

令和元年6月26日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08835

研究課題名(和文)新規網羅的迅速高感度病原体検出法の感染症対策への応用とその評価

研究課題名(英文) Application of a rapid, highly sensitive, comprehensive PCR detection method against microbiological pathogens for infection control and its evaluation

研究代表者

高橋 和郎 (Takahashi, Kazuo)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：10171472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：重篤な感染症である血流感染症の原因微生物を高感度迅速PCR法で同定し、その結果を従来の培養法と比較した。血液培養陽性72例から培養法で77菌種が同定され、本PCR法により73菌種(94.8%)で高感度で診断結果が一致した。薬剤耐性については、感受性試験法で判定されたメチシリン耐性株9株すべてmecA遺伝子が検出された(100%一致)。血液培養開始から起因为微生物と薬剤耐性の結果が判明するまでの所要時間は、29-53時間と有意に短縮し、培養を開始して翌日午前中には原因菌の同定および薬剤耐性遺伝子の検出が大部分可能となり、迅速により適切な抗菌薬治療への変更が可能となることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症となる可能性がある血流感染症は迅速な原因診断が求められる。本PCR法を用いることにより、血液培養陽性時点から1-2時間で大部分の菌種の同定と抗菌薬のメチシリン耐性が否かについての正確な判定が可能となる。従来法と比較して1-2日早く菌種が同定されるため、より早期に適切な抗菌薬で患者を治療することが可能となり、死亡率の低下、重症化の回避、入院日数の減少、不要な抗菌薬使用の回避が期待され、医療経済的にも貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A new, highly sensitive, specific Q probe PCR method was developed for improving the management of septic patients. This method identified the most common 21 target bacteria and fungi in BSI with detection of mecA gene. Then, the sensitivity, specificity, and turnaround time (TAT) of this method was assessed in comparison to the blood culture (BC) method among the BSI samples. In total, 72 patients with at least one positive BC were analyzed and 55 of 72 patients represented true BSI. Seventy-two positive BC yielded 77 pathogens. Of 77 isolated strains, the Q probe PCR method demonstrated a high degree of agreement (94.8%) 73 of 77 strains. The reduction of TAT for pathogen identification and detection of the drug resistant genes ranged from 29 to 53 hours depending on the strains. This assay incorporated into the BC method would have the strong impact on the clinical decision of antibiotic therapy and have a potential to improve clinical outcomes.

研究分野：感染症学

キーワード：病原微生物 Qプローブ法 網羅的 感染症対策 迅速 高感度

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

各種感染症の発生に際しては、迅速な治療や感染症および公衆衛生対策に対応するため、その病原体診断には、高感度、高特異性でより迅速で簡便、高性能の検査法が求められる。各種ウイルス感染症に対して現行の遺伝子診断法は高性能で迅速であるが、検査時間は約4時間を要する。また、一部の細菌感染症に対しては迅速な抗原あるいは遺伝子検査が行われているが、他の多くの場合分離同定に2-3日を要する。私たちは近年市販された高性能な全自動核酸(DNAのみ)抽出増幅同定装置を用いて、公衆衛生上感染対策が必要である疾患を優先的に、これら疾患に対して高感度で迅速な病原診断法(Qプローブ法、東洋紡)のソフト面の開発を行ってきた。この装置の特徴は検体のDNA抽出からPCR増幅、増幅産物の特異性の確認までを、全工程40分という迅速さ(現行で市販されている装置では最速である)で行い、さらに、至適条件を検討することにより最少検出可能遺伝子数が10コピー程度と高感度となることが可能な点である。現在までの研究成果として、多くの病原ウイルス、細菌に対する高感度で迅速な本Qプローブ法を開発し、一部臨床検体を用いて性能評価を進めてきた。

### 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究課題の研究目的を以下の2点とした。1)各種感染症(血流感染症を含む)を疑う症例の臨床検体について本診断法を応用し、同時に従来法と比較してその検出感度、特異性、迅速性という性能を評価する。2)感染症対策が必要と考えられる他の感染症(ウイルス性胃腸炎、他の呼吸器感染症、中枢神経系感染症)の起因微生物に対しても本Qプローブ法を作製し、実際に各種感染症の発生に際してこれを病原診断に応用し性能を評価する。

### 3. 研究の方法

#### (1)呼吸器感染症の診断への本Qプローブ法の作製と応用

呼吸器から感染するウイルスのうち、新たにパレコウイルス、サフォールドウイルス、RSウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ライノウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルス、ヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)、ヒトヘルペスウイルス7の本Qプローブ法による検出系を作製した。増幅に用いたプライマー、プローブの塩基配列は既報の報告をもとに設計した。

#### (2)血流感染症の診断への本Qプローブ法の作製と応用

血流感染症の大部分の原因となる細菌19種、真菌2種に対するQプローブPCR検出法を作製した。薬剤耐性遺伝子 *mecA* の検出は東洋紡作製のキットを用いた。調査対象患者は2015年11月から2016年12月に国際医療福祉大学病院に入院し血液培養検査を受け培養陽性となった患者72例を対象とした。血液培養陽性検体のグラム染色性、形態を確認し、血液培養液を遠心分離し、Qプローブ法を用いて起因菌同定と薬剤耐性を決定した。次に、従来の分離同定薬剤感受性試験法に対する本Qプローブ法の性能を評価した。さらに分離同定法とQプローブ法の2方法において、血液培養が陽性となった時点から原因菌の同定と薬剤感受性結果が判明するまでの時間(TAT)の差を検討した。

#### (3)マイコプラズマ感染症の診断への本Qプローブ法の応用

2011年から2015年に大阪府の複数の医療機関を受診、あるいは入院したマイコプラズマ感染症と疑われた約300名の患者の咽頭スワブに対して本Qプローブ法を用いて肺炎マイコプラズマ遺伝子の検出を行った。この検査法では同時にマイコプラズマがマクロライド(ML)系の抗菌薬に対して耐性か否かを判定できる。

### 4. 研究成果

(1)呼吸器ウイルス検出のQプローブ法の最少検出感度は20-10000コピーであった。呼吸器感染症と診断された小児50症例の鼻腔吸引液検体からサフォールドウイルス遺伝子が3例、パレコウイルス遺伝子が1例、RSウイルス遺伝子が18例、ヒトメタニューモウイルス遺伝子が5例、アデノウイルスが3例、それぞれ検出された。また、原因不明の熱性痙攣症例3例のうち2例の末梢血からHHV-6が検出され、起因病原体が診断可能となった。

(2)血液培養陽性72検体から77種の病原体を分離同定した。種の同定に関するQプローブ法の感度は94.8%(73/77)であった。非検出の4種はいずれも *Candida* spp.(非 *Candida albicans*)であり、本方法の対象微生物には含まれていない。分離同定法によるメチシリン耐性株における *mecA* 遺伝子の検出感度は100%(17/17)であった。Qプローブ法および分離同定法による平均TATは、グラム陽性球菌ではそれぞれ  $1.35 \pm 0.15$  時間、 $38.5 \pm 7.8$  時間であり、グラム陰性桿菌ではそれぞれ  $2.44 \pm 0.12$  時間、 $34.6 \pm 9.3$  時間であった。Qプローブ法のTATは有意に短縮した( $P < 0.0001$ 以下)。Qプローブ法では採血

から遅くとも30時間以内で原因菌が同定された。血液培養陽性症例72例中56例が真の血流感染症と診断され、Qプローブ法により原因菌が判明した時点で不適切な抗菌薬治療を受けていたのは12例確認された。その12例中11例では迅速に適正な抗菌薬治療が行われた。本Qプローブ法を用いると、血液培養開始翌日には原因菌の同定および薬剤耐性遺伝子の検出が大部分可能となり、迅速により適切な抗菌薬治療への変更が可能となることが明らかとなった。今後、血流感染症患者へ本検出法の臨床応用を進め、患者アウトカムの改善を評価することが必要である。

(3)臨床検体を用いてマイコプラズマに対するQプローブ法の検出感度を従来のLAMP法と比較した結果、感度99.0%、特異度99.5%と性能は同等であった。ML耐性肺炎マイコプラズマの検出頻度についてQプローブ法を用いて調査した。2011年は76.6%であったが、2015年は41.4%に低下した。この原因については、2011年はML耐性であるp1遺伝子1型が83%を占め、2015年はML感受性である2型が56%を占めたことによるものと判明した。換言すると、近年の耐性率の低下はp1遺伝子1型株から2型株への流行株の変化によるものである。初期治療に用いる抗菌薬は現在マクロライド系の選択が適切であることが支持された。本マイコプラズマの研究中に、日本では過去に検出されたことがない希有な *Mycoplasma amphoriforme* を分離同定し報告した。病原性を持つと考えられるが、今後より詳細な研究が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Katsukawa C, Asai S, Mizutani K, Arai K, Kohdera U, Kushibiki C, Shiomi M, Takeda Y, Naka A, Nakano K, Matsushita T, Kenri T, Takahashi K, Novel isolation of *Mycoplasma amphoriforme* from a pediatric patient with chronic bronchitis in Japan. *Jan J Infect Dis 査読有* 69; 450-451, 2016 DOI: 10.7883/yoken.JJID.2016.128

Katsukawa C, Kenri T, Shibayama K, Takahashi K, Genetic characterization of *Mycoplasma pneumoniae* isolated in Osaka between 2011 and 2017: Decreased detection rate of macrolide-resistance and increase of p1 gene type 2 lineage strains *PlosOne 査読有* 14;1-15, 2019 DOI: [org/10.1371/journal.pone.02099938](https://doi.org/10.1371/journal.pone.02099938)

〔学会発表〕(計 6 件)

勝川 千尋、水谷 香代子、梅田 薫、浅井 定三郎、荒井和子、園府寺 美、梶 勝史、櫛引 千恵子、塩見正司、武田義廣、中 篤子、中野景司、松下 享、高橋 和郎、肺炎マイコプラズマの遺伝子型別、第42回日本マイコプラズマ学会 2015年 東京都

勝川 千尋、水谷 香代子、石鍋 美智子、浅井 定三郎、園府寺 美、櫛引 千恵子、中 篤子、松下 享、秦 直樹、高橋 和郎、大阪府におけるマクロライド耐性肺炎マイコプラズマの検出率の低下 第48回日本小児感染症学会総会・学術集会 2016年 岡山市

勝川 千尋、水谷 香代子、石鍋 美智子、浅井 定三郎、園府寺 美、櫛引 千恵子、中 篤子、松下 享、秦 直樹、高橋 和郎、*Mycoplasma amphoriforme* の感染実態調査 第48回日本小児感染症学会総会・学術集会 2016年 岡山市

勝川 千尋、水谷 香代子、石鍋 美智子、浅井 定三郎、園府寺 美、櫛引 千恵子、中 篤子、松下 享、秦 直樹、高橋 和郎、*Mycoplasma amphoriforme* の侵淫度調査 第43回日本マイコプラズマ学会 2016年 長崎市

Myint Thazin Aung, Takahashi K, Miyata M, Aida T, Kaneko Y, Development of a rapid, highly sensitive, PCR diagnosis method against microbiological pathogens in bloodstream infection. 第28回 日本臨床微生物学会 2017年 長崎市

高橋和郎、血流感染症の原因微生物診断における迅速高感度 Q プローブ法の開発と臨床応用、第64回 日本臨床検査医学会学術集会 2017年 京都市

〔図書〕なし

〔産業財産権(特許権、実用新案権、意匠権)〕なし

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

研究組織は研究代表者(高橋 和郎)のみで、研究分担者は組織していない。