

氏名（本籍）	市 村 禎 宏（東京都）
学位の種類	博 士（再生医科学）
学位授与番号	乙第 1425 号
学位授与日付	平成 19 年 12 月 19 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Evaluation of the Invader Assay with the BACTEC MGIT 960 System for Prompt Isolation and Identification of Mycobacterial Species from Clinical Specimens
審査委員	（主査）教授 江 崎 孝 行 （副査）教授 出 口 隆 教授 渡 邊 邦 友

### 論文内容の要旨

#### 【背景・目的】

発育に時間がかかる抗酸菌の感染症の適切な治療のためには、迅速で正確な菌種の決定が重要である。抗酸菌培養に、従来から用いられている固形小川法にかわって迅速に結果が得られる液体培養法が開発され、多くの専門施設で臨床利用されている。その液体培養液から高頻度に分離される抗酸菌を直接同定できる迅速な検査法が望まれていた。本研究では、液体培養法である BACTEC MGIT 960 system と組み合わせて用いることができる抗酸菌の分子遺伝学的検出法を設計し、迅速かつ簡便に広範囲な菌種を同定する検査法を開発することを目的とした。

#### 【方法】

臨床で、高頻度に分離される抗酸菌 17 種を選択し、Invader assay を確立した。標的遺伝子は、細菌の分類指標として汎用されている 16S rRNA 遺伝子とこの遺伝子よりも菌種多様性のある 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer 1 (ITS-1) 領域を必要に応じ組み合わせて設計した。系の検証のために、ATCC 78 株と臨床分離株 607 株を用い、臨床分離株の菌種同定には 16S rRNA 遺伝子と ITS-1 領域の配列を決定して実施した。

#### 【結果】

抗酸菌 Invader 法は閉鎖系によるシグナルの常温増幅反応で、一塩基の相違を正確に識別することができ、直接ゲノムからの測定が可能であった。また、検出蛍光色素を 2 色化することにより反応本数の半減化を実現できたので、設定菌種を同時に測定する反応系を確立した。その結果、抗酸菌 Invader 法は目的の遺伝子配列に対して忠実に反応し、検討したすべての株の菌種同定および分類を正確に同定することができた。さらに、臨床検体 1,390 検体を用いた MGIT との併用試験では、122 の抗酸菌陽性液体培養液から直接 116 (95.0%) が検出同定できた。また、88 検体では雑菌に汚染された培養液で、陽性反応は認められなかった。検出に要する時間は DNA 抽出に 2 時間、反応試薬の調整に 30 分間、インキュベーションに陽性反応まで平均 1.5 時間で、エンドポイント反応 4 時間までのトータル 6.5 時間以内であった。

### 【結語】

抗酸菌を Invader 法で迅速に検出・同定する方法を作成し、その評価を臨床株および臨床検体を MIGIT960 培養法を使用して実施した。その結果、作成したアッセイで抗酸菌 17 種が正確に同定できることが検証できた。また臨床検体を使った実験でも MIGIT 培養でコンタミがあった一部を除いて、正確に同定ができることを検証した。

この方法は PCR 法のような増幅産物の汚染による偽陽性の危険性はなく、常温で反応が進行するため、高額な装置が不要である。そのため、通常の検査エリアで試薬の調製が可能であり、測定機器も安価で検査環境を低コストで設定できるメリットがあった。今後、この検査法は臨床の現場において、液体培養から病原体を直接、検出同定する方法として、実用的な価値があることが実証された。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 市村禎宏は、新たに開発した抗酸菌の Invader assay 法を用いて、発育の遅い細菌の迅速で正確な検出同定法を確立した。このことは、臨床細菌学に重要な貢献をしたものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

Evaluation of the Invader Assay with the BACTEC MGIT 960 System for Prompt Isolation and Identification of Mycobacterial Species from Clinical Specimens

J. CLIN. MICROBIOL. 45(10), 3316-3322 (2007).