

(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） 生体防御系内科部免疫科 診療部長

重症感染症では、病原体の同定による早期診断と、適切な治療を速やかに開始することが重要である。しかし、従来の細菌培養検査では、細菌コロニーの検出率、培地条件、培養時間など様々な課題が残されている。今回、病原体ゲノム DNA パターンから原因菌を同定する方法を用いて、敗血症や菌血症が疑われた小児患者を対象に、末梢血の病原体スクリーニングを実施した。今年度、小児の末梢血から DNA を抽出し細菌ゲノム DNA を増幅して、DNA パターンを解析する実験系を導入した。その後、当センター感染症科、総合診療部、小児がんセンター、ICU と連携体制を構築し、臨床研究として患者検体の解析を開始した。本臨床研究では、臨床研究実施計画書に従い研究を実施し、これまで有害事象や問題は発生していない。

### 1. 研究目的

重症感染症において、病原体の同定による早期診断によって、適切な治療を速やかに開始することの重要性が認識されている。ところが、敗血症でも血液培養検査の検出率は 30-50%程度であり、従来の *in vitro* の培養検査では、培養条件や培養時間など、従来の検査方法に課題が残されている。当センターでは、原発性免疫不全症や移植後の患者など、重症感染症に罹患するリスクの高い免疫能低下患者の診療にあたっている。

そこで、本研究では小児の細菌・真菌感染症の病原体スクリーニングとして、病原体ゲノム DNA のパターンから原因菌を同定する方法 (Melting Temperature mapping (Tm Mapping) 法) の有用性を検討する。これまで、成人領域でみられる敗血症や菌血症において、Tm Mapping 法によるスクリーニングの有用性は報告されているが、小児でのエビデンスは確立されていない。さらに、原発性免疫不全症や免疫抑制治療中の小児患者では、重症感染症の病原体が成人患者

と異なる可能性がある。本研究では Tm Mapping 法を用いて、基礎疾患を有する小児患者における網羅的な病原体ゲノム DNA 解析スクリーニングを確立することを目的とする。当センターの小児患者を対象としたパイロット臨床研究を実施し本スクリーニング解析の有用性を検討する。

本研究は、探索的な研究として位置づけられるが、本研究の成果によって、企業との連携を構築し外部資金を獲得することで、将来的に企業への導出を目指す。

### 2. 研究組織

研究者	所属施設
石川尊士	免疫科
宮入烈	感染症科
庄司健介	感染症科
窪田満	総合診療部
加藤元博	小児がんセンター
小野寺雅史	成育遺伝研究部
田村英一郎	免疫科
内山徹	成育遺伝研究部
田中雄一郎	総合診療部

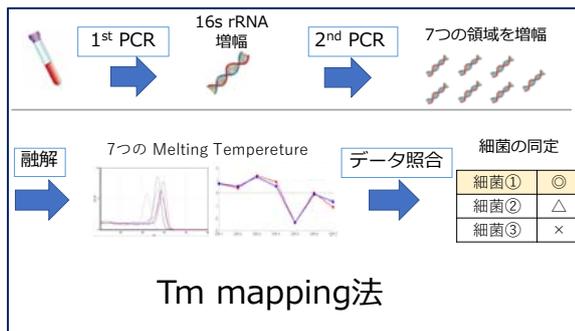
### 3. 研究成果

本年度は、網羅的細菌ゲノム DNA 解析の小児患者検体の測定方法を導入した。さらに、ICU、小児がんセンター、感染症科、総合診療部と連携体制を構築し、患者検体を用いた臨床研究を開始した。

#### (1) 網羅的細菌ゲノム DNA 解析の確立

市販される DNA 抽出キットおよび細菌ゲノム DNA 増幅 (PCR) キットを用いて、患者末梢血あるいは髄液に含まれる細菌ゲノムを同定する。本解析の感度は高いため、空気中など環境からの DNA 混入に大きく影響された。そこで、研究室内での解析場所、解析機器の設置場所、試薬の保管方法などを最適化するために、繰り返し条件検討を行なった。最終的に、一連の操作をクリーンボックス内で行うことで、コンタミネーションを回避することができた。

その後、末梢血から DNA を抽出し、細菌の rRNA 遺伝子領域の配列特異的な melting temperature の違いで、感染症の起炎菌を同定する解析を、当センター研究所で測定できる体制を確立した。



なお、今年度は血液検体を 2ml 使用するプロトコールを作成したが、血液検体量を減らすことで、1 歳未満の乳児でも本解析を実施できる可能性が示唆された。そのため、今後、検体量を減らすことを検討する必要があると考える。

#### (2) 臨床研究の研究体制を整備

臨床研究を実施するために、臨床研究課題「網羅的ゲノム DNA 解析による病原体の同定に関する研究」は、当センター倫理審査委員会で承認を得た（修正の承認：2018 年 6 月 18 日（初回承認：2017 年 11 月 14 日））。本研究の対象者は、国立成育医療研究センターで診療中の原発性免疫不全症、臓器移植後（あるいは免疫抑制剤による治療中）、明らかな免疫能低下を指摘されていない患者のうち、細菌感染症と診断あるいは細菌感染症が疑われる 1 歳以上の患者とした。被験者を効率的に集約するために、当センター病院の ICU、小児がんセンター、感染症科、総合診療部との連携が必要と考えた。そこで、各科に対して個別に本研究に関する説明会を開催し、研究の目的や方法、結果の取り扱いなどを説明し、連携体制を構築した。

また、臨床研究開始後に、研究の進捗について各科と情報共有するとともに、研究実施する中で問題となる点を確認した。検体情報を管理する上で必要な情報について、チェック表を作成した（下記）。

Tm mapping 研究 記入用紙

\* EDTA-2K 管に 2ml 採血をお願いします。(2ml 未満でも可です)  
 \* 平日日中採血 ⇒ 免疫科石川(7944) or 田村(7951) or 河合(7906)にご連絡下さい。  
 夜間、休日 ⇒ 冷蔵保存し、平日日中にご連絡下さい。\*

採血者氏名 \_\_\_\_\_ (科) \_\_\_\_\_  
 患者氏名 \_\_\_\_\_  
 採血日時 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日 \_\_\_\_\_ 時 \_\_\_\_\_ 分 \_\_\_\_\_  
 EDTA-2K 管採血量 \_\_\_\_\_ ml  
 血液培養採血量 好気ボトル \_\_\_\_\_ ml 嫌気ボトル \_\_\_\_\_ ml  
 採血方法 動脈穿刺 or 末梢ルート or CVルート or その他 \_\_\_\_\_  
 消毒方法 アルコール綿 or ガンダール or ステリクロナイクル or キンジン \_\_\_\_\_

お願い  
 \* 血液培養は可能なら 1 本 2ml 以上採血してください。  
 \* 同時に血液検査(白血球数、血液像、CRP、プロカルシトニン)をオーダーしていた方がと助かります。(休日、免疫科でオーダーさせていただくことがあります。)\*

自由記入欄  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

ご不明な点がありましたらご連絡下さい  
 文責 免疫科 石川博士(7944)

### (3) 臨床研究の開始

当センター研究所で、検体解析のプロトコールが完成したのち、実際の臨床検体の測定を開始した。これまで、免疫科から17検体、小児がんセンターから1検体、感染症科（ICU含む）から2検体、総合診療部から1検体の合計21検体について解析を行った。患者検体を用いたこれらの解析では、実験系の信頼性を確認するために、各サンプルについて測定を3回繰り返し行い、結果の相違がないことを確認した。

これまでのところ、Tm Mapping 法は血液培養よりも感度が高い傾向があった。しかし、血液培養が陽性だが、Tm Mapping 法では細菌の同定ができなかった検体が1検体あった。興味深いことに、この検体は血液培養検査で原因菌が2種類検出されていた。通常、血液培養で2種類以上の細菌が検出されることは稀であり、いずれかの細菌は皮膚常在菌などの混入のことが多い。しかし、今回、検出された細菌はいずれも病原性を示す可能性の高い細菌であった。Tm Mapping 法では、細菌ゲノム DNA をパターン化して菌株を同定することから、2種類以上の細菌ゲノムが増幅されると菌株を同定できない。そこで、Tm Mapping で増幅した DNA（PCR 産物）についてシーケンスを行ったところ、血液培養検査と同じ2種類の細菌が検出された。そのため、本検体で Tm Mapping 法で菌体を検出できなかった原因は、細菌ゲノム DNA が増幅されなかったのではなく、2種類の細菌ゲノム DNA が増幅され遺伝子のパターン化ができなかったことに起因すると考えられた。今

後、同様のケースがあった場合には、細菌ゲノム DNA のシーケンスを行うことも想定されるため、さらなる検討が必要と考える。

なお、本臨床研究では、臨床研究実施計画書に従い研究を実施しており、現時点で、有害事象や問題は発生していない。

### 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、対象から除外することとした。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。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。この研究の成果は学会等で発表される予定だが、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うため、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い。