

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 2 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591304

研究課題名（和文）非定型肺炎病原体の簡易迅速診断法の特許開発

研究課題名（英文）Development of a rapid and simple diagnostic method for detection of atypical pneumonia pathogen

研究代表者

宮下 修行（MIYASHITA NAOYUKI）

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50278917

研究成果の概要（和文）：呼吸器感染症の重要な病原体であるマイコプラズマと肺炎クラミジアの簡易迅速診断法を開発した。本法は精製抽出菌体を使用したイムノクロマトグラフィ法で、IgM抗体を定性的に検出する方法である。10分以内に判定可能な迅速性を有し、かつ実地医療で使用可能な簡便性を兼ね備えている。基礎検討では、高い特異性と再現性を確認し、臨床研究でも世界標準法と良好な相関性が示された。さらに肺炎患者の臨床像を詳細に解析し、非定型肺炎と細菌性肺炎を鑑別する方法も考案し、その臨床的有用性を確認した。

研究成果の概要（英文）：We developed a rapid and simple diagnostic method for detection of atypical pathogens, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae*, which is major cause of respiratory tract infections. Immunochromatographic test for the detection of IgM antibodies against atypical pathogens has been developed at present. The test can be performed and evaluated in 10 minutes. Basic and clinical results of this test showed good agreement with other world standard serological tests. In addition, we developed a clinical diagnostic method for suspect atypical pneumonia and confirmed the clinical usefulness.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症診断学

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦での呼吸器感染症に関する大きな特徴は、病原体に対する薬剤耐性化率が年々進んでいることで、実地医療では耐性菌増加抑止を目指した適正抗菌薬使用が求められている。

(2) 非定型肺炎病原体(マイコプラズマ、肺炎クラミジア)は世界的に呼吸器感染症の重要な原因菌で、ときに急性呼吸不全を呈する劇症型もみられ、近年、報告が増加している。

(3) 呼吸器感染症病原体に対する薬剤耐性化率が極めて高い本邦では、呼吸器感染症診療に際し耐性菌の少ない欧米の診療指針(ガイドライン)を導入することはできない。

(4) さらに近年、マイコプラズマの薬剤耐性株が日本各地で急速に増加していることが大きな問題となっている。しかし、現時点では欧米での耐性株出現の報告は少ない。

2. 研究の目的

(1) 迅速診断で原因菌を推定することができれば、狭域で有効な抗菌薬を選択することができ、耐性菌蔓延の抑止につながる。しかし、現存する非定型肺炎病原体検査法は多くの問題点があり、実地医療で大きな混乱を招いている。

(2) 適切な抗菌薬を選択するには、原因菌を迅速かつ簡便に診断することが最も重要である。しかし、現存するいずれの検査法も熟練や特殊な設備、時間を要することから、実地医療で簡便に判定できる迅速診断法の開発を計画した。

(3) 検査法以外に臨床像から病原体を推定する方法を考案し、その有用性を証明した。したがって、本鑑別法をより簡便かつ高感度な方法に改良することを計画した。

3. 研究の方法

(1) マイコプラズマおよび肺炎クラミジアの精製抽出菌体を使用したイムノクロマトグラフィー法を開発する。Immunoglobulin M抗体を定性的に検出する方法で、数分以内に判定可能な迅速性

を主目的とする。その後、簡易デバイスを作成し、基礎検討での有用性を確認後、急性呼吸器感染症患者を対象とした多施設共同研究を実施する。

(2) サーマルサイクラーなど特別な機器を必要としない遺伝子アッセイ系—LAMP(loop-mediated isothermal amplification)法を確立する。基礎検討での有用性を確認後、急性呼吸器感染症患者を対象とした多施設共同研究を実施する。

(3) 肺炎患者の背景因子、臨床症状、身体診察所見、検査成績、胸部画像、予後因子などを詳細に解析し、細菌感染症と非定型病原体感染症を鑑別するための項目、基準について検討する。臨床的有用性を市中肺炎患者を対象に多施設共同研究で確認する。

4. 研究成果

(1) 非定型病原体(マイコプラズマと肺炎クラミジア) IgM抗体検出用簡易迅速検査法の確立

① マイコプラズマと肺炎クラミジアの精製抽出菌体を使用したイムノクロマトグラフィー法を開発し、簡易デバイスの作成に成功した。

② 迅速性の検討: IgM抗体を定性的に検出する方法で、10分以内に判定可能であることを確認した。

③ 検体量の検討: 患者血清1滴(約10 μ l)と、きわめて少ない血清で測定可能な、簡便性を兼ね備えている。また、全血での測定が可能であり、血清分離の不必要な点が利点である。

④ カットオフ値の設定: 世界標準法での陽性基準を示す濃度をカットオフコントロールとして、カットオフインデックスに相当するシグナル/カットオフ値(S/C0) 1.1を陽性のカットオフとした。また、501例の成人ボランティアのシグナル/カットオフの分布から、平均 \pm 3.5 SDに相当する0.5を陰性のカットオフとした。シグナルカットオフ値の1.1は、ボランティア分布の平均 \pm 9.0 SDに相当する。

⑤ 特異性の検討: クラミジア属菌(*C. psittaci*, *C. trachomatis*, *C. pecorum*, *C. felis*, *C. abortus*, *C. muridarum*, *C. caviae*,

C. suis) やマイコプラズマ属菌 (*M. arthritidis*, *M. buccale*, *M. faucium*, *M. fermentans*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. lipophilum*, *M. orale*, *M. salivarium*, *Ureaplasma urealyticum*)、主要な呼吸器病原体 (百日咳菌、バラ百日咳菌、サイトメガロウイルス、EBウイルス、ルベラ、トキソプラズマなど) のIgM抗体陽性血清に交差反応を示さず、高い特異性が確認された。また、リウマチ因子陽性血清や自己抗体陽性血清にも交差反応を示さなかった。

⑥再現性の検討：既存のマイコプラズマ、肺炎クラミジアIgM陽性検体、陰性血清検体を使用し、各々10回の測定で高い再現結果が示された。

⑦測定に影響を及ぼすと思われる妨害物質の影響の検討：非胞合型ビリルビン 18 mg/dL、胞合型ビリルビン 19.3 mg/dL、ヘモグロビン 482 mg/dL、乳び 1430 ホルマジン濁度、リウマチ因子 (IgM型) 500 IU/ML まで影響を受けないことを確認した。

⑧血清検体の保存安定性の検討：血清検体は、2～8℃の冷蔵保存で48時間まで影響がないことを確認した。48時間を超える場合は冷凍 (-20℃以下) で保管する。また、25℃保管の48時間保管検体で、S/CO値の低下傾向を認めたが、全ての検体の判定に影響を及ぼさなかった。

⑨血清検体の凍結融解の検討：凍結融解を3回および5回繰り返しても、結果に影響を及ぼさないことを確認した。

⑩既知血清での経時的比較：経時的に採取されたマイコプラズマ肺炎と肺炎クラミジア肺炎症例の血清を使用し世界標準法と比較したが、いずれの検体でも同様の抗体推移を示した。

⑪臨床研究：急性呼吸器感染症患者を対象とした1年間の多施設共同研究では、世界標準法と良好な相関性 (マイコプラズマ：感度 97%、特異度 81%;肺炎クラミジア：感度 94%、特異度 79%) が示され、本検査法の臨床的有用性が示唆された。ただし、偽陽性が20%程度存在することを留意しなければならない。

⑫多施設共同研究は現在も継続中で、今後さらに臨床検体を集積し、その有用性を検証していく予定である。

(2) LAMP法の確立

①感度の検討：10倍段階希釈した精製菌体を

対象とした比較検討では、real-time PCR法と同等の感度で、菌量が多い場合15分以内で検出可能であった。

②特異性の検討：マイコプラズマ属菌 (上記) やクラミジア属菌 (上記)、主要な呼吸器感染症病原体 (肺炎球菌、インフルエンザ菌、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、化膿連鎖球菌、肺炎桿菌、緑膿菌、結核菌、腸球菌、大腸菌、レジオネラ・ニューモフィラなど計40種類) に交差反応を示さず、高い特異性が確認された。

③再現性の検討：既存のマイコプラズマ、肺炎クラミジア陽性検体 (数コピー～数百コピー)、陰性検体を使用し、各々10回の測定で高い再現結果が得られた。

④臨床研究：急性呼吸器感染症患者を対象とした1年間の多施設共同研究では、従来から用いてきたreal-time PCR法と良好な相関性 (マイコプラズマ：感度 97%、特異度 98%;肺炎クラミジア：感度 95%、特異度 94%) が示された。

⑤多施設共同研究は現在も継続中で、今後さらに臨床検体を集積し、その有用性を検証していく予定である。

(3) 臨床的鑑別法の確立

①鑑別表の作成：市中肺炎症例を詳細に解析し、大項目 (年齢、基礎疾患、迅速診断、白血球数) 4つと小項目 (胸部画像、身体診察所見、咳の程度、周囲の感染症) 4つからなる鑑別表を作成した。

②臨床研究：市中肺炎患者を対象とした1年間の多施設共同研究では、年齢別に感度と特異度が異なることが判明し、とくに10歳、20歳代では感度、特異度ともが90%以上と、若年成人群では本鑑別法がきわめて有用であることが示された。しかし、年齢が上昇するとともに感度、特異度とも低下し、50歳以上では感度が70%以下であった。したがって、本鑑別法は50歳未満の症例で使用すべきであり、実地医療で経験する50歳以上の肺炎症例では非定型病原体と細菌の両者をカバーする抗菌薬の選択をすべきと考えられた。

(4) 簡易迅速検査法の今後の展望

簡易かつ迅速な検査法の確立は、適正抗菌薬使用に直結し、その結果、治療効果の向上はもちろん医療資源の節減 (医療費の削減や入院期間の短縮) に寄与する。また、不適切な抗菌薬乱用を是正し、耐性菌の蔓

延防止に寄与する。さらに適切な診断と治療は、非定型肺炎病原体の引き起こす二次性慢性炎症性疾患（喘息など）の予防につながる。

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)

①Miyashita N, Ouchi K. (他 6 名, 1 番目, 4 番目) Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in adolescents with community-acquired pneumonia. 査読有 BMC Infect Dis 12, 126, 2012, URL: <http://www.biomedcentral.com/bmcinfectdis/content>

②Miyashita N, Ouchi K. (他 5 名, 1 番目, 4 番目) Influence of age in the clinical differentiation of atypical pneumonia in adults. 査読有 Respiriology, 17, 354-362, 2012, DOI: 10.1111/j.1440-1843.2012.02188.x.

③Miyashita N, Ouchi K. (他 7 名, 1 番目, 5 番目) Clinical features and the role of atypical pathogens in nursing and healthcare-associated pneumonia (NHCAP): differences between teaching university hospital and community hospital. 査読有 Intern Med 51, 585-594, 2012, URL: <http://www.naika.or.jp/imonline/index.html>

④Miyashita N, Ouchi K. (他 3 名, 1 番目, 4 番目) Clinical potential of diagnostic methods for the rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in adults. 査読有 Eur J Clin Microbiol Infect Dis 30, 439-446, 2011, URL: <http://www.springerlink.com/content/0934-9723/>

⑤Miyashita N, Ouchi K. (他 2 名, 1 番目, 4 番目) Evaluation of serological tests for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection in adolescents and adults. 査読有 Respiriology, 16, 1189-1195, 2011, DOI: 10.1111/j.1440-1843.2011.02024.x.

⑥Miyashita N, Ouchi K. (他 7 名, 1 番目, 5 番目) Outbreak of pertussis in a university laboratory. 査読有 Intern Med 50, 879-885, 2011, URL: <http://www.naika.or.jp/imonline/index.html>

tml

⑦Miyashita N, Ouchi K. (他 7 名, 1 番目, 8 番目) Community-acquired macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in patients with over 18 years. 査読有 J Infect Chemother 17, 114-118, 2011, URL: <http://www.springerlink.com/content/1341-321X>

⑧Miyashita N, Ouchi K. (他 3 名, 1 番目, 4 番目) Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia. 査読有 Int J Antimicrob Agent 36, 384-385, 2010, URL: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/09248579>

⑨Miyashita N, Ouchi K. (他 4 名, 1 番目, 4 番目) Evaluation of false-positive reaction with ELISA for the detection of *Chlamydomydia pneumoniae*-specific IgM antibody in adults. 査読有 Jpn J Infect Dis 63, 150-151, 2010, URL: <http://www.nih.go.jp/niid/ja/jjid.html>

⑩Miyashita N, Ouchi K. (他 6 名, 1 番目, 6 番目) Radiographic features of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: differential diagnosis and performance timing. 査読有 BMC Med Imaging 9, 7, 2009, URL: <http://www.biomedcentral.com/bmcmedimaging/>

[学会発表] (計 10 件)

①Miyashita N. Evaluation of the serological tests for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection in adolescents and adults. American Conference of Chest Physician Annual Meeting, 2011年10月25日, Honolulu, USA.

②Miyashita N. Comparison of antibiotic efficacy against pertussis in catarrhal phase and paroxysmal phase. American Conference of Chest Physician Annual Meeting, 2011年10月25日, Honolulu, USA.

③Miyashita N. Clinical potential of diagnostic methods for the rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in adults. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases / 27th International Congress of Chemotherapy,

2011年5月9日, Milan, Italy.

④Miyashita N. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Japan. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases / 27th International Congress of Chemotherapy, 2011年5月9日, Milan, Italy.

⑤Miyashita N. Clinical evaluation of two interferon-gamma release assay (IGRA) tests for immunocompromised patients. 20th Annual Congress of the European Respiratory Society, 2010年9月18日, Barcelona, Spain.

⑥Miyashita N. Comparative study of therapeutic effects of combined chemotherapy including various doses of clarithromycin for pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. 20th Annual Congress of the European Respiratory Society, 2010年9月18日, Barcelona, Spain.

⑦Miyashita N. Recent advance in management of Legionella infection. 1st Legionella Workshop in China, 2010年6月30日, Shenyang, China.

⑧Miyashita N. Genome-wide screening of pathogen effectors in *Chlamydia pneumoniae* using a yeast expression system. 12th International Symposium on Human Chlamydial Infections, 2010年6月21日, Salzburg, Austria.

⑨Miyashita N. Radiographic features of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: differential diagnosis and performance timing. American Conference of Chest Physician Annual Meeting, 2009年10月31日, San Diego, USA.

⑩Miyashita N. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in patients with community-acquired pneumonia in Japan. American Conference of Chest Physician Annual Meeting, 2009年10月31日, San Diego, USA.

[図書] (計10件)

①宮下修行: 診断と治療社, マイコプラズマ、クラミジア。診断に役立つ学べる感染症, 17-19, 2012

②宮下修行: 医薬ジャーナル社, 細菌性、非定型肺炎は鑑別したほうがよいか? 呼吸器感染症, 180-184, 2011

③宮下修行: 医薬ジャーナル社, クラミジア・ニューモニエ。病原菌の今日的意味, 672-689, 2011

④宮下修行: 南江堂, クラミジア感染症。感染症専門医テキスト, 888-896, 2011

⑤宮下修行: 南江堂, クラミジア属感染症の検査。感染症専門医テキスト, 152-153, 2011

⑥宮下修行: 日本医事新報社, 細菌性肺炎と非定型肺炎の鑑別について。ガイドライン/ガイドダンス 市中肺炎, 32-36, 2010

⑦宮下修行: 南江堂, クラミドフィルニューモニエ肺炎。呼吸器疾患最新の治療 2010-2012, 238-240, 2010

⑧宮下修行: エディターシップ, オウム病、肺炎クラミジア感染症。図説臨床看護医学デジタル版8「感染症」, 2010

⑨宮下修行: 南江堂, クラミジア・ニューモニエ肺炎。呼吸器感染症のすべて, 139-145, 2009

⑩宮下修行: 日本医事新報社, 肺炎クラミジア肺炎。New 専門医を目指すケース・メソッド・アプローチ11, 74-84, 2009

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 修行 (MIYASHITA NAOYUKI)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50278917

(2) 研究分担者

尾内 一信 (OUCHI KAZUNOBU)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：80351899

(3) 連携研究者

()

研究者番号：