

山田舞子 論文内容の要旨

主 論 文

Rapid and accurate detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis targeting *gyrB* gene.

gyrB gene をターゲットとした real time PCR 法と melting curve analysis による迅速かつ正確な *Pseudomonas aeruginosa* の検出

元島 (山田) 舞子、柳原 克紀、福島 和子、松田 淳一、菅原 和行、平潟 洋一、山田 恭暉、河野 茂、上平 憲

(Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 58.53-58.2007)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：上平憲教授)

緒 言

Pseudomonas aeruginosa (*P.aeruginosa*) は、院内感染菌の一つとして知られており、免疫力が低下した患者に感染して重篤な症状を引き起こす。もともと抗菌薬に耐性傾向がある上、最近では多剤耐性化したいわゆる multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*:MDRP による院内感染対策が最重要課題となっている。このため、迅速かつ正確な菌の検出法が必要となっているが、*P.aeruginosa* の現行の検出・同定法は、時間がかかり煩雑である上、時に診断特異性に問題がある。

今回われわれは、現在、菌の遺伝子学的解析の中心となっている 16SrRNA gene と比較し、進化速度が速く菌種の差別化をより明確にするとされている *gyrB* gene に着目し、本遺伝子を標的とした real-time PCR-MCA (melting curve analysis) による、臨床検体からの迅速検出法を確立し、その *P.aeruginosa* の迅速検出の有用性を検証した。

対象と方法

臨床材料より分離され、自動同定分析機器 VITEK2 にて 93%以上の確率で *P.aeruginosa* と同定された 104 分離株と、その他のグラム陰性菌 120 分離株、計 224 分離株を用いた。

また、臨床材料 108 検体を対象に、培養法と PCR 法の結果を比較した。

DNA の抽出は QIAamp DNA Mini Kit を用いた。PCR 法は、*gyrB* gene を標的として real time PCR 法にて増幅標識された (LC-FastStart DNA マスター-SYBR Green I) PCR 産物を温度融解法にて同定した (PCR-MCA 法)。

結 果

1. PCR-MCA 法のテストパフォーマンス

従来法で同定された *P.aeruginosa* 104 株とその他のグラム陰性桿菌 120 株で検証し、前者で 2 株が PCR-MCA 法に反応しなかった。後者ではすべて PCR-MCA 法にても陰性で *P.aeruginosa* は検出されなかった。診断一致率は 99.1%であった。

2. 上記の 2 例の乖離例の再検討

分離株の中で現行同定法と一致しなかった 2 株について、16S rRNA gene の sequence 解析を行った結果、*P.aeruginosa* とは 20 塩基、19 塩基の違いが見られ、ゲノム相同性から 2 株とも *Pseudomonas otitidis* (*P.otitidis*) であることがわかった。*P.otitidis* 2 株の表現型は、典型的 *P.aeruginosa* と生化学性状は類似していたが、コロニーの性状、生理的性状に若干の違いが観察されていた。したがって PCR-MCA 法の診断が正しいものとわかった。

3. 臨床材料への応用

臨床検体で *P.aeruginosa* が検出された 54 検体中すべて本 PCR-MCA 法で陽性を示し、他方 *P.aeruginosa* 非検出 54 検体中 2 検体が PCR-MCA 法で陽性であった。

4. PCR-MCA 法の感度と特異度

分離株における感度と特異度は遺伝子検査の成績を加味して、各々 100%であった。

考 察

本検査法は、現在の標準となっている自動同定分析機器・同定キット等よりも同等以上の同定能力を持っていることが示された。培養同定法陽性・PCR-MCA 陰性と乖離した 2 例は従来の *P.aeruginosa* 同定法では鑑別は困難であったが、本法では他の菌種 (*P.otitidis*) であることが識別可能であった。*P.otitidis* の臨床材料からの検出報告は本邦では初となった。

実際の臨床材料への応用では、感度は 100%と *P.aeruginosa* 培養陽性検体から全て同定することが出来たが、*P.aeruginosa* 培養陰性検体の一部に *gyrB*-PCR-MCA 陽性反応が認められた。この反応は、死菌もしくは微量な菌を検出したものか否か、あるいは培養法の過誤の問題か今後の課題である。

結論として、新しい分類標的として注目されている *gyrB* gene を指標とした *P.aeruginosa* の迅速かつ正確な real-time PCR 法を樹立した。その正確性は、従来の診断法にて鑑別できなかった *P.otitidis* を識別する能力を有していた。これをきっかけに日本では報告されていない *Pseudomonas* 属の新種を発見することができた。実際の臨床応用における評価はさらに検体数を増やして判断すべきであるが、これからの臨床検査法として十分に有用なものと思われた。

なお、申請者は本研究の続報として、薬剤耐性遺伝子 (メタロ β ラクターマーゼ遺伝子) を考慮した定量的 *P.aeruginosa* 検出法を考案し発表している。

(参考論文 : Motoshima et al. Diagn Microbiol Infect Dis. 58.53-58.2007)