

Bhim Gopal Dhouhadel 論文（テーシス）内容の要旨

主 論 文（テーシス）

Development of nanofluidic real-time PCR system for molecular serotyping of pneumococcus and its applications

ナノ流路技術を用いたリアルタイム PCR システムによる肺炎球菌血清型分子診断法の開発とその応用について

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻

Bhim Gopal Dhouhadel
ビム グッパル ドバデル

（主任指導教員：有吉 紅也 教授）

【目 的】

肺炎球菌は肺炎、髄膜炎、敗血症を来し、年間約 50 万人の小児が死亡すると推計されている。肺炎球菌はポリサッカライドから成る莢膜が血清型を決定づけ、血清型特異的な防御免疫を誘導する。少なくとも 94 の血清型が知られているが、現在小児に接種可能な肺炎球菌コンジュゲートワクチンは最大 13 種の血清型に限られる。一方、肺炎球菌の血清型頻度分布は地理的、経時的に異なる。また、近年、ワクチン導入後の非ワクチン血清型の流行も報告された。しかし、従来の微生物学的手法による血清型診断法は、相当の費用と時間を要し、定量性と感度に問題がある。そこで、本研究では、ナノ流路技術によるリアルタイム PCR を用いて多数検体の同時定量検査が可能な肺炎球菌血清型分子診断法を開発し、本法をベトナムの疫学研究に適用して血清型特異的な肺炎球菌の疫学実態を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

(1) 肺炎球菌血清型分子診断法の開発と評価： ワクチン対象種を含む 50 血清型を特異的に検出できる定量 PCR プライマーを新たに設計し、これらを多項目定量ナノ流路リアルタイム PCR (フリューダ임社バイオマーク HD) へ適用した。そして世界標準分離株および臨床分離株由来 DNA を用いて、感度、特異度、再現性を評価し、52 鼻咽頭スワブ検体を用いて従来の微生物学的手法との比較検証を行った。

(2) ベトナムの小児急性呼吸器感染症疫学研究への応用：次に、急性呼吸器感染症患者における血清型毎の肺炎球菌の感染・保菌状態を調査する目的で、ベトナム中部ニ

ヤチャン市の中核医療施設に入院した 595 名の 5 歳未満の急性呼吸器感染症患児、ならびに 350 名の健常対照者の鼻咽頭スワブより DNA を抽出し、*IytA* 遺伝子が検出された検体に対して、上記血清型分子診断法を適用した。

【結 果】

(1) 新たに 14 種の定量リアルタイム PCR を設計し、既報の 15 種の PCR と併せて 50 血清型を 29 群に分類する検出系を作製した。これらの PCR 反応がナノ流路リアルタイム PCR においても群特異的であり、また各 PCR とも 30-300 コピー/ $2\mu\text{L}$ 程度の高感度であること、また高い再現性をもって正確な定量が可能である証拠を得た。また、従来法では 52 検体中 23 検体の血清型を決定できたのに対し、血清型分子診断ではさらに培養陰性だった 16 検体の血清型を確定した。

(2) 急性呼吸器感染症患児の肺炎球菌保菌率は 32.6% (194/595)、健常対照児の肺炎球菌保菌率は 40.0% (140/350) であり、全部で 13 群の血清型が同定された。患者と対照児では血清型検出頻度分布が異なっていたが、いずれの群においても血清型検出頻度と血清型毎の菌量との間に有意な正の相関が観察された(それぞれ Spearman's $\rho = 0.44$, $P < 0.0001$; Spearman's $\rho = 0.41$, $P < 0.0001$)。また、複数血清型保菌者の頻度は患者群で有意に高かった(18.5 % vs 7.1 %, $P = 0.01$)。

【考 察】

肺炎球菌の複数の血清型を同時に検出し、定量できる新たな分子診断法の開発に成功した。本法は多検体を同時に分析可能であり、低コストであることから、疫学調査研究に適応できることを実証した。その結果、ベトナムの小児呼吸器感染症患児群と健康対照群における血清型頻度分布が明らかになり、また、頻度の高い血清型ほど、その血清型の菌量が高い傾向を示すことが世界で初めて判明した。また複数の血清型の混合感染が急性呼吸器感染症による入院のリスク因子であることが示された。

【基礎となった学術論文】

1. Dhoubhadel BG, Yasunami M, Yoshida LM, Nguyen Thi HA, Thi TH, Nguyen Thi TA, Watanabe K, Suzuki M, Morimoto K, Dang DA, Ariyoshi K: A novel high-throughput method for molecular serotyping and serotype-specific quantification of *Streptococcus pneumoniae* using a nanofluidic real-time PCR system. *J Med Microbiol* 63(Pt 4): 528-539, 2014
2. Dhoubhadel BG, Yasunami M, Nguyen Thi HA, Suzuki M, Vu Thi TH, Nguyen Thi TA, Dang DA, Yoshida LM, Ariyoshi K: Bacterial Load of Pneumococcal Serotypes Correlates with Their Prevalence and Multiple Serotypes is Associated with Acute Respiratory Infections among Children Less Than 5 Years of Age. *PLOS ONE* (in press), 2014