

リアルタイムPCR法を用いたトキソプラズマ検出法の開発

◎石井 優風香¹⁾、今井 一男²⁾、酒井 純²⁾、樽本 憲人²⁾、前田 卓哉³⁾、村上 孝³⁾、前崎 繁文²⁾
埼玉医科大学 保健医療学部 四年¹⁾、埼玉医科大学 医学部 感染症科・感染制御科²⁾、埼玉医科大学 医学部 微生物学³⁾

トキソプラズマ症は、宿主の免疫状態に応じて多彩な病像を呈する感染症で、*Toxoplasma gondii* の感染もしくは再燃により発症する。確定診断には遺伝子診断などの実験室的診断を必要とするが、最も信頼性が高いPCR検査でさえその検査感度は十分でない。我々の研究グループでは、*cyclooxygenase (cox-1)* 遺伝子に対するリアルタイムPCR法を新規に開発し、*T. gondii* のゲノムを10 fg/reactionまで検出できることを明らかにしたほか、過去に報告される*BI* 遺伝子および*REP-529* 遺伝子に対するリアルタイムPCR法よりも検出感度が高いことを証明した。今回の研究では、過去にトキソプラズマ症と診断された患者検体の残余を使用し、開発した*cox-1* 遺伝子に対するリアルタイムPCR法の有効性を検討したので報告する。

方法) 検体には、トキソプラズマ症と診断された2症例(トキソプラズマ脳炎2例; それぞれ、摘出脳組織および脳脊髄液を検体として使用) ならびに、トキソプラズマ脳炎が否定された疑い4症例(脳悪性リンパ腫4例、網脈絡膜炎1例; 房水を使用)を用いた。リアルタイムPCR法には、TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用い、QuantStudio 12K Flex

Real-Time PCR Systemを使用した。標的遺伝子には、今回作成した*cox-1* 遺伝子のほか、*BI* ならびに*REP-529* を対象とした。結果) 摘出脳組織を用いた検証では、いずれの方法においても陽性と判定できた一方、脳脊髄液ではいずれのPCR法においても、陰性となる検体がみられた。なお、トキソプラズマ症が否定された4検体においては、すべてのリアルタイムPCR法において増幅がみられなかった。

考察) *cox-1* 遺伝子を標的とするリアルタイムPCR法を含めた各種PCR法を組み合わせることで、トキソプラズマ脳炎の診断率を向上させることが可能である。

連絡先 前田卓哉 049-276-1166

バクテロイデス属菌が保有する *cfiA* の迅速検出法の開発と、当院での保有率の検討

◎小野寺 梓¹⁾、小棚 雅寛²⁾、大金 佳菜²⁾、河村 亨²⁾、今井 一男³⁾、樽本 憲人³⁾、前田 卓哉⁴⁾、前崎 繁文³⁾
埼玉医科大学 保健医療学部 二年¹⁾、埼玉医科大学病院 中央検査部²⁾、埼玉医科大学 医学部 感染症科・感染制御科³⁾、埼玉医科大学 医学部 微生物学⁴⁾

カルバペネム系抗菌薬に耐性の *Bacteroides fragilis* は、低頻度ながら国内での報告がなされており、抗菌薬治療において注意が必要である。*Bacteroides* 属では、カルバペネムを分解するメタロβ-ラクタマーゼをコードする遺伝子 *cfiA* を染色体上に保有している株が存在しており、その遺伝子上流のプロモーター領域に Insertion 配列が挿入されることで遺伝子が発現し、耐性化すると考えられている。今回、LAMP 法を用いて *cfiA* 遺伝子の存在を迅速に検出できる検査系を開発し、当院で血液培養により分離された *B. fragilis* における *CfiA* 遺伝子の保有率と、カルバペネムに対する実際の耐性率を調査した。

方法) LAMP 法に用いるプライマーの設計には、PrimerExplorer Ver5 を使用し、*cfiA* 遺伝子が存在する場合に LAMP 反応が進行するように設計した。反応の至適化には当院細菌検査室において分離された菌株、ならびに *cfiA* 領域の人工合成遺伝子を用いた。さらに、反応の特異性を検証するために、ナショナルバイオリソースより譲渡を受けた 15 種類の細菌 Type strain から抽出した DNA も用いて検

証した。

結果・結論) 抄録作成時においては、65 度、60 分で 100 ng/reaction まで *cfiA* 遺伝子を検出でき、検討した 15 種類の Type strain とは交差反応がない LAMP 反応系を構築できた。現在、血液培養検査から分離された 47 株の *B. fragilis* におけるカルバペネム感受性結果ならびに *cfiA* 遺伝子保有率の解析を実施しており、発表当日には臨床データも含め解析結果を供覧する予定である。

連絡先 前田卓哉 049-276-1166

健常人における Cell-Free DNA の性状

◎田胡 裕章¹⁾、長田 誠²⁾
群馬パース大学大学院¹⁾、群馬パース大学²⁾

【背景・目的】Cell-Free DNA(以下、cfDNA)は、細胞から逸脱した DNA が断片化されたもので、血液中を浮遊している。近年、この cfDNA を利用して遺伝子関連検査に用いることが盛んに行われるようになった。検査を行うにあたり、結果に大きな影響を与える核酸の抽出方法および抽出した核酸の性状を検討し若干の知見を得たので報告する。

【材料】本学学生および職員において、インフォームドコンセントを実施し、同意を得られた4名より EDTA 入り採血管にて採取した血漿である。

【方法】①抽出過程の異なる2キット。スピнкаラムを使用した方法(以下、カラム法)、ヨウ化ナトリウムを使用した方法(以下、ヨウ化法)により抽出された cfDNA の DNA 量と性状の検討。②増幅産物の異なる(50bp~350bp)複数のプライマー対を用いて、GAPDH のリアルタイム PCR を実施し、抽出した cfDNA の性状検討。

【結果】①2キットの抽出結果
4名の cfDNA 量は、カラム法 A:45.51ng/μL、
B:63.70ng/μL、C:24.21ng/μL、D:21.74ng/μL。ヨウ化法

A:3.61ng/μL、B:4.43ng/μL、C:3.88ng/μL、D:3.58ng/μL であった。

②リアルタイム PCR の実施結果
すべての長さのプライマー対で GAPDH の増幅を確認した。ヨウ化法では、カラム法よりも短い cfDNA の Cq 値が低く、抽出液中に短い cfDNA を多量に含んでいた。また、どちらのキットも 300bp 付近の Cq 値が高く、抽出液中の 300bp 付近の cfDNA の量は少なかった。

【考察】ヨウ化法では抽出した核酸濃度が高く、短い cfDNA を PCR で捉えられ、スピнкаラム法では核酸濃度は低いが、200bp 付近の cfDNA を捉えることできた。このことから、どちらも cfDNA の抽出には有効であると明らかになった。しかし、cfDNA は血液中にて高度に断片化されることから、短い cfDNA も捉えることができるヨウ化法の有用性が示唆された。今後は、ヨウ化法を主軸にさらなる検討を進めていく。

連絡先-027-365-3366

ガーナ共和国の臨床分離株における薬剤感受性成績

◎佐藤 和佳菜、Alafate Ayibieke¹⁾、小林 あゆみ¹⁾、谷 千尋²⁾、齋藤 良一¹⁾
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科¹⁾、東京医科歯科大学医学部附属病院²⁾

世界的に広域抗菌スペクトルを有する第三世代セファロスポリン系抗菌薬 (3GC) やカルバペネム系抗菌薬に耐性を示す薬剤耐性菌が増加している。またカルバペネム系抗菌薬不活化酵素 (カルバペネマーゼ) を産生する腸内細菌科 (CPE) が、アフリカ諸国を含め世界的に増加傾向を示している。しかし東京医科歯科大学の感染症研究拠点があるガーナ共和国 (ガ国) では、薬剤耐性菌の監視体制が十分ではない。今後、適確に薬剤耐性菌の動向の把握や感染予防を行うためには、菌株の薬剤感受性成績や分子疫学等のデータを集積する必要がある。本研究ではガ国臨床分離株における 3GC 耐性菌の分離頻度を調査し、さらに 3GC 耐性腸内細菌科の薬剤感受性とそれらが有する耐性機構について解析した。菌株は 2016 年 1 月～12 月にガ国 2 病院にて分離された 399 株を対象とした。菌株の同定には MALDI-TOF MS を使用し、CLSI に準拠した薬剤感受性試験、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) およびカルバペネマーゼ鑑別試験、耐性遺伝子の検出を行った。その結果、ガ国臨床分離株

399 株のうち、CTX の MIC >2 $\mu\text{g/ml}$ は 223 株 (57%) であり、その約半数が *E. coli* であった。CTX 耐性腸内細菌科 88 株 (うち *E. coli* は 41 株、*K. pneumoniae* は 39 株) において、MEPM 耐性株は検出されなかったが、CPFX 耐性株が 60 株 (68%) 存在した。また CTX 耐性腸内細菌科の 79 株 (90%) が *bla*_{CTX-M-group 1}、MEPM 非感受性 *E. coli* 1 株 (1%) が *bla*_{NDM-1} を有した。以上より、ガ国では 3GC 耐性菌などの多剤耐性菌が既に蔓延し、特に腸内細菌科では ESBL 産生菌が流行していることが示唆された。さらに本研究ではガ国で初めて NDM-1 産生 *E. coli* を同定した。(会員外共同研究者：東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 鈴木敏彦、大橋光子、岩永史朗)

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科
分子病原体検査学分野 佐藤和佳菜
E-mail: ma180033@tmd.ac.jp TEL: 03-5803-4515