

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム  
セットアップスキーム (ACT-MS)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 新たな起炎菌迅速同定・定量技術を基盤とし、菌数を敗血症の新規バイオマーカーとする検査システムの開発

(英語) Development of a novel rapid identification and quantification method of bacteria in a septic blood sample which can produce an effective biomarker for monitoring patient care

研究開発実施期間：2016年11月1日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 仁井見 英樹

氏名：(英語) Hideki Niimi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

(日本語) 富山大学 大学院医学薬学研究部 (医学) 准教授

(英語) National University Corporation, University of Toyama, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Education (Medicine), Associate Professor

## II 研究開発の概要

### 1. 研究開発の目的

重篤な敗血症の発症は一般的に認められ、しばしば致命的な状態になり得る。敗血症早期の適切な抗菌薬治療は、敗血症疑い患者の致死率を大幅に改善する結果につながる。しかし、抗菌薬治療を終える適切なタイミングを判断することは難しく、抗菌薬治療が十分かどうかを判断することさえ困難であることが現状である。これら抗菌薬の効き目や治療の止め時を正確に判断するためには、細菌感染症の重症度を正確に反映するバイオマーカーが必要である。現在、細菌感染症の重症度を反映するバイオマーカーとして使用されているものは、プロカルシトニン、プレセプシン、体温、白血球数、CRP (C-reactive protein) などである。これらのバイオマーカーは細菌感染症の重症度とある程度は相関するが、必ずしもその時点での重症度を正確に反映している訳ではない。

この問題を解決するため、我々は三井化学(株)の研究グループと共に、独自開発した技術(真核生物を用いてリコンビナントに作成した耐熱性DNA合成酵素、および敗血症起炎菌迅速同定法:Tm mapping法、等)を応用して、患者検体中の未知の敗血症起炎菌を迅速に同定かつ定量する新たな技術を開発した。この新技術を用いると、「患者検体中の起炎菌数」を正確に測定することが出来、菌数を細菌感染症の重症度を正確に判断するための新たなバイオマーカーとして用いることが出来るようになる。患者検体中の菌数とは、他のバイオマーカーのように「感染に対する宿主(ヒト)側の反応」を測定するのではなく、「感染菌そのものの情報」をダイレクトに測定するのである。

本研究開発の目的とは、血液中の起炎菌同定と菌数（菌名&菌数/mL）測定を迅速（採血後4時間程度）・正確に行える独自開発の検査技術を実用化（製品化）することである。その結果、起炎菌の迅速同定結果を敗血症早期の適切な抗菌薬選択に役立たせることが出来る。また、菌数を敗血症重症度や治療効果を示す新規バイオマーカーとして用いることで、「選択した抗菌薬が適切であるかどうか」や「抗菌薬投与をいつ止めるべきか」がリアルタイムで明らかとなり、効果的かつ無駄のない感染症治療を行うことが出来るようになる。

## 2. 成果

本研究では①～④を研究開発課題とした。各課題の成果は以下のとおり。

### 課題①「Tm mapping法の製品化（キット化）とキットの販売開始」

- ・三井化学(株)により生産体制構築を完了し、今後の受注に対し生産可能な状態とした。
- ・受注窓口を三井化学本社 web 内に設置し、研究用試薬としての有償販売を開始した。
- ・データベース型起炎菌同定ソフトウェアの利用体制を構築し、web 上に公開した。

### 課題②「Tm mapping法の先進医療化」

- ・Tm mapping 法について、国内誌4報、海外誌1報を publish した。
- ・Tm mapping 法（+定量法）の本格的な試験運用を富山大学附属病院で200症例実施した。
- ・起炎菌迅速同定キットの薬事対応について、PMDA との相談を実施中。

### 課題③「真空採血管のコンタミの解決」（本研究開発のボトルネック）

- ・NIPRO 社と共同で bacterial DNA contamination-free 真空採血管の開発に成功し、NIPRO 社工場にて量産できる体制を構築した。その後1万本オーダーし、予定通り納入された。
- ・真空採血管（EDTA-2K, 2ml）について、他社製品と NIPRO 社 bacterial DNA contamination-free 真空採血管をそれぞれ10本ずつ無作為抽出し、molecular-grade distilled water をそれぞれ2ml ずつ注入し、採血管内の contaminated bacterial DNA の定量を行った（*E. coli* 換算値）。その結果、他社の採血管は10本中8本で contamination が認められた（平均65 *E. coli*/tube）が、NIPRO 社 bacterial DNA contamination-free 真空採血管ではいずれもゼロであり、bacterial DNA の contamination は全く認められなかった。
- ・Tm mapping 起炎菌同定&定量検査法の学内試験運用に NIPRO 社 bacterial DNA contamination-free 真空採血管（EDTA-2K, 2ml）を使用し、毎回の検査毎にネガティブコントロールとして molecular-grade distilled water を2ml ずつ注入し、採血管内の contaminated bacterial DNA の定量を行った（*E. coli* 換算値）。その結果、150本を検査したところ、陰性（0個/tube）が116本、1個未満/tube が32本、1個/tube が2本であった。但し、ここで検出された菌は前処理工程でのコンタミネーションである可能性も否定できない。つまり、contaminated bacterial DNA は最大でも1個（*E. coli* 換算値）以下/tube の真空採血管であることが確認された。

### 課題④「菌数を敗血症のバイオマーカーとする定量法の実用化」

- ・細菌 DNA 汚染の無い eukaryote-made *Taq* polymerase を用い、nested PCR を併用した結果、低濃度から高濃度領域までの高感度で正確な定量を可能とした（50～75,000 CFU *E. coli*/mL 血液）。
- ・Tm mapping 法と定量技術を組み合わせることにより、採血後4時間で起炎菌の同定・定量検査を可能とした。

- ・起炎菌の迅速同定・定量検査技術について、2つの国内特許を出願した（特願 2017-246724, 特願 2017-246333）。
- ・三井化学と共に敗血症起炎菌迅速同定&定量検査キット、および定量コントロールキットを新たに作成し、起炎菌迅速同定&定量検査キットを 600 キット、定量コントロールキットを 400 キット実際に使用した。
- ・富山大学附属病院で「敗血症起炎菌迅速同定&定量」検査を計 200 症例実施し終えた。
- ・敗血症疑い 200 症例中、起炎菌が PCR 検出された 34 症例を迅速同定・定量検査した。その結果、重症度（qSOFA, Pitt Bacteremia Score, Shock の有無, 治療後 7 日 or 14 日生存率, にて評価）の高い症例は菌数も多い明確なデータを示した。つまり、菌数と重症度とは明らかな相関を示した。
- ・治療前の採血時に起炎菌が PCR 検出された 34 症例のうち、更に治療前、抗菌薬投与後 2 4 時間、および 7 2 時間で採血を行った 24 症例における菌数の経時的な推移を分析した。その結果、敗血症治療経過の良好な症例の多くが、治療 24 時間後に菌数が治療前の半分以下、72 時間後は 1/4 以下となった。逆に治療経過不良な症例では、治療 24 時間後に菌量の増加を認めた。
- ・臨床経過で分類した 24 症例における菌数、白血球数、CRP、プレセプシン、プロカルシトニン、IL-6 の経時的な推移を比較・分析した。その結果、菌数は敗血症の治療経過良好を正確に反映するが、WBC, CRP, PCT は特に治療 24 時間後において必ずしも治療経過良好とは一致せず、逆に上昇する機会が多かった。また、敗血症以外の他の炎症性疾患を合併した場合、WBC, CRP, PCT, P-SEP は非常に影響を受けるが、血中の菌数はその影響を受けることなく、敗血症の治療経過を正確に反映した。IL-6 は治療経過良好であれば治療 24 時間後に上昇することは無いが、治療経過不良の場合に菌数は治療 24 時間後に上昇するのに対し、逆に IL-6 は減少してしまう。以上の結果を考慮すると、菌数は敗血症の治療経過を最も迅速・正確に反映するバイオマーカーであることが強く示唆された。

### 3. 開発技術の特徴・優位性

【コスト面】 1 検体 1 万円（保険収載後は 3 千円）

【迅速性】 採血後 4 時間で起炎菌を同定&定量

【同定可能な菌種の数】 データベース中の 160 菌種以上を同定。データベースの更新は迅速かつ簡便。

【陰性判定】 採血後 4 時間程度で陰性判定。迅速に陰性判定が行えるのは本検査法のみ。

【起炎菌の定量】 1~40 万個/PCR Tube で正確に定量。本法は検体中の菌数を迅速&正確に定量出来る初の方法。

### 4. 今後の展開

**医療ニーズ**：本研究の実用化は感染症患者の重篤化を防ぎ、長期入院の回避に役立つ

**社会的インパクト**：菌数を新たなバイオマーカーとする、以下の感染症医療の創出の可能性

- ・菌数が感染症重症度の新たな指標となる可能性
- ・菌数の経時的変化が治療効果の新たな指標となる可能性
- ・菌数が限りなくゼロに近づくことが抗菌薬の止め時の指標となる可能性
- ・敗血症の定義が菌数を指標としたものになる可能性
- ・菌数測定は血液検体だけでなく、脳脊髄液、心嚢水、胸水、腹水、羊水、関節液、眼房水、術後のドレーン排液など、多種の感染症の重症度や治療効果の指標、感染症リスク管理の指標として利用されるようになる可能性。その他、本検査技術は臨床検査だけでなく、医療品・器具の細菌汚染検査や、生活用水、実験溶液などの細菌汚染検査に応用可能。

## 【英文研究概要】

Severe sepsis is a common and frequently fatal condition. Initial adequate antibiotic therapy results in a significant decrease in the crude mortality rate among patients suspected of sepsis. However, it is difficult to judge the best timing to stop the antibiotic therapy, or even whether the antibiotic therapy is adequate. In order to judge correctly, we need a biomarker to strictly reflect the severity of microbial infection. Current biomarkers to reflect the severity of microbial infection are Procalcitonin, Presepsin, body temperature (BT), white blood cells (WBC), C-reactive protein (CRP), etc. These biomarkers correlate with the severity of microbial infection to some extent, but do not always accurately reflect the severity at a particular point in time.

To solve this problem, we developed a novel rapid identification and quantification method of unknown bacteria in a clinical sample using the original technology (the eukaryote-made thermostable DNA polymerase and the melting temperature ( $T_m$ ) mapping method, etc.). Using the novel method, “the bacterial concentration in a clinical sample” can be correctly measured as a novel biomarker to accurately judge the severity of microbial infection. The bacterial concentration is not a result of the host defense but direct information about the pathogen itself.

During this research period, we identified and quantified bacteria in 34 septic blood samples, and found that the quantification results were clearly correlated with severity of sepsis. We subsequently examined the time-dependent changes of blood bacterial concentration in 24 septic blood samples, and found that the time-dependent changes of blood bacterial concentration ran parallel with treatment progress, but were not correlated with those of Presepsin, Procalcitonin, WBC, CRP and IL-6. In particular, 24 to 72 hours after antibiotic treatments, blood bacterial concentrations were dramatically decreased (less than 50%, and less than 25%, respectively).

The novel method enables the identification and quantification of bacteria in a clinical sample around four hours of whole blood collection. We indicated the possibility as follows: based on the blood bacterial concentration, we could estimate the accurate severity of microbial infection. Moreover, using the time-dependent change of blood bacterial concentration, we could monitor the accurate therapeutic effect. As a result, we could find the best timing to stop antibiotic treatment as well.