

Appendix

I ファンギフローラ Y[®]染色

1. 方 法

ファンギフローラ Y[®]は、A 液(変性ヘマトキシリン)と B 液(スチルベンジルスルホン酸系蛍光染料と共染防止剤)から構成されている。

- ① 角膜生検材料をスライドガラスに付着させ、乾燥。
- ② エタノールを滴下し、乾燥。
- ③ A 液を滴下し、一面に広げ約 2 分間染色。
- ④ 流水で 30 秒間洗浄。
- ⑤ B 液を試料上に滴下し、5 分染色。
- ⑥ 水道水に約 20 回出し入れして洗浄。乾燥すれば⑨に準じてただちに検鏡判定可能である。
- 封入する場合、以下の処理を行う。
- ⑦ 100% エタノールに 2 回入れて脱水。
- ⑧ キシレンで透徹、封入。
- ⑨ 励起波長 395~425 nm (V 励起法)、または 330~380 nm (UV 励起法)の観察光を持つ蛍光顕微鏡で観察(400 倍および油浸 1,000 倍)。

2. 結果の判定

菌糸、酵母菌(図 41)、アカントアメーバのシスト(図 42)にそれぞれ相当する形態を持った青緑色蛍光像が、切除組織内に浸潤している病像を認めた場合に、陽性と判定する。陽性像あるいは陽性菌糸の形態および大きさは、菌種の推定のため重要である。起炎菌診断には臨床所見、経過、培養結果を併せて評価することが望ましい。

3. 利 点

- ① 感度が高く、真菌の菌糸およびアカントアメーバのシストを明瞭に検出することができる²⁴⁾。
- ② 染色操作後においても、菌体および切除組織の形態的特徴は良好に保存される²⁵⁾。
- ③ 通常の透過光によるヘマトキシリン染色像の観察と蛍光による観察の併施により、詳細な病理像の観察が可能である。
- ④ 採取後時間が経過した試料においても染色性は低下せず、染色後の試料の保存性(1 年以上)、発色性も良好である。

4. 注 意 点

- ① 試料は、27 ゲージ針などを用い、病巣部をごく少量一塊として採取することが望ましい。擦過塗抹標本は、角膜への浸潤性の判定が困難であるため推奨されない。
- ② セルロース性挟雑物は蛍光像として染色される。このため、標本採取時には綿棒などセルロースを含んだ器具は使用しない。
- ③ 細胞の融解が著しい場合、共染像を認める場合が

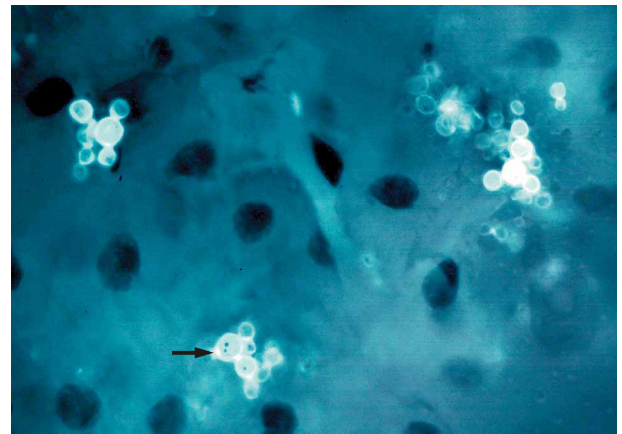


図 41 酵母菌のファンギフローラ Y[®]染色像(×1,000).
→: 酵母様真菌.



図 42 アカントアメーバのファンギフローラ Y[®]染色像(×1,000).

ある。

- ④ 抗真菌薬の使用により真菌形態が徐々に破壊され、切除標本から陽性像が検出されなくなる場合がある。このため、治療開始後採取した標本の染色結果の解釈には十分な注意が必要である。
- ⑤ 酵母菌であっても感染病巣部では菌糸状(仮性菌糸)に観察されることが多い(図 43)。

II 蛍光抗体法(HSV, VZV)

1. 単純ヘルペスウイルス(HSV)

1) 方法

ヘルペス(1・2 型)FA 試薬「生研」(デンカ生研、東京)を用いた場合を以下に示す。

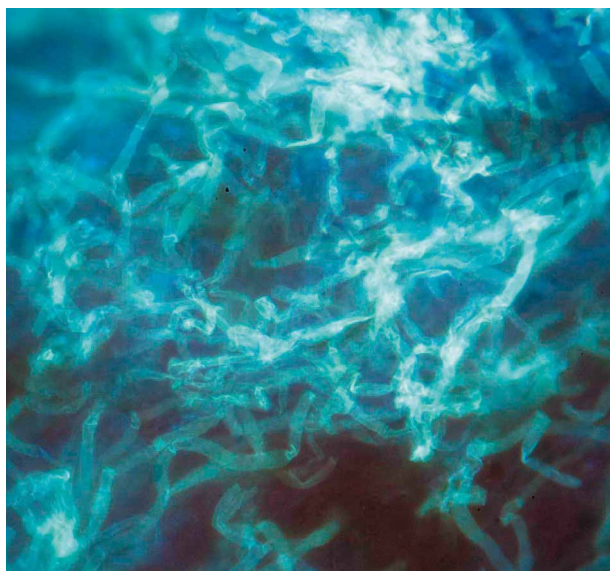


図 43 菌糸状に観察された酵母菌のファンギフローラ Y[®]染色像(×1,000).

- ① 角膜上皮擦過物(角膜生検材料)を無蛍光スライドガラスに塗抹し、冷風で乾燥.
- ② アセトンに 10 分間浸し、固定.
- ③ 蛍光(fluorescein isothiocyanate : FITC)標識抗 HSV-1 あるいは HSV-2 モノクローナル抗体(対比染色用のエバンスブルー含有)を試料上に滴下.
- ④ 湿潤箱に入れ、37℃で 15 分間反応させる.
- ⑤ 精製水で洗浄し、冷風で乾燥.
- ⑥ 封入液(グリセリンとリン酸緩衝液を 9:1 の割合で混和したもの)で封入.
- ⑦ 励起波長 525 nm をピークとする観察光(B 励起法)を持つ蛍光顕微鏡で観察.

2) 結果の判定

緑色の特異蛍光を発する HSV 感染細胞を認めれば陽性と判断できる(図 44). HSV 非感染細胞は赤色に染色される.

3) 利点

蛍光抗体法はウイルス分離に比べ、迅速に結果が得られる. また、感度、特異性ともに高い. モノクローナル抗体を利用し、HSV 抗原の型別確認ができる.

4) 注意点

偽蛍光や偽発色があるため、陽性対照、陰性対照を同時に用いる必要がある. 蛍光は時間とともに褪色するため、検鏡は速やかに行う.

2. 水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)

眼部帯状疱疹眼局所からの検体採取およびウイルス分離が難しいため、皮膚の水疱内容の蛍光抗体法によるウイルス抗原の証明が診断に用いられている. 水疱内容を注射器で吸引し、スライドガラスに滴下したものを塗抹・乾燥し、固定後 FITC 標識抗 VZV モノクローナル抗体(VZV-FA「生研」)を用いる. 眼局所からは、偽樹枝

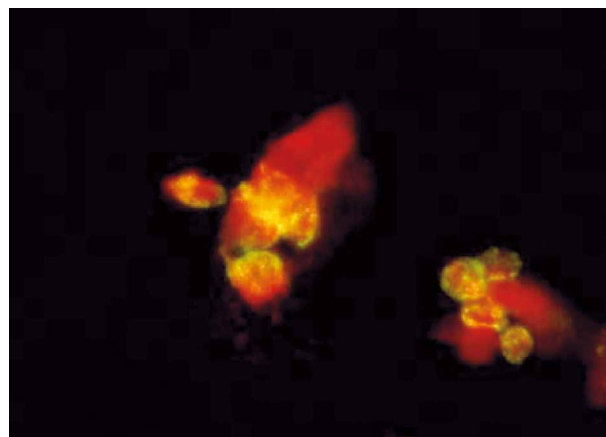


図 44 樹枝状角膜炎病巣擦過物の抗 HSV 蛍光標識抗体による染色標本の蛍光顕微鏡写真.

状角膜炎が発症したときのみ検体が採取可能であるが、検体量が少ないため、採取法に工夫が必要となる. Impression cytology から得られた検体に対し、VZV のモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法も有用である²⁶⁾.

Ⅲ 免疫クロマトグラフィ法(HSV)

1) 方法

チェックメイト[®]ヘルペス アイ(わかもと製薬、東京)を用いた場合を以下に示す.

- ① 綿棒で採取した角膜上皮擦過物(角膜生検材料)をキット付属の検体抽出液に添加し、抽出.
- ② 反応シートに 3 滴(150 μ l 相当)滴下し、15~30℃にて 15 分静置後に判定部を目視観察し、判定.

2) 結果の判定

判定部 C と S の両方に赤紫色のラインが出た場合を陽性、C のみにラインが出た場合を陰性.

3) 利点

特定の機器や技術を必要とせず、他のいずれの HSV 検査〔ウイルス分離、蛍光抗体法、polymerase chain reaction(PCR)法〕よりも簡便・迅速に結果が得られる. モノクローナル抗体を利用し特異性が 100% である.

4) 注意点

陰性の場合でも HSV 感染を否定することはできない. 検査の精度を上げるためには角膜上皮細胞をできるだけ多く採取するために角膜擦過をしっかりと行う必要がある.

Ⅳ 細菌培養・感受性検査

1. 細菌検査依頼時の注意事項とは

角膜炎の起炎菌として一般細菌を標的とする場合には、臨床診断より疑われる目的対象菌群を明記し、検査室に伝える. 検査室ではその情報に基づいて選択培地を適時追加することにより、目的菌の検出時間および検出率を高めることが可能となる. 特にメチシリン耐性黄色

ブドウ球菌(MRSA)、緑膿菌、バンコマイシン耐性腸球菌(vancomycin-resistant enterococci: VRE)の検出用には、他の雑菌の発育を抑制し、目的菌を選択的に増殖させる選択分離培地を追加する。

また、培養検査では材料を 3～5 枚の培地に塗布するため採取材料が極端に少ない場合は、目標とする菌群や耐性菌に優先順位を付記するのも、検出率を高める工夫となる。

2. 一般細菌の培養方法

一般細菌の検出を目的とする場合、検査室では①血液寒天培地：主に溶連菌用、②チョコレート寒天培地：ヘモフィルス用、③デソキシコレート培地(DHL)またはマッコンキー培地：腸内細菌・ブドウ糖非発酵菌用、以上の 3 種類の培地を基本的に使用する。さらに、臨床コメントに応じて、④サブロー寒天培地：真菌用、⑤MSEY(マンニト食塩卵黄加培地)：黄色ブドウ球菌用、⑥MRSA スクリーン培地：MRSA 迅速検出用、⑦NAC(nalidixic acid cetrime agar)：緑膿菌用、⑧バンコマイシン添加エンテロコッカセル培地：VRE 用などの選択培地を加える。

角膜由来材料を上記の培地に画線培養後、①、②の培地は 5～10%、35℃炭酸ガス(CO₂)培養器へ、③、⑤～⑧の培地は通常の 35℃培養器(non-CO₂)へ、④の培地は 25℃培養器(non-CO₂)へ入れ、24～48 時間培養し適時観察する。

3. 起炎菌が検出されるまでの時間

自施設に検査室がある場合の菌種同定と薬剤感受性検査に要するおよその時間を表 11 に示す。緑膿菌や MRSA などの一般細菌では通常 1 日、カンジダ属で 1～2 日、嫌気性菌では 2～3 日で発育集落が得られる。治療効果判定を急ぐ患者では、直接検査室に培養結果を問い合わせることにより推定菌種の一次報告が得られる。また、糸状菌は初代分離に 2～4 週間を必要とする株もまれではない。

4. 検査結果の解釈

1) 起炎菌の判断

外眼部には図 45 に示すように多くの常在菌が存在する。このため検査結果より起炎菌を判断する場合は、

① 塗抹検鏡結果と同定菌種名の比較。

② 局所の炎症像の特徴。

③ 同定菌種名と薬剤治療効果。

などを考慮し決定する。

2) 薬剤感受性試験結果の解釈

日本国内の多くの検査室(検査会社)は、Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI)により推奨されている CLSI 標準法に準拠して感受性試験を実施している。具体的には、微量液体希釈法とディスク拡散法のいずれかが用いられている。

表 11 細菌の塗抹、同定、感受性試験に要するおよその日数

	塗抹検査	菌発育	最終同定	薬剤感受性結果
一般細菌	15 分以内	1 日	2～3 日	3～4 日
嫌気性菌	15 分以内	2～3 日	5～7 日	5～7 日

i) 微量液体希釈法(CLSI: M100-S21)

ミューラーヒントン培地に良好に発育する菌については、96 穴のマイクロプレートを用いた微量液体希釈法により最小発育阻止濃度(MIC)を測定し、さらに CLSI の判定カテゴリー(下記 iv)参照)も併せて報告する。

ii) ディスク拡散法(CLSI: M100-S21)

栄養要求性の厳しい特殊な菌(ストレプトコッカス属、ヘモフィルス属など)については、微量液体希釈法による感受性試験の実施が困難であるため、手法であるディスク拡散法により阻止円直径を判定し、判定カテゴリーに準じて報告する。なお、薬剤ディスクは CLSI 標準法に準拠した市販ディスクを使用する。

iii) β-ラクタマーゼ試験

Haemophilus influenzae, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella(Branhamella) catarrhalis* および嫌気性グラム陰性桿菌については β-ラクタマーゼ試験を実施する。コロニーから直接実施する本試験で陽性ならば、感受性結果を待たずにペニシリン系の薬剤は使用できないと判断する。

iv) 判定カテゴリーとは

感受性結果は、MIC 値または阻止円直径から血中有効濃度に基づく臨床有用性を考慮し、表 12 に示したように S: 感受性, I: 中間, R: 耐性と判定される。感染性角膜炎の起炎菌が感受性判定で「S」と判定された場合は、その点眼薬による治療効果が期待できる。一方、「R」と判定された場合はその解釈が難しく、点眼薬が血中有効濃度よりはるかに高濃度で調整されているために効果がある場合もあるので、実際に臨床的に使用して効果が認められている場合は「R」と判定されたことを根拠に当薬剤を中止・変更する必要はない。一方、たとえ PAE(postantibiotic effect)の高い薬剤であっても角膜表面では起炎菌と薬剤との十分な接触時間が確保されないため、治療効果はさほど期待できないとの意見もあり、「R」と判定された薬剤をわざわざ新たに開始することは、ほかに方法がない場合を除いては避けた方がよい。現に Wilhelmus らは 0.3% シプロフロキサシン塩酸塩点眼薬による角膜炎治療効果と起炎菌の感受性結果との関係性を評価し、MIC が 1.0 μg/ml 以上を示す症例では半数で治療効果が得られなかったと報告している²⁷⁾が、逆に半数では効果があったということでもあり、この辺の解釈の難しさを示している。

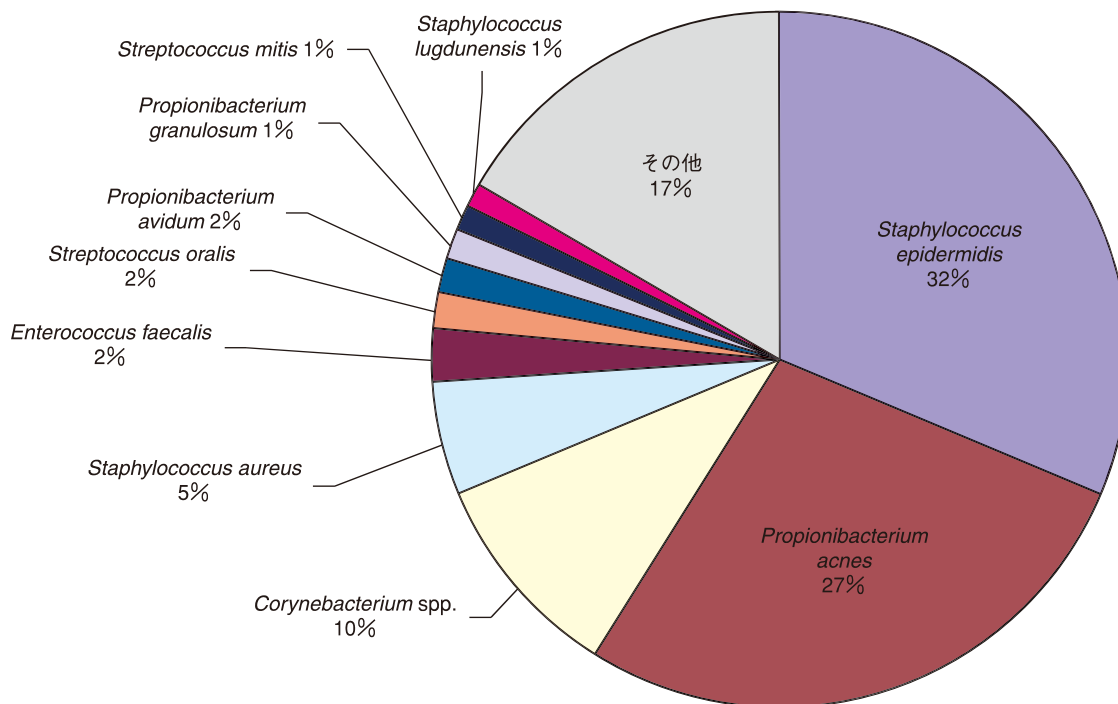


図 45 外眼部常在菌.

日本眼感染症学会の術前滅菌法に関する多施設共同研究において 60 歳以上の白内障術前患者の結膜から分離された細菌の内訳.

表 12 薬剤感受性試験結果の解釈 (CLSI 法)

感受性 S : susceptible	推奨される抗菌薬の投与量で臨床的有効性が期待できる
中間 I : intermediate	通常投与量では効果が低い(大量投与が必要). 抗菌薬移行性の良好な部位の感染症の場合には効果が期待される
耐性 R : resistant	臨床的有効性は期待できない
対象 (N/A, N/R)	治療薬として使用できない(適応外, 対象外)

v) 感受性スペクトル

感染性角膜炎患者の日常診療に際しては、主に臨床所見に基づき点眼薬を選択するが、推定起炎菌と用いる点眼薬の抗菌スペクトルは正しく認識しておく必要がある。また PAE を考慮した点眼薬の使用も重要である。治療効果は、外来患者では 2~3 日で判定し、適時点眼薬を変更する。抗菌力の強いフルオロキノロン系およびアミノグリコシド系抗菌薬の長期使用(1 週間以上)は真菌および腸球菌などの菌交代現象を誘発するため、全科的には避けるべきとされているが、なるべく混濁の少ない治療を目指す眼科においては感染性角膜炎に対する抗菌点眼薬治療を 1 週間で止めることは難しく、臨床経過をみながら薬剤の中止時期を決めていくことになるが、漫然とした長期使用がないように注意すべきである。

V 真菌培養・感受性検査

1. 方 法

① 点眼麻酔後、開瞼器をかける。

- ② 円刃刀またはゴルフ刀などでサンプルを採取する。
- ③ 培地シャーレの中心部に円刃刀を突き立てて直接接種する。
- ④ 得られたサンプルは培養とともに塗抹検鏡に供する。
- ⑤ 室温および 37℃ で培養する。
- ⑥ 培養した真菌はスライドカルチャーにて菌種を同定する。
- ⑦ 感受性検査キットを用い薬剤感受性検査を行う。

2. 結果の判定

1) 真菌培養

接種場所に一致して菌が生えてきた場合には病変部から分離されてきたと判断できるが、その他の部位に生えてきた場合には contamination と判断する。確定診断では、塗抹検鏡で角膜実質に真菌が感染していることが重要である。培養のみ陽性であるときには contamination の可能性があることに注意して判定する。塗抹検鏡と培養結果が一致したときには信頼性が高い。また、糸状菌

と酵母菌では、臨床所見に差がある²⁸⁾。糸状菌の中でも菌種によって病原性に差があり、角膜潰瘍の重症度や進行に差がある。したがって、臨床所見から培養結果をある程度推測することができ、臨床所見を踏まえて総合的に判断する。

2) スライドカルチャー

ガラスシャーレ、V 字型ガラス管、スライドガラス、カバーガラスを乾熱滅菌しておく。真菌培養用の平板寒天培地を滅菌メスで約 10 mm 幅の格子状に切り出す。そしてスライドガラス上に一片を置き、寒天培地の 4 辺に培養真菌を白金耳で接種し、カバーガラスで覆う。ガラスシャーレ内の V 字ガラス管の上にスライドガラスを置き、最後に少量の滅菌水をシャーレ内に注ぎ、真菌が生えた至適温度で培養する。真菌の発育状態を観察し、適当な時期にカバーガラスをピンセットでゆっくり剥がす。別のスライドガラス上にラクトフェノール・コトンプルーを滴下し、その上に菌糸が付着している面を下にして静かに置く。残ったスライドガラスは寒天を取り除き、ラクトフェノール・コトンプルーを滴下すればもう 1 枚標本ができる。カバーガラスの周辺にバルサムまたはネイルエナメルを塗り封入し、顕微鏡で観察する。

3) 感受性検査

酵母様真菌に関しては各種簡易キットが販売されているが、糸状菌に関してはまだ標準化は完全ではない²⁹⁾。感受性検査に用いた培地や培養条件により感受性結果が異なるため、感受性検査方法や培養条件が異なる場合には、検査結果を単純に比較検討できない。

3. 利 点

感染性角膜炎の病巣から直接サンプルを採取して真菌を培養することによって、真菌性角膜炎の確定診断を下すことができる。培養した真菌はスライドカルチャーすることにより、菌の形態を詳しく観察することができ、菌種を同定することも可能である。また、感受性検査を行うことによって適切な抗真菌薬の選択が可能である。

4. 注 意 点

サンプルの採取場所は瞳孔縁から離れた位置の角膜潰瘍の周辺部を選ぶ。瞳孔縁から離れている部位でサンプルを採取することで視力障害を残しにくい。潰瘍中心部は穿孔を起こしやすいので避ける。増殖力の旺盛な真菌は潰瘍周辺部の正常角膜との境界に多く存在するので、このような部分を狙って円刃刀を用い、強めに擦過して角膜実質を採取する。角膜実質からサンプルを採取することが真菌の検出率を上げるうえで重要である³⁰⁾。

また、得られたサンプルは培養とともに塗抹検鏡に供する。真菌性角膜炎の確定診断として、塗抹検鏡によって角膜実質に真菌が感染していることを確認しておくことが重要なポイントである。

さらに、培養はサブロー寒天培地、ポテトデキストロース寒天培地、抗菌薬添加普通寒天培地などを用い、

各培地それぞれ 2 枚を用意して室温と 37℃ で培養し、真菌の発育の有無を観察する。真菌用培地は一般的に細菌が発育しにくくなっている。真菌用の培地が準備できない場合には、細菌培養用の培地が代用可能である。室温と 37℃ で培養するのは、菌種により発育至適温度が異なるためである。発育速度は菌種によりばらつきがあるため、少なくとも 2 週間は培養する。

Ⅵ アカントアメーバ培養

1. 方 法

分離培養法の概略を図 46 に示す。

1) 分離用培地の作製

〈方法 1〉

i) 用意するもの

① アカントアメーバ塩類溶液(KCM)

(a) アカントアメーバ塩類溶液保存液の組成

KCl	0.4 g
CaCl ₂	3.0 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	1.0 g
DW(蒸留水)	1,000 ml

トリス緩衝液で pH 6.8~7.0 に調整後、オートクレーブで滅菌し、冷暗所保存する。使用時、この保存液を DW で 100 倍に希釈して用いる。

(b) アカントアメーバ塩類溶液の簡易処方

上記の KCM の代わりとなる簡易処方がある。生理食塩水 1 ml に DW 60 ml を加えて、オートクレーブで滅菌し、このまま用いる。

② Bacto agar, Difco

ii) 培地の作製

① 寒天平板の作製(1.5% NN 寒天培地) : Bacto agar, Difco 1.5 g を KCM 100 ml で溶解し、オートクレーブで滅菌する。約 60℃ に冷めたときに直径 60 mm のプラスチックシャーレに、厚さ約 5 mm に注入する。冷蔵庫(4℃)で約 3 か月間保存できる。

② 寒天平板の表面にガラス棒などで yeast extract glucose(YG)液を塗布する³¹⁾。室温で数時間~半日ほど乾燥させ、検査に用いる。

(a) YG 液

酵母エキス, Difco	0.5 g
グルコース	0.5~1.0 g
KCM	10 ml

(b) 納豆上澄み液

YG 液の代わりに、簡易処方として納豆上澄み液を用いることもできる³²⁾。

新鮮な納豆(挽き割納豆は不可)を 8~10 粒ほど小試験

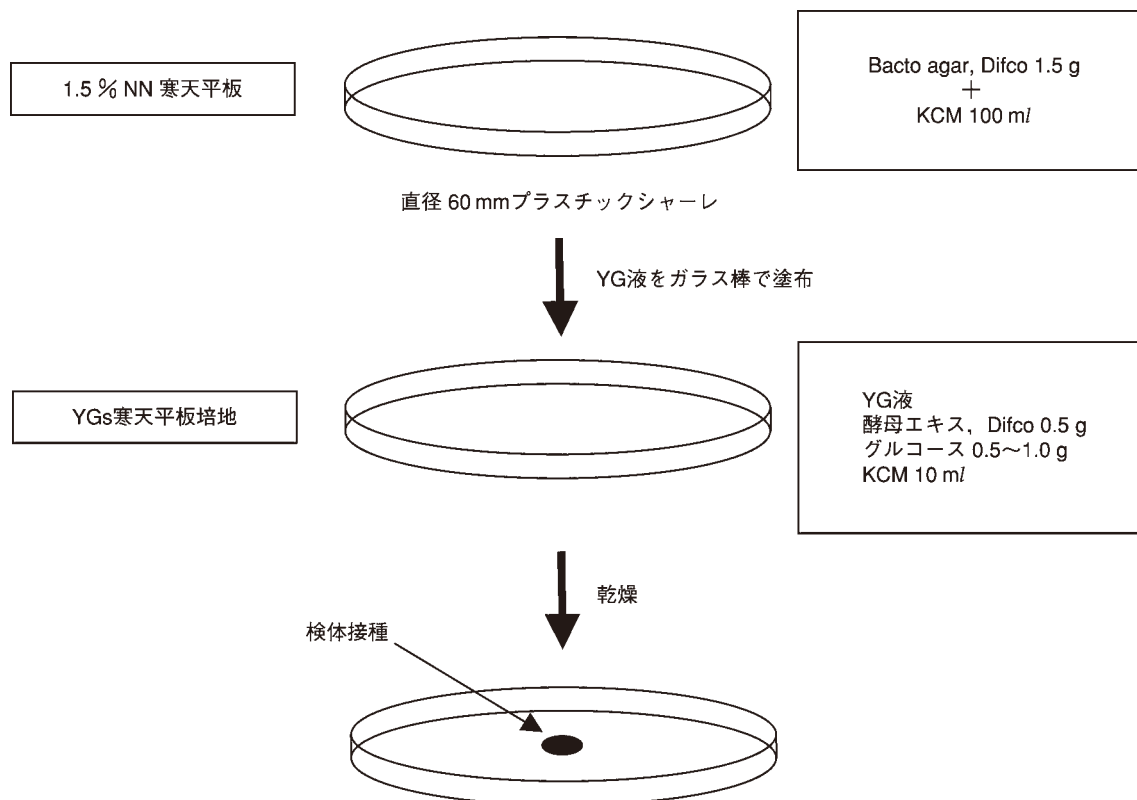


図 46 アカントアメーバの分離培養法.

KCM : アカントアメーバ塩類溶液, YG : yeast extract glucose.

管に入れ, KCM 10 ml を加える. これを静かに攪拌(倒立, 正位を繰り返す)し, 納豆の粘液がほぼ溶液中に溶解したら, 上澄みを別の容器に分注する. この上澄み液を YG 液の場合と同様に寒天平板に塗布し, 乾燥後使用する.

(c) 大腸菌浮遊液

通常の検査室では YG 液ではなく大腸菌浮遊液(後述)を用いている.

〈方法 2〉

i) 用意するもの

① アカントアメーバ塩類溶液

・アカントアメーバ保存液の組成

NaCl	12 g
KCl	0.35 g
CaCl ₂	0.3 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.4 g
Tris-HCl 100 mM (pH 6.8)	500 ml
DW (蒸留水)	1,000 ml

上記の成分を入れて溶解後, 121℃で 15 分間オートクレーブで滅菌する. 作製した保存液は, 冷蔵庫で保存する.

② PURIFIED AGAR

ii) 培地の作製

① 寒天平板(低栄養培地)の作製: ガラス瓶に寒天(PURIFIED AGAR)粉末 1.6 g を入れ, 精製水 99 ml に溶解し, 上記のアカントアメーバ保存液を 1 ml 加え, 121℃で 15 分間オートクレーブで滅菌する. 50℃程度に冷めてから, シャーレに流し入れ, 寒天が固まったら冷蔵庫でさらに 30 分程度固め, その後インキュベーターで 15 分ほど乾燥させる, 瓶のままであれば約 6 か月保存可能であるが, シャーレに分注した場合には 1 か月以内に使用する.

② 使用直前に寒天平板に大腸菌浮遊液 1 滴を滴下し, コンラージ棒で均等に広げ, 乾燥させる.

・大腸菌浮遊液の作製法

大腸菌(ATCC 株 25922)を血液寒天培地で一昼夜培養する. 精製水 10 ml にアカントアメーバ保存液 0.1 ml を加えた溶液を作製し, 平板に発育したコロニーの 1/2 を浮遊させ試験管にとる. 恒温槽(60℃)に試験管を入れ, 10 分間ごとにボルテックスをかけながら 60 分間加熱処理する. 試験管が冷めたら, チューブに 1 ml ずつ分注して密封し, 冷蔵庫で保存する.

2) 検体の採取と接種

i) 角膜擦過物

硬めのスパーテルや円刃刀などを用いて, 角膜病変部

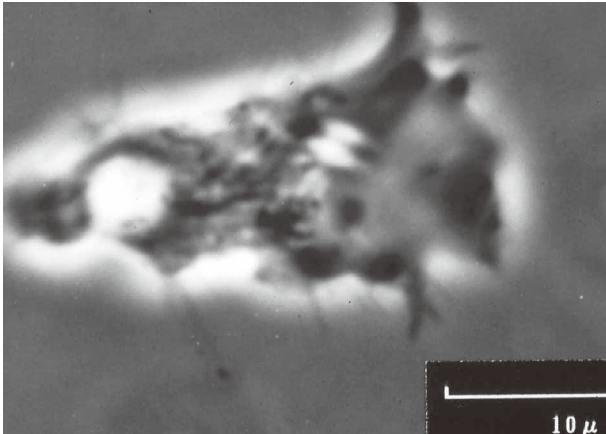


図 47 アカントアメーバの栄養体(位相差顕微鏡)。

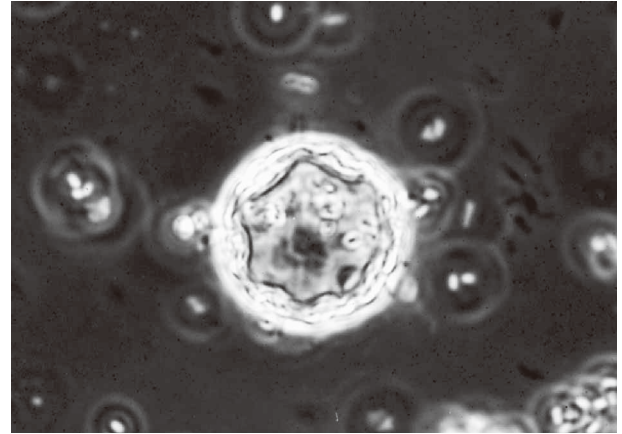


図 48 アカントアメーバのシスト(位相差顕微鏡)。

から擦過物を採取する。培地の中央に検体を置き、その上に KCM を 1 滴落とす。

外部機関に培養を依頼する場合には、採取した材料を直接濾紙片に取り、KCM を 1 滴落として室温で十分に乾燥させる。材料の周囲を鉛筆などでマークして、スクリーチューブなどに密封して郵送するとよい。

ii) コンタクトレンズ、コンタクトレンズ保存液

コンタクトレンズはレンズ表面を寒天平板に擦りつけるように塗りつけるか、レンズを拭き取った濾紙片を培地に直接置く。コンタクトレンズ保存液は遠心分離管に入れて 600 G で 7 分間遠心分離し、沈渣をマイクロピペットで滴下する。

3) 培養

30℃ の暗所で培養する。2～3 日目には栄養体がみられ、5～7 日目には大部分がシスト化する。

2. 結果の判定

1) 生体観察

平板上の適当なシスト集団上に KCM を 1 滴落とし、白金耳でシストをスライドガラス上にとる。薄いカバーガラスの小片を枕として材料の上にカバーガラスをかけ、ブリッジプレパラートを作製し、位相差顕微鏡で観察する。栄養体では棘状偽足と単核の胞状核を認める。シストは大きさ 10～20 μm で、内・外二重壁と内壁の形状が確認できればアカントアメーバ属と判定できる(図 47, 48)。

2) 簡易染色

いくつかの染色法があるが、細胞内構造の保存、二重壁の判別などの点から brilliant cresyl blue (BCB) 染色が簡便で観察しやすい。また、ギムザ染色でも観察可能である。

i) BCB 染色

① シスト浮遊液と KCM で調製した 0.1% BCB 染色液を等量混合する。

② ブリッジプレパラートを作製し、検鏡する。

3. 利 点

アカントアメーバの分離培養は、比較的感度の高い病因診断法である。また、薬剤感受性を調べれば、治療薬の選択に関する情報を得ることができる。アカントアメーバの培養は難しくなく、培地さえ用意しておけば簡単に実施できる。培地は冷蔵庫で約 3 か月間保存できる。また、アカントアメーバの分離培養は、臨床検査業者に委託することも可能である。各業者から検体輸送用キットを取り寄せ、取り扱い説明書に従って検体を採取し、提出する。

4. 注 意 点

アカントアメーバ角膜炎の初期では検出できないことがある(偽陰性)。また、アカントアメーバは室内塵など日常生活環境下に高率に存在するので、検査器具や材料の汚染に十分注意する必要がある。

Ⅶ ヘルペスウイルス培養

1. 方 法

サンプルとしては、上皮型が疑われる場合は、上皮欠損部ではなく、その辺縁の上皮を MQA チップなどで擦りとり、実質型では涙液をサンプルとする。これらのサンプルを、直接培養細胞(Vero 細胞など)に接種するのが感度を上げる点からはよいが、冷凍保存しておき、後日接種を行うか、培養実施施設に送付することも可能である。

2. 結果の判定

サンプルを接種した細胞内でウイルスが増殖してくると、細胞に数日～1 週間で ballooning などの細胞変性効果(CPE)が出現してくる。CPE が拡大してきたら増殖したウイルスを回収・冷凍保存し、後日、蛍光抗体法・中和法などを用いてウイルスの種類を同定する。

3. 利 点

陽性であれば角膜ヘルペスと確定診断できるため、ヘルペス診断のゴールド・スタンダードである。また分離されたウイルスを用いて薬剤感受性や病原性を検討した

り、分子疫学的調査に用いることができる。

4. 注 意 点

以上 1~3 は HSV 分離の方法であり、VZV については眼局所からのウイルス分離は困難であり、臨床的な利用は難しい。HSV についても、感度が悪い、結果が出るのに日数を要する、培養細胞を用意する必要がある³³⁾³⁴⁾など、日常の臨床検査としては不向きな面がある。

VIII Polymerase chain reaction(PCR)法

1. PCR 法

PCR 法ではまず、検体を 94℃前後の高温に供し DNA 二本鎖変性により一本鎖にする。これを denaturation という。次に反応温度を 55~60℃前後に下げて、それぞれの一本鎖にプライマーを付着させる。これを annealing という。再び温度を 72℃前後に上げて伸長反応(extension)を行う。

具体的な方法は、まず得られたサンプルから DNA を抽出し、マイクロチューブ中に抽出 DNA、2 種類のプライマー、デオキシヌクレオシド 3 リン酸(dNTP)、バッファー、MgCl₂、DNA ポリメラーゼ、H₂O を混合する。サーマルサイクラーを、例えば denaturation 94℃ 30 秒、annealing 58℃ 30 秒、extension 72℃ 60 秒、35 サイクルなどの条件に設定し、試薬と DNA の入ったチューブを反応させる。

また、nested PCR は、アウタープライマーとインナープライマーを使って 2 段階の PCR を行う方法で、より感度が優れる。

結果の判定は、設定したエンドポイントにおける PCR 産物をアガロースゲル(図 49)に電気泳動し、増幅産物が得られたかどうかを確認する。

2. リアルタイム PCR 法

上記の従来型 PCR 法に対して、リアルタイム PCR 法は、目的 PCR 増幅産物を 1 サイクルごとに経時的にモニタリングすることにより定量的な解析が可能で、眼科領域でも報告が行われている³⁵⁾。二本鎖 DNA に特異的に挿入して蛍光を発する色素である SYBR green I を用いるインターカレーター法と配列特異的オリゴヌクレオチドに蛍光物質を標識したプローブを用いる TaqMan 法がある。増幅された DNA 量に比例して得られる蛍光強度を検出することにより、初期鋳型 DNA を定量する。既知の初期鋳型コピー数から段階希釈したスタンダードサンプルにおける増幅曲線にて、閾値 PCR 産物量に達するサイクル数(threshold cycle : Ct 値)を算出して、初期鋳型量と Ct 値との直線関係を示す検量線を作成する。目的サンプルにおいても同様に Ct 値を算出して、検量線に当てはめることによって、目的サンプルの初期鋳型量絶対数を定量できる。また、内在コントロール遺伝子によるサンプル間の補正をすることにより、サンプル間の相対的比較定量を行うこともできる。

サイズ
マーカー
陰性
対照
患者
サンプル
陽性
対照



図 49 Polymerase chain reaction (PCR) 産物のアガロースゲル電気泳動。

患者涙液より抽出した DNA より、HSV-1 の UL-2 region に相当するバンド(342 bp)が得られた。

3. 利 点

PCR 法では、涙液、角膜上皮、前房水、硝子体のように採取できる検体が少量で、サンプル中のウイルス量が少ない場合でもウイルス DNA を増幅させることにより検出可能である。また、多数の病原体を短時間で検索することができる。また、本反応の鋳型となる DNA は、凍結させて長期保存できる。

4. 注 意 点

PCR 法ではあくまで DNA の存在が証明されるのみである。したがって、ウイルスであれば活動性ウイルスの存在を証明しているわけではないので、その評価に注意を要する。眼ヘルペス感染症研究会が提唱した上皮型ヘルペスの診断基準では、PCR 法によるウイルス DNA の証明は確定診断、確定診断項目ではなく、補助診断項目に挙げられている。少量の DNA が増幅されるため、検査環境を整え、contamination に注意する必要がある。

IX 血清抗体価

1. 方 法

1) 採取

発症初期および発症 2 週後の患者血液を 5 ml 程度採取し、血清を分離する。不可能な場合は発症 2 週後の血

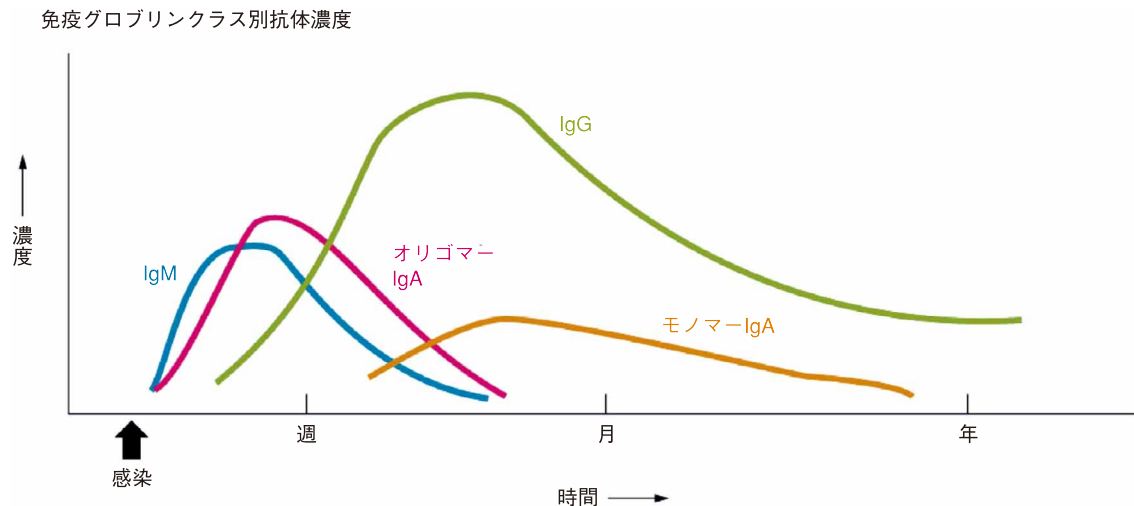


図 50 抗体応答.

清だけを採取する。

2) 検査依頼

測定方法を指定して、検査室あるいは検査会社に検査を依頼する。補体結合反応試験(CF 法)、中和試験、赤血球凝集阻止試験(HI 法)、蛍光抗体法(FA 法)、酵素抗体法(ELISA 法)が主に用いられる。CF 法は感度が低く、IgG 値を主に反映し、スクリーニングとして用いる。ウイルス特異的な IgG 抗体価や IgM 抗体価の測定には、HI 法や ELISA 法、FA 法を用いる。

3) 診断

ペア血清で CF 抗体価が 4 倍以上、その他の方法では 2 段階以上の抗体価の上昇を証明できれば、そのウイルスによる感染と診断する。

2. 結果の判定

1) 感染に伴う抗体応答の原則

感染時に産生される特異的抗体としては感染初期に IgM、それと同時期にオリゴマー IgA が産生され、感染 7～10 日後にピークとなり、その後 IgG が遅れて上昇し長期にわたり産生される(図 50)。

2) 初感染ヘルペスが疑わしい場合

発症 2 週後の血清において IgG 抗体価と IgM 抗体価を測定し、IgG 抗体価が上昇せず IgM 抗体価が上昇していれば、初感染ヘルペスであると診断できる。発症 4

日以内では、感染にもかかわらず抗体価が上昇していないこともある。

3) 眼部带状疱疹の場合

VZV の再活性化により起こるので、ペア血清を採取し、IgG 抗体価ないし CF 抗体価で 4 倍以上の上昇があれば診断できる。IgM 抗体価は上昇しない。成人における VZV 抗体の保有率は 60% 以上であり、ペア血清による抗体価上昇が証明できない場合は、診断価値は低い。

4) 角膜ヘルペスの場合

HSV の再活性化が原因であり、HSV 抗体の保有率は 60% 以上のため、抗体価の上昇によっても角膜炎の原因ウイルスとは判断できない。

3. 利 点

血清の採取のみで検査でき、角膜に対する侵襲がない。

4. 注 意 点

ウイルス性角膜炎が疑われる場合は、HSV 抗体価と VZV 抗体価を測定し、発症 2 週以後で抗体陰性であれば、原因ウイルスの可能性は否定してよい。IgM 抗体価が上昇している場合は、初感染と診断する。それ以外は、血清抗体価上昇を認めても、原因ウイルスと判定することはできない。