

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790918

研究課題名（和文）ヒト細胞標準化 Real-time PCR 法での肺炎起炎菌診断と網羅的病態解析

研究課題名（英文）Diagnosis and Analysis of Causative Agents in Pneumonia by the Real-time PCR-based system for the Rapid Identification (HIRA-TAN)

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

研究成果の概要（和文）:

Real-time PCR を基に，肺炎の治療対象となる病原体を迅速に同定できる包括的システム（HIRA-TAN 法）を使用して，治療対象を判定するまでの時間，検査にかかる費用，治療対象の同定率，また肺炎発症場所ごとの原因微生物の解析を前向き試験で検証した．既存の検査法と比較すると，HIRA-TAN 法は時間，費用，同定率いずれも良好な結果であった．

研究成果の概要（英文）:

We have developed the real-time PCR system, named HIRA-TAN, which was able to comprehensively identify the causative agents in pneumonia. The time required to report the HIRA-TAN result from the sample submitted, the total cost of a single assay and the diagnostic frequency of the HIRA-TAN were validated through the multi center prospective study. Compared to conventional methods (sputum examination and antigen tests), the HIRA-TAN system could be the preferable diagnostic tool with regard to the time required, the cost and overall performance. This could be the first innovative system that targets all pathogens capable of causing pneumonia en masse.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

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：HIRA-TAN，定着型病原体，非定着型病原体，肺炎，real-time PCR

1. 研究開始当初の背景

〔研究背景〕

肺炎の起炎菌は，わかっているようで実ははっきりしていないことが多く，現在普及している迅速診断法もインフルエンザウイルスや肺炎球菌などの一部の病原体にしかないので，肺炎患者の約半数は起炎菌が不明なまま治療をうけているのが現状である．日常診療における起炎菌の診断法は，肺炎患者の喀痰を培地に塗り込み，数日後に育成した病原体を同定する培養法である．培養法による診断では，時間を要すること，培養できない菌

もいること，手技が煩雑であること，検査実施者により結果の誤差が生じるなどの問題がある．そしてこれらの問題は依然未解決のままである(*File TM Lancet 2003*). 現在では，高価・強力・広域スペクトルの抗菌薬が普及したため，治療に難渋する肺炎は昔から比べると減少はしたものの，その乱用により耐性菌の出現，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．現在では，肺炎は本邦の死亡原因 3 位になっている．

〔問題点〕

病原体検出において PCR などの分子生物学的手法は有用であるが、呼吸器感染症領域では普及していない。それは、検出能力が高い PCR では、肺炎球菌や緑膿菌などのような定着型病原体（無症候で気道に存在しうる病原体、すなわち常在菌）も検出されてしまい、起炎菌と確定できないためである。現在臨床応用されている PCR は、マイコプラズマや結核菌のような非定着病原体（健常者からは検出されず、検出されれば起炎菌と確定できる病原体）に対してのみである。臨床的に問題となる重症市中肺炎や院内肺炎の起炎菌は、定着型病原体によるものがほとんどである。

〔これまでの研究〕

そこで我々は、ヒト細胞と定着型病原体との細胞数比を Real-time PCR で測定し、肺炎をおこしている定着型病原体が有意に増殖しているかを判定できる技術を開発した（特許第 4665203 号取得，PCT/JP2009/053976 出願）。肺炎患者の喀痰から定着型病原体が Real-time PCR で検出された場合、治療対象（起炎菌）と非治療対象（常在菌）とに cutoff 値を用いて鑑別することに成功した（*Hirama T et al PLoS One 2011*）。また非定着病原体もあわせて包括的に Real-time PCR を実施することで、肺炎で治療対象となる 30 種類の病原体に対し、4 時間以内で一括に

図1. HIRA-TANの検出標的

01 Homo sapiens
02 Streptococcus pneumoniae
03 Haemophilus influenzae
04 Moraxella catarrhalis
05 Pseudomonas aeruginosa
06 Klebsiella pneumoniae
07 Stenotrophomonas maltophilia
08 Staphylococcus aureus, MSSA
09 Staphylococcus aureus, MRSA
10 Acinetobacter baumannii
11 Escherichia coli
12 Mycoplasma pneumoniae
13 Legionella pneumophila
14 Legionella spp.
15 Chlamydomphila pneumoniae
16 Chlamydomphila psittaci
17 Bordetella pertussis
18 Coxiella burnetii
19 Mycobacterium Tuberculosis
20 Mycobacterium intracellulare
21 Mycobacterium avium
22 Mycobacterium kansasii
23 Nocardia spp.
24 Pneumocystis jiroveci
25 Aspergillus spp.
26 Aspergillus fumigatus
27 metallo-beta-lactamase IMP
28 Adenovirus
29 Influenza virus A/B and H1/H3/H5/H7 [RT-PCR]
30 human metapneumovirus [RT-PCR]
31 RS virus [RF-PCR]

起炎菌同定ができる迅速診断キット HIRA-TAN: Human cell-controlled Identification of the Respiratory Agent from TAN (痰)を開発した(図1. HIRA-TAN 検出標的 <http://hira-tan.com>)。そして HIRA-TAN の臨床的妥当性と再現性を臨床試験によって検証し、本発明の有用性を証明してきた(UMIN 試験 ID 000001694)。HIRA-TAN では、定着型病原体は cutoff 値を用いることで既存の診断方法とおなじ診断能力にくわえ、非定着型病原体を網羅的に検出できる診断力を兼ね備えた迅速診断検査であることが証明してきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺炎の診断早期に起炎菌を確定し、適切な抗菌薬治療を患者に提供できる技術を開発することである。

〔主要アウトカム評価項目〕

- (1) HIRA-TAN 法と既存の検査法の各々における検体提出から結果報告までの時間(すなわち経験的治療から確定的治療へ移行するまでの時間)

〔副次アウトカム評価項目〕

- (1) HIRA-TAN 法と既存の検査法における起炎菌を診断するために要した費用
- (2) HIRA-TAN 法の治療対象の同定率と既存の検査法による起炎菌の同定率
- (3) 肺炎発症別の治療対象の同定率と解析

3. 研究の方法

埼玉県内にある臨床試験参加施設を受診した肺炎患者の連続登録を行う。18 歳以上の肺炎患者で、以下の 6 項目を実施したものを登録する。

1. 喀痰検査(塗抹、培養)[特殊培地や抗酸菌検査は必要に応じて実施]
2. 肺炎球菌尿中抗原を実施
3. インフルエンザ抗原検査[インフルエンザ流行時または疑われる場合]
4. レジオネラ尿中抗原[入院症例のみ]
5. 血液培養検査[入院症例のみ]
6. 臨床試験に参加する同意を書面で提出

試験名: 成人肺炎における HIRA-TAN の有用性と経験的治療から確定的治療までの時間の検証する臨床試験 (UMIN 試験 ID 000006863) (埼玉医科大学 IRB: 申請番号 11-047)

4. 研究成果

臨床試験参加施設において、肺炎症例の連続

登録を行った。

〔主要アウトカム評価項目〕

HIRA-TAN 法と既存の検査法の各々における検体提出から結果報告までの時間

HIRA-TAN は自動調整装置を用いると(科学技術振興機構 A-STEP FS シーズ顕在化タイプ 肺炎の早期確定的治療を実現する原因微生物網羅的迅速判定システムの開発), 検体を受け付けてから 3 時間で治療対象を判定できる。しかし, 週末や夜間に検体の提出もあり, 観察期間内の平均は 8 時間であった。一方, 喀痰検査(培養法) は, 観察期間内の平均は 78 時間であった。

〔副次アウトカム評価項目〕

HIRA-TAN 法と既存の検査法における起炎菌を診断するために要した費用

HIRA-TAN は図 1 に示す検出標的に対して PCR を実施すると 1 回に 5,000 円を要する。一方, 観察期間内に行われた既存の検査法は, 平均すると一人当たり 21,000 円を要した(検査費用は保険点数から求めた)。入院患者のほうが外来患者より, また重症であるほど実施された検査項目が多く, 検査コストを要する。

HIRA-TAN 法の治療対象の同定率と既存の検査法による起炎菌の同定率

過去の臨床試験と同様, HIRA-TAN による治療対象の同定率は 60%, 既存の検査法による起炎菌の同定率は 50%であった。HIRA-TAN で同定できなかった 40%のうち, 既存の検査法で診断できたものが 2%あった。HIRA-TAN は検出標的に含まれていない病原体は検出できない。これらは本研究の次の課題のひとつである。

肺炎発症別の治療対象の同定率と解析

肺炎の治療対象の同定率は, 市中肺炎が 40%, 医療介護関連肺炎が 40%, 院内肺炎が 20%であった。市中肺炎では, 肺炎球菌, インフルエンザ菌が治療対象の主要な病原体であった。医療介護関連肺炎では, クレブシエラと緑膿菌が, 院内肺炎では緑膿菌とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌が主要な病原体であった。医療介護関連肺炎では, 高齢者が大半を占め, 高齢者の多くは HIRA-TAN でも既存の検査法でも, 起炎菌を同定できないことが多いことがわかった。

〔本研究の新規性と今後の発展性〕

PCR 法などの分子生物学的検査はこれまで非定着病原体にたいしては非常に有用性が高く(とくにウイルス感染症), 過去に多くの研究者が網羅的 Real-time PCR 法を開発している(Tiveljung-L A et al J Med Virol

2009, Gröndahl B et al J Clin Microbiol 1999)。しかし, 肺炎の起炎菌の多くは定着型病原体であり, 臨床的重要性と頻度の高いこれらをスクリーニングできなければ, どんなにウイルス等に対して網羅的検索をかけても, 医療現場の需要に応えることができない。肺炎における治療対象(起炎菌)と非治療対象(常在菌)の鑑別。これは, 一見容易に思えながら, いまだ未解決の臨床的問題であり, 本発明はその問題を解決することができる唯一の診断法である。HIRA-TAN では, 臨床的頻度が高い定着病原体に PCR を実施し, 起炎菌を診断できる新規性がある。さらに上述したウイルスに限らず, 真菌などの日和見病原体を PCR リストに加えることで, 本来望まれるべき包括的な検査になりえる。今後も非定着病原体のリストに真菌やウイルスなどの検出標的を増やすことができ, ここに本研究の発展性がある。

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 2 件)

- (1) 川島 彬子, 平間 崇, 西原 冬美, 嶺崎 祥平, 萩原 弘一, 清水 禎彦, 金沢 實. インフルエンザウイルス A/H1N1 2009 肺炎の 1 剖検症例. 日本呼吸器学会雑誌, 2012; 1(1): 56.
- (2) Hirama T, Yamaguchi T, Miyazawa H, Tanaka T, Hashikita G, et al. Prediction of the Pathogens that are the Cause of Pneumonia by the Battlefield Hypothesis. PLoS One 2011; 6(9): e24474. 査読有. 10.1371/journal.pone.0024474

〔学会発表〕(計 16 件)

- (1) 杉山 亜斗, 平間 崇, 川島 彬子, 永田 真, 萩原 弘一, 金沢 實. 肺血栓内膜摘除術を施行した慢性血栓性肺高血圧症の 1 例. 第 590 回日本内科学会関東地方会. 2012 年 09 月 08 日. 日内会館(東京)。
- (2) 川名 宏, 増本 愛, 平間 崇, 永田 真, 萩原 弘一, 金沢 實. 非免疫不全患者に発症した肺と皮膚ノカルジア症の 1 例. 第 590 回日本内科学会関東地方会. 2012 年 09 月 08 日. 日内会館(東京)。
- (3) 淵上 彰, 平間 崇, 川島 彬子, 永田 真, 萩原 弘一, 金沢 實. AIDS 関連ニューモシスチス肺炎と鑑別が困難であった肺カポジ肉腫の 1 例. 第 589 回日本内科学会関東地方会. 2012 年 07 月 15

- 日. 日内会館 (東京).
- (4) 鷹野 雅史, 川島 彬子, 平間 崇, 永田 真, 萩原 弘一, 金沢 實. Cyclophosphamid 投与で救命できた関節リウマチに合併した肺胞出血の症例. 第 589 回日本内科学会関東地方会. 2012 年 07 月 15 日. 日内会館 (東京).
- (5) T. Hirama, S. Minezaki, K. Hagiwara, M. Kanazawa. HIRA-TAN, A Real-Time PCR-Based Diagnostic Test In The Respiratory Tract Secretions, Identifies The Pathogens Therapeutically Targeted In Pneumonia. American Thracic Society 2012 International Conference. 2012 年 05 月 22 日. San Francisco, CA, USA.
- (6) 平間 崇, 嶺崎 祥平, 塩野 文子, 金澤 實. Locked Nucleic Acids-PCR 法を用いた MAC の簡易クラリスロマイシン耐性遺伝子の同定法の確立. 第 87 回日本結核病学会総会. 2012 年 05 月 11 日. 広島国際会議場 (広島).
- (7) 平間 崇, 嶺崎 祥平, 萩原 弘一, 金沢 実. 埼玉県西部地区における肺炎症例の起炎病原体について (2) HIRA-TAN を用いた検討. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 2012 年 04 月 25 日. 長崎ブリックホール (長崎).
- (8) 平間 崇, 嶺崎 祥平, 萩原 弘一, 金沢 実. 埼玉県西部地区における肺炎症例の起炎病原体について (1) 既存の診断方法を用いた検討. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 2012 年 04 月 25 日. 長崎ブリックホール (長崎).
- (9) 平間 崇, 萩原 弘一, 金沢 実. Locked Nucleic Acids-PCR 法を用いた MAC の簡易クラリスロマイシン耐性遺伝子の同定法. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会. 2012 年 04 月 21 日. 神戸コンベンションセンター (兵庫).
- (10) 井上 智恵, 平間 崇, 川島 彬子, 他. 多発性浸潤影・気胸を呈した肺吸虫症の 1 例. 第 586 回日本内科学会関東地方会. 2012 年 3 月 10 日. 日内会館 (東京).
- (11) Hirama Takashi, Minoru Kanazawa. Tuberculosis screening program using the QuantiFERON-TB Gold test and chest computed tomography for healthcare workers accidentally exposed to patients with tuberculosis. European Respiratory Society Annual Congress 2011. 2011 年 9 月 26 日. アムステルダム (オランダ)
- (12) 高杉 綾香, 平間 崇, 三尾 友彦, 他. 特発性血小板性紫斑病発症を契機に診

断された若年特発性肺動脈性高血圧症の 1 例. 第 581 回日本内科学会関東地方会. 2011 年 9 月 10 日. 日内会館 (東京).

- (13) 平間 崇, 三尾 友彦, 嶺崎 祥平, 塩野 文子, 山口剛史. 埼玉県西部地区を中心とした(市中/医療ケア関連/院内発症)肺炎の原因微生物について. 第 59 回日本化学療法学会総会. 2011 年 6 月 24 日. 札幌コンベンションセンター (札幌).
- (14) 三尾 友彦, 平間 崇, 嶺崎 祥平, 塩野 文子, 山口剛史. 健常者に発症した緑膿菌性膿胸. 第 59 回日本化学療法学会総会. 2011 年 6 月 24 日. 札幌コンベンションセンター (札幌).
- (15) 嶺崎 祥平, 平間 崇, 三尾 友彦, 塩野 文子, 山口剛史. 肺癌患者における非発熱性好中球減少時の肺炎原因微生物における検討. 第 59 回日本化学療法学会総会. 2011 年 6 月 24 日. 札幌コンベンションセンター (札幌).
- (16) 平間 崇, 金澤 實. QFT と胸部 CT を活用した医療従事者の結核接触者健診. 第 86 回日本結核病学会総会. 2011 年 6 月 2 日. 日本教育会館 (東京).

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 平間 崇, 萩原 弘一. 文光堂. 実地医家のための 臨床検査のすすめかた・評価のしかた「呼吸器感染症」. 2012 年. 3 ページ.
- (2) 平間 崇, 萩原 弘一. 文光堂. 実地医家のための 臨床検査のすすめかた・評価のしかた「肺血栓塞栓症」. 2012 年. 3 ページ.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)
 名称: METHOD OF DISTINGUISHING INFLAMMATORY PATHOGEN CAUSING ACUTE RESPIRATORY INFECTION
 発明者: 平間 崇, 萩原 弘一
 権利者: 平間 崇, 萩原 弘一
 種類: PCT/JP2009/053976
 番号: PWO09110473
 出願年月日: 2009 年 3 月 3 日
 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

○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：特許
番号：特許第 4665203 号
取得年月日：2011 年 01 月 21 日
国内外の別：国内特許

〔その他〕

ホームページ

呼吸器感染症の研究室

<http://hira-tan.com>

受賞歴

日本呼吸器学会 日本呼吸器学会奨励賞. 受賞者 平間 崇. ヒト細胞標準化半定量 real-time PCR の開発と臨床応用. 2012 年 4 月 21 日. 神戸コンベンションセンター（兵庫）.

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

(2)連携研究者

嶺崎 祥平 (MINEZAKI SHOHEI)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：90648007

(3)協力研究者

江頭 博 (EGASHIRA HIROSHI)

埼玉医科大学・医学部・実験助手