

氏名	酒井 純
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 1384 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 1 項第 3 号に該当

学位申請論文タイトル及び掲載誌

A novel detection procedure for mutations in the 23S rRNA of *Mycoplasma pneumoniae* with peptide nucleic acid-mediated loop-mediated isothermal amplification assay  
 ペプチド核酸 peptide nucleic acid (PNA)と loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP) 法を組み合わせた、*Mycoplasma pneumoniae* の 23S rRNA 変異の革新的検出法

Journal of Microbiological Methods 2017 年 10 月掲載

学位審査委員 (主査) 教授 永田 真

(副査) 教授 池淵 研二、准教授 岡 秀昭、准教授 松井 政則

## 論文内容の要旨

【目的】 *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) は、幅広い年齢層で感染しうる市中肺炎の一病原微生物であることが知られている。*M. pneumoniae* に対する標準治療の一つとしてマクロライド系薬剤が挙げられるが、近年耐性化が進行している。本邦のマクロライド耐性菌の 99%では、特異的に 23S-rDNA の点突然変異 (A2063G, A2064G, A2063C) によるミスセンス変異が認められ、マクロライド系薬剤との結合性の低下を引き起こすことから耐性を獲得している。本研究では、検体中の *M. pneumoniae* がマクロライド耐性かを判定するため、DNA 増幅の簡便な LAMP 法に、ミスセンス変異部分を認識して特異的に結合する Peptide Nucleic Acid (PNA) を加えて反応させる PNA-LAMP 法を新規に開発し、マクロライド耐性に関わる遺伝子変異を簡便に同定可能か検証した。

【方法】 *M. pneumoniae* 23S-rDNA を特異的に増幅する LAMP プライマー・セットを設計した後、*M. pneumoniae* 標準株 (JNBP 03925) から抽出した genomic DNA を用い LAMP 反応を至適化した。*M. pneumoniae* を除く一般細菌・真菌 計 54 種の菌株から抽出した DNA を用い、LAMP 反応の特異性を検証した。*M. pneumoniae* 23S-rDNA の点突然変異 (A2063G, A2064G, A2063C) に相補的配列をもつ PNA (PNA-GA, PNA-AG, PNA-CA) を合成し、反応の鋳型として野生型、先述の点変異配列をもつ人工遺伝子 (plasmid)、培養株由来の genomic DNA を用い、LAMP 反応における PNA の阻害効果を検証した。最終的に、臨床現場から提出された咽頭拭い液より野生型・A2063G の *M. pneumoniae* DNA を抽出・反応させ、臨床現場での応用が可能か検証した。

【結果】野生型の genomic DNA を用いて、62℃, 1 時間条件下にて LAMP 反応を行なったところ、鋳型 DNA 量が 100 pg/μl-1.0 fg/μl の範囲で増幅が見られた。また LAMP 反応後、反応液が混濁するため、DNA 増幅が目視で容易に確認可能であった。一般細菌・真菌 計 54 種の DNA では、増幅が見られなかった。同 LAMP 条件下にて、野生型と変異をもつ genomic DNA, plasmid DNA を鋳型として、PNA-GA, PNA-AG, PNA-CA をそれぞれ添加して反応させた際、変異 DNA と対応す

る PNA を加えた検体のみで増殖が抑制された。咽頭ぬぐい検体から抽出した A2063G 変異も同様に、PNA-GA でのみ DNA 増幅が抑制され、野生型では PNA 有無に関わらず増幅が見られた。

【結論】本邦における *M. pneumoniae* のマクロライド耐性菌は年々増加傾向を示しており、簡易的かつ迅速な検査の検討が必要である。本研究より、PNA-LAMP 法は、*M. pneumoniae* のマクロライド耐性の有無をシーケンスすることなく、簡易的かつ迅速に行えることから、*M. pneumoniae* のマクロライド耐性診断に有用と考えられた。