

## <シンポジウム(3)-8-4>中枢神経系感染症の遺伝子診断の進歩

### トキソプラズマ脳炎の PCR 検査法

浅井 隆志<sup>1)</sup>

**要旨：**トキソプラズマ脳炎の検査法には、髄液中のトキソプラズマ原虫を PCR 法で検出する方法がもちいられる。その理由は、抗体価の検出法だけでは無症状の慢性感染者と脳炎患者との区別が難しいこと、ならびに免疫不全患者では抗体価の上昇が望めないためである。

PCR の標的遺伝子としては 1 虫体あたり 35 コピーある B1 と 110 コピーある 18S-rDNA がもちいられる。両遺伝子の Nested-PCR をおこなったところ、18S-rDNA がもっとも感度の良い方法であった。しかしトキソプラズマ脳炎患者での陽性率は 40% ほどで、炎症部位が髄腔と接触する患者で陽性率が高かった。このことは髄液中の虫体の有無が結果に反映された可能性が考えられる。

(臨床神経 2013;53:1194-1195)

Key words : トキソプラズマ脳炎, 18S-rDNA ネステッド PCR, LAMP 法

トキソプラズマ原虫の我が国における感染率は全人口の約 10% 程度である<sup>1)</sup>。これらの人々は慢性的な感染者であり、抗体価は陽性であることから急性感染者を抗体価だけで判別することは難しいのが現実である。米国疾病対策予防センター (Centers for Disease Control and Prevention) の寄生虫に関するホームページ (dpd.cdc.gov/dpdx/Default.htm) に掲載されている抗体価に対する判断によれば、どの項目も再検査を推奨しており、最終判断は専門の機関に委ねることが記載されている。またトキソプラズマ症が発症するリスクの多い免疫不全者では抗体価の上昇が望めない。そこで確定診断のために色々の診断法がもちいられるが、PCR 法もその一つである。

トキソプラズマ原虫の標的遺伝子としては 1 虫体あたり 35 コピーある B1 と 110 コピーある 18S-rDNA がもちいられる。Fig. 1 に示されたのは 18S-rDNA を標的にする Nested-PCR プライマーである。1 回目の PCR を標的遺伝子の Fig. 1 に示された部位の外側からおこない 311 bp の断片を合成する。コンデションは 94°C 1 分、42°C 1 分、72°C 1 分を 40 サイクルおこなった。2 回目の PCR は 311 bp の内側の 290 bp を 1 回目と同じコンデションで 40 サイクルおこなった。合成遺伝子の中間付近に記載された二つのレストリクシオンサイトによりトキソプラズマの遺伝子であることが確認できる。結果の特異性は非常に高くトキソプラズマ症患者以外の症例では陽性になる例は 1 件もなかった<sup>2)</sup>。B1 遺伝子に関しても同じような操作をおこなったが 18S-rDNA にくらべて感度的に低かったのでここでは省略する。

今回もちいたサンプルに関してはトキソプラズマ脳炎と確定診断された患者の髄液に限定して記載する。またこれらサンプルの取り扱いに関してはすべて防衛医科大学の倫理委員会の承諾をえている。

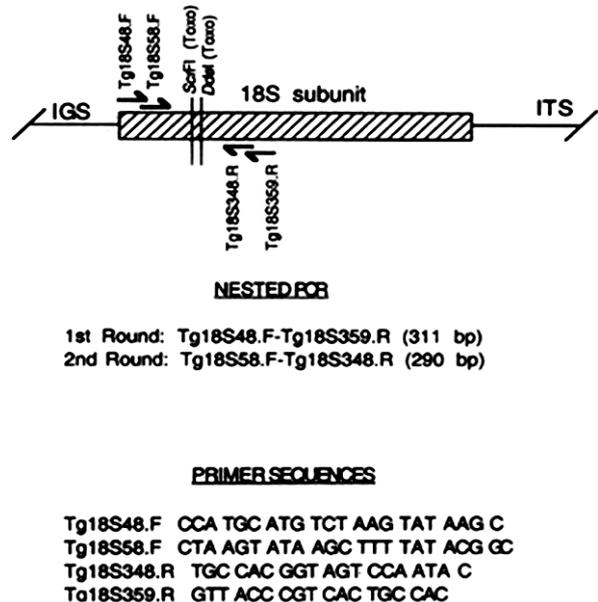


Fig. 1 18S-rDNA を標的にした Nested PCR プライマー。

Fig. 2 はトキソプラズマ脳炎患者の髄液をサンプルとしたときの PCR 陽性率と脳の炎症部位と髄腔との接触に関する内容をまとめた結果である。この内容の一部は参考文献 2) にまとめて記載されている。トキソプラズマ脳炎患者髄液の約半数が PCR 陽性で、炎症部位が髄腔と接触する傾向がみられた。このことは Nested-PCR の感度の問題ではなく、髄液中における虫体の有無が結果に反映されたものと考えられる。実際この PCR の感度は  $10^{-8}$  ng/ul と非常に高く、1 虫体

<sup>1)</sup> 慶應義塾大学医学部感染症学教室 [〒 160-8582 東京都新宿区信濃町 35 予防医学校舎]  
(受付日: 2013 年 5 月 31 日)

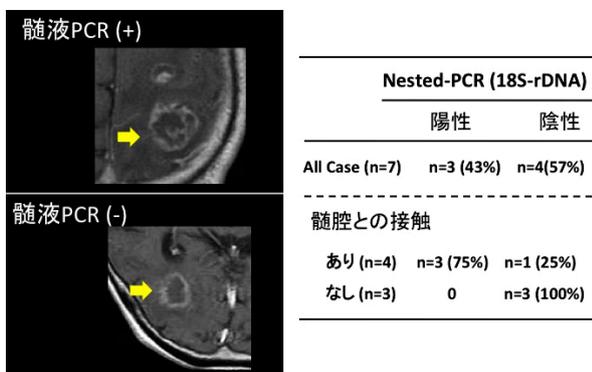


Fig. 2 髄液 PCR 法の結果と画像所見との関連.

でも検出可能な値である.

以上の結果を総合すると、トキソプラズマ脳症を PCR 法だけでは診断できない症例が約半数存在する。そういう意味で PCR 法は補助的な診断法である。最終的には血清診断法、画像診断法、核医学診断法などとの組み合わせによる総合的な判断が必要と思われる。

現在の Nested-PCR 法は感度的にすぐれた方法であるが、もっと低価格で簡便な方法を将来的には考えなければならぬ。そこで栄研化学が開発した LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法について検討した。この方法は標的遺伝子の 6 つの領域に対して 4 種類のプライマーを設定し、鎖置換反応を利用して一定温度で反応させる。特別な PCR 専用のサーマルサイクラーを必要とせず、サンプルの遺伝子、プライマー、鎖置換型 DNA 合成酵素、基質の混合

液を 65°C 付近で保温することによって反応が進み、検出までの工程を 1 ステップでおこなうことができる。このことは低価格のランニングコストと簡便な工程の実現には最適な方法である。

今回トキソプラズマの B1 遺伝子に関しては 3 つの領域と 18S-rDNA に関しては 6 つの領域に関してプライマーを設定して LAMP 法をおこなった (詳細は略)。その結果、LAMP 法の進行は確認されたが、18S-rDNA を標的とした Nested-PCR 法以上の感度はえられなかった。今後のさらなる検討が必要であろう。

謝辞：以上トキソプラズマ脳炎の PCR 検査法について記載してきたが、18S-rDNA の Nested-PCR 法はワシントン大学の L.David Sibley 教授の研究室で筆者が教わったものである。

またこの発表で使用したデータは、筆者の研究室で大学院を修了し、現在防衛医科大学内科助教の前田卓哉先生がまとめたものである。両先生に厚くお礼を申し上げたい。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれもありません。

## 文 献

- 1) Sakikawa M, Noda S, Hanaoka M, et al. Anti-Toxoplasma antibody prevalence, primary infection rate, and risk factors in a study of toxoplasmosis in 4,466 pregnant women in Japan. Clin Vaccine Immunol 2012;19:365-367.
- 2) Mikita K, Maeda T, Ono T, et al. The utility of cerebrospinal fluid for the molecular diagnosis of toxoplasmic encephalitis. Diagn Microbiol Infect Dis 2013;75:155-159.

## Abstract

### The diagnosis of toxoplasmic encephalitis by polymerase chain reaction

Takashi Asai, Ph.D.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Infectious Disease, Keio University School of Medicine

The nested polymerase chain reaction (PCR) and the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay were performed to detect and identify toxoplasma parasites in human cerebrospinal fluid (CSF). The performed nested PCR targeting the 18S rDNA using primers generated by Dr. L.D. Sibley instead of the conventionally used primers that target the B1 gene. Toxoplasma gondii-specific LAMP primers targeting both genes were also designed. The clinical sensitivity and specificity were evaluated using clinical CSF samples from 16 patients with toxoplasmic encephalitis (TE) and from 12 patients with other diseases. The 18S rDNA nested PCR showed the highest detection sensitivity limit with a minimum of  $1.0 \times 10^{-8}$  ng/ $\mu$ l. However, sensitivity and specificity of nested PCR with clinical specimens were 50% and 100%, respectively. The sensitivity of molecular diagnosis of TE is not sufficient; therefore, patients clinically suspected of having TE should be treated promptly. This molecular diagnostic tool would restrictively facilitate a definitive diagnosis of TE at an early stage in approximately 50% of patients.

(Clin Neurol 2013;53:1194-1195)

**Key words:** Toxoplasmic encephalitis, 18S-rDNA nested PCR, loop-mediated isothermal amplification assay