

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15384

研究課題名（和文）デジタルPCRと生菌のみ検出するPCR法を組み合わせた新たな迅速薬剤感受性検査法

研究課題名（英文）A new rapid antimicrobial susceptibility test method combining digital PCR and viability-PCR

研究代表者

荻原 真二（OGIHARA, Shinji）

山梨大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：80790005

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、敗血症治療に貢献するため、短時間で血液検体に含まれている微量な微生物を検出できる手法を構築し、さらにviability-Digital PCR (dPCR)法による迅速薬剤感受性検査法の有用性を評価した。その結果、dPCRは5.6 CFU/mLのごく僅かな菌量まで検出可能であった。さらに模擬敗血症患者血液を作製し、抗菌薬暴露viability-dPCRによるダイレクト薬剤感受性検査法は、30分の抗菌薬暴露で従来法と同じ薬剤感受性結果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症診療は、早期診断及び適正な抗菌薬治療が重要である。特に血液中に微生物が入り込み感染症を引き起こす敗血症では、治療を間違えると死に至ることもある。現在の敗血症における検査法では、患者血液を採取して適正な抗菌薬が判明するまでに3日間にかかる。そこで、本研究では敗血症患者血液から直接微生物を見つけ出し、薬剤感受性検査を行う手法を構築した。

研究成果の概要（英文）：In this study, to contribute to the treatment of sepsis, we constructed a method that can detect a small number of bacteria contained in a blood sample in a short time, and evaluated the usefulness of a rapid antimicrobial susceptibility test using viability- Digital PCR (dPCR). As a result, dPCR was able to detect even a very small number of bacteria of 5.6 CFU/mL. Furthermore, the direct rapid antimicrobial susceptibility test by viability-dPCR was performed on the blood of simulated sepsis patients. The direct rapid antimicrobial susceptibility test result as the conventional method was shown after 30 minutes of antimicrobial exposure.

研究分野：臨床微生物検査学

キーワード：デジタルPCR viability-PCR 薬剤感受性検査

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染症治療では診断と治療の遅れが治療の失敗につながり、特に重症感染症である敗血症性ショックでは治療開始が 24 時間遅れると致死率が 90%を超える。また多様な多剤耐性菌が世界中に蔓延しつつあり、初期治療の抗菌薬選択が難しくなっている。そのため耐性菌の増加を抑えるべく、本邦では薬剤耐性対策アクションプランが発表され、抗菌薬の使用を最小限にする方向性が定められた。これらのことから感染症診断及び治療に対する迅速な薬剤感受性検査の重要性がこれまで以上に増している。

現行法では検体提出から原因微生物検出と適切な抗菌薬が決定されるまでに 3 日以上かかる。血液検体からの直接遺伝子検査でも、敗血症患者由来の血液に含まれる菌数は 1-10 CFU/mL とごく微量であるため、従来の定量 PCR では感度が乏しく検出することは困難である。遺伝子検査による薬剤感受性検査も死菌由来の遺伝子を検出してしまうため、生菌及び死菌の区別ができず効果のある抗菌薬の判定ができない。

2. 研究の目的

そこで我々は、抗菌薬暴露による生菌・死菌を区別できる viability PCR 法と、血液中の僅かな微生物を正確に検出できる dPCR 法を組み合わせた迅速起炎菌検出法および迅速薬剤感受性検査法を考案した。

本研究は、短時間で血液検体に含まれている微量な微生物を定量検出できる手法を構築し、さらに viability-dPCR 法による迅速薬剤感受性検査法の有用性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 菌数定量検出法の構築

single copy gene をターゲットとするグラム陽性菌のユニバーサルプライマープライマーブロープを作製した。さらに属名の異なる 3 種のグラム陽性菌の合成遺伝子も作製した。それぞれの合成遺伝子を用いて、希釈直線性を評価した。また、3 種のグラム陽性菌の A 遺伝子の合成遺伝子と増幅されないグラム陰性菌のゲノムを用いた混和測定を行い、ゲノム存在下でも合成 DNA コピー数の影響を確認した。

(2) viability-dPCR 法による迅速薬剤感受性検査法

1. 試料

菌株は *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 を用いた。菌株は、バイタルメディア羊血液寒天培地(極東製薬)を使用し、35℃、好気培養条件下で 18-24 時間培養を行ったコロニーを使用した。菌液作製は、*S. aureus* ATCC 29213 を Phosphate-buffered saline (PBS) に懸濁しマックファーランド 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) に調整した。菌液を 10 倍希釈系列に作成し、推定 1-5, 1-50, 1-500 CFU/mL になるように血液に添加し、核酸抽出及び PCR を行い、最小検出感度を確認した。同時に培養法を用いて、後日 CFU の決定を行った。

2. 迅速薬剤感受性検査法

始めに、*S. aureus* ATCC 29213 に対する Levofloxacin の最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentrations : MIC) を確認した。迅速薬剤感受性検査は *S. aureus* ATCC 29213 の推定 1-500 CFU/mL とした模擬敗血症患者血液 10mL を用いて、抗菌薬もしくは PCR grade water (無抗菌薬) を加え、37℃ で指定の時間インキュベートした。その後、PMA 処理、核酸抽出及び dPCR と Real-time PCR を実施した。

サンプルに含まれる抗菌薬濃度は低濃度 (0.03 µg/mL)、中濃度 (2.0 µg/mL)、高濃度 (32 µg/mL) の 3 濃度とし、抗菌薬暴露時間は 30 分、1 時間、2 時間とした。

3. 統計分析

有意差はダネット検定を行い、 $p > 0.05$ を有意水準とした。

4. 研究成果

(1) 菌数定量検出法の構築

作製したプライマーブロープと各グラム陽性菌の合成遺伝子においてデジタル PCR での定量核酸増幅が確認でき、希釈直線性も優れていた。ゲノム存在下でも合成 DNA のコピー数に影響はなかった。

(2) viability-dPCR 法による迅速薬剤感受性検査法

1. 最小検出感度

血液に含まれる *S. aureus* ATCC 29213 は 5.6 CFU/mL まで陽性シグナルを検出できた。PCR grade water による陰性試験 (10 サンプル) では全て陰性であった。敗血症患者の血液中には 1-10 CFU/mL の微生物が存在することから、本手法は敗血症原因菌を検出するための十分な感度であったと考える。

2. viability-dPCR による迅速薬剤感受性検査法

S. aureus ATCC 29213 に対する Levofloxacin の最小発育阻止濃度は 0.5 µg/mL であったことから、0.03 µg/mL は抗菌薬の影響を受けず、2.0, 32 µg/mL は抗菌薬効果を発揮する。

Real-Time PCR は、2 時間の抗菌薬暴露では、PMA 添加、非添加ともに 2.0, 32 µg/mL で有意に Ct 値の延長が認められた。1 時間の抗菌薬暴露では、PMA 添加のみで 2.0, 32 µg/mL で有意に Ct 値の延長が認められた。30 分の抗菌薬暴露では、PMA 添加のみで高濃度の抗菌薬暴

露で有意な Ct 値の延長が認められたものの、0.03, 2.0 $\mu\text{g/mL}$ では有意な Ct 値の延長は認められなかった。従来の定量 PCR 法を用いた viability Real-Time PCR は、1 時間以上の抗菌薬暴露で薬剤感受性検査が可能であることを示唆した。一方で、30 分の短時間の抗菌薬暴露時間では、詳細な薬剤感受性判定はできなかった。

dPCR は、2 時間の抗菌薬暴露では、PMA 添加、非添加ともに 2.0, 32 $\mu\text{g/mL}$ で有意に陽性シグナルの減少が認められた。30 分, 1 時間の抗菌薬暴露では、PMA 添加のみで 2.0, 32 $\mu\text{g/mL}$ で有意に陽性シグナルの減少が認められた。dPCR は陽性シグナルを精度高く検出できる dPCR の特性を用いたことで微量な抗菌薬効果を検出できたと考えた。かし、用いた菌量は 1-500 CFU/mL であったため、更なる微量な菌量での迅速薬剤感受性検査法の評価が必要であると考ええる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----