

題 目

本邦におけるトキソプラズマ脳炎診断法の検討

氏 名

三木田 馨

(総合内科学専攻)

防衛医科大学校

平成26年度

目 次

第1章 緒言	1
第2章 本邦におけるトキソプラズマ脳炎診断における、 血清抗トキソプラズマ抗体検査の有用性の検討	
第1節 目的	5
第2節 方法	5
第3節 結果	6
第4節 小括	7
第3章 トキソプラズマ脳炎に対する髄液を用いた遺伝子診断法の確立	
第1節 目的	8
第2節 方法	8
第3節 結果	11
第4節 小括	12
第4章 本邦におけるトキソプラズマ脳炎診断における、 画像検査の有用性の検討	
第1節 目的	13

第 2 節 方法	13
第 3 節 結果	14
第 4 節 小括	15
第 5 章 考察	17
第 6 章 結論	22
謝辭	23
引用文献	24
図表	28

第1章 緒言

トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*) は、孢子虫類に属する細胞内偏性寄生性原虫で、ネコ科動物を終宿主とし、ヒトを含む恒温動物を中間宿主とする代表的な人畜共通寄生虫で、トキソプラズマ症の病原体である。ヒトへの感染は、終宿主であるネコの糞便中に排泄されるオーシストの経口摂取、およびブタ、ヒツジなどの筋肉中に含まれる嚢子を不完全な加熱調理で経口摂取することで成立する後天性感染と、初感染妊婦から胎児への先天性感染がある。後天性感染は、初感染時は無症状であることが多いが、一度感染すると休眠型の嚢子を形成する事により宿主の防御免疫能から逃れる事で、一生涯、慢性的に感染が持続するとされ、世界人口のおよそ3分の1が慢性感染していると推定されている¹⁾。慢性感染は、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV)による後天性免疫不全症候群 (acquired immune deficiency syndrome: AIDS) や、移植・免疫抑制療法による宿主の免疫低下により再燃し、致死的な疾患であるトキソプラズマ脳炎 (toxoplasmic encephalitis: TE) をきたす^{2,3)}。AIDSに合併するTE患者数は、抗HIV療法の発達により1995年までは著明な減少を続けていたものの、HIV感染の診断の遅れや薬剤耐性HIV感染症例の存在により、2000年以降は患者数の減少のペースが鈍くなっており、現在でも重要な日和見感染症である⁴⁾。加えて、移植・免疫抑制療法の発達により、TE発症リスクのある患者数も増加しており、本邦でも重要性が増している疾患である。

TEの臨床診断には、アメリカ疾病予防管理センター (Centers for Disease

Control and Prevention: CDC) による診断基準が一般に用いられている⁵⁾。すなわち、1) 頭蓋内疾患を示唆する局所の神経症状、または意識障害がある 2) 頭部 CT または頭部 MRI で病巣を認める 3) トキソプラズマ原虫に対する血清抗体 (IgM、IgG) を認めるか、あるいはトキソプラズマ症の治療に反応する、の 3 項目を満たすものが臨床的に TE と診断される。しかしながら、TE 診断における血清診断の有用性には懐疑的な意見もある。なぜなら、TE 患者での血清抗トキソプラズマ IgG 抗体価 (anti-*T. gondii* IgG antibody: *TgAb*) は 30% 程度の症例でしか上昇が見られず、IgM 上昇はほとんど見られないことが報告されているからである^{6,7)}。また、トキソプラズマ感染率は国・地域で異なるとされており、実際にその抗体陽性率は 6.1 から 74.5% と幅広い事が報告されている⁸⁾。加えて、感染率の高い地域・国においては、血清 *TgAb* 検査の TE 診断における意義が低い事が報告^{9,10)}されている。本邦における血清 *TgAb* 陽性率は 10% 程度と報告されており^{11,12)}、比較的陽性率は低めであることから、血清 *TgAb* 検査が TE 診断に有用である事が期待される。しかしながら、それについて論じた文献は検索した限り存在せず、本邦における血清 *TgAb* 検査の有用性については明らかにしていない。

血清抗体の TE 診断における有用性には疑問が残るため、頭蓋内病変をきたす多数の疾患の中から、1、2) で TE を鑑別する必要があるが、それは非常に困難であり、実際には CDC の臨床診断基準が有用でない場合があると考えられる。そのため、臨床の現場では多くの症例で診断前治療をせざるをえない状況となっている²⁾。しかしながら、進行した TE の予後は非常に不良で、致死率が 63%

に達するという報告もある¹³⁾。そのため、迅速かつ確実な TE 診断が患者の予後の改善に必要不可欠であることから、TE 診断の確実性をあげる方法が研究、検討されている。

近年、各種臨床検体を用いた遺伝子診断法が開発・検討されている。PCR 法や real-time PCR 法による、臨床 CSF 検体中の *T. gondii* DNA 検出が有用であると報告されているものの、その報告内容を詳細に検討してみると、これらの検査法の感度は高くはない¹⁴⁾。また、血液など他の臨床検体を用いた TE 遺伝子診断も、その有用性を示す事ができた報告は認められず、現状では遺伝子診断を用いた TE 診断法は確立されていない。

CDC の臨床診断基準では、画像上頭蓋内病変を呈する事が TE 診断の必要条件にあげられているが、その画像所見を解析、検討して TE 診断の確実性をあげる試みが報告されている。海外においては、TE 診断における脳 MRI 画像所見、²⁰¹ Tl single-photon emission CT (SPECT) の有用性の検討がされているが^{15, 16)}、本邦においては、TE 診断に関してのまとまった画像所見の検討についての報告は調べうる限り存在しない。

本研究では、TE 診断に際して CDC の臨床診断基準では、診断前治療をせざるをえない症例があることを念頭に、1) 本邦におけるトキソプラズマ脳炎診断における、血清抗トキソプラズマ抗体検査の有用性の検討、2) トキソプラズマ脳炎に対する髄液を用いた遺伝子診断法の確立、3) 本邦におけるトキソプラズマ脳炎診断における画像検査の有用性の検討、を行い、本邦におけるより有用性の高い TE 診断方法の検討と、それらを用いた本邦における TE 診断アルゴリ

ズムの開発を行った。

第2章 本邦におけるトキソプラズマ脳炎診断における、血清抗トキソプラズマ抗体検査の有用性の検討

第1節 目的

CDC の TE 臨床診断基準項目に、血清トキソプラズマ抗体検査が陽性である事があげられているが、その有用性は国・地域で異なる事が報告されている^{9,10)}。一方、本邦での TE 診断における、血清トキソプラズマ抗体検査の有用性は明らかになっていない。日本人における *TgAb* 検査の有用性について検討することを目的に本研究を行った。

第2節 方法

(a) 症例と *TgAb* 検査

2005 年以降、複数の共同研究施設で診断された HIV 感染者で TE を呈している症例 (AIDS-TE) 群 11 例と、HIV 感染者で TE を呈していない症例 (Non-TE) 群 75 例を対象とした。AIDS-TE の診断は、① 抗トキソプラズマ薬が神経症状を改善させた場合、② 脳 MRI での多発脳膿瘍に有効であった場合、あるいは③ 脳生検後の病理組織診断によって行われた。血清 *TgAb* 検査は、外部検査会社でトキソプラズマ IgG 抗体を標的にした ELISA 法 (プラテリア トキソ IgG、Bio-Rad, Hercules, USA) で施行された。検査結果は、 $< 6 \text{ IU / mL}$ を陰性、 $\geq 6 \text{ IU / mL}$ かつ $< 9 \text{ IU / mL}$ を判定保留、 $\geq 9 \text{ IU / mL}$ を陽性として判定するのが同社の診断基準であるが、本研究においては偽陰性を極力排除するという

方針を採用して上記基準を単純化し、 $< 6 \text{ IU / mL}$ を陰性、 $\geq 6 \text{ IU / mL}$ を陽性として判定し、抗体陽性率の算出を行った。日本国籍を有する症例を対象とした。

(b) 結果の解析

統計学的処理は F 検定を用いて行い、p 値 0.01 未満を有意差があると判定した。

(c) 倫理的な配慮

本研究計画はヘルシンキ宣言を遵守しており、本校の倫理委員会の承認を得ている。また、臨床情報の集積と解析に関しても本校の倫理委員会の承認を得ている（防衛医科大学校倫理委員会承認番号 1259）。

第 3 節 結果

(a) 患者背景

対象患者の背景を表 1 に示す。AIDS-TE 群 11 例と Non-TE 群 75 例を解析の対象とした。それぞれの群で、男性の割合が多く、年齢の中央値はともに 41 歳であった。

(b) 血清 TgAb 陽性率

図 1 に血清 TgAb 陽性率を示す。対象患者 86 名における血清 TgAb 陽性率は、

23.2 % (20 / 86 例)であった。AIDS-TE 群では陽性率は 72.7% (8 / 11 例)、Non-TE 群で 16.0 % (12 / 75 例)であった。2 群間の抗体陽性率に統計学的に有意差を認めた($p<0.01$)。

(c) TE 診断における血清 *TgAb* 検査の感度・特異度

感度は 72.7%(8 / 11 例)、特異度は 84.0%(63 / 75 例)であった。

第 4 節 小括

本研究では、血清 *TgAb* 検査では 27.3% (3 / 11 例)が陽性を示さず、CDC による既存の診断法では 30%弱の AIDS-TE 症例が見落とされる事が明らかになった。しかしながら、AIDS-TE 群と Non-TE 群の血清 *TgAb* 陽性率はそれぞれ 72.7%、16.0 %で AIDS-TE 群で有意に血清 *TgAb* 陽性率が高いことが示され、血清 *TgAb* 検査が AIDS-TE の診断に有用である可能性が示唆された。

第 3 章 トキソプラズマ脳炎に対する髄液を用いた遺伝子診断法の確立

第 1 節 目的

CDC の TE 臨床診断基準としてとして、血清トキソプラズマ抗体検査があげられている。その有用性は国・地域によって異なる。前項に詳述したように、本邦においては、血清 *TgAb* 検査は TE 診断に有用であることが示唆されたが、感度 72.7%、特異度 84%であり、TE の 27.3%が見落とされる事から、より確実な TE 診断を行う方法の開発が必要であると考えられた。

TE 診断の確実性をあげる方法として、各種臨床検体を用いた遺伝子診断法が開発・検討されている。PCR 法や real-time PCR 法による、臨床 CSF 検体中の *T. gondii* DNA 検出が有用であると報告されているものの、その報告内容を詳細に検討してみると、これらの検査法の感度は高くはない¹⁴⁾。

そこで我々は、nested-PCR 法を用いた、*T. gondii* DNA を標的とする高感度な原虫検出系の確立と、TE 患者の CSF 検体から本法を用いて *T. gondii* DNA を検出することによる、確実な TE 診断法の確立を目的として本研究を行った。

第 2 節 方法

(a) トキソプラズマ原虫の培養と DNA の抽出

T. gondii の RH strain をヒト線維芽細胞で培養し、tachyzoite を回収した¹⁷⁾。回収した tachyzoite は、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) で攪拌し、その後冷凍、解凍を 3 回繰り返す、原虫を破壊した溶液を作成

した。QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用い、メーカーの指示手順に従い、溶液から genomic DNA を抽出した。

(b) nested-PCR 法

L. David Sibley 博士 (Washington University School of Medicine) から *T. gondii* の 18S rDNA を標的にデザインされた nested-PCR のプライマーの提供を受けた。B1 遺伝子を標的にした nested-PCR 法は既に報告されている反応条件を使用した¹⁸⁾。

プライマーセットと PCR 反応条件を表 2 に示す。PCR 反応は、*Takara Ex Taq* kit (Takara Bio inc., Kyoto, Japan)を使用し、thermal cycler (Takara Bio Inc.)で反応を行った。nested-PCR 産物は、ethidium bromide を含む 1.2 % アガロースゲルで電気泳動を行い、LAS-3000 Chemiluminescence image Analyzer (Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan)で可視化した。

(c) nested-PCR 産物の DNA シークエンス

それぞれの nested-PCR 産物を pCR 2.1-TOPO TA cloning plasmids (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)でクローニングし、TOP 10 *E.coli* (Thermo Fisher Scientific) で形質転換を行った。Ampicillin 100 µg / mL を含有した Luria Bertani (LB)培地でクローンの選択を行った。Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen)でプラスミド精製を行った後、増幅した DNA を ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)で反応さ

せ ABI PRISM 310 DNA Sequencer で解析を行った。

(e) nested-PCR 法の検出感度の比較

二つの nested-PCR 法の比較のため、(a)に示した方法で得られた *T. gondii* genomic DNA を 10 ng / μ L から 1×10^{-9} ng / μ L まで 10 倍ずつの希釈系列を作製し、これらを用いて nested-PCR 法と LAMP 法の検出感度を測定した。

(f) 臨床検体

2000 年から 2011 年の間に共同研究施設において、TE と診断された患者から、診断目的で腰椎穿刺により採取された CSF を検査法の評価のために使用した。TE の診断は、① 抗トキソプラズマ薬が神経症状を改善させた場合、② 脳 MRI での多発脳膿瘍に有効であった場合、あるいは③ 剖検によって行われた。

コントロール群として、中枢神経疾患の診断目的で CSF が採取された症例を用いた。これらはいずれも臨床診断され、臨床経過、画像所見、CSF 中の病原体の検出により TE は除外されている。また CSF 採取は、抗菌薬を含むあらゆる治療の前に行われた。

CSF からの DNA 抽出は、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用いて行われ、検査までの間は -80°C で保管されていた。

(g) 倫理的な配慮

本研究計画はヘルシンキ宣言を遵守しており、本校の倫理委員会の承認を得

ている。また、臨床検体の集積と解析に関しても本校の倫理委員会の承認を得ている（防衛医科大学校倫理委員会承認番号 852）。

第3節 結果

(a) nested-PCR 法の検出感度

図2に18S rDNAを標的にしたnested-PCR産物の電気泳動像を示す。アガロースゲル上で $1.0 \times 10^{-8} \text{ ng} / \mu\text{L}$ まで *T. gondii* 由来 DNA bandを確認することが可能であった。一方、B1遺伝子を標的にしたnested PCR産物の検出感度は $1.0 \times 10^{-5} \text{ ng} / \mu\text{L}$ であった(図3)。以上より、18S rDNAを標的にしたnested-PCR法の検出感度が 10^3 倍高いことが示された。

(b) 臨床検体への nested PCR の応用と、感度、特異度の検討

T. gondii の18S rDNAを標的にしたnested-PCR法を患者から得られたCSFに適用することで、TEを他疾患から鑑別することが可能であるかの検討を行った。検討対象とした症例の内訳を表3に示す。16症例が臨床的に免疫不全患者に発症したTEと診断された。TE以外のコントロール群は12例で、その内訳はAIDS合併脳悪性リンパ腫(n=4)、AIDS合併進行性多巣性白質脳症(n=3)、AIDS合併多発脳梗塞(n=1)、併存疾患の無い無菌性髄膜炎(n=2)、併存疾患の無い不明熱(n=1)、そして併存疾患の無いノカルジア脳炎(n=1)のCSFが用いられた。TEとそれ以外のコントロール群のCSFについて、nested-PCR法で検査した結果を表4に示す。TEについて偽陽性は認めず、特異度は100%

であった。しかし、TE と臨床診断された 16 例中、8 例のみで *T. gondii* DNA を検出可能であり、検査感度は 50 %と判定された。

第 4 節 小括

本研究で、*T. gondii* 18S rDNA を標的とした nested-PCR 法を開発し、その検出感度は $1.0 \times 10^{-8} \text{ ng} / \mu\text{L}$ であることが示された。これは既報告の検討¹⁹⁾での最大の検出感度が $2.0 \times 10^{-6} \text{ ng} / \mu\text{L}$ である事から、50 倍以上の検出感度である。TE 臨床診断例の CSF を用いた検討では感度 50 %、特異度 100%であり、本研究で開発した nested-PCR 法により CSF 中の *T. gondii* 18S rDNA が検出できた症例は、TE と確定診断できる事が示された。

第4章 本邦におけるトキソプラズマ脳炎診断における、画像検査の有用性の検討

第1節 目的

第3章に結果を詳述した通り、TE診断におけるCSFを用いたnested-PCR法の有用性が示された。特異度が100%であるため、nested-PCR法で陽性であった場合には、TEと確定診断できる。しかしながら、陰性である場合の補助診断が必要となる。TE診断における脳MRI画像所見、²⁰¹Tl single-photon emission CT (SPECT)の有用性の検討がされているが^{15, 16)}、本邦におけるまとまった報告は調べうる限り存在しない。本研究は、本邦におけるAIDS-TE症例における脳MRI検査、²⁰¹Tl SPECT有用性を検討する事を目的に行われた。

第2節 方法

(a) 症例

2005年から2011年までの間、共同研究施設である、がん・感染センター都立駒込病院、都立墨東病院で診断されたAIDS-TE11例を対象とした。AIDS-TEと診断した根拠は、① 脳MRIで占拠性頭蓋内病変が検出されていること、② トキソプラズマに対する治療により神経症状、画像所見が改善すること、とした。TE診断までは、いずれの症例も抗HIV療法は行われていない。

(b) 画像所見の解析

上記症例について、頭蓋内病変は、gadopentetate dimeglumine (Gd-DTPA) 造影脳 MRI 検査が施行され、病変の分布、数、造影効果が評価された。また、²⁰¹Tl SPECT 検査が施行され、脳への集積の有無が評価された。

(c) 臨床データの解析

データは防衛医科大学校で解析された。

(d) 倫理などへの配慮

本研究計画はヘルシンキ宣言を遵守しており、本校の倫理委員会の承認を得ている。また、臨床情報の集積と解析に関しても本校の倫理委員会の承認を得ている（防衛医科大学校倫理委員会承認番号 1004）。また、共同研究施設の倫理委員会でもそれぞれ承認を得ている（東京都立墨東病院倫理委員会 承認番号 34、がん・感染センター都立駒込病院倫理委員会 包括的同意）。

第3節 結果

(a) 脳 MRI 所見

11 例に Gd-DTPA 造影脳 MRI 検査が施行された。病変の数、分布について、その表 5 に示す。9 症例 (81.8%) に多発病変を認め、2 例 (18.2%) に単発病変を認めた。11 症例で 37 個の病変を確認したが、白質に一番多く分布し (n=21, 56.8 %)、次いで辺縁部（大脳皮質、皮髄境界部）(n=6, 16.2 %)、基底核 (n=5、

13.5 %)と続き、後方窩 (n=3、8.1 %)、視床 (n=1、2.7%)、脳幹 (n=1、2.7 %)への分布は少なかった。

表 6 に病変の大きさと所見について示す。11 症例での 37 個の病変のうち、径 10 mm 未満の病変が 15 個(40.5 %)、10 mm 以上ものが 22 個 (59.5 %)であった。Gd-DTPA 造影では、23 個 (62.2 %)がリング状に造影され、9 個 (24.3 %)が均一に造影された。リング状を呈した病変は 10 mm 以上の病変のうち 17 個 (77.3%)、10 mm 未満の病変のうち 6 個(40.0%)であった。

(b) ^{201}Tl SPECT

11 例に ^{201}Tl SPECT が施行された。単独 AIDS-TE 9 例では、病変部に集積は認められなかった。2 例に、病変部に一致して集積を認めたが、1 例は TE と脳悪性リンパ腫が合併している症例であり、もう 1 例は TE にクリプトコッカス感染が合併している例であった(表 7)。

第 4 節 小括

本邦における、AIDS-TE11 例の Gd-DTPA 造影脳 MRI 検査と ^{201}Tl SPECT 検査所見の解析を行った。画像診断上、AIDS-TE との鑑別が最も重要なのは脳悪性リンパ腫とされているが、本研究での AIDS-TE での Gd-DTPA 造影脳 MRI 所見は、既報告^{15, 20, 21)}と同様に、脳病変の数、分布、大きさ、造影所見に脳悪性リンパ腫での Gd-DTPA 造影脳 MRI 所見で差は認められず、両疾患の鑑別における有用性は示されなかった。一方、 ^{201}Tl SPECT は腫瘍細胞に特異的に集

積を示す検査であり、集積の有無が単独 AIDS-TE と脳悪性リンパ腫の鑑別に有用であることが示唆された。

第 5 章 考察

全世界人口の 3 分の 1 にトキソプラズマ原虫が慢性的に不顕性感染していると考えられている¹⁾。その感染率は 6.1-74.5%と幅広く、国、地域によって異なることが報告されている^{9, 10)}。TE は、免疫不全患者に日和見感染症として生じるが、進行した場合の予後は不良であり、致死率は 63 %という報告がある²²⁾。早期の確実な診断が TE の予後改善に寄与するが、十分な感度・特異度を示す診断法の報告は無い。

抗トキソプラズマ抗体検査所見は、CDC の TE 診断基準の項目のひとつである⁵⁾。しかしながら、血清トキソプラズマ抗体陰性の TE の存在は稀ではない事^{6, 7)}、トキソプラズマ感染率の高い地域・国においては、血清抗トキソプラズマ抗体陽性率が元々高いため、TE 診断における血清トキソプラズマ抗体検査の有用性が低い事が報告されている¹⁰⁾。本邦においては、血清 TgAb 陽性率は 10%とされ比較的陽性率は低めであることから^{11, 12)}、血清 TgAb 検査が TE 診断に有用である事が期待される。第 2 章の検討で示されたように AIDS-TE 群での血清 TgAb 陽性率は 72.7%、Non-TE 群での陽性率 16.0 %と両群間で有意差を認め、本邦での AIDS-TE 診断における血清 TgAb 検査の有用性が示唆された。

HIV 感染者と非 HIV 感染者における抗トキソプラズマ抗体陽性率には差がないとする報告が多い。Israelski DM らは、アメリカにおける HIV 感染者 443 例、非 HIV 感染者 630 例の抗トキソプラズマ抗体陽性率の検討を行い、それぞれ 4%、7%の陽性率を示し、両群間に統計学的有意差を認めない事を報告している²³⁾。同様に、Sykora J らは、チェコスロバキアにおける HIV 感染者、非 HIV 感染

者の抗トキソプラズマ抗体陽性率の検討を行い、それぞれの陽性率が 29.8%、26.1%であり、両群間に統計学的有意差を認めない事を報告している²⁴⁾ことから、本研究で得られた知見は非 HIV 感染者の TE 診断にも応用可能と考えられる。以上、第 2 章の研究結果からは、本邦における TE 診断に血清 TgAb 検査が有用である事が示唆された。今後の更なる症例蓄積を計画中である。

第 3 章の研究では、これまでの *T. gondii* DNA を標的とした遺伝子診断法の報告の多くは、反復配列を 35 コピー持つ B1 遺伝子を標的としているが、我々は *T. gondii* に高い特異性を持ち、反復配列数が 110 コピーと B1 遺伝子よりも高い 18S rDNA が診断を目的とする標的として最適だと考えた。実際に、われわれの検討においても、B1 遺伝子を標的にした nested-PCR 法での検出感度 (1×10^{-5} ng / mL) よりも、18S rDNA を標的にした検出感度が優れていた (1×10^{-8} ng / mL)。この検出感度は、CSF 10 mL 中に 1 トキソプラズマ原虫が存在した場合に相当する。これまでの報告¹⁹⁾での最も優れた検出感度を示した遺伝子診断法の検出感度は 2×10^{-6} ng / mL であり、我々の検出系はその 50 倍の検出感度を示した。また実際の TE 症例の CSF を用いた検討では、特異度 100 %を示し、CSF 中の *T. gondii* DNA を nested-PCR 法で検出することで TE の確定診断ができるという事が示された。

しかしながら、最も優れた検出系を用いたにも関わらず、TE 診断感度は 50 %であった。TE の CSF を用いた 17 の研究のレビューによると、感度は 17 %-100 %で、平均 59 %であると報告されており¹⁴⁾、本研究の感度は、既報告と同程度の結果であった。高感度な検出系を用いているにも関わらず、感度

が向上しなかったことについては、いくつかの理由が考えられる。Chowdhury ら²⁵⁾は、TE 病変は主に脳実質部に存在し、髄膜を巻き込む事は稀であるため、CSF に異常を来す事は少ないと考えられるため、TE 診断における CSF の有用性は低いとしている。また、Sterkers ら²⁶⁾は、host の DNA が混在する事が、PCR 反応に阻害的に働く可能性があるとして報告している。TE の CSF からの DNA 抽出法を比較した報告²⁷⁾があり、方法間で 10 倍の差があるとしている。しかしながら、我々の検出系は既報告と比較して少なくとも 50 倍優れた検出感度を示しているため、我々の用いた DNA 抽出法が感度の上昇を妨げる要因になったとは考えにくい。今後症例を集積し、TE 病変と髄腔の位置関係と検査感度の関連について検討していく予定である。

第 3 章で、CSF に対し nested-PCR 法を用いる事で TE 確定診断が可能である事が示されたが、結果が陰性の際、他の診断法が必要となる。中枢神経病変で AIDS-TE と鑑別が最も問題となる代表的疾患は、脳悪性リンパ腫であるが、²⁰¹Tl SPECT が両者の鑑別に有用であるという報告^{15, 16)}がされるなど、画像検査を用いた TE 診断法が検討されているが、本邦における TE 診断における画像検査の有用性は明らかになっていない。そこで我々は、第 4 章に詳述したように、Gd-DTPA 造影脳 MRI 検査と ²⁰¹Tl SPECT の TE 診断における有用性についての検討を行った。Gd-DTPA 造影脳 MRI による、TE と脳悪性リンパ腫の鑑別は難しいと報告されている²⁸⁾。本研究での、AIDS-TE の病変数、分布は既報告^{15, 20, 21)}と同様であった。また、病変のサイズ、造影パターンも既報告²⁰⁾と同様で、脳悪性リンパ腫との鑑別は困難である。本研究でも、病変の分布に

よる鑑別はできなかった。脳悪性リンパ腫は、急速な増大により中心部への血液供給が不足し壊死を起こすため²⁹⁾、TE 病変で特徴的画像所見とされる壊死所見と同様の所見になり、壊死所見による両者の鑑別は困難である。

²⁰¹Tl SPECT は、腫瘍病変への集積を描出するため³⁰⁾、TE と脳悪性リンパ腫の鑑別に有用とされている¹⁶⁾。本研究でも、²⁰¹Tl SPECT が施行された他疾患を合併していない AIDS-TE 9 症例は、すべて集積が見られず ²⁰¹Tl SPECT は両疾患の鑑別に有用と考えた。しかしながら、Kosuda ら³¹⁾は、サイズの小さな脳悪性リンパ腫の中にはおいては、集積が見られないものがある事を報告している。また、²⁰¹Tl SPECT での AIDS 合併脳悪性リンパ腫診断は、Lorberboym ら¹⁵⁾によると感度、特異度がそれぞれ 96%、76%、また D'Amico ら³²⁾も 96%、75%と報告しており、特異度に問題を残している。その問題を念頭に、²⁰¹Tl SPECT と血清 TgAb 検査を組み合わせる事で、感度、特異度を改善できたという報告がある³³⁾。

われわれは、本研究結果を基に、本邦における TE 診断アルゴリズムの作成を試みた(図 4)。1) 免疫不全患者で、中枢神経症状があり、脳画像検査でも占拠性の病変を呈し、TE が疑われるような症例について、血清 TgAb 検査を行う。本邦における TE 疑い症例では TgAb 検査陽性であれば、TE である可能性が高いため、血清 TgAb 検査陽性：TE の可能性あり、陰性：TE の可能性低い、と考える事ができる。2)次に、TE 疑い患者の CSF を用いて 18S rDNA を標的にした nested-PCR 法を行う。Nested-PCR 法で陽性であれば TE と確定診断できるため、nested-PCR で CSF 中の *T. gondii* DNA 検査陽性：TE 確定診断、陰性：

TE の可能性低い、とする事ができる。3) 最後に、 ^{201}Tl SPECT を行う。集積があれば腫瘍性病変の可能性が高いため、 ^{201}Tl SPECT で集積無し：TE の可能性あり、集積あり：TE の可能性低い、とする事ができる。

以上の 1)から 3)の手順を踏まえて、我々は以下のように定義した。CSF を用いた nested-PCR 法が陽性の場合「TE 確定診断 (Definite TE)」とした。

Nested-PCR 法が陰性であり、かつ a) 血清 *TgAb* 検査陽性、b) ^{201}Tl SPECT で集積無し、の 2 項目とも満たす場合を「TE 準確定診断 (Probable TE)」、1 項目を満たす場合を「TE 疑診 (Possible TE)」、両方とも満たさない場合を「TE 否定 (Non-TE)」とした。諸般の事情で、本アルゴリズムの検査を施行できない症例が存在する事が予想される。本アルゴリズムはそのような症例に対する治療導入を妨げるものでは無い。本研究での症例数は少なく、今後症例の集積を進め、本アルゴリズムの有用性を検討していく予定である。

第 6 章 結論

1. 本邦においては、TE を疑う症例において、血清 *TgAb* 検査が診断に有用である可能性が示唆された。
2. TE 患者の CSF 中の *T. gondii* DNA を検出するための、18S rDNA を標的にした nested-PCR 法を開発し、既報告の 50 倍の検出感度を示す系を作製する事に成功した。臨床検体を用いて検討を行ったところ、感度 50 %、特異度 100 %であった。本法で陽性結果が出た場合は、TE と確定診断できることが示された。
3. 本邦における悪性リンパ腫と TE の鑑別方法として ^{201}Tl SPECT が有用である可能性が示唆された。
4. 本邦における TE 診断アルゴリズムを作成した。

謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校 国際感染症感染症学講座 教授 宮平靖博士、衛生学公衆衛生学講座 教授 櫻井裕博士、内科学講座 教授 川名明彦博士に衷心より感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり御指導頂きました防衛医科大学校 内科学講座 前田卓哉博士に深謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、貴重な御助言、御協力を賜りました防衛医科大学校内科学講座教室員諸先生に深く感謝の意を表します。

本研究の主旨は、日本エイズ学会総会（第 27 回、2013 年 11 月、熊本）（第 25 回、2011 年 11 月、東京）、日本感染症学会東日本地方会学術集会（第 62 回、2013 年 11 月、東京）（第 60 回、2011 年 10 月、山形）、日本臨床寄生虫学会（第 22 回、2011 年 4 月、東京）において発表した。

引用文献

- 1) Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8: 634-40.
- 2) Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004; 363: 1965-76.
- 3) Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol*. 2008; 55: 467-75.
- 4) Jones JL, Roberts JM. Toxoplasmosis hospitalizations in the United States, 2008, and trends, 1993-2008. *Clin Infect Dis*. 2012; 54: e58-61.
- 5) Castro KG, Ward JW, Slutsker L, Buehler JW, Jaffe HW, Berkelman RL, *et al*. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep*. 1992; 41: 1-19.
- 6) Derouin F, Thulliez P, Garin YJ. [Value and limitations of toxoplasmosis serology in HIV patients]. *Pathol Biol (Paris)*. 1991; 39: 255-9.
- 7) Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA*. 1984; 252: 913-7.
- 8) Sakikawa M, Noda S, Hanaoka M, Nakayama H, Hojo S, Kakinoki S, *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: 365-7.
- 9) Renold C, Sugar A, Chave JP, Perrin L, Delavelle J, Pizzolato G, *et al*. *Toxoplasma* encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 1992; 71: 224-39.
- 10) Raffi F, Aboulker JP, Michelet C, Reliquet V, Pelloux H, Huart A, *et al*. A prospective study of criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. The BIOTOXO Study Group. *AIDS*. 1997; 11: 177-84.
- 11) Naito T, Inui A, Kudo N, Matsumoto N, Fukuda H, Isonuma H, *et al*.

Seroprevalence of IgG anti-toxoplasma antibodies in asymptomatic patients infected with human immunodeficiency virus in Japan.

Intern Med. 2007; 46: 1149-50.

- 12) Yamaoka M, Konishi E. Prevalence of antibody to *Toxoplasma gondii* among inhabitants under different geographical and climatic conditions in Hyogo Prefecture, Japan. *Jpn J Med Sci Biol.* 1993; 46: 121-9.
- 13) Martino R, Bretagne S, Rovira M, Ullmann AJ, Maertens J, Held T, *et al.* Toxoplasmosis after hematopoietic stem transplantation. Report of a 5-year survey from the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25: 1111-4.
- 14) Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96 Suppl 1: S205-15.
- 15) Lorberboym M, Estok L, Machac J, Germano I, Sacher M, Feldman R, *et al.* Rapid differential diagnosis of cerebral toxoplasmosis and primary central nervous system lymphoma by thallium-201 SPECT. *J Nucl Med.* 1996; 37: 1150-4.
- 16) Ruiz A, Ganz WI, Post MJ, Camp A, Landy H, Mallin W, *et al.* Use of thallium-201 brain SPECT to differentiate cerebral lymphoma from toxoplasma encephalitis in AIDS patients. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1994; 15: 1885-94.
- 17) Sibley LD, Niesman IR, Asai T, Takeuchi T. *Toxoplasma gondii*: secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. *Exp Parasitol.* 1994; 79: 301-11.
- 18) Schoondermark-van de Ven E, Galama J, Kraaijeveld C, van Druten J, Meuwissen J, Melchers W. Value of the polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from patients with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1993; 16: 661-6.
- 19) Mikita K, Maeda T, Ono T, Miyahira Y, Asai T, Kawana A. The utility of cerebrospinal fluid for the molecular diagnosis of toxoplasmic encephalitis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 75: 155-9.

- 20) Dina TS. Primary central nervous system lymphoma versus toxoplasmosis in AIDS. *Radiology*. 1991; 179: 823-8.
- 21) Ernst TM, Chang L, Witt MD, Aronow HA, Cornford ME, Walot I, *et al*. Cerebral toxoplasmosis and lymphoma in AIDS: perfusion MR imaging experience in 13 patients. *Radiology*. 1998; 208: 663-9.
- 22) Martino R, Maertens J, Bretagne S, Rovira M, Deconinck E, Ullmann AJ, *et al*. Toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2000; 31: 1188-95.
- 23) Israelski DM, Chmiel JS, Poggensee L, Phair JP, Remington JS. Prevalence of Toxoplasma infection in a cohort of homosexual men at risk of AIDS and toxoplasmic encephalitis. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1993; 6: 414-8.
- 24) Sykora J, Zastera M, Stankova M. Toxoplasmic antibodies in sera of HIV-infected persons. *Folia Parasitol (Praha)*. 1992; 39: 177-80.
- 25) Chowdhury MN. Toxoplasmosis: a review. *J Med*. 1986; 17: 373-96.
- 26) Sterkers Y, Varlet-Marie E, Cassaing S, Brenier-Pinchart MP, Brun S, Dalle F, *et al*. Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of Toxoplasma gondii from simulated specimens. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 3216-22.
- 27) Alfonso Y, Fraga J, Cox R, Bandera F, Pomier O, Fonseca C, *et al*. Comparison of four DNA extraction methods from cerebrospinal fluid for the detection of Toxoplasma gondii by polymerase chain reaction in AIDS patients. *Med Sci Monit*. 2008; 14: MT1-6.
- 28) Lolli V, Tampieri D, Melancon D, Delpilar Cortes M. Imaging in primary central nervous system lymphoma. *Neuroradiol J*. 2010; 23: 680-9.
- 29) Chiang FL, Miller BL, Chang L, McBride D, Cornford M, Mehringer CM. Fulminant cerebral lymphoma in AIDS. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1996; 17: 157-60.
- 30) Black KL, Hawkins RA, Kim KT, Becker DP, Lerner C, Marciano D. Use of thallium-201 SPECT to quantitate malignancy grade of gliomas. *J Neurosurg*. 1989; 71: 342-6.

- 31) Kosuda S, Aoki S, Suzuki K, Nakamura H, Nakamura O, Shidara N. Primary malignant lymphoma of the central nervous system by Ga-67 and Tl-201 brain SPECT. *Clin Nucl Med*. 1992; 17: 961-4.
- 32) D'Amico A, Messa C, Castagna A, Zito F, Galli L, Pepe G, *et al*. Diagnostic accuracy and predictive value of 201Tl SPET for the differential diagnosis of cerebral lesions in AIDS patients. *Nucl Med Commun*. 1997; 18: 741-50.
- 33) Skiest DJ, Erdman W, Chang WE, Oz OK, Ware A, Fleckenstein J. SPECT thallium-201 combined with Toxoplasma serology for the presumptive diagnosis of focal central nervous system mass lesions in patients with AIDS. *J Infect*. 2000; 40: 274-81.

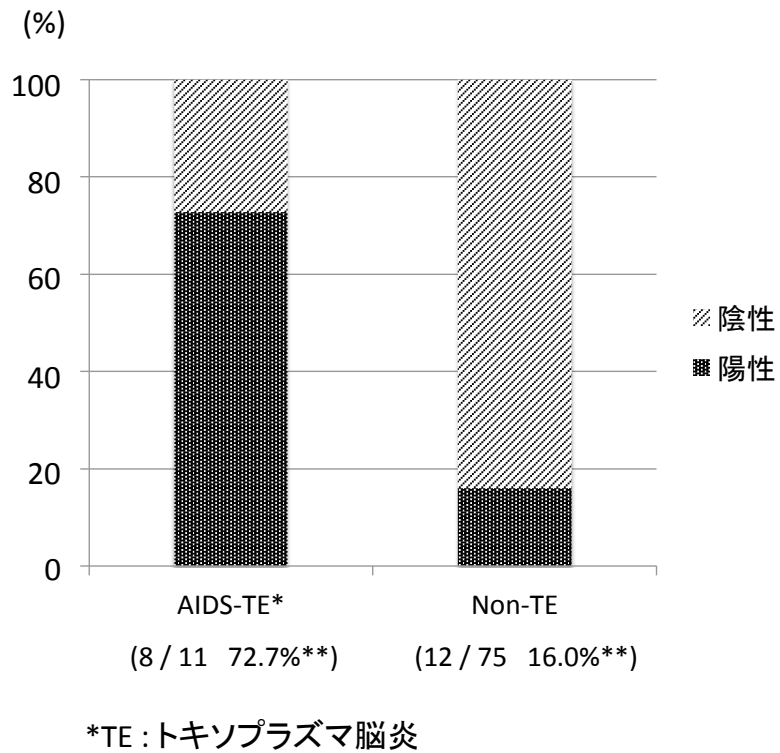
図 表

	AIDS-TE* (n=11)	Non-TE (n=75)
男性 : 女性	10 : 1	70 : 5
年齢	41** (33-48)	41** (22-79)
CD4陽性細胞数 (/μL)	25** (3-115)	116** (2-729)
HIV-RNA (copies/mL)	130,000** (56,000-870,000)	68,000** (20-1,000,000)

* TE : トキソプラズマ脳炎

** 中央値

【表 1】 AIDS-TE と Non-TE の患者背景

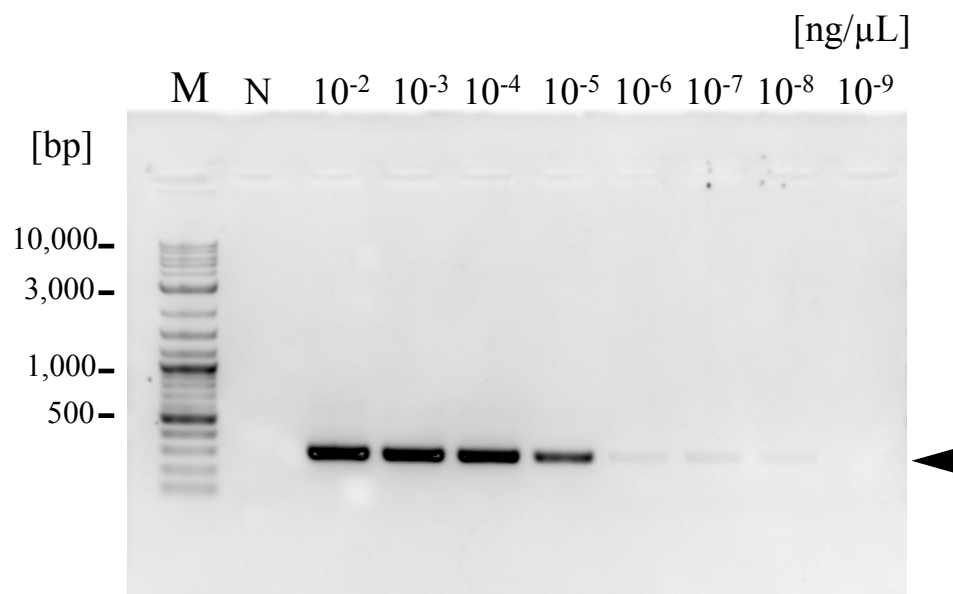


【図 1】 AIDS-TE と Non-TE での *TgAb* 陽性分布図

AIDS-TE 群では、*TgAb* 陽性率が 72.7 % (8 / 11 例)、Non-TE 群で 16.0 % (12 / 75 例)で、両群間に統計学的な有意差を認めた (** $p < 0.01$ 、F 検定)。

Target	PCR Primers	Nucleotide position	Cycle condition
L37415	1st PCR 5'-CCA TGC ATG TCT AAG TAT AAG G -3'	48-70	60s at 94°C
	5'-GTT ACC CGT CAC TGC CAC -3'	359-342	60s at 42°C
			60s at 72°C
	2nd PCR 5'-CTA AGT ATA AGC TTT TAT ACG GC -3'	58-80	40cycles (each)
	5'-TGC CAC GGT AGT CCA ATA C -3'	348-330	

【表 2】18S rDNA を標的とした nested-PCR 法のプライマーセットと反応条件



【図 2】

18S rDNA を標的にした nested-PCR 産物の電気泳動像。

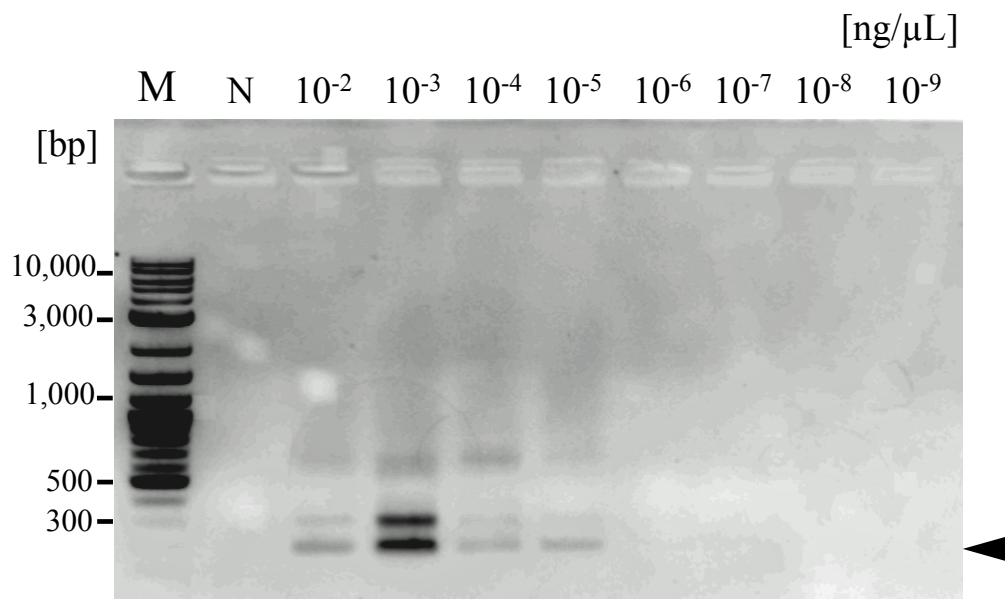
矢頭が標的範囲のサイズに相当する。

T. gondii DNA standard の 10 倍希釈系列を、 1×10^{-2} から 1×10^{-9} ng / μ L の間で作製した。 1×10^{-8} ng / μ L まで、相当するサイズに合致して band を指摘可能である。

M: size marker

N: negative control

bp: base pairs



【図 3】

B1 遺伝子を標的にした nested-PCR 産物の電気泳動像。

矢頭が標的範囲のサイズに相当する。

T. gondii DNA standard の 10 倍希釈系列を、 1×10^{-2} から 1×10^{-9} ng / μ L の間で作製した。 1×10^{-5} ng / μ L まで、相当するサイズに合致して band を指摘可能である。

M: size marker

N: negative control

bp: base pairs

診断	症例数
トキソプラズマ脳炎(TE)*	16
TE以外コントロール群	12
AIDS合併脳悪性リンパ腫	4
AIDS合併	3
AIDS合併	1
無菌性髄膜炎	2
不明熱	1
ノカルジア脳炎	1

* トキソプラズマ症治療で画像所見・神経症状の改善を呈するか、
剖検でトキソプラズマ原虫が確認されたもの。

【表 3】 検討対象症例の内訳

		臨床診断	
		トキソプラズマ脳炎(TE)	TE以外のコントロール群
Nested-PCR (18S rDNA)	陽性	8 / 16 (50%)	0 / 12 (0%)
	陰性	8 / 16 (50%)	12 / 12 (100%)

【表 4】 トキソプラズマ脳炎症例とトキソプラズマ脳炎以外のコントロールの群の髄液を用いた、*T.gondii* 18S rDNA を標的にした nested-PCR 法の感度・特異度

単発病変	2 / 11 例 (18.2%)
多発病変	9 / 11 例 (81.8%)
病変分布 (個)	
大脳白質	21 / 37 (56.8%)
辺縁部	6 / 37 (16.2%)
基底核	5 / 37 (13.5%)
後方窩	3 / 37 (8.1%)
視床	1 / 37 (2.7%)
脳幹	1 / 37 (2.7%)

【表 5】 Gd-DTPA 脳造影 MRI によるトキソプラズマ脳炎病変数とその分布

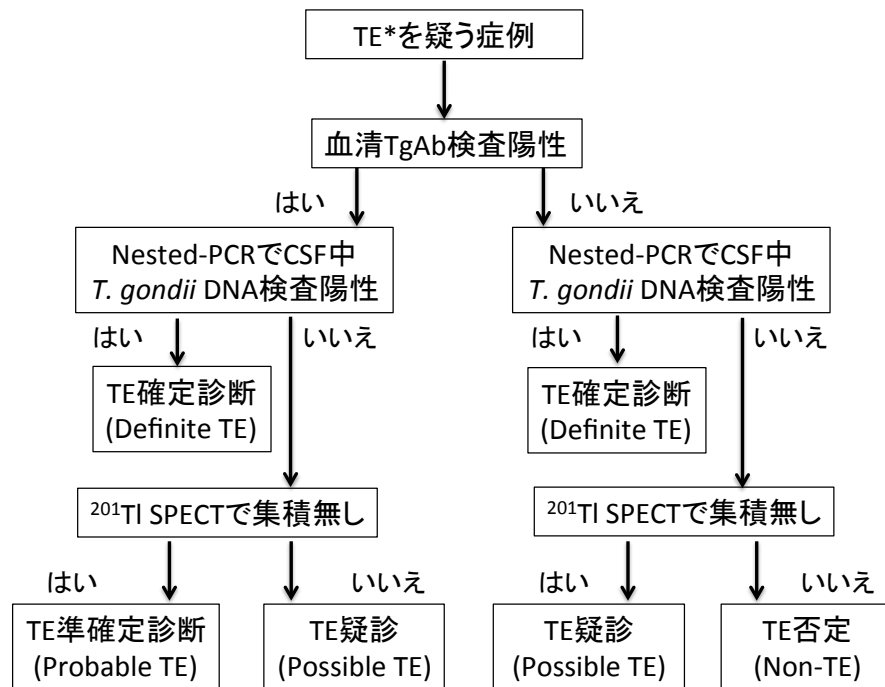
病変サイズ	個数	造影所見		
		リング状	均一	造影(-)
< 10mm	15	6 / 15 (40.0%)	7 / 15 (46.7%)	2 / 15 (13.3%)
≥ 10mm	22	17 / 22 (77.3%)	2 / 22 (9.1%)	3 / 22 (13.6%)

【表 6】 Gd-DTPA 造影脳 MRI によるトキソプラズマ脳炎病変サイズと
造影所見

²⁰¹ Tl-SPECT	疾患名	症例数
集積なし	単独AIDS-TE*	9例
集積あり	AIDS-TE+ 脳悪性リンパ腫	1例
	AIDS-TE+ クリプトコッカス感染	1例

*TE：トキソプラズマ脳炎

【表 7】 ²⁰¹Tl-SPECT の集積の有無と、疾患名



*TE：トキソプラズマ脳炎

【図 4】 トキソプラズマ脳炎診断のアルゴリズム