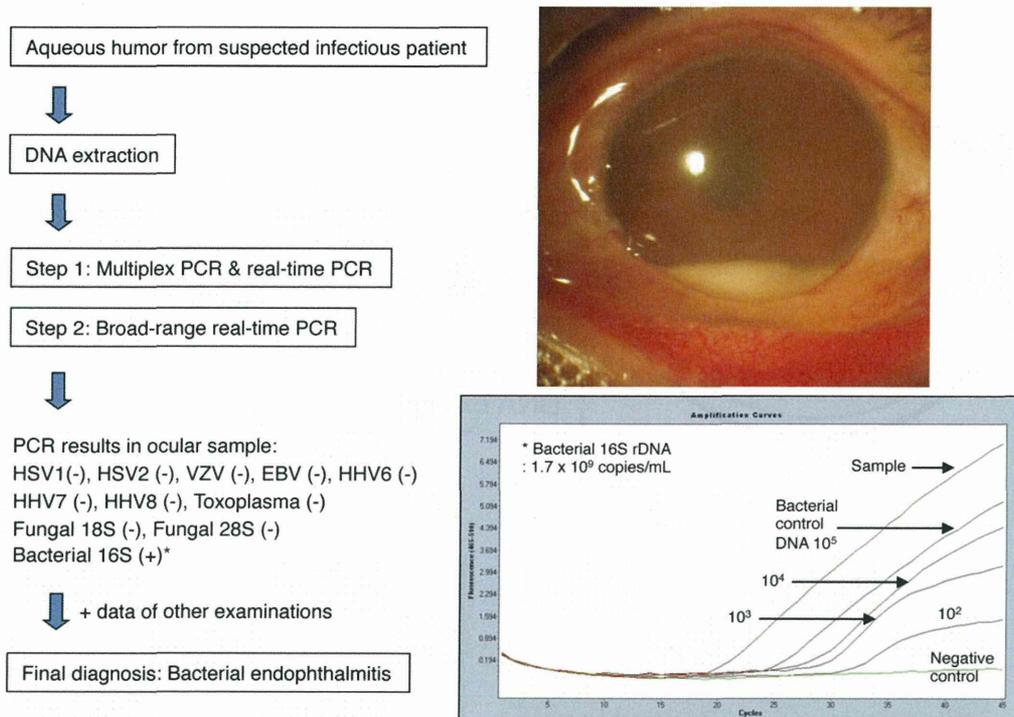


Figure 2. Polymerase chain reaction (PCR) results for a sample from a representative case. An aqueous humor sample was obtained from an endophthalmitis patient (severe anterior chamber cells with hypopyon in the slit photograph on the right). After DNA extraction from the sample, multiplex PCR was performed to screen for human herpes virus types 1 through 8 (HHV1–8) and *Toxoplasma gondii* using LightCycler capillaries. We simultaneously performed broad-range real-time PCR for the detection of bacterial 16S or fungal 18S/28S ribosomal DNA (rDNA) and found there was a high copy number of bacterial 16S rDNA in the sample. The sample demonstrated negative results for the human herpes viruses (HSV), such as HSV1, HSV2, varicella-zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV), HHV6, HHV7, and HHV8 for *T. gondii*. Broad-range real-time PCR indicated the sample showed negative results for fungal 18S and 28S rDNA. The patient finally was diagnosed as having infectious endophthalmitis related to bacterial infections.

ysis, with each case confirmed to contain bacterial 16S rDNA (Table 4).

We also analyzed our comprehensive PCR examinations for the diagnosis of ocular infection in terms of the diagnostic parameters for sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value. The calculated percentages for sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were 91.3%, 98.8%, 98.6%, and 92.4%, respectively.

Discussion

In the field of ophthalmology, PCR has proven to be very useful for patient diagnosis because the analysis can be carried out using only a very small amount of sample, such as aqueous humor. When comprehensive PCR is used, the results make it possible to include or exclude infections as the potential cause of an ocular disorder. When using our PCR system, a diagnosis can be made quickly, and in fact is much less time consuming compared with other methods. For example, multiplex PCR requires only 90 minutes, real-time PCR takes 60 minutes, and DNA extraction can be performed in only 40 minutes. Additionally, the diagnostic parameters (sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value) of these comprehensive PCR examina-

tions are very high. Even so, it should be noted that with regard to the sensitivity and specificity, there is no agreed upon gold standard, which could lead to difficulties when making a diagnosis. However, from a clinical aspect, use of these comprehensive PCR examinations to analyze ocular samples makes it possible to diagnose rapidly patients with unknown intraocular infectious disorders such as uveitis and endophthalmitis.

With multiplex PCR, it is possible to screen rapidly for the genome of more than 10 types of infectious antigens.^{2–4} Additionally, when the PCR screening results are positive, this real-time PCR then can be used to measure the DNA load. Thus, use of this real-time PCR makes it possible to obtain quantitative information for antigen DNA in samples. Recently, broad-range real-time PCR for bacteria or fungi has become available.^{1,5,6} With this method, we were able to measure the amplification of the target rDNA genes. Target antigens for this method include the bacteria 16S,¹ fungal 28S,⁶ and *Candida* or *Aspergillus* 18S rRNA genes.⁵ Detection of bacterial or fungal DNA is possible because primers and probes can be designed specifically for the unvariable regions (bacterial or fungal common regions) within the sequences. By using the primers and probes of these genes, broad-range PCR can be used to detect the presence of bacteria or fungi in the samples.

Table 1. Positivity of the Comprehensive Polymerase Chain Reaction System in the Ocular Fluids of 500 Patients with Uveitis and Endophthalmitis

Infectious Antigens	Multiplex PCR and Real-Time PCR	Broad-Range Real-Time PCR
HSV-1 (HHV-1)	18/500 (3.6%)	—
HSV-2 (HHV-2)	4/500 (0.8%)	—
VZV (HHV-3)	55/500 (11.0%)	—
EBV (HHV-4)	17/500 (3.4%)	—
CMV (HHV-5)	68/500 (13.6%)	—
HHV-6	2/500 (0.4%)	—
HHV-7	0/500 (0%)	—
HHV-8	0/500 (0%)	—
Toxoplasmosis	6/500 (1.2%)	—
Bacteria 16S	—	33/500 (6.6%)
Fungal 18S/28S	—	11/500 (2.2%)
Total	170/500 (34.0%)	44/500 (8.8%)

CMV = cytomegalovirus; EBV = Epstein-Barr virus; HHV-1 through HHV-8 = human herpes virus types 1 through 8; HSV-1 and HSV-2 = herpes simplex virus types 1 and 2; VZV = varicella-zoster virus.

Multiplex polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR were performed to screen for or detect HHV genomic DNA and toxoplasmosis. Broad-range real-time PCR was performed to screen for and detect bacterial 16S and fungal 18S/28S ribosomal DNA.

Based on PCR results, clinical findings, and other examinations, we were able to diagnose infectious diseases successfully. In the present study, with the exception of HHV-7 and HHV-8, almost all of the infectious agents were detected in collected ocular samples. Herpes simplex virus type 1 was detected in aqueous humor of patients with keratouveitis, anterior uveitis, and ARN. However, the symptoms in 4 ARN patients were shown to be related to an HSV-2 infection. In addition to detecting VZV DNA in many ocular samples, our results also indicated a high copy number of VZV DNA in the samples. We previously reported finding an association between the VZV viral load in the aqueous humor and the clinical manifestations of VZV anterior uveitis.⁷ Iris atrophy was found to be much more severe in the high-viral load group compared with the low-viral load group. Overall, our results demonstrated that there was a significant correlation between the VZV viral load in the aqueous humor and damage to the iris, such as iris atrophy and pupil distortion, in patients with VZV-related anterior uveitis.

Multiplex and real-time PCR analysis of samples from various infectious patients detected EBV DNA in 17 of 500 cases (3.4%). In a previous study,⁸ we found only 3 of 17 samples from uveitis patients to have significantly high EBV DNA copy numbers when using real-time PCR. Because the EBV viral load was not very high in these samples, this suggested that viral replication of EBV does not occur in the eye. It has been assumed that the EBV infection acts as a secondary factor in the pathogenesis of ocular inflammation.⁹ Epstein-Barr virus has been shown to be able to infect B-lymphocytes and epithelial cells, including ocular pigment epithelial cells.¹⁰ Therefore, it may be the intraocular infiltrating B-cells and the epithelial cells that are releasing the EBV DNA within the eye during

inflammatory conditions. This is supported by our finding that EBV DNA was detected in ocular samples from patients with severe intraocular inflammatory disease such as ARN and bacterial or fungal endophthalmitis (see Table 2).

Cytomegalovirus DNA was detected in patients with corneal endotheliitis, anterior uveitis without corneal endothelium edema, and CMV retinitis. Corneal endotheliitis or anterior uveitis was not seen in immunocompromised patients. However, CMV retinitis was seen in immunocompromised patients, such as those with HIV infections. Cytomegalovirus-related anterior uveitis is similar to Posner-Schlossman syndrome, in which whitish, small, mutton-fat keratic precipitates, high intraocular pressure, and mild inflammation

Table 2. Comprehensive Polymerase Chain Reaction Results for Each Infectious Genome in Patients with Uveitis and Endophthalmitis

Infectious Antigens	Clinical Diagnosis	Positive PCR Results*/ Total No. of Patients (Mean Age of Onset [yrs])
HSV-1	Herpetic keratouveitis	1/4 [†] (43)
	Herpetic anterior uveitis	16/76 (51)
	Acute retinal necrosis	1/29 (39)
	Others	0/391 (—)
HSV-2	Acute retinal necrosis	4/29 (28)
	Others	0/471 (—)
VZV	Herpetic keratouveitis	2/4 (61)
	Herpetic anterior uveitis	26/76 (66)
	Acute retinal necrosis	24/29 (51)
	PORN	2/2 (53)
	Others	1/389 (55)
EBV	Idiopathic uveitis	5/107 (60)
	Fungal endophthalmitis	3/11 (69)
	Bacterial endophthalmitis	1/38 (75)
	Acute retinal necrosis (VZV)	3/24 (49)
	Intraocular lymphoma	1/43 (72)
CMV	Others	4/277 (48)
	Corneal endotheliitis	11/12 (67)
	Herpetic anterior uveitis	32/76 (58)
	Cytomegalovirus retinitis	23/23 (57)
HHV-6	Others	2/389 (52)
	Bacterial endophthalmitis	2/38 (71)
HHV-7	—	0/462 (—)
	—	0/500 (—)
HHV-8	—	0/500 (—)
	—	0/500 (—)
Toxoplasmosis	Ocular toxoplasmosis	6/9 (55)
	Others	0/491 (—)
Bacteria 16S	Bacterial endophthalmitis	26/38 (64)
	Idiopathic uveitis	3/107 (54)
	Others	4/355 (67)
Fungal 18S/28S	Fungal endophthalmitis	9/11 (61)
	Fungal keratitis	1/1 (55)
	Others	1/488 (65)

CMV = cytomegalovirus; EBV = Epstein-Barr virus; HHV-6 through HHV-8 = human herpes virus types 6 through 8; HSV-1 and HSV-2 = herpes simplex virus types 1 and 2; PCR = polymerase chain reaction; PORN = progressive outer retinal necrosis; VZV = varicella-zoster virus. *Detection of infectious DNA by multiplex PCR combined with real-time PCR or broad-range real-time PCR.

[†]In the 4 keratouveitis patients, the PCR system detected HSV-1 DNA in only 1 patient.