

平成27年度病院医学教育研究助成成果報告書

報告年月日：平成28年 月 日

研究・研修課題名	リアルタイムPCR法を用いたEBウイルス検査
研究・研修組織名（所属）	検査部
研究・研修責任者名（所属）	佐藤 恵美（検査部）
共同研究・研修者名（所属）	竹谷 健（輸血部）、松田 親史、三島 清司、長井 篤（検査部） 椎名 浩昭（泌尿器科）、鈴木 淳司（腫瘍血液内科）、 山口 清次（小児科）

目的及び方法、成果の内容

①目 的

造血幹細胞移植や腎移植などの移植後は臓器移植の拒絶反応や造血幹細胞移植の合併症であるGVHDを予防するために強力な免疫抑制剤が必要となるが、それに伴いさまざまな感染症が合併する。特にEBウイルス感染症では、移植後リンパ増殖症、EBウイルス関連血球貪食症候群などの重篤な疾患が発症する。免疫抑制剤投与中に発熱・リンパ節腫脹や肝酵素の上昇、炎症反応の上昇が認められることがあり、その原因が移植後の拒絶反応によるものか、感染症によるものかを早期に診断し、治療を開始することが患者の予後に影響する。

現在、EBV遺伝子検査は外部委託検査により行われているため、結果報告に時間を要し、早期診断が困難である。

リアルタイムPCR法はウイルスDNAを2-3時間以内に増幅でき、定量も可能であることから、治療効果も併せて評価可能であり、その後の治療方針の決定に有用である。本研究では院内において正確かつ迅速に検査可能なリアルタイムPCR法を用いたEBV遺伝子検査を実施することを目的とする。

②方 法

1. 対象

2014年2月から2015年1月の間に外部委託検査においてEBV検査を実施した患者検体43検体を用いた。

2. 方法

1) DNAの抽出

外部委託検査でEBVを測定した残りの全血（200 μ L）からQIAamp DNA Blood Mini Kitを用いてDNAを抽出する。

2) PCR反応

DNA溶液5 μ LをPCR反応液15.0 μ Lに加え、Light cyclere480（ロシュ・ダイアグノスティック）を使用し、95 $^{\circ}$ C10分間の後、95 $^{\circ}$ C10秒間、62 $^{\circ}$ C1分間のPCR反応を50サイクル繰り返し、測定を行った。EBV DNA定量値については既知濃度の標準物質から求めたコピー数（コピー/ μ L）により求めた。

3) 同時再現性

4例の患者全血を用いて5回連続測定を行い、CP値のCV値を求めた。

4) 外部委託検査との比較検討

外部委託検査で行われたEBウイルスDNA定量の結果と当院での結果（EBV PPS Set、日本遺伝子研究所/リアルタイムPCR法）を比較検討する。

3. 標準作業手順書（SOP）の作成

遺伝子検査は検体からの核酸の抽出、増幅、検出といった工程に大別される。最終的にはPCR反応により得られた多量の増幅産物を扱う。しかし、増幅産物の取扱いを誤ると、他の検体へのコンタミネーションに繋がり、検査結果に大きく影響することとなる。また、用手法で行う作業が多いことから、測定者間の技術格差が大きいのも現状である。これらのことから、我々は常に妥当性のある検査結果、精度が保てるよう標準作業手順書（SOP）を作成する。

③成 果

1. 同時再現性

4例の患者検体を用いて行った。その結果、CVは0.23～0.68%と良好な結果であった（表1）。

表1. 同時再現性

	A	B	C	D
1	30.21	30.58	31.05	29.47
2	29.95	30.66	31.04	29.68
3	30.11	30.8	31.18	29.45
4	30.3	30.97	31.03	29.59
5	30.5	30.6	30.99	29.62
Mean	30.21	30.72	31.06	29.56
SD	0.21	0.16	0.07	0.10
CV(%)	0.68	0.53	0.23	0.33

2. 外部委託検査との比較検討

外部委託検査で行われたEBウイルスDNA定量法（Real-Time PCR法）との比較検討を行った。43検体のうち陽性と判定された24検体について院内で用いている単位（コピー/ μ L）を換算式により外部委託検査で用いられている単位（コピー/ 10^6 cells）に換算した（表2）。それぞれの対数値を比較し、相関性をみた。その結果、 $r=0.881$ と高い相関が得られた（図1）。3例の検体について2法の間には乖離がみられた。その要因として①添加するDNAサンプル量が異なること。②プライマープローブ配列が異なるため、感度の違いがある。③院内検査は外部委託検査で行われた残検体を用いたため、サンプルのDNAが劣化した。④マスターミックス試薬のポリメラーゼ活性や阻害物質に対する耐性度の違いなどが挙げられる。

表 2. EBV DNA 定量 換算表

Sample No	外部委託検査		院内検査			
	EBV 定量値 (コピー /10*6cells)	換算値 log(コピー /10*6cells)	EBV 定量値 (コピー/μl)	DNA 濃度 (ng/ul)	換算値 (コピー /10*6cells)	換算値 log(コピー /10*6cells)
1	2.10E+03	3.32E+00	0.792	20.7	2.53E+02	2.40E+00
2	1.70E+02	2.23E+00	0.174	19.3	5.95E+01	1.77E+00
3	1.20E+03	3.08E+00	1.5	25.9	3.82E+02	2.58E+00
4	1.50E+03	3.18E+00	4.47	44.7	6.60E+02	2.82E+00
5	2.00E+01	1.30E+00	0.0011	25.8	2.81E-01	-5.51E-01
6	7.50E+04	4.88E+00	93.9	19.6	3.16E+04	4.50E+00
7	7.10E+02	2.85E+00	1.34	21.2	4.17E+02	2.62E+00
8	5.60E+02	2.75E+00	0.092	23.0	2.64E+01	1.42E+00
9	1.10E+03	3.04E+00	0.183	19.9	6.07E+01	1.78E+00
10	1.20E+03	3.08E+00	0.515	18.8	1.81E+02	2.26E+00
11	2.30E+02	2.36E+00	0.156	19.6	5.25E+01	1.72E+00
12	4.20E+02	2.62E+00	0.181	21.5	5.56E+01	1.74E+00
13	9.70E+03	3.99E+00	3.42	30.8	7.33E+02	2.87E+00
14	1.10E+02	2.04E+00	0.382	24.7	1.02E+02	2.01E+00
15	4.10E+02	2.61E+00	0.278	21.8	8.42E+01	1.93E+00
16	1.90E+02	2.28E+00	0.212	16.7	8.38E+01	1.92E+00
17	1.50E+05	5.18E+00	126	23.0	3.62E+04	4.56E+00
18	1.40E+04	4.15E+00	17.3	61.4	1.86E+03	3.27E+00
19	8.60E+02	2.93E+00	0.386	32.1	7.94E+01	1.90E+00
20	7.50E+02	2.88E+00	0.188	10.1	1.23E+02	2.09E+00
21	2.30E+03	3.36E+00	92.8	23.0	2.66E+04	4.43E+00
22	3.40E+03	3.53E+00	21.7	43.7	3.28E+03	3.52E+00
23	3.90E+02	2.59E+00	0.356	47.7	4.93E+01	1.69E+00
24	6.40E+01	1.81E+00	0.0193	91.7	1.39E+00	1.43E-01

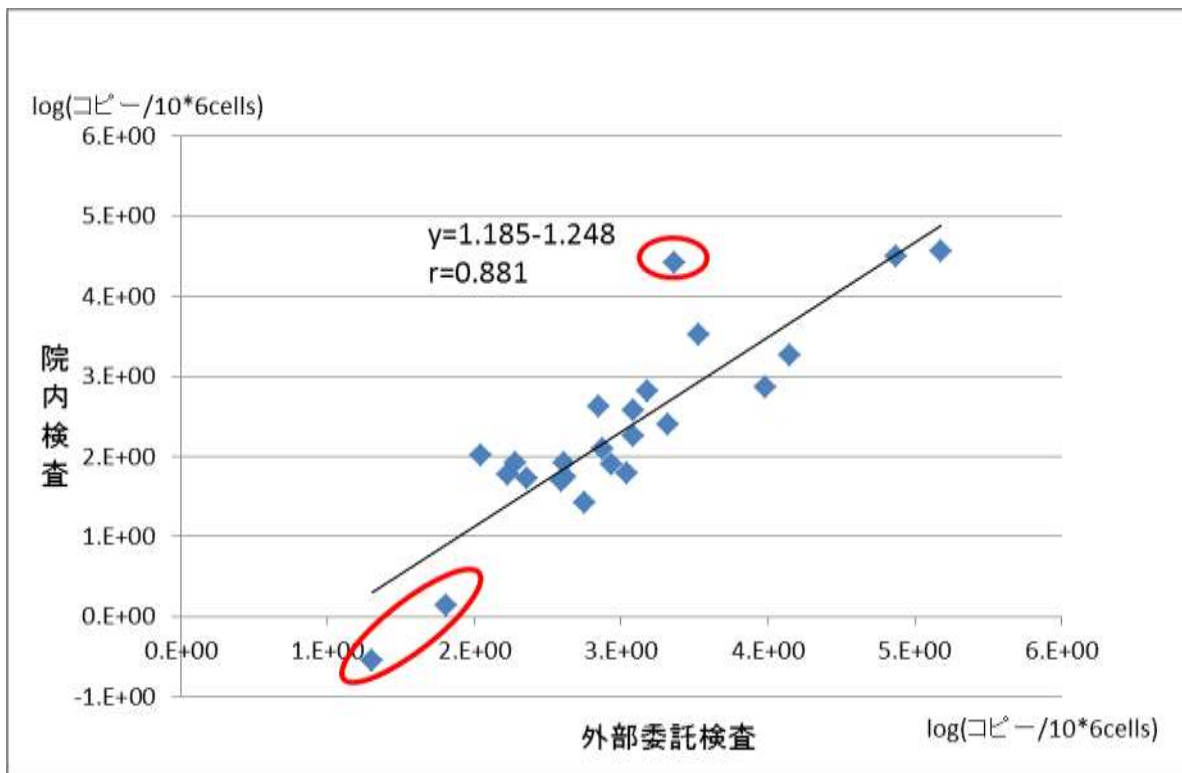


図 1. 2 法の EBVDNA 定量の相関

3. 標準作業手順書（SOP）の作成

遺伝子検査を実施する上での操作方法やコンタミネーションの影響を避けるために操作エリアを区別することなど統一のルールを記載した SOP を作成した。スタッフが SOP をみることで正確に測定ができるよう SOP 作成にあたっては図を多く盛り込み、視覚的に理解可能とした。(図 2)

- ④ 「Calculate」をクリックすると Standard Curve が表示される。
- ⑤ 「Error」値、「Efficiency」値がそれぞれ基準を満たしていること、コントロールが許容幅に入っていることを確認し、外れた場合は再検査する

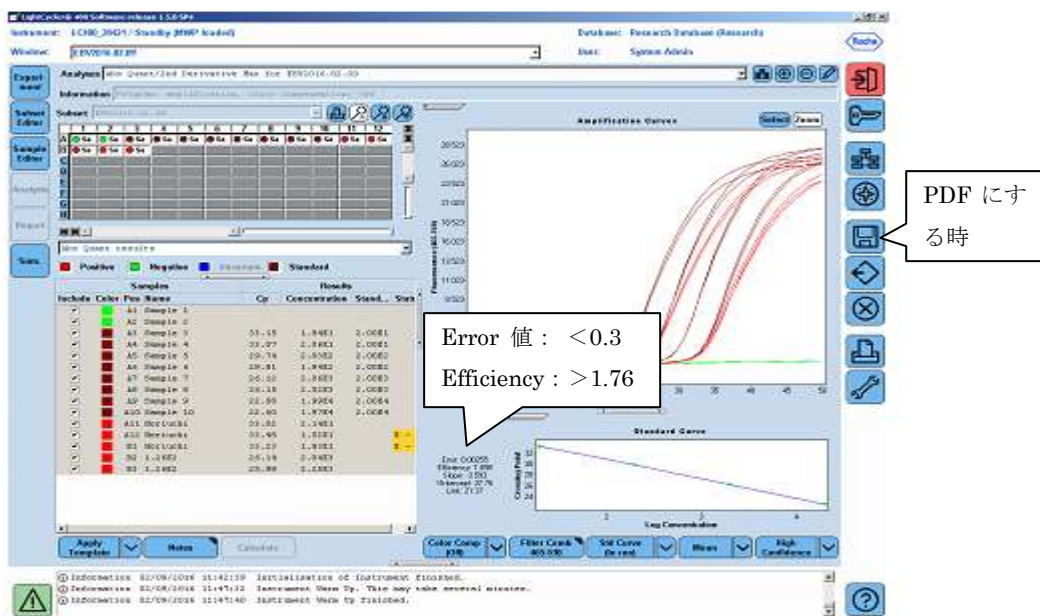


図 2. 標準作業手順書内容の一例

【まとめ】

今回の検討の結果、再現性は良好で外部委託検査による EBV DNA 検査との相関も比較的良好であった。EBV DNA 定量検査は、標準物質を用いたリアルタイム PCR 法が用いられているが、使用される標準物質は各施設でさまざまであり、施設間で定量値を比較できないという問題点がある。生物学的製剤研究所（NIBSC）から一次国際標準品が入手可能であるが高価で輸入経路が複雑であることから最近、信州大学：岩下らにより一次国際標準品を用いて二次標準物質が作製された¹⁾。今後、他施設で利用可能な二次標準物質が普及することで、リアルタイム PCR 法による EBV DNA 定量値の施設間差と EBV 関連疾患の疾患毎の診断基準の設定および治療効果の評価が可能になると考えられる。

当院では 2015 年 6 月より先進医療として「リアルタイム PCR 法による EB ウイルス感染症迅速診断」を実施している。2015 年 10 月～2016 年 3 月までの半年間の依頼件数は 26 件であり、外部委託検査時の依頼件数 30 件/年に比べ増加していることから、臨床への貢献度は高いものと思われる。また、迅速に結果報告が可能となり、患者の予後の改善だけでなく、治療期間の短縮、医療費の削減に繋がると考える。

■文献

1) 岩下千奈美：「EBV 核酸増幅検査用第一次国際標準品（1st WHO International Standard）に基づく二次標準物質を用いた末梢血中 Epstein-Barr virus (EBV) DNA 量の評価