

(中村茂樹) 論文内容の要旨

主 論 文

Melting curve analysis for rapid detection of topoisomerase gene mutations

in *Haemophilus influenzae*

(融解温度曲線分析法によるインフルエンザ菌トポイソメラーゼ遺伝子変異迅速診断法の確立)

中村茂樹、柳原克紀、森永芳智、泉川公一、関 雅文、掛屋 弘、山本善裕、
上平 憲、河野 茂

(Journal of Clinical Microbiology・掲載予定)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(指導教授：河野 茂 教授)

緒 言

インフルエンザ菌の薬剤耐性化は深刻であり、特に β -lactamase negative ampicillin resistant *H. influenzae* (BLNAR)が急速に増加している。また、fluoroquinolone (FQ)の処方頻度の増加に伴い、FQ 耐性インフルエンザ菌感染症の報告も認められるようになった。FQ 耐性は DNA 複製に必要なトポイソメラーゼ酵素(*gyrA*, *parC*)のキノロン耐性決定領域(QRDR)の点変異が原因である。インフルエンザ菌では *gyrA* codon84, 88、*parC* codon84, 88 が点変異を起こしやすいといわれている。点変異の検出法として融解温度曲線分析法が知られており、これは変異株の融解温度(T_m)が低下することを利用する方法である。薬剤耐性化の進行を抑制するには、早期の耐性菌迅速診断が不可欠である。今回我々は融解温度曲線分析法を用いて、FQ 耐性インフルエンザ菌迅速診断法を確立した。

対象と方法

使用菌株は Rd(標準株)、臨床分離株(FQ 感受性菌 9 株、FQ 耐性菌 7 株)を用いた。*gyrA*, *parC* の QRDR を増幅可能なプライマーと *gyrA* の codon84,88、*parC* の codon84,88 の点変異を検出可能なプローブを作成し、各菌株のコロニーから DNA を抽出後、同一のキャピラリーに加え PCR を行った。Light cycler480 を用いて融解温度曲線を作成し、その結果と微量液体希釈法による薬剤感受性試験結果、およびシーケンス結果と比較検討した。

結 果

融解温度曲線で変異株と判定された全ての菌株は野生株より低い T_m 値を有しており野生株と変異株を鑑別可能であった。また、融解温度曲線で変異株と判定された菌株は全てシーケンスの結果、変異を有していた。さらに塩基変異数が多いほど T_m 値が低下しており、融解温度曲線での変異株は薬剤感受性試験でも FQ の感受性が低下していた。DNA 抽出から解析終了まで約 2 時間で終了した。この迅速診断法は、迅速かつ正確に変異株を検出可能であり、その結果はシーケンス結果ならびに薬剤感受性試験を反映するものであった。

考 察

FQ はインフルエンザ菌治療で重要な役割を果たしている薬剤であり、耐性化獲得は深刻な問題である。FQ 耐性菌は段階的に塩基変異を起こし高度耐性を獲得することが知られている。従来の薬剤感受性試験では、ごく少数混在している 1 段階変異を保有する菌株の検出は困難である。不適切な抗菌薬投与が行われれば、2 段階変異を引き起こし高度耐性を獲得する。そのため、本検出系のように遺伝子変異を高い感度、特異度で早期から検出できれば、臨床的に有効な治療が行えるのみでなく、今後の高度耐性獲得の予防につながる。