

学位論文抄録

Multiplex PCR法を用いた皮膚病変からの迅速なヘルペスウイルスの同定
(Quick detection of herpes viruses from skin lesions using multiplex PCR)

境 恵祐

Keisuke Sakai

指導教員

尹 浩信 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻皮膚機能病態学

学位論文抄録

【目的】皮膚科の臨床の場合において、皮膚にさまざまな水疱、糜爛、潰瘍などを見かけることがあるが、それがヘルペスウイルス属感染症によるものかどうか診断に迷うことがある。ウイルス性疾患であるのかどうか、どのウイルスによる疾患なのか同定することは治療方針に直結するため、出来るだけ迅速な診断が求められる。リアルタイム PCR はプライマーを設定することでウイルスに特異的な DNA 部位を増幅させるため診断に有用であるが、今までの方法では臨床検体から DNA の抽出を行わなければならない、時間がかかり、手順の煩雑さから検体の汚染をきたす恐れがあった。これらの問題解決のため直接臨床検体を用いてリアルタイム PCR を行い、正確かつ迅速にヘルペスウイルス感染症の診断ができる検査方法の確立を目的とした。

【方法】臨床検体（水疱蓋、びらん・潰瘍面のぬぐい液）を、DNA抽出作業を行うことなく直接リアルタイムPCRに用いてウイルス同定ができるかどうか検討した。また、同一検体に対して複数のプライマーを同時に用いるmultiplex PCR法を併用することで、より迅速にウイルス同定が行えるかどうかを確認した。

【結果】DNAの抽出を行わなくとも、臨床検体と滅菌蒸留水を混ぜた溶解液を用いたPCR検査でウイルスのDNAは正常に増幅され、異なる検体同士でもそれぞれのウイルスの型に特異的なdissociation curveと、ウイルスの型ごとに同一のピーク温度が見られた。増幅されたPCR産物について電気泳動を行い、設定したプライマーから予測される増幅産物の長さに合致した結果が得られた。dissociation curveのピーク温度は増幅産物の長さが長いほど高かった。水痘帯状疱疹ウイルスと単純疱疹ウイルス1型、2型の計3種類のプライマーを同時に用いて解析を行うmultiplex PCR法でも、検体に含まれるウイルスの型に特異的なdissociation curveとピーク温度が認められた。dissociation curveの形状とピーク温度を観察することによって、水痘帯状疱疹ウイルスと単純疱疹ウイルス1型、2型のいずれかのDNAが検体に含まれていた場合はそれらのウイルス感染症と診断することができた。検体採取から診断までにかかる時間はおよそ2時間であり、既存の方法よりも迅速な診断が可能であった。

【考察】水疱・びらんなど検体の性状を選ばず、非侵襲的かつ迅速に目的とするウイルスのDNAを皮膚病変から同定できたことにより、ヘルペスウイルス感染症のうち水痘帯状疱疹ウイルス・単純疱疹ウイルス1型、2型を早期に診断することができた。これにより早期に治療を行うことができ、重症化や帯状疱疹後神経痛などの後遺症の発生を減ずることができると思われる。また、今までウイルス感染症の診断が困難であった皮膚病変についてもウイルス同定検査を試みる事ができるため、今後病因解明の手段として有用な検査であると考えられる。

【結論】皮膚病変からの検体を用いて直接multiplex PCR法を行うことで水痘帯状疱疹ウイルス感染症ならびに単純疱疹ウイルス感染症を迅速に同定することができた。結果を得られるまでの手順の省略と時間短縮ができ、早期診断治療に結びつく方法である。