

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：30-19

課題名：網羅的病原体ゲノム解析による感染症の早期診断法に関する研究

主任研究者 国立成育医療研究センター

生体防御系内科部免疫科 診療部長 河合利尚

重症な細菌感染症では、病原体を同定し適切な抗菌薬を選択することの重要性は周知の事実である。小児においても、迅速に病原体が同定されることで、適切な抗菌薬治療による症状の改善だけでなく、薬剤耐性菌対策にも貢献すると考えられる。今回、菌血症や敗血症が疑われる小児患者 77 例を対象に、細菌ゲノム DNA 解析 (Tm Mapping 法) によって末梢血の細菌 DNA を同定し、従来の血液培養検査と比較検討した。このうち、血液培養検査では 16 検体、Tm Mapping 法では 21 検体で検出された。血液培養検査では、全検体で菌種が同定されたが、Tm Mapping 法では、データベースとの照合で菌種の同定に至った検体は 15 検体だった。細菌の検出率は、Tm Mapping 法では 27.3% であり、血液培養検査 (20.1%) よりも検出率は高い傾向がみられた。将来的に Tm Mapping 法が実用化されれば、小児の重症感染症の原因菌の同定に貢献し得ると考える。

### 1. 研究目的

小児の感染症治療において、原因菌の同定は適切な抗菌薬の選択につながり、患児の症状を改善するだけでなく、抗菌薬の適正使用による薬剤耐性菌対策にも大きく貢献する。細菌感染症では、従来、*in vitro* 培養検査によって原因菌が同定されてきたが、培養条件や抗生剤投与などの条件によって検出率が大きく低下することが課題であった。一方、ウイルス感染症では、ウイルスゲノム解析による病原体の同定が有用であることが報告されている。そこで、近年、細菌感染症においても、細菌ゲノム解析による原因菌の同定が検証されはじめた。本研究では、敗血症や菌血症などの重症細菌感染症が疑われる小児を対象として、末梢血から直接、細菌 DNA のシーケンス解析を行い、細菌を同定する。小児の一般臨床において、本解析の有用性を評価し、将来的な医療検査技術としての可能性について検討する。

### 2. 研究組織

研究者	所属施設
石川 尊士	国立成育医療研究センター
岡井 真史	国立成育医療研究センター
小野寺 雅史	国立成育医療研究センター

窪田 満	国立成育医療研究センター
加藤 元博	国立成育医療研究センター
宮入 烈	国立成育医療研究センター
内山 徹	国立成育医療研究センター
庄司 健介	国立成育医療研究センター

### 3. 研究成果

本年度の研究は、臨床研究実施計画書「網羅的ゲノム DNA 解析による病原体の同定に関する研究」に基づき、臨床検体を収集しデータ解析を行った。

#### 1) 対象となった疾患群

菌血症、敗血症、髄膜炎などの重症感染症が疑われる小児患者を対象に検討を行った。病院の一般培養検査と同時に、本解析用の血液を採取し、DNA を抽出した。その後、細菌 DNA (16SrRNA 遺伝子) に特異的なプライマーセットを用いて PCR で遺伝子配列を増幅した。PCR で検出される melting temperature (Tm) 値を二次元に mapping して、そのパターンを感染症起炎菌迅速同定システム (三井化学) のデータベースに照会し菌種を同定した (Tm Mapping 法を用いた網羅的細菌ゲノム DNA 解析)。

対象となった患者は 77 例で、その

うち基礎疾患を持たない患者は 14 例、原発性免疫不全症患者は 18 例、臓器移植後（あるいは免疫抑制剤による治療中）患者は 15 例であった。今回対象となった患者の年齢は  $9.0 \pm 9.3$  歳で、男児 54 例、女児 23 例であった。主な疾患は、カテーテル関連血流感染、肺炎、骨髄炎胃腸炎、肝膿瘍、髄膜炎であり、最終診断に至った 73 例のうち、感染症以外の疾患は川崎病の 1 例と発熱性好中球減少症の 9 例であった（表 1）。

表 1. 対象患者の最終診断

Clinical diagnosis	
CRBSI	12
Febrile Neutropenia	9
Pneumonia	8
Osteomyelitis	8
Enteritis	7
Liver abscess	4
Meningitis	4
Neonatal infection	3
Encephalitis	3
Cellulitis	3
Lymphadenitis	3
Infective endocarditis	3
Urinary tract infection	2
Subcutaneous abscess	2
Kawasaki disease	1
Unknown	4

## 2) 血液培養検査と Tm Mapping 法の比較検討

末梢血において、細菌は、血液培養検査では 16 検体、Tm Mapping 法では 21 検体で検出された。血液培養検査では、全検体で菌種が同定されたが、Tm Mapping 法では、データベースとの照合で菌種の同定に至った検体は 15 検体だった。なお、Tm Mapping 法で同定した症例のうち、血液培養検査で同定された菌種との一致率は 80%であった。

血液培養が陽性で、Tm Mapping で原因菌を同定できなかった 1 検体では、細菌 DNA は検出されていたが、データベースで菌種が同定されな

った。そのため、16SrRNA 遺伝子の PCR 産物を用いて、シークエンス解析を行い、データベースに一致しなかった原因を解析している。今後も、同様のケースが散見される場合には、データベースのアップデートの必要性を検討する。

今回、細菌の検出率は、Tm Mapping 法では 27.3%であり、血液培養検査（20.1%）よりも検出率は高い傾向がみられた。しかし、菌種の同定まで至った検体は血液培養と同様であった。ただし、今回の検討では、血液培養検査（初回検査）が陽性となった翌日に、血液培養検査（再検）と同時に Tm Mapping の検体が採取された検体が 21 例（Tm Mapping 法で陰性検体を含む）あるため、血液中の細菌量が減少し、十分な細菌 DNA が得られず菌種が同定できなかったと推測される。実際に、血液培養検査の再検では陰性であったが、Tm Mapping 法では細菌が検出された検体は 7 件で、菌種が同定された検体は 5 件だった。将来的に Tm Mapping 法が実用化されれば、血液培養検査と同様に初回検査で Tm Mapping 法を実施することで、小児の重症感染症の原因菌の同定に貢献し得ると考える。

## 3) 不一致検体の検討

本研究では、血液培養検査が陽性で Tm Mapping 法で菌種が同定されなかった検体が 1 件あった。原発性免疫不全症を基礎疾患に持つ患児で、血液培養検査では、*Granulicatella adiacens* (*G. adiacens*) と *Staphylococcus haemolyticus* (*S. haemolyticus*) が同定された。そのため、これら 2 菌種の混合感染による菌血症と診断された。

*Granulicatella* 属は *nutritionally variant streptococci* (NVS) の一種で、分離培養で発育が遅く、同定検査に Satellitism test が必要なため早期の菌種同定が難しく、分離の培養条件により同定できない場合もある。Tm Mapping 法は、細菌に固有の Tm 値

の違いをデータベースで照合し菌株を同定する方法である。そのため、2種類以上の細菌が同用量で混在するサンプルでは、細菌を検出することはできても、菌種の同定は困難となる。本症例では、Tm Mapping法で菌種が同定されなかった原因として、混合感染が疑われたため、Tm mappingで増幅した16S rRNA遺伝子領域の塩基配列をシークエンス解析したところ、*G. adiacens* と *S. haemolyticus* が同定された。

(本解析は、2019年の日本小児感染免疫学会学術集会で報告した)。

#### 4) 効率的に検体を得るための試み

2018年度に網羅的細菌ゲノムDNA解析法が樹立できたため、測定検体数を増やすことが可能となった。そこで、新たに救急診療科と連携し、救急診療部で検体を収集することとした。これに関連して、臨床研究実施計画書「網羅的ゲノムDNA解析による病原体の同定に関する研究」の修正を行い承認された(承認日:2019年7月9日)。

また、本研究の実施によって、救急診療科での日常診療の妨げになり患者の不利益につながらないために、救急部での同意説明を行う際に用いる簡易説明書・同意書を作成し、倫理委員会で承認された(承認日:2019年7月9日)。

#### 5) 被験者選択基準の拡充

2018年度まで解析に必要な血液は2mlであった。そのため、被験者への侵襲を考慮して、2018年度までは1歳以上の患者を対象としていた。今年度、網羅的細菌ゲノムDNA解析法の測定方法を改良し、より少ない血液量(最低血液量1ml)でも解析可能な実験系を樹立した。

1歳未満の小児では免疫系が未熟であり、重篤な細菌感染症に罹患する頻度が高く、実際に、当センターでも、1歳未満の患者に関する依頼もしばしばあったが、これまで解析を実施することはなかった。今回、

検体量を1mlまで減らすことが可能となったため、1歳未満の被験者についても解析可能と考え、被験者選択基準の年齢制限を削除した。

本件について、倫理委員会へ修正申請し、承認された(承認日:2019年5月14日)。重症細菌感染症は、乳児でもしばしばみられることから、より実臨床に即した研究が可能になったと考える。

#### 6) 解析時間の検討

細菌感染症の治療では、病原体を迅速に同定し、適切な抗生剤を選択することが期待される。血液培養検査では、増殖した細菌を確認するため、一般に24-48時間を要する。一方、Tm Mapping法では、DNA抽出から最近の同定まで4-5時間程度であったことから、迅速検査としても有用性が期待される。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究実施において、対象患者個人のプライバシーをはじめと人権擁護を最優先とし、危険性の排除や説明と理解(インフォームドコンセントおよびアセント)を徹底した。インフォームドコンセントを得られた場合のみ本研究を実施し、採血により病状の悪化が強く示唆される場合は、対象から除外した。医療行為による個人への不利益として採血による苦痛が考えられるが、検体は生体外で処理して研究を行うため、それ以外に生じることはないと考ええる。なお、採取された検体は、個人情報管理者が、採取された検体と臨床情報(年齢・カルテ番号・既往歴・合併症・感染症の診療内容・細菌検査結果・感染症に関する画像診断結果・体温・血圧・心拍数・呼吸数・血液ガス・白血球数・CRP・プロカルシトニン)を匿名化された情報として保管した。解析担当者には、匿名化された情報のみを供与した。今後、この研究の成果は学会等で発表されるが、前記匿名化を行い、個人情報を保護して発表する。なお、本研究では、細菌のゲノムを特異的に認識するプライマーを用いて遺伝子解析を行っているため、検体に含まれるヒトゲノムDNAの遺伝情報が解析対象になることはなかった。