

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659779

研究課題名(和文) DNA分析による創傷内細菌の迅速同定法の開発

研究課題名(英文) Development of the rapid characterization method of the bacteria in a wound by DNA analysis

研究代表者

館 正弘 (TACHI, Masahiro)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50312004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：軟部組織感染症を生じる起因菌の培養結果は、しばしば不正確であり、菌の同定までに数日の時間がかかることが問題となる。菌の同定を迅速に行うことは、患者の救命にもつながり、その意義は大きい。そこで組織からDNAを抽出し、迅速かつ正確な細菌同定を目指すことを目的とし、研究を行った。まず、DNAの抽出は、キットを使うことにより、格段に早く抽出することが可能となった。また、検査部との連携により迅速同定を行う体制の一步となる研究成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The culture results of samples from soft tissues infections are often incorrect, and the identification of bacteria takes few days. To develop the rapid and correct bacterial characterization, 16S rRNA analysis were performed. We extracted bacterial DNA rapidly and identified bacterial 16S rRNA. To get more rapidly reports from central clinical laboratory, organization of laboratory system will be needed.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形成外科学

キーワード：外科 微生物 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性足病変に代表される軟部組織感染症に対しては、通常 empirical な広域抗生物質が選択され、数日後に得られる細菌培養の結果をみて抗生物質を絞るのが一般的である。しかしながら細菌培養の結果はしばしば不正確であり、バイオフィーム中の細菌はことに通常の寒天培地では増殖しにくい。また、嫌気性菌の同定には厳密な嫌気環境の必要があり、通常の培養方法では限界がある。この方法は医療費の無駄を生むばかりか、適切な抗生剤の選択には程遠い。また、近年メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)や基質拡張型 β-ラクタマーゼ産生菌(ESBL)など、耐性菌の割合が高くなっているため、細菌の迅速な同定は患者の救命にも直結している。

2. 研究の目的

臨床検体から DNA を抽出し、bacterial tag encoded FLX amplicon pyrissequencing によって細菌を同定する。MRSA や ESBL などの多剤耐性菌にターゲットとなる細菌を絞ったキット化、迅速化を図り、臨床検体に対する処方効率化を図る。

3. 研究の方法

(1) サンプル採取

糖尿病性皮膚潰瘍、褥瘡、慢性下腿潰瘍などの創面からデブリドマン時に得られる組織をホモジェナイズし、サンプルを-80 で保存する。

(2) DNA 抽出

ISOGEN(ニッポンジーン)、QIAamp® DNA Mini(QIAGEN)2つのDNA抽出方法を用い、それぞれのDNA回収量、回収時間について検討を行う。

(3) PCR 法と電気泳動

(2)で得られたDNAをPCR法で増幅する。具体的には27Fと519Rという2つのプライマーでバクテリアの16S rRNAをコード

している領域を増幅する。増幅したサンプルを電気泳動し、目的の領域が増幅されているか確認する。

4. 研究成果

(1) サンプル採取

サンプルは慢性皮膚潰瘍、外科的手術創部開放創において、明らかな炎症症状を伴う場合、あるいは膿汁を分泌している場合、また敗血症を伴う感染症の場合の創面あるいは骨髄のデブリドマン時に得られた組織を切除後急速に凍結し、-80 で保存した。検体は2年間で40例程度の解析を行った。

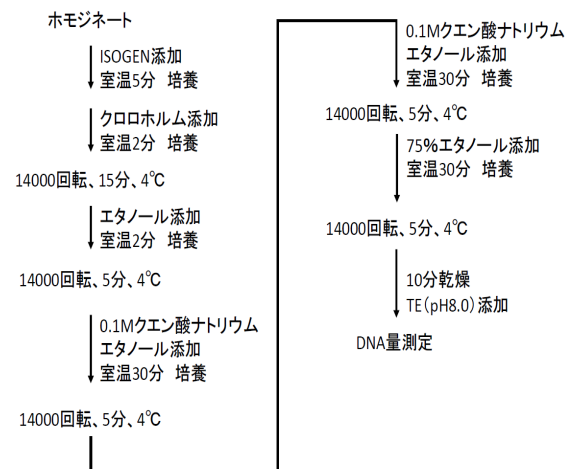


図1 ISOGENを用いたDNA抽出

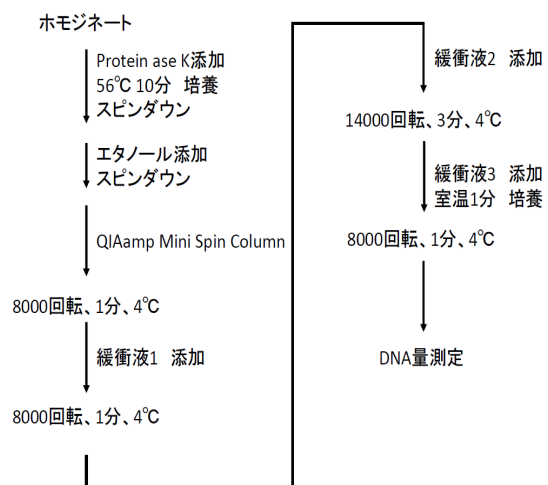


図2 QIAamp® DNA Miniを用いたDNA抽出

(2) DNA 抽出

採取したサンプルは DNA 抽出と同時に定法にのっとり寒天培地による旧来の細菌培養を検査室で実施した。通常の培養法で検出された細菌は、MRSA とセラチア、緑膿菌、バクテロイズであった。ISOGEN を用いての DNA 抽出 (図 1) には 3 時間程度の時間を要した。一方で、QIAamp® DNA Mini を用いた抽出法 (図 2) では 1 時間程度であり、ISOGEN と比較して、約 3 倍の効率での抽出が可能であった。通常の培養法で検出された細菌は、MRSA と以上の結果より、今後の DNA 抽出には QIAamp® DNA Mini を用いて行った。

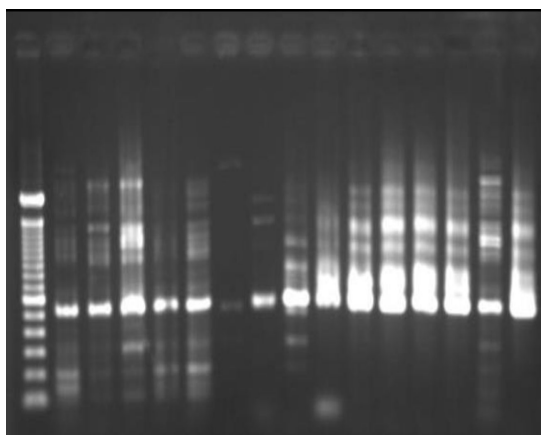


図 3 組織から抽出した DNA のバクテリアの 16S rRNA 領域を増幅した電気泳動写真

(3) PCR 法と電気泳動

DNA 濃度が 20 ng / μ l となるように調整し、抽出した DNA を 27F と 509R の 2 つのプライマーで細菌に固有の遺伝子領域である 16S rRNA をコードしている領域を増幅した (図 3)。シーケンス用に精製し、シーケンスを行った。これらの研究を東北大学病院検査部の協力を得て行った。現状の方法では、コストも多くかかること、更なる迅速化を図るため、今後の DNA 検査の迅速化に向けて、インフルエンザ、ノロウイルスや多剤耐性緑膿菌にも応用されているイムノクロマト法を用いた迅速かつ、簡便に検査を行えるように MRSA など耐性菌に特異的抗原の同定を

目指し、キット化を検討している。

迅速同定を行うためには、まずサンプルから DNA を抽出する必要があり、その後、PCR 法や次世代シーケンサーを用いて解析することにより、以前より迅速に菌を同定することが可能となった。しかし、DNA を抽出し、PCR 法で増幅するには、3~4 時間と時間がかかり、そこからシーケンスを行うと更に時間を消費する。そのため、より迅速に菌の同定を行うにはイムノクロマト法などが必要であるが、耐性菌に特異的抗原同定や、モノクローナル抗体を作成するのに時間がかかっている状態である。

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 3 件)

1. Kanno E, Kawakami K, Miyairi S, Tanno H, Otomaru H, Hatanaka A, Sato S, Ishii K, Hayashi D, Shibuya N, Imai Y, Gotoh N, Maruyama R, Tachi M Neutrophil-derived tumor necrosis factor- α contributes to acute wound healing promoted by N-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Dermatol Sci*. 70:130-138, 2013 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.01.004> 査読あり

2. Iizaka S, Sanada H, Matsui Y, Furue M, Tachibana T, Nakayama T, Sugama J, Furuta K, Tachi M, Tokunaga K, Miyachi Y Predictive validity of weekly monitoring of wound status using DESIGN-R score change for pressure ulcer healing: a multicenter prospective cohort study. *Wound Repair Regen*. 20:473-481, 2012 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1524-475X.2012.00778.x> 査読あり

3. Hayashi D, Kawakami K, Ito K, Ishii K, Tanno H, Kanno E, Maruyama R, Shimokawa H, Tachi M Low-energy extracorporeal shock wave therapy enhances skin wound healing in diabetic mice: A critical role of endothelial nitric oxide synthase. *Wound Repair Regen*. 20:887-895, 2012 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1524-475X.2012.00851.x> 査読あり

〔学会発表〕(計 4件)

1. 鈴木愛子, 菅野恵美, 川上和義, 宮入伸一,
丹野寛大, 石井恵子, 丸山良子, 館正弘

緑膿菌クオラムセンシング分子

N-butanoyl-L-homoserine lactone が創傷治
癒過程と創部炎症反応に与える影響

第24回日本生体防御学会

2013年7月10日~2013年7月12日, 熊本

2. 菅野恵美, 丹野寛大, 川上和義, 宮入伸一,
石井恵子, 丸山良子, 館正弘

緑膿菌クオラムセンシング分子

N-butanoyl-L-homoserine lactone が創傷治

癒過程と創部炎症反応に与える影響

第42回日本創傷治癒学会

2012年12月2日~2012年12月4日, 札幌

3. Kanno E, Kawakami K, Miyairi S,
Tanno H, Ishii K, Hayashi D, Maruyama R,
Tachi M

Skin wound healing promoted by a
quorum-sensing molecule,
N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone
from *Pseudomonas aeruginosa*.

4th Congress of the World Union of Wound
Healing Societies

2012年9月3日~2012年9月6日, 横浜

4. Tanno H, Kawakami K, Kanno E,
Hayashi D, Ishii K, Maruyama R, Tachi M
Role of invariant natural killer T cells in
skin wound healing.

4th Congress of the World Union of Wound
Healing Societies

2012年9月3日~2012年9月6日, 横浜

〔図書〕(計 2件)

1. 菅野恵美, 館正弘

創傷のすべて第 2 章感染症 2.慢性感染症
Critical colonization. 克誠堂出版 2012 年
256-257 査読なし

2. 菅野恵美, 館正弘

ナースのためのアドバンスド創傷ケア Part
アドバンスド創傷ケアの実際 2.実際編創
傷病態生理学:各論慢性創傷の病態学 照林
社 2012 年 135-141 査読なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.prs.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

館正弘 (TACHI MASAHIRO)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 50312004

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: