

論文要旨等報告書

氏	小出康史
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3 5 6 9 号
学位授与の日付	平成 2 0 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	口腔ケア・介護歯科における等温遺伝子増幅法を利用したメチシリン耐性菌の新しい検査法の有用性の検証

論文審査委員 教授 福井 一博 教授 高柴 正悟 准教授 岸本 悦央

学位論文内容の要旨

【緒言・目的】

高齢化社会の到来や、全身管理を行う上での歯科治療の重要性が高まるなか、日和見感染や院内感染に対する対策は重要である。とくにメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に代表される薬剤耐性菌の感染は重篤な結果をもたらすことになる。したがって、医療従事者は、薬剤耐性菌の感染実態を迅速にそして正確に把握しておく必要があるが、介護や訪問診療時は十分な設備がないので、細菌学的な検査を簡便に行うことは困難である。

【目的】

等温遺伝子増幅法(LAMP法)を応用して、MRSAに特異的な遺伝子(メチシリン耐性遺伝子, *mecA* と黄色ブドウ球菌特異的遺伝子, *spa*)を迅速かつ簡便に検出するための新しい検査法を確立し、その方法の有用性、ならびに臨床現場、とくに口腔ケアや介護歯科医療現場における適用性について調べること。

【材料および方法】

1. **供試菌種** : MRSAとして、臨床分離株3株ならびにSCC*mec*タイプ(type-I, II, III, IVa, IVc, V)の異なる6株を使用した。メチシリン耐性*S. epidermidis* (MRSE)として、臨床分離された5株を、メチシリン感受性*S. aureus* (MSSE)として4株を、さらにメチシリン感受性*S. epidermidis* (MSSE)として3株、口腔内関連細菌として、8菌種を用意した。
2. **DNA抽出方法と調整方法** : 菌体からのDNA抽出は、InstaGene Matrixを用いて行い、回収した上清をDNA抽出液として、2 μ lをLAMP法とPCR法の鋳型として使用した。
3. **LAMP用プライマー** : LAMP用プライマーは、MRSAの特異的な遺伝子をターゲットとして、遺伝子データベースに登録されている*mecA*ならびに*spa*の塩基配列をもとに、the Net Laboratory websiteのPrimer Explorer version 2を用いて設計した。
4. **LAMP反応** : Loopamp DNA amplification kit(栄研化学株式会社, 栃木, 日本)を用い、添付の説明書に従って行った。すなわち、4種類のプライマー、酵素、鋳型DNA、Reaction mixバッファー、蒸留水を含む反応液を調整後、64°Cの等温条件で60分間インキュベートして遺伝子の増幅反応を行い、その後80°Cで5分間加熱して、増幅反応を終結させた。
5. **PCR反応** : *mecA*ならびに*spa*検出のためのPCR反応は、平松らならびにShopsinらの記載に準じて行った。

6. **増幅遺伝子の検出**：電気泳動で検出増幅された DNA の検出は、LAMP 反応液あるいは PCR 反応液を 2.0% アガロースゲル上でエチジウムブロマイドにて染色し、蒸留水で洗浄後に紫外線 (302 nm) 照射下のもとで増幅遺伝子断片の有無を写真判定した。LAMP 反応の目視判定は、反応後のチューブに原液を 10 倍に希釈した SYBR Green I を加え、蛍光発色の有無で判定した。
7. **特異性試験**：培養後、 10^5 個に調整した各供試菌株から DNA を抽出し、*mecA* ならびに *spa* を標的とした LAMP 反応を行った。また、同じ鋳型 DNA を用いて PCR 法を行い、両者の検出結果を比較して LAMP 法の特異性を調べた。
8. **検出感度試験**：LAMP 法による *mecA* ならびに *spa* の検出感度試験は、MRSA 株である NCTC 10442 株を用いて行った。本株から DNA を抽出し、1 反応液あたりに含まれる鋳型 DNA 量が $10 \sim 10^5$ 個の菌数分に相当するように段階希釈した後、各 LAMP 反応の鋳型として使用した。60 分の LAMP 反応後、増幅産物は電気泳動法ならびに目視判定にて検出した。
9. **培養法による MRSA の検出**：咽頭に付着した喀痰を採取した後、一般細菌培養検査として委託（ファルコバイオシステムズ株式会社、岡山出張所、日本）して、MRSA 保有の有無を調べた。
10. **臨床サンプル**：*mecA* ならびに *spa* 検出のための LAMP 法を臨床サンプルに応用した。臨床サンプルは LAMP 法と同時に上述した PCR 法ならびに培養法で検査し、検査結果を比較することで LAMP 法の臨床応用の可能性を評価した。被験者は、老人介護施設に入院中の 87 名で、口腔内のセルフコントロールが困難な高齢者（平均年齢 70.84 ± 11.52 歳）であり、定期的に歯科医師による専門的な口腔ケアを受けている者とした。また、MRSA の保有状況は培養法によってあらかじめ検査を行っていた。臨床サンプルは、口腔ケアの際に除去したプラーク（28 サンプル）あるいは喀痰（59 サンプル）を使用した。また、本研究は岡山大学 医歯薬学総合研究科 倫理委員会の承認を得ておこなった。

【 結果 】

1. PCR 法と LAMP 法によって 10^5 cells/tube に調整した供試菌から *mecA* ならびに *spa* を検出したところ、すべての MRSA ならびに MRSE から *mecA* を、そして MRSA ならびに MSSA から *spa* を特異的に検出することができた。
2. LAMP 反応による *mecA* の検出感度は、電気泳動による検出方法で 1 cell (MRSA)/tube であり、目視判定法では 10 cells (MRSA)/tube だった。*spa* は電気泳動、目視判定のいずれの検出方法においても 1 cell (MRSA)/tube だった。
3. LAMP 法による検出結果と同時に行った従来の PCR 法での検出結果を比較したところ両方法による検査結果は 83.9% (73/87) 一致した。検査結果をプラークサンプルと喀痰サンプルに分けて比較すると、プラークサンプルでは両者の結果が 100% 一致するのに対して、喀痰サンプルでの一致率は 76.2% であった。さらに LAMP 法と培養検査の結果を比較した場合には、両方法による検査結果の一致率は 91.9% (81/87) であった。サンプル別にして検査結果を比較するとプラークサンプルでは両方法の結果が 96.4% 一致するのに対して、喀痰サンプルでは 89.8% の一致率であった。また、口腔ケアを必要とする患者、87 名からの MRSA 検出率 LAMP 法では 11 名 (12.6%) が、PCR 法では 13 名 (14.9%) が MRSA 保有者である可能性が示された。また培養法では 13 名 (14.9%) が MRSA を保菌している結果を得た。

【 考察 】

検査所要時間が短く、PCR 法に必要なサーマルサイクラーなどの特別な機器を必要としない LAMP 法はベッドサイドや訪問歯科現場などで有効な細菌検査法となる可能性が示唆された。

【 結論 】

本研究から、LAMP 法を応用し、*mecA* ならびに *spa* を検出するための新しい検査法を開発した。この方法は迅速性と簡便性にすぐれており、口腔ケアや介護歯科医療現場で有用性の高い検査法として応用できる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）を迅速かつ簡便に検出するため、等温遺伝子増幅（LAMP）法を応用することにより、MRSAに特異的な遺伝子（メチシリン耐性遺伝子、*mecA*；黄色ブドウ球菌特異的遺伝子、*spa*）を迅速かつ簡便に検出するためのプライマーを設計し、そのプライマーの有用性、ならびに口腔ケアや介護歯科医療現場等の臨床現場における適用性について調べることを目的とした研究である。

申請論文は以下の内容を示すものであった。

1. *mecA*ならびに*spa*増幅のための60分間のLAMP反応によって培養細菌から特異的かつ高感度に標的遺伝子の検出することが可能な、LAMPプライマーを設計することができた。
2. 60分間のLAMP法による*mecA*ならびに*spa*の増幅は、恒温槽で実施可能であり、さらに目視による検査判定が可能であった。
3. 臨床現場から得た口腔内プラークサンプルにLAMP法を応用して*mecA*ならびに*spa*遺伝子を増幅して、従来法である培養検査法と検出率を比較した結果96.4%、遺伝子増幅法であるポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）法では100%一致した。一方、喀痰サンプルでは若干検出率が低下した。

以上の知見によって、MRSAに特異的な遺伝子を増幅可能なLAMPプライマーを設計することができた。さらに臨床サンプル（プラークサンプルおよび咽頭の付着物のswab）から両遺伝子を検出した結果、従来の検出法であるPCR法や培養法と比較して同等以上の検出率を確認することができた。このことは、介護や往診の現場において薬剤耐性菌を高感度かつ特異的に、そして迅速、簡便に口腔内から検出できる可能性があることを示唆した。この検査法によって、医療従事者が、薬剤耐性菌の情報をいち早く、そして正確に得ることが出来る有用な検査法になり得る可能性があると考えられた。