

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08988

研究課題名(和文) レーザーマイクロダイセクション法による画期的な病原体診断法の開発

研究課題名(英文) The establishment of diagnostic tool for causative microorganisms using laser capture microdissection

研究代表者

高城 一郎 (Ichiro, Takajo)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：20418841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：適切な起炎菌の同定は、感染症診療における抗菌薬選択において重要である。しかしながら、多くの臨床検体は起炎菌以外の常在菌などによる汚染があり、しばしば“真”の起炎菌の同定が困難な場合がある。本研究では、細菌を貪食した好中球をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)法で回収し、起炎菌の同定が可能か検討した。細菌を貪食した好中球からDNAを抽出しPCR法により、細菌特異的16SリボソームRNAの検出が可能であった。同方法によって腹膜炎モデルマウスの起炎菌の同定も可能であった。本方法によって効率的に高い特異度で起炎菌の同定が可能と考えられ、細菌検査の新しい方法として有用である可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喀痰や尿などの臨床検体における起炎菌の同定は、抗菌薬の選択を適切に行うために重要であるが、日常診療で取り扱う臨床検体はしばしば起炎菌以外の細菌に汚染されており、判断が難しい場合がある。好中球に貪食された細菌は起炎菌と考えられるため、本研究ではこの様な好中球をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)法で効率的に回収し、起炎菌を同定する方法の開発を進めた。グラム染色とLCM法を組み合わせ、細菌を貪食した好中球の回収と細菌特異的な16SリボソームRNA遺伝子の同定が可能となった。腹膜炎モデル動物においても本方法により起炎菌の同定が可能であり、今後、臨床検体での応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To detect causative microorganisms is important to select accuracy treatments in daily clinical practice of infectious diseases. Gram staining is a common technique to estimate causative microorganisms. However, sometimes, it is difficult to distinguish bacterial contamination of clinical samples in this method. In the present study, we tried to establish a novel method to detect "true" causative microorganisms using laser capture microdissection (LCM). Bacteria-phagocytized neutrophils were targeted and were collected by LCM. After nucleic acid extraction from these neutrophils, the bacteria-specific 16S ribosomal RNA was analyzed. In peritonitis model mice, a causative microorganism was detected by this method. Therefore, LCM method may be a useful tool to detect causative microorganism which was phagocytized by neutrophils. In future study, it is necessary to evaluate the sensitivity and specificity of this method in clinical samples.

研究分野：感染症

キーワード：細菌検査 レーザーマイクロダイセクション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

病原微生物の検出は感染症の診断および治療に不可欠であり、細菌学的検出法のほかに近年核酸増幅を用いた方法および質量分析装置を用いた解析法などが用いられている。しかし、極めて微量の感染検体や混在する微生物等により病原性微生物を単離することが難しい場合も少なくない。これまで我々は、*E. coli* (American Type Culture Collection ATCC\_25922) を材料として Laser Capture Microdissection (LCM) を用いて、グラム染色標本から顕微鏡下で菌体の切り出し、回収、DNA 抽出を行った後、PCR で細菌 16S リボソーム RNA (16S rRNA) 遺伝子の増幅を行い起炎菌を同定する方法の確立に成功した。本研究においてはこの方法をさらに発展させ、臨床検体を用いた診断法の確立を行う。

## 2. 研究の目的

感染症の診断の第一歩は病原体の分離である。しかしながら肺炎や菌血症のように一般的な感染症であっても、その起炎菌の同定率は低い。これは起炎微生物が多彩であり、嫌気性菌や抗菌薬の影響、細胞内寄生体では培養困難な感染症の頻度が高いことによる。本申請研究においては古典的なグラム染色、培養法に加えて菌体をスライド標本から LCM 法を用いて、直接回収し、細菌の 16SrRNA 遺伝子を増幅する方法を確立し菌種同定に応用する。本方法の応用により病原体診断率の飛躍的向上を目指す。

## 3. 研究の方法

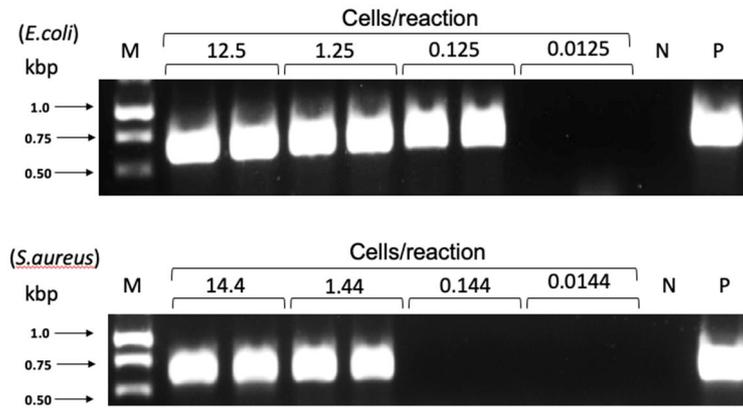
(1) LCM 法のグラム染色への応用：既に確立したグラム染色塗沫標本から LCM 法により微生物を回収し、16S rRNA 遺伝子 PCR を用いて同定する方法の改良を行う。病原体特異的プライマーを複数組み合わせることによる特異性の高い検出法について、複数菌に適応できる方法を検討する。具体的には、LCM 専用メンブレンスライドに菌株を塗布し、そのグラム染色標本を LCM (本学フロンティア実験センター) によって菌体を回収する。回収された菌体の 16S rRNA 遺伝子について PCR 法による解析を行う。さらに臨床的に分離頻度の高いグラム陽性菌、陰性菌、また嫌気性菌を対象に特異的なプライマーを合成し、これを用いた nested PCR 法による検出法を確立する。

(2) 腹膜炎モデル動物の腹水からの病原体検出：臨床的に重要な種々の細菌を動物の腹腔内に接種し、より実臨床に近い条件のサンプルを作成し、グラム染色塗沫標本から微生物あるいは微生物を貪食した好中球を LCM 法により回収し、16S rRNA 遺伝子 PCR あるいは細菌特異的 PCR を用いて同定する方法の感度、特異度について検討を進める。C57BL/6 マウスの腹腔内へ微生物接種し腹膜炎を発症させ、接種後 6-8 時間でサクリファイスし、腹水を回収した。腹水のグラム染色標本を作製し、上記 LCM 法による微生物同定を行った。

## 4. 研究成果

(1) LCM 法のグラム染色への応用：臨床で代表的な病原菌である *E. coli* ATCC 25922 と *S. aureus* ATCC 29213 を用いて LCM を使用した細菌同定法を段階的に検討した。その結果、*E. coli* ではアルカリ加熱法で、*S. aureus* からは Achromopeptidase (ACPase) と InstaGene Matrix を用いた方法によりそれぞれの 16S rRNA 遺伝子の検出が可能であった。また、各菌液を用いて検出感度の検討を行った。*E. coli* とアルカリ加熱法の組み合わせでは 0.125 cells/reaction まで検出可能であったのに対し、*S. aureus* と ACPase & Instagene Matrix 法

では 1.44 cells/reaction であった ( 図 1 )。



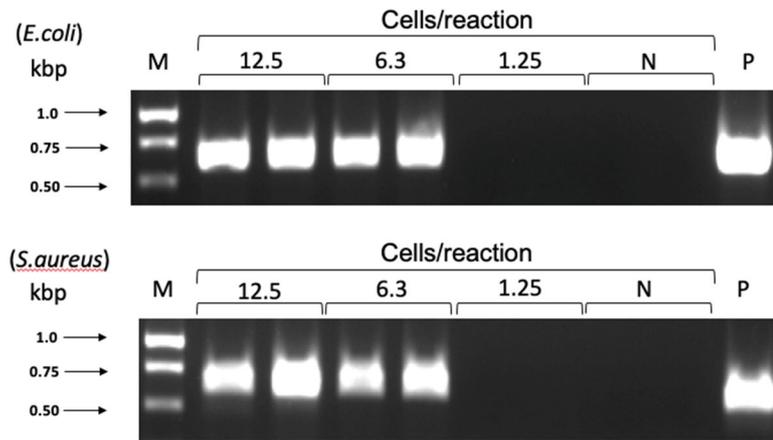
**図 1. 菌液希釈系列 (*E. coli*, *S. aureus*)を用いた 16S rRNA 遺伝子 PCR の感度の検討** . 上段, 段階希釈した *E. coli* 菌液より抽出した DNA をテンプレートとした 16S rRNA 遺伝子の PCR 産物の電気泳動 . Lane-1,2: 12.5 菌体/reaction; Lane-3,4: 1.25 菌体/reaction; Lane-5,6: 0.125 菌体/reaction; Lane-7,8: 0.0125 菌体/reaction; N, negative control (滅菌水); P, Positive control (*E. coli* 10 菌体/reaction); M, 1-kb DNA Marker. 下段, 段階希釈した *S. aureus* 菌液より抽出した DNA をテンプレートとした 16S rRNA 遺伝子の PCR 産物の電気泳動 . Lane-1,2: 14.4 菌体/reaction; Lane-3,4: 1.44 菌体/reaction; Lane-5,6: 0.144 菌体/reaction; Lane-7,8: 0.0144 菌体/reaction; N, negative control(滅菌水); P, Positive control (*S. aureus* 10 菌体/reaction) ; M, 1-kb DNA Marker.

次に、メンブレンスライドに菌液を塗布し、グラム染色を行った標本から LCM で約 100cells、50cells、10cells の菌体を回収し検出感度の検討を行った。その結果、*E. coli*、*S. aureus* 共に 50cells (6.3cells/reaction) 回収したサンプルまで検出可能であったが、10cells では PCR 産物は認められなかった ( 図 2 )。

#### ( 2 ) 腹膜炎モデル動物の腹水からの病原体検出 :

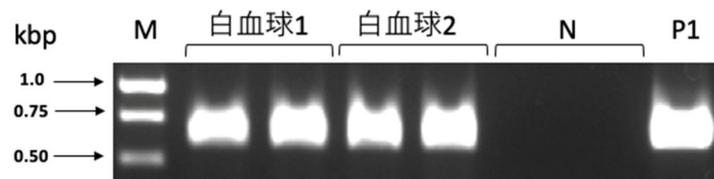
腹膜炎モデルマウスより得られた腹水のグラム染色標本を作成した。菌体を貪食した白血球 1 細胞を 2 つずつ LCM 法で回収し、*E. coli* はアルカリ加熱法、*S. aureus* は ACPase & Instagene Matrix 法で DNA 抽出後、16S rRNA 遺伝子 PCR を行った。その結果増幅産物が認められた。また、ダイレクトシーケンス法で塩基配列解析を行ったところ、マウスに接種した菌と一致した ( 図 3 )。

また、*E. coli* および *S. aureus* の菌種特異的 nested-PCR を行ったところ、*E. coli* 特異的 PCR では *E. coli* を接種したモデルマウス由来の LCM サンプルのみで増幅産物が得られ、*S. aureus* を接種したモデルマウス由来のサンプルでは増幅産物は認められなかった。一方、*S. aureus* 特異的 PCR では *S. aureus* を接種したモデルマウス由来の LCM サンプルのみで増幅産物が得られ、*E. coli* を接種したモデルマウス由来の LCM サンプルでは増幅産物は認められなかった ( 図 4 )。

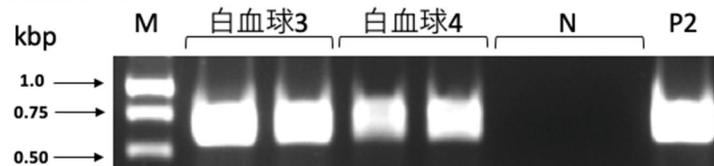


**図 2. グラム染色標本から回収した菌体を用いた 16S rRNA 遺伝子 PCR の感度の検討** . 上段 , 段階希釈した *E. coli* 菌液より抽出した DNA をテンプレートとした 16S rRNA 遺伝子の PCR 産物の電気泳動 . Lane-1,2: 12.5 菌体/reaction; Lane-3,4: 6.3 菌体/reaction; Lane-5,6: 1.25 菌体/reaction; Lane-7,8: N, negative control(菌を塗布していないメンブレン), Lane-9: P, Positive control (*E. coli* 10 菌体/reaction), M: 1-kb DNA Marker. 下段 , 段階希釈した *S. aureus* 菌液より抽出した DNA をテンプレートとした 16S rRNA 遺伝子の PCR 産物の電気泳動 . Lane-1,2: 12.5 菌体/reaction; Lane-2,3: 6.3 菌体/reaction; Lane-5,6: 1.25 菌体/reaction; Lane-7,8: N, negative control(菌を塗布していないメンブレン), Lane-9: P, Positive control (*S. aureus* 10 菌体/reaction); M, 1-kb DNA Marker.

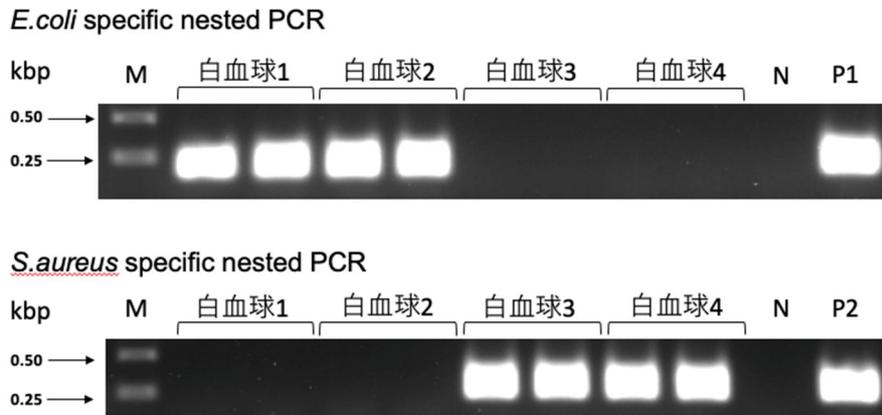
### *E. coli* 接種マウス



### *S. aureus* 接種マウス



**図 3. 腹膜炎モデルマウスから回収した白血球の 16S rRNA 遺伝子 PCR 産物の電気泳動** . *E. coli* ( 上段 ) および *S. aureus* ( 下段 ) 接種による腹膜炎モデルマウスの腹水で作成されたグラム染色標本から , LCM 法で白血球を回収し 16S rRNA 遺伝子の PCR 産物の電気泳動 . 白血球 1 および 2 は , LCM 法で別々に回収した白血球を示す . 下段の白血球 3 と 4 も同様 . N, 陰性コントロール (生理食塩水を接種したマウスから回収した白血球), P1, Positive control (*E. coli* 10 菌体/reaction) ; P2, Positive control (*S. aureus* 10 菌体/reaction) ; M, 1-kb DNA Marker.



**図 4. 腹膜炎モデルマウスから回収した白血球の菌種特異的 nested-PCR 結果.** 腹膜炎モデルマウスの腹水で作成されたグラム染色標本から, LCM 法で白血球を回収し *E. coli*. (上段) および *S. aureus* (下段) の 16S rRNA 遺伝子の nested-PCR 産物の電気泳動. 白血球 1 および 2 は *E. coli* 腹膜炎マウス由来, 白血球 3 および 4 は *S. aureus* 腹膜炎由来の白血球 DNA をテンプレートとした 16S rRNA 遺伝子の nested-PCR 産物を示す. N, 陰性コントロール (生理食塩水を接種したマウスから回収した白血球), P1, Positive control (*E. coli* 10 菌体/reaction); P2, Positive control (*S. aureus* 10 菌体/reaction); M, 1-kb DNA Marker.

2018 年度においてはこれらの結果をまとめて、Journal of microbiological methods に論文として報告した。さらに *E. coli* と *S. aureus* 以外の菌種として代表的な嫌気性菌である *B. fragilis* で検討を行ったが、腹膜炎モデルを作成することができなかった。また動物実験ではなく、簡易的に白血球に貪食された細菌モデルを得るために単球-マクロファージ系細胞株(THP-1)を用いた細菌貪食実験を行った。THP-1 による *S. aureus* の貪食が確認できたが、*E. coli* の貪食は認められなかった。*S. aureus* を貪食した THP-1 においても、LCM 法で回収や PCR による *S. aureus* の核酸検出が可能であった。

2019 年度は THP-1 以外の細胞株として顆粒球系の細胞に分化可能な HL-60 を用いて検討を行ったが、細菌貪食モデルを樹立することはできなかった。また基礎的検討と並行して、細菌を貪食した好中球を多数認める喀痰や細菌尿といった臨床検体を利用し、検出可能であるかの検討を行った。10 検体を用いて検討を行なった結果 7 検体で細菌由来 DNA を検出することができ、さらに 4 検体については培養で検出されなかった菌種を検出することができた。

今後は細胞株を用いた細菌貪食モデルを確立し、検出感度の検討や DNA 抽出方法の改良を行う予定である。また、複数菌貪食が認められるような臨床検体における LCM 法による菌種の検出ができるような方法を確立していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada Akiteru, Umeki Kazumi, Saeki Yuji, Hashikura Yuuki, Nomura Hajime, Yamamoto Ikuo, Umekita Kunihiro, Takajo Ichiro, Koshimoto Chihiro, Okayama Akihiko	4. 巻 155
2. 論文標題 Detection of microbial genes in a single leukocyte by polymerase chain reaction following laser capture microdissection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 42 ~ 48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2018.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田明輝, 山本成郎, 梅北邦彦, 高城一郎, 岡山昭彦.
2. 発表標題 グラム染色とLaser Micro Dissection法を組み合わせた核酸診断法.
3. 学会等名 第91回日本感染症学会総会・学術講演会.
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡山 昭彦  (Okayama Akihiko)  (70204047)	宮崎大学・医学部・教授   (17601)	
研究分担者	越本 知大  (Koshimoto Tomohiro)  (70295210)	宮崎大学・フロンティア科学総合研究センター・教授   (17601)	