
演題名 感染症遺伝子検査における感度測定と定量法、および DNA 抽出法による変動についての検討

氏名 ○野手 良剛、仁井見 英樹、宇治 義則、北島 勲

所属 富山大学附属病院 検査部

【目的】近年、遺伝子検査における精度管理の重要性が再認識され、プロトコールの標準化に関する検討が活発に行われている。遺伝子検査の特異度は多分にプライマーの設計に依存するが、感度やその定量についてはプライマー（ T_m 値、濃度）のみならず、DNA 抽出法やアニーリング温度、PCR buffer の組成等、プロトコールの各段階それぞれが多少なりとも影響する。

今回、我々は感染症遺伝子検査において、感度測定と定量法についての方法論を検討した。また、DNA 抽出法による変動、および感度や定量法に与える影響について検討を加えたので報告する。

【方法】感染菌として真菌である *Candida Albicans* を用い、以下の方法で感度を測定した。

1. 基準となる濁度 (0.5 McFarland) に合わせて、生食に溶かした菌液を作る。
2. 上記の菌液を希釈して培地に開き、CFU/ml を測定する。
3. 同時に上記菌液から菌 DNA を抽出し、DNA 濃度を測る。
4. DNA 抽出液を倍々希釈し、PCR の検出限界を測定する。
5. PCR 検出限界の DNA 濃度から、PCR 検出限界の CFU 量を計算する。

尚、DNA 抽出方法について、抽出キットと自動核酸抽出装置とを比較する目的で、InstaGene Matrix (BIO-RAD)、および MagNA Pure & LC DNA Isolation Kit III (Roche) を使用した。

【結果】1. 菌液の濃度：*Candida Albicans* 0.5 McFarland を培地に開いた結果、菌液の濃度は 0.7×10^4 CFU/ml であった。

2. 菌液の DNA 濃度：*Candida Albicans* 0.5 McFarland から抽出した DNA 濃度は、

InstaGene Matrix を用いた場合、 $6.7 \text{ ng}/\mu\text{l}$ であり、MagNA Pure を用いた場合、 $13.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ であった。

3. 抽出した DNA 終濃度：プロトコールに沿って抽出した場合、InstaGene Matrix では $33.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、MagNA Pure では $13.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ の終濃度 DNA が抽出された。

【考察】上記の結果より、抽出キットに比較し、自動核酸抽出装置を用いると同濃度に含まれる DNA 量は約 2 倍に上昇する。その結果、感染症遺伝子検査の感度を CFU で計算すると、自動核酸抽出装置を用いた場合、抽出キットに比較して感度が 2 倍程度上昇することになる。但し、添付プロトコールに沿って抽出すると、抽出キットでの DNA 終濃度は 5 倍程濃くなるため、そのままを PCR に用いると感度が逆転することになる。

そもそも PCR における感度とは何かと考えた場合、それは「特定のプロトコール上での検出限界」と言わざるを得ない。例えば、検体を先に遠心濃縮したり、抽出 DNA をエタ沈で濃縮すれば、幾らでも感度を高めることは可能である。しかし、いかなるプロトコールにしろ、一定濃度の菌液における DNA 量は感度測定の基本数値であり、それは DNA 抽出法に左右されることになる。

尚、定量においては、菌種毎に DNA の大きさ、倍数体は異なり、またターゲットとなる遺伝子のコピー数も異なる可能性があるため、定量においても「特定のプロトコール」毎にそれぞれ検量線を引かなければならない。

【結語】以上、感染症遺伝子検査における感度測定と定量法について検討した。DNA 抽出法も含め、プロトコールの各段階が結果に影響するため、各遺伝子検査項目における施設間でのプロトコールの標準化が今後の課題であると考える。