

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670268

研究課題名(和文) 新規高感度迅速起因菌同定法とNF- κ B病態解析法を統合した敗血症検査システム構築研究課題名(英文) The integrated system with Tm mapping and the FCS-based NF- κ B assay for sepsis patients

研究代表者

北島 勲 (Kitajima, Isao)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：50214797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Eukaryote made Taq DNA polymeraseの安定した生産体制を確立し、子宮感染症に対して羊水中マイコプラズマ、細菌の迅速同定プロトコルを提案した。次に、16SリボソームDNAに対してリアルタイムPCRから各melting temperature (Tm)値を算出するTm mapping法を開発し、敗血症患者の血液から直接100菌種以上を同定し血液培養法と高い一致率を得た。次に、蛍光相関分光法(FCS)によるNF- κ B活性化定量法を開発し、SIRS病態の早期診断有用性を明らかにした。Tm mapping法とNF- κ B活性化定量測定との組み合わせは敗血症早期治療に有用となる。

研究成果の概要(英文)：The earliest possible identification of pathogenic microorganisms is critical for selecting appropriate antimicrobial therapy. We developed a nested-PCR-based assay for detecting Mycoplasma and other bacteria in amniotic fluid samples using eukaryotic, thermostable DNA polymerase. Next, a "melting temperature (Tm) mapping method" was developed for identifying a broad range of bacteria. Employing primer sets for a 16S ribosomal gene, more than 100 bacterial species can be identified. Nuclear transcription factor-kappa B (NF- κ B) activation plays a key role in the regulation of immune responses to inflammation. We developed an experimental apparatus for detection of NF- κ B activation based on fluorescence correlation spectroscopy (FCS), which permits analysis of DNA-protein binding in the liquid phase. FCS was performed using the single-molecule fluorescence detection system. We have integrated Tm mapping and the FCS based NF- κ B assay and are conducting clinical trials in sepsis patients.

研究分野：臨床検査

キーワード：感染症 微生物 敗血症 遺伝子検査 転写因子 1分子計測

1. 研究開始当初の背景

重篤な感染症発症患者を救命するためには、検体中の起因菌を可能な限り迅速に検出・同定することが临床上重要である。しかし、現在の検出法では同定までに数日を要し、広範囲スペクトラム抗菌薬の結果、多剤耐性菌出現も問題となっている。従って臨床現場の要求に応じて、感染症迅速検査法開発競争が熾烈化している。例えば細菌抗原検出や質量分析法が注目されているが、培養コロニーからの診断であるため結果を得るまで 10~24 時間を要する (Annu. Rev. Anal. Chem. 1:71-93, 2008)。さらに敗血症に至ると全身反応性炎症症候群(SIRS)を呈し救命率が著しく低下する。我々は、問題解決のための新検査システム構築に挑戦する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、検体採取後 2 時間以内に感染症起因菌同定と全身炎症性症候群の炎症病態をリアルタイムにモニタできる検査システムの臨床実用化することである。我々は独自開発による eukaryote-made Taq polymerase を用いた高感度化と融解温度 (melting temperature : T_m 値) 組合せを図式化した同定法により 2 時間以内に感染微生物を網羅的検索するシステムを確立する。さらに全身性炎症反応症候群(SIRS)病態の鍵を握る転写因子 NF-κB 活性の迅速解析法を確立し両者を統合し総合評価することで、適切な抗菌薬選択と SIRS 病態を迅速に把握できるようになり、我が国の敗血症由来 SIRS 救命率向上に貢献することができる。

3. 研究の方法

(1) 血液検体からリンパ球分離と血漿中細菌 DNA 迅速簡便抽出法 : EDTA-2Na 採血管採血後溶血剤で白血球吸着フィルター膜にてリンパ球を分離回収し、核蛋白を抽出する。その残余血漿を遠心し、上清を再度 2 万回転以上で高速遠心後に得られる沈渣物に細菌 DNA 検出用抽出溶液に加え、細菌 16S

ribosomal DNA プライマーを利用した PCR にて細菌 DNA を検出する。

(2) バクテリアフリー eukaryote-made Taq polymerase の安定した生産体制確立 : 真核生物を宿主としたリコンビナント Taq polymerase を独自開発し、バクテリア DNA フリーの Taq 酵素作成に初めて成功した。Eukaryote-made Taq polymerase がバクテリア DNA コンタミフリーとするために全工程で抗菌薬を作用させた生産体制を確立する。

(3) 起因菌同定 T_m マッピング法検索精度向上 : 起因菌同定ソフトウェアは 7 つの T_m 値の平均値からの距離を測定し、データベースの距離と比較することで、Buffer や機器による測定誤差を補正する。7 つの T_m 値が 2 次元で描く“形”の解析で未知の起因菌を同定する。検体種毎にデータベースを分け、T_m 値の入力時に検体種を選択出来るシステムにすることでより利便性を高くし、データベース充実による検索システムを向上させる。

(4) 感染症の患者検体を血液 (敗血症)、羊水 (胎児子宮内感染症) で検討する。とくに羊水中のマイコプラズマ、ウレアプラズマ、細菌、真菌感染検査のプロトコールを作成する。

(5) FCS を基盤にした生物試料中からの特異的 NF-κB 活性化測定法の確立と改良 : 生物試料中の核蛋白から直接 NF-κB 量を測定するために、蛍光標識プローブに対し、非標識 NF-κB 特異結合プローブ過剰量入れた競合反応並進拡散時間と蛍光標識プローブに対し非標識 NF-κB 非結合プローブを過剰量入れた並進拡散時差で特異的 NF-κB 結合量を測定する。

(6) 血液検体から起因菌同定 T_m マッピング法と FCS による転写因子活性化定量測定を融合した検査システムを構築する。

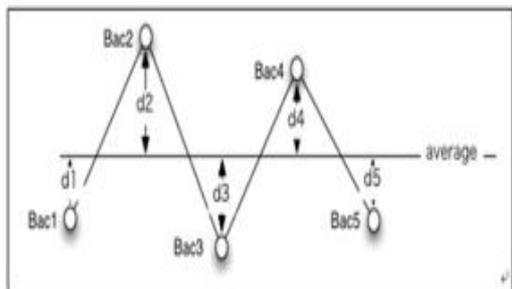
4. 研究成果

(1) バクテリアフリー eukaryote-made Taq polymerase の安定した生産体制確立

バクテリアフリーの eukaryote-made Taq polymerase は純水を PCR100 サイクルでも コンタミネーションは検出されなかった。

(2) T_m マッピング法による計算式から T_m 値の図式化による評価法の確立

7つの T_m 値の平均値からの距離を測定し、



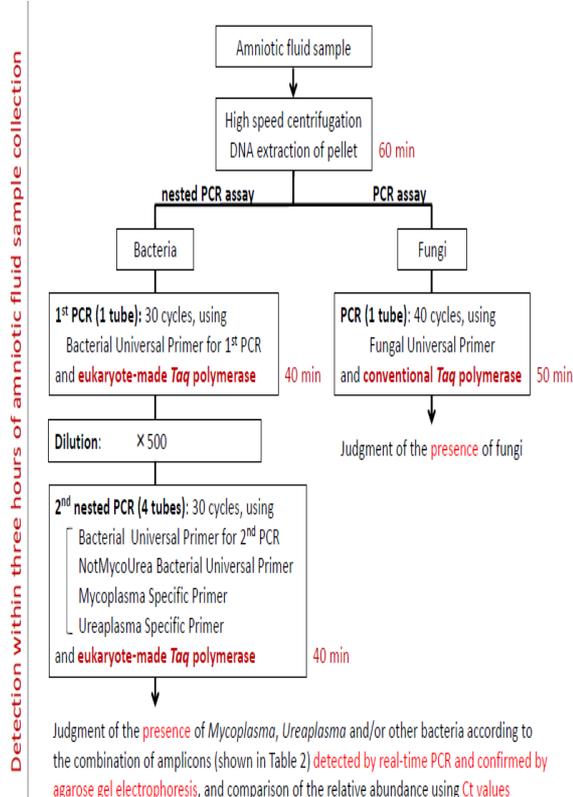
$$\text{Distance} = \sqrt{(d1_{ob} - d1_{av})^2 + (d2_{ob} - d2_{av})^2 + \dots + (dn_{ob} - dn_{av})^2}$$

データベースの距離と比較することで、Buffer や機器による測定誤差を補正できた。7つの T_m 値が 2 次元で描く“形”の解析で未知の起因菌を同定できた。検体種毎にデータベースを分け、T_m 値入力時に検体種を選択出来るシステムにして、利便性を高くし、データベース充実による検索システムを向上させた。

(3) 羊水（胎児子宮内感染症）のマイコプラズマ、ウレアプラスマ、細菌、真菌感染検査のプロトコルを作成した。

胎児子宮内感染症疑い 300 検体を本プロトコルに則り、培養法との一致率を解析した結果、マイコプラズマ検出 93.3 % (280/300)、ウレアプラスマ検出 89.3 % (263/300)、細菌検出 99.7 % (299/300) の高い有用性が確認できた。

(4) 敗血症血液検体の T_m マッピング法解析：100 菌種程度の細菌を迅速に同定する。我々は、敗血症が疑われた患者から全血 200 検体を本法で解析した。85.5% (200 検体中 171 検体) において、陽性と陰性を合計した結果が血液培養法と一致した。T_m mapping 法で 130 検体が陰性であり、128 検体が培養法で陰性 98.5%(128/130) が両者一致した。



(5) FCS を基盤にした生物試料中からの特異的 NF-κB 活性化測定法確立

蛍光標識プローブ (1 nM) : 非標識 NF-κB 特異結合プローブ過剰量 (50 nM) の競合反応並進拡散時間と蛍光標識プローブ (1 nM) : 非標識 NF-κB 非結合プローブ過剰量 (50 nM) の競合反応並進拡散時間の差が特異的 NF-κB 活性量として定量測定できることを確立した。この方法の臨床応用として、がん患者の周術期における NF-κB 活性化定量解析を行った。2 症例は手術中 2 時間でリンパ球中の NF-κB 活性化が上昇し、全身性炎症反応症候群(SIRS)に罹患した。

(6) 血液検体から起因菌同定 T_m マッピング法と FCS による転写因子活性化定量測定を融合した検査システムの構築



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 7 件)

(1) Shirahata A, Takahashi H, Kitajima I, Tsuji H, Eguchi Y, Matsushita T, Kajiki M, Honda G, Sakata Y: Recombinant soluble human thrombomodulin (thrombomodulin Alfa) in the treatment of neonatal disseminated intravascular coagulation. *European Journal of Pediatrics* 2014;173(3):303-11

(2) Asakura H, Takahashi H, Matsushita T, Ninomya H, Honda G, Mimuro J, Eguchi Y, Kitajima I, Sakata Y: Post-marketing surveillance of thrombomodulin alfa, a novel drug for treatment of disseminated intravascular coagulation treatment-Safety and efficacy in 1,032 patients associated with hematologic malignancy. *Thromb Res.* 2014;133:364-370.

(3) Mastusita T, Watanabe J, Honda G, Mimuro J, Tsuji H, Eguchi Y, Kitajima I,

Sakata Y: Thrombomodulin alfa treatment in patients with acute promyelocytic leukemia and disseminated intravascular coagulation: a retrospective analysis of an open label multicenter postmarketing surveillance study cohort. *Thromb Res.* 2014;133(5):772-81.

(4) Eguchi Y, Gando S, Ishikura H, Saitoh D, Mimuro J, Takahashi H, Kitajima I, Tshuji H, Matsushita T, Tsujita R, Nagao O, Sakata Y: Post-marketing surveillance data of the thrombomodulin alfa: sub-analysis in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Journal of Intensive Care.* 2014;2:30.

(5) Harada K, Mikuni S, Beppu H, Niimi H, Abe S, Hano N, Yamagata K, Kinjo M, Kitajima I: A rapid and high-throughput quantitation assay of the nuclear factor-κB activity using fluorescence correlation spectroscopy in the setting of clinical laboratories. *PLOS One* 2013 Oct;8:e75579

(6) Mimuro J, Takahashi H, Kitajima I, Tsuji H, Eguchi Y, Matsushita T, Kuroda T, Sakata Y: Impact of recombinant soluble thrombomodulin (thrombomodulin alfa) on disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res.* 2013 May;131(5):436-43.

(7) Madoiwa S, Kitajima I, Ohmori T, Sakata Y, Mimuro J: Distinct Reactivity of the Commercially Available Monoclonal Antibodies of D-dimer and Plasma FDP Testing to the Molecular Variants of Fibrin Degradation Products. *Thromb Res.* 2013 Oct;132(4):457-64.

{ 学会発表 } (計 6 件)

(1) Niimi H: The Tm mapping method. A novel rapid, easy, and cost-effective method that identifies unknown pathogenic

microorganisms within 3 hours of patient sample collection. Microbiology and Infectious Diseases Asia Congress. 2014, 6.10th-11th, Singapore.(invited lecture)

(2) Niimi H, Ueno T, Hayashi S, Abe A, Tsurue T, Mori M, Tabata H, Minami H, Goto M, Saito S and Kitajima I. The Melting Temperature (Tm) Mapping Method: A Novel Method That Enables Rapid Identification of Unknown Pathogenic Bacteria In Sepsis Within Three Hours of Whole Blood Collection. ECCMID 2014, 2014 May 10-13 Barcelona, Spain

(3)Niimi H, Ueno T, Kitajima I: The Melting Temperature (TM) Mapping Method: A Novel Method That Enables Rapid Identification of Unknown Pathogenic Microorganisms within Three Hours of Patient Sample Collection. The 9th International Conference of Clinical Laboratory Automation and Robotics, 2014,4,17th -19th ,Yokohama

(4)Kitajima I, Hirano K, Tani M, Tanaka K:Novel haemostatic biomarkers in acute cardioembolic stroke, 2013 American Association for Clinical Chemistry Annual Meetin,; 2013, July 28-Augst 1; Houston.

(5)Kitajima I, Hirano K, Tani M, Tanaka K: Novel haemostatic biomarkers in acute cardioembolic stroke. 20th European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2013, May 19-23; Milano.

(6)Niimi H, Ueno T, Hayashi S, Mori M, Tabata H, Minami H, Saito S, Kitajima I: A New rapid, easy and cost-effective method that identifies unknown pathogenic microorganisms within 3 hours from sample collection. 20th European Congress

of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2013, May 19-23; Milano.
(invited lecture)

〔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

北島 勲 (Kitajima, Isao)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
教授

研究者番号：50214797

(2)研究分担者

仁井見 英樹 (Niimi, Hideki)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：50401865

(3)連携研究者

()

研究者番号：