

# 感染性角膜炎における CycleavePCR 法を用いた細菌、真菌の同定と定量

板橋 幹城<sup>1)</sup>、檜垣 史郎<sup>2)</sup>、福田 昌彦<sup>2)</sup>、下村 嘉一<sup>2)</sup>

1) 近畿大学医学部奈良病院 眼科

2) 近畿大学医学部 眼科学教室

感染性角膜炎は、早期に起炎菌を突き止め、適切な治療を行わないと、重篤な場合には、角膜混濁、視力低下といった永続的な合併症を残す疾患である。臨床では、角膜の擦過培養、菌の顕微鏡検鏡を行い、起炎菌の同定を行い、治療の方針を決定する事が多い。しかし、菌培養は所要時間がかかり、鏡検では手技により差がでるため、原因菌が同定されにくい等の問題がある。そのため、サイクリングプローブを用いたリアルタイム PCR 法(CycleavePCR 法)にて、感染症角膜炎起炎菌の検出系を構築し、起炎菌の同定、定量を検討した。

起炎菌同定のため、感染症角膜炎の角膜擦過物の検体を採取し、培養検査を行った 40 眼を対象とした。検出する菌は、角膜潰瘍の原因菌が、黄色ブドウ球菌、レンサ球菌、緑膿菌の検出頻度が高く、また、副腎皮質ステロイド点眼、抗菌薬の濫用により真菌、多剤耐性菌が増加してきている事をふまえ、*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, MRSA, *Candida* sp., *Fusarium* sp の 6 種類の菌種と決定した。培養検査を行った際に、角膜擦過物と涙液を採取したサンプルより DNA を抽出し、既述した 6 菌種に対して設計したサイクリングプローブ、プライマー(図1)を使用し、同じ反応系を用いる事により、1 回の測定で同時に起炎菌の同定、定量を行った。そして、細菌培養開始から 48 時間後に判明した培養結果と、CycleavePCR 法による菌定性、DNA コピー数について比較検討した。

培養結果と CycleavePCR 法とによる結果が 20 眼において一致し、これらの起炎菌は *P. aeruginosa* 8 眼 ( $5.1 \pm 4.0 \times 10^2$  コピー) (平均±標準誤差)、*S. pneumoniae* 5 眼 ( $5.6 \pm 5.1 \times 10^3$  コピー)、*S. aureus* 3 眼 ( $3.8 \pm 1.3 \times 10$  コピー)、*Candida* sp. 3 眼 ( $8.8 \pm 4.9 \times 10^3$  コピー)、MRSA 1 眼 ( $1.0 \times 10^2$  コピー)であった。結果が一致しなかった 14 眼では、11 眼が Cycleave PCR 法のみが陽性であった。また、6 眼では両検査法とも検出されなかった。

上記結果より、CycleavePCR 法は従来の鏡検、培養検査と比較して、より高率、迅速に起炎菌の同定、定量を行う事が可能な有用な検出方法であると考えられた。しかし、リアルタイム PCR 法は DNA の検出方法であるため、実際に

活性化している菌種がどうか見極める事が大切であり、迅速に結果を得るためには、症状と鏡検での菌数も組みあわせて、実際の起炎菌の決定を行う必要があると考えられた。迅速に起炎菌決定することは予後の結果においても重要であり、今回もちいた CycleavePCR 法による菌同定法や、将来は菌同定するキット等、簡便に迅速に原因菌を同定できる環境が整う事を期待する。

ターゲット起炎菌	ターゲット遺伝子	増幅鎖長 (bp)
S. Aureus, 黄色ブドウ球菌	Cap5G, Cap8G	141
MRSA, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌	mecA	106
S. pneumoniae, 肺炎球菌	LytA	319
P. Aeruginosa, 緑膿菌	gyrB	120
Candida sp., カンジダ属	ITS2	120
Fusarium sp., フサリウム属	EF1-alpha	140

図 1. Cycleave PCR 法に用いたプライマー、プローブ

## [参考文献]

Itahashi M, Higaki S, Fukuda M, Shimomura Y. Detection and quantification of pathogenic bacteria and fungi using real-time polymerase chain reaction by cycling probe in patients with corneal ulcer. *Arch Ophthalmol* 128 : 535-540, 2010.