

機関番号：3 2 4 0 9

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：2 1 7 9 0 7 8 4

研究課題名 (和文)

標準化半定量 Real time PCR を用いた呼吸器感染症の包括的迅速診断法

研究課題名 (英文)

Detection of the pneumonic pathogen by the real-Time PCR-Based Diagnostic Test using cell number ratio of pathogen to inflammatory cells in the respiratory tract secretions

研究代表者

平間 崇 (HIRAMA TAKASHI)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：8 0 5 1 0 3 3 8

研究成果の概要 (和文):

Commensal organism (無症候で気道に存在しうる病原体、いわゆる常在菌や正常細菌叢のこと) は肺炎の原因微生物(起炎菌)の大半を占める。HIRA-TAN (Human cell controlled Identification of Respiratory Agent from 痰)はReal-time PCRを用いた呼吸器感染症の包括的迅速診断法であり、Commensal organismを治療対象(起炎菌)と非治療対象(定着菌)とにカットオフ値を用いて鑑別することに成功した。またNon-commensal organism (通常は気道に存在せず、検出だけで起炎菌と確定できる病原体)にもあわせてPCRを実施することで、肺炎をおこすほとんどの病原体にたいして包括的検索ができる検査となりえた。我々は、臨床試験を実施し、HIRA-TANがCommensal organismとNon-commensal organismにたいして高い検出力と診断力を有していることを証明できた。

研究成果の概要 (英文):

Commensal organisms are frequent causes of pneumonia. However, the detection of these organisms in the airway does not mean that they are the causative pathogens. The HIRA-TAN is a real-time PCR-based system which has the ability to identify the pathogens that should be therapeutically targeted among the commensal organisms detected in the sputum. We successfully developed the cutoff value, which differentiates the therapeutic targets and Non-therapeutic target even when it is detected by PCR. The HIRA-TAN also targets the pathogenic non-commensal organisms, making itself a comprehensive test for the identification of the pathogens of pneumonia. We employed a prospective study to investigate the performance of the HIRA-TAN. We concluded that the HIRA-TAN is a sensitive method to identify the causative organism in pneumonia and provide valuable information to choose an appropriate treatment for the pneumonic patient.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成 22 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：非閉塞性肺疾患癌，肺線維症，呼吸器感染症，HIRA-TAN

## 1. 研究開始当初の背景

肺炎の原因微生物は、実はわかっているようで不明な点が多く、迅速検査法もインフルエンザウイルスや肺炎球菌などの一部の微生物にしかいないため、約半数の肺炎患者は原因微生物が不明なまま治療をうけている。日常診療の原因微生物の同定法は、肺炎患者の喀痰を培地に塗り込み数日後に育成した微生物を同定する方法である。これでは診断まで時間を要すること、培養できない微生物を同定できないこと、手技が煩雑であるにもかかわらず、これらは未解決である。現在では、高価・強力・広域スペクトルの抗菌薬が普及しているため、治療に難渋する肺炎は昔から比べると減少したものの、そのために耐性菌の出現、医療費の高騰をまねき、またそれら抗菌薬で治療できないものも存在するため、肺炎は今なお本邦の死亡原因4位のままである。

## 2. 研究の目的

PCR等の分子生物学的手法は“病原体を検出する”ことにかけては極めて有用な検査であるが、PCR診断は普及していない。それは、肺炎の多くが *S. pneumoniae* や *P. aeruginosa* のような“commensal organism”（無症候で気道に存在しうる病原体、いわゆる常在菌や正常細菌叢のこと）を原因とするため、PCRで喀痰中に commensal organism が検出されたからといってそれを起炎菌と確定できないためである。そこで我々は、喀痰中のヒト細胞数と病原体細胞数の比を Real-time PCR で相対的定量することで、commensal organism を起炎菌として可能性の高い病原体（治療対象）と低い病原体（非治療対象）とにカットオフ値で分類できた（特許第 4665203 号，PCT/JP2009/053976）。また *M. pneumoniae* や *M. tuberculosis* のような“Non-commensal organism”（通常は気道に存在せず検出のみで原因微生物と確定できる病原体）もあわせて包括的に PCR を実施することで、市中肺炎でも院内肺炎でも治療対象となる複数の病原体に対して、4 時間以内で一度に原因微生物を同定できる迅速診断キット（HIRA-TAN; Human cell controlled Identification of Respiratory Agent from 痰）の開発に成功した（Table 1）。本研究の目的は、肺炎患者の喀痰に対して、PCR を用いた包括的検索を実施し、治療対象となる病原体を迅速に同定することである。

Table 1. HIRA-TAN の検出標的（標的遺伝子）

01 <i>Homo sapiens</i> (SFTPC), Internal Control.
02 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (lyt A), CO, CAP
03 <i>Haemophilus influenzae</i> (16S rRNA), CO, CAP
04 <i>Moraxella catarrhalis</i> (oopB), CO, CAP
05 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (16S rRNA), CO, HAP
06 <i>Klebsiella pneumoniae</i> (gapA), CO, HAP
07 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (23S rRNA), CO, HAP
08 <i>Acinetobacter baumannii</i> (OXA-24 like), CO, HAP
09 <i>Escherichia coli</i> (16S rRNA), CO, HAP
10 <i>Staphylococcus aureus</i> MSSA (femB), CO, HAP
11 <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (mecA), CO, HAP, DRRG
12 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (16S rRNA), NCO, CAP
13 <i>Chlamydia pneumoniae</i> (53KD antigen), NCO, CAP
14 <i>Chlamydia psittaci</i> (ompA), NCO, CAP
15 <i>Legionella pneumophila</i> (mip), NCO, CAP
16 <i>Legionella</i> spp. (16S rRNA), NCO, CAP
17 <i>Coxiella burnetii</i> (16S rRNA), NCO, C
18 <i>Bordetella pertussis</i> (BP-485), NCO, CAP
19 <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> (MPB64), NCO, CAP
20 <i>Mycobacterium intracellulare</i> (16-23S rRNA), NCO, CAP
21 <i>Mycobacterium avium</i> (16S rRNA), NCO, CAP
22 <i>Mycobacterium kansasii</i> (dnaJ), NCO, CAP
23 <i>Nocardia</i> spp. (16S rRNA), NCO, HAP
24 <i>Pneumocystis jirovecii</i> (5S rRNA), NCO, HAP
25 Metallo-beta-lactamase (IMP), DRRG
26 Metallo-beta-lactamase (VIM), DRRG
27 Influenza virus A (M gene), NCO, CAP
28 Influenza virus B (NP gene), NCO, CAP
29 RS virus (F gene), NCO, CAP
30 Human metapneumovirus (N gene), NCO, CAP
31 <i>Aspergillus</i> spp. (ITS1), NCO, HAP
CO: 定着型病原体 NCO: 非定着病原体
DRRG: 薬剤耐性関連遺伝子
CAP: 市中肺炎の起炎病原体 HAP: 院内肺炎の起炎病原体

## 3. 研究の方法

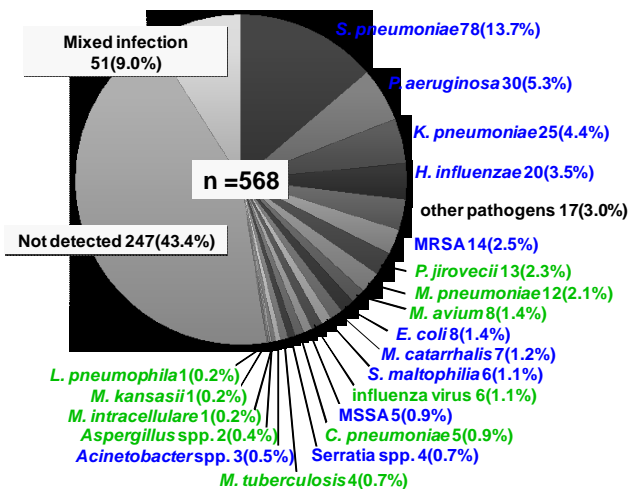
(1)臨床試験を実施して Commensal organism に設定した HIRA-TAN のカットオフ値に臨床的妥当性と再現性があるかを、既存の原因微生物同定方法（グラム染色、細菌培養検査、抗原検査）と比較検討する。Primary endpoint は *H. influenzae* と *P. aeruginosa* のカットオフ値に関する検討、また連続登録した市中肺炎・院内肺炎の原因微生物の割合。Secondary endpoint は *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* のカットオフ値に関する検討である。症例選択基準として、18 歳以上の肺炎患者で、肺炎発症 48 時間以内に喀痰が採取でき、同時に喀痰でグラム染色と細菌培養検査が行なわれている患者。試験期間を 2 年間とし、参加 10 施設で合計 600 例の喀痰サンプルを採集した時点で収集終了とする（HINF study : UMIN 試験 ID 00001694）。

#### 4. 研究成果

(1)2009年2月3日から2010年10月14日にかけて、臨床試験参加9施設において、計568名の肺炎症例が登録された。

(2)そのうちHIRA-TANで原因微生物を同定できたものが349例(61.4%)、既存の診断方法で原因微生物を同定できたものが321例(56.4%)であった(Fig.1)。321例の内訳は、混合感染が51例(9.0%)、単一起炎菌として最も多く検出されたものは *S. pneumoniae* 78例(13.7%)、次いで *P. aeruginosa* 30例(5.3%)、*K. pneumoniae* 25例(4.4%)、*H. influenzae* 20例(3.5%)であった。発症場所別でみると、568名のうち市中肺炎 CAP 349例、医療ケア関連肺炎 HCAP 147例、院内肺炎 HAP 72例であり、おのおの原因微生物はCAP 198例(56.7%)、HCAP 78例(53.1%)、HAP 45例(62.5%)で診断された。多く検出された病原体はCAPでは *S. pneumoniae*、*H. influenzae*、HCAPでは *S. pneumoniae*、*P. aeruginosa*、HAPでは *P. aeruginosa*、*S. aureus*(MRSA)であった。

Figure 1 肺炎症例 n=568 における原因微生物の内訳



(3)Commensal Organism において、既存の原因微生物同定方法とHIRA-TANの同定方法(カットオフ値を用いる)を検証した。二項分布で95%信頼区間をもとめ、HIRA-TANの同定法と既存の同定法の割合は、*H. influenzae* 0.90 (26/30; 95% CI, 0.70-0.95) また *P. aeruginosa* 0.89 (40/45; 95% CI, 0.76-0.95) であった。ほかの病原体についても *K. pneumoniae* 0.72 (26/36; 95% CI, 0.55-0.84)、*S. pneumoniae* 0.84 (90/107; 95% CI, 0.81-0.90) であった。

(4)既存の同定方法と卑劣性のない診断力に

くわえ、迅速性、包括性、また医療費をおおはばに削減できる検査であることを証明できた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Hirama T, Hagiwara K, Kanazawa M. Tuberculosis screening programme using the QuantiFERON®-TB Gold test and chest computed tomography for healthcare workers accidentally exposed to patients with tuberculosis. *J Hosp Infect.* 2011;77(3):257-62.

平間崇, ほか. 埼玉県西部地区における2009/2010シーズンのインフルエンザ対策. *日本医事新報*. 日本医事新報 2011; 4526:60-66.

Miyazawa H, Tanaka T, Nagai Y, Hirama T, et al. Peptide nucleic acid-linked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based detection test for gefitinib-refractory T790M epidermal growth factor receptor mutation. *Cancer Sci.* 2008;99(3):595-600.

[学会発表](計12件)

平間崇「ヒト細胞標準化 real-time PCR法を用いた呼吸器感染症の起炎病原体スクリーニング検査」第58回日本化学療法学会総会 2010年6月2-4日・長崎。

Takashi HIRAMA, et al. "Cell number ratio of pathogen to inflammatory cells discriminates the commensal organisms causing pneumonia." American Thoracic Society 2010 International Conference. 2010年5月14-19日. NEW ORLEANS, LA. USA.

平間崇, 他「ヒト細胞標準化 real-time PCR法を用いた呼吸器感染症の起炎病原体スクリーニング検査」第50回日本呼吸器学会学術講演会. 2010年4月23-25日. 京都。

平間崇, 他「呼吸器感染症 ヒト細胞標準化 real-time PCR法を用いた呼吸器感染症の起炎病原体スクリーニング検査」第84回日本感染症学会総会・学術講演会. 2010年4月23-25日. 京都。

平間崇「ヒト細胞標準化 real-time PCR法を用いた呼吸器感染症の起炎病原体スクリーニング検査」第21回日本臨床

微生物学会総会 . 2010 年 1 月 30 日 . 東京 .

Takashi HIRAMA, et al. "HIRA-TAN: A Real-time PCR-based Diagnostic Test for the Pathogens of Pneumonia." 47th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America. 2009 年 11 月 1 日. Philadelphia, PA, USA.

Takashi HIRAMA, et al. "HIRA-TAN: a real-time PCR-based diagnostic test for the pathogens of pneumonia." 2009 European Respiratory Society annual congress. 2009 年 9 月 12-15 日. Vienna, Austria.

平間 崇, 他「標準化半定量 Real-time PCR を用いた呼吸器感染症の起炎菌同定法 - HIRA-TAN の多施設前向き試験の結果報告 -」第 49 回 日本呼吸器学会学術講演会 2009 年 6 月 12-14 日 東京 .

平間崇, 他「標準化半定量 PCR 法を用いた呼吸器感染症の起炎菌同定法 - A multicenter prospective study for the validation -」第 57 回 日本化学療法学会総会 . 2009 年 6 月 3-5 日 . 東京 .

T.HIRAMA, et al. "Multicenter Prospective study for the validation of the Novel and Multiplex real-time PCR-based diagnostic test for 20 pneumonic pathogens in the Respiratory Tract Secretions." American Thoracic Society 2009 International Conference. 2009 年 5 月 15-20 日. San Diego, CA. USA.

平間 崇, 他「標準化半定量 Real-time PCR を用いた呼吸器感染症の起炎菌同定法 - 多施設前向き試験の結果報告 -」第 83 回日本感染症学会総会・学術講演会 . 2009 年 4 月 23-24 日 . 東京 .

平間 崇, 他「標準化半定量 Real-time PCR 法を用いての呼吸器感染症の起炎病原体診断」第 106 回 日本内科学会総会・講演会 . 2009 年 4 月 10-12 日 . 東京 .

#### 〔図書〕(計 5 件)

萩原弘一編. 診断と治療社『呼吸器研修ノート』(第 10 章 7 肺化膿症 p.428-430 平間崇). 2011 年

工藤翔二編. 日本臨牀『呼吸器症候群』(D-3.慢性壊死性肺アスペルギルス症 p.157-161 平間崇). 2008 年

前崎繁文編. 文光堂『感染症内科クリニカルスタンダード』(IV-1.インフルエンザ p.172-176 平間崇). 2008 年

永井厚志,吉澤靖之編. 中外医学社『EBM 呼吸器疾患の治療 2008-2009』(2.インフルエンザ p.13-28 平間崇). 2007 年

#### 〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称: 急性呼吸器感染症起炎病原体の鑑別方法

発明者: 平間崇, 萩原弘一

権利者: 平間崇, 萩原弘一

種類: 国内特許

番号: 特願 2008-052399

出願年月日: 2008/03/03

国内外の別: 日本

特許番号: 特許第 4665203 号

特許登録日: 2011/01/21

出願状況 (計 1 件)

名称: 急性呼吸器感染症起炎病原体の鑑別方法

発明者: 平間崇, 萩原弘一

権利者: 平間崇, 萩原弘一

種類: 国際特許

番号: PCT/JP2009/053976

出願年月日: 2009/03/03

国内外の別: 米国, ヨーロッパ特許 (英国・フランス・ドイツ), カナダ, インド, 中国, オーストラリア

科学技術振興機構の PCT 第 22 条(1)に基づく指定国移行の支援決定

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

平間 崇 (HIRAMA TAKASHI)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80510338