

## 研究No. 2

## 2022 年度 病院医学教育研究助成成果報告書

報告書提出年月日	2023 年 3 月 31 日
研究・研修課題名	Human herpesvirus6 (HHV6) および Human herpesvirus7 (HHV7) の DNA 定量 PCR 検査法の確立
研究・研修組織名 (所属)	検査部
研究・研修責任者名 (所属)	松田親史 (検査部)
研究・研修実施者名 (所属)	竹谷 健 (小児科) 荒木 剛 (検査部)

成果区分	<input type="checkbox"/> 学会発表 <input type="checkbox"/> 論文掲載 <input type="checkbox"/> 資格取得 <input type="checkbox"/> 認定更新 <input type="checkbox"/> 試験合格 <input type="checkbox"/> 単位取得 <input checked="" type="checkbox"/> その他の成果 ( 該当なし )
該当者名 (所属)	松田親史 (検査部)
学会名 (会期・場所)、認定名等	未定
演題名・認証交付元等	該当なし
取得日・認定期間等	該当なし
診療報酬加算の有・無	<input type="checkbox"/> 加算有 ( ) <input checked="" type="checkbox"/> 加算無

**目的及び方法、成果の内容****① 目的**

Human herpesvirus 6, 7 (HHV-6, 7) は 6, 7 番目に発見されたヒトヘルペスウイルスで、これらのウイルスの中枢神経病原性はこれまでの研究で明らかになっており、初感染時の熱性けいれんや脳炎・脳症例に加え、当院のような移植治療を行う施設においては、特に臓器移植患者をはじめとした免疫不全宿主でのウイルス再活性化に伴う脳炎も問題となっている。HHV-6 初感染時の中枢神経合併症の中で最も重篤な合併症である脳炎・脳症は、全国調査の結果本邦で年間約 60~100 例程度発生していると推計されており、HHV-6 と HHV-7 をまとめると、わが国ではインフルエンザウイルスに次いで 2 番目に多い起因ウイルスとされている。髄液中ウイルスは初感染時の脳炎・脳症例では検出率が低いため、遺伝子増幅によるウイルスの検出は有用性が高い検査として位置付けがなされている。

現在、当院においては、日和見感染症を検出する目的でマルチプレックス PCR 法を用いた定性検査が実施されている。リアルタイム PCR 増幅曲線から半定量値を算出できるが、その値は定量検査に置き換えることができないほど低い信頼度であった。実際の医療現場において患者の経過を見ることを踏まえると、残念ながら半定量値ではその評価が困難と考えられる。

本研究では、大学病院の多様化する医療の中で上記病態発生の可能性が高いことを鑑みて、HHV-6/HHV-7 の遺伝子 (DNA) 定量検査を院内で実施できるようにすることを目的とする。

**② 方法**

対象は、合成遺伝子を用いてその定量性を測定して試薬性能を検討した。

試薬は TaqMan PCR 法を用いた既報 (Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017 Mar 1;58(3):1553-1559.) のプライマー及びプローブをそのデザイン情報を基に作成をした。

分析器は Lightcycler480 (ロシュ) を用いた。

【TaqMan PCR 法の測定原理】蛍光物質 (FAM) とクエンチャー物質を修飾させたオリゴヌクレオチドであるプローブは、アニーリング工程で鋳型 DNA にハイブリダイズするように設計されている。しかしながら、ハイブリダイズした段階ではプローブ上に励起光の照射を抑制するクエンチャー

(様式1)

ーが存在するために、蛍光の発生は抑制されている。その後の伸長反応工程で、TaqDNA ポリメラーゼのもつ活性により、鋳型にハイブリダイズしたプローブが分解されることにより、蛍光色素がプローブから遊離し、クエンチャーによる抑制が解除されて蛍光を発するようになる。この蛍光色素をリアルタイムで測光し、リアルタイムの値として迅速かつ正確に遺伝子の定量を行うことを可能とした方法である。

検討内容は、同時再現性試験、日差再現性試験、感度試験、レンジ試験および検量線の評価を行った。

同時再現性試験：1回のアッセイで1濃度につき同一プレート内で8wellを用いて評価を行った。

検討で用いた濃度は、100、10,000、100,000 コピ-/ $\mu$ Lを用いた。

日差再現性試験：5日間でそれぞれキャリブレーションおよびアッセイを行い評価した。

検討で用いた濃度は、100、10,000 コピ-/ $\mu$ Lを用いた。

感度試験：25 コピ-/ $\mu$ Lの濃度の合成遺伝子を用いて8well/日ずつ3日間で計24回測定を行い、低値域の感度を評価した。

レンジ試験：100 コピ-/ $\mu$ Lから1,000,000 コピ-/ $\mu$ Lまでの直線性について検討を行った。

③ 成果

反応系についての再現性の検討データを表1に示す。合成遺伝子を8回連続測定した同時再現性試験では、試料の平均値が、100、10,000、100,000 コピ-/ $\mu$ Lに対して、変動係数CV値はそれぞれHHV6が、5.8%、11.5%、6.7%、HHV7が、10.4%、3.0%、6.1%であった。また5日間にわたり行った日差再現性試験では、試料の平均値が100、10,000 コピ-/ $\mu$ Lに対して、CV値は、それぞれHHV6が、11.5%、7.4%、HHV7が、6.9%、8.0%であった。

表1 本測定系の再現性試験結果

	同時再現性						日差再現性				
	HHV6			HHV7			理論値	HHV6		HHV7	
理論値	1.00E+02	1.00E+04	1.00E+06	1.00E+02	1.00E+04	1.00E+06		1.00E+02	1.00E+04	1.00E+02	1.00E+04
1	109	12700	1070000	86.4	9190	1170000	1日目	105	10200	93.1	9630
2	112	10200	930000	93.1	9110	1200000	2日目	98.3	10300	108	10200
3	123	10900	1030000	70	9360	1140000	3日目	98.1	12100	96.4	8350
4	113	13200	953000	88.7	9140	1220000	4日目	87.8	11600	109	10200
5	105	11500	1110000	84.4	9630	1320000	5日目	106	11100	103	10000
6	123	12300	1120000	73.7	8890	1090000	MEAN	99.0	11060.0	101.9	9676.0
7	117	9730	1080000	78.1	8730	1130000	SD	7.3	820.4	7.0	776.9
8	109	13200	1070000	72.8	9140	1130000	CV	7.3	7.4	6.9	8.0
MEAN	113.9	11716.3	1045375.0	80.9	9148.8	1175000.0					
SD	6.6	1345.3	69936.6	8.4	273.0	71912.6					
CV	5.8	11.5	6.7	10.4	3.0	6.1					

感度試験においては8well/日を用いて3日間計24回測定を行い、25 コピ-/ $\mu$ Lにおける低値域の感度を評価した結果、検出率は100%であり25 コピ-/ $\mu$ Lまでの検体を感知できることを確認した。

表2 本測定系の感度試験結果

		HHV6	HHV7			HHV6	HHV7			HHV6	HHV7
1日目	1	13.1	4.6	2日目	9	12.1	21.3	3日目	17	19.8	31.1
	2	17.8	6.46		10	42.7	19.8		18	30.9	10.4
	3	19.8	10.9		11	22.9	16.6		19	39.7	26.8
	4	15.6	13.5		12	12	17		20	51.5	10.4
	5	22.9	37.1		13	43.3	28.3		21	33.9	26.8
	6	26.9	8.82		14	26	24.8		22	36	13.4
	7	32.8	11.1		15	12.7	44.5		23	33.3	35.4
	8	23.6	6.13		16	17.5	6.39		24	41.1	12.4

レンジ試験においては、100 コピー/μL から 1,000,000 コピー/μL までの直線性について検討を行った。結果原点を通る直線が得られ 100 コピー/μL から 1,000,000 コピー/μL までの測定レンジを確認した。

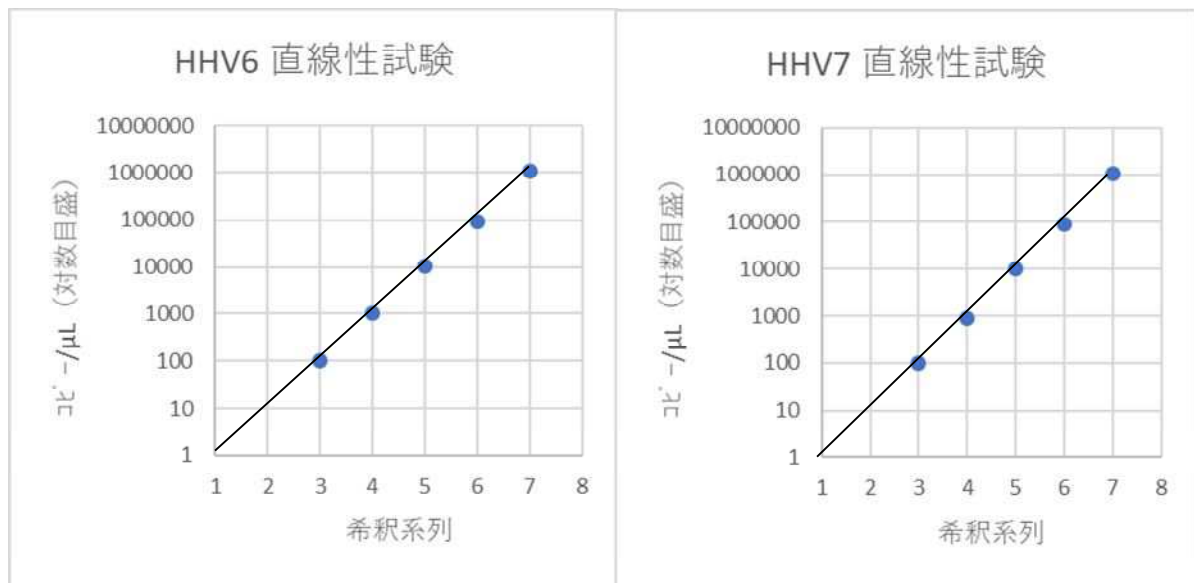


図 1 直線性試験結果

#### ④ まとめ

HHV-6/HHV-7 は、乳幼児期の初感染時だけでなく、主に免疫抑制状態下にある成人での再活性化時にも脳炎・脳症の原因として注目されている。造血幹細胞移植後の HHV-6 および HHV-7 脳炎に対して抗ウイルス薬が承認されておりその治療に関しても確立しつつある。

今回の検討データから、TaqManPCR 法を用いた HHV-6/HHV-7 遺伝子定量の測定系を確立することができた。そのため、院内で迅速診断が実施可能となり、早期に適切な治療を行うことで、当該疾患の患者の救命に寄与できる。さらに、本法の定量性が確認できたことから、治療効果判定にも有用であると考えられる。