

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590843

研究課題名(和文) 網羅的迅速病原体遺伝子検出法の開発と公衆衛生への応用の評価

研究課題名(英文) Development of rapid, multi-targeted detection method for microbial pathogens and application for public health

研究代表者

高橋 和郎 (TAKAHASHI, KAZUO)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・その他

研究者番号：10171472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：種々の感染症の原因微生物を従来法と比較して迅速且つ高感度で網羅的に検出する方法(Qプローブ法)を作製した。百日咳疑い患者197例の検討では従来のLAMP法と比較し、より迅速に検査が可能で、同等の性能を示した。マイコプラズマ感染症患者58例の検討では、72%でマクロライド系抗生物質に耐性であることが1時間以内で判明し、有効な抗生剤を選択し治療期間を短縮できることが示された(従来法では不可能である)。カンピロバクター集団発生例17名の検討では、Qプローブ法は従来の培養法より非常に迅速に診断でき、また同等の性能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We developed more rapid(within 1 hour including DNA extraction), highly sensitive, multi-pathogen-targeted detection methods (referred to Q probe method) against representative pathogens of infectious diseases. The Q-probe method for pertussis revealed almost equivalent quality with more rapid performance compared to a conventional LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) method. The Q-probe method for mycoplasma infection revealed that 72% of M.pneumoniae was defined within 1 h to be resistant to macrolide type of antibiotics, suggesting that this more rapid method confers shortening the treatment period. The Q-probe method for campylobacter also revealed its superior quality with more rapid performance compared to a conventional culture isolation method.

研究分野：感染症学 ウイルス免疫学

キーワード：起因微生物 迅速 PCR法 網羅的 Qプローブ法 感染症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 地方自治体において、各種感染症や食中毒の発生に際して迅速な公衆衛生対策に対応するため、その起因病原体診断(行政検査)には、高感度、高特異性で迅速な高性能の検査法が求められる。現状のリアルタイムPCR法による遺伝子検査法の所要時間は約4時間を要し、さらに検査の迅速化が求められる。

(2) 平成22年秋に、全自動で検体の核酸抽出からPCR反応、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(現行の方法ではもっとも迅速である)で行い、また最少検出可能遺伝子数が10コピーと高感度で検査が可能な測定機器が開発上市された。また、この装置の重要な特徴は遺伝子増幅部位中の1塩基の変異をも同時に検出することができる(SNIP解析)点で、薬剤耐性遺伝子変異の有無を同時に迅速に検出することが可能である。しかし、各種病原微生物を性能よく検出可能な検出系が確立されていない。

## 2. 研究の目的

本課題の研究目的は、上記装置を用いて各種病原体を高感度、高特異的に、且つ迅速に診断する方法(試薬内容や反応条件)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、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し、実際の検査診断に応用して、迅速な公衆衛生的感染対策を可能とすることを目的とする。また、マイコプラズマ感染症では、近年マクロライド耐性肺炎マイコプラズマによる感染が増加してきているが、この現状を把握し、臨床上の特徴を明らかにし、適切な治療方針策定について検討することも目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) Qプローブ法による病原微生物の検出法の作製  
対象病原体はノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス、食中毒菌、インフルエンザウイルスである。PCR法の作

製については、各病原体について現行のPCR法と同じ標的遺伝子とし、プライマーとプローブを設計する。検出感度を確定するために標的遺伝子のDNAを作製する。この陽性コントロールを用いてプライマーとプローブの最適濃度を決定し、さらに最少検出感度を決定し、10-20コピーを高感度に検出する反応条件を見いだす。感染性胃腸炎ウイルスと食中毒菌の検出は複数の病原体を同時に検出可能なマルチプレックス型PCR法を作製し、一回のPCR検査で診断が可能となる検査法を確立する。インフルエンザウイルスの同定に関しては、A型、B型の型別とH1、H3亜型の型別、また抗ウイルス剤に対する耐性の有無を同時に判定するPCR法を作製する。

(2) 臨床検体へ応用しその検査法の性能を評価する。

上記の各種疾患患者の各種検体を対象に本方法を用いて病原体を検出する。同時に現行法(従来のPCR法やLAMP法)でも検査し、その結果を比較することにより本方法の性能(感度と特異性)を評価する。病原体サーベイランスや集団発生における感染性胃腸炎、食中毒患者検体、呼吸器感染症患者特にマイコプラズマ肺炎、インフルエンザ患者検体を検査する。

(3) マイコプラズマ感染症におけるマクロライド耐性菌感染の臨床的特徴を明らかにするために、種々の臨床所見、検査所見との関連について検討する。

## 4. 研究成果

(1) Qプローブ法を用いたマクロライド耐性マイコプラズマ感染症における臨床的特徴: Qプローブ法でマイコプラズマ感染症と診断された58例中42例(72.4%)でマクロライド耐性であった。耐性菌と感受性菌感染患者の2群における比較検討から以下の結論を得た。抗菌薬治療開始後の有熱期間は耐性株の場合の方が有意に長い。(中央値6 vs 2日) 感受性株群ではMLにより中央値2日で解熱した。耐性株症例では2~3

種類の抗菌薬を使用しており、ミノマイシン開始病日と有熱期間は正に相関し、開始後平均1.6日後に解熱した。以上の結果から提言できることは、1) Qプローブ法により1時間以内に迅速にマクロライド耐性の有無を診断することにより、有効な抗生剤を選択して治療期間を短縮でき、また入院率を低下させることが期待できる。2) 抗菌薬開始後2日で解熱しない場合、薬剤変更を考慮すべきである。

(2) Qプローブ法を用いた高感度迅速微生物検査法の作製：細菌性腸管感染症の原因であるカンピロバクター、サルモネラ、腸炎ビブリオおよび呼吸器感染症の原因である百日咳菌、インフルエンザウイルスに対する高感度迅速Qプローブ法(検出感度10コピー以下)を作製した。

(3) カンピロバクター集団発生例17名について培養法と比較して性能を評価した結果、感度は100%、特異度は89%であり、培養法で陰性、Qプローブ法で陽性であるのが1検体認められた。1回の検査所要時間は1時間以内であった。本結果よりQプローブ法は従来の培養法と同等の性能であることが明らかとなった。

(4) 外来迅速検査でインフルエンザと診断された8名の患者の咽頭スワブを検査した結果、6例がH1亜型、2例がH3亜型で、H1亜型はすべてオセルタミビル感受性であった。1回の検査所要時間は検体処理から2時間以内で有り、リアルタイムPCR法と比較してより迅速に検査が可能であった。

(5) 小児百日咳疑い症例197例の咽頭あるいは鼻腔ぬぐい液検体をQプローブ法およびLAMP法で検査した。LAMP法は等温で、所要時間2時間程度の遺伝子増幅検査法である。その結果、2方法で一致しない結果であった例が2例認められた。感度は98.4%、特異度は99.3%であり、陽性検体はすべてB. pertussisであった。以上より、Qプローブ法はLAMP法と比較して同等の性能を有すると考えられる。

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 2件)

中野景司、辻 章志、谷内昇一郎、金子一成、高橋和郎

Qプローブ法を用いたマクロライド耐性肺炎マイコプラズマの臨床経過の検討  
第44回日本小児感染症学会

2012年11月24日-25日

北九州市

高野智子、田尻 仁、高橋和郎

小児のマクロライド耐性マイコプラズマ肺炎の臨床像の検討

日本感染症学会

2013年6月10日 12日

東京都

[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：  
出願年月日：  
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

高橋 和郎 (TAKAHASHI Kazuo)

大阪府立公衆衛生研究所 副所長兼感染症部長

研究者番号：10171472

(2) 研究分担者

左近 直美 (SAKON Naomi)

大阪府立公衆衛生研究所 感染症部ウイルス課 主任研究員

研究者番号：50291216

(3) 研究分担者

倉田 貴子 (KURATA Takako)

大阪府立公衆衛生研究所 感染症部ウイルス課 主任研究員

研究者番号： 70435890