

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：30指定1

課題名：分子生物学的診断法の感染症診療と感染対策への応用

主任研究者名（所属施設） 国立成育医療研究センター

（所属・職名） 生体防御系内科部感染症科・診療部長 宮入 烈

（研究成果の要約） 小児の感染症診療において迅速な病原体の同定は患者の予後に直結する。本研究では分子生物学的な手法を用いた病原体診断を前年度より継続し、重症感染症である脳炎・脳症、心筋炎、呼吸不全について行い約 40-60%の症例について関連する病原体を検出した。小児の救急疾患についても病原体診断をつけることは、性虐待を含めた他の疾患の除外につながった。また帯状疱疹とその合併症についてもリアルタイム PCR 法によるウイルス検出によりその関連を明らかにした。その他に耐性遺伝子の検出による薬剤耐性菌の早期認知による院内感染対策、病原体特定による抗菌薬の適正使用に活用した。

1. 研究目的

小児の感染症診療において迅速な病原体の同定は患者の予後に直結する。本研究の目的は分子生物学的な手法を用いた病原体診断を、重症感染症の原因診断、院内感染対策、抗菌薬の適正使用に活用し、手法の標準化と臨床的なアウトカムに直結する適応について検討することである。

2. 研究組織

研究者	所属施設
宮入 烈	国立成育医療研究センター
植松悟子	国立成育医療研究センター

3. 研究成果

本年度は目的を達成するために、多数の原因不明の感染症に対して分子生物学的な検討を加えた。また感染対策に寄与する分子生物学的検査を行った。具体的な成果として下記が挙げられる。

(1) 【小児重症感染症患者の診療体制とリア

ルタイムPCR法を用いた病原体検出】

国立成育医療研究センターにおける重症感染症患者は集中治療室に集約され、必要に応じてリアルタイム PCR が実施された（図1）。一般的な検査（迅速抗原検査、細菌培養検査、抗体検査）で原因が不明であった小児重症感染症患者検体(脳炎・髄膜炎、新生児敗血症、呼吸不全、心筋炎)に対して、PCR 検査を用いた検討（単独病原体の系は 55 病原体、マルチプレックス系 8 種類）を行い 4-6 割の患者で病原体検出に至った（図2）。

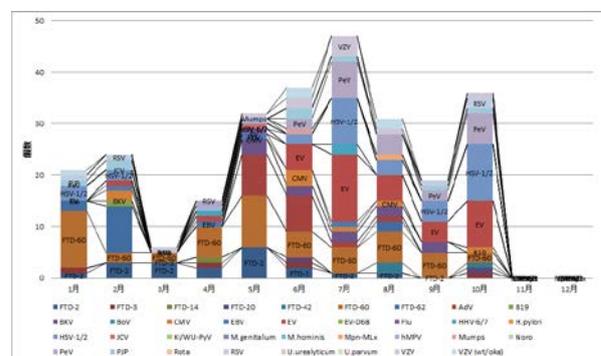


図1：リアルタイム PCR の実施項目（月別）

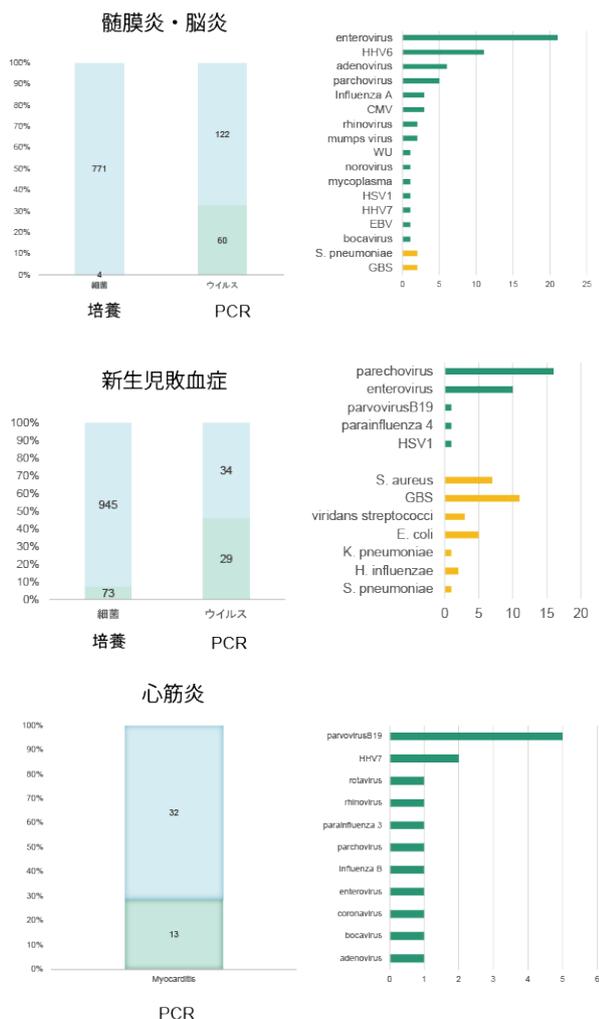


図2 重症感染症における培養法とPCRによる病原体検出状況

(2) 【発熱と発疹を呈する小児患者についての検討】

小児の発疹症は明確な診断がつかないことが多い。当院救急外来を受診した急性発疹症の患者を対象に、臨床的な記録、皮膚の写真、ウイルス学的な検討を合わせて行い、非特異的な皮疹の原因診断をマルチプレックスリアルタイムPCR法で以下の病原体を標的に行った。(ヘルペスウイルス属: HSV-1,2, HHV-6,7, VZV, CMV, EBV、ピコルナウイルス属: エンテロウイルス属, パレコウイルス、発疹ウイルス: 麻疹ウイルス, 風疹ウイルス, パルボウイルス、気道系ウイルス: ライノウイルス, コロナウイルス, インフ

ルエンザウイルス, パラインフルエンザウイルス, ヒトメタニューモウイルス, ボカウイルス, アデノウイルス, マイコプラズマ・ニューモニエ)

- 現在までに117症例の検討が行われ、約半数の症例で微生物が検出され、臨床的に奏功した事例も複数あった(植松分担研究書参照)。今後症例数を増やし臨床像との照合を行う予定である。
- 小児の帯状疱疹と合併症についての検討を行った。(宮入分担研究書参照)

(3) 院内感染対策として、薬剤耐性菌の耐性機構の検討、細菌の遺伝子相同性検査、RSウイルス・ノロウイルスなどのウイルス排泄状態の評価を行う。

【分子生物学的手法の感染対策への応用】

- 次世代シーケンサーを用いた薬剤耐性菌の薬剤耐性遺伝子、相同性検討の解析。ナノポアシーケンサーを用いた検討を開始した。
- 呼吸器・消化器ウイルスの検出とモニタリング: 免疫不全患者はウイルス感染後も長期間(数カ月)にわたってウイルスを排泄し、感染源となり得る事が判明している

【薬剤耐性遺伝子の検出】

- 高度薬剤耐性が疑われる臨床検体に由来するエンテロバクター属菌と大腸菌の菌体から薬剤耐性遺伝子の検出を行った。
- 多剤耐性グラム陰性菌の耐性機構の解析: 2013年より海外で入院歴のある患者を対照に、選択培地を用いた便培養による検査を実施している。約70%に第3世代セフェムに耐性の耐性菌あるいはバンコマイシン耐性腸球菌が検出されている。一部の患者は、一般的に国内で使用されている抗菌薬に全て耐性を示す、カルバペネム耐性菌(NDM, KPC)が検出される。我々は、これらについてPCRを用いた検

討を行い、耐性機構を確認し、個別の隔離対策等に役立てている。海外からの輸入例については精査し結果を論文化した。

(4) 抗菌薬適正使用に係る検査：小児診療の現場における分子生物学的診断技術の標準化と活用法の最適化を図り、均てん化する。以下の検討を継続中である。

- ▶ 肺炎症例に関する検討：ウイルス感染症に続発する細菌感染症は臨床診断に基づいて行われているのが現状である。検討開始前の肺炎症例 80 例について臨床的な特徴を解析し、臨床医が抗菌薬投与を選択する基準を検討し、呼吸状態や血液検査所見が判断基準として用いられている事が判明した。今回我々は入院患者に対するリアルタイム PCR 検査を開始した。結果を還元することにより抗菌薬の処方行動に与える影響を前方視的に検討中である。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究の検体採取の際には、患者、または保護者から同意書を得た上で検討を行う。得られたサンプルにおいては、プライバシーの保護には十分配慮をし、成果を公表する場合には患者を同定できるような情報を一切含めず、匿名化による個人情報保護を行う。その方法として、患者の情報と検体番号は、患者識別対応表を作ることによって、匿名化され、その対応表は、当院の個人情報管理者によって管理され、他の人がアクセス出来ないようにする。研究終了後の検体は、今後発見される可能性のあるウイルスに対しての検索を行うために、採取されてから 10 年間、保存されるが、その後に廃棄される。