

ウイルス性網膜炎での眼検体を用いた polymerase chain reaction 法の診断的意義

永江 康信¹⁾, 中川やよい¹⁾, 田野 保雄¹⁾, 森 康子¹⁾²⁾, 青野 利哉³⁾

¹⁾大阪大学医学部眼科学教室, ²⁾大阪大学医学部細菌学教室, ³⁾東洋紡績(株)総合研究所

要 約

1995 年 1 月から 1996 年 12 月までの 2 年間に polymerase chain reaction (PCR) 法を使って, 眼検体(涙液, 前房水, 硝子体)で 8 種類のヘルペス科ウイルスのウイルス感染の有無を検索した。対象は, 網膜剥離 5 例, サイトメガロウイルス網膜炎 4 例, 眼悪性リンパ腫 1 例, 増殖性糖尿病網膜症 3 例の 13 例 22 眼 31 検体である。臨床的にウイルス性網膜炎と診断された 9 例 12 眼では, 涙液検体 12 眼中 1 眼(8%), 前房水検体 7 眼中 6 眼(86%), 硝子体検体 1 眼中 1 眼(100%)に病因ウイルス DNA が検出された。臨床的にウイルス性網膜炎が

ない対側眼では, 涙液検体 6 眼と前房水検体 1 眼中にはウイルス DNA は検出されなかった。ウイルス性網膜炎と考えにくい 4 例 4 眼では, 眼悪性リンパ腫の 1 眼にウイルス DNA が検出された。以上から, PCR 法はウイルス性網膜炎の確定診断に有効な方法であるが, 偽陽性の事例もあるために注意が必要であることと, 眼検体としては涙液よりも前房水および硝子体が有用であると結論される。(日眼会誌 102: 509—514, 1998)

キーワード: ウイルス性網膜炎, PCR 法, 眼検体, 偽陽性

The Diagnostic Significance of Polymerase Chain Reaction for Ocular Samples in Viral Retinitis

Yasunobu Nagae¹⁾, Yayoi Nakagawa¹⁾, Yasuo Tano¹⁾, Yasuko Mori¹⁾²⁾ and Toshiya Aono³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology Osaka University Medical School

²⁾Department of Microbiology Osaka University Medical School

³⁾Toyobo Research Center

Abstract

During the past two years we studied the incidence of infection by eight members of the herpesvirus family in ocular samples (tear fluid, the aqueous, and the vitreous) using the polymerase chain reaction (PCR). A total of 31 ocular samples were collected from 22 eyes of 13 patients. The series comprised five cases of acute retinal necrosis, four of cytomegalovirus retinitis, three of proliferative diabetic retinopathy, and one of ocular malignant lymphoma. In 12 eyes of 9 patients with viral retinitis, causative viral DNA was detected either from the tear fluid (1/12, 8%), the aqueous (6/7, 86%), or the vitreous (1/1, 100%). In the fellow eyes free of viral

retinitis, no viral DNA was detected in the samples (6 of tear fluid and one of the aqueous). Out of the other 4 patients without viral retinitis, viral DNA was detected in one patient with ocular malignant lymphoma. The findings show that PCR is a useful and sensitive method in the diagnosis of viral retinitis, but that it may give false positive results. The aqueous and the vitreous samples gave more positive results than tear fluid. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 509—514, 1998)

Key words: Viral retinitis, PCR, Ocular samples, False positive

I 緒 言

現在汎用されている polymerase chain reaction (PC-

R) 法は Saiki ら¹⁾によって開発されたものである。この PCR 法を利用したウイルス DNA の同定は確立された方法であり, 臨床診断に役立つことは既に多数報告^{2)~6)}

別刷請求先: 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2 大阪大学医学部眼科学教室 永江 康信

(平成 9 年 9 月 18 日受付, 平成 10 年 3 月 13 日改訂受理)

Reprint requests to: Yasunobu Nagae, M.D. Department of Ophthalmology Osaka University Medical School, 2-2 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka-fu 565-0871, Japan

(Received September 18, 1997 and accepted in revised form March 13, 1998)

表1 プライマーおよびプローブ

ウイルス	標的遺伝子	用途*	配列 (5' 3')	増幅産物長 (base pairs)	
				1st PCR	2nd PCR
HSV-1	精蛋白質 D	HSV-F	GTTTGTGTGTTGTTTCGGTCATAAGC	350	209
		HSV-R	GCGTAGTACACCGTGATCGGGA		
		HSV-F	GTTTGTGTGTTGTTTCGGTCATAACC		
		1-R2	TCCGCCATCTTGAGAGAGGCATCC		
		1-CP	AGCGCGAACGACCAACTACCCCGAT		
		1-DP	TCAGTTATCCTTAAGGTCTCTTTTG		
HSV-2	精蛋白質 D	HSV-F	GTTTGTGTGTTGTTTCGGTCATAAGC	331	277
		HSV-R	GCGTAGTACACCGTGATCGGGA		
		HSV-F	GTTTGTGTGTTGTTTCGGTCATAACC		
		2-R2	GGCTGAATGTGGTAAACACGCTTC		
		2-CP	TCCCAATCGATTTTCGCGGAAGAAC		
		2-DP	TTCCGGTTTTGGACCAGCTGACCGA		
VZV	DNA ポリメラーゼ	V-F1	GTTTCTCCCACTGGTACGTCAAG	460	356
		V-R1	CAGTGGCCGCTACGTATAAACAT		
		V-F2	GGCGAAATGTAGGATATAAAGGA		
		V-R2	ATCGCGGCTTGTGTTTGTCTAAT		
		V-CP	TTTACCACGCTAACGTTAAATTTTG		
		V-DP	TATGCCACCTTTACAGTTGGAG		
EBV	DNA ポリメラーゼ	E-F1	GCGGGCCAACACCAAGGT	392	313
		E-R1	AGGGCATGGGCAGGATAAA		
		E-F2	GGCCTCATCCCCATCGACATGTA		
		E-R2	AGAACACGCGGATCTGCTG		
		E-CP	AGAGATTGCCAAGATCGCTCACAT		
		E-DP	GCTAAACCATTTCGTGATCCACGT		
CMV	DNA ポリメラーゼ	C-F1	ATGCATGGCCAAGACTAACT	284	223
		C-R	TGTAGATACGGATCTGCTG		
		C-F2	CGGCAACGCAAGGATGACCTGTC		
		C-R	TGTAGATACGGATCTGCTG		
		C-CP	GTTCAACACCATTAAATTTTCACTACG		
		C-DP	ATTCCGTTGCGGCGTGTCATCTTT		
HHV-6A	主要カプシド 蛋白質	HHV-F	ATAATTGGCAATGAACACCGTT	762	579
		HHV-R	GATCCTTTTTGAGATGCCCAAGG		
		6A-F2	GTGCCTATTATACAGTTCCAGA		
		HHV-R	GATCCTTTTTGAGATGCCCAAGG		
		6A-CP	CCCCGGTTAGGACAAACTTAAC		
		6A-DP	AAATCGCCCCACACCCAAGAG		
HHV-6B	主要カプシド 蛋白質	HHV-F	ATAATTGGCAATGAACACCGTT	762	214
		HHV-R	GATCCTTTTTGAGATGCCCAAGG		
		6B-F2	GTCAACAAGCTATCTGCGAAGTCG		
		HHV-R	GATCCTTTTTGAGATGCCCAAGG		
		6-CP	CTCCGGTCACGACAATATAC		
		6-DP	AAATTGCCCCATAACCCCAAGAG		
HHV-7	主要カプシド 蛋白質	HHV-F	ATAATTGGCAATGAACACCGTT	762	350
		HHV-R	GATCCTTTTTGAGATGCCCAAGG		
		7-F2	TACACCAACCCTACTGTAAATAGT		
		HHV-R	GATCCTTTTTGAGATGCCCAAGG		
		7-CP	CTTTCGGTAAGATAAATAAGCAATCACAAT		
		7-DP	CATTACTCCAGTGACTTCCGATATTAATTT		

HSV-1: 単純ヘルペスウイルス 1 型, HSV-2: 単純ヘルペスウイルス 2 型, VZV: 水痘・帯状疱疹ウイルス, CMV: サイトメガロウイルス, EBV: エプスタイン・バーウイルス, HHV-6A: ヒトヘルペスウイルス 6A 型, HHV-6B: ヒトヘルペスウイルス 6B 型, HHV-7: ヒトヘルペスウイルス 7 型

* F: 1st polymerase chain reaction (PCR) および 2nd PCR の両方におけるフォワード・プライマー

R: 1st PCR および 2nd PCR の両方におけるリバース・プライマー

F1: 1st PCR におけるフォワード・プライマー, F2: 2nd PCR におけるフォワード・プライマー

R1: 1st PCR におけるリバース・プライマー, R2: 2nd PCR におけるリバース・プライマー

CP: 捕捉プローブ, DP: 検出プローブ

表 2

	HSV -1	HSV -2	VZV	EB	CMV	HHV -6A	HHV -6B	HHV -7
F1	HSV -F	HSV -F	V -F1	E -F1	C -F1	HHV -F	HHV -F	HHV -F
F2	HSV -F	HSV -F	V -F2	E -F2	C -F2	6A -F2	6B -F2	7 -F2
R2	1 -R2	2 -R2	V -R2	E -R2	C -R	HHV -R	HHV -R	HHV -R
R1	HSV -R	HSV -R	V -R1	E -R1	C -R	HHV -R	HHV -R	HHV -R

本研究で使用した nested 用のプライマーの全種類 (21本)を示す.

表 3

臨床診断			HSV -1	HSV -2	VZV	CMV	EBV	HHV -6A	HHV -6B	HHV -7
症例1	桐沢型ぶどう膜炎 (左)	涙液 (右)	-	-	-	-	-	-	-	-
		(左)	-	-	-	-	-	-	-	-
		前房水 (左)	-	-	+	-	-	-	-	-
		硝子体 (左)	-	-	+	-	-	-	-	-
症例2	桐沢型ぶどう膜炎 (両)	涙液 (右)	-	-	-	-	-	-	-	-
		(左)	-	-	-	-	-	-	-	-
		前房水 (右)	-	-	+	-	-	-	-	-
症例3	桐沢型ぶどう膜炎 (右)	涙液 (右)	-	-	+	-	-	-	-	-
		(左)	-	-	-	-	-	-	-	-
		前房水 (右)	-	-	+	-	-	-	-	-
症例4	桐沢型ぶどう膜炎 (右)	涙液 (右)	-	-	-	-	-	-	-	-
		(左)*	-	-	-	-	-	-	-	-
		前房水 (右)	-	-	-	-	-	-	-	-
		前房水 (左)*	-	-	-	-	-	-	-	-
症例5	桐沢型ぶどう膜炎 (右)	涙液 (右)	-	-	-	-	-	-	-	-
		(左)	-	-	-	-	-	-	-	-
		前房水 (右)	-	-	+	-	-	-	-	-
症例6	サイトメガロウイルス網膜炎(両)	涙液 (右)	-	-	-	-	-	-	-	-
		(左)	-	-	-	-	-	-	-	-
		前房水 (右)	-	-	-	+	-	-	-	-
症例7	サイトメガロウイルス網膜炎(両)	涙液 (右)	-	-	-	-	-	-	-	-
		(左)	-	-	-	-	-	-	-	-
症例8	サイトメガロウイルス網膜炎(右)	涙液 (右)	-	-	-	-	-	-	-	-
		(左)	-	-	-	-	-	-	-	-
		前房水 (右)	-	-	-	+	-	-	-	-
症例9	サイトメガロウイルス網膜炎(左)	涙液 (右)	-	-	-	-	-	-	-	-
		(左)	-	-	-	-	-	-	-	-
症例10	眼悪性リンパ腫 (右)	硝子体 (右)	-	-	+	+	-	-	-	-
症例11	増殖性糖尿病網膜症(両)	硝子体 (右)	-	-	-	-	-	-	-	-
症例12	増殖性糖尿病網膜症(両)	硝子体 (右)	-	-	-	-	-	-	-	-
症例13	増殖性糖尿病網膜症(両)	硝子体 (左)	-	-	-	-	-	-	-	-

* : 症例 4 の左眼は, 既往歴から桐沢型ぶどう膜炎で失明, 現在, 活動性なし.

されている通りである. その特異性はいずれの報告でも高く, 十分臨床診断に有用である. しかし, 過去のいずれの報告もヘルペス科ウイルスの 3~5 種類を検討しているにすぎず, ウイルス性網膜炎では眼検体の採取部位別検討はされていない. 今回, 我々は現在知られている 8 種

類のヘルペス科ウイルス DNA に対して, 眼検体採取部位別に PCR 法を施行した 13 例 22 眼 31 検体について, PCR 法の診断的意義, すなわち有用性と留意点を明確にすることを目的とした.

II 実験方法

対象症例は、1995年1月から1996年12月までの2年間に、大阪大学医学部附属病院眼科で臨床的にウイルス性網膜炎と診断された9例と眼悪性リンパ腫1例および増殖性糖尿病網膜症3例で、計22眼31検体である。PCR法の検体は、患者の涙液、前房水、硝子体を用いた。採取に際し、患者への十分な説明と患者の同意を得た。涙液採取は点眼麻酔後、清潔操作で、小短冊に切断したシルマー試験紙の断片を下方の結膜嚢に5,6秒静置し、涙液を十分しみ込ませたのち、清潔な生理食塩水100 μ l入りの小試験管内に入れた。前房水は十分な点眼麻酔後、27ゲージ針をつけた1mlのデイスポーザブル注射器を用いて顕微鏡下で慎重に約0.2ml採取した。処置後はオフロキサシン眼軟膏を点入し、圧迫眼帯を施行した。硝子体は、原則として硝子体手術の開始直後に、眼内灌流を始める前にコアビトレクトミーを行って採取した。いずれの検体も-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

PCR法は、ヘルペス科ウイルスDNAを検出する目的で、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2型(HSV-2)、水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)、サイトメガロウイルス(CMV)、Epstein-Barr virus(EBV)、ヒトヘルペスウイルス6A,6B,7(HHV-6A, HHV-6B, HHV-7)の各種プライマー⁷⁾を用いた nested-PCR法を施行した(表1, 2)。

1) サンプルからのDNAの抽出法

検体を95 $^{\circ}$ C10分間加熱して、その5 μ lをPCR法の検体とした。

2) 反応液組成: x10 Tth buffer 5 μ l, 2mM dNTPs 4 μ l, Primer 各0.5 μ M, Tth DNA polymerase (TOYOBO) 2 units, 検体5 μ l(nested PCR時は1st PCR産物を0.5 μ l)を蒸留水で計50 μ lに調節した。

3) 反応条件: 94 $^{\circ}$ C1分, 55 $^{\circ}$ C2分, 75 $^{\circ}$ C1.5分, 40 cycles (single), さらにプライマーの位置を変えて, 94 $^{\circ}$ C1分, 55 $^{\circ}$ C2分, 75 $^{\circ}$ C1.5分, 40 cycles(nested)を行った。アガロースゲルで電気泳動して、各バンドを確認した。なお、ベータアクチンを陽性対照として置いており、全例で検出されていることを確認した。

4) 特異検出: 陽性のバンドが得られた場合はハイブリダイゼーションを施行し、PCR法の結果を確認した。ハイブリダイゼーションの方法は、各PCR産物20 μ lをTE-bufferで20倍に希釈し、50 μ lずつ8本に分けて、DNAプローブ自動測定システム(TOYOBO)⁸⁾を用いてハイブリダイゼーションを実施し(DNAプローブは表1参照)、10 kilo counts per second以上の出力が得られた検体を陽性と判定した。

III 結果

全13例22眼31検体の結果を一覧表に示した(表3)。

典型的な眼所見から臨床的にウイルス性網膜炎と診断した9例(症例1~9)12眼においては、涙液検体12眼中1眼(8%)、前房水検体7眼中6眼(86%)、硝子体検体1眼中1眼(100%)に病因ウイルスDNAが検出された。臨床的に検体採取時にウイルス性網膜炎が存在しないと考えられた対側眼では、涙液検体6眼および前房水検体1眼においてウイルスDNAは全く検出されなかった。一方、臨床的にウイルス性網膜炎と考えにくい4例(症例10~13)4眼中、1眼(25%)にウイルスDNAが検出された。その内訳は次のようである。悪性リンパ腫を疑って細胞診のため、硝子体検体を採取した症例10で同時にウイルス学的検索を行ったところ、水痘・帯状疱疹ウイルス、CMVの2種類のウイルスDNAが検出された。3眼の増殖性糖尿病網膜症(症例11~13)の硝子体検体を検索したが、ウイルスDNAは検出されなかった。PCR法のアガロースゲルで得られた陽性のバンドは、全例ハイブリダイゼーションを施行し、両者の陽性バンドが一致したことを確認した。

IV 考 按

眼検体(涙液、前房水、硝子体)のPCR法によるヘルペス科ウイルスDNAの検索は、臨床的にウイルス性網膜炎と診断した9例中6例67%が陽性であった。眼内検体(前房水および硝子体)に限定すると、7例中6例86%と高い特異性を呈した。検体の採取部位によってその陽性率はかなり差があり、涙液では8%と著しく低く、前房水では86%、硝子体では100%であった。したがって、ウイルス性網膜炎などの眼内病変の診断には涙液検体による検索は無効であり、眼内検体(前房水もしくは硝子体)の検索が必要ことが確認された。ウイルス性網膜炎は、その炎症が網膜面から硝子体に波及し、さらに、前房炎症を惹起すると一般的に考えられており、前房炎症が比較的強い時期に採取した前房水からはウイルスDNAが検出されたと考えられる。そこで、臨床病期別の各眼内検体とPCR法の結果を検討してみた。症例4以外の6例は、いずれも典型的なウイルス性網膜炎の眼底所見を認め、症例1の硝子体検体を除くと、抗ウイルス薬の点滴投与前に眼内検体の採取が可能であった。このように、最盛期に採取した眼内検体のPCR法の陽性率は6例中6例が陽性と100%であった。したがって、今回の検査法は、眼内検体に限ると極めて特異性が高い方法といえよう。

前房水検体が陰性であった症例4の右眼は、臨床的に桐沢型ぶどう膜炎の診断で、既に前医で抗ウイルス薬、ステロイド薬が投与されており、前房炎症が軽度だったため前房水からはウイルスDNAが検出されなかったと思われる。他眼が失明していたためと、硝子体混濁が軽度で網膜病変も治療に反応したため硝子体生検は行わなかった。症例7は3歳の幼児で、前房穿刺の侵襲の大きさを考慮し、涙液採取だけに留めた。症例4の右眼では硝子体検

体, 症例 7, 9 では前房水検体で PCR 法を行えば, 病因ウイルス DNA が検出された可能性が高いと考えられた。

以上から, 今回我々が施行した PCR 法は, ウイルス性網膜炎の診断に非常に有用な検査法であるが, 検体の採取部位, 採取時期により結果に差が出ることが明らかとなった。したがって, PCR 法によるウイルス性網膜炎の診断のためには, 眼検体の採取部位は涙液のみでは不十分であり, 治療前や前房炎症がある程度ある時期に眼内検体(前房水・硝子体)を採取し, 積極的な病因検索を行うべきであると考えている。ただし, 硝子体生検による硝子体検体の採取は, 硝子体手術の進歩により安全に行えるようになったが, 前房穿刺に比べると侵襲が大きいいため, 個々の症例で十分検討する必要があると思われる。

PCR 法によるウイルス性網膜炎の診断の留意点として, 今回の症例 10 のように, ウイルス性網膜炎と考えにくい症例にウイルス DNA が検出された場合である。このような潜在性の感染例として, HHV-6 がヒト網膜から検出されているが, 病因ウイルスとは断定されていないという報告⁹⁾もあり, 病因でないウイルス DNA が検出されても不思議ではない。症例 10 は, 硝子体生検で B-cell 型非ホジキンリンパ腫と確定診断がつき, 放射線治療により腫瘍性の眼底病変は治癒したので, ウイルス性網膜炎の併発は考えられない。リンパ球数などは正常であるが, 原疾患およびステロイド療法の影響により潜在していた水痘・帯状疱疹および CMV の DNA が硝子体検体から検出されたと考えている。PCR 法の結果, 陽性と出たからといってウイルス性網膜炎と診断するのではなく, あくまで臨床症状を考慮し, 慎重に診断することが重要である。

PCR 法はごく少量の臨床検体からウイルス DNA を感度よく検出できる非常に有効な診断方法であり, 大量の検体採取が困難な眼科領域では特に有用であり, ウイルス性眼疾患の診断に主として応用されており^{2)~6)}, その他, トキソプラズマ症¹⁰⁾とトラコーマ感染症¹¹⁾の診断にも有用である。この方法の眼科領域での今後の応用として, 検体の処理を工夫して nested-PCR 法と同検体で mRNA-PCR を応用してさらに感度を上げ, より早期にウイルス感染を検出すること¹²⁾や, 他科領域では真菌, 細菌感染症の診断へ応用されているが^{13)~16)}, 眼科では真菌性および細菌性眼内炎の診断への PCR 法の応用はまだ立ち遅れていると思われる。PCR 法で抗酸菌が検出された報告¹⁷⁾¹⁸⁾もみられるが, 今後, 眼内の真菌, 細菌感染症への PCR 法の応用が容易にできるようになれば, 眼感染症の診断と治療に大いに役立つと思われる。

文 献

- 1) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350—1354, 1985.
- 2) 原 吉幸, 山本修士, 岡本茂樹, 李 三榮, 佐々木由紀, 中川やよい, 他: PCR 法を用いたぶどう膜炎の診断. *あたらしい眼科* 7: 1819—1822, 1990.
- 3) Fox GM, Crouse CA, Chuang EL, Pflugfelder SC, Cleary TJ, Nelson SJ, et al: Detection of herpesvirus DNA in vitreous and aqueous specimens by the polymerase chain reaction. *Arch Ophthalmol* 109: 266—271, 1991.
- 4) 山本修士, 下村嘉一, 原 吉幸, 大橋裕一, 木下 茂, 岡本茂樹, 他: PCR 法によるウイルス感染症へのアプローチ. *眼紀* 42: 816—821, 1991.
- 5) Mitchell SM, Fox JD, Tedder RS, Gazzard BG, Lightman S: Vitreous fluid sampling and viral retinitis in patients with AIDS. *J Med Virol* 42: 336—340, 1994.
- 6) Mitchell SM, Fox JD: Aqueous and vitreous humor samples for the diagnosis of cytomegalovirus retinitis. *Am J Ophthalmol* 120: 252—253, 1995.
- 7) 青野利哉, 山西弘一: ウイルスゲノムの検出・解析 2. ヘルペスウイルス. *蛋白質核酸酵素* 41: 669—675, 1996.
- 8) 吉本 操: 化学発光法による DNA プローブ自動測定システムの開発. *日本臨床検査自動化学会誌* 20: 728—731, 1995.
- 9) Reux I, Fillet AM, Agut H, Katlama C, Hauw JJ, LeHoang P: *In situ* detection of human herpesvirus 6 in retinitis associated with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol* 114: 375—377, 1992.
- 10) Brezin AP, Kasner L, Thulliez P, Li Q, Daffos F, Nussenblatt RB, et al: Ocular toxoplasmosis in the fetus. Immunohistochemistry analysis and DNA amplification. *Retina* 14: 19—26, 1994.
- 11) Bobo L, Munoz B, Viscidi R, Quinn T, Mkocho H, West S: Diagnosis of Chlamydia trachomatis eye infection in Tanzania by polymerase chain reaction/enzyme immunoassay. *Lancet* 338: 847—850, 1991.
- 12) Lynas C, Cook SD, Laycock KA, Bradfield JW, Maitland NJ: Detection of latent virus mRNA in tissues using the polymerase chain reaction. *J Pathol* 157: 285—289, 1989.
- 13) Robert F, Lebreton F, Bougnoux ME, Paugam A, Wassermann D, Schlotterer M, et al: Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. *J Clin Microbiol* 33: 2366—2371, 1995.
- 14) Takeuchi H, Yamamoto S, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Okada Y, et al: Detection of *Proteus mirabilis* urease gene in urinary calculi by polymerase chain reaction. *Int J Urol* 3: 202—206, 1996.

- 1) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site

- 15) Patel RJ, Fries JW, Piessens WF, Wirth DF: Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 28:513—518, 1990.
- 16) Schluger NW, Rom WN: The polymerase chain reaction in the diagnosis and evaluation of pulmonary infections. Am J Respir Crit Care Med 152: 11—16, 1995.
- 17) Kotake S, Kimura K, Yoshikawa K, Sasamoto Y, Matsuda A, Nishikawa T, et al: Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in ocular tuberculosis. Am J Ophthalmol 117:805—806, 1994.
- 18) 種元桂子, 石川宏志, 気賀沢一輝, 尾羽沢大, 布施川久恵, 宮地勇人, 他: 眼脂および胃液から polymerase chain reaction 法により抗酸菌が検出された強膜炎の 1 例. 日眼会誌 101:97—101, 1997.