

研究計画書

核酸増幅法を用いたトキソプラズマ症遺伝子診断に関する検討

第 1.0 版(2019 年 7 月 9 日)

第 1.1 版(2019 年 7 月 22 日)

第 2.0 版(2019 年 8 月 27 日)

1. 背景

トキソプラズマ症は、原虫である *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) による感染症である。本原虫の経口感染により感染が成立する。健常人の場合は、ほとんどが無症候性に感染し、生涯にわたり慢性感染（保虫者）に移行する。全世界に広い分布を示しているが、本邦における抗体陽性率は5—20%とされ、フランス、ブラジルなどでは70%以上と高いことが報告されており、全人類の1/3が感染していると推定されている。

本症が問題になるのは、妊娠早期に妊婦が初感染した場合の死産・流産、胎児の水頭症、精神遅滞、脳性麻痺などをきたす先天性トキソプラズマ症と宿主の特に細胞性免疫が低下した場合に起きる後天性トキソプラズマ症である。特に後者は後天性免疫不全症候群、造血幹細胞移植、固形臓器移植に伴う細胞性免疫不全、免疫抑制剤や抗がん剤投与が必要な種々の疾患と関連して発症し、しばしば致命的な経過を辿る。

トキソプラズマ症診断においては病変部からの検体の病理診断が必要となるが、全身状態が不良な中では中枢神経や肺などから検体採取が出来ないこともしばしばある。そこで比較的容易に採取が可能な血液や脳脊髄液などの臨床検体中の *T. gondii* 遺伝子を核酸増幅検査法 (polymerase chain reaction、PCR) により検出することが欧米では広く行われている。しかしながら、わが国では *T. gondii* 遺伝子検出は保険収載されていないだけでなく、ごく少数の研究室でのみ実施可能な状況にあり、適切な診断が行えてない。

特に造血幹細胞移植においては、強力な免疫抑制状態となるため、常に本症の発症を考慮しなければならない。欧米の報告によると造血幹細胞移植後のトキソプラズマ症発生率は1%程度とされていたが、これは適切に診断されていない可能性を考慮すると過少評価されていたと考えられる。実際、2005年に欧州造血細胞移植学会からの前向き研究の結果が報告され、トキソプラズマ抗体陽性患者（保虫者）を対象に定期的に末梢血のPCRを行うことで16%の陽性率であったことが示されている(1)。一方、本邦からの二つ報告では造血幹細胞移植後のトキソプラズマ症発生率は0.22%、1.8%と低値となっている(2,3)。これらの発症頻度は対象群の慢性感染率（抗体陽性率）に大きく左右されること、またわが国ではPCR検査が実施できず、適切に診断できる体制がない中での確定診断のみの結果であり、実際はこれらの数値よりもはるかに高い可能性がある。また典型的な中枢神経病変ではなく、間質性肺炎や肝障害といった発症様式では診断できず、死亡に至っている症例が相当数存在する可能性もある。つまり造血幹細胞移植という造血器疾患に対する根治療法を行った患者がトキソプラズマ症で生命を脅かされる状況が分かっている中で、適切な対応がとれていない現状がある。そのため、日本造血細胞移植学会のガイドラインでは

「PCRによるトキソプラズマ DNA 検出はトキソプラズマ診断において最も有用かつ現実的な方法と考えられる」「本邦においては未承認検査であり、その普及が待たれる」と記載されている(4)。

我々はトキソプラズマ症診断のための PCR の測定系を樹立して、トキソプラズマ脳症の患者の脳脊髄液を用いた検討で感度 50%、特異度 100%という結果を報告した(5)。この結果は海外からの後天性免疫不全症患者の結果と同等であった(感度 44%) (6)。そこで本研究ではトキソプラズマ症が疑われる患者やその発症リスクの高い患者を対象として、患者の医療機関では PCR 検査が実施できない場合に PCR 法による *T. gondii* 遺伝子検出検査を実施して、その結果を医療機関に参照情報として提供することを第一の目的とする。

2. 目的

本研究の第一の目的はトキソプラズマ症の疑いの患者あるいはトキソプラズマ症発症高リスク患者の臨床検体から核酸増幅 (PCR) 法により *T. gondii* 遺伝子検出を試み、その結果を診療への参照情報として提供することとする。

また上記検査に用いた後の残余検体があれば、それを用いて、我々が新たに開発した定量 PCR や高感度な定量 PCR の検証を行い、将来、汎用可能となる測定系(体外診断薬)の確立を目指すことを第二の目的とする。

3. 対象

3.1 適格基準 (以下のいずれかに該当する)

- 1) 我が国の医療機関においてトキソプラズマ症の発症が疑われる症例
- 2) トキソプラズマ症の発症リスクが高いと考えられる症例

3.2 除外基準

- 1) 患者あるいは保護者・それに準ずる者からの同意が取得できない症例
- 2) 検査のための適切な検体が得られない症例

4. 方法

本研究は慶應義塾大学病院の患者とそれ以外の施設の患者で異なる対応をする。慶應義塾大学病院の患者は慶應義塾大学医学部倫理委員会で承認され、実施されるが、日本の可能性のある全ての施設において発症率の低いトキソプラズマ症のために倫理委員会の承認を事前にとることは現実的ではない。そこで

他施設からの検体の受入・検査に関しては、「他の研究機関への既存試料・情報の提供に関する届出書」を用いて各施設内にて承認を得て、実施される。

4.1 PCR

通常診療の中で得られた末梢血、脳脊髄液（髄液）、気管支肺胞洗浄液、組織生検検体などから DNA を抽出して、PCR により *T. gondii* 遺伝子を検出する。その手法は既報に基づき、行われる(4)。なお既に採取・保存されている検体で、PCR に利用可能なものがあれば、検査を実施する。

なお本研究で用いる PCR は診療に用いる検査としての精度管理は「医療法等の一部を改正する法律（平成 29 年法律第 57 号）」に準じた対応はできていないため、あくまでも診療の「参照情報」「参照値」として結果を報告する。

4.2 検体の送付・受領および結果の連絡

4.2.1 検体の送付・受領

送付元にて検体は患者主治医およびその施設・診療科の責任で匿名化し、凍結保存された検体は冷凍にて、採取後間もない場合は冷蔵あるいは室温にて送付する。検体受領後、すみやかに保存あるいは処理を行い、可及的速やかに検査を行う。結果の連絡は e-mail あるいは Fax にて行う。

4.2.2 「他の研究機関への既存試料・情報の提供に関する届出書」の提出

本研究では個々の患者の生命を脅かしているトキソプラズマ症の診断に必要な検査を実施することが目的となる。そのため、通常の診療で得られた検体の一部や保存検体を「既存試料」として扱い、各医療機関では「他の研究機関への既存試料・情報の提供に関する届出書」を施設長あるいはそれに準ずる者へ提出することで、検体の提供を可能とする。そして、その写しを慶應義塾大学医学部血液内科に送付する。*T. gondii* 遺伝子検出検査のためだけに、採血を含めた侵襲を伴う検体採取処置は行わず、検体採取量が増えることがないようにする。

なお慶應義塾大学病院の患者の場合には研究施設内であり、「他の研究機関への既存試料・情報の提供に関する届出書」は不要となる。

4.2.3 症例・検体情報提供書

送付元である医療機関は症例・検体情報提供書を検体送付時に同封する。なお情報提供書は個人情報を含まず、以下の情報となる。

- ・ 検体種および採取日
- ・ 年齢
- ・ 性別
- ・ トキソプラズマ抗体検査結果
- ・ 基礎疾患および治療や免疫抑制の状況など
- ・ トキソプラズマ症が疑われる臨床情報（関連臓器、検査値等）

4.3. 新規の核酸増幅法の検証

4.1 実施後の残余検体があれば、従来の定性 PCR をさらに発展させた定量 PCR (real-time PCR) や高感度定量 PCR (digital PCR) の感度・特異度などの検証を行う。また将来的に汎用可能となる体外診断薬の開発も検討する。

5. 倫理的配慮および個人情報保護

5.1 倫理的配慮

トキソプラズマ症の診療においては迅速な結果を得る必要があり、慶應義塾大学病院以外の施設では、倫理委員会の承認は必須とはしない。通常の診療で得られる検体の一部を「既存試料」、診療情報を「既存情報」として扱い、「他の研究機関への既存試料・情報の提供に関する届出書」を施設長に届けることで、提供を可能とする。*T. gondii* 遺伝子検出検査のためだけに、採血を含めた侵襲を伴う検体採取処置は行わないこととする。

ただし、規定の説明文書に沿って、患者主治医から十分な説明の上、文書にて同意を取得する。患者が未成年、成人であっても説明の理解および同意が困難な状況では代諾者へ説明文書に沿って、十分な説明の上、文書にて同意を取得する。代諾者は未成年の場合には親権者、未成年後見人とし、成人の場合には配偶者を含めた親族、それに準ずる者とする。

同意書は各医療機関にて医療記録の一部として保管・管理される。

ただし慶應義塾大学病院の患者の場合には同意書は研究責任者、個人情報管理者、事務局により保管・管理される。

5.2 個人情報保護

個人情報は一切、患者が治療を受けている医療機関外へは出ないように、全て匿名化して管理される。取得された同意書は診療記録の一部として保管するなどして、適切に患者医療機関にて管理される。送付元施設内に連結匿名化可能な符合を症例毎に付与し、それを用いて研究実施施設へ情報提供を行う。研究実施施設側は施設名と付与された符合を用いて、以下の情報・試料を保管管理する。

- ・他の研究機関への既存試料・情報の提供に関する届出書の写し
- ・症例・検体情報提供書
- ・ *T. gondii* 遺伝子を遺伝子増幅検査の結果
- ・ 残余検体(検査実施後に残余がある場合)

情報・試料は研究終了後5年あるいは最終の研究結果報告日から3年の、いずれか遅い方まで保管される。その後、情報は裁断、焼却のいずれかで処理し、試料は医療廃棄物として廃棄される。

6. 研究期間

研究期間は慶應義塾大学医学部倫理委員会で承認後～2024年3月31日までとする。

7. 目標症例数

本研究は個々の症例においてトキソプラズマ症の診断の参照情報を提供することを目的とする。そのため目標とする基準はないが、我が国の同種造血幹細胞移植は年間3700件、既報の1つではトキソプラズマ症は1.8%の発症率が示されており、約70名が発症する可能性がある。ただし、この数値は死亡後に診断された剖検例を中心したものであり、これ以上の発症者がいることが想定される。そこで、本研究では後天性免疫不全症などの基礎疾患も含めていることも考慮して、年間150例、研究期間5年間であるため、研究全体で750例を目標症例数とする。

8. 研究体制

8.1 主幹施設

- 1) 慶應義塾大学医学部血液内科

責任者：森 毅彦

連絡先：〒160-8582

東京都新宿区信濃町 35

TEL 03-3353-1211 (内線 62385)

FAX 03-3353-3515

E-mail: tmori@a3.keio.jp

2) 慶應義塾大学医学部感染症学教室

責任者：三木田 馨

連絡先：連絡先：〒160-8582

東京都新宿区信濃町 35

TEL 03-3353-1211 (内線 61164)

FAX 03-3353-5958

E-mail: keimikita@keio.jp

8.2 検査依頼機関

我が国の医療機関を対象としており、トキソプラズマ症の検査が必要と判断される症例が発生した場合にはあらゆる医療機関からの検体の受入を行う。

8.2.1 国内施設への周知・広報

本研究の実施に関しては慶應義塾大学医学部倫理委員会で承認され次第、慶應義塾大学医学部血液内科のホームページ、UMIN への登録、日本造血細胞移植学会の「学会が支援する臨床研究」へ申請することで学会ホームページ掲載、学会ニューズレター掲載などにより、全国レベルでの研究の展開を目的とした周知・広報を行う。

8.3 研究協力機関・部門

株式会社医学生物学研究所 研究開発本部 遺伝子試薬開発ユニット

責任者：岡田 英樹

〒960-1242 福島県福島市松川町美郷 4-1-1

TEL 024-537-2350

FAX 024-537-2386

E-mail: okada.hideki@mbl.co.jp

役割：PCR 法の精度管理、新たな検査法の開発への協力・技術提供、体外新薬開発への協力。

参考文献

1. Martino R, Bretagne S, Einsele H, et al: Early detection of *Toxoplasma* infection by molecular monitoring of *Toxoplasma gondii* in peripheral blood samples after allogeneic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 40 (1) : 67-78, 2005.
2. Sumi M, Norose K, Hikosaka K, et al: Clinical characteristics and computed tomography findings of pulmonary toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 104 (6) : 729-740, 2016.
3. Matsuo Y, Takeishi S, Miyamoto T, et al: Toxoplasmosis encephalitis following severe graft-vs.-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: 17 yr experience in Fukuoka BMT group. *Eur J Hematol* 79(4):317-321, 2009.
4. 日本造血細胞移植学会ガイドライン：造血細胞移植後の感染管理（第4版）IX トキソプラズマ症（p30-37）
(https://www.jshct.com/uploads/files/guideline/01_01_kansenkanri_ver04.pdf)
5. Mikita K, Maeda T, Ono T, et al: The utility of cerebrospinal fluid for the molecular diagnosis of toxoplasmic encephalitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Feb;75(2):155-159.
6. Foudrinier F1, Aubert D, Puygauthier-Toubas D, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in immunodeficient subjects by gene amplification: influence of therapeutics. *Scand J Infect Dis*. 1996;28(4):383-6.