

ウイルス多項目同時迅速診断の実践

要求事項と解決法

多項目: マルチプレックスPCR法による多項目同時測定

迅速性: リアルタイムPCRを用いたウイルス検査・One-step RT-PCR

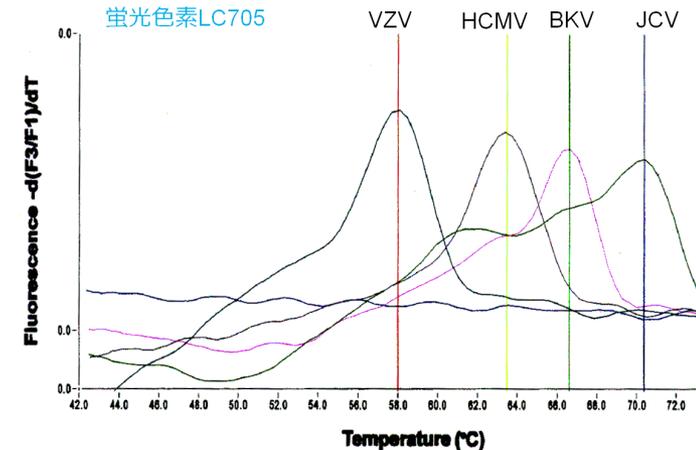
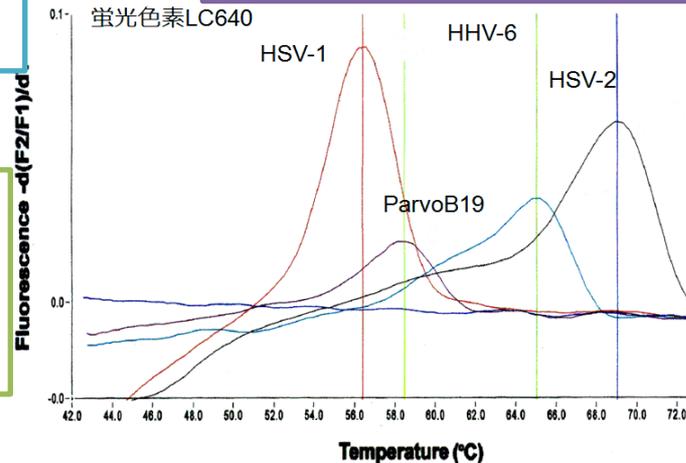
正確性: Hybri-probe と Melting Curve法を用いたウイルスの検出・同定

信頼性: できるだけ多くのサブタイプの測定が可能な共通プライマーの設定

EBV, HSV-1, HSV-2, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7,
JCV, BKV, ADV, ParvoB19, HBV, HHV-8 (13種類)

多項目同時迅速解析

リアルタイムPCRによる
Multiplex PCRと
Melting Analysisによる
定性的検査



2.5時間で13種類のウイルスを一度に解析 → 早期発見・早期治療 → 医療成績向上

ウイルス迅速診断の流れ

ウイルス定性解析 → 陽性のもの → 定量解析 (確定診断)

検出されたウイルスの量と性状に基づき、治療方針決定に関する支援

病院

ウイルス迅速診断依頼
(10:00までの提出)

確定診断
(夜には治療方針確定)

ウイルス迅速診断結果報告
(夕方までに結果報告)

高度感染症診断部

検体：末梢血・組織

→末梢血は**全血・血球・血漿(血清)**それぞれで測定

検査項目：日和見感染セット, 免疫応答チェック(FCM解析)

HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, HHV6, HHV7, BK virus, JC virus, HBV
Parvo virus B19, EBV, HHV-8, AdV (13ウイルス) **ウイルス項目**

➡ ウイルス**定性解析** - **陽性のもの** -> **定量解析(確定診断)**

2段階診断(誤診防止)

対応ウイルスを随時増やす

新規診断法、新規治療法の開発および先進医療申請

臓器移植センター
小児がんセンター
免疫科
高度先進医療研究室
高度感染症診断部
が中心に作成

病態とウイルス量の
データの集積

ウイルスごとの
診断基準作成
(発症・病態予測
と治療介入決定)

ウイルスごとの
診断ガイドライン
の作成および
情報発信

難治性EBV関連増殖性疾患診断

はじめの一步

1. EBVゲノム量定量解析
(血球成分中、血漿成分中) 単位: copy/ μ gDNA
2. 感染細胞の増殖程度 FCM解析での追跡
3. クロナリティー解析 Southern blotting (EBV-TR)
4. 感染細胞同定解析 CD4, CD8, $\gamma\delta$ -T, NK
5. 感染細胞株の樹立

重要事項

1. と 2. の項目を定期的にモニタリングすることによって感染細胞の把握を十分行う！

1と2のモニタリングは定期的におこない、病態変化時には直ぐに解析

血球・血漿別々に解析する！

1週間～3ヶ月に1回 (病態による)

感染細胞と免疫細胞の活性化や増殖を解析する！

1週間～3ヶ月に1回 (病態による)

病態の進行度を解析する！

年1回

どの細胞に感染しているかを解析する！
⇒治療方針決定に必須

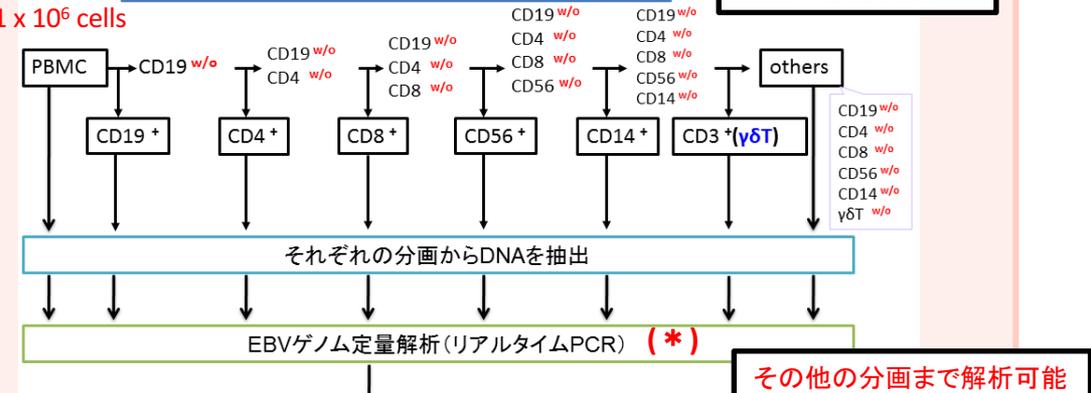
年1回

治療後の再感染診断で使用！

1回

EBV感染細胞同定解析法(直列法)

PBMCは少なくてもすむ



感染細胞同定

感染細胞は B細胞とCD8陽性T細胞

(例)

PBMC(All)	: 2.1 x 10 ⁴ copies/μgDNA
CD19*(B cells)	: 1.6 x 10 ³ copies/μgDNA
CD4*(T cells)	: 検出感度以下
CD8*(T cells)	: 7.5 x 10 ⁶ copies/μgDNA
CD56*(NK cells)	: 検出感度以下
CD14*(Mono)	: 検出感度以下
CD3*(γδ-T cells)	: 検出感度以下
Others	: 検出感度以下

その他の分画まで解析可能

総合的に感染細胞分画を確定診断する

感染細胞がない分画は検出感度以下になることが多い

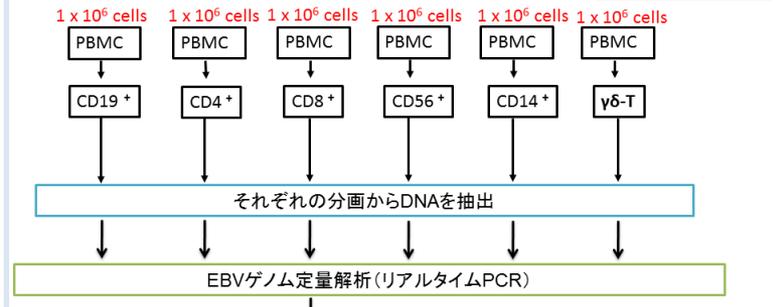
成育の方法

- ・感染細胞同定解析は初診時 長期経過観察症例では年1回
- ・EBV定量解析によるモニタリング
 - ①血球・血漿別々にEBV定量解析
 - ②FCM解析によるチェック
 1~3ヶ月に1回

従来の方法

EBV感染細胞同定解析法(並列法)

PBMCが多く必要!



感染細胞同定

感染細胞のメインは CD8陽性T細胞だが他の分画にもいる可能性あり

(例)

PBMC(All)	: 2.1 x 10 ⁴ copies/μgDNA
CD19*(B cells)	: 1.6 x 10 ³ copies/μgDNA
CD4*(T cells)	: 4.2 x 10 ² copies/μgDNA
CD8*(T cells)	: 7.5 x 10 ⁶ copies/μgDNA
CD56*(NK cells)	: 5.3 x 10 ⁴ copies/μgDNA
CD14*(Mono)	: 2.4 x 10 ³ copies/μgDNA
CD3*(γδ-T cells)	: 7.1 x 10 ³ copies/μgDNA

(*) 応用例

EBVでなく他のウイルスや目的分子の遺伝子を設定すればどの細胞に感染、発現しているか分かる

