

(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、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。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

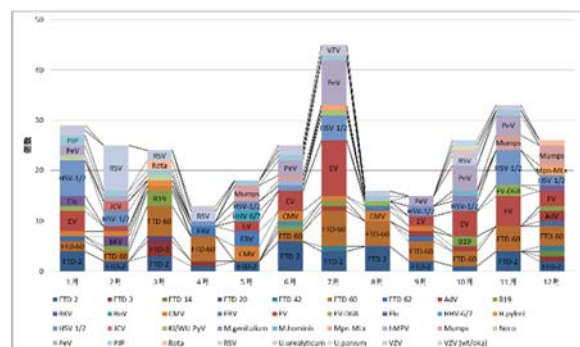
研究者	所属施設
宮入 烈	国立成育医療研究センター
田中雄一郎	国立成育医療研究センター
植松悟子	国立成育医療研究センター

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査を加えた。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。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、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）を行った。



図：リアルタイムPCRの実施項目（月別）重症感染症の診断実績として脳炎・脳症 60/182（33%）Enterovirus, HHV6, adenovirus など。新生児敗血症 29/63（46

%) Parechovirus, enterovirus など。心筋炎 13/45 (29%) Parvovirus B19 など。呼吸不全 133/197 (66%):Rhinovirus, human metapneumovirus など、があげられる。

2. 【一部の症例について追加検討を行い下記の成果を得た】

① 新興感染症である

polyomavirus (WUPyV) について、リアルタイム PCR による検出系を確立し既存検体のスクリーニングを行った。重症呼吸器感染症患者 60 例中、6 例で WUPyV が検出された。検討を重ねた結果、WUPyV の臨床像として未熟児など NICU 管理を要する患者における間質性肺炎の病像を取ることが明らかになった。

② エンテロウイルス 遺伝子型別判定 (CODEHOP) を下記の検体について行った。検体 1 脳炎・髄膜炎と診断された血清からリアルタイム PCR によりエンテロウイルスが検出された。遺伝子型別判定によりコクサッキーウイルス A6 型と判定された。検体 2 肺炎と診断された喀痰からリアルタイム PCR でエンテロウイルス及びライノウイルス検出された。遺伝子型別判定によりライノウイルス C と判定された。

③ レジオネラ属菌の検出：現在使用しているリアルタイム PCR 検出系は、以前に偽陽性と判定された検体があり特異性に問題があった。そこでレジオネラ属菌に特異的な mip 遺伝子の検出による判定を試みた。材料には肺炎と診断された LAMP 陽性の気道吸引物を使用した。参考文献では手法として nested PCR を行っていたが、検討した検体では 1st PCR は特異的なバンドのみを検出できたが、2nd

PCR では非特異的なバンドも検出された。両者の PCR 産物の配列を確認したところ、共にレジオネラ属菌の mip 遺伝子であることは確認できたが、2nd PCR 産物には複数の配列が混在する部分があり、品質管理の観点から 1st PCR 産物を使用することが適当と考えられた。

- ④ カンピロバクター属菌の菌種同定：カンピロバクター菌血症と診断された臨床検体に由来する菌体について、通常と異なる増殖速度や形態が確認されたため菌種同定を行った。菌体からはリアルタイム PCR 検出系に含まれるジェジュニ、コリ及びビラリの各株は検出されなかった。次に 16S rRNA の配列を確認したところ、カンピロバクター科ではなくヘリコバクター科に属することが確認された。(両者は 16S rRNA の配列に基づいて系統発生的解析により分類される。)
- ⑤ 16S rRNA 菌種同定：非結核性抗酸菌が疑われる髄膜炎と診断された髄液とヘモフィルス菌が疑われる心内膜炎と診断された血清から分離培養を経ずに直接検体の菌種同定を行った。16S rRNA の配列を確認すると、両検体共にアルスロバクター属菌もしくは培養不可能なバクテリアとの検索結果が得られ、環境中のコンタミネーションと考えられた。現時点では臨床検体からの菌種同定は困難で菌種同定には至らなかった。
- ⑥ 救急疾患における応用：小児の原因不明の救急疾患についてリアルタイム PCR 検査を実施し、病原体診断の促進により、性虐待を含めた他の鑑別の除外につながった。(分担植松報告書参照)

- ⑦ 入院診療における応用：新生児ヘルペス感染症が疑われる患者におけるリアルタイムPCR検査の院内ラボの有用性を検討し、抗ウイルス薬投与期間や入院期間の短縮につながる事が明らかとなった。（分担田中報告書参照）

3. 【分子生物学的手法の感染対策への応用】

- ① 緑膿菌、MRSA、ESBL 産生性大腸菌の POT 法による解析：当院で検出された MRSA 株について、POT 法を用いた検討を行い、アウトブレイクの精査をした。感受性検査が一部異なる 14 検体について検討した結果、10 例が同一遺伝子型であることが判明し、臨床情報とあわせ伝播様式の確定、対策の実施に役立った。
- ② 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。RS ウイルス、アデノウイルス感染症例において3か月以上の長期にわたりウイルスの検出があることが確認された。今後はウイルス分離培養が可能な整備を行う。また生物活性を反映するリアルタイムPCRの開発が必要であり検討中。
- ③ 薬剤耐性遺伝子の検出：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。検出にはシカジーニアスカルバペネマーゼ遺伝子型検出キットとシカジーニアス ESBL 遺伝子型検出キットを使用した。エンテロバクター属菌から

は検出系に含まれる薬剤耐性遺伝子は検出されなかったが、大腸菌からは TEM 及び CTX-M-1 遺伝子が検出された。また、カルバペネマーゼ遺伝子型と ESBL 遺伝子型の自家検出系では、以前の増幅条件で反応すると陽性コントロールの検出が再現出来なかったが、アニーリング温度を変更することで同様の結果が得られるようになった。同検査を海外からの耐性菌持ち込みのスクリーニング検討に応用しその有用性を検証した（分担宮入報告書参照）

- ④ 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。（2報論文掲載）
- ⑤ 抗菌薬適正使用に係る検査：熱源不明の発熱と急性下痢症の病原体検討、迅速診断法を用いた治療の最適化を行う小児診療の現場における分子生物学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。下記2つの検討を開始した。発熱と発疹を呈する小児患者についての検討を開始した。小児の発疹症は明確な診断がつかないことが多い。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
皮疹の原因診断を特定する。

分子生物学的手法による微生物診断は比較的
新しい技術であり、コストも高く様々な手法
が乱立している。検査法の標準化と臨床的な
アウトカムにつながる適応について検討する
必要がある。

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成することによ
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、その後には廃棄される。