

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08642

研究課題名(和文) 検体中の生菌数を感染症重症度や治療効果の新たな指標とする検査技術の開発

研究課題名(英文) Novel rapid quantification method of viable bacteria in a septic blood sample can produce an effective biomarker for monitoring patient care

研究代表者

仁井見 英樹 (NIIMI, HIDEKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：50401865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：現在用いられているプレセプシン、プロカルシトニン、体温、白血球数、CRPなどは敗血症の重症度と必ずしも一致しない。そこで我々は「患者検体中の菌数」を敗血症重症度の新たな指標として利用するため、迅速・正確に測定する方法を開発した。実際に敗血症患者で血液培養陽性となった患者の血液中の菌数を測定した結果、菌数と患者の重症度は明確な相関を示した。次に、敗血症患者5名の治療前、治療後24時間、72時間の菌数の推移を調べた。その結果、感受性の高い抗菌薬を使用した場合、24時間後に菌数は劇的に減少し、72時間後には更に減少した。つまり菌数は優秀なバイオマーカーである可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Severe sepsis is a common and frequently fatal condition, but current biomarkers do not always reflect the severity of sepsis at a particular point in time. Here we show the development of a novel rapid identification and quantification method of unknown bacteria in a clinical sample using the original technology. We identified and quantified bacteria in septic blood samples, and the quantification results were correlated with the severity of microbial infection. We subsequently examined the time-dependent changes of blood bacterial concentration, and found that the time-dependent changes of blood bacterial concentration were not correlated with those of BT, WBC, CRP, IL-6, and Presepsin. In particular, 24 to 72 hours after antibiotic treatments, blood bacterial concentrations were dramatically decreased. In conclusion, blood bacterial concentration would be useful as a novel biomarker not only to estimate the severity of microbial infection but to monitor the therapeutic effect.

研究分野：感染症検査方法の開発

キーワード：敗血症 感染症 遺伝子検査 バイオマーカー 迅速検査

1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療や臓器移植などの医療の高度化に伴い、重篤な感染症のリスクが増えている。感染症の中でも特に敗血症の治療成績は良好でなく、死亡率は25%以上にもなる。適切な抗菌薬治療を行い、重篤な感染症患者を救命するためには、患者検体中の起炎菌を可能な限り迅速に検出・同定することが臨床に重要である。しかし、現在の血液培養検査の菌陽性率は40%程度と低く、血液培養後に行う一般的な生化学的性状検査法では、検体提出から起炎菌の同定まで通常2～3日を要する。そのため、結果が判明するまでの間は経験に基づく治療を施行せざるを得なく、同定結果の無いままに抗菌薬の選択を余儀なくされていることが現状である。その結果、広域スペクトルの抗菌薬使用による多剤耐性菌の出現や、抗菌薬の選択ミスにより重篤患者が致死的となる危険性等、感染症早期の治療においては未だ重大なリスクを抱えている。従って、社会的にも、そして臨床の現場からも、感染症早期に起炎菌を高感度に検出し、迅速に同定する検査方法の確立が求められている。検体からスタートして2～3時間で起炎菌を同定するシステムの構築が可能ならば、感染症早期に同定結果に基づいた適切な抗菌薬選択が可能となり、上記の問題解決につながる。

我々は既に Melting Temperature (Tm) mapping method を開発し、採血から3時間程度で未知の起炎菌を同定する検査システムを構築した。但し、同定は敗血症の重症度判定に利用できる訳ではなく、現在用いられているプレセプシン、プロカルシトニン、体温、白血球数、CRPなども臨床的な重症度と必ずしも一致しない。一方、患者検体中の菌数を迅速・正確に定量する検査方法は無く、培養法にて大雑把な定量(+1, +2, +3)は行われているが、それは菌種毎の増殖能に依存するため、正確な生菌数を反映してはいない。また、培養法を用いる限り、迅速な検査を行うことは極めて難しい。そこで我々は敗血症重症度の新たな指標として利用するために、「患者検体中の菌数」を迅速・正確に測定する方法を開発した。今迄の敗血症のバイオマーカーは全て宿主(ヒト)側の反応のみをみているが、宿主の反応を介することなく、直接菌数を定量することが敗血症の重症度として最も理に適っている筈である。

2. 研究の目的

本研究開発の目標とは、血液中の起炎菌同定と菌数(菌名&菌数/mL)測定を迅速(採血後3時間程度)・正確に行える独自開発の検査技術を実用化することである。その結果、起炎菌の迅速同定結果を敗血症早期の適切な抗菌薬選択に生かすことが出来る。また、菌数を敗血症重症度や治療効果を示す新規バイオマーカーとして用いることで、「選択

した抗菌薬が適切であるかどうか」や「抗菌薬投与をいつ止めるべきか」がリアルタイムで明らかとなり、無駄な治療継続を避けることが出来る。

3. 研究の方法

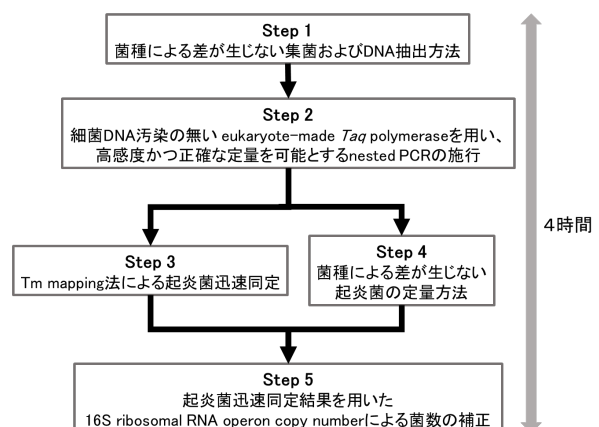
敗血症起炎菌迅速同定システムの概要

本システムでは血液検体から直接抽出した細菌DNAを鋳型とし、複数の細菌ユニバーサル・プライマー(全ての細菌DNAを検出するプライマー)を用いて nested PCR を行い、複数のPCR増幅産物の melting temperature (Tm) 値(二本鎖DNAの50%が一本鎖に解離する時の温度)を二次元にマッピングして、その“形”をデータベースと照らし合わせることで同定する。この方法により、検体採取から3時間以内で検体中に最も多く存在する細菌(起炎菌)が同定される。データベースとの照合・同定には、起炎菌同定ソフトウェアをウェブ上で使用する。また、起炎菌のPCR検出には、北海道三井化学(株)と共同開発した eukaryote-made thermostable DNA polymerase (真核生物を宿主細胞として作成した耐熱性DNA合成酵素)を用いる。これは“細菌DNAのコンタミネーションが皆無である”ことに成功した初のDNA合成酵素であり、患者検体より直接、高感度で正確な細菌DNAの検出を可能とする。

敗血症起炎菌定量法の概要

起炎菌同定(Tm mapping法)と定量とは同時並行で行う(図1)。一方ではTm値の組み合わせで菌の同定を行い、もう一方では定量コントロール(大腸菌)で検量線を引いて菌の定量を行う。PCRのプライマーは16S ribosomal RNAをターゲットとした universal primer を用いるが、16S ribosomal RNAのコピー数(1つの菌の中に含まれる遺伝子の数)は菌種によって異なる。検量線での定量結果はコントロールとして用いた大腸菌としての菌数となるが、Tm mapping法で同時に起炎菌が同定されるので、この16S ribosomal RNAのコピー数で菌数を補正する。その結果、採血後3時間半程度で起炎菌の同定結果と定量結果とが同時に得られる。

図1: 起炎菌同定・定量法のフローチャート



4. 研究成果

bacterial DNA contamination-free である eukaryote-made *Taq* polymerase の開発により、患者血液検体から直接、迅速で正確な細菌の PCR 検出・同定・定量が可能となった。

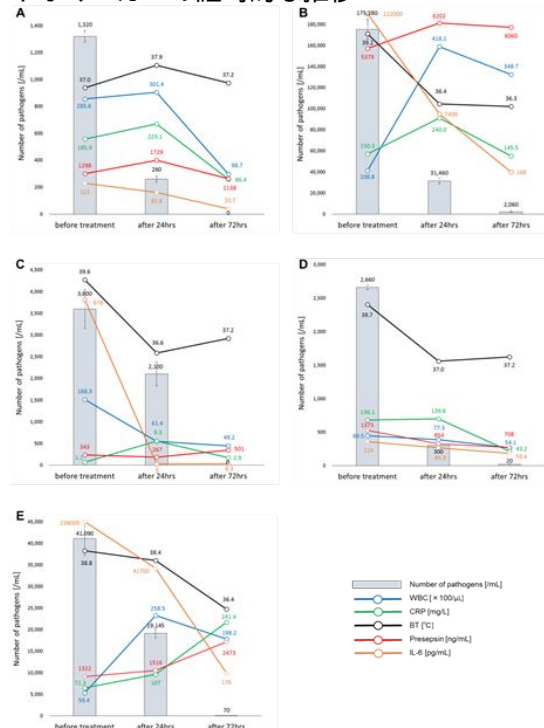
Tm mapping 法の開発により、シーケンスなどで塩基配列を読むことなく、PCR melting 解析（共にリアルタイム PCR 機器 1 台あれば実施出来る）のみで起炎菌を同定できるため、迅速（採血後 3 時間程度）・簡便・安価な検査が可能である。

起炎菌同定ソフトウェアには既に 200 菌種以上の細菌データが登録しており、僅か 7 つの PCR プライマーで敗血症のほぼ全ての起炎菌を同定することが可能である。

起炎菌定量法の開発により、血液検体中の菌数（菌名含む）を敗血症の重症度や治療効果を示す新たなバイオマーカーとして用いることが出来るようにした。実際、敗血症患者 5 名の治療前後の菌数を他のバイオマーカーと共に測定した結果を以下に示す。菌数は他のバイオマーカーより短時間で大きく変動するため、バイオマーカーとして非常に優れている。更に血液中の菌数がほぼゼロになることで、抗菌薬治療の止め時が分かるようになる。今迄、抗菌薬治療の止め時の指標は無く、今後、菌数が止め時の指標として使われることを期待する。

抗菌薬治療前後での菌量の経時的な推移の解析

図 2：敗血症患者 5 名の菌数と、その他のバイオマーカーの経時的な推移



解析の目的：抗菌薬治療前後での菌数の経時的な推移を解析し、菌数が治療効果判定のためのバイオマーカーとして有効であるかどうかを評価する。

Protocols：対象患者は個別症例として富山大学附属病院で敗血症疑いと診断された成人 5 症例。治療前、抗菌薬投与後 2 4 時間、および 7 2 時間で採血を行った。そして、その 3 ポイントで起炎菌迅速同定・定量検査と共に、体温、白血球数、CRP、プレセプシン、IL-6 を測定した（図 2）。

症例 A：血液培養、尿培養、および Tm mapping 法で *E. coli* 検出。尿路感染症からの敗血症と診断。抗菌薬は meropenem を投与（*E. coli* に感受性）。Error bar は triplicate 測定による。

症例 B：血液培養で *Klebsiella oxytoca*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* を検出。Tm mapping 法では複数菌感染で同定出来ず。腭頭部癌からの敗血症と診断。抗菌薬は cefepime を投与（*K. oxytoca* と *H. influenzae* に感受性、*S. pneumoniae* には intermediate）。定量結果は *E. coli* 換算値で算出。Error bar は triplicate 測定による。

症例 C：血液培養、尿培養、および Tm mapping 法で *E. coli* 検出。尿路感染症からの敗血症と診断。抗菌薬は tazobactam/piperacillin を投与（*E. coli* に感受性）。Error bar は triplicate 測定による。

症例 D：血液培養および Tm mapping 法で *Streptococcus dysgalactiae* 検出。感染源は不明。抗菌薬は tazobactam/piperacillin を投与（*S. dysgalactiae* に感受性）。Error bar は triplicate 測定による。

症例 E：血液培養、尿培養、および Tm mapping 法で *Enterobacter aerogenes* 検出。尿路感染症からの敗血症と診断。抗菌薬は tazobactam/piperacillin を投与（*E. aerogenes* に感受性）。Error bar は triplicate 測定による。

結果：

実際の患者検体を用いて迅速同定 & 定量検査を施行した結果、採血後 4 時間という迅速さで敗血症起炎菌の同定および定量を行うことが出来た。また、血液中の菌数は治療後 2 4 時間で他のどのバイオマーカーよりも劇的に変動した。IL-6 を除く他のバイオマーカーは、特に抗菌薬投与 24 時間後に菌量の減少とは逆に上昇する場合がある。現行のバイオマーカーは全て宿主（ヒト）側の免疫反応を反映している為、結果的に菌量の減少のタイミングから遅れ、タイムラグが生じてしまう可能性が考えられる。この結果から、菌数は治療効果を迅速に反映する、敗血症の新たなバイオマーカーとして極めて有用である可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計16件)

仁井見英樹; Melting Temperature (Tm) mapping 法: 新たな敗血症起炎菌迅速同定法. **臨床病理**, 査読無し, 2018, 66(3), 267-274

Yoneda N, Yoneda S, Niimi H, Ito M, Fukuta K, Ueno T, Ito M, Shiozaki A, Kigawa M, Kitajima I, Saito S. Sludge reflects intra-amniotic inflammation with or without microorganisms. *American Journal of Reproductive Immunology*, 査読有, 2017, doi: 10.1111/aji.12807.

仁井見英樹; 敗血症起炎菌迅速同定システム Tm mapping 法. **臨床と微生物**, 査読無し, 2017, 44(5), 063-071

Higashi Y, Nakamura S, Niimi H, Ueno T, Matsumoto Kawago K, Sakamaki Kitajima I and Yamamoto Y. Spondylodiscitis due to Parvimonas micra diagnosed by the melting temperature mapping method: a case report. *BMC Infectious Diseases*, 査読有, 2017, 17(584), DOI:10.1186/s12879-017-2690-4

Torai R, Makino T, Mizawa M, Hayashi M, Furukawa F, Niimi H, Shimizu T. Recurrent deep vein thrombosis with a protein S Tokushima mutation. *British Journal of Dermatology*, 査読有, 2017, DOI:10.1111/bjd.15700

仁井見英樹; 敗血症起炎菌のあらたな迅速同定法. **医学のあゆみ**, 査読無し, 2017, 262(7,8), 728-729

仁井見英樹; 2016年度学会賞受賞報告(学術賞) Melting Temperature (Tm) mapping 法: 検体採取後3時間以内での敗血症起炎菌迅速同定法. **臨床化学**, 査読無し, 2017, 46(1), 47-54

仁井見英樹; 最前線の研究現場から - 検査は医療を変える - 革新的な敗血症検査システムを開発. **実業之富山**, 査読無し, 2017, 72(1), 50-53

金谷雄平、高松和弘、下江豊、仁井見英樹、北島勲、栗山勝. 先天性アンチトロンピン欠損症による脳静脈洞血栓症を併発した多発性硬化症の1例. **臨床神経学**, 査読有, 2016, 56(4), 254

Yoneda S, Shiozaki A, Yoneda N, Ito M, Shima T, Fukuda K, Ueno T, Niimi H, Kitajima I, Kigawa M, Saito S. Antibiotic Therapy Increases the Risk of Preterm Birth in Preterm Labor without Intra-Amniotic Microbes, but may Prolong the Gestation Period in Preterm Labor with Microbes, Evaluated by Rapid and High-Sensitive PCR System. *American Journal of Reproductive Immunology*, 査読有, 2016, 75(4), 440-450

仁井見英樹; 敗血症起炎菌の新たな迅速同定法. **バイオサイエンスとインダストリー**, 査読無し, 2016, 74(5), 422-424

仁井見英樹; 敗血症の起炎菌の迅速検出・同定, **検査と技術**, 査読無し, 2016, 44(5), 369

Yoneda N, Yoneda S, Niimi H, Ueno T, Hayashi S, Ito M, Shiozaki A, Urushiyama D, Hata K, Suda W, Hattori M, Kigawa M, Kitajima I, Saito S. Polymicrobial Amniotic Fluid Infection with Mycoplasma/Ureaplasma and Other Bacteria Induces Severe Intra-Amniotic Inflammation Associated with Poor Perinatal Prognosis in Preterm Labor. *American Journal of Reproductive Immunology*, 査読有, 2015, doi: 10.1111/aji.12456

仁井見英樹; 血液検体からの起炎菌の直接検出・同定方法の開発. **化学療法領域** 増刊号, 査読無し, 2015, 31(S-1), 211-219

Niimi H, Ueno T, Hayashi S, Abe A, Tsurue T, Mori M, Tabata H, Minami H, Goto M, Akiyama M, Yamamoto Y, Saito S and Kitajima I. Melting Temperature Mapping Method: A Novel Method for Rapid Identification of Unknown Pathogenic Microorganisms within Three Hours of Sample Collection. *Scientific Reports*, 査読有, 2015, doi: 10.1038/srep12543.

Ueno T, Niimi H, Yoneda N, Yoneda S, Mori M, Tabata H, Minami H, Saito S, Kitajima I. Eukaryote-Made Thermostable DNA Polymerase Enables Rapid PCR-Based Detection of Mycoplasma, Ureaplasma and Other Bacteria in the Amniotic Fluid of Preterm Labor Cases. *PLoS One*, 査読有, 2015, doi:org/10.1371/journal.pone.0129032

【学会発表】(計13件)

仁井見英樹, 感染症における新たな迅速検査技術の開発, ファーマ・メディカルエンジニア養成プログラムと生命融合科学教育部の共催シンポジウム, 2018年2月13日

仁井見英樹, 菌数を敗血症の新規バイオマーカーとする迅速な遺伝子検査システムの開発, 第64回日本臨床検査医学会学術集会, 京都, 2017年11月17日

仁井見英樹, 菌数を敗血症の新規バイオマーカーとする起炎菌迅速同定・定量検査システムの開発, 第66回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京, 2017年11月1日

仁井見英樹, 菌数を敗血症の新規バイオマーカーとする迅速検査システムの開発, 第87回日本感染症学会 西日本地方会学術集会, 長崎, 2017年10月27日

仁井見英樹, 菌数を敗血症の新規バイオマーカーとする迅速検査システムの開発, 第57回日本臨床化学会年次学術集会, 札幌, 2017年10月7日

Hideki Niimi, Tm Mapping - A Novel Testing Method for Rapid Bacterial Identification without Blood Culture,

Satellite Session at Singapore International Infectious Disease Conference 2017, 2017年8月25日

仁井見英樹, 敗血症起因菌迅速同定システム(Tm mapping法): 開発と臨床展開, 第28回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 長崎, 2017年1月21日

仁井見英樹, Tm mapping法概要および複数機関の試験結果, 第28回日本臨床微生物学会総会学術集会、長崎, 2017年1月21日

仁井見英樹, 敗血症起炎菌迅速同定法(Tm mapping法)の開発, 第56回日本臨床化学会年次学術集会、熊本, 2016年12月3日

仁井見英樹, 新たな起炎菌迅速同定・定量技術を基盤とし、菌数を敗血症の新規バイオマーカーとする検査システムの開発, とやま産学官金交流会, 2016年11月30日

仁井見英樹, Melting Temperature (Tm) mapping法: 検体採取後3時間以内での敗血症起炎菌迅速同定法, 第58回日本感染症学会中日本地方会学術集会、2015年10月16日

仁井見英樹, Tm mapping法: 血液検体からの起炎菌の直接検出・同定方法の開発, 第27回臨床微生物迅速診断研究会総会, 金沢, 2015年7月4日

仁井見英樹, Tm mapping法(感染症起炎菌迅速同定法)の院内試験運用結果と正確性の評価, 第89回日本感染症学会学術講演会, 京都, 2015年4月16日

【産業財産権】

出願状況(計5件)

名称: 不完全なマッチプローブを用いたカンジダ菌の迅速同定法

発明者: 東祥嗣, 仁井見英樹, 北島勲

権利者: 富山大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-61350

出願年月日: 2018年3月28日

国内外の別: 国内

名称: 検体中の細菌数の定量方法

発明者: 仁井見英樹, 北島勲, 宮腰晃央, 東祥嗣

権利者: 富山大学、三井化学

種類: 特許

番号: 特願 2017-246724

取得年月日: 2017年12月22日

国内外の別: 国内

名称: 検体中の細菌数の定量方法

発明者: 仁井見英樹, 北島勲, 宮腰晃央, 東祥嗣

権利者: 富山大学、三井化学

種類: 特許

番号: 特願 2017-246333

取得年月日: 2017年12月22日

国内外の別: 国内

名称: 改良Tmマッピング法

発明者: 仁井見英樹, 大槻晋也, 北島勲

権利者: 富山大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-244461

取得年月日: 2017年12月22日

国内外の別: 国内

名称: 血液検体の前処理方法

発明者: 仁井見英樹, 杉江和茂, 北島勲, 上野智浩

権利者: 富山大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-219547

取得年月日: 2017年11月15日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

【その他】

・仁井見英樹, 日本臨床化学会 学術賞, 2016年12月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仁井見 英樹 (NIIMI, Hideki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号: 50401865

(2) 研究分担者

北島 勲 (KITAJIMA, Isao)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号: 50214797

上野 智浩 (UENO, Tomohiro)

富山大学・附属病院・検査輸血細胞治療部 技師長

研究者番号: 00771700