

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

学位論文審査の結果の要旨

※ 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)		
審査委員	主査 石 塚 全 副査 若 崎 博 通 副査 若 野 正 之		
本論文では、GENECUBE®を用い 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ている。 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、<i>Chlamydia pneumoniae</i> (CPN) と <i>Chlamydia psittaci</i> (CPS) の <i>ompA</i> 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が設計された。GENECUBE®（自動核酸抽出・増幅・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、最適条件（98℃ で 1 秒間、アニーリング：58℃ で 3 秒間、延長：63℃ で 5 秒間）を設定し、DNA コントロールを測定した結果、一定のピーク温度（CPN：61℃；CPS：55℃）で用量依存性の明確な融解曲線が確認できた。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 を明確に鑑別できた。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。 PCR-QC 法で CPN と CPS の DNA コントロール、ATCC 株を測定したところ、CPN、CPS の DNA コントロールは各々陽性となり <i>C. trachomatis</i> (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。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。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。 さらに、呼吸器系材料 300 検体を用いて細胞培養法との比較を行った。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%、99.0%であった。 以上より、診断感度の再評価と改善が必要ではあるが、本法は非定型肺炎の迅速な診断の一助となり得ると考察された。現在におけるクラミジアの診断は外注検査への検体提出が主流となっており、結果報告までに時間を要する。また、これまでのクラミジア培養や PCR 測定の検査データは全国的に乏しかったが、本論文ではこれらに関して様々な方法で実験を行い、解析されている。本法の外来診療への適応が期待され、学位論文として十分価値のあるものと認められる。			

(令和 3 年 6 月 1 日)

最終試験の結果の要旨

※ 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ェ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)		
審 査 委 員	主査 石 塚 全 副査 石 崎 博 道 副査 石 野 正 之		
上記の者に対し、 口 頭 により、学位論文を中心とした関連分野について試問 筆 答 合格 を行った結果 と判定した。 不合格			
(令和 3 年 6 月 1 日)			