

氏 名 うえじま ようじ
上島 洋二

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 405 号

学位授与年月日 令和 5 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目
Exploration for the rapid detection method for bacterial pathogen
in pediatric clinical specimens using the melting temperature
mapping method.
(Melting temperature mapping法を用いた小児臨床検体中の
細菌性病原体の迅速検出法の探索)

論文審査委員

(主査)	教授	山本 善裕
(副査)	教授	森永 芳智
(副査)	教授	林 篤志
(副査)	准教授	甲斐田 大輔
(指導教員)	准教授	仁井見 英樹

論 文 要 旨

論 文 題 目

**Exploration for the rapid detection method for bacterial pathogen
in pediatric clinical specimens using the melting temperature mapping method.**

**(Melting temperature mapping 法を用いた小児臨床検体中の
細菌性病原体の迅速検出法の探索)**

富山大学大学院医学薬学教育部（博士課程）

生命・臨床医学専攻

臨床分子病態検査学講座

上島洋二

〔目的〕細菌感染症において起炎菌を同定する方法の gold standard な方法は培養法である。培養法では、臨床検体を採取してから微生物が同定されるまでに数日を要し、患者は不適切な広域抗菌薬を投与されることがある。より迅速に起炎菌を同定する方法が期待されている。Melting Temperature (T_m) mapping 法は、リアルタイム PCR 法を利用した起炎菌同定方法であり、成人の場合、採血後 3 時間以内に細菌の同定が可能である。しかし、小児の細菌感染症患者の臨床検体から起炎菌を検出できるかどうかを検討した研究はない。本研究では、市販用に向けてプライマーセットを新たに設計し、より多くの菌種を含むデータベースを構築した。T_m mapping 法を用いて小児の様々な臨床検体から起炎菌の検出が可能か培養検査と比較し有用性を徹底的に検討した。


〔方法〕感度試験では、細菌（7 菌種）を培養し、フローサイトメーター（Beckman Coulter CytoFLEX）を用いて各試料の菌細胞数を調整し、血液と混入し特定の菌濃度を作成し、その後、ガラスビーズ法で破砕し、T_m mapping 法を用いて同定が可能かを確認した。臨床試験では、T_m mapping 法と従来の培養法との検出率を比較し T_m mapping 法の有用性を評価する単施設前向き研究を行った。対象は 2015 年 1 月から 2020 年 4 月に埼玉県立小児医療センターの 18 歳未満で細菌感染症を疑われた患者を対象とした。血液検体は、培養法用と T_m mapping 法用に検体を同時、または別々に採取し、24 時間以内の検体の比較を許容した。非血液検体は採取後に培養法用と T_m mapping 法用に分割してそれぞれ検査を行い比較した。培養法は一般的な手順で行い、院内検査室で分離株の同定を実施した。T_m mapping 法の手順は、細菌の DNA を抽出後に、Niimi ら（Sci Rep. 2015;5:12543）の報告をもとに、新しく設計したプライマー用に条件を設定して検査を行った。培養法と T_m mapping 法との同定結果が不一致であった場合に解釈の基準として、「true pathogen」、「possible pathogen」、「indeterminate pathogen」、「contaminate pathogen」をそれぞれ定義した。また、過去に陽性となった血液培養陽性ボトルを調査し、データベースと照合したボトル、および菌種のカバー率を検討した。

〔成績〕感度試験では、 $0 < D \leq 0.26$ は完全一致（37/37=100%）、 $0.26 < D \leq 0.53$ は完全一致（34/35 = 97%）と mismatches（1/35=2.9%）となり、臨床検体では $0 < D \leq 0.53$ を同定とした。臨床検体では 156 名（年齢中央値 2 歳）の小児で計 256 検体を使用した。T_m mapping 法と培養法の一致率は、陽性・陰性検体ともに血液検体で 76.4%（126/165）、非血液検体で 79.1%（72/91）であった。血液および非血液検体の培養法による同定結果を報告するまでの期間の中央値は、それぞれ 6.39 日、3.07 日であった。DNA 抽出から T_m mapping 法の結果を報告するまでの平均時間は 3.6 時間であった。T_m mapping 法で菌種が検出された 56 検体のうち、32 検体が培養法陰性であった。T_m mapping 法が陰性で培養法が陽性の検体は 2 検体であった。T_m mapping 法と

培養法の両者で同定された菌種の不一致がみられた検体は2検体であった。カバー率の調査では、細菌が同定された血液培養陽性ボトルの数では605ボトルのうち588ボトル(99%)がデータベースでカバーされていたが、菌種でみると46菌種のうち42菌種(91%)がカバーされていた。

〔総括〕小児の臨床検体において、また、血液に限らず非血液検体でも、Tm mapping 法が培養法より迅速で高い検出率を示した。培養法が同定不可でTm mapping 法のみで同定された41検体のうち、trueと分類されたのは13検体のみであった。そのほかは、16検体、9検体、3検体がそれぞれ、possible、contaminate、indeterminateと分類された。Tm mapping 法では細菌を貪食した白血球を多く含むバフィーコートが採取されるため、抗菌薬投与後でも死菌を検出したことで同定率が向上したと推測された。個々の症例報告では、抗菌薬のde-escalationや医療費の削減につながったことを報告した。以上より、Tm mapping 法は小児科領域における細菌感染症の起炎菌の迅速同定に有用であり、特に培養陰性例に対する抗菌薬適正使用に有用であると考えられた。一方で、稀な菌種の同定が可能かデータベースの拡充による検証が必要なこと、複数菌の同定は有意な細菌のみしか検出できないことが限界であった。少量検体から行えることから、Tm mapping 法は小児の細菌感染症の迅速同定から最適な診断、治療に結び付く検査方法として期待される。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	上島 洋二
論文審査委員	職 名 (主査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 准教授	氏 名 山本 善裕 森永 芳智 林 篤志 甲斐田 大輔	
指導（紹介）教員	准教授	仁井見 英樹	
(論文題目 英文の場合は和訳, 日本文の場合は英訳を付記すること) Exploration for the rapid detection method for bacterial pathogen in pediatric clinical specimens using the melting temperature mapping method. (Melting temperature mapping法を用いた小児臨床検体中の細菌性病原体の迅速検出法の探索)		(判定) 合格	
(論文審査の要旨) 〔目的〕 細菌感染症において起炎菌を同定する方法のgold standardな方法は培養法である。培養法では、臨床検体を採取してから微生物が同定されるまでに数日を要し、患者は不適切な広域抗菌薬を投与されることがある。より迅速に原因菌を同定する方法が期待されている。Melting Temperature (T _m) mapping法はリアルタイムPCR法を利用した原因菌同定方法であり、成人の場合、採血後3時間以内に細菌の同定が可能である。しかし、小児の細菌感染症患者の臨床検体から原因菌を検出できるかどうかを検討した研究はない。上島氏は本研究において、市販用に向けてプライマーセットを新たに設計し、より多くの菌種を含むデータベースを構築した。T _m mapping法を用いて小児患者の臨床検体から起炎菌の検出が可能か培養検査と比較し、有用性を検討した。 〔方法〕 上島氏は、感度試験では細菌（7菌種）を培養し、フローサイトメーター（Beckman Coulter CytoFLEX）を用いて各試料の菌細胞数を調整し、血液と混入し特定の菌濃度を作成し、その後、ガラスビーズ法で破碎し、T _m mapping法を用いて同定が可能かを確認した。臨床試験では、T _m mapping法と従来の培養法との検出率を比較しT _m mapping法の有用性を評価する単施設前向き研究を行った。対象は2015年1月から2020年4月に埼玉県立小児医療センターの18歳未満で細菌感染症を疑われた患者を対象とした。血液検体は、培養法用とT _m mapping法用に検体を同時、または別々に採取し、24時間以内の検体			

の比較を許容した。非血液検体は採取後に培養法用とTm mapping法用に分割してそれぞれ検査を行い比較した。培養法は一般的な手順で行い、院内検査室で分離株の同定を実施した。Tm mapping法の手順は、細菌のDNAを抽出後に、Niimiら (Scientific Reports. 2015;5:12543) の報告をもとに、新しく設計したプライマー用に条件を設定して検査を行った。培養法とTm mapping法との同定結果が不一致であった場合に解釈の基準として、「true pathogen」、「possible pathogen」、「indeterminate pathogen」、「contaminate pathogen」を定義した。また、過去に陽性となった血液培養陽性ボトルを調査し、データベースと照合したボトル、および菌種のカバー率を検討した。

〔成績〕

感度試験では、 $0 < D \leq 0.26$ は完全一致 (37/37=100%)、 $0.26 < D \leq 0.53$ は完全一致 (34/35 = 97%) とミスマッチ (1/35=2.9%) となり、臨床検体では $0 < D \leq 0.53$ を同定とした。臨床検体では156名 (年齢中央値2歳) の小児で計256検体を使用した。Tm mapping法と培養法の一致率は、陽性・陰性検体ともに血液検体で76.4% (126/165)、非血液検体で79.1% (72/91) であった。血液および非血液検体の培養法による同定結果を報告するまでの期間の中央値は、それぞれ6.39日、3.07日であった。DNA抽出からTm mapping法の結果を報告するまでの平均時間は3.6時間であった。Tm mapping法で菌種が検出された56検体のうち、32検体が培養法陰性であった。Tm mapping法が陰性で培養法が陽性の検体は2検体であった。Tm mapping法と培養法の両方で同定された菌種の不一致がみられた検体は2検体であった。カバー率の調査では、細菌が同定された血液培養陽性ボトルの数では605ボトルのうち588ボトル (99%) がデータベースでカバーされていたが、菌種でみると46菌種のうち42菌種 (91%) がカバーされていた。

〔総括〕

上島氏は、Tm mapping法と呼ばれる、16S rRNA遺伝子 (16S rDNA) を増幅した後でNested PCRを行い、PCR産物のTm値のパターンから細菌を同定する方法を用いて、小児の臨床検体から細菌の迅速同定が可能かを検証した。前方視的観察研究を行い、小児の血液や髄液、腹水、膿など様々な臨床検体を用いて、少ない検体量 (血液では0.5mL、膿では50 μ L) でも原因菌の迅速同定が可能であること、培養法よりも細菌の同定率が有意に高いことを示した。

以上から、細菌の迅速同定に関してTm mapping法が小児臨床検体に対して有用であることを初めて明らかにした点は新規性がある。また個々の症例報告では、*Neisseria meningitidis*を同定して救命し周囲への感染予防を行い二次感染が予防された症例や、*Streptococcus intermedius*を迅速同定した脳膿瘍の小児例、世界で初めて*Streptococcus pneumoniae*による感染性腎嚢胞の症例などを報告しており、細菌を同定しえたことで抗菌薬のde-escalationを行い医療費の削減につながったことも報告してきたことは実臨床を見据えた医学における学術的重要性も高いと考えられる。また、少ない検体量でも測定可能であること、抗菌薬投与下の培養陰性例の細菌感染症の原因菌同定や臨床検体の無菌状態 (非細菌感染) の確認を行うことができることは臨床的発展性が極めて高いと考えられる。

以上より本審査会は本論文を博士 (医学) の学位に十分値すると判断した。