

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860653

研究課題名(和文)HIRA-TANを利用したCOPD急性増悪の原因微生物の解析

研究課題名(英文)Analysis of microorganisms responsible for exacerbations of COPD by a semi-quantitative PCR method, HIRA-TAN

研究代表者

嶺崎 祥平 (Minezaki, Shohei)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：90648007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：HIRA-TAN法の標的病原微生物にCOPD増悪の原因の一つとして考えられるパラインフルエンザウイルスを追加し、前向きに症例の収集を開始した。安定期のCOPD患者19例において、喀痰培養またはHIRA-TAN法にて病原微生物を検出した例は7例あったが、現時点で菌検出の有無と、増悪・症状との関連を指摘することはできなかった。

COPD増悪例において、後ろ向きなものも含め解析を行ったところ、喀痰培養では115例中40例(34%)で常在菌以外の細菌を検出、HIRA-TANでは52例(45%)と、培養より多くの病原微生物を検出しており、COPD増悪の原因菌検索法として有用な可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A prospective study was performed in 19 patients with COPD. Pathogenic bacteria were detected in induced sputa obtained from 7 COPD patients at stable conditions by culture (n=2) or a semi-quantitative PCR method, HIRA-TAN (Human cell controlled Identification of Respiratory Agent from "TAN") (n=6). Viruses were not detected in any of the patients. The presence of bacteria was not related to symptoms or exacerbations during the observation period (mean 36 weeks). In a retrospective study, pathogenic bacteria in sputum were detected in 40 patients (34%) by culture and in 52 patients (45%) by the PCR method among COPD patients with exacerbations or pneumonia (n=115). It was noted that *S. pneumoniae* was more frequently detected by HIRA-TAN (20%) than by culture (5%). Viruses were not investigated in the retrospective study. These observations suggest a potential benefit of the semi-quantitative PCR method, HIRA-TAN, to detect microorganisms potentially involved in exacerbations of COPD.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：COPD

1. 研究開始当初の背景

呼吸器感染症の原因微生物は、不明な点が多く、普及している迅速診断法もインフルエンザウイルス(抗原検査)や肺炎球菌(抗原検査)などの一部の微生物にしかいないため、約半数の急性下気道感染症を発症した患者は原因微生物が不明なまま治療をうけている。日常診療における原因微生物の診断法は、呼吸器感染症患者の喀痰を培地に塗り込み、数日後に育成した微生物を同定する方法である(喀痰培養検査)。これでは診断まで時間を要すること、培養できない微生物を同定できないこと、手技が煩雑であること、検査実施者により結果に誤差がしょうじるなどの問題があるものの、これらは以前より未解決のままである(NEJM 2008: 359;22)。現在では、高価・強力・広域スペクトルの抗菌薬が普及しているため、治療に難渋する急性下気道炎は昔から比べると減少はしたものの、そのために耐性菌の出現、医療費の高騰をまねき、またそれら抗菌薬で治療できないものも存在するため、肺炎は今なお本邦の死亡原因4位であり、現在増え続けるCOPDの死亡率は死亡原因の9位まで上昇している。

上述のように、本発明はPCR法で検出された原因微生物が起炎菌か定着菌かを鑑別できる画期的なものである。肺炎患者から得られた喀痰の定量培養(CFU/ml)や喀痰のReal-time PCR法(Ct value/ μ L)を行っても、検体(喀痰)の再現性や均一性に問題があるため、喀痰中の微生物の定量法は不可能とされてきた。そこで我々は喀痰中のヒト細胞数と微生物数との細胞数(DNAコピー数)比を用いて微生物数の相対定量を表現することに成功し(ヒト細胞に比べ微生物数の大小を評価する)、定着型病原体が検出された場合、治療対象(起炎菌)と非治療対象(常在菌)とにカットオフ値を用いて鑑別できた(国内特許第4665203号取得、国際特許科学技術振興機構支援による9カ国PCT/JP2009/053976出願)。またマイコプラズマや結核菌のような非定着病原体(通常は気道に存在せず検出のみで起炎菌と確定できる病原体)もあわせて包括的にPCR法を実施することで、肺炎で治療対象となる30種類の病原体に対し、4時間以内で一括に起炎菌同定ができる迅速診断キット(HIRA-TAN: Human cell-controlled Identification of the Respiratory Agent from "TAN")の開発に成功した(Table 1. HIRA-TANの検出標的)。本発明(HIRA-TAN)は下気道感染症患者の1回の喀痰で、肺炎をおこすほとんどの原因微生物が迅速に診断でき、ルーチンに行われないウイルスや真菌も網羅的に含み、さらに検出された定着型病原体が治療対象か非治療対象か鑑別が可能である。呼吸器感染症の原因微生物における治療対象(起炎菌)と非治療対象(定着菌)。この鑑別は、一見容易に思えながら、いまだ未解決の臨床的問題であり、本発

明はその問題を解決することができる診断法である。呼吸器感染症の原因微生物を正確に判断できる上、この発明はPCRを用いているため、迅速かつ高い再現性で原因微生物を早期診断できる。また、現在PCR技術の進歩と普及により、複数のPCR反応を同時施行することが可能であり、とくに非定着病原体(呼吸器感染症ウイルスなど)は検出のみで原因微生物と確定できることもあり、これまで網羅的PCR診断に応用されている(J Clin Microbiol 2004; 42: 1564, J Clin Microbiol 2001; 39: 1696)。本研究ではそれら微生物を新たにライブラリーに追加し、今まで以上の包括的検索が可能となっている。COPDの急性増悪は細菌だけでなく、ウイルス、非定型病原体など多種の微生物が原因となりうる事から、本研究において包括的に原因微生物の検索を行う事で、これまで特定できない部分の多かった、COPD急性増悪時の原因や、定着菌との関連が明らかにできる。

1 検体あたり31種類の検出標的に対しPCR 10反応を一括に実施することで、1回につき5,000円の費用で運営を可能とし、4時間あれば全検査結果がわかる。既存の診断法で30種類の原因微生物の診断を試みると40,000円以上の検査費と結果到着まで最低2週間を要する点を考量しても、検査コストを大幅に上回る医療費削減と労働時間削減が可能である。

Table 1. HIRA-TANの検出標的(標的遺伝子)

01 <i>Homo sapiens</i> (SFTPC), Internal Control.
02 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (lyt A), CO, CAP
03 <i>Haemophilus influenzae</i> (16S rRNA), CO, CAP
04 <i>Moraxella catarrhalis</i> (copB), CO, CAP
05 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (16S rRNA), CO, HAP
06 <i>Klebsiella pneumoniae</i> (gapA), CO, HAP
07 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (23S rRNA), CO, HAP
08 <i>Acinetobacter baumannii</i> (OXA-24-like), CO, HAP
09 <i>Escherichia coli</i> (16S rRNA), CO, HAP
10 <i>Staphylococcus aureus</i> MSSA (femB), CO, HAP
11 <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (mecA), CO, HAP, DRRG
12 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (16S rRNA), NCO, CAP
13 <i>Chlamydia pneumoniae</i> (53KD-antigen), NCO, CAP
14 <i>Chlamydia psittaci</i> (ompA), NCO, CAP
15 <i>Legionella pneumophila</i> (mip), NCO, CAP
16 <i>Legionella</i> spp. (16S rRNA), NCO, CAP
17 <i>Coxiella burnetii</i> (16S rRNA), NCO, C
18 <i>Bordetella pertussis</i> (BP-485), NCO, CAP
19 <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> (MPB64), NCO, CAP
20 <i>Mycobacterium intracellulare</i> (16-23S rRNA), NCO, CAP
21 <i>Mycobacterium avium</i> (16S rRNA), NCO, CAP
22 <i>Mycobacterium kansasii</i> (dnaJ), NCO, CAP
23 <i>Nocardia</i> spp. (16S rRNA), NCO, HAP
24 <i>Pneumocystis jirovecii</i> (5S rRNA), NCO, HAP
25 Metallo- β -lactamase (IMP), DRRG
26 Metallo- β -lactamase (VIM), DRRG
27 Influenza virus A (M gene), NCO, CAP
28 Influenza virus B (NP gene), NCO, CAP
29 RS virus (F gene), NCO, CAP
30 Human metapneumovirus (N gene), NCO, CAP
31 <i>Aspergillus</i> spp. (ITS1), NCO, HAP
CO: 定着型病原体, NCO: 非定着病原体
DRRG: 薬剤耐性関連遺伝子
CAP: 市中肺炎の起炎病原体, HAP: 院内肺炎の起炎病原体

2. 研究の目的

本研究の目的はその発明を利用し、慢性閉塞性肺疾患(COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease)の急性増悪に、いかなる

微生物が関与しているのか検証し、既存の方法との検出能力を比較することである。

3. 研究の方法

40歳以上のCOPD患者でMiller-Jones喀痰分類M2-P3の膿性喀痰を用い、採取された検体(喀痰)は二分され、一方をHIRA-TANに、一方を細菌検査に使用。両者の結果の比較を行った。40歳以上のCOPD患者で、急性増悪例に関しては症状発症48時間以内にMiller-Jones喀痰分類M2-P3の膿性喀痰を用いたグラム染色と培養検査、肺炎球菌尿中抗原検査、インフルエンザ抗原検査(流行シーズン全例)、血液培養検査が行なわれ、書面で本研究の同意がえられた患者とした。採取された検体(喀痰)は二分され、一方をHIRA-TANに、一方を細菌検査に使用した。既存の方法による菌診断については

- ・Gram染色で当該病原体と形態学的に矛盾しない病原体が多数の白血球(x100で一視野当たり25個以上)と共に認められ、さらに喀痰培養で当該病原体が検出される
- ・尿中抗原が陽性となる(肺炎球菌、レジオネラ菌のみ)
- ・抗原検査が陽性となる(インフルエンザウイルスのみ)
- ・血液培養から当該病原体が検出される

上記のいずれかを認めるものを起因菌として判定した。

4. 研究成果

安定期COPD患者19症例について、喀痰培養または、喀痰半定量PCRで病原微生物を検出した例は7例。Streptococcus pneumoniae 1例(両者)、Klebsiella pneumoniae 1例(培養のみ)、Haemophilus influenzae 3例(PCRのみ)、Moraxella catarrhalis 2例(PCRのみ)が検出されたが、菌検出の有無・種類と増悪・症状との関連は指摘できなかった。また、PCRでウイルスは検出しなかった。

後ろ向きの解析も含めた、COPD急性増悪患者115例については、喀痰培養では115例中40例(34.7%)で常在菌以外の細菌を検出(Table 2)、HIRA-TANでは52例(45.2%)で病原微生物を起炎菌として検出した(Table 3)。一致したのは23例であった。検出の多かった菌として、Hemophilus influenzaeはHIRA-TAN法で9例、培養で3例検出した。Streptococcus pneumoniaeは特にPCRでの検出が多く、HIRA-TAN法では23例検出したのに対し、喀痰培養では6例検出、肺炎球菌尿中抗原は7例陽性であった。

Table 2

既存の方法による菌診断

<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	2
<i>Stenotrophomonas Maltophililia</i>	3
<i>Aspergillus spp</i>	1
<i>Mycobacterium avium</i>	3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA	1
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	7
<i>E.coli</i>	3
<i>Haemophilus influenzae</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
<i>Candida</i>	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
Not detected	75

Table 3

HIRA-TAN法による菌診断

<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	2
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	2
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	22
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	8
<i>Haemophilus influenzae</i>	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
Not detected	63

HIRA-TAN法は培養に比べ迅速に定着菌と起因菌を区別できる可能性があり、COPD増悪、併発肺炎の原因菌検索法として有用な可能性が示唆された。

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3件)

1. 喀痰の半定量的PCR法によるCOPD増悪時の起因菌診断.第53回日本呼吸器学会学術講演会. 嶺崎祥平 平間崇 仲村秀俊 金澤實. 2013年4月 東京国際フォーラム
2. Identification of causative bacteria in airways of COPD by a novel semi-quantitative PCR method. 2013.European Respiratory Society. Shohei Minezaki Hidetoshi Nakamura HIRAMA takashi Minoru Kanazawa 2013年9月 BARCELONA Spain
3. COPD患者の増悪と肺炎に影響する臨床的因子の検討.第55回日本呼吸器学会学術

講演会：嶺崎祥平 仲村秀俊 塩野文子
三尾友彦 金澤實 萩原弘一 永田真
2015年4月 東京国際フォーラム

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 嶺崎 祥平 (Minezaki
Shohei)

埼玉医科大学 医学部 助教

研究者番号：90648007