

201324068B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

急性網膜壊死の診断基準に関する調査研究

平成 24 年度～平成 25 年度 総合研究報告書

研究代表者 望月 學

平成 26 (2014) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

急性網膜壊死の診断基準に関する調査研究

平成 24 年度～平成 25 年度 総合研究報告書

研究代表者 望月 學

平成 25 年（2013 年）3 月

## 目 次

I. 総合研究報告	
急性網膜壊死の診断基準に関する調査研究	1
望月 學	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	7
III. 研究成果の刊行物・別刷	9

# I. 総合研究報告

急性網膜壊死の診断基準に関する調査研究

研究代表者 東京医科歯科大学眼科 教授 望月 學

研究要旨：これまでに作成した「急性網膜壊死の診断基準」を用いて、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ピルの点滴またはバラシクロピルの内服、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。

研究分担者	所属研究機関	職名
高瀬 博	東京医科歯科大学眼科	講師
後藤 浩	東京医科大学眼科	教授
岡田アナベルあやめ	杏林大学眼科	教授
大黒伸行	大阪厚生年金病院眼科	主任部長
水木信久	横浜市立大学眼科	教授
園田康平	山口大学眼科	教授
南場研一	北海道大学眼科	講師
富田 誠	東京医科歯科大学臨床試験管理センター	准教授

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に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班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、治療ガイドライン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、まず東京医科歯科大学倫理委員会

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。

平成23年度に、本研究助成費を受けて専門家班員による「急性網膜壊死の診断基準に関する調査研究」班を確立した。その研究班会議において、各班員の急性網膜壊死の診療経験に基づいて、急性網膜壊死の診断基準（案）を作成した。（表1）

表1. 急性網膜壊死の診断基準（案）

＜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 a と b 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事が望ましい。その後の経過と検査結果に基づいて診断を確定する。	
1. 初期眼所見項目	a. 前眼部に中等度以上の前部ぶどう膜炎、または豚脂様角膜後面沈着物がある b. 一つまたは複数の網膜滲出斑（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 c. 網膜動脈炎が存在する d. 視神経乳頭発赤がある e. 炎症による硝子体混濁がある f. 高眼圧症がある
2. 経過項目	a. 病巣は急速に円周方向に拡大する b. 多発性網膜裂孔、網膜剥離を生じる c. 網膜血管閉塞を生じる d. 視神経萎縮を来す e. 抗ヘルペスウイルス薬に反応する
3. 検査	a. 眼内液検査（前房水または硝子体）：PCR、抗体率のいずれかで、HSV-1、HSV-2 もしくは VZV が陽性 b. 他疾患を疑わせる検査結果がない
4. 分類	(1) 確定診断群：初期眼所見項目のうち a と b、および経過項目のうち a を認め、かつ 3a の眼内液検査で HSV または VZV が検出されたもの (2) 臨床診断群：眼内液からウイルスが検出されない、あるいは検査未施行であるが、初期眼所見項目のうち a と b を含む 4 項目と経過項目のうち a を含む 2 項目、並びに検査項目の b を満たすもの。

平成24年度は、この診断基準（案）に基づいた過去3年間の後ろ向き調査研究を行った。研究班員の所属施設（北海道大学、東京医科歯科大学、東京医科大学、杏林大学、横浜市立大学、大阪厚生年金病院、山口大学）眼科に2009年1月1日から2011年12月31日までの間に初診した急性網膜壊死患者および対照疾患患者（サイトメガロウイルス網膜炎、眼トキソプラズマ症、サルコイドーシス、ベーチェット病、結核、梅毒、眼内リンパ腫）を

対象とした。これらの患者診療録を用い、後方視的に以下の項目を調査した。①各施設での最終確定診断、②初診時または発症時の診断基準の該当する所見の有無、③その他の臨床所見、④臨床経過、⑤眼内液に対するウイルス検査結果。この結果をもとに、研究班が作成した診断基準の診断パラメータ（感度、特異度、陽性診断率（PPV）、陰性診断率（NPV））を算出した。その結果をもとに研究会議において診断基準（案）の妥当性を検証し、診断基準（案）の改定を行った。（表2）

表2. 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。

- 初期眼所見項目
  - 前房細胞または豚脂様角膜後面沈着物がある
  - 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
  - 網膜動脈炎が存在する
  - 視神経乳頭発赤がある
  - 炎症による硝子体混濁がある
  - 眼圧上昇がある
- 経過項目
  - 病巣は急速に円周方向に拡大する
  - 網膜裂孔、網膜剥離を生じる
  - 網膜血管閉塞を生じる
  - 視神経萎縮を来す
  - 抗ヘルペスウイルス薬に反応する
- 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）
- 分類
  - 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が病因と特定されたもの
  - 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。

平成25年度は、急性網膜壊死の診断基準に基づいて、全国大学病院眼科（表3）を対象に後ろ向き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3. 全国調査参加施設一覧

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

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、治療ガイドラインを作成する。

(倫理面への配慮)

東京医科歯科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

平成23年度の研究班会議において、「急性網膜壊死の診断基準（案）」を作成した。（表1）

平成24年度には、この妥当性を評価するため、研究班員の所属する7施設で、急性網膜壊死患者38名、対照疾患患者266名のデータが集積解析された。対照の内訳は、サイトメガロウイルス網膜炎25名、眼トキソプラズマ症39名、サルコイドーシス122名、ベーチェット病40名であった。これらの患者の最終確定診断名および臨床所見のデータに基づいて、平成24年度作成の急性網膜壊死の診断基準（表1）の診断パラメータを算出した。その結果、急性網膜壊死の確定診断群（眼内液によるウイルス診断が陽性のもの）の感度は57.9%、特異度100%、PPV 100%、NPV 94.3%であった。ウイルス検査結果を考慮しない場合の臨床診断群の診断パラメータは感度52.6%、特異度100%、PPV 100%、NPV 93.7%であった。これらの結果から平成24年度作成の診断基準の感度は低いものである事が分かった。我々はさらに、各項目の診断パラメータを検討した。（表4）

表4. 診断基準項目の診断パラメータ

項目	感度	特異度	PPV	NPV
1a*	89.5	71.4	30.9	97.9
1b*	97.4	95.9	77.1	99.6
1c	84.2	94.0	66.7	97.7
1d	73.7	68.8	25.2	94.8
1e	89.5	42.1	18.1	96.6
1f	7.9	91.4	11.5	87.4
2a*	65.8	99.6	96.2	95.3
2b	65.8	97.0	75.8	95.2
2c	57.9	92.5	52.4	93.9
2d	39.5	95.5	55.6	91.7
2e	97.4	95.5	75.5	99.6
3a	94.7	98.5	90.0	99.2

\*診断に必須の項目、PPV: 陽性的中率  
 NPV: 陰性的中率

その結果、平成24年作成の診断基準（案）における必須項目のうち、「1a. 前眼部に中等度以上の前部ぶどう膜炎、または豚脂様角膜後面沈着物がある」の感度は89.5%であり、「2a. 病巣は急速に円周方向に拡大する」の感度も65.8%と低いものであり、これらが診断基準の感度を低下させる主因と考えられた。他の診断パラメータに影響を与えない範囲での診断基準の改定が必要と考えられた。

以上の結果を踏まえて、平成24年作成の診断基準の改定を行った。まず、初期眼所見項目の「1a. 前眼部に中等度以上の前部ぶどう膜炎、または豚脂様角膜後面沈着物がある」から「中等度以上の」の条件を削除し、「1a. 前眼部に前部ぶどう膜炎、または豚脂様角膜後面沈着物がある」とした。また、経過項目の「2a. 病巣は急速に円周方向に拡大する」を診断確定のための必須項目から外した。その結果、改定診断基準の確定診断群の感度は65.8%から92.1%に上昇し、しかも特異度は100%に保たれていた。臨床診断群の感度も57.9%から86.8%に上昇し、特異度は100%に保たれた。

これらの結果を踏まえ、平成24年度第2回班会議において「急性網膜壊死の診断基準」の最終案を作成した。（表3）一方、同班会議において、今回施行された後ろ向き調査研究で用いた対照疾患の種類が少ないが問題視された。そのため、急性網膜壊死との鑑別が問題となり得る対照疾患として、結核、梅毒、眼内リンパ腫を追加調査した。その結果、対象となった全ての疾患とその内訳は、急性網膜壊死が45名、対照疾患としてサイトメガロウイルス網膜炎32名、サルコイドーシス135名、眼トキソプラズマ症48名、ベーチェット病111名、結核30名、梅毒5名、眼内リンパ腫48名となった。これら全ての対象疾患に対して「急性網膜壊死の診断基準」をあてはめ検討した結果、感度は91.0%、特異度100%、PPV 100%、NPV 99.0%となった。

平成25年度には、「急性網膜壊死の診断基準」最終案に基づき、全国後ろ向き調査研究を施行した。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39の大学病院および基幹病院が参加した。（表4）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146名、対照疾患患者409名（表5）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。

表5. 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	(49)	(21:188)
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

その結果、感度は79.0%、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6）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、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さなかった。

表6. 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

平成25年度の全国調査では、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82.1%、バラシクロビルの内服が75.7%、ステロイドの全身投与が92.9%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64.3%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5.0%、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82.9%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。

#### 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。これを用いて全国39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

79.0%、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ガイドラインを作成中である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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;120:1761-8
- 2) 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 Ophthalmol*. 2013;57:98-103.
- 3) Ohguro N, Sonoda KH, Takeuchi M, Matsumura M, Mochizuki M. The 2009 prospective multi-center epidemiologic survey of uveitis in Japan. *Jpn J Ophthalmol*. 2012;56:432-5.
- 4) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Ogawa M, Maruyama K, Usui N, Mochizuki M. Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:4692-8
- 5) 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.

- 6) 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*. 2013;6:585-8
- 7) 澁谷悦子、石原麻美、木村育子、安藤澄、飛鳥田有里、西田朋美、中村聡、林清文、水木信久. 横浜市立大学附属病院における近年のぶどう膜炎の疫学的検討 (2009~2011年). *臨眼*. 2012;66:713-8.

##### 2. 学会発表

- 1) Takase H, Goto H, Mizuki N, Namba K, Ohguro N, Okada AA, Sonoda KH, Tomita M, Mochizuki M. Development of new diagnostic criteria for acute retinal necrosis based on ocular findings and virological testing of intraocular fluids. 12<sup>th</sup> International Ocular Inflammation Society Congress. Spain. 2014. 2. 28.
- 2) 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.
- 3) 宮永将、高瀬博、鴨居功樹、川添裕子、窪野玲央、川口龍史、中島由季子、神田紗也香、高橋任美、福地麗、杉田直、望月学. 東京医科歯科大学におけるぶどう膜炎臨床統計 1998~2001年と2007~2011年の比較. 第117回日本眼科学会総会, 2013. 4. 6.
- 4) 橋本幸三、石川 聖、渡邊 久、杉田 直、小川 学、望月 学、竹内 大. サイトメガロウイルスにより発症した急性網膜壊死の1例. 第116回日本眼科学会総会, 東京, 2012. 4. 5.
- 5) 杉田 直、小川 学、望月 学、清水則夫、渡邊 健. ヒトヘルペスウイルス6型DNAが眼局所より同定された炎症性眼疾患のウイルス学的検討. 第66回日本臨床眼科学会, 京都, 2012. 10. 25.
- 6) 澁谷悦子、石原麻美、木村育子、安藤澄、飛鳥田有里、西田朋美、中村聡、林清文、水木信久. 横浜市立大学附属病院における近年のぶどう膜炎の疫学的検討 (2009~2011年) 第65回日本臨床眼科学会, 東京, 2011. 10. 8.
- 7) 窪野玲央、高瀬博、横井匡、仁科幸子、東範行、望月学. 骨髄移植後免疫抑制状態の小児に生じた壊死性ヘルペス性網膜症の1症例. 第45回日本眼炎症学会, 京都, 2011. 7. 10.
- 8) Takase H, Goto H, Okada AA, Ohguro N, Mochizuki M. Development and validation of new diagnostic criteria for acute retinal necrosis. World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology. Tokyo. 2014. 4. 4. (予定)
- 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 学. 急性網膜壊死の診断基準に関する全国調査研究. 第48回日本眼炎症学会, 東京, 2014. 7月 (予定)
- 10) 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. 我が国における急性網膜壊  
死の実態調査. 第68回日本臨床眼科学会, 神  
戸, 2014. 11月 (予定)

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

## 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。

## Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Ohguro N, Sonoda KH, Takeuchi M, Matsumura M, Mochuzuki M.	The 2009 prospective multi-center epidemiologic survey of uveitis in Japan.	Jpn J Ophthalmol.	56	432-5	2012
Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Ogawa M, Maruyama K, Usui N, Mochizuki M.	Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	53	4692-8	2012
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
澁谷悦子、石原麻美、木村育子、安藤澄、飛鳥田有里、西田朋美、中村聡、林清文、水木信久	横浜市立大学附属病院における近年のぶどう膜炎の疫学的検討（2009～2011年）	臨眼.	66	713-8	2012

### Ⅲ. 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,<sup>1,2</sup> Manabu Ogawa, MD, PhD,<sup>1</sup> Norio Shimizu, PhD,<sup>3</sup> Tomohiro Morio, MD, PhD,<sup>4</sup> Nobuyuki Ohguro, MD, PhD,<sup>5</sup> Kei Nakai, MD, PhD,<sup>6</sup> Kazuichi Maruyama, MD, PhD,<sup>7</sup> Kenji Nagata, MD,<sup>7</sup> Atsunobu Takeda, MD, PhD,<sup>8</sup> Yoshihiko Usui, MD, PhD,<sup>9</sup> Koh-Hei Sonoda, MD, PhD,<sup>10</sup> Masaru Takeuchi, MD, PhD,<sup>11</sup> Manabu Mochizuki, MD, PhD<sup>1</sup>

**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.<sup>1</sup>

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](http://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.<sup>2,3</sup> The toxoplasmosis primers and probes also have been reported previously.<sup>4</sup>

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.<sup>1</sup> Primers and probes for the fungal species (fungal 18S or 28S ribosomal DNA [rDNA]) along with the PCR conditions also have been reported previously.<sup>5,6</sup>

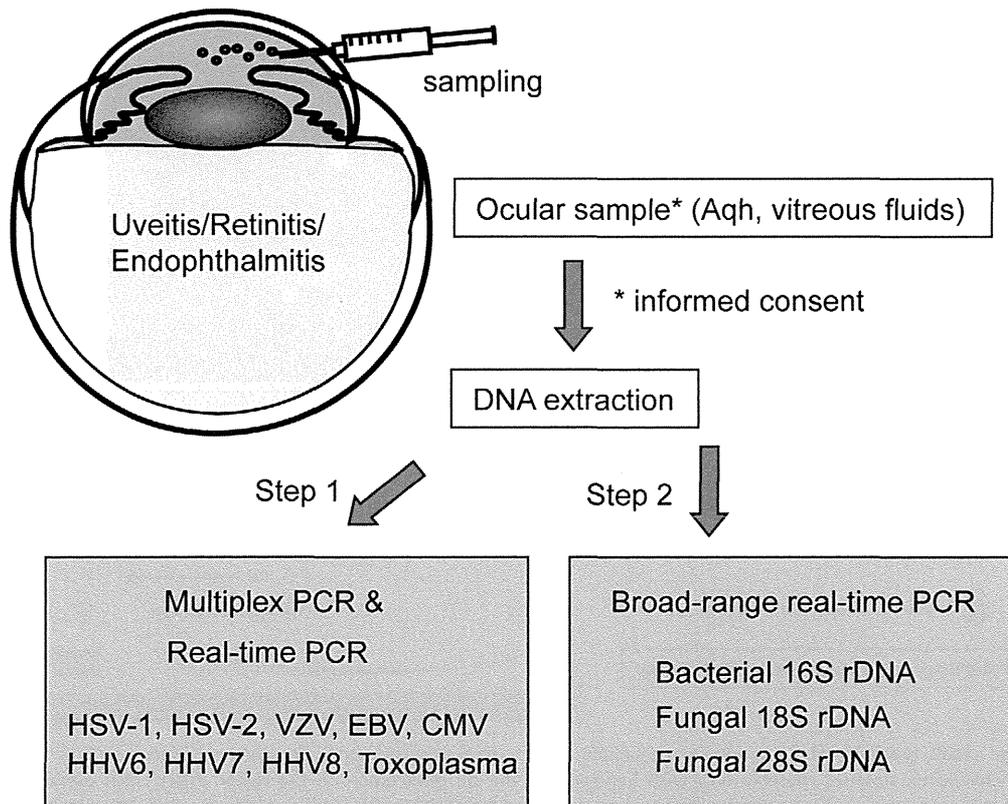
Amplification of the human  $\beta$ -globulin gene served as an internal positive extraction and amplification control. The value of the HHV copy number in the sample was considered to be significant when more than 50 copies/ml were observed. Significant differences in the copy number were defined as 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.

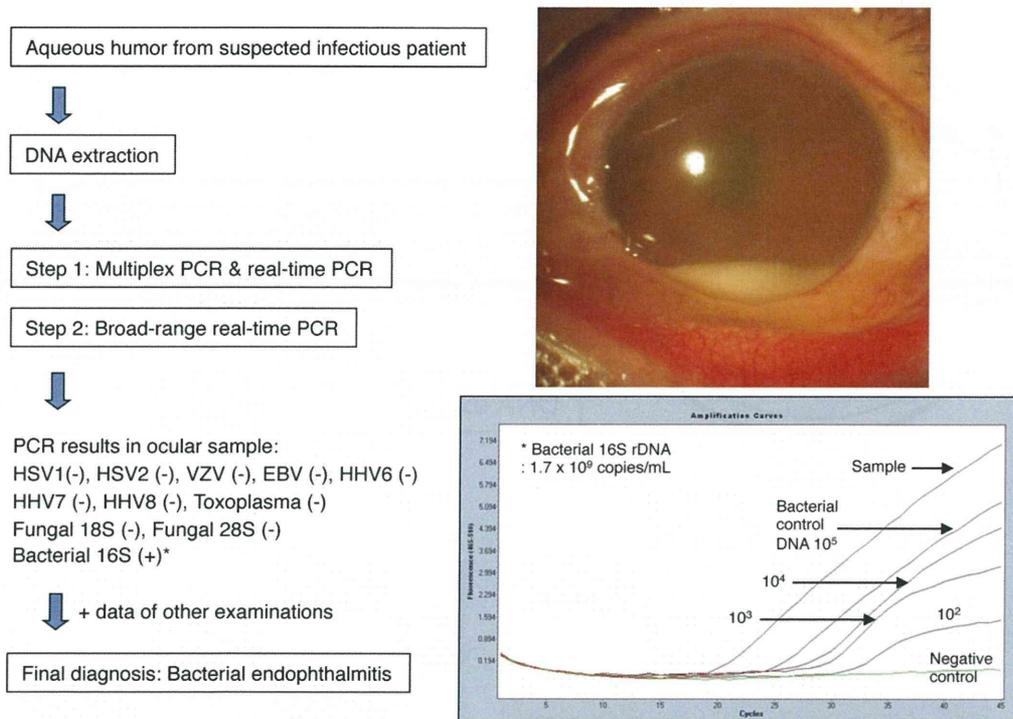
Subsequently, we analyzed the results for each of the infectious antigens, including HHV-1 through HHV-8, toxoplasma, bacteria, and fungi. Table 2 shows a summary of the results. Herpes simplex virus type 1 was detected in 1 case of keratouveitis, in 16 cases of anterior uveitis, and in 1 case of ARN, 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.<sup>2–4</sup> 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.<sup>1,5,6</sup> With this method, we were able to measure the amplification of the target rDNA genes. Target antigens for this method include the bacteria 16S,<sup>1</sup> fungal 28S,<sup>6</sup> and *Candida* or *Aspergillus* 18S rRNA genes.<sup>5</sup> 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.<sup>7</sup> 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,<sup>8</sup> 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.<sup>9</sup> Epstein-Barr virus has been shown to be able to infect B-lymphocytes and epithelial cells, including ocular pigment epithelial cells.<sup>10</sup> 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 <sup>†</sup> (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)
	Others	2/389 (52)
HHV-6	Bacterial endophthalmitis	2/38 (71)
	Others	0/462 (—)
HHV-7	—	0/500 (—)
HHV-8	—	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.

<sup>†</sup>In the 4 keratouveitis patients, the PCR system detected HSV-1 DNA in only 1 patient.

Table 3. False-Negative Results for Polymerase Chain Reaction

Clinical Diagnosis	False-Negative Results*
Corneal endotheliitis (cytomegalovirus)	1
Herpetic keratouveitis	1
Herpetic anterior uveitis	2
Ocular toxoplasmosis	3
Bacterial endophthalmitis	12
Fungal endophthalmitis	2

\*False-negative results indicate negative polymerase chain reaction results, with a final diagnosis of ocular infection as determined by other examinations, clinical findings, or responses to treatment.

in the anterior chamber are observed.<sup>11,12</sup> In these types of cases, both the retina and fellow eye usually are intact. However, CMV-related corneal endotheliitis exhibits corneal endothelium edema but not anterior uveitis.<sup>12–15</sup> Recently, several investigators have reported finding cases of CMV-associated corneal endotheliitis when using this new PCR technique.<sup>12,15,16</sup> It additionally was reported that this inflammation could be well controlled through the use of antiviral agents.<sup>12–16</sup>

In both our previous and present studies, we observed a few cases with positive HHV-6 results. As reported previously, we also have encountered a patient with apparent severe unilateral panuveitis.<sup>17</sup> After further examination of this particular case, we finally determined the patient had ocular toxocariasis and HHV-6–associated panuveitis. In addition, we also found 2 HHV-6–positive cases with bacterial endophthalmitis in our present study, with neither of the patients found to be immunocompromised. Thus, at the present time there is no conclusive evidence that clarifies whether viral replication of HHV-6 occurs in the eye. Of all of the patients examined in the present study, there were no HHV-7– or HHV-8–positive cases.

This study examined many bacteria-positive endophthalmitis cases. Sample analysis led to the detection of bacterial 16S rDNA in 26 of 38 patients with clinically suspected bacterial endophthalmitis. With the exception of the PCR-negative cases, high bacterial DNA copy numbers were detected in all of these patients. Our broad-range real-time PCR detected bacterial 16S rDNA in samples from 3 patients with idiopathic uveitis, which were false-positive results (Table 4). However, bacteria 16S copy numbers were not very high in these patients. It has been suggested that amplification of bacteria species may occur in patients undergoing long-term steroid treatments. In fact, the 3 cases in our present study all had received subconjunctival injections, systemic steroids, or both over a long period. Other explanations for our present results could be contamination caused by technical errors during the PCR preparation or bacterial exposure that occurred when collecting the samples (e.g., contamination resulting from conjunctival ocular flora present when collecting the ocular sample). Other than these 3 cases, we did not observe any PCR false-positive results resulting from herpes virus, fungi, or parasites.

In this study, we used 2 PCR methods to detect fungal infections, one for fungal 18S and one for 28S rDNA. For the 18S, we designed pan-fungal primers and probes that were complementary to the 18S rRNA sequences present in the *Candida* and *Aspergillus* species.<sup>5</sup> Our PCR system detected 6 *Candida* species, along with 5 *Aspergillus* species. In another study, we used several different primers and probes to detect separately each of these fungal species.<sup>5</sup> Additionally, although our PCR examination was able to detect all species of *Candida* and *Aspergillus* DNA, it did not detect any other fungi DNA. Therefore, we prepared a separate assay that targeted a part of the 28S large subunit rRNA genes for others.<sup>6,18</sup> *Candida* ocular infection is very similar to endogenous endophthalmitis, and in the past, we have encountered some rare *Aspergillus*-positive cases, for example, retinal vasculitis, endogenous endophthalmitis, late postoperative endophthalmitis, and post-traumatic keratitis-associated endophthalmitis. Fungal DNA was detected in 9 of the 11 ocular samples obtained from fungal endophthalmitis patients (Table 2). One fungal keratitis case also had positive results for fungal 28S rDNA in the aqueous humor. These PCR-positive samples all had significantly high copy numbers of *Candida*, *Aspergillus*, or *Cryptococcus* DNA. In 2 patients who were clinically suspected of having *Candida* endophthalmitis, our PCR analysis did not detect any fungal genome in the ocular sample. However, it should be noted that this sample was aqueous humor, and if we had obtained a vitreous sample instead, we might have detected *Candida* DNA because *Candida* endophthalmitis often results from hematogenous dissemination. This finding suggests that the type of sample collected could be very important with regard to the ability to make an accurate diagnosis.

In our bacterial 16S PCR study, we found false-negative results in 12 of the 38 samples obtained from clinically suspected bacterial endophthalmitis patients (Table 3). The false-negative results were defined as being negative for PCR even though there was a clinically suspected bacterial infection, for example, culture positive, having an inflammation that was well-controlled by antibiotics, or both. Once again, it is necessary to consider how the samples were actually obtained in these cases. Bacterial 16S rDNA was not detected in a few of the endogenous bacterial endophthalmitis patients. However, because endogenous endophthalmitis results from hematogenous dissemination, it might have been possible to detect bacterial genome if we had collected vitreous samples. Although the proper DNA extraction procedure required for verifying bacterial infec-

Table 4. False-Positive Results for Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction for Infectious Antigens	False-Positive Results*
Bacteria 16S	3

\*False-positive results indicate positive polymerase chain reaction results, with a final diagnosis of clinically noninfectious disease. These patients with bacteria 16S false-positive results ultimately were diagnosed with idiopathic uveitis.

tion by PCR remains controversial, we have attempted to use various approaches for the DNA extraction that will upregulate the PCR sensitivity. In general, a bactericidal enzyme pretreatment (e.g., lysozyme pretreatment) is required for bacterial cell wall destruction, and several investigators have reported previously finding lysozyme resistance in gram-negative and gram-positive bacteria species.<sup>19,20</sup> However, we did not pretreat any of our samples with enzyme because of the limited amount of sample that was available and the fact that our PCR examination included other infectious agents, such as viruses, fungi, and parasites. Therefore, it is possible that bacterial 16S rDNA might not have been detected in a few of the endogenous bacterial endophthalmitis patients because of difficulties in collecting samples from patients with infectious agglomeration.

In conclusion, our results indicate that a comprehensive PCR system can be used to verify ocular disease diagnoses definitively. Furthermore, this PCR system also is able to exclude ocular infections as the potential cause of ocular disorders and, based on the confidence of the diagnosis, can be used to help design appropriate early treatments for ocular disease. Because it is important to be able to exclude noninfectious uveitis or endophthalmitis, the PCR-negative results can help to simplify the clinical workups in these cases. Additionally, because PCR examinations can be used to exclude infectious agents, this makes it easier to determine which cases are applicable for use of steroids. Although unfortunately this laboratory approach is not commercially available at the present time, we currently are pursuing plans to create a simple examination kit that can be used for ocular infectious diseases in the near future.

## References

1. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, et al. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. *Br J Ophthalmol* 2011;95:345–9.
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* 2008;92:928–32.
3. Sugita S, Iwanaga Y, Kawaguchi T, et al. Detection of herpesvirus genome by multiplex polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR in ocular fluids of patients with acute retinal necrosis. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2008;112:30–8.
4. Sugita S, Ogawa M, Inoue S, et al. Diagnosis of ocular toxoplasmosis by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiplex and quantitative real-time. *Jpn J Ophthalmol* 2011;55:495–501.
5. Sugita S, Kamoi K, Ogawa M, et al. Detection of *Candida* and *Aspergillus* species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012;250:391–8.
6. Ogawa M, Sugita S, Watanabe K, et al. Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012;250:1877–83.
7. Kido S, Sugita S, Horie S, et al. Association of varicella zoster virus load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. *Br J Ophthalmol* 2008;92:505–8.
8. Yamamoto S, Sugita S, Sugamoto Y, et al. Quantitative PCR for the detection of genomic DNA of Epstein-Barr virus in ocular fluids of patients with uveitis. *Jpn J Ophthalmol* 2008;52:463–7.
9. Ongkosuwito JV, Van der Lelij A, Bruinenberg M, et al. Increased presence of Epstein-Barr virus DNA in ocular fluid samples from HIV negative immunocompromised patients with uveitis. *Br J Ophthalmol* 1998;82:245–51.
10. Chodosh J, Gan Y-J, Sixbey JW. Detection of Epstein-Barr virus genome in ocular tissues. *Ophthalmology* 1994;104:705–8.
11. Kawaguchi T, Sugita S, Shimizu N, et al. Kinetics of aqueous flare, intraocular pressure and virus-DNA copies in a patient with cytomegalovirus iridocyclitis without retinitis. *Int Ophthalmol* 2007;27:383–6.
12. Miyanaga M, Sugita S, Shimizu N, et al. A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. *Br J Ophthalmol* 2010;94:336–40.
13. de Schryver I, Rozenberg F, Cassoux N, et al. Diagnosis and treatment of cytomegalovirus iridocyclitis without retinal necrosis. *Br J Ophthalmol* 2006;90:852–5.
14. Chee SP, Jap A. Presumed Fuchs heterochromic iridocyclitis and Posner-Schlossman syndrome: comparison of cytomegalovirus-positive and negative eyes. *Am J Ophthalmol* 2008;146:883–9.
15. Chee SP, Bacsal K, Jap A, et al. Corneal endotheliitis associated with evidence of cytomegalovirus infection. *Ophthalmology* 2007;114:798–803.
16. Koizumi N, Suzuki T, Uno T, et al. Cytomegalovirus as an etiologic factor in corneal endotheliitis. *Ophthalmology* 2008;115:292–7.
17. Sugita S, Shimizu N, Kawaguchi T, et al. Identification of human herpesvirus 6 in a patient with severe unilateral panuveitis. *Arch Ophthalmol* 2007;125:1426–7.
18. Vollmer T, Störmer M, Kleesiek K, et al. Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2008;46:1919–26.
19. Callewaert L, Aertsen A, Deckers D, et al. A new family of lysozyme inhibitors contributing to lysozyme tolerance in gram-negative bacteria. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000019.
20. Davis KM, Akinbi HT, Standish AJ, et al. Resistance to mucosal lysozyme compensates for the fitness deficit of peptidoglycan modifications by *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000241.