

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893096

研究課題名(和文)血管内感染症に対する全血マルチプレックスPCRによる細菌遺伝子診断に関する研究

研究課題名(英文)Molecular approach using multiplex PCR to diagnose intravascular infection

研究代表者

田辺 正樹(TANABE, MASAKI)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50456737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：血液培養陰性の感染性心内膜炎などの血管内感染症の補助診断として血液を用いた細菌遺伝子診断の有用性について検討した。細菌全般を検出できる「broad-range PCR」、7菌種を標的とした「菌種特異的PCR」、「オキサシリン耐性遺伝子」を同時にできる遺伝子診断システムを構築し、対象期間内に感染性心内膜炎の確定例10例、不明熱例10例を対象に検討を行ったところ、感染性心内膜炎例について、血液培養が陰性化した後においても、血液から細菌遺伝子を検出することができた。血液を用いた細菌遺伝子診断は血液培養陰性の血管内感染症の診断や抗生薬選択に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated utility of molecular approach using polymerase chain reaction (PCR) performed on whole blood to diagnose intravascular infection such as infective endocarditis (IE). Multiplex PCR composed of (1) broad-range PCR targeting all bacteria species, (2) bacteria specific PCR targeting 7 bacteria species, and (3) oxacillin-resistant gene were applied 10 patients with IE and 10 patients of fever of unknown origin. Bacterial genes were detected in patients with IE during phases of negative bacterial culture. Molecular approach using PCR on whole blood can be useful tool to assist diagnose and select of antibiotics in patients with culture negative vascular infection.

研究分野：感染症

キーワード：細菌遺伝子診断 PCR 感染性心内膜炎 血管内感染症

1. 研究開始当初の背景

血管内感染症の確定診断、治療方針の決定には、血液培養による起炎菌の同定及び薬剤感受性結果が重要となる。特に感染性心内膜炎においては、血液培養陽性が診断基準の大項目となっており重要視されている。しかし、確定診断前の抗菌薬投与あるいは起炎菌が培養困難菌であるため 10%程度の症例で血液培養が陰性となる症例がみられると言われている。

培養検査以外の微生物の検査方法として遺伝子学的診断法があり、培養にて分離された菌株の菌種同定や耐性遺伝子を検索する方法、血液・髄液や摘出組織切片などの臨床材料から直接遺伝子を検出する方法がある。近年細菌に共通する 16S rRNA 領域のプライマーを用いることで想定外の起炎菌も検出・同定できる broad-range PCR 法が活用されるようになり、その臨床応用の報告が散見されている。感染性心内膜炎の症例に対し、摘出した弁組織を用いて、broad-range PCR 法にて菌の同定を行った研究が行われているが、臨床現場においては、感染性心内膜炎等の血管内感染症が疑われた時点で、迅速に診断できることが求められる。そのためには、血液検体を用いた遺伝子学的検査を行う必要があるが、全血を用いた broad-range PCR 法の有用性については未だ確立されていない。

また、broad-range PCR 法は、培養が困難あるいは培養できない病原体の検出、新菌種の検出・同定には有用であるが、broad-range PCR が陽性となった後、シークエンスにて菌種推定を行う 2 段階のステップを要するため迅速性には欠ける。さらに、遺伝子検査にて起炎菌が推定されたとしても、抗菌薬の感受性は不明であることなどの欠点がある。

2. 研究の目的

感染性心内膜炎の起炎菌としては、黄色ブドウ球菌と連鎖球菌が 80%程度の症例を占め、その他、腸球菌やグラム陰性桿菌等があげられる。また、日本の医療機関においては黄色ブドウ球菌の半数以上が MRSA であることも考慮すると、抗菌薬の選択の際には、病原体のメチシリン耐性の有無が重要となる。

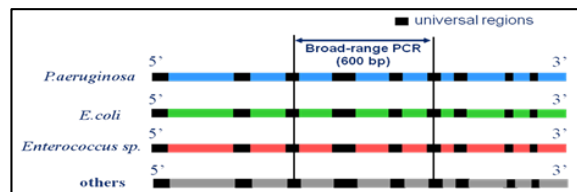
より迅速に感染性心内膜炎等の血管内感染症の診断・治療方針の決定を行うことができるよう、感染性心内膜炎を起こす主要な菌種を特異的に検出する系、オキサシリン耐性遺伝子 (mec) を検出する系、細菌全般を検出する broad-range 系を同時に検出するマルチプレックス PCR による「血管内感染症迅速遺伝子診断システム」を構築することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

臨床的に血管内感染症（感染性心内膜炎、敗血症）が疑われるが血液培養陰性のため起炎菌が同定できない症例、及び positive control として血液培養にて菌が同定されている血管内感染症例を対象に、無菌下で血液培養・PCR 検査用の血液を採取し、マルチプレックス PCR を用いて菌種の推定を行う。また、手術施行症例に対しては、術中組織の細菌検査（培養、PCR）を行い、全血 PCR の同定菌との相同性を確認し、「血管内感染症迅速遺伝子診断システム」の有用性を検討する。

<マルチプレックス PCR による細菌遺伝子診断システムについて>

(1) 細菌の 16S rRNA 領域にはすべての菌に共通した各数十塩基からなる保存領域が点在し、保存領域に挟まれた数百塩基の遺伝子配列は属あるいは種のレベルで概ね同一である。この universal な領域を増幅の標的領域とし、2 箇所の保存領域にプライマーを設計して病原細菌を網羅的に検出し得る PCR 系 (broad-range PCR) を用いる (下図参照)。



(2) 感染性心内膜炎の起炎菌として重要な以下の菌種を特異的に検出するため、それぞれの菌種・属に保存された領域を検出する PCR 細菌系 (菌種特異的 PCR) を用いる。

spa	<i>Staphylococcus aureus</i>
Entero	<i>Enerococcus sp.</i>
HACEK-	<i>Haemophilus influenzae</i>
HACEK-	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
HACEK-	<i>Cardiobacterium hominis</i>
HACEK-	<i>Eikenella corrodens</i>
HACEK-	<i>Kingella kingae</i>

(3) 上記、細菌全般 (broad-range 系) 特異的菌種 7 種に、オキサシリン耐性遺伝子 (mec 遺伝子) を加えた 9 種のプライマーを用いたマルチプレックス PCR を用いる。

<血管内感染症疑い症例に対する全血を用いたマルチプレックス PCR の有用性の検討>

(a) 臨床的に血管内感染症（感染性心内膜炎、敗血症）が疑われるが、血液培養陰性のため起炎菌が同定できない症例

(b) 血管内感染症（感染性心内膜炎、敗血症）で入院となり、すでに血液培養にて起炎菌が同定されている症例 (positive control) を対象として、無菌下で血液を採取し、マル

チプレックス PCR による遺伝子解析にて細菌遺伝子が検出されるか否かを検討する。また手術施行例に関しては、全血 PCR と術中摘出検体の同定菌との同定性を検討する。

< 遺伝子診断の方法 >

EDTA 血あるいは術中摘出組織より DNA を抽出する。マルチプレックス PCR 検査用プライマーを用いて、細菌の DNA を増幅する。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認し、目的サイズのバンドが認められた場合、PCR 陽性と判定する。菌種特異的 PCR 陽性であれば、当該菌種を推定菌と判断する。菌種特異的 PCR が陰性で broad-range PCR のみ陽性の場合、ダイレクトシークエンス法にて塩基配列を解析する。NCBI の BLAST でホモロジー検索を行い、一致率 98%以上を認めた場合、その菌由来の DNA と判断し有意菌と判定する。

4. 研究成果

研究を開始した平成 25 年 10 月～平成 27 年 3 月までの 18 ヶ月間において、感染性心内膜炎 (IE) 確定例 10 例 (9 例: 血液培養陽性、1 例: 血液培養陰性)、不明熱例 10 例 (全例: 血液培養陰性) に対して、マルチプレックス PCR を用いた細菌遺伝子検査を実施した。

(1) 対象患者内訳 (n=20)

IE 確定例 (10 例) の起炎菌の内訳は、*Methicillin sensitive Staphylococcus aureus* (MSSA) 3 例、*Enterococcus faecalis* 2 例、*Streptococcus mitis* 2 例、*Streptococcus sanguinis* 2 例、*Streptococcus viridans group* 1 例。

不明熱例に対する PCR の結果、1 例は、エンドトキシン高値の敗血症例で全血 PCR にて、*enterobacter sp.* 遺伝子を検出したため、グラム陰性桿菌感染症によるエンドトキシンショックと診断した。1 例は、細菌 broad-range PCR は陰性であったが、真菌 broad-range PCR 陽性で、*Candida parapsilosis* 遺伝子が陽性であり、真菌血症と診断した。他の 8 例は、全血 PCR 陰性であり、膠原病等他の原因による発熱と考えられた。

(2) IE 確定例 (n=10)

IE 確定例 10 例の起炎菌の内訳としては、黄色ブドウ球菌 3 例、腸球菌 2 例、連鎖球菌 5 例であった。今回検討したマルチプレックス PCR 系には、黄色ブドウ球菌検出プライマー (spa)、腸球菌検出プライマー (Entero) が含まれており、10 例中 5 例 (50%) において、迅速診断が可能であった。10 例中 5 例 (50%) は連鎖球菌が起炎菌であり、broad-range PCR 陽性の結果を確認後、ダイレクトシークエンス法による塩基配列解析を必要とした。spa 陽性となった 3 例については、全例オキサシリン耐性遺伝子 (mec)

が陰性であったため、抗 MRSA 薬が不要と判断できた。

MSSA による IE の 1 例について、全身多発膿瘍を認め toxic shock syndrome が臨床的に疑われたため、Panton-Valentine leucocidin (PVL) 遺伝子の検索を行ったところ陽性であった。PVL 陽性であることが判明したため、毒素産生を抑える目的で、蛋白合成阻害剤である Linezolid、Clindamycin の併用を行う判断ができた。

IE 確定例 10 例のうち 1 例は血液培養陰性であったが、大動脈弁 + 僧帽弁のエコー所見等から IE と診断された culture-negative IE であった。全血 PCR にて MSSA 遺伝子を検出したため、MSSA が起炎菌と判断し、第一世代セフェム系薬による治療を行った。入院 25 日目に手術を施行した際の摘出組織の培養検査も陰性であったが、PCR にて MSSA を検出した。

なお、血液培養陽性の IE 9 例のうち 8 例は、全血 PCR 陽性であったが、1 例 (起炎菌: *S. mitis*) は全血 PCR 陰性であった。本例は、血液培養陽性時点で PCR 検査が施行できず、5 日後に全血 PCR を施行した際は陰性であった。しかし、入院 12 日後に手術を施行した際の摘出組織の PCR は陽性であった。

(3) 不明熱例 (n=10)

不明熱 10 例に対して全血 PCR を実施し、うち 2 例 (20%) について起炎菌の推定ができた。1 例はエンドトキシンショックの症例で血液培養が陰性となったため、全血 PCR 検査を行ったところ、*Enterococcus sp.* 遺伝子を検出したため、グラム陰性桿菌感染症によるエンドトキシンショックと診断し、対応することができた。もう 1 例は、Bacterial broad-range PCR 陰性であったが、臨床的に真菌感染症も疑われる症例であったため、Fungal broad-range PCR を併用することで、カンジダ遺伝子を検出することができ、抗真菌治療を開始することができた。

他の 8 例については、全血 PCR 陰性であり、少なくとも重度の菌血症は生じていないと考えられ、抗菌薬の中止を検討する際の一つの情報となりえた。

IE 治療後の follow up で PCR 検査を行っていた 1 例 (起炎菌: *S. sanguinis*) で、PCR 陰性が続いていた後に *E. coli* 遺伝子を検出した (その際の血液培養は陰性)。敗血症性ショックを生じる直前に偶然採血されていたものであったが、*E. coli* が原因の敗血症を見ているものと考えられた。

(4) PCR の陽性期間

IE の多くは経過中に手術治療が行われることが多いため、内科的に抗菌治療のみで経過をみた場合と手術治療が行われた場合の比較は困難であるが、起炎菌により PCR 陽性期間が異なる傾向は見られた。

MSSA 3 例中 2 例は、繰り返し PCR 検査を行

うことができた。PVL 陽性であった重症黄色ブドウ球菌感染症例においては、前医で血液培養陽性の後、抗菌治療開始後 11 日目に血液培養再検した時点で陰性化が確認され、以後、繰り返して実施した血液培養および発症 59 日目に施行された手術時検体の培養検査とも陰性であった。しかし、手術後 4 週間の静注抗菌治療を行った後も PCR は陰性化せず、外来にて内服抗菌治療を続け、発症 136 日目（術後 77 日目）でも全血 PCR は陽性であった。発症 141 日目の再検査にて全血 PCR 陰性を確認でき、抗菌治療を終了した。

もう 1 例の MSSA 症例は、culture negative IE の症例で、経過を通じて血液培養および手術時検体の培養とも陰性であった。しかし、入院 3 日目の全血 PCR にて MSSA 陽性が判明、その後、入院 25 日目の手術時検体および入院 37 日目（手術後 12 日目）の全血 PCR も陽性であった。術後抗菌治療を続け、入院 46 日目（手術後 21 日目）の全血 PCR で陰性化した。

腸球菌症例 2 例中 1 例は、発症 1 週間後の血液培養も陽性で発症 2 週間後の血液培養にて陰性化した症例であるが、血液培養陰性化後 41 日目に施行した全血 PCR も陽性であった。もう 1 例の腸球菌症例は、血液培養陰性化後 17 日目の全血 PCR にて陰性化が確認されている。

連鎖球菌症例 5 例中 4 例で繰り返し PCR 検査を行うことができた。血液培養陰性化後、全血 PCR の陰性化が確認されたのは、それぞれ 4 日目、15 日目、17 日目、24 日目であった。

血液培養・PCR 施行のタイミング、手術の有無、人工弁・自己弁の相違、疣腫のサイズなどが、症例ごとに異なるため直接比較はできないが、連鎖球菌と比較し黄色ブドウ球菌、腸球菌は比較的長期間にわたり全血 PCR が陽性になる傾向が見られた。

(5) まとめ

感染性心内膜炎等の血管内感染症例に対して、全血 PCR を施行することで、血液培養が陰性化した後においても、細菌遺伝子を検出することができた。

今回対象となった症例においては、黄色ブドウ球菌・腸球菌が 50%、連鎖球菌が 50% であり、陽性例のおよそ半数でマルチプレックス PCR を用いることで、より迅速に起炎菌の推測が可能であった。また、黄色ブドウ球菌例においては、同時にオキサシリン耐性遺伝子 (mec) の有無をみることで、MSSA と MRSA の区別ができ、抗菌薬選択に有用と考えられた。

全血 PCR が陽性となる期間については、症例の背景・検体の採取状況が異なるため評価できないが、連鎖球菌と比較し腸球菌・黄色ブドウ球菌の方が、より長期間陽性となる傾向が見られた。「全血 PCR で細菌遺伝子が陽性となること」が、「感染が持続しているこ

と」を直接意味するわけではないが、PCR 陽性期間が長期化する症例は、臨床的にも重症例・難治例が多いため、PCR を用いた経過 follow は、抗菌薬の使用期間を考慮する際の参考となる可能性が考えられた。この点については、さらに症例を積み重ねる必要がある。

今回、重症黄色ブドウ球菌感染症例において、PVL 遺伝子陽性が判明した。米国等において PVL 陽性の市中型 MRSA が問題となっているが、MSSA でも PVL を発現している例もあるため、黄色ブドウ球菌感染の重症例においては、PVL 遺伝子の検索も重要と考えられた。

今回の検討の中で、全血 broad-range PCR にてグラム陰性桿菌 (*enterobacter*: 1 例、*E. coli*: 1 例) を検出することができた。1 例は、偶発的に検出されたものであるが、ともに同時期に採取された血液培養は陰性であり、培養陰性の敗血症例についても適切に症例を選択し、適切なタイミングで全血 PCR 検査を行うことで、臨床的に有益な情報を得ることができる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)

志田幸太、熊谷直人、谷村宗義、中森史朗、田辺正樹 他. Panton-Valentine Leukocidin 産生黄色ブドウ球菌による感染性心内膜炎の 1 例. 第 112 回 日本内科学会総会・講演会 サテライトシンポジウム. 平成 27 年 4 月 11 日、みやこめっせ(京都府京都市).

田辺正樹、中村明子. 全身性多発膿瘍を合併した PVL 毒素産生 MSSA による感染性心内膜炎の 1 例. 第 89 回 日本感染症学会学術講演会. 平成 27 年 4 月 16 日、国立京都国際会館(京都府京都市).

田辺正樹. 妊娠中に発生した感染性心内膜炎の 1 例. 第 63 回 日本化学療法学会総会. 平成 27 年 6 月 6 日、京王プラザホテル新宿(東京都新宿区).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田辺 正樹 (TANABE, Masaki)
三重大学医学部附属病院・准教授
研究者番号：50456737

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

中村 明子 (NAKAMURA, Akiko)
三重大学医学部附属病院・臨床検査技師