

# 急性網膜壊死患者眼内液の多項目迅速ウイルス polymerase chain reaction (PCR) および real-time PCR 法 によるヘルペスウイルス遺伝子同定

杉田 直<sup>1)</sup>, 岩永 洋一<sup>1)</sup>, 川口 龍史<sup>1)</sup>, 二神 百合<sup>1)</sup>, 堀江真太郎<sup>1)</sup>  
白井 友香<sup>1)</sup>, 山本紗也香<sup>1)</sup>, 菅本 良治<sup>1)</sup>, 望月 學<sup>1)</sup>, 清水 則夫<sup>2)</sup>  
渡邊 健<sup>2)</sup>, 水上 美樹<sup>2)3)</sup>, 森尾 友宏<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>東京医科歯科大学眼科学教室, <sup>2)</sup>東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス学, <sup>3)</sup>東京医科歯科大学細胞治療センター

## 要 約

**目 的**：ヒトヘルペスウイルス (HHV) は現在 1~8 までの型が知られている。今回, HSV1 (単純ヘルペスウイルス 1 型, HHV1), HSV2 (単純ヘルペスウイルス 2 型, HHV2), VZV (帯状疱疹ウイルス, HHV3) およびそれ以外の HHV が急性網膜壊死の病因に関与しているかを検討する目的で, 眼内液の HHV ゲノムの同定を polymerase chain reaction (PCR) 検査法にて行った。

**対象と方法**：2001 年から 2006 年までの 6 年間, 当院において急性網膜壊死と診断され凍結保存されていた検体または新鮮検体合計 14 例 14 眼からの 19 検体 (硝子体 12 検体, 前房水 7 検体) について HHV1~HHV8 型の定性 PCR 法 (多項目迅速ウイルス PCR) と, 陽性の検体は real-time PCR を用いてその陽性ウイルスの定量を行った。

**結 果**：臨床所見から急性網膜壊死と診断されたすべての症例の眼内液から HSV か VZV のいずれかが同定された。その内訳は, 19 検体中, VZV, HSV1, HSV2 陽性はそれぞれ 16 例 (84%), 1 例 (5%), 2 例 (11%) であった。定量 PCR にてウイルスコピー数を確認したと

ころ, いずれもウイルス DNA が高コピー数であった。また硝子体と前房水検体のウイルス量を比較したところ, 硝子体検体が有意に高かった。他のヘルペスウイルスでは, Epstein-Barr virus (EBV, HHV4) の共感染が 19 検体中 9 検体 (47%) にみられた。眼科疾患との関連性が明らかでない HHV6, 7, 8 についてはいずれも陰性であった。一方, すべての患者の血清中にはこれらのヘルペスウイルス DNA が検出されなかった。

**結 論**：従来から言われているように HHV1~3 が急性網膜壊死の病因ウイルスで, 病態形成に関与していることが確認された。多項目迅速ウイルス PCR 法は同時に多くのウイルスを迅速に同定可能で, real-time PCR 法はウイルス量の判定に有用であった。急性網膜壊死のように迅速かつ正確な診断が求められる症例ではこれらの PCR 検査は有用であると思われた。(日眼会誌 112 : 30-38, 2008)

**キーワード**：急性網膜壊死, ヘルペスウイルス, 眼内液, 定性 PCR 法, 定量 PCR 法

## Detection of Herpesvirus Genome by Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-time PCR in Ocular Fluids of Patients with Acute Retinal Necrosis

Sunao Sugita<sup>1)</sup>, Youichi Iwanaga<sup>1)</sup>, Tatsushi Kawaguchi<sup>1)</sup>, Yuri Futagami<sup>1)</sup>, Shintaro Horie<sup>1)</sup>  
Tomoka Usui<sup>1)</sup>, Sayaka Yamamoto<sup>1)</sup>, Yoshiharu Sugamoto<sup>1)</sup>, Manabu Mochizuki<sup>1)</sup>  
Norio Shimizu<sup>2)</sup>, Ken Watanabe<sup>2)</sup>, Miki Mizukami<sup>2)3)</sup> and Tomohiro Morio<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology & Visual Science, <sup>2)</sup>Department of Virology, Medical Research Institute,  
and <sup>3)</sup>Center for Cell Therapy, Tokyo Medical and Dental University

## Abstract

**Purpose** : The human herpesvirus (HHV) family consists of types 1 to 8 (HHV1-8). The purpose of this study was to investigate the detection of HHV DNA, especially HSV1 (herpes simplex virus 1, HHV1),

HSV2 (herpes simplex virus 2, HHV2), and VZV (varicella-zoster virus, HHV3) in ocular fluids of patients with acute retinal necrosis (ARN).

**Methods** : The intraocular genome for HHV1-8

別冊請求先 : 113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学眼科学教室 望月 學  
(平成 18 年 4 月 24 日受付, 平成 19 年 8 月 24 日改訂受理)

Reprint requests to : Manabu Mochizuki, M. D. Ph. D. Department of Ophthalmology & Visual Science, Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Medicine, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

(Received April 24, 2006 and accepted in revised form August 24, 2007)

was determined in 19 ocular fluid samples (12 vitreous fluid and 7 aqueous humor samples) taken from ARN patients (n=14). The samples were tested for the presence of virus DNA by two systems of polymerase chain reaction (PCR) : the multiplex PCR screening test and real-time quantitative PCR.

**Results :** Multiplex PCR demonstrated VZV (n = 16, 84%), HSV1 (n = 1, 5 %) or HSV2 (n = 2, 11%) genomic DNA in all the samples. In real-time PCR, a high copy number of virus DNA was detected. The virus DNA-positive samples contained Epstein-Barr virus (EBV, HHV4) DNA in 9 of 19 samples (47%). No HHV6-8 DNA was detected in the ocular samples, and no virus

DNA was detected in the serum samples.

**Conclusions :** The genome for HHV1-3 was detected in the patients with ARN. All cases contained a high copy number for the virus DNA that indicates viral replication. PCR systems are useful for determining whether virus infections are associated with uveitis.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 112 : 30-38, 2008)

**Key words :** Acute retinal necrosis, Herpesvirus, Ocular fluids, Qualitative PCR, Quantitative PCR

## I 緒 言

近年、ウイルス学や分子生物学の進歩により眼科領域でも原因不明の疾患にウイルスが関与していることが判明した。その中心はヘルペスウイルス属で、例えば当初は原因が不明であった急性網膜壊死(桐沢型ぶどう膜炎)は水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)あるいは単純ヘルペスウイルス(HSV1, HSV2)感染が病因であることが明らかにされた。これにより急性網膜壊死に抗ウイルス薬を中心とした治療が導入され飛躍的に進歩したが、しかし未だに視機能低下を完全に避けることは不可能である。その理由の一つとして、診断とそれに伴う治療が遅れた場合、進行した網膜や視神経の障害を回避させることが困難なことがあげられる。ヘルペスウイルス属には単純ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルスだけではなく、多くの種類が同定されている。主に日和見感染で認められるサイトメガロウイルス(CMV)、ぶどう膜炎でしばしば認められるEBウイルス(Epstein-Barr virus : EBV)、また眼科疾患関連性が未だ分かっていないHHV6, HHV7, HHV8などがヘルペスウイルス属として含まれる。今回、我々はヘルペスウイルス属の定性polymerase chain reaction (PCR) 検査システムを確立し、急性網膜壊死患者眼局所からウイルスを迅速に、かつ多くの種類のウイルスを同時に同定する検査システムを開発した。またそのウイルス陽性検体を用いて real-time PCR 法によりウイルスゲノム数を測定する定量PCR法を行い、正確な診断とそれに基づく適切な治療を行うことを目的とした。

## II 対象および方法

### 1. 眼内液採取

眼内液は2001年から2006年までの6年間、当院において急性網膜壊死と診断され凍結保存されていた検体または新鮮検体合計14例14眼からの19検体(硝子体12検体、前房水7検体)である。これらの眼内液はイン

フォームド・コンセントの得られた患者から採取した。対照として、活動性眼内炎症を認めていた14例のぶどう膜炎(サルコイドーシス4例、Vogt-小柳-原田病2例、特発性ぶどう膜炎8例)の硝子体または前房水も使用した。眼内液の採取は学内の倫理委員会の承認を得て行った。

### 2. 核酸抽出

前房水、硝子体液は自動核酸抽出機 BioRobot E21 を使用しEZ1 Virus Mini Kit(キアゲン社)を用いて核酸を抽出した。血液はEZ1 Blood 200  $\mu$ l kit(キアゲン社)を用いて磁気ビーズ法にてDNAを抽出した。

### 3. 定性PCR法検査

検討したヘルペスウイルス属はHSV1(HHV1)、HSV2(HHV2)、VZV(HHV3)、EBV(HHV4)、CMV(HHV5)、HHV6, HHV7, HHV8で、また慢性感染症として最近注目されているBKウイルス(BKV, Polyomavirus科)、JCウイルス(JCV, Polyomavirus科)、パルボウイルスB19(PVB19, Parvovirus科)についても検討した。多項目迅速ウイルスPCR法(マルチプレックスPCR法)を用いて上記11種類のウイルスを同時にスクリーニングした。AccuPrime Taq(インビトロジェン社)を用いてそれぞれのウイルス特異的プライマーを混合して、リアルタイムPCRのLightCycler<sup>®</sup>(ロシュ社)で多項目迅速ウイルスPCR(マルチプレックスPCR)を行った。11種類のウイルスを2組に分けて下記の2つのキャピラリーを用いて同時に検査した。キャピラリーA : HSV1, HSV2, VZV, PVB19, HHV6, CMV, BKV, JCV. キャピラリーB : EBV, HHV7, HHV8. PCR条件は、denature 95 $^{\circ}$ C 2秒, PCR 95 $^{\circ}$ C 2秒, 58 $^{\circ}$ C 15秒, 72 $^{\circ}$ C 15秒を40サイクル, extension 40 $^{\circ}$ C 30秒行った。その後、ハイブリダイゼーションプロブの混合液とPCR産物を混合し、melting Curve解析を行い、ウイルスの検出を行った。これらはTm値(melting temperature, 融解温度)が重ならないように設定したプロブによってウイルスの種類を判定した。

melting Curve 解析とは、実際には 95°C で PCR 産物を一本鎖にしたところから 40°C に温度を下げてプローブとハイブリダイズさせると FRET (fluorescence resonance energy transfer) により蛍光が発せられる。再び温度を徐々に上昇させながら蛍光強度をモニタリングしていくと FRET により発する蛍光が上昇温度により各種ウイルスプローブ固有の T<sub>m</sub> 値に達したところで FRET が解消し消光する。時間に対する蛍光強度グラフを微分して得られた異なる各種ウイルスプローブのピーク値によってウイルス種を判定することができる。なお、HSV の検出に関しては、プライマーは HSV1 と HSV2 の両方の型に共通な部分に設定している。しかし、プローブは HSV2 のゲノム配列とは完全一致しているのに対し、HSV1 のゲノム配列とは 2 塩基不一致となっている。そのため、HSV2 陽性の場合には HSV1 陽性の場合よりも T<sub>m</sub> 値がおおよそ 15°C 低くなり、両者を明確に判別できる。また、BKV と JCV も同様の原理により判別できる検査系となっている。プライマー配列、プローブ配列、ウイルス増幅領域を表 1 にまとめた。

4. 定量 PCR 検査

定性 PCR で陽性と判定されたウイルスに関しては、そのウイルスゲノムの定量 PCR を行った。PCR 試薬として AmpliTaq Gold (ABI 社) を用いて、7300 system で定量 PCR を行った (real-time PCR, ABI 社)。サンプルから抽出した核酸溶液 5 μl を PCR 反応液 (10x buffer, dNTP, primer probe MIX, MgCl<sub>2</sub>, AmpliTaq Gold, ROX reference, Nucrease free water) に加え、denature 95°C 10 分, PCR 95°C 15 秒, 60°C 60 秒の条件で 45 サイクル行った。偽陽性を避ける目的で、プライマーとプローブ配列は多項目迅速ウイルス PCR 法とは全く異なるように設定した。スタンダードは陽性の PCR 産物を pGEM-T vector (Promega Corporation) に組み込んだプラスミドを、東京医科歯科大学のシーケンサービスにて ABI3130xl genetic analyzer (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) で配列を確認した後、プラスミドを制限酵素で鎖状にし、DNA 濃度よりコピー数を算出して用いた。

III 結 果

1. 多項目迅速ウイルス PCR 検査結果

多項目迅速ウイルス PCR 検査により、臨床所見から急性網膜壊死と診断された 14 例すべての眼内液から HSV か VZV のいずれかが同定された (表 2)。その内訳は、HSV1 が 1 例 (5%)、

表 1 多項目迅速ウイルス polymerase chain reaction (PCR) 検査(マルチプレックス PCR) : 検査したウイルス項目とその増幅領域、使用したプライマーとプローブ配列

ウイルス項目	PCR 増幅領域	プライマー配列	プローブ配列	文献番号
HSV1 & 2 (Herpes simplex virus, HHV1 & 2)*	polymerase	F : GCTCGAGTGCAGAAAAACGGTTC R : TCGGGTTGATAAACGCGCAGT	3'FITC : GCGCACAGATCCACGGCCCTTGATGAGC LcRed604-5' : CTTGCCCGCAGATGACGCG	1
VZV (Varicella-Zoster virus, HHV3)	gene 29	F : TGTCTAGAGGAGGTTTATCTG R : CATCGTCTGTAAGACTTAACCAG	3'FITC : GGGAAATCGAGAAACACCCCTATCCGAC LcRed640-5' : AAGTTCGGGTATAATTGTCAGT	2
EBV (Epstein-Barr virus, HHV4)	BamHI	F : CGCATAATGGCGACCTAG R : CAAACAAGCCACTCCCC	3'FITC : AAAGATAGCAGCAGCGCAGC LcRed640-5' : AACCATAGACCCGCTTCCTG	なし
CMV (Cytomegalovirus, HHV5)	CMV glycoprotein	F : TACCCCTATCGCGTGTGTC R : ATAGGAGGCGCCACGTAATC	3'FITC : TCGTCGTAGCTACGTTACAT LcRed705-5' : ACACCACTTATCTGCTGGCAGC	3
HHV6 (Human herpes virus 6, HHV6)	101k gene region	F : ACCCGAGAGATGATTTTGGC R : GCAGAAGACAGCAGCGAGAT	3'FITC : TAAGTAACCGTTTTCCGTCCTCC LcRed705-5' : GGGTCATTTATGTTATAGA	4
HHV7 (Human herpes virus 7, HHV7)	U57	F : GAAAAATCCGCCATAATAGC R : ATGGAACACCTATTAACGGC	3'FITC : GCCATAAGAAACAGTACAGACATGTGCA LcRed705-5' : TTGTGAAATGTTGTGGG	5
HHV8 (Human herpes virus 8, HHV8)	EB BDLF1 ORF26	F : AGCCGAAAGGATTCACCCAT R : TCCCGTGTGCTACGTCACG	3'FITC : CCGATGATGTAATAATGGCGGAAC LcRed705-5' : TGATCTATATACCACCAATGTTCAATTTATG	6
BKJC (BK virus + JC virus)*	VP2	F : CACTTTTGGGGACCTAGT R : CTCTACAGTAGCAAGGGATGC	3'FITC : TCTGAGGCTGCTGCCACAGGATTTT LcRed705-5' : AGTAGCTGAAAATTGCTGGAGAGGCTGCT	7
PVB19 (Parvovirus B19)	NS1	F : CCGCCAAAGTACAGGAAAAAC R : CAGCTACACTTCCACCGCA	3'FITC : GCAAAAAGCCATTTTAGCGGGGCA LcRed640-5' : CACCAGGGTAGATCAAAAAATGCGGTGGA	8

\*HSV1 & 2 はプライマーは共通部分に設定しているが、プローブは一致しないように設定。そのため T<sub>m</sub> 値に差が生まれ、HSV1 と HSV2 を判定できるシステムになっている。BKJC に関して同様に別々に判定できるようにしている。EBV (BamHI) は株式会社日本遺伝子研究所にて設計したものを使用した。

表 2 急性網膜壊死および対照ぶどう膜炎患者眼内液を用いた多項目迅速ウイルス PCR 検査結果

症例, 年齢, 性	診断名	サンプル	多項目迅速ウイルス PCR 検査結果											
			HSV1	HSV2	VZV	EBV	CMV	HHV6	HHV7	HHV8	BKV	JCV	PVB19	
症例 1, 82 歳, 女性	急性網膜壊死	VF	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 2, 61 歳, 男性	急性網膜壊死	VF	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	急性網膜壊死	AH	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 3, 27 歳, 女性	急性網膜壊死	VF	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 4, 44 歳, 男性	急性網膜壊死	VF	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 5, 39 歳, 男性	急性網膜壊死	VF	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 6, 40 歳, 男性	急性網膜壊死	VF	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 7, 70 歳, 女性	急性網膜壊死	VF	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	急性網膜壊死	AH	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 8, 46 歳, 男性	急性網膜壊死	VF	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	急性網膜壊死	AH	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 9, 42 歳, 男性	急性網膜壊死	VF	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	急性網膜壊死	AH	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 10, 16 歳, 男性	急性網膜壊死	VF	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 11, 68 歳, 男性	急性網膜壊死	VF	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	急性網膜壊死	AH	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 12, 47 歳, 男性	急性網膜壊死	AH	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 13, 55 歳, 女性	急性網膜壊死	AH	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 14, 72 歳, 男性	急性網膜壊死	AH	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 15, 47 歳, 女性	サルコイドーシス	VF	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 16, 68 歳, 女性	サルコイドーシス	VF	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 17, 70 歳, 女性	サルコイドーシス	VF	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 18, 44 歳, 女性	サルコイドーシス	VF	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 19, 39 歳, 男性	原田病	AH	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 20, 34 歳, 女性	原田病	AH	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 21, 55 歳, 女性	特発性ぶどう膜炎	VF	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 22, 29 歳, 男性	特発性ぶどう膜炎	VF	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 23, 42 歳, 男性	特発性ぶどう膜炎	VF	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 24, 77 歳, 女性	特発性ぶどう膜炎	VF	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 25, 61 歳, 男性	特発性ぶどう膜炎	VF	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 26, 50 歳, 女性	特発性ぶどう膜炎	AH	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 27, 35 歳, 女性	特発性ぶどう膜炎	AH	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
症例 28, 61 歳, 女性	特発性ぶどう膜炎	AH	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

急性網膜壊死と診断された 14 症例(平均年齢 50 歳)と対照のぶどう膜炎群(平均年齢 51 歳)のヘルペスウイルス属定性 PCR の結果のまとめを示した。

VF: 硝子体液, AH: 前房水, BKV: BK ウイルス, JCV: JC ウイルス, PVB19: パルボウイルス B19.

HSV2 が 2 例 (11%), VZV が 16 例 (84%) 陽性であった。他のヘルペスウイルスでは、EBV の共感染が 19 検体中 9 検体 (47%) でみられた。また、CMV の共感染は 19 検体中 1 検体 (5%) にみられた。眼科疾患との関連性がはっきりしていない残りのヘルペスウイルス属 HHV6, HHV7, HHV8 はいずれの検体においてもそのゲノムは検出されなかった。また、移植患者や免疫不全患者、慢性感染症でしばしば検出される BK ウイルス、JC ウイルス、パルボウイルス B19 はいずれも陰性だった。一方、対照のぶどう膜炎群では、1 例の特発性ぶどう膜炎の前房水から VZV が陽性 (1/14, 7%) で、サルコイドーシス 1 例のみ (1/14, 7%) で硝子体液中 EBV が陽性であった (表 2)。残りのウイルスはすべて陰性であった。また、急性網膜壊死および対照のぶどう膜炎のいずれの患者においても血清中にはこれらのヘルペスウイルス DNA が検出されなかった。

## 2. 定量 PCR 検査結果

次に、上記の定性 PCR 検査で陽性検体に対して real-time PCR 法を用いて定量 PCR を行った。その硝子体検体検査の結果のまとめを表 3 に、前房水検体検査の結果のまとめを表 4 に示した。定量 PCR ではいずれの硝子体検体からも HSV1, HSV2, VZV DNA が 1 ml 中  $10^5$  レベルから  $10^7$  レベルといずれも高コピー数が検出された。一方、EBV は 1 例を除くほとんどが測定限界以下 (50 コピー以下) であった (表 3)。前房水検体でも同様に、VZV DNA は高コピー数を示し、その前房水のコピー数は  $10^2$ /ml ~  $10^6$ /ml と幅広い値であった (表 4)。しかし、前房水定性 PCR で EBV DNA が 3 検体で陽性、CMV が 1 検体で陽性を示していたが、それらを定量 PCR で検討したところ、そのウイルスゲノムは測定限界以下 (50 コピー以下) であった (表 4)。対照のぶどう膜炎群で VZV が 1 例、EBV が 1 例ずつ定性 PCR で陽



表 3 急性網膜壊死患者の定量 PCR 結果(硝子体)

症例	最終診断名	定性 PCR	定量 PCR
症例 1	急性網膜壊死 (VZV)	VZV	VZV ( $6.0 \times 10^7$ copies/ml)
症例 2	急性網膜壊死 (VZV)	VZV, EBV	VZV ( $4.0 \times 10^7$ copies/ml), EBV ( $7.3 \times 10^3$ copies/ml)
症例 3	急性網膜壊死 (HSV2)	HSV2	HSV2 ( $1.3 \times 10^6$ copies/ml)
症例 4	急性網膜壊死 (VZV)	VZV, EBV	VZV ( $1.9 \times 10^6$ copies/ml), EBV (50 copy 以下)
症例 5	急性網膜壊死 (HSV1)	HSV1, EBV	HSV1 ( $2.2 \times 10^6$ copies/ml), EBV (50 copy 以下)
症例 6	急性網膜壊死 (VZV)	VZV, EBV	VZV ( $9.4 \times 10^6$ copies/ml), EBV (50 copy 以下)
症例 7	急性網膜壊死 (VZV)	VZV, EBV	VZV ( $6.1 \times 10^6$ copies/ml), EBV (50 copy 以下)
症例 8	急性網膜壊死 (VZV)	VZV, EBV	VZV ( $5.0 \times 10^6$ copies/ml), EBV (50 copy 以下)
症例 9	急性網膜壊死 (VZV)	VZV	VZV ( $5.6 \times 10^6$ copies/ml)
症例 10	急性網膜壊死 (HSV2)	HSV2	HSV2 ( $2.8 \times 10^5$ copies/ml)
症例 11	急性網膜壊死 (VZV)	VZV	VZV ( $8.0 \times 10^7$ copies/ml)

表 4 急性網膜壊死患者の定量 PCR 結果(前房水)

症例	最終診断名	定性 PCR	定量 PCR
症例 2	急性網膜壊死 (VZV)	VZV, EBV	VZV ( $4.0 \times 10^6$ copies/ml), EBV (50 copy 以下)
症例 7	急性網膜壊死 (VZV)	VZV	VZV ( $9.7 \times 10^3$ copies/ml)
症例 8	急性網膜壊死 (VZV)	VZV	VZV ( $2.3 \times 10^3$ copies/ml)
症例 9	急性網膜壊死 (VZV)	VZV, EBV	VZV ( $7.3 \times 10^4$ copies/ml), EBV (50 copy 以下)
症例 11	急性網膜壊死 (VZV)	VZV	VZV ( $5.5 \times 10^5$ copies/ml)
症例 12	急性網膜壊死 (VZV)	VZV, EBV, CMV	VZV ( $2.0 \times 10^5$ copies/ml), CMV (50 copy 以下), EBV (50 copy 以下)
症例 13	急性網膜壊死 (VZV)	VZV	VZV ( $7.3 \times 10^4$ copies/ml)
症例 14	急性網膜壊死 (VZV)	VZV	VZV ( $3.8 \times 10^2$ copies/ml)

性を示していたが、これらを定量 PCR で検討したところ、いずれも測定限界以下であった。

### 3. 硝子体と前房水のウイルス量の比較検討

まず VZV が陽性であった硝子体 8 検体と前房水 8 検体をそれぞれまとめて、その眼内液中のウイルス量を検討した(図 1A)。硝子体検体では VZV ウイルス量は多くは  $10^6$ /ml 以上で、前房水より有意に高い値であった ( $p=0.0011$ )。その中でも、同一患者で硝子体と前房水を同時に採取できた 5 症例で、そのウイルス量について比較検討した(図 1B)。いずれの症例も硝子体が前房水に比べてウイルス量が高い値を示していた。

### 4. 眼内液中に EBV が同定された患者の臨床所見の検討

急性網膜壊死患者から、特に硝子体検体から多くの EBV DNA が同定されたので、その中から 11 症例について比較検討した。PCR の結果にて EBV DNA 陽性群 ( $n=6$ ) と EBV DNA 陰性群 ( $n=5$ ) に分けて検討した(表 5)。平均年齢は EBV DNA 陽性群で 50 歳、EBV DNA 陰性群は 42 歳であり、陽性群は陰性群より平均年齢が高い傾向にあった(Mann-Whitney の U 検定,  $p=0.46$ )。発症から当院受診日数(平均病日)は陽性群で 12.5 日、陰性群で 9.0 日と差があった( $p=0.14$ )。患者はすべて片眼発症であったが、最終矯正視力は EBV DNA 陽性群が悪い傾向にあった。検体採取前の抗ウイルス薬投与(アシクロビル点滴静注)は陽性群では 67% に施行されていたが、陰性群では行われていなかった。

以上より、EBV DNA 陽性群は陰性群に比べて網膜病変が進行し、重症例が多く、全身的にも免疫抑制状態と思われる者が多かった。その代表症例を図 2 に提示した。さらに表 5 に示すように、この代表症例も含めて検体採取前のプレドニゾロン内服は EBV DNA 陽性群で全例に施行されていたが、陰性群では行われていなく両群間に有意な差があった ( $p=0.01$ )。帯状疱疹などのヘルペス関連既往歴は EBV DNA 陽性群では 50% に存在したが、陰性群では 0% であった(表 5)。

### 5. 前房水中ウイルス量と予後との関係

眼内液中のウイルス量(DNA コピー数)と視力、網膜病変の広がり方(進行)などの視力予後との関係について検討した。硝子体検体では DNA コピー数にあまり差がなかったため、DNA コピー数に差があった前房水検体 8 症例 8 検体(全症例 VZV 急性網膜壊死)を用いて比較検討した(表 6)。VZV DNA コピー数が  $10^4$ /ml 以上を示した 5 症例(症例 2, 11, 12, 9, 13)はいずれも経過中に視力が不変か悪化し、網膜壊死病巣の場所が周辺を越えて後極内あるいは後極付近まで進行している症例がほとんどであった。症例 13 は網膜壊死病巣が周辺部で止まっていたが乳頭炎と網膜動脈炎が著明で、最終的には視神経萎縮を来し視力不良となった。網膜剝離の発生は手術を拒否したため薬物療法のみで経過観察した症例 12 の 1 例だけだった。残りの 3 症例(症例 7, 8, 14)はウイルスコピー数が  $10^2 \sim 10^3$ /ml と低く、網膜壊死病巣も周辺部のみで広がりもなく、薬物療法のみで経過観察

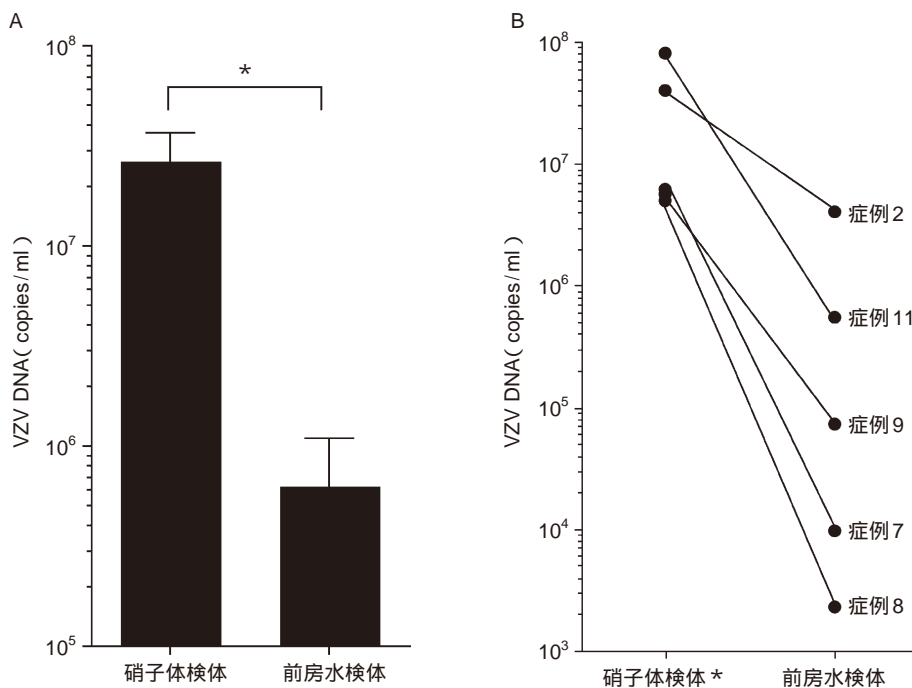


図 1 急性網膜壊死患者硝子体と前房水のウイルス量の比較検討.

A : VZV が陽性であった硝子体 (n=8) と前房水 (n=8) の検体中のウイルス量をまとめて比較検討した。ウイルス量は各検体の real-time PCR 測定でのウイルスコピー数 (平均値 ± 標準偏差) を示す。\* : p<0.005 (Mann-Whitney の U 検定)。B : 同一患者から採取した硝子体と前房水検体中の VZV ウイルス量を比較検討した (5 症例 : 症例 2, 症例 7, 症例 8, 症例 9, 症例 11)。ウイルス量は各検体の real-time PCR 測定でのウイルスコピー数を示す。\* : p<0.05 (Mann-Whitney の U 検定)。

表 5 眼内液から EBV DNA が検出された急性網膜壊死患者の臨床所見の検討

	症例	年齢	最終矯正視力	病日*	検体採取前の抗ウイルス薬投与	検体採取前のステロイド全身投与	ヘルペス既往歴
EBV DNA 陽性 (n=6)	症例 2	61	手動弁	15 日	なし	あり	あり
	症例 4	44	光覚弁	15 日	なし	あり	なし
	症例 5	39	0.4	12 日	アシクロビル点滴	あり	あり
	症例 6	40	手動弁	15 日	アシクロビル点滴	あり	なし
	症例 7	70	0.1	9 日	アシクロビル点滴	あり	あり
	症例 8	46	1.5	9 日	アシクロビル点滴	あり	なし
EBV DNA 陰性 (n=5)	症例 3	27	1	7 日	なし	なし	なし
	症例 9	42	0.01	5 日	なし	なし	なし
	症例 10	16	0.3	13 日	なし	なし	なし
	症例 11	68	0.8	14 日	なし	なし	なし
	症例 13	55	0.1	6 日	なし	なし	なし

眼内液を用いた定性 PCR の結果から EBV DNA 陽性群と EBV DNA 陰性群に分けて検討した。\* 病日 : 発症から初診時までの平均期間。

しても最終視力は良好であった。

#### IV 考 按

急性網膜壊死 (桐沢型ぶどう膜炎) は 1971 年に浦山らにより初めて報告され<sup>9)</sup>, その後 VZV や HSV による眼内感染であることが判明した。本疾患は, 神経親和性を有するが, 同じヘルペスウイルスにもかかわらず性質や侵襲する部位の異なる 2 つのウイルスによって発症することから, 病因ウイルスによる多少の病型の違いがあることも分かっている<sup>10)</sup>。ウイルスゲノムを直接的に証明

する PCR が一般的に行われる前は, 局所の抗体産生 (Q 値測定) や眼所見のみで診断, 治療されていたのが現状である。以前は, 難治性のぶどう膜炎の代表例であったが, 現在は, 早期診断・早期治療が行われれば, 失明を回避できる症例もみられるようになった。最近の知見では, 定量 PCR 法が急性網膜壊死の診断に有用であった症例報告もある<sup>11)12)</sup>。今回の我々の検討では, 急性網膜壊死患者 14 名全例の眼内液から HSV1, HSV2, VZV いずれかのウイルスが検出され, 定量 PCR ではいずれの検体もその病因ウイルスが高コピー数であった。その

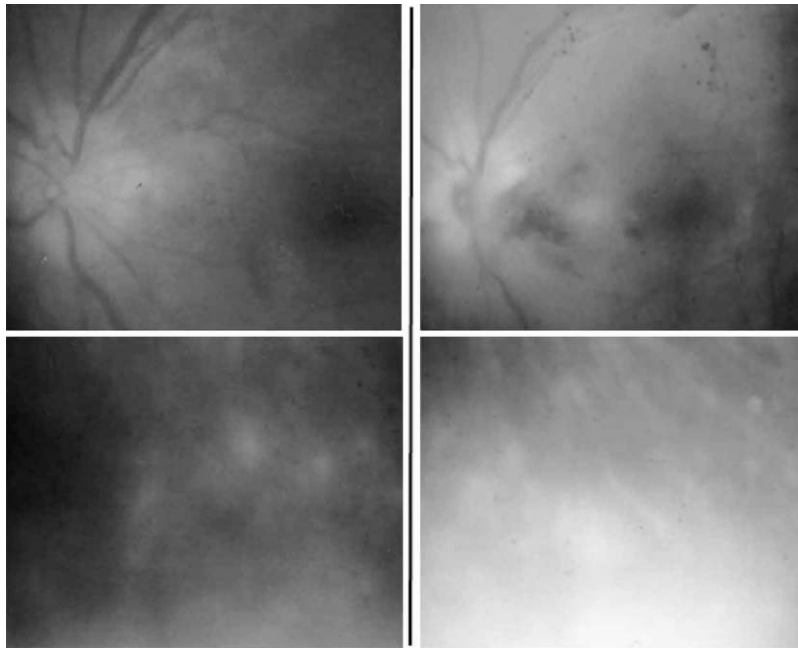


図 2 EBV DNA が陽性を示した VZV 急性網膜壊死の眼底写真.

42 歳の男性. 2005 年 11 月 24 日, 当院初診時(左写真)には左矯正視力 0.9, 眼底周辺に顆粒状の白斑と視神経乳頭の発赤, 腫脹を認める程度だったが, 4 日後には視力 0.01 と低下し, 右写真のように視神経乳頭周囲の浮腫, 出血, 網膜動脈炎, 硝子体混濁に加え, 下方周辺部の白斑が癒合し, 壊死病巣を呈してきた. 本症例の採取された硝子体から  $5.6 \times 10^6$  copies/ml の VZV が検出され, 前房水から  $7.3 \times 10^4$  copies/ml の VZV と EBV (定量では測定限界以下) が検出された. 血清中にこれらのウイルスは検出されなかった.

表 6 急性網膜壊死患者の眼内ウイルス量と予後の関係: 視力, 網膜病変の進行, 治療

症例	前房水定量 PCR	初診時視力→最終視力	網膜壊死病巣の部位	網膜病変進行	主な治療
症例 2	VZV ( $4.0 \times 10^6$ copies/ml)	(0.1)→(手動弁)	周辺～後極	あり	薬物および手術
症例 11	VZV ( $5.5 \times 10^5$ copies/ml)	(0.2)→(0.4)	周辺～後極近く	あり	薬物および手術
症例 12	VZV ( $2.0 \times 10^5$ copies/ml)	(0.3)→(0.1)	周辺～後極近く	あり	薬物のみ
症例 9	VZV ( $7.3 \times 10^4$ copies/ml)	(1.2)→(0.1)	周辺～後極近く	あり	薬物のみ
症例 13	VZV ( $7.3 \times 10^4$ copies/ml)	(0.9)→(0.01)	周辺部のみ+乳頭炎	あり	薬物および手術
症例 7	VZV ( $9.7 \times 10^3$ copies/ml)	(0.2)→(0.9)	周辺部	あり	薬物および手術
症例 8	VZV ( $2.3 \times 10^3$ copies/ml)	(1.2)→(2.0)	周辺部のみ	なし	薬物のみ
症例 14	VZV ( $3.8 \times 10^2$ copies/ml)	(0.7)→(1.0)	周辺部のみ	なし	薬物のみ

患者 8 例の前房水のウイルス検査結果から前房水中の VZV コピー数が多い順に並べ, 前房水採取時の眼底検査所見, 視力, 進行などを検討した.

3 種のウイルスの中では VZV が最も多く, 本検討では約 8 割の患者で認められた. さらに, VZV が陽性であった硝子体検体と前房水検体のその眼内液中のウイルス量について検討したところ, そのウイルス量は多くは  $10^6$ /ml 以上で硝子体が前房水より有意に高い値を示していた. これらの結果より, より壊死病巣に近い硝子体の方がウイルス濃度が高く, 硝子体ゲル中にウイルスがトラップされていて, より局所の感染の病態を反映していると考えられた.

また, 急性網膜壊死患者の前房水中のウイルス量と視力, 網膜病変の広がり方などの視力予後との関連について検討した. VZV DNA コピー数が  $10^4$ /ml 以上を示した症例はいずれも経過中に視力が悪化し, 病巣の進行し

ている症例がほとんどであった. 残りの症例はウイルスコピー数が  $10^2 \sim 10^3$ /ml と低く, 病巣も周辺部のみで広がりもなく, 薬物療法のみで経過観察しても最終視力は良好であった. 以上の検討より, 今回の検討だけでは症例数が少なくまだはっきりとした結論はできないが, 急性網膜壊死が疑われた時点で前房水を採取し, 定量 PCR でウイルスコピー数を把握することが薬物療法のみで経過観察してもよいのか, 硝子体手術を早急に検討した方がよいのかの目安になると思われる.

今回の我々の検討では検査した患者の約半数に EBV DNA が定性 PCR で検出された. しかし, 定量 PCR により高いコピー数の EBV DNA が検出されたのはわずか 1 症例だけであった. すなわち, 定性 PCR で EBV



DNA が陽性であっても、その大半は定量 PCR では測定限界以下のものであり、急性網膜壊死の病因ウイルスと考えられる VZV や HSV とは眼内ウイルス量が大きく異なり、病因としての本症への関与は低いと思われた。しかし、EBV DNA 陽性検体と陰性検体の症例を比較・検討すると、EBV DNA 陽性患者は診断・治療までに日数のかかった症例や視力不良の進行の早い重症例が多く、患者背景では年齢が高く、帯状疱疹などのヘルペス既往歴があり、さまざまな理由で副腎皮質ステロイド薬の内服を受けている症例が多かった。EBV は成人に達するまでに多くの人が感染を受ける普遍的なウイルスであり、感染後免疫能とのバランスのもとに潜伏・持続感染となる。また、EBV は B リンパ球と一部の上皮細胞を感染の標的としており、免疫能のバランスが崩れたときに無限増殖能が発揮され腫瘍原性が生じると考えられている<sup>13)</sup>。眼疾患では、ぶどう膜炎以外でも角膜炎や網膜色素上皮症などとの関連が示唆<sup>14)</sup>されているが明らかではない。これまでぶどう膜炎患者の眼局所検体から EBV DNA が検出された症例の報告があり、Usui ら<sup>15)</sup>は血清・前房水中の EBV 抗体価測定により EBV の関与が疑われたぶどう膜炎患者 3 例の臨床的特徴を報告している。一方、Ongkosuwito ら<sup>16)</sup>は HIV 陰性免疫抑制状態のぶどう膜炎患者の眼局所検体から高率に EBV DNA が検出されることを報告しているが、ぶどう膜炎の直接的な原因ウイルスとして EBV の可能性は低いとしている。今回、定量 PCR で EBV DNA が高コピー数であった症例 1 では発症以前からのプレドニンの長期内服があり、背景として副腎皮質ステロイド薬長期使用や自己免疫疾患の存在などの何らかの免疫異常がある場合は EBV 再活性化が起こる可能性があると思われた。ただ、正常眼内組織における EBV DNA の同定<sup>17)</sup>、網膜色素上皮における EBV レセプターの発現の報告などから正常の眼内上皮組織を中心に EBV が潜伏しているとも考えられる<sup>18)</sup>。眼内炎症時に潜伏していた EBV が再活性化し、ぶどう膜炎の主な原因である病因ウイルス(急性網膜壊死では VZV か HSV)に随伴して炎症を増悪している可能性も否定できない。

ウイルスが発症あるいは病態形成に関与していると推定されている眼疾患は多い。それにはウイルスが発症に直接関与する炎症性疾患の場合とウイルス感染が契機となる自己免疫疾患とがある。病因ウイルスが病巣から検出され、眼所見に再現性があれば病因(ウイルスによる直接感染あるいは潜伏感染の再活性化)として確定するが、多くの場合、病因ウイルスが病巣(眼局所)から検出されずに疑いのまま加療されることがある。さらに、その病巣からウイルス PCR で特定のウイルスが検出されたとしても、その陽性という結果は PCR の感度が良いためにコンタミネーションなどが避けられないことから偽陽性が含まれる場合もある。我々が今回行った 2 つの

PCR システムは、多種のウイルスを同時にかつ迅速にスクリーニング可能で、その後異なったプライマーとプローブの組み合わせでウイルス量の定量化検査をするために偽陽性の可能性はきわめて低い。また、治療前に眼局所のウイルス増幅コピー数を把握できたために、実際、治療薬の用量を決めるうえで非常に有用であった。さらに、この PCR システムは微量なサンプルでも増幅、解析可能なので眼内液などの微量サンプルあるいは虹彩の一部などの小さな眼組織でも検査が可能である。今後、原因不明の難治性眼内炎症疾患の眼内液から多種類のヘルペスウイルス属や疾患関連性がよく分かっていないウイルス感染の有無を簡易的に、かつ迅速にスクリーニングすることが可能になるとと思われる。さまざまな分子生物学的検査が発達してきた今もおぶどう膜炎の原因不明例は多い。我々はこのシステムを利用して、HHV6 が関与すると考えられた難治性ぶどう膜炎を報告した<sup>19)</sup>。今後もこの PCR システムを利用すれば原因不明の眼内炎症疾患の眼内液から未知のウイルスなどが検出される可能性があり、多くの原因不明眼疾患の病因解明に寄与すると思われる。

## 文 献

- 1) Burrows J, Nitsche A, Bayly B, Walker E, Higgings G, Kok T : Detection and subtyping of Herpes Simplex virus in clinical samples by LightCycler PCR, enzyme immunoassay and cell culture. *BMC Microbiol* 2 : 12, 2002.
- 2) Espy MJ, Teo R, Ross TK, Svien KA, Wold AD, Uhl JR, et al : Diagnosis of varicella-zoster virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol* 38 : 3187—3189, 2000.
- 3) Schaade L, Kockelkorn P, Ritter K, Kleines M : Detection of cytomegalovirus DNA in human specimens by LightCycler. *J Clin Microbiol* 38 : 4006—4009, 2000.
- 4) Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Yamamoto K : Use of real-time PCR to monitor human herpesvirus 6 (HHV-6) reactivation after allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Mol Med* 6 : 427—432, 2000.
- 5) Zerr DM, Huang ML, Corey L, Erickson M, Parker HL, Frenkel LM : Sensitive method for detection of human herpesviruses 6 and 7 in saliva collected in field studies. *J Clin Microbiol* 38 : 1981—1983, 2000.
- 6) Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles MD, et al : Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266 : 1865—1869, 1994.
- 7) Whiley DM, Mackay IM, Sloots TP : Detection and differentiation of human polyomaviruses JC and BK by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol* 39 : 4357—4361, 2001.



- 8) **Harder TC, Hufnagel M, Zahn K, Beutel K, Schmitt HJ, Ullmann U, et al** : New LightCycler PCR for rapid and sensitive quantification of parvovirus B19 DNA guides therapeutic decision-making in relapsing infection. *J Clin Microbiol* 39 : 4413—4419, 2001.
  - 9) 浦山 晃, 山田西之, 佐々木徹郎, 西山義一, 渡辺春樹, 佐藤裕也, 他 : 網膜動脈周囲炎と網膜剝離を伴う特異な片眼性急性ぶどう膜炎について. *臨眼* 25 : 607—619, 1971.
  - 10) 市側稔博, 坂井潤一, 山内康行, 箕田 宏, 臼井正彦 : 桐沢型ぶどう膜炎 44 症例の臨床的検討. *日眼会誌* 101 : 243—247, 1997.
  - 11) **Arimura E, Deai T, Maruyama K, Uno N, Yamamoto H, Matsumoto C, Shimomura Y** : Herpes simplex virus-2 quantification by real-time polymerase chain reaction in acute retinal necrosis. *Jpn J Ophthalmol* 49 : 64—65, 2005.
  - 12) **Asano S, Yoshikawa T, Kimura H, Enomoto Y, Ohashi M, Terasaki H, et al** : Monitoring herpesvirus DNA in three cases of acute retinal necrosis by real-time PCR. *J Clin Virol* 29 : 206—209, 2004.
  - 13) **Cruchley AT, Williams DM, Niedobitek G, Young LS** : Epstein-Barr virus : biology and disease. *Oral Dis* 1 : 156—163, 1997.
  - 14) **Matoba AY** : Ocular disease associated with Epstein-Barr virus infection. *Surv Ophthalmol* 35 : 145—150, 1990.
  - 15) **Usui M, Sakai J** : Three cases of EB virus-associated uveitis. *Inter Ophthalmol* 14 : 371—376, 1990.
  - 16) **Ongkosuwito JV, Van der Lelij A, Bruinenberg M, Wienesen-van Doorn M, Feron EJ, Hoyng CB, et al** : Increased presence of Epstein-Barr virus DNA in ocular fluid samples from HIV negative immunocompromised patients with uveitis. *Br J Ophthalmol* 82 : 245—251, 1998.
  - 17) 薄井紀夫 : 眼内組織におけるヘルペス群ウイルス DNA の検出. *日眼会誌* 98 : 443—448, 1994.
  - 18) 薄井紀夫, 坂井潤一, 臼井正彦 : 正常眼内組織における Epstein-Barr Virus (EBV) レセプターの発現. *あたらしい眼科* 10 : 435—440, 1993.
  - 19) **Sugita S, Shimizu N, Kawaguchi T, Akao N, Morio T, Mochizuki M** : Identification of human herpesvirus 6 in a patient with severe unilateral panuveitis. *Arch Ophthalmol* 125 : 1426—1427, 2007.
-