

氏 名	橋 本 徹
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1702 号
学位授与の日付	平 成 12 年 1 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	抗酸菌感染症の迅速診断に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 光 山 正 雄 教 授 西 淵 光 昭 教 授 福 井 次 矢

論 文 内 容 の 要 旨

背 景：抗酸菌は呼吸器感染症の主要な起炎菌として临床上重要な位置を占めている。本邦では従来より指摘されていた非定型抗酸菌症の増加に加え、平成9年度より結核罹患率も増加に転じ社会的にも問題となっている。欧米では抗酸菌症は AIDS の合併症として 80 年代後半より注目され多くの研究がなされてきた。抗酸菌症の診断・治療において菌の検出は決定的な意味があるが、従来の塗抹・培養法では感度と迅速性に問題があり、新しい検出法の開発が待たれていた。本研究は PCR 法を用いて臨床検体から結核菌と *Mycobacterium avium* (*M. avium*) の迅速検出を目指したものである。特に後者に関しては競合的 PCR 法による半定量も試みた。

方 法：結核菌群に特異的な繰り返し配列である IS 6110 と *M. avium* に特異的なアルファ抗原を各々増幅するプライマーを設計した。喀痰等の検体はガラスビーズとライソゾームで溶菌後、フェノールクロロフォルム法で DNA 抽出を行った。増幅した DNA は電気泳動後エチジウムブロマイド染色するか、サザンブロットイングまたはドットブロットイングした後、特異プローブにて検出した。*M. avium* 特異的なプライマーで同時に増幅される標準 DNA を設計し、既知量検体に混入することで競合的 PCR を実施した。

結 果：IS 6110 を標的とする PCR では結核菌 DNA 10 fg まで検出可能であった。また結核菌以外の抗酸菌や呼吸器感染症の主要な起炎菌となる一般細菌は増幅されなかった。肺結核が疑われた患者喀痰 70 検体に本法を用いたところ、塗抹・培養陽性 13 検体全て、塗抹陰性・培養陽性検体 8 検体中 5 検体、両者陰性 49 検体中 1 検体で PCR 陽性であった。従って培養法をゴールドスタンダードとすると本法の感度は 85.7%，特異度は 98% となり、臨床的に有用であると思われた。一方 *M. avium* に対する PCR では同菌のみならず *M. marinum* も増幅されたが、ブロットイング法を併用することで *M. avium* の特異的検出が可能となり、その検出感度は DNA 量で 10 fg であった。さらに競合的 PCR を行うことで、 10^5 CFU と 10^4 CFU の区別が可能であった。本競合的 PCR 法を用いることで *M. avium* の迅速検出・半定量が可能となり、診断や治療効果判定に臨床的有用性を発揮することが期待された。

結 語：結核菌と *M. avium* に対する PCR を組み合わせる事で、理論上は 90% 近くの抗酸菌症例で菌の迅速検出が可能になるはずである。しかし実際の臨床検体では検出感度が著しく低下することが判明しており、今後前処理法の工夫やより良いプライマーの開発等の検討をさらに進めていく必要があると思われる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は PCR 法を用いて臨床検体から結核菌と *Mycobacterium avium* (*M. avium*) の迅速検出を目指したもので、後者に関しては競合的 PCR 法による半定量も試みた。結核菌群特異的な IS 6110 と *M. avium* に特異的なアルファ抗原を各々増幅するプライマーを用い、検体はガラスビーズとライソゾームで溶菌後 DNA を抽出、PCR 産物は電気泳動後染色、またはブロットイング後プローブにて検出した。*M. avium* 特異的なプライマーで同時に増幅される標準 DNA を設計し、検体に混入することで競合的 PCR を実施した。IS 6110 を標的とする PCR では結核菌 DNA 10 fg まで検出可能であった。患者喀痰 70 検体に本法を用い、塗抹・培養陽性 13 検体全て、塗抹陰性・培養陽性 8 検体中 5 検体、両者陰性 49 検体中 1 検体で PCR

陽性で、培養法をゴールドスタンダードとすると本法の感度は 85.7%，特異度は 98% であった。*M. avium* に対する PCR では同菌に加え *M. avium* も増幅されたが、プローブにより *M. avium* の検出が可能で、その検出感度は DNA 量で 10 fg であった。競合的 PCR により、 10^5 CFU と 10^4 CFU の区別が可能であった。結核菌と *M. avium* に対する PCR を組み合わせる事で、90% 近くの抗酸菌症例で菌の迅速検出が可能である。

以上の研究は、抗酸菌感染症の診断の質の向上に貢献し感染症診療の進歩に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 11 年 12 月 1 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。