

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09402

研究課題名（和文）敗血症における原因菌の迅速同定技術の開発

研究課題名（英文）Development of rapid identification technique for pathogenic bacteria causing sepsis

研究代表者

川井 廉之（Kawai, Yasuyuki）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90445073

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：敗血症の主な原因菌である23菌種をターゲットとし、同時にヒトDNAとの非特異的反応を排除したオリジナルプライマーをデザインした。当初、グラム陽性菌の検出に課題があったが、デザインの見直しを繰り返し、In silico analysisによって各菌種の増幅が可能であることを確認した。また、ヒトDNAとの非特異的増幅反応が抑制できることを確認した。

本プライマーを用いて、敗血症血液サンプルから血液培養検査で陽性となったサンプルの解析を進めている。臨床上問題となるグラム陰性、陽性菌のいずれも増幅し検出が可能であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、敗血症の血液検体から原因菌を選択的に増幅するために、広い範囲の細菌を増幅が可能かつ、サンプル中に大量に含まれるヒトDNAとの非特異的増幅の排除するプライマーデザインとPCR条件の確立を行った。これらの成果によって敗血症血液検体から、これまで検査時間短縮のボトルネックとなる血液培養による増菌の過程を経ずに、直接細菌DNAを増幅可能となった。

研究成果の概要（英文）：We have designed unique primers targeting 23 bacterial species, which are the major causes of sepsis, while eliminating non-specific reactions with human DNA. Initially, we encountered a problem in detecting gram-positive bacteria, but after numerous revisions to the design and in silico analysis, we confirmed that each bacterial species could be amplified. We also verified that non-specific amplification reactions with human DNA could be suppressed.

Now, using these primers, we are analyzing samples taken from septicemic blood that tested positive in blood culture tests. We have discovered that both gram-negative and gram-positive bacteria, which pose significant clinical challenges, can be amplified and detected.

研究分野：救急集中治療

キーワード：敗血症 16SrRNA 迅速診断

1. 研究開始当初の背景

敗血症は死亡率が 30%と高く早期治療介入が重要である。近年、予後の改善を目的とした治療バンドルが提案されているが、その中でも有効な抗生剤を迅速に投与することが特に重要である。しかし現在、原因菌を同定するために行われている血液培養検査では 24 時間以上の時間を必要とする。また、近年臨床現場に導入された Multiplex PCR 法も、検査前の前処理に血液培養による増菌が必要であり迅速性が十分ではない。このため、臨床現場では広域抗菌薬が使用されるが薬剤耐性菌の発生するリスクが近年問題となっている。

2. 研究の目的

敗血症の血液試料中には少数の細菌 DNA と大量のヒト白血球 DNA が存在するため、既存のユニバーサルプライマーを用いた PCR 法では非特異的増幅反応のため原因菌同定が困難である。このため本研究では、非特異的増幅反応を除去し、迅速に血中の細菌を同定することを目的として次の研究を行う。

- (1) 敗血症モデルを用いた最も効率的なヒト白血球 DNA の除去方法の確立。
- (2) ヒト白血球 DNA に対する非特異的反応が無く、細菌 16SrRNA 遺伝子に特異的且つ高感度な新規ユニバーサルプライマーの設計と検証。In silico analysis で検証。
- (3) 上記技術を用いて臨床検体に対して原因菌の同定を行い、血液培養検査結果と比較する。

3. 研究の方法

(1) 市販の人全血に対して、事前に細菌には影響しない濃度の試薬による溶血処理と洗浄を加えることで、サンプル中のヒト白血球由来と考えられる DNA 濃度を 1/100 程度まで有意に減少させることができることが確認できた (Fig. 1)。

(2) ターゲット配列を大腸菌 J01859.1 の 16SrRNA とし設計したプライマー候補の中から、敗血症の原因菌として重要な 23 菌種との相同性に基づいて選択した。また、ヒト DNA との非特異的反応を排除するように候補を選択した。

最終的に選ばれたプライマーについて、Biopython のライブラリを用いて In silico analysis をを行い、対象 23 菌種について、増幅が可能であることを確認した (Fig. 2)。

またヒト DNA に対する非特異的反応が、細菌 DNA の増幅が得られる PCR 条件下に起こらないことを電気泳動で確認した (Fig. 3)。

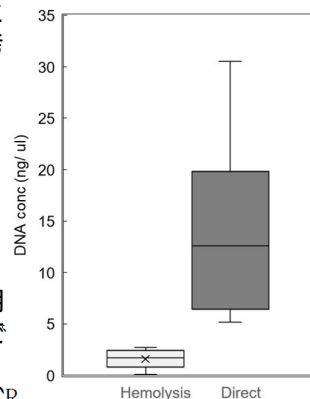


Figure 1: 溶血処理の有無による DNA 濃度の比較。

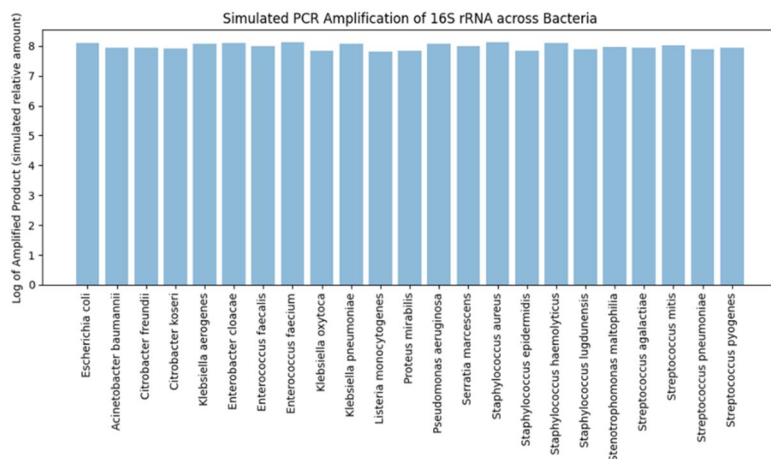


Figure 2: 敗血症の代表菌種に対して本研究でデザインしたプライマーによる in silico PCR 結果。

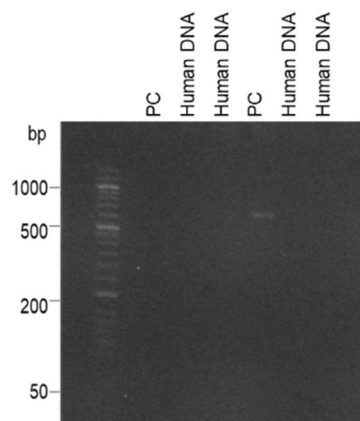


Figure 3: Human DNA に対して非特異的バンドの形成は見られない。

(3) 溶血処理を行った敗血症血液サンプルに対して、市販のキットを用いた DNA 抽出処理を行い、血液培養で陽性となったサンプルについて PCR を行った。得られた PCR 産物を外注のシーケンス解析サービスを利用してシーケンス解析を行い、得られた配列をアセンブルし、BLAST 検索によってグラム陽性菌、陰性菌の両者を同定可能であることを確認した。

ただし、血液培養結果は、常にコンタミネーションと原因菌の鑑別が問題となる。このため、臨床に応用するために、本研究法で得られた結果を解釈する方法の検証が追加が必要となっている。

4 . 研究成果

本研究では、敗血症の血液検体から原因菌を選択的に増幅するために、広い範囲の細菌を増幅が可能かつ、サンプル中に大量に含まれるヒト DNA との非特異的増幅の排除するプライマーデザインと PCR 条件の確立を行った。

これらの成果は、敗血症血液検体から、これまで検査時間短縮のボトルネックとなっていた血液培養による増菌の過程を経ずに、直接細菌 DNA の増幅が可能であることを確認できたことである。現在、高速化が進んでいる PCR 装置、シーケンス解析装置の迅速性を活用するための重要な基盤技術と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川井廉之
2. 発表標題 PCRを用いた敗血症原因菌の同定検査条件の最適化による検出率改善の試み
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川井廉之、中山章文、古谷俊介、永井秀典
2. 発表標題 Step-downPCR法を用いた16S- rRNA遺伝子検出法の検討
3. 学会等名 第32回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2021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	中山 章文 (Nakayama Akifumi) (70536721)	岐阜医療科学大学・保健科学部・教授 (33708)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------