

令和元年6月27日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09743

研究課題名(和文) LAMP法による急性感染性発疹症の迅速診断法の確立

研究課題名(英文) The establishment of rapid diagnostic method for acute infectious eruption using LAMP

研究代表者

新原 寛之(NIIHARA, HIROYUKI)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・講師

研究者番号：60362935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：急性感染性発疹症について皮膚抽出DNAと既報のプライマーを用いたLAMP(loop-media ted isothermal amplification method)法とreal-time PCR法を用いて感度・特異度の検定を行い、LAMP法の有用性を検討した。結果は、水疱内容物を用いたLAMPではサーマルサイクラーの種類で感度、特異度に差があり、Loopamp EXIA;ではhuman herpes virus (HHV)、(VZV)型感染の感度・特異度が100%であった。一方、紅斑部皮膚組織を用いたLAMPでは、GenieIIIは感度・特異度ともに100%であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症は、菌種、ウイルス種に関係なく迅速診断迅速加療開始が予後を規定する。迅速かつ高い精度を持つPCRによる検査は、日常診療において外注検査が多くを占め、in houseでの施行は難しく迅速診断には寄与しにくい状況である。LAMP(loop-media ted isothermal amplification method)法はin house検査として各医療機関に普及しつつあり、急性感染性発疹症に関してその応用について検討した。

研究成果の概要(英文)：The results of real-time PCR, LAMP(loop-media ted isothermal amplification method), virus antigen analysis using immunochromatography or pathological analysis with Hematoxylin-Eosin stain for human herpes virus , , were compared. The sensitivity and the specificity of the result using Loopamp EXIA was higher than that using Genie III though it was considered the cases using Loopamp EXIA were lower than those using Genie III. For definite diagnosis, the most precious way is an identification of pathogenic gene using real-time PCR. In addition, we confirmed the utility of the detection method for the rapid detection of human herpes virus , , using LAMP method. The result of PCR depends on the amount of pathogenic gene in specimens, which means using specimens containing the more amount of pathogenic genes for the PCR is preferable in selecting the specimens for the definite diagnosis.

研究分野：皮膚科

キーワード：real-time PCR法 LAMP法 急性感染性発疹症

## 1. 研究開始当初の背景

発熱、発疹、リンパ節腫脹を主訴とする急性発疹症は、鑑別疾患が多数ある上に急性の経過をたどり、時に致死的である。しかしながら、病初期の診断および治療方針の決定に適用できる精度の高い検査法は、商業ベースでは乏しいのが現状である。

申請者らは、これまでに、感染が原因で生じる急性感染性発疹症のうちリケッチア感染症について、皮膚抽出 DNA を用いることで nested PCR 法、real-time PCR 法、LAMP 法 (Loop-mediated amplification 法) を用いることにより、十分な感度・特異度が得られることを示した (雑誌論文、引用文献)。即ち、リケッチア感染症では、病原体が血中に存在する割合が少なく、しばしば痂皮も見つからないことがあるため、皮疹部より検体を採取して DNA を抽出し、各種 PCR 検査に供することが実臨床において有益な情報をもたらすことを示してきた。

近年、種々の PCR 法が開発されてきたが、nested PCR 法、real-time PCR 法は、遺伝子操作の煩雑さを要したり、蛍光プローブを用いた高価な検査系であったりするため、実臨床上でルーティンに行えるような実行可能性が低く、商業ベースに乗せる上ではこの点がネックであった。他方で、外注依頼をしても、検体の搬送等に時間がかかる、土日祝日には検査が行えないなどといった現状が存在するため、急性感染症の対応の観点からは、加療開始初期に必要な情報が得られないなどの課題があった。

LAMP 法は、検査機器の初期導入コストが比較的安価であり、感染症診断の場では、一部の疾患で既に保険適応となっている。こうした背景から、LAMP 法は、市中病院でも in house での測定が可能と考えられる。さらに、従来の遺伝子診断法でネックとなっていた費用や手技の煩雑さなどの課題がクリア出来るものと考えられる。また、先行研究における病原体遺伝子検査法の多くは、培養したウイルスの遺伝子をサンプルとして、希釈系でプライマーの有用性が報告されている。本研究では、実臨床において適切な検体採取部位について、特に皮膚紅斑部サンプルを用いた感染症遺伝子診断の有用性を検討することとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、血液培養での病原菌検出が困難なウイルス感染性発疹症を対象として、先行研究を参考に Real-time PCR、LAMP あるいは nested PCR プライマーの作製および準備を行い、実臨床における迅速遺伝子診断の有用性を調査することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究の対象となる急性感染性発疹症を下記表 1 に設定し、各種遺伝子検査法の準備を行った。臨床検体は、感染症疑い患者より同意を得て、血清、パフィーコート、水疱、びらん、膿疱、痂皮、紅斑組織等の生体サンプルを採取して検体に供した。患者から得た臨床検体より適宜 DNA あるいは RNA を抽出し、LAMP 法、real-time PCR 法あるいは nested PCR 法を用いた病原体遺伝子の検出を行った。結果は、病理組織検査結果との比較が可能である対象サンプルについては、確認を行った。なお、本研究の実施にあたり、島根大学医の倫理委員会の承認を得た (研究課題名: Loop mediated-isothermal amplification (LAMP)法を用いた急性感染性発疹症の迅速診断法の確立、研究管理番号: 20130930-9、通知番号: 2380)。

表 1. 本研究の対象となった疾患名 (病原体名) とサンプルおよび抽出キット

疾患名 (病原体名)	病原体	抽出キット
日本紅斑熱 ( <i>R. japonica</i> )	偏性細胞内寄生性細菌	QIAamp DNA mini kit
ツツガムシ病 ( <i>O. tsutsugamushi</i> )	偏性細胞内寄生性細菌	QIAamp DNA mini kit
単純ヘルペス (HSV-1)	2 本鎖 DNA	NucleoSpin plasma XS
性器ヘルペス (HSV-2)	2 本鎖 DNA	NucleoSpin plasma XS
帯状疱疹/水疱瘡 (VZV)	2 本鎖 DNA	NucleoSpin plasma XS
伝染性単核症 (Epstein-Barr virus)	2 本鎖 DNA	NucleoSpin plasma XS
サイトメガロ (HHV-5)	2 本鎖 DNA	NucleoSpin plasma XS
突発性発疹 (HHV-6A and 6B)	2 本鎖 DNA	NucleoSpin plasma XS
HHV-7	2 本鎖 DNA	NucleoSpin plasma XS
伝染性紅斑 (ヒトパルボウイルス B19)	単鎖 DNA	NucleoSpin plasma XS
SFTS (ブニヤウイルス)	1 本鎖 RNA	QIAamp Viral RNA mini kit

手足口病 (エンテロウイルス 71)	1 本鎖 RNA	RNeasy fibrous tissue mini kit
		QIAamp Viral RNA Mini Kit
麻疹 (measles virus)	1 本鎖 RNA	RNeasy fibrous tissue mini kit
		QIAamp Viral RNA Mini Kit
風疹 (rubella virus)	1 本鎖 RNA	RNeasy fibrous tissue mini kit
		QIAamp Viral RNA Mini Kit

( 1 ) 検体収集および DNA 抽出

島根大学医学部附属病院の皮膚科外来にて、急性感染性発疹症疑い症例より、血清、バフィーコート、水疱、びらん、膿疱、痂皮、紅斑組織等の生体サンプルを採取し、同研究室にて遺伝子検出検査の検体として供した。DNA 抽出、RNA 抽出ともに QIAGEN のキット ( QIAamp DNA Mini Kit, QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAamp Viral RNA Mini Kit, RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit 等 ) を用いてそれぞれ DNA あるいは RNA の抽出を行った。RNA ウイルス疑いの検体を採取する場合は、検体中の RNA を安定的に保つために RNAlater (QIAGEN)を用いた。

( 2 ) 病原体遺伝子検査に使用したプライマー

既報に基づいて表 1 の感染症に対する各種プライマーを入手し、real-time PCR 法および LAMP 法あるいは nested PCR 法による病原体遺伝子の検出を行った。

( 3 ) 病理組織免疫染色

病理組織検査で封入体所見がみられた場合、ヘルペスウイルス感染症の診断とした。その際、  
、  
( VZV ) のいずれであるかは不明とした。

( 4 ) 各種 PCR

抽出した DNA 溶液あるいは RNA 溶液を用いて、臨床所見から疑わしい疾患のプライマーを使用した real-time PCR 法、LAMP 法を行った。Real-time PCR 法の測定機器は、Thermal Cycler Dice® Real Time System II を使用し、LAMP 法の測定機器は、リアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA®と蛍光強度の測定及び乖離曲線解析も可能な Genie III (日本ジーン社)とを用いた。

( 5 ) 紅斑部組織の HE 染色

紅斑部組織は HE 染色で組織所見確認し、特に水疱形成疾患であるヘルペス 型とヘルペス 型抗原に共通して染色される抗 HSV-1 抗体とヘルペス 型 ( VZV ) 抗原に特異的に染色される抗 VZV 抗体を用いた特殊染色を追加した。

( 6 ) HSV 抗原定性検査あるいはデルマクイック

水疱を形成したヘルペス 型感染症疑い症例では、水疱内容物を採取し、スライドガラスに細胞を擦過しアセトン固定の後、HSV 抗原定性検査目的にウイルス特異的抗原を外注検査に提出した。水疱を形成したヘルペス 型感染症疑い症例には、イムノクロマト法を測定原理とした水痘・帯状疱疹ウイルス抗原キットデルマクイック®VZV を用いて、現在の商業ベースで測定可能な point of care 検査の精度を評価した。

4 . 研究成果

検体数は、6 年間で水疱内容物採取が 96 例 (うち 94 例がヘルペス 型、  
( VZV ) 型感染疑い)、紅斑部組織が 89 例 (うち 88 例がヘルペス 型、  
( VZV ) 型感染疑い)であった。手足口病疑い症例が水疱内容物で 1 例、サイトメガロウイルス感染症疑いが水疱内容物で 2 例、紅斑部組織で 1 例あったが、他は全てヘルペスウイルス 型感染疑い症例であった。サイトメガロウイルス疑い紅斑部組織では 1 例が HE 染色、PCR いずれも陰性で、もう 1 例は HE 染色で陽性であるも、RT-PCR、LAMP は陰性であった。

以下、表 2 にヘルペスウイルス 型、  
( VZV ) 型感染症疑い症例に関して年ごとの検体数を示す。

表 2. 収集し得た感染症疑いの検体数

年度	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	合計
水疱内容物	7	18	13	18	13	11	14	94
紅斑部組織	5	23	26	8	7	17	3	89

LAMP 法の実施は、検査機器の配置場所の関係から、2015 年度までは濁度を測定する Loopamp EXIA®を用い、2016 年度からは蛍光検出試薬で発光を検出する Genie® III を用いた。Genie® III は、より測定の感度が高いと考えられる。水疱内容物、紅斑部組織からの抽出 DNA 溶液を用いてヘルペス感染症の検査を行った症例はそれぞれ 94 例、89 例であった。このうち、水疱内容物の遺伝子検査あるいはウイルス抗原検査を実施した症例数およびその結果を下記表 3 に示す。検査の精度は、Real-time PCR 検査陽性をゴールドスタンダードと考えて、その感度、特異度、陽性的中率および陰性的中率を計算した（表 4）。また、紅斑部組織の遺伝子検査あるいは HE 染色検査を実施した症例数およびその結果を下記表 5 に示し、各種検査の精度を表 6 に示した。

表 3. 水疱内容物の各種病原体遺伝子検査およびウイルス抗原検査の結果、陽性（検査数）

	HHV1	HHV2	VZV
94 例の疑い症例中の検査実施数	94	20	74
Real-time PCR 法			
Thermal Cycler Dice®	13 (94)	4 (20)	39 (74)
LAMP 法			
Loopamp EXIA®（2015 年度まで）	3 (20)	2 (20)	12 (20)
Genie® III（2016 年度から）	9 (74)	2 (13)	31 (74)
ウイルス抗原検査	2 (42)	2 (42)	18 (42)

\* HHV2 は疑い検体が少なかったため、LAMP 法において一部重複して 2 種の検査を実施

表 4. 水疱内容物の LAMP 測定法およびウイルス抗原検査の検査精度

測定機材	項目（症例数）	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率
Loopamp EXIA®	HHV（20）	100	100	100	100
	HHV（20）	100	100	100	100
	VZV（20）	100	100	100	100
Genie® III	HHV（74）	100	98	90	100
	HHV（13）	100	100	100	100
	VZV（74）	81	81	70	88
ウイルス抗原検査	HHV（42）	10	97	50	78
	HHV（13）	50	100	100	92
	VZV（42）	36	85	73	52

-; 計算不可

表 5. 紅斑部組織の各種病原体遺伝子検査および HE 染色の結果、陽性（検査数）

	HHV1	HHV2	VZV
89 例の疑い症例中の検査実施数	88	23	88
Real-time PCR 法			
Thermal Cycler Dice®	0 (88)	0 (23)	20 (88)
LAMP 法			
Loopamp EXIA®（2015 年度まで）	0 (23)	0 (23)	7 (23)
Genie® III（2016 年度から）	1 (65)	0 (4)	14 (65)

表 6. 紅斑部組織の LAMP 測定法および HE 染色の検査精度

測定法	項目（検体数）	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率
Loopamp EXIA®	HHV1（23）	-	100	-	100
	HHV2（23）	-	100	-	100
	VZV（23）	100	94	86	100
Genie® III	HHV1（65）	-	96	-	100
	HHV2（4）	-	100	-	100
	VZV（65）	100	100	100	100
HE 染色	核内封入体（88）	55	96	79	88

-; Real-time PCR で陽性を示した症例が無い場合計算不可

水疱内容物、紅斑部組織抽出 DNA を用いた LAMP 法の検査精度はいずれも高く、Loopamp EXIA®では、HHV 、 （VZV）型感染症においていずれも感度・特異度が 100%であった。HHV2 の陽性症例数が少なかったが、有病率が低いことが前提にあるためである。Genie® III にて測定した症例では、HHV 、 型感染症の陽性症例が比較的少なく、この理由として、皮疹の出るものの多くは VZV であったためである。比較的検体数、陽性例が多い HHV （VZV）型感染症は感度 81%、特異度 81%、陽性的中率 70%、陰性的中率 88%であった。ウイルス抗原検査では HHV 型感染症の感度が 10%と極端に低値であったのは、HHV 型感染症自体が小水疱形成疾患であり、検体採取の際に十分量の検体が採取できず、検体量不足から偽陰性率が高くなったと考えられた。HHV （VZV）型感染症においても感度は 36%と低値であり、ウイルス抗原検査は、原理的に検体採取バイアスが生じやすい検査法であった。綿棒に水疱内容物を吸収して、スライドガラスに塗布するので検体量が少ないことでスライドガラスへの塗布が不十分になることが偽陰性率の高値の一因となったと考えた。紅斑部組織の検査では、HHV 、 型感染症において陽性検体がなく、感度が計算できない状態であった。一方で、HHV （VZV）型感染症においては十分な感度・特異度を有していた。紅斑部組織から抽出 DNA 量が安定してもらえることを示唆していた。このことは、水痘・帯状疱疹症例がまだ、水疱形成する前の段階で病院受診した場合に、LAMP 法を用いて検査を行った場合、除外診断および確定診断の両方で十分な精度の検査が行えることを意味している。HE 染色における核内封入体所見の感度は 55%であったが、特異度は 96%と十分な精度であった。検体収集が研究期間内に残念ながら行えなかった伝染性単核球症、サイトメガロウイルス感染症、突発性発疹、手足口病、伝染性紅斑疑い症例に関しても、今後検体収集を行って検査精度を評価していく予定である。HE 染色は今後特殊染色を行って感度特異度を出す予定である。

#### < 引用文献 >

新原寛之, LAMP 法によるリケッチア感染症の新規迅速診断法の確立, 課題番号/領域番号 25860828, 2015 年度科研費成果報告書

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. 新原 寛之, 河野 邦江, 田原 研司, 高垣 謙二, 中村 嗣, 辻野 佳雄, 村田 将, 太田 征孝, 飛田 礼子, 吉田 暁子, 千貫 祐子, 森田 栄伸; Real-time PCR および nested PCR 法を用いたリケッチア症迅速診断の有用性 島根県における 11 症例の検討. 日本皮膚科学会雑誌. 126(11): 2117-2126. 2016
2. Niihara H, Kohno K, Tobita R, Ishikawa N, Morita E. Rapid diagnosis of herpes zoster by loop-mediated isothermal amplification in a pregnant woman showing folliculitis-like eruption without vesicles. J Dermatol. 44(7). 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕なし

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者：河野 邦江

ローマ字誌名：( KOHNO, kunie )

所属研究機関名：島根大学

部局名：医学部皮膚科学講座

職名：特別協力研究員

研究者番号 ( 8 桁 ) : 20432619

(2)研究協力者：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。