研究成果報告書

1．研究課題名：呼吸器真菌感染症における原因真菌同定のためのプライマーセットの作成

2．研究代表者氏名：真鍋大樹

3．研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

2025 年 5 月 18 日　第 6 回日本医真菌学会　九州・中四国支部会で学会発表を行った。

4．研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

【研究の目的】

呼吸器真菌感染症では、培養に時間を要することや培養陰性例が存在することから、臨床検体から原因真菌を直接同定できる培養非依存的検査法の確立が求められる。本研究では、成熟 rRNA として細胞内に多数存在する 18S rRNA を標的とし、ヒト配列と交差せず、主要な呼吸器病原真菌を広く増幅可能なプライマーセットを作成し、DNA および RNA を用いた高感度な真菌同定法の構築を目的とした。

【1．18S rRNA プライマーセットの設計】

Aspergillus 属、Candida 属、Cryptococcus 属、ムーコル目、Fusarium 属、Scedosporium 属、Pneumocystis jirovecii など、呼吸器感染症の原因となり得る真菌の 18S rRNA 遺伝子配列を比較し、真菌間で保存され、かつヒト配列とは合致しない領域を探索した。その結果、新規 18S プライマー4 セットを設計した。

【2．予備検証および臨床検体への応用】

まず空中落下真菌を用いて各プライマーセットの増幅を確認し、複数の候補で良好な PCR 増幅が得られた。次に、培養で真菌が同定されている気管支肺胞洗浄液、喀痰、手術検体など計 11 検体を用い、検体から直接核酸を抽出して PCR および塩基配列解析を実施している。現在、得られた配列を BLAST 解析し、培養結果との一致度、増幅効率、菌種レベルでの識別能を評価中である。

【3．RNA を用いた高感度化の検討】

ITS 領域は真菌 DNA 解析の標準的標的である一方、成熟 rRNA には含まれない。そこで、細胞内コピー数が多い 18S rRNA そのものを利用することで高感度化できるか検討した。真菌から RNA を抽出し、random hexamer または 18S 特異的 R3 プライマーを用いて逆転写した後に PCR を行ったところ、18S を標的とした反応は ITS を標的とした反応より強い増幅を示し、特に 18S 特異的プライマーを用いた逆転写で良好な増幅が得られた。この結果から、rRNA を利用することにより少量真菌の検出感度を高められる可能性が示された。

【4．定量系の整備と今後の課題】

さらに、18S 領域を用いたリアルタイム PCR の条件検討を進め、既知コピー数の標準試料を用いた検量線作成および検出限界の評価を開始した。今後は、プライマーごとの増幅効率・特異度・再現性を比較して最適なセットを選定するとともに、DNase 処理を含む RNA 抽出・逆転写条件を最適化する。臨床検体数を増やし、培養法との一致率、培養陰性例における検出能、種レベル同定精度を検証し、呼吸器真菌感染症の迅速診断に利用可能な検査系の確立を目指す。

【本年度の成果】

新規 18S プライマー4 セットを設計し、培養真菌および臨床検体を用いた直接 PCR の検証段階まで進めた。また、RNA を標的とすることで 18S の増幅が良好となることを予備的に確認し、「18S rRNA を利用した高感度・培養非依存的真菌同定法」の実現可能性を示す基礎データを得た。