

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460692

研究課題名(和文)動物接種とゲノム解析の組み合わせによる画期的な難同定病原微生物診断法の開発

研究課題名(英文)A novel diagnostic method of causative agents for infectious diseases using animal inoculation and genomic analysis

研究代表者

岡山 昭彦 (Okayama, Akihiko)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：70204047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：培養困難な感染症の診断法開発をめざして、グラム染色、培養法に加えて菌体成分をスライド標本からレーザーマイクロダイセクション(LMD)法を用いて細菌あるいは真菌の16SリボソームRNA(16SrRNA)遺伝子を増幅することを試みたところ、大腸菌約100菌体までは安定して検出することはできた。しかしながらPCR効率を上げるとコンタミネーションが見られたため、方法の見直しに加え、病原微生物特異的PCRも試みた。後者では、大腸菌では、特異PCRが16SrRNA遺伝子増幅よりも感度が高く有望と思われた。今後、動物実験を経て方法を改善し、ヒト臨床サンプルからの検出に取り組みたい。

研究成果の概要(英文)：To identify the causative agents for bacterial infection, we tried to apply the micro laser dissection (LMD) to obtain the bacterial DNA from the gram stained slides in combination to determine its DNA sequences from PCR product. When *Escherichia coli* were used as its subject, even 100 bacteria can be successfully identified using primers for 16S ribosomal RNA genome. However, the contaminated bacterial genome from circumstance was also detected when the sensitivity of this method was increased. Therefore, we also tried to develop PCR pathogen-specific primers and obtained good sensitivity and specificity. We are planning to perform animal experiment and apply this method for the clinical samples.

研究分野：感染症

キーワード：感染症 新規診断法 レーザーマイクロダイセクション

1. 研究開始当初の背景

臨床的に発熱を主訴とする患者は最も多く、その第一原因は感染症である。しかしながら肺炎や菌血症のようにコモンな感染症であっても、その起炎菌の同定率は低い。これは感染症の原因が多彩であり、古典的な方法で培養可能な細菌以外の感染症の頻度が高いことや既に行われた抗菌薬治療の影響による。病原微生物の検出は感染症の診断および治療に不可欠であり、細菌学的検出法のほかに近年核酸増幅を用いた方法および質量分析装置を用いた解析法などが用いられるようになってきた。しかし、極めて微量の感染源や混在する微生物等により病原性微生物を単離することが難しい場合も少なくない。また、ウイルスはもちろんのこと、抗酸菌、レジオネラ、リケッチア、など細胞内寄生体は通常の培養方法では検出できない。核酸増幅を用いた方法および質量分析装置を用いた方法はまず病原体の培養・コロニーの精製が原則であるため、新規の検出方法も十分な力を発揮していない面がある。このため多くの感染症症例は疑い例にとどまり、治療や予防、院内感染対策などに支障を期している。本研究はこのような状況を打破するための試みである。

2. 研究の目的

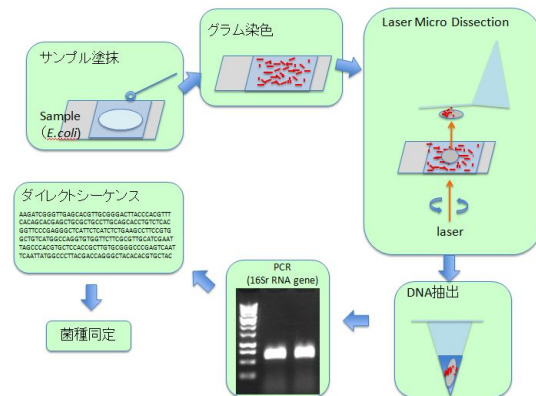
感染症の原因が多彩であり、嫌気性菌や抗菌薬の影響、細胞内寄生体で培養困難な感染症の起炎微生物の診断は困難である。本申請研究においては古典的なグラム染色、培養法に加えて菌体成分をスライド標本からレーザーマイクロダイセクション(LMD)法を用いて、直接微生物由来核酸を回収し、細菌あるいは真菌の16sリボソームRNA(16SrRNA)遺伝子を増幅する方法を確立し菌種同定に応用する。さらに免疫不全マウスなどのふくめた動物への検体接種を組み合わせることにより一般に検

出困難な細胞内寄生体の検出も試みる。本方法の応用により病原体診断率の飛躍的向上を目指す。

3. 研究の方法

研究の大きな目的は古典的培養法とともにLMD法や遺伝子検査を同時並行で行い、さらに動物への接種を組み合わせることにより、これまで困難であった細胞内寄生体をふくむ病原微生物の臨床検体からの検出を可能にすることにある。

LMD法のグラム染色への応用：臨床検体のグラム染色塗沫標本から病原性微生物と推定される菌体をLMD法を用いて、直接回収し、16SrRNA遺伝子増幅を行いそのシーケンスを解析することで菌種同定を行う。



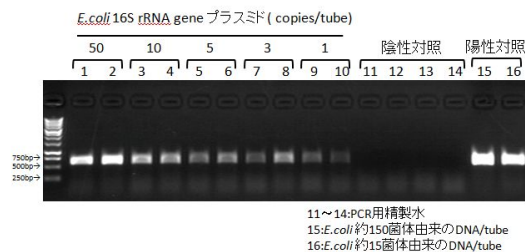
Nested PCR法を用いた16SrRNA遺伝子同定：血液培養サンプルなどからの核酸を回収し、細胞内寄生体など通常の培養法で検出されない病原性微生物を16SrRNA遺伝子増幅(Nested PCR)で検出する方法を確立する。

動物接種による検出効率増強法：臨床検体(本来原則無菌的な部位から採取：血液など)を通常のマウスおよび免疫不全マウスに接種し、古典的培養あるいは16SrRNA遺伝子検査を容易に行い、さらに細胞内寄生体の検出を可能にする。

4. 研究成果

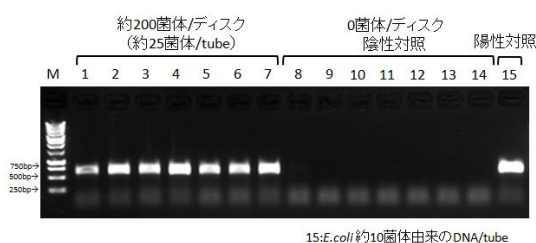
LMD 法のグラム染色への応用：臨床検体のグラム染色塗沫標本から病原性微生物と推定される菌体を LMD 法を用いて、直接回収し、16SrRNA 遺伝子増幅を用いて菌種同定を行うことを想定し、まずは培養後コロニーより釣菌した細菌をスライドに塗布し、グラム染色後、LMD による回収を試みた。大腸菌を用いた実験では、細菌が付着したままのディスクを回収することができた。これを試験管内で熱アルカリ処理し、細菌核酸を改修し、中和後、16SrRNA 遺伝子をユニバーサルに増幅するプライマーを用いて PCR を行った。PCR の感度を対象シーケンスを含むプラスミド希釈で確認したところ十分に感度を上げると 1 反応あたり 1 コピーでも検出可能であった (図 1)。

図 1



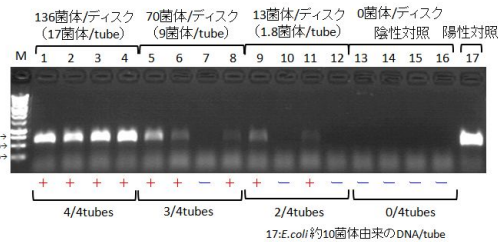
しかしながら PCR 効率を上げると、環境や試薬由来と思われるコンタミネーションが見られた。このため、試薬の見直しを行い、また機器に紫外線照射を行うことで、コンタミネーションの減少を図った。その結果、大腸菌検体においてはコンタミネーションなしに検出することが可能となった (図 2)。

図 2



この条件において、大腸菌検体の希釈を行い、感度を調べたところ、約 100 菌体までは安定して検出することはできたが、それ以下の 10 菌体程度になると検出感度は 2 分の 1 程度であった (図 3)。

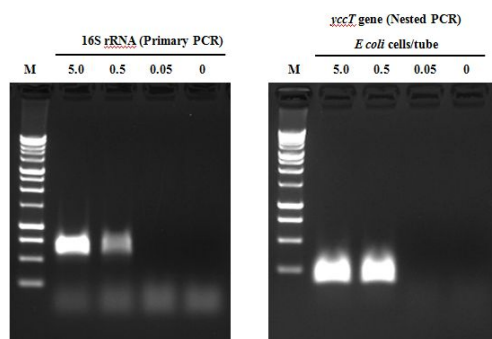
図 3



さらに菌種を変えて、グラム陽性球菌である黄色ブドウ球菌を対象として同様の検討を行ったところ、検出感度は大腸菌の 10 分の 1 程度であった。これは菌体壁の成分等が異なり溶菌が効率よく行われていないためであると考えられた。

16SrRNA 遺伝子増幅は広範囲の病原微生物を検出できる利点がある半面、コンタミネーションを除外しにくく、また遺伝子産物のシーケンス決定が必要で、時間を要するという問題点があった。この問題を解決するため、上記実験と並行して、病原微生物特異的 PCR を代表的な起炎菌に応用することを試みた。対象としてはヒトの一般的な感染症の起炎菌である大腸菌、ブドウ球菌に加えて、腸球菌、緑膿菌、インフルエンザ菌、嫌気性菌であるバクテロイデスなどを検出する系を検討した。大腸菌では、特異 PCR が 16SrRNA 遺伝子増幅よりも感度が高く有望と思われた (図 4)。現在その他の細菌についても検討を進めている。

図 4



Nested PCR 法を用いた 16SrRNA 遺伝子同定：感度を上げるために 16SrRNA 遺伝子増幅を Nested PCR で検出する方法についても検討した。しかしながら single PCR であっても 1 反応あたり 1 コピーの遺伝子検出が可能であったことや、反応工程が増えることによって、コンタミネーションの頻度が増えることがあり、さらに検討を要するものと考えられた。

動物接種による検出効率増強法：臨床検体（本来原則無菌的な部位から採取：血液など）を通常のマウスおよび免疫不全マウスに接種し、古典的培養あるいは 16SrRNA 遺伝子検査を容易に行い、さらに細胞内寄生体の検出の可能性を検討した。異なる菌量の大腸菌を C57BL マウス腹腔内に接種して腹膜炎を発症させるという実臨床に近い状況での検出を試みたが、成功しなかった。

以上の結果から現状では本検出系を直ちに臨床に応用することは困難であるが、さらに効率的な DNA 抽出法を検討し、またマルチプライマーを用いた検出系により簡便で特異的な検出系の作成、マウス実験モデルの確立に取り組み、ヒト臨床サンプルからの検出に取り組みたい。

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 1 件)

山田明輝, 加来恵, 武田展幸, 佐伯裕二, (学会員外共同研究者：梅木一美, 山本成郎, 岡山昭彦). レーザーマイクロダイセクション法 (LMD) を用いた細菌の検出と同定の試み. 第 27 回日本臨床微生物学会総会・学術集会. 一般演題 17(口演) 遺伝子検査 20-093. 2016. (1月29日-31日(31日発表), 宮城県仙台市, 仙台国際国際センター)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡山 昭彦 (Akihiko Okayama) 宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：70204047

(2) 研究分担者

高城 一郎 (Ichiro Takajo) 宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：20418841

林 哲也 (Tetsuya Hayashi) 九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：10173014

越本 知大 (Koshimoto Chihiro) 宮崎大学・フロンティア実験総合センター・教授

研究者番号：70295210