

# 分子生物学的手法による病原菌の新しい同定法に関する基礎的・臨床的研究

著者	藤田 信一
著者別表示	Fujita Shinichi
雑誌名	平成14(2002)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	2001-2002
ページ	5p.
発行年	2003-05
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00049344">http://doi.org/10.24517/00049344</a>



KAKEN
2002
65

金沢大学

分子生物学的手法による病原菌の新しい同定法に関する  
基礎的・臨床的研究

(13670264)

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金  
(基盤研究C2) 研究成果報告書

平成15年度5月

研究代表者                      藤田 信一  
(金沢大学大学院医学系研究科助教授)

金沢大学附属図書館



0300-02170-4

# は し が き

## 研究&組織

研究代表者 藤田 信一 (金沢大学大学院医学系研究科)  
助教授

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	2,100	0	2,100
平成14年度	900	0	900
総計	3,000	0	3,000

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1) Shin-ichi Fujita, Yasuko Senda, Shigeki Nakaguchi, and Takuma Hashimoto (2001): Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. J. Clin. Microbiol. 39:3617-3622

2) Shin-ichi Fujita, Yasuko Senda, Thikako Iwagami, Shigeki Nakaguchi, and Takuma Hashimoto: Rapid identification of staphylococcal strains by internal transcribed spacer PCR followed by microchip electrophoresis. (発表予定)

## (2) 学会発表等

1) 藤田信一、橋本琢磨、千田靖子、小林勉：PCR法によるグラム陽性菌の迅速同定に関する基礎的・臨床的検討。第48回日本臨床検査医学会総会、平成13年8月27日（東京）

2) 藤田信一：PCR法による病原微生物の迅速同定とその血液培養への応用。第48回日本臨床検査医学会総会ランチョンセミナー、平成13年8月27日（東京）

3) 藤田信一：PCR法による病原微生物の迅速同定への挑戦。第9回北陸臨床病理集談会セミナー、平成13年9月9日（金沢）

4) 藤田信一、橋本琢磨、千田靖子、中口茂樹、岩上千加子、山岸高由：PCR産物のマイクロチップ電気泳動パターンを利用した病原微生物同定用データベースの構築。第27回北陸臨床病理集談会、平成14年9月8日（富山）

5) 藤田信一、橋本琢磨：PCR産物のマイクロチップ電気泳動パターンを利用した病原微生物同定用データベースの構築。第49回日本臨床検査医学会総会、平成14年11月23日（大阪）

## 研究成果（概要）

細菌の 16S rDNA と 23S rDNA に挟まれた internal transcribed spacer 領域（ITS）をユニバーサルプライマーを用いた PCR 法で増幅し、その PCR 産物をマイクロチップ電気泳動装置にて泳動し、得られた泳動パターンから菌種同定を試みた。使用菌株は腸内細菌科の 23 属、緑膿菌科の 15 属、Aeromonas 属、Vibrio 属、Yersinia 属、Campylobacter 属、Haemophilus 属、Neisseria 属、グラム陽性球菌の 13 属、Corynebacterium 属、Mycobacterium 属、Clostridium 属、Nocardia 属などの参考菌株と当院での臨床分離株である。*Listeria monocytogenes* と *Legionella pneumophila* は参考菌株のみについて検討した。真菌では 18S rDNA と 28S rDNA 領域にそれぞれプライマーを設定して PCR を行った。

*Staphylococcus aureus* は 40 パターンに分類され、約 90% の菌株で MSSA と MRSA の鑑別が可能であった。*S.aureus* 以外の staphylococci も泳動パターンからすべての菌株で菌種レベルの同定ができた（発表予定、論文 2）。Enterococcus 属では *E.faecalis*, *E.casseliflavus*, *E.gallinarum* が類似のパターンを呈したものの、その他の Enterococcus の同定は可能であった。Corynebacterium 属 9 菌種 14 株は泳動パターンから 9 種類に分けられた。*C.diphtheriae* の 4 株は特徴的なパターンを呈し、非病原性 Corynebacterium と容易に区別された。

Mycobacterium 属 10 菌種 24 株では 1~5 本のバンドがみとめられ、計 13 種類のパターンに分類された。*M.tuberculosis*, *M.avium*, *M.intracellulare* の 3 菌種では 2 種類のパターンがみられたが、これらの菌種の鑑別はできなかった。その他の Mycobacterium 属は菌種に特徴的なパターンを呈し、迅速同定に有用と思われた。*C.difficile* 36 株は 26 種類に分類され、毒素（トキシン A、B）を産生する 5 株は 4 パターンに限られた。真菌 25 菌種は Multiplex PCR 法により、すべての菌株で 2 本のバンドがみとめられ、その泳動パターンから酵母菌種の同定が可能であった（発表論文 1）。しかし、Aspergillus 属 3 菌種 5 株とノカルジア属 3 菌種 6 株は属レベルの同定は可能であったが、種レベルの同定はできなかった。以上の成績から、臨床的に重要な菌株は約 2 時間で菌種レベルの同定が可能であることが示された。さらに、多種類のパターンがみられた *S.aureus* や *C.difficile* では泳動パターン解析が疫学的手法として有用であると思われた。

グラム染色陽性血液培養ボトル 250 検体のうち 2 菌種以上分離された 5 検体を除く 245 検体は 2~3 時間で属レベルまたは菌種レベルの同定が可能であった。今後、菌株を増やして、精度の高いデータベースを構築して公開するとともに、迅速 PCR 法を用いて 1 時間以内に病原菌の同定を可能にしたいと考えている。