

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293238

研究課題名(和文) 先進医療を推進するための感染症迅速診断法の確立と診療介入

研究課題名(英文) Rapid diagnostic methods for infectious diseases

研究代表者

一山 智 (Ichiyama, Satoshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30223118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,600,000円

研究成果の概要(和文)：感染症診断のための検査法は日々進歩しており、遺伝子検査をはじめとした迅速診断法は日常診療でも応用されるようになった。しかし、感染症が重症化する免疫不全患者ほどさまざまな原因微生物を想定する必要があるにもかかわらず、多くの感染症で「なにを、どのような患者に検査すべきか」という、検査の標準化が遅れている。本研究では、確定診断が困難でかつ重症化が問題となる「A. Clostridium difficile 関連腸炎を代表とした院内下痢症B. 免疫不全者の肺炎C. 侵襲性真菌症」において、遺伝子検査法を含む迅速診断法を用いた検査のアルゴリズムを作成した。

研究成果の概要(英文)：Current development of molecular assay has enabled rapid diagnosis in various clinical fields including infectious diseases. However, despite the necessity to assume a variety of causative micro-organisms in infectious diseases of immunodeficient patients, standardization of diagnostic algorithms has been under development. In this study, we established new diagnostic algorithms for A. Clostridium difficile related enteritis, B. Pneumocystis pneumoniae, C. Invasive fungal infection using rapid diagnostic method including a new automated molecular assay, which could be applied in routine practice.

研究分野：感染症

キーワード：感染症 臨床検査

## 1. 研究開始当初の背景

感染症診断のための検査法は日々進歩しており、遺伝子検査をはじめとした迅速診断法は日常診療でも応用されるようになった。しかし、感染症が重症化する免疫不全患者ほどさまざまな原因微生物を想定する必要があるにもかかわらず、多くの感染症で「なにを、どのような患者に検査すべきか」という、検査の標準化が遅れている。本研究では、確定診断が困難かつ重症化が問題となる「A. *Clostridium difficile* 関連腸炎を代表とした院内下痢症 B. 免疫不全者の肺炎 C. 侵襲性真菌症」において、遺伝子検査法を含む迅速診断法を用いた検査のアルゴリズムを作成し、医療の質を向上させることを目的として研究を行った。

A. 京都大学医学部附属病院（京大病院）における定点調査では、当院の入院患者のうち、約5%の患者が何らかの原因で腸炎症状を呈していた。また、担癌患者は院内下痢症の発症率が高いことが知られている。（Polage CR et al, CID 2012 55）院内下痢症でもっとも頻度が高いのは *Clostridium difficile* 腸炎（CDI）であり、発症後は可能な限り抗生剤を終了すべきであっても、現在の検査の感度が低いこともあり抗生剤投与が継続されている状況がある。そこで、本研究では特に院内下痢症の発症が多い病棟において、院内下痢症の原因に関するプロスペクティブサーベイランスを行い、CDIの正確な発症率を調査するとともに、従来の検査法では診断が困難であったその他の院内下痢症の原因微生物の診断を行う。欧米では遺伝子検査を基本として CDI が診断されているが、本邦では EIA 法が広く用いられている。

B. *Pneumocystis jirovecii* 肺炎ならびに *Cytomegalovirus* 肺炎の迅速診断  
臓器移植や免疫抑制療法の進歩により非 HIV 感染者の免疫不全者が増加している。それに伴い、日和見感染症、特に肺炎が予後を規定する重要な因子となっている。その中でも PCP は、頻度や死亡率ともに高い疾患であるにもかかわらず、診断に必須の遺伝子検査が一般的に不可能かつ標準化がなされていないため確定診断が困難である。しかし、われわれの研究チームではすでにリアルタイム PCR を用いた PCP の迅速診断に関する研究を行ってきた（文献1、2）。PCP と共感染あるいは鑑別が必要な病態に CMV 肺炎があるが、同様に診断は困難であり、正確な発症率についても不明である。

C. 1-3 D グルカンならびに核酸 PCR

法を用いた侵襲性真菌症の早期診断  
1.3- D グルカン（BDG）は真菌の細胞壁構成成分であり、深在性真菌症の診断に有用である。しかしながら、BDG が陽性になる真菌感染症は複数あり、それぞれに特異的な治療が必要である。たとえば酵母様真菌であっても *Trichosporon* spp., と *Cryptococcus* spp., の治療薬は全く異なる。深在性真菌症でもっとも頻度が高いカンジダ血症は血液培養で診断するが、感度は100%ではなく、一定の割合で血液培養によって検出できないケースがある（文献3）。また、侵襲性アスペルギルス症におけるアスペルギルス抗原の位置づけも血液腫瘍以外では確立したものが無い。その一方で、BDG 陽性例の先制攻撃的治療のメリットは確立されたものはなく、BDG が偽陽性となる因子も多数報告されている。症例によっては偽陽性であるか真の陽性であるか鑑別が困難な場合があり、抗真菌薬投与をやむを得ず開始あるいは中止してしまう現状がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、遺伝子検査を中心とする迅速診断法を利用した、3種の感染症の診断アルゴリズムを確立し、その費用対効果を含む有用性を評価する。現在、研究室で使用されている自動核酸抽出装置はワークロードや職業感染のリスクを考慮すると実地臨床でも活用すべきツールであり、自動化を前提としたワークフローの評価を行う。

A. *Clostridium difficile* 関連腸炎の迅速診断  
全自動検査システムと従来から用いられている EIA 法を用いた臨床検査室における *Clostridium difficile* 腸炎の迅速診断アルゴリズムを確立する。

B. *Pneumocystis jirovecii* 肺炎ならびに *Cytomegalovirus* 肺炎の迅速診断  
全自動検査システムを用いた臨床検査室における PCP および CMV 肺炎の迅速診断法を確立する。免疫抑制患者の肺炎における PCP と CMV 肺炎の発症率、高リスク患者群の同定、早期の診療介入による予後の改善を目指す。

C. 1-3 D グルカンならびに核酸 PCR  
法を用いた侵襲性真菌症の早期診断  
BDG 検査例について、PCR 検査を用いた侵襲性真菌症の早期診断が可能であるかどうかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### A. *Clostridium difficile* 関連腸炎の迅速診断

京都大学医学部附属病院の担癌患者および移植患者病棟入院中で1日3回以上の水様便を呈した患者を対象として、PCRならびにEIA法を用いて病原体の検出を行う。

#### B. *Pneumocystis jirovecii* 肺炎ならびにCytomegalovirus 肺炎の迅速診断

京大病院においてPCPが疑われ、胸部画像診断で新規の陰影を呈した免疫抑制患者を対象として、*Pneumocystis* と *Cytomegalovirus* について全自動遺伝子検出装置 (BDMAX) を用いたリアルタイムPCR検出系の開発を行った。

#### C. 1 - 38D グルカンならびに核酸PCR法を用いた侵襲性真菌症の早期診断

京大病院において深在性真菌症が疑われBDGを提出された検体から、自動核酸抽出装置を利用してDNAを抽出し、真菌のユニバーサルプライマーを用いて真菌の検出ならびに同定を行いその診断的性能を評価した。

### 4. 研究成果

#### A. *Clostridium difficile* 関連腸炎の迅速診断

検討期間中にCDトキシン検査に提出された下痢便検体は308件であった。そのうち、いずれかの方法でCDトキシンが陽性と判明した件数は48件であった(陽性率15.6%)。C.DIFF QUIK CHEKでGDH抗原陽性かつ毒素陰性であった50例はToxinogenic cultureが追加され、さらに10例が毒素陽性となった。

一方で同じ50検体ではPCR法では22例がトキシン遺伝子陽性であった。

EIA法は簡便であるが、単回では感度は十分ではなく、Toxinogenic cultureを追加した場合は時間と労力が必要である。一方PCR法は感度が高く、自動化機器を用いることで時間と労力を節約することができる。費用面も考慮し、EIA法でGDH抗原のみ陽性となった例についてはPCR法を追加することで適切な診断に役立つものと考えられ、京大病院検査部でルーティン運用を開始できた。

#### B. *Pneumocystis jirovecii* 肺炎ならびにCytomegalovirus 肺炎の迅速診断

京大病院においてPCPが疑われ、胸部画像診断で新規の陰影を呈した免疫抑制患者285例を対象として新たに開発した自動化法の性能評価を行った。当該法は、対象患者の呼吸器検体を用いた検討で、下記表1, 2に示す通り既存法とほぼ同等の感度・特異度を有し、検出にかかる時間を約半分にすることが可能であった。PCPについては自動化法により早期診断・介入が可能となり、疾患予後の改善が期待された。Cytomegalovirus肺炎については、治療を行わず改善する例もありその診断的意義について更なる検討が必要と考えられた。

	自動化法 陽性	自動化法 陰性
従来法 陽性	170	16
従来法 陰性	30	69

表1 *Pneumocystis* PCRの性能評価

	自動化法 陽性	自動化法 陰性
従来法 陽性	250	12
従来法 陰性	18	5

表2 Cytomegalovirus PCRの性能評価

#### C. 1 - 38D グルカンならびに核酸PCR法を用いた侵襲性真菌症の早期診断

京大病院において深在性カンジダ症が確定し、BDG測定が行われた28例についてPCR・シーケンス法による同定を行った。BDG陰性患者においてもPCRにより検出が可能な場合があった。血液培養が陽性になるまで通常1日以上時間がかかるため、迅速かつ菌種同定が可能なPCR法がBDGよりも迅速診断と治療介入に有用な可能性が示された。

	BDG 陽性	BDG 陰性
PCR 陽性	23	2
PCR 陰性	1	2

表3 BDGとPCR法の比較

#### 引用文献

(1) Matsumura Y, Shindo Y, Iinuma Y, Yamamoto M, Nagao M, Ito Y, Takakura S, Hasegawa Y, Ichiyama S. Clinical characteristics of *Pneumocystis pneumonia* in non-HIV

patients and prognostic factors including microbiological genotypes. BMC Infect Dis. 2011 Mar 25;11:76

(2) Matsumura Y, Ito Y, Iinuma Y, Yasuma K, Yamamoto M, Matsushima A, Nagao M, Takakura S, Ichiyama S. Quantitative real-time PCR and the (1→3)-β-D-glucan assay for differentiation between Pneumocystis jirovecii pneumonia and colonization Clin Microbiol Infect. 2012 Jun;18(6):591-7

(3) Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. Clin Infect Dis. 2013 May;56(9):1284-92.

#### 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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

長尾美紀、松村康史、山本正樹、一山智  
CD トキシン検出における全自動核酸抽出増幅法と酵素免疫測定法の比較検討  
第 89 回日本感染症学会総会・学術集会  
(2015)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

一山 智 (ICHIYAMA, Satoshi)

京都大学大学院医学研究科臨床病態検査学 教授

研究者番号 : 30223118

##### (2)研究分担者

長尾 美紀 (NAGAO, Miki)

京都大学大学院医学研究科臨床病態検査学

准教授

研究者番号 : 80523993

松村 康史 (MATSUMURA, Yasufumi)

京都大学大学院医学研究科臨床病態検査学

講師

研究者番号 : 80726828

山本 正樹 (YAMAMOTO, Masaki)

京都大学大学院医学研究科臨床病態検査学

助教

研究者番号 : 90726837