

## 学内グラント 報告書

## 平成21-22年度 学内グラント終了後報告書

標準化半定量 Real-time PCR 法 (HIRA-TAN) を用いた  
呼吸器感染症の包括的起炎病原体の診断方法

研究代表者 平間 崇 (大学病院 呼吸器内科)

## 緒言

肺炎の起炎菌は、実はわかっているようで不明な点が多く、普及している迅速診断法もインフルエンザウイルスや肺炎球菌などの一部の病原体にしかないと、約半数の肺炎患者は起炎菌が不明なまま治療をうけている。日常診療における起炎菌の診断法は、肺炎患者の喀痰を培地に塗り込み、数日後に育成した病原体を同定する方法である(喀痰培養検査)。これでは診断まで時間を要すること、培養できない菌もいること、手技が煩雑であること、検査実施者により結果の誤差がしょうじるなどの問題があるものの、これらは以前より未解決のままである。現在では、高価・強力・広域スペクトルの抗菌薬が普及しているため、治療に難渋する肺炎は昔から比べると減少はしたものの、そのために耐性菌の出現、医療費の高騰をまねき、またそれら抗菌薬で治療できないものも存在するため、肺炎は今なお本邦の死亡原因4位のままである。

病原体検出においてPCRなどの分子生物学的手法は有用な検査法であるが、呼吸器感染症領域では普及していない。それは、検出能力が高いPCRは、肺炎球菌や緑膿菌などのような定着型病原体(無症候で気道に存在しうる病原体、すなわち常在菌)が検出されても起炎菌と確定できないためである。臨床応用されているPCRは、マイコプラズマや結核菌のような非定着病原体(健常者からは検出されず、検出されれば起炎菌と確定できる病原体)に対してのみである。臨床的に問題となる重症市中肺炎や院内肺炎の起炎菌は、定着型病原体によるものがほとんどである。

## 材料と方法

そこで我々は、ヒト細胞と定着型病原体との細胞数をReal-time PCRで表現し、肺炎をおこしている

定着型病原体が有意に増殖しているかを判定できる技術を発明した(特許第4665203号取得, PCT/JP2009/053976公開, JST支援による9ヶ国出願)。肺炎患者の喀痰から定着型病原体がReal-time PCRで検出された場合、治療対象(起炎菌)と非治療対象(常在菌)とにcutoff値を用いて鑑別することに成功した<sup>1)</sup>。また非定着病原体もあわせて包括的にReal-time PCRを実施することで、肺炎で治療対象となる24種類の病原体に対し、4時間以内で一括に起炎菌同定ができる迅速診断キットHIRA-TAN: Human cell-controlled Identification of the Respiratory Agent from TAN(痰)を開発した(Fig.1)。HIRA-TANは肺炎患者の喀痰を使用し、定着型病原体はcutoff値で治療対象を判定/診断し、非定着病原体は検出で治療対象と診断/確定することができる。

## 結果

本開発の臨床的妥当性と再現性を臨床試験によって検証した(UMIN ID: 000001694, 埼玉医科大学 IRB 08-063)。臨床試験は、参加9施設の前向き試験で肺炎症例を連続登録し、既存の診断方法(喀痰塗抹, 喀痰培養, 尿中抗原)とHIRA-TANを全症例で実施した。既存の診断方法をもとに、HIRA-TANでの起炎菌の診断率、また、定着型病原体に設定したcutoff値の妥当性を検証した。2009年2月から2010年10月にかけて肺炎症例568例が登録され、そのうちHIRA-TANで起炎菌を同定できたものが360例(63.4%)、既存の診断方法で起炎菌を同定できたものが321例(56.4%)であり、HIRA-TANでは既存の診断方法以上の起炎菌診断率と迅速性を有することが証明できた。また、HIRA-TANの定着型病原体に設定したcutoff値での診断方法は、既存の診断方法で起炎菌と診断する定着型病原体を90%以上の割合で診断できることを証明できた。

## 考 察

HIRA-TANは、定着型病原体はcutoff値を用いることで既存の診断方法とおなじ診断能力にくわえ、非定着型病原体を網羅的に検出できる診断力を兼ね備えた迅速診断検査であることが証明された。治療早期から簡便かつ迅速に肺炎の起炎菌の診断ができれば、経験的治療から確定的治療へ移行でき、抗菌薬の適正使用につながる。本発明にはそれを実現化する能力がある。最終的には医療経済効果や耐性菌抑制効果など公衆衛生の改善へ寄与するまで発展させることを目標とする。

## 謝 辞

実験に協力頂いた埼玉医科大学呼吸器内科江頭博氏、宮澤仁志氏に感謝する。本研究の一部は埼玉医科大学学内グラント(21-02-02-06)による。

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) 川島彬子, 平間崇, 西原冬実, 嶺崎祥平, 萩原弘一, 清水禎彦, 他. インフルエンザウイルスA/H1N1 2009肺炎の1剖検症例. 日呼吸誌 2012;1(1):56-61.
- 2) Hirama T, Yamaguchi T, Miyazawa H, Tanaka T, Hashikita G, Kishi E, et al. Prediction of the pathogens that are the cause of pneumonia by the battlefield hypothesis. PLoS One 2011;6(9): e24474.
- 3) 平間崇, 松岡優, 江頭博, 嶺崎祥平, 池淵研二, 萩原弘一, 他. 埼玉県西部地区における2009/2010シーズンのインフルエンザ対策. 日本医事新報 2011;4526:60-6.
- 4) Hirama T, Hagiwara K, Kanazawa M. Tuberculosis

## HIRA-TAN の 検出標的 ( 40 target genes )

01 <i>Homo sapiens</i>	21 <i>Acinetobacter baumannii</i>
02 <u><i>Streptococcus pneumoniae</i></u>	22 <u><i>Escherichia coli</i></u>
03 <u><i>Haemophilus influenzae</i></u>	23 <u><i>Serratia marcescens</i></u>
04 <u><i>Moraxella catarrhalis</i></u>	24 <i>Bordetella pertussis</i>
05 <u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u>	25 <i>Coxiella burnetii</i>
06 <u><i>Klebsiella pneumoniae</i></u>	26 Influenza virus A
07 <u><i>Stenotrophomonas maltophilia</i></u>	27 Influenza virus B
08 <u><i>Staphylococcus aureus</i>, MSSA</u>	28 Influenza virus A H1 seasonal
09 <u><i>Staphylococcus aureus</i>, MRSA</u> *	29 Influenza virus A H3 seasonal
10 <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	30 Influenza virus A H5 avian
11 <i>Legionella pneumophila</i>	31 Influenza virus A H1 pdm 2009
12 <i>Legionella</i> spp.	32 human metapneumovirus
13 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	33 RS virus
14 <i>Chlamydia psittaci</i>	34 human Rhinovirus A
15 <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	35 human Rhinovirus B
16 <i>Mycobacterium intracellulare</i>	36 human Rhinovirus C
17 <i>Mycobacterium avium</i>	37 <i>Aspergillus</i> spp.
18 <i>Mycobacterium kansasii</i>	38 <i>Aspergillus fumigatus</i>
19 <i>Nocardia</i> spp.	39 metallo-beta-lactamase IMP*
20 <i>Pneumocystis jirovecii</i>	40 metallo-beta-lactamase VIM *

下線のある病原体: 定着型病原体 ( cutoff値で診断)

下線のない病原体: 非定着病原体 ( PCR検出で診断)

\*: 薬剤耐性関連遺伝子 ( 多剤耐性菌に関連する)

**Fig. 1.** HIRA-TAN の検出標的(40 target genes). HIRA-TAN (Human cell controlled Identification of Respiratory Agent from “TAN” [Sputum]) は喀痰中のヒト細胞を標準化した半定量Real-time PCR法である。

- 喀痰を使用したreal-time PCR法による迅速検査法(4時間) *Rapid*
- 40標的遺伝子に対する肺炎の起炎病原体の包括的検査法 *Comprehensive*
- 検出された定着型病原体を治療対象(起炎菌)か非治療対象(定着菌)か鑑別できるreal-time PCR法(国内特許第4665203号取得, PCT/JP2009/053976公開, JST支援による9カ国に特許出願)と非定着型病原体を検出するreal-time PCR法を組み合わせた革新的検査法 *Innovative*
- 40検出標的は1検体6000円と高い医療経済的検査法 *Economic*
- 伝染性病原体や多剤耐性菌の早期発見 (院内感染対策) *Safe*

screening programme using the QuantiFERON-TB Gold test and chest computed tomography for healthcare workers accidentally exposed to patients with tuberculosis, *Journal of Hospital Infection* 2011;77(3):257-62.

## 賞与

- 1) 日本呼吸器学会奨励賞. ヒト細胞標準化半定量 real-time PCRの開発と臨床応用. 日本呼吸器学会. 受賞者 平間崇. 2012年4月
- 2) 優秀指導医賞. 埼玉医科大学病院. 受賞者 平間崇. 2012年3月
- 3) 日本化学療法学会学術奨励賞. 標準化半定量 PCR法を用いた呼吸器感染症の起炎菌同定法 -A multicenter prospective study for the validation-. 第58回日本化学療法学会総会. 受賞者 平間崇. 2010年6月
- 4) 日本内科学会奨励賞. 標準化半定量 Real-time PCR法を用いての呼吸器感染症の起炎病原体診断～新しい肺炎検査の試み～. 第107回日本内科学会講演会. 受賞者 平間崇. 2010年4月
- 5) American Thoracic Society International Trainee Travel Award. Multicenter Prospective study for the validation of the Novel and Multiplex real-time PCR-based diagnostic test for 20 pneumonic pathogens in the Respiratory Tract Secretions. American Thoracic Society 2009 International Conference (米国胸部学会国際会議2009). San Diego, CA. USA. 受賞者 平間崇. 2009年5月
- 6) Respiratory Tract Infection Young Investigators Award. 標準化半定量 Real-time PCRを用いての呼吸器感染症の起炎病原体同定法～新しい肺炎検査の試み～. RTI 研究会/バイエル薬品株式会社. 受賞者 平間崇. 2008年12月

## 特許

- 1) 科学技術振興機構の支援によるPCT指定国へ出願決定: 米国, ヨーロッパ特許(英国・フランス・ドイツ), カナダ, インド, 中国, オーストラリア. 出願者 平間崇, 萩原弘一. 2010年6月
- 2) 国際特許 PCT/JP2009/053976 公開. 急性呼吸器感染症起炎病原体の鑑別方法. 発明者 平間崇, 萩原弘一. 2009年3月
- 3) 国内特許 第4665203号 取得. 急性呼吸器感染症起炎病原体の鑑別方法. 発明者 平間崇, 萩原弘一. 特願2008-052399, 2008年3月

## 競争的資金

- 1) 科学技術振興機構 第2回 A-STEP FS シーズ顕在化タイプ(課題番号 AS2321117F). 肺炎の早期確定的

治療を実現する原因微生物網羅的迅速判定システムの開発. 研究代表者PI 平間崇. 2012年4月

- 2) 日本学術振興会 科学研究費補助金 若手研究B(課題番号 23790918). ヒト細胞標準化 Real-time PCR法での肺炎起炎菌診断と網羅的病態解析. 研究代表者PI 平間崇. 2011年4月
- 3) 埼玉医科大学医学部同窓会 第20回 落合記念賞. HINF study: HIRA-TANで使用するカットオフ値の妥当性を検証する前向き試験. 研究代表者PI 平間崇. 2009年6月.
- 4) 日本学術振興会 国際学会等派遣事業. Multicenter Prospective study for the validation of the Novel and Multiplex real-time PCR-based diagnostic test for 20 pneumonic pathogens in the Respiratory Tract Secretions. American Thoracic Society 2009 International Conference. 研究代表者 平間崇. 2009年5月
- 5) 日本学術振興会 科学研究費補助金 若手研究B(課題番号 21790784). 標準化半定量 Real-time PCRを用いた呼吸器感染症の包括的迅速診断法. 研究代表者PI 平間崇. 2009年4月

## 学会発表

- 1) 平間崇. QFTと胸部CTを活用した医療従事者の結核接触者健診, 第86回日本結核病学会総会, 2011年6月, 東京
- 2) Hirama T, Hagiwara K, Kanazawa M. Tuberculosis screening program using the QuantiFERON-TB Gold test and chest computed tomography for healthcare workers accidentally exposed to patients with tuberculosis, European Respiratory Society Annual Congress 2011, 2011年9月, Amsterdam, the Netherlands
- 3) 平間崇, 嶺崎祥平, 三尾友彦, 山口剛史. 埼玉県西部地区を中心とした(市中/医療ケア関連/院内発症)肺炎の原因微生物について, 第59回日本化学療法学会総会, 2011年6月, 札幌
- 4) 平間崇. ヒト細胞標準化 real-time PCR法を用いた呼吸器感染症の起炎病原体スクリーニング検査, 第58回日本化学療法学会総会, 2010年6月, 長崎
- 5) Hirama T, Fukunaga K, Yamaguchi T, Kanazawa M, Hagiwara K. Cell number ratio of pathogen to inflammatory cells discriminates the commensal organisms causing pneumonia, American Thoracic Society 2010 International Conference, 2010年5月, New Orleans, LA. USA.
- 6) 平間崇, 福永興壺, 金澤實, 萩原弘一. ヒト細胞標準化 real-time PCR法を用いた呼吸器感染症の起炎病原体スクリーニング検査, 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 2010年4月, 京都

- 7) 平間崇, 田中政彦, 嶺崎祥平, 山口剛史, 金澤實, 萩原弘一. ヒト細胞標準化 real-time PCR法を用いた呼吸器感染症の起炎病原体スクリーニング検査, 第84回日本感染症学会総会・学術講演会, 2010年4月, 京都
- 8) 平間崇. ヒト細胞標準化 real-time PCR法を用いた呼吸器感染症の起炎病原体スクリーニング検査, 第21回日本臨床微生物学会総会, 2010年1月, 東京
- 9) Hirama T, Kanazawa M, Hagiwara K. HIRA-TAN: A Real-time PCR-based Diagnostic Test for the Pathogens of Pneumonia, 47th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, 2009年11月, Philadelphia, PA, USA.
- 10) Hirama T, Minezaki S, Mio T, Kanazawa M, Hagiwara K. HIRA-TAN: a real-time PCR-based diagnostic test for the pathogens of pneumonia, 2009 European Respiratory Society annual congress, 2009年9月, Vienna, Austria.
- 11) 平間崇, 小林国彦, 永田真, 金澤實, 萩原弘一. 標準化半定量 Real-time PCRを用いた呼吸器感染症の起炎菌同定法 - HIRA-TANの多施設前向き試験の結果報告 -. 第49回日本呼吸器学会学術講演会, 2009年6月, 東京
- 12) 平間崇, 金澤實, 萩原弘一. 標準化半定量 PCR法を用いた呼吸器感染症の起炎菌同定法 - A multicenter prospective study for the validation -, 第57回日本化学療法学会総会, 2009年6月, 東京
- 13) Hirama T, Minezaki S, Yamaguchi T, Kanazawa M, Hagiwara K. Multicenter Prospective study for the validation of the Novel and Multiplex real-time PCR-based diagnostic test for 20 pneumonic pathogens in the Respiratory Tract Secretions, American Thoracic Society 2009 International Conference, 2009年5月, San Diego, CA, USA.
- 14) 平間崇, 嶺崎祥平, 山口剛史, 金澤實, 萩原弘一. 標準化半定量 Real-time PCRを用いた呼吸器感染症の起炎菌同定法 - 多施設前向き試験の結果報告 -. 第83回日本感染症学会総会・学術講演会, 2009年4月, 東京
- 15) 平間崇, 嶺崎祥平, 宮下起幸, 山口剛史, 小林国彦, 永田真, 金澤實, 萩原弘一. 標準化半定量 Real-time PCR法を用いての呼吸器感染症の起炎病原体診断. 第106回日本内科学会総会・講演会, 2009年4月, 東京