

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09673

研究課題名(和文) 小児の細菌性肺炎の鑑別に有用なバイオマーカーの検索

研究課題名(英文) Search for biomarkers useful for discriminating bacterial pneumonia in children

研究代表者

楠原 浩一 (KUSUHARA, Koichi)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：20243941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：2015年4月から2018年3月までに産業医科大学小児科に肺炎で入院し、喀痰での起炎菌検索が可能であった41例(年齢中央値 3.1歳)を対象とした。喀痰の塗抹にて貪食像を認め、培養にて起炎菌が同定された患者を細菌性肺炎群(19例、46%)、同定されなかった患者を非細菌性肺炎群(22例、54%)に分類し、入院時の全血および血清を用いて白血球数、好中球数、CRP、プロカルシトニン、プレセプシン、単球/好中球CD64を測定し、2群間で比較した。その結果、いずれのバイオマーカーでも両群間で有意差を認めなかった。ROC解析を行い、細菌性肺炎の識別能を比較したところ、好中球CD64が最も良い成績を示した。

研究成果の概要(英文)：Subjects of this study were children admitted to the University of Occupational and Environmental Health Hospital for pneumonia from April 2015 to March 2018, whose sputum samples were suitable for detection of causative bacteria (median age, 3.1 years). When phagocytized bacterial cells were seen on the Gram stain smear of the sputum sample and corresponding bacterium was isolated later, it was identified as a bacterial pathogen. The patients with and without identification were classified into bacterial pneumonia group (n=19, 46%) and non-bacterial pneumonia group (n=22, 54%), respectively. White blood cell count, neutrophil count, CRP, procalcitonin, presepsin and monocyte/neutrophil CD64 expression on admission were compared between the 2 groups. No biomarkers evaluated in this study showed significant difference between them. In ROC analysis, neutrophil CD64 expression showed better ability to discriminate bacterial pneumonia.

研究分野：小児感染症

キーワード：肺炎 喀痰 細菌性 バイオマーカー 鑑別 小児

### 1. 研究開始当初の背景

小児の細菌性肺炎は、小児では喀痰が容易には得られないため、確定診断が困難なことが多く、海外の文献では血液培養あるいは胸水培養が陽性であった例のみを確定例として取り扱っていることが多い。我々は、経鼻下咽頭吸引によって喀痰を採取し、その性状の分析(Geckler 分類)によって質の高い喀痰と判定された場合に、起炎菌を同定する方法を報告した(Hoshina, Kusahara et al. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010)。この方法により、小児でも比較的簡便に一般細菌による細菌性肺炎の確定診断が可能である。質の高い喀痰は約 75%の症例で得ることができ、その約 70% (全体の約 50%) で起炎菌を同定することができた。一方で、残りの 25% では質の高い喀痰が得られないことから、また、年長児では経鼻下咽頭吸引が行いにくく喀痰が得られにくいことから、起炎菌の同定のステップに進むことができない。さらに培養結果の判定までには一定の時間が必要である。そのため、喀痰以外の血液検査などのバイオマーカーにより、細菌性が否かを鑑別する必要性が出てくる。経鼻下咽頭吸引を用いた我々の別の検討では、白血球数、好中球数、CRP、プロカルシトニン(PCT)で、細菌性肺炎の鑑別能を比較したところ PCT が ROC 解析で AUC=0.87 と最も良い成績を示した(Hoshina et al. *J Infect Chemother*, 2014)。しかし、PCT のみでは十分な鑑別マーカーとは言えず、他のより優れたバイオマーカーの検索が望まれる。

### 2. 研究の目的

細菌感染症の新しいバイオマーカーとして注目されている、単球/好中球の CD64、presepsinなどを測定し、それぞれのマーカーを細菌性肺炎群と非細菌性肺炎群の2群間で比較することで、小児の細菌性肺炎鑑別に有用なバイオマーカーを同定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象者からの検体採取

当科に肺炎のため入院し、本人または家族から同意の得られた小児を対象とし、入院時に喀痰および血液を採取した。

#### (2) 喀痰の採取および処理

喀痰は、経鼻下咽頭吸引、自力で喀痰を排出、気管切開口から吸引のいずれかの方法を用いて採取し、得られた喀痰の品質を Geckler 分類に従って分類した。Geckler 分類 4 または 5 の場合(気管切開口から吸引した喀痰の場合は Geckler 分類 4,5,6 の場合)に良質な喀痰と判定し、起炎菌の同定を進めた。塗抹にて白血球による貪食像を示す細菌があり、そのグラム染色所見と一致する細菌が培養で分離同定される場合に起炎菌と判断し、起炎菌が同定された患者を細菌性肺炎群、同定されなかった患者を非細菌性肺炎群

として振り分けた。

#### (3) 血液の採取および処理

血液は全血と血清を採取し、白血球数、好中球数、CRP、PCT、presepsin、単球/好中球の CD64 を測定した。単球/好中球の CD64 は全血を用いて、QuantiBRIGHT CD64PE/CD45PerCP (Becton-Dickinson, San Jose, CA) および PE beads (Becton-Dickinson) を使用し、フローサイトメーターを用いて単球、好中球の分離とそれぞれの細胞上の CD64 発現を定量した。

#### (4) 細菌性肺炎群と非細菌性肺炎群との比較

白血球数、好中球数、CRP、PCT、presepsin、単球/好中球の CD64 を細菌性肺炎群と非細菌性肺炎群とで比較し、さらに細菌性肺炎の識別能について Receiver Operating Characteristic(ROC)解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 各マーカーの2群間での比較

対象の 41 例中、起炎菌が同定された症例(細菌性肺炎群)は 19 例、同定されなかった症例(非細菌性肺炎群)は 22 例であった。白血球数、好中球数、CRP、PCT、presepsin、単球 CD64、好中球 CD64 をこの2群で比較した結果、非細菌性肺炎群に比べ細菌性肺炎群で高値であったのは、好中球数、CRP、PCT、単球 CD64、好中球 CD64 であったが、統計学的有意差は認めなかった(表 1)。

**表 1 細菌性肺炎群と非細菌性肺炎群における各バイオマーカーの比較**

	細菌性肺炎群 n=19	非細菌性肺炎群 n=22	P値
白血球数 / $\mu\text{l}$ (range)	12000 (6200-27700)	14600 (4600-29300)	0.2956
好中球数 / $\mu\text{l}$ (range)	8404 (3026-20910)	7965 (1426-21389)	0.6355
CRP, mg/dl (range)	5.30 (0.24-13.54)	3.05 (0.17-15.36)	0.4884
PCT, pg/ml (range)	0.26 (0.07-26.9)	0.18 (0.05-2.47)	0.5468
presepsin, ng/ml (range)	252 (136-753)	260 (116-1651)	0.7259
単球CD64, molecules/cell (range)	2028 (1799-3186)	1992 (1787-3595)	0.6851
好中球CD64, molecules/cell (range)	1811 (1726-1956)	1781 (1689-2099)	0.2946

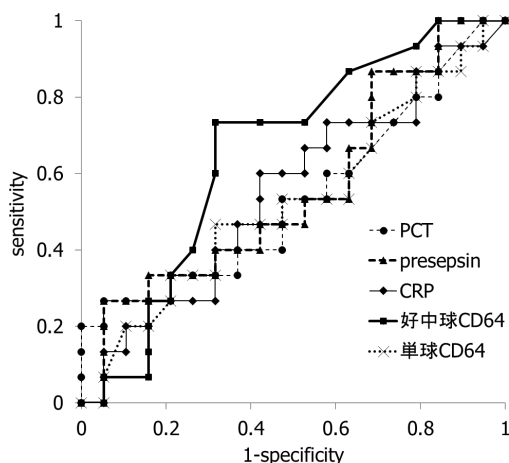
#### (2) 各バイオマーカーの細菌性肺炎識別能評価

CRP、PCT、presepsin、単球 CD64、好中球 CD64 に関して細菌性肺炎識別能の ROC 解析を行った結果、AUC はそれぞれ 0.56、0.56、0.53、0.54、0.60 であった(表 2、図 1)。単球 CD64 は、cut-off 値を 1932 molecules/cell とすると感度 42.1%、特異度 68.2%であった。好中球 CD64 は、cut-off 値を 1799 molecules/cell とすると感度 63.2%、特異度 59.1%であった。

**表 2 各バイオマーカーの細菌性肺炎識別能評価**

Marker	AUC (95% CI)	Cut off	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CRP	0.56 (0.38-0.74)	3.75	63.2%	54.5%	54.5%	63.2%
PCT	0.56 (0.37-0.75)	0.20	58.8%	52.4%	50.0%	61.4%
presepsin	0.53 (0.34-0.72)	267	47.1%	55.0%	47.0%	55.1%
単球CD64	0.54 (0.35-0.72)	1932	42.1%	68.2%	53.3%	57.7%
好中球CD64	0.60 (0.42-0.77)	1799	63.2%	59.1%	57.1%	65.1%

**図 1 ROC 解析による各バイオマーカーの細菌性肺炎識別能評価**



**(3) バイオマーカーの組み合わせによる細菌性肺炎識別能評価**

表 2 に示した cut off 値を用いて、2 種類のバイオマーカーを組み合わせる細菌性肺炎識別能を検討した(表 3)。好中球 CD64 かつ CRP をマーカーとした場合、好中球 CD64 のみをマーカーとした場合と比較し、特異度は 77.3%と高くなったが、感度が 36.8%と低くなった。好中球 CD64 かつ PCT をマーカーとした場合も、好中球 CD64 のみをマーカーとした場合と比較し、特異度は 81.0%と高くなったが、感度が 47.1%と低くなった。

**表 3 バイオマーカーの組み合わせによる細菌性肺炎識別能評価**

Marker	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
好中球CD64かつCRP	36.8%	77.3%	58.3%	58.6%
好中球CD64またはCRP	89.5%	36.4%	54.8%	80.0%
好中球CD64かつPCT	47.1%	81.0%	66.7%	65.4%
好中球CD64またはPCT	82.4%	33.3%	50.0%	70.0%
好中球CD64かつ単球CD64	47.4%	63.6%	52.9%	58.3%
好中球CD64または単球CD64	78.1%	27.3%	50.0%	66.7%

(1)から(3)によって得られた結果からは、好中球/単球 CD64 や presepsin は小児の細菌性肺炎と非細菌性肺炎の十分な鑑別マーカーとは言えなかった。症例の蓄積や他のバイオマーカーの検索など、更なる検討が必要である。

**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 10 件)

Kaoru H, Igarashi R, Hoshina T, Kojiro M, Kusuhara K: Utility of the performance of lumbar puncture for febrile children with status epilepticus in the bacterial conjugate vaccine era. *Pediatr Infect Dis J* 査読有(in press)

Kawamura M, Hoshina T, Ogawa M, Nakamoto T, Kusuhara K. Effectiveness of an early switch from intravenous to oral antimicrobial therapy for lower respiratory tract infection in patients with severe motor intellectual disabilities. *J Infect Chemother* 査読有 24:40-4, 2018.

Hoshina T, Yamamoto N, Ogawa M, Nakamoto T, Kusuhara K: The efficacy of the direct clinical intervention for infectious diseases by a pediatric infectious disease specialist in the pediatric ward of a tertiary medical facility without a pediatric antimicrobial stewardship program. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 査読有 36:1449-54, 2017.

Haro K, Ogawa M, Hoshina T, Kojiro M, Kusuhara K. Difference between Japanese secondary and tertiary medical facilities regarding changes in the hospitalization of children for pneumonia after the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine. *Jpn J Infect Dis* 査読有 70: 270-4, 2017.

Ichikawa S, Hoshina T, Kinjo T, Araki S, Kusuhara K: Efficacy of periodic surveillance culture in a neonatal intensive care unit in the presumption of causative pathogens of late-onset bacterial infection. *Am J Infect Control* 査読有 45:251-4, 2017.

Miyake F, Ishii M, Hoshina T, Ichikawa S, Araki S, Kinjo T, Shibata E, Hachisuga T, Kusuhara K: Analysis of the physiological variation in neutrophil CD64 expression during the early neonatal

period. *Am J Perinatol* 査読有 33:1377-81, 2016.

Ishii M, Araki S, Goto M, Yamamoto Y, Kusuhara K: CCL2 level is elevated with metabolic syndrome and CXCL10 level is correlated with visceral fat area in obese children. *Endocr J* 査読有 63:795-804, 2016.

Kawase M, Hoshina T, Nakamoto T, Asai H, Ishii M, Kusuhara K: Serial Changes of serum cytokine in a pediatric patient with severe fever with thrombocytopenia syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 査読有 35:359-60, 2016.

Yamamoto N, Sato K, Hoshina T, Kojiro M, Kusuhara K: Utility of ferritin as a predictor of the patients with Kawasaki disease refractory to intravenous immunoglobulin therapy. *Mod Rheumatol* 査読有 25:898-902, 2015.

Hoshina T, Nanishi E, Kanno S, Nishio H, Kusuhara K, Hara T: The uselessness of procalcitonin in the diagnosis of focal bacterial central nervous system infection. *J Infect Chemother* 査読有 21:620-2, 2015.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

楠原 浩一 (KUSUHARA Koichi)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20243941

### (2)研究分担者

保科 隆之 (HOSHINA Takayuki)  
産業医科大学・医学部・講師  
研究者番号：30398078

石井 雅宏 (ISHII Masahiro)  
産業医科大学・大学病院・助教  
研究者番号：30461560

### (3)連携研究者

神蘭 淳司 (KAMIZONO Junji)  
産業医科大学・医学部・非常勤医師  
研究者番号：50299616

宮川 隆之 (MIYAKAWA Takayuki)  
産業医科大学・医学部・非常勤医師  
研究者番号：90219733