

	い　　わ　　や　　あ　　き　　ら
氏　　名	岩　谷　昭
学　　位	博　士（医学）
学位記番号	新大博(医)第1684号
学位授与の日付	平成17年 9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	Rapid and quantitative detection of blood <i>Serratia marcescens</i> by a real-time PCR assay:Its clinical application and evaluation in a mouse infection model (リアルタイム PCR 法による血中セラチア・マルセッセンスの迅速かつ定量的検出:マウスモデルでの評価と臨床への応用)
論文審査委員	主査 教授 木 南 凌 副査 教授 畠 山 勝 義 副査 教授 山 本 達 男

博士論文の要旨

【背景と目的】

Serratia marcescens (以下、セラチア) は日和見感染菌であるが、院内感染による敗血症の死亡率は高く、39～50%に達する。わが国では1999年から2002年にかけて3つの大規模な院内感染事例が発生した。発熱後48時間以内の死亡率は20～60%と急激な経過をたどり、血液培養の結果が判明する前に死亡した患者が多数みられた。セラチア菌血症の診断法を改善する為に、申請者らはリアルタイム PCR 法による迅速かつ高感度の診断法を開発し、マウスモデルにおいて評価した。又、臨床で大きな問題となるカルバペネム耐性についても同時に検出する方法を試みた。

【材料と方法】

- 1) 菌株：使用したセラチアを含むグラム陰性桿菌は、標準株と臨床分離株であった。*bla_{IMP}* 遺伝子保有カルバペネム耐性株についても検討した。
- 2) 培養と DNA の抽出：菌株を液体培地で培養後、 1×10^7 CFU/ml の濃度に希釈し、その200 μ l から DNA 抽出キットを使用して DNA を抽出した。検出感度を検討する実験では、菌液の10倍希釈系列を作成し、緩衝液 (PBS) またはボランティアの血液に混ぜてから DNA を抽出した。臨床検体 (血液) は、冷蔵保存されていた全血から直接200 μ l 採取し、同様に DNA 抽出を行った。
- 3) リアルタイム PCR：セラチア 16S リボゾーム RNA 遺伝子配列から特異的プライマーとプローブを作成した。カルバペネム耐性遺伝子 (*bla_{IMP}*) に対する特異的プライマーとプローブは、決定した遺伝子配列に基づいて作成した。
- 4) マウス実験：マウス腹腔内にセラチアを投与し、2週間にわたって生死を

観察した。マウス血中のセラチア菌数は寒天平板法で測定した。

【結果と考察】

1) リアルタイム PCR 反応の特異性と感度：設計したリアルタイム PCR 反応で、57 株すべてのセラチアが陽性であった。また、*S. liquefaciens*、*S. plymuthica* を含む 132 株 (18 菌種) のグラム陰性桿菌はすべて陰性であった。セラチア特異的な検出が可能であった。続いて感度について検討した。PBS に浮遊させた場合の検出限界は 5 CFU/ml、血液に浮遊させた場合は 20 CFU/ml と、高感度を示した。また、種々の菌濃度を用いて作成した検量線は良好な直線性を示し、定量的検出が可能であった。

2) 臨床検体 (血液) を用いたセラチアの診断：血液培養でセラチアが陽性となった 2 例の血液は、リアルタイム PCR 法でも陽性結果となった。検量線から血中菌濃度を求めた結果、1 例は 65 CFU/ml、もう 1 例は 140 CFU/ml であった。

3) マウス実験：セラチアをマウス腹腔内に投与した実験で、 3×10^7 CFU を投与した場合にはセラチアの血中濃度は $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml まで増加し、全てのマウスが死亡した。 6×10^6 CFU 腹腔内投与した場合には、投与 12 時間後に血中濃度は 10^4 CFU/ml まで減少し、投与 54 時間で 50% のマウスが死亡した。 3×10^6 CFU 投与の場合には、12 時間後の血中濃度は 10^3 CFU/ml まで減少し、2 週間たってもすべてのマウスが生存した。投与 12 時間後の血中濃度が 10^7 CFU/ml 以上ではマウスは 100% が死亡し、 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml で 50% が死亡、 10^3 CFU/ml 以下では死亡 0% であった。血中の菌量は、菌血症の重症度を反映し得ると考えられた。

4) カルバペネム耐性遺伝子の同時検出：プローブの標識蛍光を変えることで、同一試験管内でセラチアとカルバペネム耐性遺伝子の同時検出が可能であった。

【結論】

リアルタイム PCR 法による迅速かつ定量的なセラチア菌血症の診断法を検討した。検査に必要な時間は 2.5 時間で、必要な血液は 200 μ l であった。マウスの実験では血中の菌数レベルが重症度を反映した。本リアルタイム PCR 法は血液中のセラチアを定量的に測定することができる。患者血中の菌数を迅速測定して臨床的重症度の指標とする可能性が考えられる。本診断法はカルバペネム耐性セラチアの迅速診断にも有効であった。

論文審査の要旨

申請者はリアルタイム PCR 法による迅速かつ高感度のセラチア菌血症の診断法を開発し、その応用結果を報告している。作製した特異的プライマーとプローブは、セラチア 16S リボゾーム RNA 遺伝子配列からデザインしているが、さらにカルバペネム耐性遺伝子に対する特異的プライマーとプローブも作製している。以下に結果の要旨を記載する。

57株のセラチア菌を対象としたリアルタイムPCRでは、すべてのセラチアが陽性となり、一方他のグラム陰性桿菌ではすべて陰性であった。PBSに浮遊させた場合の検出限界は5CFU/mlであり、血液に浮遊させた場合では20CFU/mlであった。すなわち、高感度な検出能力を示し、定量的検出も可能であった。また、セラチア16SリボソームRNA遺伝子とカルバペネム耐性遺伝子の同時検出も可能であった。実際の臨床検体では、血液培養でセラチアが陽性となった2例の血液は、本リアルタイムPCR法でも陽性結果となった。さらに、セラチアをマウス腹腔内に投与した実験を行った。投与12時間後の血中濃度によって死亡率がかわるが、PCRで定量した血中菌量はこの重症度を反映していた。

本検査に必要な時間は2.5時間で、必要な血液は200μlであり、セラチアを迅速かつ定量的に測定することができる、と申請者は主張している。臨床的重症度の指標となる可能性があり、この開発と応用例を示した点に博士論文としての価値を認める。