

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861529

研究課題名(和文)チトクロムCによる感染症迅速診断キットの開発

研究課題名(英文)Development of infection rapid diagnostic kit by cytochrome C

研究代表者

石部 頼子(Ishibe, Yoriko)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：50405742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：イムノクロマト法を用いたチトクロムCによる感染症迅速診断キットの開発を目的に検討を行った。測定キットの作成については測定感度および測定時間ともに臨床応用が可能なものであった。しかし感染症診断という点においてチトクロムCがすでに保険収載されているプロカルシトニンやプレセプシンになど他のマーカー比べて優れていたという結果が示せなかった。今後は感染症および外傷、熱傷の際に生じる全身性炎症症候群による重篤な病態を的確に把握するためのマーカーとしてさらに検討を加えていく予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a rapid infection diagnostic kit using cytochrome C and immunochromatography. A measurement kit with measurement sensitivity and time satisfactory for clinical application was developed. However, regarding diagnosis of infection, we were unable to show that cytochrome C was superior to other markers already covered by health insurance, such as procalcitonin and presepsin. In the future, we plan to further investigate cytochrome C as a marker to accurately assess serious conditions due to systemic inflammatory syndrome that occurs in association with infection, trauma or burn.

研究分野：救急医学

キーワード：チトクロムC 感染症診断 イムノクロマト法 敗血症

1. 研究開始当初の背景

臨床の現場においては感染症の診断に、血液培養検査や各種炎症マーカー、各種診断パラメーターが利用されているが、迅速性及び精度の観点から適切な治療方法の選択や処置方法に示唆を与える有用な手段としては必ずしも満足できるレベルではないのが現状である。チトクロム C による感染症迅速診断キットが開発されれば、ベッドサイドでの感染症早期診断が可能となり治療の開始・中止時期の早期判断が可能となり、また、入院期間の短縮による患者と国双方の医療費軽減が見込めると考えられた。

2. 研究の目的

生体の感染症による全身状態の増悪には臓器実質細胞と血管内皮の広範なアポトーシスが関与している。細胞にアポトーシスを誘導する主要経路の一つは、細胞内ミトコンドリアからのチトクロム C の放出の関連が示唆されており、細胞壊死を伴うような病態、例えばインフルエンザ脳症や劇症肝炎などにおいてはその値が上昇し、診断マーカーとしても既に臨床で応用されてきている。我々の研究チームは、これまでの研究で血中のチトクロム C が感染症で上昇することを明らかにし、電気化学発光免疫測定法 (CLEIA) によるチトクロム C 測定系を作成したが、これには、測定検体に煩雑な前処理を必要とし、また測定装置も大きく、実際の臨床現場に導入することには困難であった。そこで、我々はチトクロム C の ELISA 法による定量法を開発し、感染症においては感度の優れた炎症マーカーであることを証明した。しかしこの測定系でも結果が得られるまでには前処理を含め約 3 時間を要し、迅速性の観点からは課題があった。感染症の診断・治療は、対応の遅れが生命予後を左右するため、さらに簡便で、かつ短時間に結果が得られる方法を開

発する必要があると考え、イムノクロマト法による測定系の開発を目的とした。

1) 学術的背景

現在、国外において最も高い評価を受け市販されている感染症マーカーは、プロカルシトニンである。我々が研究するチトクロム C が、プロカルシトニンを上回る診断能力を有しているか、臨床検体を用いて検討する必要がある。

2) どこまで明らかにするか

【キット化】

イムノクロマト法を利用し、血漿あるいは全血を微量 (約 100 μ L) 滴下するだけの単純操作で、かつ短時間 (約 15 分) に結果が得られる測定キットを作成することを目標とした。

【精度の確認】

イムノクロマト法と ELISA 法 (従来法) による、チトクロム C データの比較検討を行う。

【鑑別診断能力】

感染の違い (グラム陰性菌、グラム陽性菌、真菌、ウイルス) によるチトクロム C 発現量の差について、臨床検体を用いて検討する。

【重症度判定】

チトクロム C と重症度スコアとの関連について検討する。

3. 研究の方法

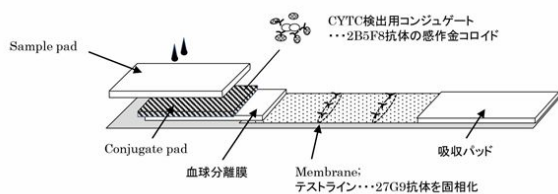
イムノクロマトグラフィー法による感染症診断マーカーの開発と、実用化を目的として、2 年の研究計画を作成した。おおまかには、初年度はチトクロム C の機序解析とマーカーの作成、次年度は種々の感染症についてマーカーを用いた臨床試験を主として行い、最終年度は前年に引き続いた精度確認を行う。

・チトクロム C の測定の簡便化を図るため、イムノクロマト法を利用しキット化する。

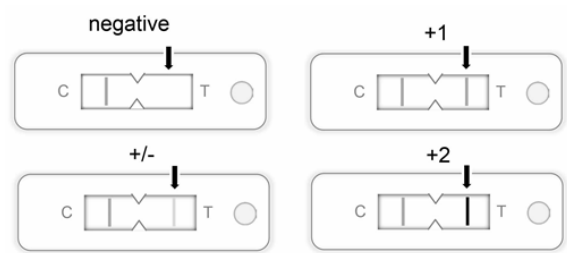
(予備実験では敗血症患者で数百 ng/mL オ

ーダーであり、簡易キットの作成は可能である)

<キットの原理>



<試作品>



- ・チトクロムC 測定においてイムノクロマト法と ELISA 法とのデータの比較を行う。
- ・測定値と各疾患の重症度を比較検討する。
- ・臨床検体及び周術期の検体を採取し、感染症合併の予測について検討する。

4. 研究成果

岩手医科大学救急医学講座に搬送され搬入時感染が疑われた症例を対象に臨床検体を採取し、チトクロムCのほか、CRP、プロカルシトニン、プレセプシンなど従来の感染症マーカーを測定し、その信頼性について評価した。患者は腹腔内感染症から外傷、熱傷症例など計80検体であった。患者を健常群10例、非感染性SIRS群20例、局所感染群22例、敗血症群16例、重症敗血症群12例であった。

イムノクロマト法を用いた測定キットの開発

各測定検体はヘパリン化し血漿を採取、作成した測定キットのテストラインに100 μ lを滴下し、検出したバンドの濃さでそれぞれ

陰性、1+、2+、3+とした。判定は今回の検討に参加していない第3者の医師2名に依頼し肉眼で行った。全血では、検出結果にばらつきが認められ、今回の検討では血漿検体のみとした。測定結果は健常群：全例陰性、非感染性SIRS群：陰性10例、1+6例、2+4例、局所感染群：陰性2例、1+8例、2+11例、3+11例、敗血症群1+2例、2+4例、3+10例、重症敗血症群：2+4例、3+8例であった。

検体滴下からバンドの検出までは約2分で開始し、11分でプラトーに達した。その後60分まではバンドの色調に変化はなく、検出時間は15分とした。

測定キットとしては検出感度、測定時間ともに問題なく、臨床応用は可能であると判断した。

ELISA法とイムノクロマト法の測定値の比較検討

上記80検体の血漿検体をELISA法で測定し、イムノクロマト法の測定値と比較した。結果が明らかに乖離していると考えられた症例はなく、陰性が30~100ng/ml、1+が100~500ng/ml、2+が500~1500ng/ml、3+が1500~3000ng/mlと考えられた。最低検出感度は30ng/ml以上と考えられた。両測定法の相関は $r=0.91$ 、 $p<0.01$ であった。

測定値と病態重症度の比較検討

チトクロムCの測定値の平均値はそれぞれ健常群56.0ng/ml、局所感染群466.5ng/ml、非感染性SIRS群812.3ng/ml、敗血症群1024.5ng/ml、重症敗血症群1814.9ng/mlと健常人及び局所感染群では有意に低値であった。感染症診断能を他の感染症マーカーであるプロカルシトニン及びプレセプシンと比較した。結果はAUC(area under the curve)で比較した。ACUはチトクロムC:0.77、プロカルシトニン:0.90、プレセプシン:0.91で従来のマーカーに比較し感染症診断能は劣っていた。この要因としては、これまでの感染症特異的マーカーでは非感染性SIRS群

では値が上昇することはなかったものの、チトクロムCでは上昇する症例を認めたことにより、感染症診断における感度は高いものの、特異性が低いことが要因と考えられた。チトクロムCは非感染性SIRS群内において重症度の悪化につれその値は上昇していた。これらのことからチトクロムCは感染症に特異的なマーカーというよりは「SIRS」、いわゆる全身性に侵襲が及んだ状態における重症度を速やかに反映するマーカーである可能性が示唆された。このことから非感染性SIRS症例に追加検討を行った。症例は重症熱傷3例、交通事故や転落による多発外傷17例であった。このうち外傷症例を外傷重症度スコアであるISSで分類するとチトクロムCとの相関は $r=0.77$ 、 $p<0.036$ であり有意な相関関係を認め、他のマーカーであるCRP、プロカルシトニン、プレセプシンはISSとの相関を認めなかった。

研究開始時、チトクロムCは感染症診断マーカーとして検討を開始した。確かに感染症に対する感度は高いものの、非感染性SIRSでも有意な上昇をみせることから、診断能としては他のマーカーに劣る結果となった。このことから感染症診断マーカーとしての臨床応用は見送り、あらたに感染症、外傷を含め重症病態を的確に判断するマーカーとして、再度検討していく方針とした。

合併症の予測

脊椎側湾症の定期手術25症例においてチトクロムC値を測定し、周術期合併症の発生予測の評価を行った。結果は25症例のうち2例に術後創部感染(局所感染)を認めた。チトクロムC値はこの2例において上昇はみられたものの有意な差はなく。現段階では合併症発生予測としては、さらに症例を増やし検討が必要と考えられた。

イムノクロマト法を用いたチトクロムCによる感染症迅速診断キットの開発を目的に検討を重ねた。測定キットの作成については

感度および測定時間ともに臨床応用が可能なものであった。しかし感染症の診断という点においてチトクロムCがすでに保険収載されている他のマーカーに比べて優れていたという結果が示せず、今後は感染症および外傷の重症な病態を的確に把握するためのマーカーとしてさらに検討を加えている段階である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石部 頼子 (ISHIBE, Yoriko)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：50405742