

氏 名 ひがし よしつぐ
東 祥嗣

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 340 号

学位授与年月日 令和 2 年 9 月 28 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

**Rapid Identification of *Candida* Species in Candidemia Directly
from Blood Samples Using Imperfect Match Probes**
(不完全一致配列のprobe を用いたカンジダ血症における
原因菌種迅速同定検査法の開発)

論文審査委員

(主査)	教授	佐藤 勉
(副査)	教授	森永 芳智
(副査)	教授	岸 裕幸
(副査)	教授	安田 一朗
(指導教員)	教授	山本 善裕

論 文 要 旨

論 文 題 目

**Rapid Identification of *Candida* Species in Candidemia Directly from
Blood Samples Using Imperfect Match Probes**

不完全一致配列のprobeを用いたカンジダ血症における

原因菌種迅速同定検査法の開発

氏 名 _____ 東 祥 嗣 _____

備考 ① 論文要旨は，2,000字程度とする。

② A4判とする。

〔目的〕

カンジダ血症は院内菌血症の原因微生物として頻度が高い一方で細菌と比較して長い培養時間を要するため早期診断，早期治療は容易ではない．また菌種により薬剤感受性が異なるため，迅速同定は治療方法の早期決定に加え患者予後に直結すると思われる．細菌による菌血症の原因同定法として，複数のprimer setを用いて得られたTm値を組み合わせて同定するTm mapping法が報告されている．しかしながらカンジダ属は真核生物のため，ヒト検体で使用できるuniversal primerを複数作成するのは困難である．このような解決すべき課題に対し，1つのuniversal primer setに加え不完全一致配列のprobe (IM Q-probe)を組み合わせるにより培養過程を経ず血液検体から直接カンジダ血症の主要8菌種を同定する方法の開発を試みた．


〔方法並びに成績〕

1セットのuniversal primerと消光probeであるQ-probeを組み合わせることで，複数のTm値を獲得することを可能とした．カンジダ8菌種について，それぞれ塩基ミスマッチ数が異なり，かつmutant strainsに依らず塩基配列が一定になるよう，DNA DATA BANKでmutant strainsの塩基配列で確認し，1つの増幅産物の中に3種類のIM Q-probeを設計した．IM Q-probeとPCRで得られた増幅産物によるTm値は，IM Q-probeと標的DNA領域とのマッチした塩基数，塩基配列，およびGC%により規定される．そのため3つのTm値の組み合わせは菌種特異的なものとなった．菌種はTm値の組み合わせをデータベースと比較することで判定した．具体的には得られた3つのTm値を3次元の1点の位置として，データベース中の既知のカンジダ菌との2点間の距離を“Difference Value (D)”として表す．この値がゼロに近い程，検出菌がデータベース中のカンジダ菌種と一致することを意味する．施行内誤差が最大で $\pm 0.25^{\circ}\text{C}$ 存在したため，診断基準は $0.0 \leq D \leq 0.41$ とした．本法の同定感度は1.2 CFU of *C. albicans* per PCR tubeであった．精度評価として先ず臨床検体コロニーから検出されたカンジダ8菌種，34株のDNAで評価し，全株においてシーケンス解析結果と一致した．次にカンジダ8菌種の菌株 (2×10^2 CFU) を健常者血液 (全血2 mL) に混入したカンジダ血症疑似血液検体を作成し，本法を用いてカンジダ菌種の検出・同定を行った．その結果，カンジダ8菌種全てにおいて正確に同定することが出来た．最後にカンジダ血症患者の血液検体16検体 (3菌種) を用い，本法でカンジダ菌種の迅速同定を行った結果，16検体全てにおいて採血後約3.5時間でカンジダ菌種を正確に検出・同定することができた．

〔総括〕

採血から約3.5時間でカンジダ血症の主要8菌種を検出・同定できる新たな遺伝子検査法を開発した．本法は培養検査と比較して迅速診断が可能であり，より早期に適切な抗真菌薬の選択が可能となりうる．近年，医療の高度化や社会の高齢化のためcompromised hostは増加してきており，それに伴いカンジダ血症による敗血症も増加している．そのため本法がカンジダ血症に対する治療成績向上に役立てばと考えている．

学位論文審査の要旨

報告番号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	東 祥嗣
論文審査委員	職 名 (主査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授	氏 名 佐藤 勉 岸 裕幸 安田一朗 森永芳智	
指導 (紹介) 教員	感染予防医学教授 山本善裕		
(論文題目 英文の場合は和訳, 日本語の場合は英訳を付記すること) Rapid Identification of Candida Species in Candidemia Directly from Blood Samples Using Imperfect Match Probes (不完全一致配列の probe を用いたカンジダ血症における原因菌種迅速同定検査法の開発)			(判定) 合格
(論文審査の要旨)			
<p>【目的】</p> <p>カンジダ血症は院内菌血症の原因微生物として頻度が高い一方で細菌と比較して長い培養時間を要するため早期診断, 早期治療は容易ではない. また菌種により薬剤感受性が異なるため, 迅速同定は治療方法の早期決定に加え患者予後に直結すると思われる. 細菌による菌血症の原因同定法として, 複数の primer set を用いて得られた Tm 値を組み合わせる Tm mapping 法が報告されている. しかしながらカンジダ属は真核生物のため, ヒト検体で使用できる universal primer を複数作成するのは容易ではない. このような解決すべき課題に対し, 1つの universal primer set に加え不完全一致配列の probe (IM Q-probe) を組み合わせることにより培養過程を経ず血液検体から直接カンジダ血症の主要 8 菌種を同定する方法の開発を試みた.</p> <p>【方法並びに結果】</p> <p>消光 probe である Q-probe を組み合わせることにより, 1セットの universal primer を用いて複数の Tm 値を獲得することを可能とした. カンジダ 8 菌種について, それぞれ塩基ミスマッチ数が異なり, かつ mutant strains に依らず塩基配列が一定になるよう, DNA DATA BANK で mutant strains の塩基配列で確認し, 1つの増幅産物の中に 3種類の IM Q-probe を設計した. IM Q-probe と PCR で得られた増幅産物による Tm 値は, IM Q-probe と標的 DNA 領域とのマッチした塩基数, 塩基配列, および GC%により規定される. そのため 3つの Tm 値の組み合わせは菌種特異的なものとなった. 菌種同定は Tm 値の組み合わせをデータベースと比較することで判定した.</p>			

具体的には得られた 3 つの T_m 値を 3 次元の 1 点の位置として、データベース中の既知のカンジダ菌との 2 点間の距離を“Difference Value (D)”として表す。この値がゼロに近い程、検出菌がデータベース中のカンジダ菌種と一致することを意味する。施行内誤差が最大で $\pm 0.25^\circ\text{C}$ 存在したため、診断基準は $0.0 \leq D \leq 0.41$ とした。精度評価としてまず臨床検体コロニーから検出されたカンジダ 8 菌種、34 株の DNA で評価し、全株においてシーケンス解析結果と一致した。次にカンジダ 8 菌種の菌株 (2×10^2 CFU) を健常者血液 (全血 2 mL) に混入したカンジダ血症疑似血液検体を作成し、本法を用いてカンジダ菌種の検出・同定を行った。その結果、カンジダ 8 菌種全てにおいて正確に同定することが出来た。最後にカンジダ血症患者の血液検体 16 検体 (3 菌種) を用い、本法でカンジダ菌種の迅速同定を行った結果、16 検体全てにおいて採血後約 3.5 時間でカンジダ菌種を正確に検出・同定することができた。

【総括】

採血から約 3.5 時間でカンジダ血症の主要 8 菌種を検出・同定できる新たな遺伝子検査法を開発した。本法は定性検査として評価したが、定量検査に移行することができるため、迅速診断だけでなく治療効果判定にも使用すると考えている。また菌種特異的な primer を用いた PCR と異なり、データベースに登録している菌種を増やすことで PCR tube を増やすことなく、より多くの菌種を同定することが可能となる。近年、医療の高度化や社会の高齢化のため compromised host は増加してきており、それに伴いカンジダ血症による敗血症も増加している。そのため本法がカンジダ血症に対する治療成績向上に役立てばと考えている。以上のことから、血液検体から培養過程を経ず直接カンジダ血症の主要 8 菌種を同定する方法として、1 つの universal primer set に加え不完全一致配列の probe (IM Q-probe) を組み合わせた点は新規性があり、得られた 3 つの T_m 値を 3 次元の 1 点の位置として、データベース中の既知のカンジダ菌との 2 点間の距離を“Difference Value (D)”として表す方法は医学における学術的重要性も高く、カンジダ 8 菌種の菌株を健常者血液に混入したカンジダ血症疑似血液検体において、カンジダ 8 菌種全てにおいて正確に同定することが出来た点は臨床的発展性が期待できる。以上より本審査会は本論文を博士 (医学) の学位に十分値すると判断した。