

「血液中の菌数を敗血症重症度や治療効果の新たな指標とする検査技術の開発」

富山大学附属病院 検査部 仁井見 英樹



【背景と研究目的】

感染症による死因として最も頻度の高い敗血症は、病原体によって引き起こされた全身性炎症反応症候群（SIRS）である。特に細菌感染症で全身に波及した場合は非常に重篤な状態であり、無治療ではショック、DIC、多臓器不全などから早晚死に至る。元々は体力低下を背景としていることが多く、治療成績も決して良好ではない。従って、敗血症の重症度や治療効果を正確にモニタリングし、その結果を引き続き治療方針にフィードバックさせることが重要と考える。現在、敗血症の重症度判定に用いられている検査項目は、血液培養、エンドトキシン、プロカルシトニン、白血球数、CRP、血圧、体温、呼吸数、脈拍数、等であり、最近新たにプレセプシンが加わった。血液培養結果は時間を要するために早期治療にフィードバックすることは難しく、また、白血球数やCRPは宿主側の感染防御反応であるため、検査値と重症度にTime-lagが生じ、実際の重症度とはしばしば乖離した値となる。プロカルシトニンは特異性、定量性に難があり、使いづらい。このように、感染症の重症度判定のための指標として、未だ信頼のおける検査項目は存在しない。可能であれば、検体中の菌数を測定して指標とすることが最も直接的であり、理に適っていると言える。

現在、検体中の細菌数の標準的定量解析は、採取した患者検体の培養によって行われる。培養技術は長年利用されているが、検査に時間がかかる上、菌種毎に異なる増殖能に依存するため、Colony-forming unit (CFU)を用いた定量結果の信頼性は低い。よって、細菌数の正確な測定を行うには、培養に頼らない測定法が好ましい。近年、培養以外の方法で最も汎用性が高いと考えられるのは、定量PCR（real-time PCR）を用いる方法である。ほぼ全ての研究機関や検査部門でreal-time PCR機器を備えているからである。

定量PCRで細菌の検出を試みる場合、次に問題となるのは検出に用いるプライマーの設計である。検査開始時点において起炎菌が同定されている訳ではなく、また、混合感染もしばしば生じ得るため、菌種固有のプライマーを用いては、重症度判定のために「検体中の全ての菌数を測定する」目的は達成できない。従って、出来る限り多くの菌種を正確に定量できるユニバーサルプライマーの設計を必要とする。更に、検出すべき標的遺伝子について、汎用されているbacterial 16S ribosomal DNAでは菌種毎にcopy numberが異な

る (e.g. *Mycoplasma pneumoniae*: 1 copy /菌, *Bacillus cereus*: 13 copies /菌, etc.) ため、ある程度の量的比較は可能だが、正確な定量は不可能である。菌数を正確に定量するためには、菌種によって copy number が左右されないような標的遺伝子の選択が必要となる。

臨床検査として患者検体から菌数の定量を試みる場合、検体中に含まれる細菌は微量であるため、高感度で正確な菌検出を必要とする。また、感染症疑いの検体においては、検体中に「菌が無い」ことも正確に報告する必要があるため、bacterial contamination-free の PCR 検出系の構築が求められる。そこで我々は、敗血症重症度や治療効果の新たな指標として、「血液中の菌数」を検査項目として開発することを研究の目的とした。つまり、宿主側の生体反応を検査に用いるのではなく、血液中の菌数を直接的に数えるのである。

【本研究が解決しようとする課題】

本研究が解決しようとする課題は、“現時点では患者検体中に微量に存在する細菌の数を菌種（種属）に左右されずに正確に測定することが出来ない”、という事である。

【課題を解決するための方法】

本本研究は、「rpoB 遺伝子（全ての菌種で copy number = 1）を標的とした（全ての菌種と 100%マッチする）複数種類の bacterial universal primer を 1 つの PCR tube に混合して同じ amplicon を増幅するように設計し、更に eukaryote-made *Taq* DNA polymerase を併用して無菌の定量 PCR を行う」ことを主要な特徴とする。

患者血液を検体として菌の定量を試みる場合、高感度での菌検出を必要とする。また、血液検体中に「菌が無い（正確には検出感度以下）」ことを検査するためには、bacterial contamination-free の PCR 検出系を構築する必要がある。我々は近年、バクテリア DNA のコンタミの無い eukaryote-made *Taq* DNA polymerase の開発を行った (*J. Clin. Microbiol.* Sept.2011, p.3316-3320)。この *Taq* DNA polymerase と bacterial universal primer を組み合わせて定量 PCR を行うことで、偽陽性の無い、正確で高感度な菌数の測定が可能となる。

【菌種に左右されずに菌数を正確に測定するプライマー設計】

本研究のプライマーセットが有する特徴は以下のとおり。

1) 標的遺伝子の copy number が菌種の相違に関わらず常に一定である。

本研究では標的遺伝子として rpoB 遺伝子を選択した。この遺伝子の copy number は菌種の相違に関わらず常に 1 なので、定量 PCR の結果が菌数を正確に反映する。

2) 患者検体から検出される菌種の殆ど全てを検出できる。

本研究では rpoB 遺伝子の bacterial conserved region を標的として bacterial universal primer の設計を試みた。しかし、rpoB には全ての細菌に対して完全に保存された bacterial conserved region は存在しない。従って、患者検体から検出される殆

ど全ての菌種とそれぞれ塩基配列が 100%マッチした **bacterial universal primer** を複数組み合わせ (**forward primer 19 種類、reverse primer 15 種類**)、1つの PCR tube にそれぞれ等量ずつ混合して、ほぼ全ての菌を検出できるようにした。

3) 菌種に左右されずに菌数を正確に測定出来る。

本研究では定量 PCR で正確な菌数の測定を行うために、プライマー設計について以下の点を工夫した。① 全ての菌種に塩基配列がそれぞれ 100%マッチするプライマーを混入した。② 各プライマーを等量ずつ混入した。③ プライマーの **Tm 値** を出来るだけ揃え、アニーリング温度は最も **Tm 値** の低いプライマーに合わせた。④ 長さの異なるプライマーは、出来るだけ **amplicon** の内側 (3' 側) に延長するようにして、どのプライマーによって増幅される **amplicon** の大きさもほぼ同一にした。

4) 2 種類のプライマーセットを用いて、高感度・高特異度の測定が行える。

本研究では 2 種類のプライマーセットを設計して、それぞれのプライマーセットでの菌数測定に加え、2つのプライマーセットを組み合わせ **nested PCR** を行い、高感度・高特異度の菌数測定を行えるようにした。

以上を特徴として **rpoB** プライマーセットを設計した。

【プライマー動作の検証実験】

上記の **rpoB** プライマーセットを用いて、プライマー動作の検証を行った。

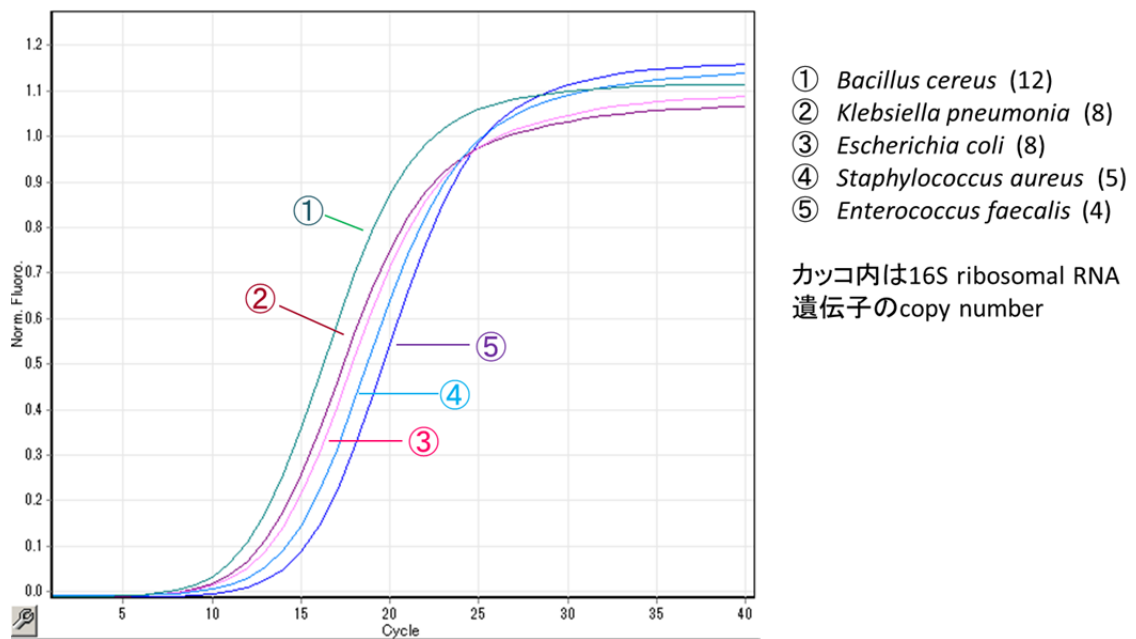
用いた菌種 (カッコ内は 16S ribosomal RNA 遺伝子の菌 1 個あたりの **copy number**) を以下に示す。

- 1、*Bacillus cereus* (12)
- 2、*Klebsiella pneumoniae* (8)
- 3、*Escherichia coli* (8)
- 4、*Staphylococcus aureus* (5)
- 5、*Enterococcus faecalis* (4)

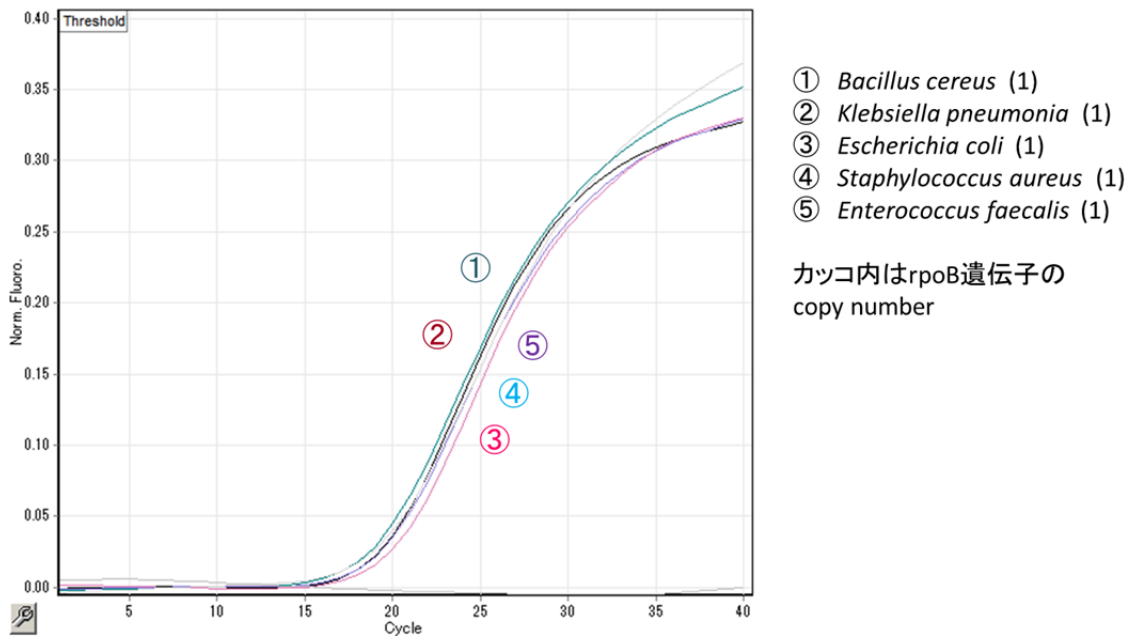
それぞれの菌の DNA 溶液を作り、吸光度からゲノム数を計算 (各ゲノムの大きさの違いを補正) し、理論的に菌数を一致させた。そして、16S ribosomal RNA 遺伝子の **bacterial universal primer**、および **rpoB** プライマーを用いて、それぞれ定量 PCR を行った。

以下、結果を示す。

16S ribosomal RNA を標的とした bacterial universal primer を用いて定量 PCR を行った場合



rpoB 遺伝子を標的とした本研究のプライマーセットを用いて定量 PCR を行った場合



以上の結果、本研究の **rpoB** プライマーセットを用いることで、菌種（種属）に左右されずに正確な菌数の測定が可能であることを示した。

【結語】

敗血症の新たな検査指標として「血液中の菌数」そのものを測定する方法は、重症度をリアルタイムに反映する指標（結果報告まで2時間以内）として、その有用性が期待できる。例えば抗菌薬により菌交代現象が生じたとしても、菌数の総量のモニタリングとなるため、網羅的な観点から抗菌薬の効果判定が可能となる。今後、本検査法の実用化を目指し、患者検体での検証を繰り返し行う計画である。

プロジェクトの感想

今回、幸運にも日本臨床検査医学会の学術推進プロジェクトに採択して頂いたお陰で、リスクのある研究課題に大胆に挑戦することが出来ました。目の前に解決すべき課題が見つかったとしても、思い付いた方法で解決できる保証はなく、実際にやってみなければ結果は分からない。しかも、そのようなリスクのある研究課題では研究費を得るのは容易ではないため、スタートラインに立つことさえ難しい。そういったリスクを承知で寛容にも採択して頂き、挑戦する機会を頂いたことに心より感謝したいと思います。研究は2年間で右往左往し、修正を繰り返しながらも、基礎検討段階までは何とかクリアできました。学

術推進プロジェクトとの名に恥じないよう、引き続き本研究の実用化を目指し、少しでも臨床検査の推進に貢献できるように努めていきたいと思ひます。改めまして、本研究の助成を頂き、有難うございました。