

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791131

研究課題名(和文) 新規遺伝子増幅法による簡便・迅速な疥癬診断法の臨床応用と薬剤耐性虫の同定

研究課題名(英文) A development of easy-to-use method for diagnosis of scabies by DNA amplification and identification of drug-tolerant scabies for antiscabietic drug

研究代表者

皆川 智子 (Minakawa, Satoko)

弘前大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20436033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：疥癬は、その診断の難しさや感染力の強さから、最前線の皮膚科医にとって、常に忘れてならない皮膚疾患となっている。本研究の目的は、簡便・迅速で多くの検体を処理できる画期的な検査法の臨床応用である。1)ヒゼンダニ特異的プライマーの作成、DNAと Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法の条件の設定。2)検体の採取：虫体、虫卵、排泄物などの検体から、PCRとLAMP法で増幅を行った。3)患者での応用：鏡検とLAMP法で検討した。4)病棟での検査：疥癬の流行があった病棟で、体幹に散発する掻痒の強い小丘疹を有する患者から検体を採取し、検討した。

研究成果の概要(英文)：We have to remember the scabies as highly infectious disease. The purpose of this study is a development of easy-to-use method for diagnosis of scabies by DNA amplification. The DNA extracted from scabies's bodies and eggs was used as a template. We researched by DNA sequencing of the polymerase chain reaction (PCR) products and Loop-Mediated Isothermal Amplification(LAMP). We examined the patients with highly pruritic red papules, their family and all healthcare professionals in charge of the patients after physical examination.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：疥癬 ヒゼンダニ 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

疥癬はヒゼンダニが皮膚の角質層に寄生して起こる感染症であり、臨床的に夜に増強する激痒が特徴的である。確定診断には、皮疹部から虫体や虫卵を検出する必要がある。治療は、イベルメクチンの内服、クロタミトンや安息香酸ベンジルの外用である。学問的にはあまり問題がない疾患に見えるが、実際の診療の場では皮膚科医にとって、非常に難義な疾患となる。

まず、その診断である。皮膚所見だけでは熟練した皮膚科医でも、皮膚掻痒症などとの鑑別が難しく、鏡検もたくさんの部位から皮膚を採取する必要がある、また偽陰性のことも多々あり、疑わしければ何回も行うことになる。

さらに、その強力な感染力のため病棟や老人施設などで集団発生も多く、その場合皮膚科医は、疥癬患者はもとより、疥癬ではないかゆみや皮疹を有する患者、また接触のあった看護師、介護師、医師などの医療関係者をすべて診察し鏡検することになる。

また、教科書的には通常の疥癬では隔離は必要がないとなっているが、多くの施設では患者は隔離され、医療関係者は予防衣・手袋の着用を強要される。このような状態は、疥癬が終息するまで続く。

そこで、最前線の皮膚科分野では、鏡検法より、より短時間に、簡便に、多くの検体を処理できる検査法の開発と臨床応用が切望されている。

2. 研究の目的

疥癬は、その診断の難しさや感染力の強さから、最前線の皮膚科医にとって、常に忘れてならない皮膚疾患となっている。本研究の目的は、簡便・迅速で多くの検体を処理できる画期的な検査法の臨床応用、ならびに今後問題となる薬剤耐性虫の同定である。

3. 研究の方法

(1) ヒゼンダニ特異的プライマーの作成 DNA と LAMP 法の条件の設定:

我々はすでにヒゼンダニ DNA 塩基配列から PCR を行いある程度プライマーに適した DNA 配列を決定しているため、その部位を基本として LAMP 法に適した種々のプライマーを作成する。

得られて PCR 産物をクローニングしてシーケンスを行い DNA の配列も確かめる。

種々の温度にて反応を行い、温度・反応時間を決定する。

(2) 適切な検体の採取法:

虫体、虫卵、排泄物などの検体から、PCR と LAMP 法で増幅をおこなう。

増幅産物をゲルに流して確認、さらにサイバークリーンや比色で定量する。

また、どの程度で陽性になるか、最小量も決定し、寝具などのゴミから検査を行う可

能性も検討する。

(3) 患者での実際の応用:

実際に疥癬が流行している施設において、倫理委員会での同意を取る。

実際に疥癬の流行している病棟で、鏡検と LAMP 法の感度や特異度の相違を決定する。

また、実際に検体採取から診断までの時間などを測定する。

さらに、虫体が消失してから、どのくらい LAMP 法が陽性になるかも検討する。

(4) 通常の病棟での検査:

対象とする、疥癬の流行がよくみられる施設の、倫理委員会での同意を取る。

疥癬の集団発生のおこっていない老人を主体とする病棟で、すべての患者や患者の寝具から検体を採取する。

LAMP 法を行い、潜在する患者がどのくらいいるのかも調査してみる。

(5) イベルメクチン耐性ヒゼンダニの同定:

本法によるマススクリーニングからイベルメクチン耐性のヒゼンダニの存在を突き止める。

4. 研究成果

(1) ヒゼンダニ特異的プライマーの作成、DNA と Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法の条件の設定: 我々はすでにヒゼンダニ DNA 塩基配列から PCR を行いある程度プライマーに適した DNA 配列を決定していたので、その部位を基本として LAMP 法に適した種々のプライマーを作成し、得られた PCR 産物をクローニングしてシーケンスを行い DNA の配列を確認、種々の温度にて反応を検討した。

(2) 適切な検体の採取法: 虫体、虫卵、排泄物などの検体から、PCR と LAMP 法で増幅をおこなった。また、どの程度で陽性になるか調べるため、寝具などのゴミから検査を行うことも検討した。

(3) 患者での実際の応用: 実際に疥癬が流行している施設において、倫理委員会での同意を得て、鏡検と LAMP 法の感度や特異度の相違を検討した。担当した医師により差が見られたが、実際に問診、診察、検体採取から診断に至るまでの時間は、患者 1 名あたり 10-15 分を要した。また、鏡検で虫体が消失後も LAMP 法が陽性になるか検討した。

(4) 通常の病棟での検査: 倫理委員会での同意のもと、当院と関連病院を受診した、臨床症状(体幹や陰部、大腿および上腕内側、指間部といった皮膚のやわらかい部位に 2-5mm 大の淡紅色小丘疹が多発)から疥癬が疑われた患者から、診断のため、角層ごとピンセツ

トでつまんで検査材料を採取し、KOH 法にて虫体や虫卵を直接証明して診断をした。臨床症状および鏡検で疥癬と診断した患者 11 名でオイラックス軟膏を頸部から下の全身にくまなく塗布し、施設により安息香酸ベンジル外用も併用した。幼児を除き、肝腎機能障害を有さず、内服可能と判断された患者でイベルメクチンを内服し、改善がみられた。また疥癬の集団発生のおこっていない老人を主体とする病院やベットの共用する人工透析病院で体幹に散発する掻痒の強い小丘疹を有する患者で鏡検を行い、潜在する患者がどのくらいいるのが調査した。

(5) イベルメクチン耐性ヒゼンダニの同定：臨床症状および鏡検で疥癬と診断した患者 11 名のうち、幼児を除き、肝腎機能障害を有さず、内服可能と判断された患者でイベルメクチンを内服したところ、改善がみられ、薬剤耐性虫は同定できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Minakawa S, Nakano H, Nakajima K, Matsuzaki Y, Takiyoshi N, Akasaka E, Rokunohe D, Sawamura D: Mutational analysis on 16 Japanese population cases with epidermolysis bullosa simplex. *J Dermatol Sci*. 査読有 2013; 72:330-332. doi:p11: S0923-1811(13)00275-2.
2. Minakawa S, Matsuzaki Y, Nakajima K, Nakano H, Sawamura D. Tegafur/gimeracil/oteracil (TS-1) induced Stevens-Johnson syndrome: Case report. *Dermatologica Sinica*. 査読有 2013; 31: 154-156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsi.2012.12.005>
3. Nakagawa K, Minakawa S, Sawamura D. EPR spectroscopic investigation of psoriatic finger nails. *Skin Res Technol*. 査読有 2013; 19: 450-3. doi: 10.1111/srt.12068
4. Minakawa S, Takeda H, Korekawa A, Kaneko T, Urushidate, Sawamura D. Q-switched ruby laser therapy and long-term follow-up evaluation of small to medium-sized congenital melanocytic naevi. *Clin Exp Dermatol*. 査読有 2012; 37:438-40. doi:10.1111/j.1365-2230.2011.04226.x.
5. Minakawa S, Matsuzaki Y, Nakano H, Sawamura D, Elenitsas R. Acantholysis caused repeated hemorrhagic bullae in a case of acantholytic acanthoma. *J Dermatol*. 査読有 2012;39:1107-8. doi: 10.1111/j.1346-8138.2012.01564.x.
6. Minakawa S, Matsuzaki Y, Rokunohe D, Akasaka E, Nakajima K, Aizu T, Kaneko T, Nakano H, Takashima T, Sawamura D. A Case of Erythema Nodosum Associated with Subareolar Abscess *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. 査読有 2012; 2: 263-4. doi:10.4236/jcdsa.2012.24049
7. Anolik RB, Elenitsas R, Minakawa S, Nguyen J, Rubin AI. Histologic features of nail cosmetics. *Am J Dermatopathol*. 査読有 2012; 34: 412-5. doi: 10.1097/DAD.0b013e3182377005.
8. Nakagawa K, Minakawa S, Sawamura D. Spectroscopic evidence of abnormal structure of psoriasis vulgaris stratum corneum. *J Dermatol Sci*. 査読有 2012; 65: 222-4. doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.01.002.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 皆川智子, 金子高英, 中野 創, 澤村大輔, 森山貴子, 森本武史: 即時型インスリン アレルギーと考えられた 1 例. 日本皮膚科学会青森地方会第 364 回例会 (2013/11/24) 弘前大学医学部コミュニケーションセンター (弘前市)
2. 皆川智子, 中野 創, 中島康爾, 澤村大輔, 池田志孝, 玉井克人, 三橋善比古: 単純型表皮水疱症 16 例の遺伝子診断. 第 77 回日本皮膚科学会東部支部学術大会 (2013/9/21-22). 大宮ソニックシティ (さいたま市)
3. 皆川智子, 中島康爾, 中野 創, 澤村大輔, 千葉純子: 単純型表皮水疱症の 1 例. 日本皮膚科学会青森地方会第 363 回例会 (2013/8/25) 八戸パークホテル (八戸市)
4. 皆川智子, 松崎康司, 金子高英, 中野 創, 澤村大輔, 三橋善比古: 家族性良性慢世天疱瘡の 1 例. 第 40 回皮膚かたち研究会 (2013/7/28) 石垣記念ホール (東京)
5. Minakawa S, Matsuzaki Y, Nakajima K, Nakano H, Sawamura D, Stevens - Johnson syndrome associated with TS-1. 71th AAD Annual Meeting (2013/3/2), Florida (America)
6. 皆川智子, 金子高英, 松崎康司, 中野 創, 澤村大輔, 木村淳也: ウステキヌマ

ブで改善した乾癬の2例.日本皮膚科学会
青森地方会第359回例会(2012/9/2),ホ
テルニューキャッスル(弘前市)

7. 皆川智子, 金子高英, 松崎康司, 中野
創, 澤村大輔, 三上 誠, 鈴木民夫, 三
橋善比古, 有棘細胞癌, Bowen病, 日光角
化症を伴った眼皮膚白皮症の1例. 第39
回 皮膚かたち研究学会(2012/7/29),
東京慈恵会医科大学(東京)

〔図書〕(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

皆川 智子(MINAKAWA, Satoko)

弘前大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 20436033