

論 文 要 旨

Diagnostic usefulness of a nested PCR assay
for detecting *Sarcoptes scabiei* DNA in skin scrapings from
clinically suspected scabies.

〔疥癬疑診患者の皮膚落屑からヒゼンダニDNAを
検出するのに有用なネステッドPCR法の確立〕

福山茂雄

【序論および目的】

疥癬はヒゼンダニによっておこる皮膚疾患であり、最近老健施設での多量発生が問題になっている。その確定診断には鏡検やデルモスコピーにて、患者皮疹部位からダニ虫体、卵や疥癬トンネルの存在を確認する必要がある。しかし、臨床症状からは疥癬が疑われるが、ダニを確認できない症例も数多く存在している。これらの症例においては治療薬の投与を逡巡することが多く、投薬の遅れが結果的に感染の拡大を招く。これまで疥癬の皮疹においてヒゼンダニDNAをPCR法にて増幅した報告はあるが、これらは多数の疥癬疑診例の皮膚落屑をもちいた検討ではなく、疥癬の皮疹落屑をもちいたヒゼンダニの遺伝子診断が疥癬診断に有用性であるかについては未だ一定の見解は得られていない。

本研究では、ヒゼンダニ特有の遺伝子配列からえられた2種のプライマーを用いたnested PCR法にて、疥癬の皮疹落屑におけるヒゼンダニ遺伝子診断の有用性について検討した。

【材料および方法】

本研究では、ダニの確認できた疥癬の皮膚落屑(22症例、落屑数33)、ダニを確認できた症例におけるダニを確認できない皮膚落屑(16症例、落屑数51)、ダニは確認できないが临床上疥癬が疑われた症例の皮膚落屑(40症例、落屑数96)、他疾患の皮膚落屑(25症例、落屑数25)、健常人の皮膚落屑(30例、落屑数30)のDNAを用いて、ヒゼンダニミオシン重鎖遺伝子(SMH)、ヒゼンダニリボゾーム遺伝子(ITS-2)に特有なプライマーによるnested PCRをおこない、2%アガロースをもちいた電気泳動にてヒゼンダニ遺伝子を検出した。なお、ヒゼンダニミオシン重鎖遺伝子は、疥癬患者血清をヒゼンダニ遺伝子発現ライブラリーに反応させ、陽性を示したコロニーからえられた。また、SMHとITS-2プライマーをもちいたnested PCR法にて異なった結果が得られた場合は、増幅されたDNAの配列を解析して、それらがヒゼンダニDNAであることを確認した。

【結 果】

- 1) これらのプライマーによる nested PCR では、家ダニ（ヤケヒョウヒダニ、コナヒョウヒダニ）DNA は増幅されなかった。
- 2) これらのプライマーによる nested PCR では、顕微鏡でダニを確認できた皮疹落屑の陽性率は100%であった。
- 3) これらのプライマーによる nested PCR では、他の皮膚疾患の皮疹落屑や健常人の皮膚落屑はすべて陰性であった。
- 4) ダニを確認できた症例におけるダニを確認できない皮疹落屑をもちいた検討では、SMHとITS-2プライマーによる陽性率はそれぞれ43%と57%であった。
- 5) 疥癬疑診例の皮疹落屑をもちいた検討では、SMHとITS-2プライマーによる陽性率はそれぞれ38%と58%であった。

【結論及び考察】

上記の結果から、本診断法の sensitivity, specificity はそれぞれ100%であり、この遺伝子診断法は、疥癬の診断に有用であることが示された。実際、鏡検にてヒゼンダニがみつからない疥癬疑診例においても、本診断法にて多くの陽性例がみつき、本診断法がこれまでの診断法に比べ、感度において優れていることが証明された。

本研究における成果は疥癬の新たな診断法を提供するものであり、この診断法にて疥癬の診断率の向上が期待できる。さらに、この診断法は疥癬の治療の決定や治癒の判定にも有用と考えられる。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 108 号		学位申請者	福山茂雄
審査委員	主査	秋葉澄伯	学位	博士 (医学)
	副査	竹内 亨	副査	野田伸一
	副査	吾郷一利	副査	河井一浩

Diagnostic usefulness of a nested PCR assay for detecting *Sarcoptes scabiei* DNA in skin scrapings from clinically suspected scabies.

〔疥癬疑診患者の皮膚落屑からヒゼンダニ DNA を検出するのに有用な
ネステッド PCR 法の確立〕

疥癬はヒゼンダニによっておこる皮膚疾患であり、その確定診断には鏡検やダーモスコーピーにより、患者皮疹部位からダニ虫体、卵、糞や疥癬トンネルの存在を確認する必要がある。これまで疥癬患者の皮疹からヒゼンダニ DNA を PCR 法により増幅した報告はあるが、それらの報告では検討症例数も少なく、またヒゼンダニが観察されないいわゆる疥癬疑診例の皮膚落屑を用いた検討ではないため、ヒゼンダニの遺伝子診断が疥癬診断に有用性であるかについては未だ一定の見解は得られていない。本研究において、著者らはヒゼンダニの確認できた疥癬の皮疹落屑 (22 症例、落屑数 33)、ダニを確認できた症例におけるダニを確認できない皮疹落屑 (16 症例、落屑数 51)、ダニは確認できないが臨床疥癬が疑われた症例の皮疹落屑 (40 症例、落屑数 96)、他疾患の皮疹落屑 (25 症例、落屑数 25)、健常人の皮膚落屑 (30 例、落屑数 30) の DNA を用いて、ヒゼンダニミオシン重鎖遺伝子 (SMH)、ヒゼンダニリボソーム遺伝子 (ITS-2) に特有なプライマーによる nested PCR を行い、2%アガロースを用いた電気泳動にてヒゼンダニ遺伝子を検出した。

得られた結果は以下の通りであった。

- 1) これらのプライマーによる nested PCR では、イエダニ (ヤケヒョウヒダニ、コナヒョウヒダニ) DNA は増幅されず、顕微鏡でダニを確認できた皮疹落屑の陽性率は 100%であった。
- 2) これらのプライマーによる nested PCR では、他の皮膚疾患の皮疹落屑や健常人の皮膚落屑はすべて陰性であった。
- 3) ダニを確認できた症例において、ダニを確認できない皮疹落屑を用いた検討では、SMH と ITS-2 プライマーによる陽性率はそれぞれ 43%と 57%であった。
- 4) 疥癬疑診例の皮疹落屑を用いた検討では、SMH と ITS-2 プライマーによる陽性率はそれぞれ 38%と 58%であった。

上記の結果から、この遺伝子診断法は、疥癬皮疹の診断に有用であることが示された。実際、鏡検にてヒゼンダニが観察されなかった疥癬疑診例においても、本診断法により多くの陽性例が検出され、本診断法がこれまでの診断法に比べ、感度において優れていることが証明された。

本研究における成果は疥癬の新たな診断法を提供するものであり、この診断法により疥癬の診断率の向上が期待できる。さらに、この診断法は疥癬の治療の決定や治癒の判定にも有用と考えられる。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 108 号	学位申請者	福山茂雄
審査委員	主査	秋葉澄伯	学位 博士 (医学)
	副査	竹内 亨	副査 野田伸一
	副査	吾郷一利	副査 河井一浩

主査および副査の5名は、平成22年7月21日、学位申請者 福山茂雄 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) ヒゼンダニが死んでいる場合、そのDNAが分解される可能性があるので、PCR産物の大きさを100bpぐらいにすると感度があがるのではないか。

(回答) 患者が受診した時、感染からどのくらい経過しているかわからないが、PCR産物を小さくすることは検討に値する。

質問2) 疑診例の判定はどのような基準でやっているのか。判定があいまいになるのではないか。

(回答) 皮疹ではダニの虫体、卵、糞は見つからないが、疥癬によくみられる皮疹や搔痒感があり、周囲に疥癬患者がいる場合を疑診患者としたが、判定がそんなにあいまいになるとはおもわれぬ。

質問3) 疑診例の内、どのくらいが実際に感染していたと考えているか。

(回答) 多くは感染していたと考えている。

質問4) そうであれば、nested PCR法による感度が低いのではないか。

(回答) 皮疹内のヒゼンダニ数は多くて数個体であり、採取した落屑にヒゼンダニやその成分が含まれない可能性がある。また、皮疹の中にはヒゼンダニそのものではおこらないid反応によるものもあるので、例えPCRの感度をあげても疑診例での陽性率は100%にはならないのではないかと考える。

質問5) 落屑にはダニのどの部分が含まれているのか

(回答) 生きているダニ、死んでいるダニ、ダニの分解産物、卵、糞。

質問6) 疥癬皮疹と断定する場合、虫体以外に卵、糞も観察したか。

(回答) 卵、糞も観察しているが、これらの同定には迷う場合が多々ある。

最終試験の結果の要旨

質問 7) この方法で陰性の場合、疥癬は否定できるのか。

(回答) 先ほどお答えしたように、皮疹全てがヒゼンダニによるものではないので、この方法で陰性の結果が得られても疥癬は否定できない。

質問 8) SMH と ITS-2 の 2 種のプライマーを用いた検討で感度に違いがあるのはいかなる理由か。

(回答) プライマーとダニ DNA の Tm 値や PCR 産物の大きさによる差と考える。

質問 9) 患者レベルにおいては、この方法は sensitivity、specificity が 100% といえないのではないか。

(回答) 指摘どおりで、落屑にダニが認められた場合には sensitivity、specificity が 100% という意味である。

質問 10) ヒゼンダニがいなくなっても id 反応などで症状が続くことがあるため、治癒判定は重要だが、治癒判定のためには個体レベルで感度をあげる方法が必要ではないか。

(回答) ヒゼンダニが観察された 7 症例にイベルメクチンを投与し、痒み等の症状のなくなった皮疹を検討したところ、全例陰性であった。その後の再発もみられなかったため、この方法はダニがいなくなったという意味での治癒判定には十分有用であると考えている。

質問 11) 特効薬であるイベルメクチンの作用機序は、また耐性のメカニズムは。

(回答) クロライドイオンチャンネルに作用すると考えられている。耐性のメカニズムの一つとして、イベルメクチンが作用するイオンチャンネル遺伝子に変異のある例が報告されている。

質問 12) ダニは脱皮するか。もし、脱皮するとしたら、この方法は脱皮部分も検出する可能性があるか。

(回答) 脱皮するので、その可能性は十分ある。

質問 13) 皮疹や痒みのメカニズムは。

(回答) 糞にシステインプロテアーゼが含まれており、患者にその IgE 抗体が見つかったので I 型アレルギーによる症状と考えられる。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。