

Development and evaluation of a novel quenching probe PCR (GENECUBE) assay for rapidly detecting and distinguishing between *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci*

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2021-07-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 久田, 恭子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/00028739

学位論文の要旨

※ 整理番号		ふりがな 氏名	ひさだ きょうこ 久田 恭子
学位論文題目	Development and evaluation of a novel quenching probe PCR (GENECUBE) assay for rapidly detecting and distinguishing between <i>Chlamydia pneumoniae</i> and <i>Chlamydia psittaci</i> (肺炎クラミジアとオウム病クラミジアを迅速に鑑別するためのジーンキューブを用いたクエンチングプローブ法の開発とその評価)		

【研究の目的】

クラミジアは、細胞偏性寄生菌である。クラミジア属の中でも *C. pneumoniae* (CPN)、*C. psittaci* (CPS)、*C. trachomatis* (CTR) がヒトに病原性を持つ。*C. pneumoniae* (肺炎クラミジア) は、成人・小児共に呼吸器感染症を引き起こし、日本では市中肺炎の約 5%～30%を占めている。また、肺炎クラミジアは 5 類感染症、*C. psittaci* が原因であるオウム病は 4 類感染症として報告が義務付けられている。診断にはペア血清による抗体価測定が一般的であるが、有意な抗体価上昇を調べるために 2～3 週間後の採血を必要とし、迅速性は低く確定診断できない場合もある。細胞培養は最も感度が良いとされている検査法であるが、煩雑なため専門の研究設備と費用を必要とするために実施している施設はほとんどない。従って、既存検査法の臨床的有用性と利便性は限られており、クラミジア病原体の実効性のある迅速検出法が、長い間待ち望まれていた。今回、GENECUBE®をプラットフォームとする Quenching Probe PCR 法を応用して肺炎クラミジアとオウム病を鑑別できる迅速な測定系を構築し、その有用性を評価した。

【方法】

Quenching Probe (蛍光消光プローブ) では、結合部の塩基配列が 1 塩基異なると温度融解曲線のピーク温度に差が出ることを利用して、CPN と CPS の *ompA* 遺伝子領域をターゲットにした特異的プローブとプライマーを設計した。GENECUBE® (自動核酸抽出・增幅・解析器；全行程 50 分以内) を用いて、設計した PCR を実施すると、ピーク温度の違いで CPN と CPS を鑑別でき、混合検体でも両菌種を同時検出できる可能性があった。そこで最初に、10 種類の PCR 増幅条件を設定し CPN と CPS の検出に関して最適条件を選択した。

次に CPN と CPS の DNA コントロール、ATCC 株、臨床分離株を用い、PCR-QC 法で CPN と CPS の DNA コントロールを測定した。また、各 DNA コントロールを希釈し、検出限界を求め、従来法である real time PCR 法の TaqMan PCR と比較した。

さらに、呼吸器系材料 300 検体を用い、細胞培養法との比較を行った。検体は、福井大学医学部附属病院と市立敦賀病院の呼吸器内科と小児科患者から採取した喀痰や咽頭、鼻咽腔など臨床検体の余剰検体を使用した（福井大学医学部倫理審査番号：20130080）。細胞培養では、72 時間培養後蛍光染色を行い、細胞内に封入体が確認されたものをクラミジア陽性と判定した。

【結果】

条件 No.1 (変性：98°C で 1 秒間、アニーリング：58°C で 3 秒間、延長：63°C で 5 秒間) を用いた DNA コントロールの測定では、一定のピーク温度 (CPN, 61°C ; CPS, 55°C) で用量依存性の明確な融解曲線が確認でき、条件 No.1 を最適な PCR 条件と設定した。また、CPN と CPS 混合検体では、2 つの異なるピークが観察され、CPN と CPS を明確に識別できた。アガロースゲル電気泳動では、これらの PCR 産物が個々に単一バンドとして検出された。この結果を基に、以下の実験では条件 No.1 を使用して検討を行った (PCR-QC 法)。

DNA コントロール、ATCC 株、臨床分離株を PCR-QC 法で測定した結果、CPN、CPS の DNA コントロールは各々陽性となり CTR ならびに呼吸器系の臨床材料から分離された別の 70 菌属 167 菌種はすべて陰性となった。これらより、本 PCR-QC 法は他菌種との交差反応はなく、特異性に優れていることが確認された。

PCR-QC 法の CPN と CPS の検出限界は、両者で約 50 copies/test で、TaqMan PCR 法の検出限界は両者で約 120 copies/test であり、両法とも同程度であった。

細胞培養法では、11 件のクラミジア陽性が確認された。PCR-QC 法では、CPN6 件、CPS1 件が陽性となり、286 検体は培養法、PCR 法いずれも陰性だった。細胞培養法を基準法とした場合、PCR-QC 法の感度と特異度はそれぞれ 36.3% (95%CI : 10.9-69.2%) 99.0% (95%CI : 97.0-99.8%) であり、これら 2 つの方法の相関性を示す κ index は 0.43 (95%CI : 0.08-0.7) であった。

【考察】

従来、CPN と CPS の検出手段として、シングルステップやマルチプレックス方式などの PCR 法が開発されてきたが、DNA 抽出から検出までに 3 時間以上要し、迅速診断には不十分であった。GENECUBE®を使用した本 PCR-QC 法では、結果報告までの作業が自動化され、CPN と CPS の DNA コントロールの識別が 50 分以内で可能となった。また、Taq ポリメラーゼよりも高い増幅率と忠実度を有する KOD ポリメラーゼの使用により、短時間（約 10 分）の PCR が実現でき、CPN と CPS 検出限界も 50 copies/test 程度が確保された。臨床検体の解析では、特異度は 99% と良好で、一方感度は 36% と低値であった。しかし、本邦の血清学的基準（岸本ら 2009 年）に従えば、PCR-QC 法のみ陽性の 3 例は急性 CPN 感染症と診断され、細胞培養法のみ陽性の 7 例中 5 例では急性 CPN 感染症は否定的であった。同基準下では、PCR-QC 法の感度は最低でも 50% (7/14) 以上となり、両検査に偽陽性、偽陰性が存在し、正確な感度評価は難しいと考えられた。

【結論】

GENECUBE®を用いた本 PCR-QC 法は、日常的な臨床検査に適した簡便な方法で、肺炎クラミジアとオウム病との鑑別に役立つ可能性があった。また、特異性に優れ、検出限界や再現性も従来法と同等で良好であった。診断感度の再評価と改善が必要であるが、本法の外来診療への適応の可能性が確認できた。

備考 1 ※印の欄は、記入しないこと。

2 学位論文の要旨は、和文により研究の目的、方法、結果、考察、結論等の順に記載し、

2,000 字程度にまとめタイプ等で印字すること。

3 図表は、挿入しないこと。