

氏 名 やました みね
山下 峰

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 188 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学専攻

学 位 論 文 題 目 Application of viability PCR using propidium monoazide to
detect and differentiate live/dead methicillin-resistant
staphylococcus aureus in clinical samples
(Viability PCR 法を用いた患者検体中の MRSA の生菌検出法の開発)

論 文 審 査 委 員

(主査)	教 授	林 篤志
(副査)	教 授	森 寿
(副査)	教 授	村口 篤
(副査)	教 授	北村 寛
(指導教員)	教 授	北島 勲

論文内要の要旨

目的

MRSA は 1961 年に同定されて以来、世界中に広く拡散しており、敗血症や心内膜炎、重症肺炎など、ハイリスクな感染症をひき起こす最も主要な起炎菌となった。PCR はバクテリアの検出に広く使用されているが、生菌と死菌の判別が出来ないのが欠点である。近年、Viability PCR という、定量 real-time PCR と Propidium Monoazide (PMA) 試薬とを併用した方法が開発され、プロトコールを上手く最適化すれば、PCR で生菌と死菌を判別できる可能性が開かれた。現在、食品汚染や環境汚染検査に試用され始めている。

そこで我々は、Viability PCR を臨床応用し、患者検体中の MRSA を高感度で検出且つ生菌・死菌の判別を行うことで、MRSA に対する抗菌薬治療の効果をモニタリングできるようにして、MRSA 感染症の治療に役立つ新たな検査を構築することを目的とした。

方法ならびに成績

本研究では *mecA* 遺伝子を標的とした nested PCR 法を工夫した。*mecA* 遺伝子を標的とすることで、MRSA のみならず methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) や、methicillin-resistant Coagulase-negative *Staphylococci* (MRCNS) 等、全てのメチシリン耐性菌を検出することができる。また、nested PCR を用いることで、高感度・高特異度の菌検出 (LOD=8.1 CFU/mL) を行い、安定的な Ct (Cycle threshold) value が得られるようにした。更に、*mecA* プライマーは 50 サイクルまで dimer が生じないように設計し、no amplification (=死菌) を正確に確認できるようにした。

まず Viability PCR の性能評価を行うために、in vitro で抗菌薬 (gentamicin, vancomycin, linezolid) の MRSA に対する効果判定を 24 時間、および 12 日間で行った。その結果、8 時間後に vancomycin の感受性が確認でき、また、vancomycin 投与 6 日目には全ての菌が死滅したことを正確に判定できた。次に臨床血液検体 11 検体を用い、Viability PCR の評価を行った。その結果、全ての MRSA が全て死菌である (= no amplification) と判定した検体は、培養法でもコロニーが生じなかった。但し、患者検体中 (in vivo) での低濃度域の Ct difference の値は不安定であり、現プロトコールにおいて、抗菌薬の効果を定量的に判定するのは難しいことが分かった。

総括

メチシリン耐性菌を標的とした Viability PCR の報告は今迄に無く、また、臨床検体から直接、生菌・死菌を判定する Viability PCR の臨床応用も未だ報告されていないため、本研究は臨床における Viability PCR の初の挑戦的な試みである。患者検体中の微量な菌においては Ct value が安定しないため、現時点では菌が完全に死滅したことの判定は可能と考えるが、生菌・死菌の割合を定量的に測定するには、感度を高めるなどのプロトコールの更なる改良が必要である。Viability PCR は将来的に感染症の検査として有用なツールとなり得ると考える。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

【目的】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は敗血症、重症肺炎などのハイリスクな全身感染症をおこす最も主要な起炎菌として臨床上特に重要である。臨床検体中に存在するMRSAの高感度な検出はPCR法で可能となったが、生菌と死菌の区別ができないこと、また抗菌薬の効果判定が培養法でしかできないことが難点であった。本研究では、Viability PCRという定量的real-time PCRとPropidium Monoazide (PMA) 試薬を併用した方法を用い、患者血液検体中のMRSAを迅速かつ高感度で検出し、その生菌、死菌の判別を行い、さらに抗菌薬治療の効果判定に応用することを目的とした。

【方法および成績】

すべてのメチシリン耐性菌を検出できるよう *mecA* 遺伝子を標的とし、nested PCR 法を併用することで高感度・高特異度の菌検出 (LOD=8.1 CUF/ml) と安定的な Ct (Cycle threshold) value が得られるように条件設定した。*mecA* プライマーは50 サイクルまでダイマーが生じないように設計し、no amplification (=生菌ゼロ) を正確に確認できるようにした。まず、*in vitro* において抗菌薬 (gentamicin, vancomycin, linezolid) の MRSA に対する24 時間後、12 日後の効果判定を Viability PCR を用いて行った。その結果、8 時間後に vancomycin の感受性が確認でき、6 日後にはすべての菌が死滅したことを正確に判定できた。また、linezolid よりも vancomycin が高い抗菌効果が得られた。次に臨床血液検体 11 検体を用い、Viability PCR の評価を行った。その結果、本方法で検体中の MRSA がすべて死菌であると迅速に判定された検体では、培養法においてもコロニーを生じなかった。

ただし、Ct value の差である Ct difference は、臨床血液検体での低濃度域で不安定であったため、現プロトコールにおいて抗菌薬の効果を定量的に判定するのは難しいと考えられた。

【総括】

メチシリン耐性菌すべてを標的とした viability PCR の報告はなく、また、臨床血液検体から直接、生菌・死菌を判定できる viability PCR の臨床応用もいまだ報告されていないことから、本研究は新規性が高く、医学における学術的重要性も認められる。本研究は、臨床検体への viability PCR 応用への挑戦的な試みであり、Propidium Monoazide (PMA) 試薬との併用により、臨床検体中

の MRSA が死滅したことの定性判定が培養法と比較して迅速にできる点に臨床的有用性がある。患者検体中の微量な菌に対しては Ct value が安定しないため、生菌・死菌の割合を定量的に評価するには、更なる改良が必要と考える。不必要な抗菌薬投与や患者の不利益をさけるために viability PCR は MRSA 感染症治療における有用なツールに将来的になり得ると考えられ、今後の臨床的発展性が期待される。

以上より、本審査委員会は、本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。