

氏 名	白 石 守
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 617 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	マイクロバイーム手法にヒト細胞数によるノーマライゼーションを加えた呼吸器感染症迅速診断システムの開発
論文審査委員	(委員長) 教授 遠 藤 俊 輔 (委 員) 教授 畠 山 修 司    講師 氣 駕 恒太朗

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

感染性肺炎（以下、肺炎）は、患者生命に関わる重要な疾患である。喀痰培養検査では起炎菌の特定は容易ではなく、正確で迅速な特定方法が求められている。

遺伝子工学的細菌同定法として行われている PCR (Polymerase Chain Reaction) 法は鋭敏過ぎて起炎菌と常在菌が同時に検出されてしまうため、半定量リアルタイム PCR を用い起炎菌と常在菌を判別しようという試みがなされている。本研究もその一つである。

今回我々は、全ての細菌が有する 16S rRNA 遺伝子を標的として PCR を実施し、喀痰検体中に最頻度で存在する細菌を同定した。さらに喀痰検体中のヒト細胞数当たりの病原菌数をリアルタイム PCR で半定量することで、同定された病原菌が肺炎の起炎菌か決定できるか検討した。

### 2 研究方法

#### 1. 実験前準備 ローカルデータベースの作成とプライマーの設計

16S rRNA 遺伝子配列の相同性によって細菌種を同定するため、肺炎をきたす可能性のある 49 種の細菌を選択し、ローカルデータベースを構築した。米国国立生物工学情報センターから各細菌の遺伝子配列情報を入手し、16S rRNA 遺伝子配列を抽出した。ClustalW 解析を用いてアライメントし、遺伝的に高度に保存されている領域でプライマーミックスを設計した。さらに、ヒト MUC5B 遺伝子の塩基配列を NCBI より入手し、PCR プライマーと TaqMan プローブを設計した。

#### 2. 研究対象

2018 年 7 月から 2019 年 9 月までに呼吸器感染症のために自治医科大学附属病院呼吸器内科を受診した症例より採取された喀痰残余 223 検体を使用し、診療情報に基づき、急性感染群 (Group A) 84 件、非急性感染群 (Group C) 139 件を対象とした。

#### 3. DNA 抽出

検体を均質化したのち、ガラスビーズ法により DNA 抽出を行い、細菌 16S rRNA 遺伝子とヒト MUC5B 遺伝子の 2 つのパートでリアルタイム PCR を実施した。PCR 産物を回収し、それぞれの Ct 値を測定した。16S rRNA 遺伝子増幅産物の塩基配列を Sanger 法によるダイレクトシーケンスで決定した。

#### 4. リアルタイム PCR と $C_{t\text{pathogen}}$ , $C_{t\text{human}}$ の測定

病原菌を同定するための相同性検索は BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) プログラムを用いて bit score を計測することにより行った。最も高い bit score を示した細菌を病原菌とし、培養検査で得られた最頻度菌種と比較した。また、同定された病原菌の活動性を、細菌 16S rRNA 遺伝子とヒト MUC5B 遺伝子の  $C_t$  値の差 ( $\Delta C_t$ )を用いて評価した。

### 3 研究成果

#### 1. 病原菌の同定

16S rRNA 遺伝子配列での相同性検索の妥当性を調べるため、2 菌種間の bit score を測定したところ、閾値を 700 に設定することで大半の菌種は判別が可能であった。口腔内常在菌 (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*) の配列情報もローカルデータベースに加え、これらの菌種も除外できるようにした。

PCR 増幅産物をシーケンスする際に生じるノイズにより不適となった検体を除き、使用可能な検体数は Group A 28 件, Group C 45 件となった。16S rRNA 遺伝子配列を使用した相同性検索結果の細菌の約 3 分の 1 が *S. pneumoniae* であったが、培養検査結果ではわずか 1 件のみであった。相同性検索結果と培養検査結果の一致率は Group A 28 件中 5 件 (17.9%)、Group C 45 件中 7 件 (15.6%)であり Group 間で差はなかった。相同性検索結果と培養検査結果が一致した Concordant 群と、不一致であった Discordant 群で  $\Delta C_t$  の分布に違いはみられなかった。また、Group A, C の検体群間でも差はみられなかった。

#### 4 考察

今回使用した検体の培養検査で、*S. pneumoniae* 検出率が低くなったのは抗菌薬前治療により細菌の生存・増殖が抑制されたことが原因として考えられる。これに対し、16S rRNA 遺伝子シーケンス法は検体中の抗菌薬の影響を受けないという利点があり、本法は、培養検査で検出不能の起炎菌でも検出できる可能性が示唆された。

本法で同定した細菌が起炎菌であるかを判断する基準として、「戦場仮説」に倣って検体の細菌 16S rRNA 遺伝子とヒト MUC5B 遺伝子の  $C_t$  値を測定し、その差  $\Delta C_t$  により菌の活動性を評価し、起炎菌を推定しようとした。予想に反し、喀痰培養で起炎菌と推定された Concordant 群と定着菌と推定された Discordant 群で  $\Delta C_t$  に差が見られなかったほか、急性炎症と慢性炎症の検体間でも差がみられなかった。これは測定可能な検体数が少なかったこと、検体に唾液成分が混入していた可能性が考えられた。今後、抗菌薬前治療の有無を把握した上でのさらなる検体を蓄積するとともに、検体採取法や PCR における工夫が必要と考えられる。

#### 5 結論

本研究は、16S rRNA 遺伝子という肺炎を来す代表的な細菌の共通部分を使用してプライマーを設計し PCR を行い、起炎菌を探索した最初の報告である。本法は口腔内常在菌の混入などの問題はあものの、喀痰培養では検出しない病原菌を検出できる可能性が示唆された。しかし、リアルタイム PCR より得られた 16S rRNA 遺伝子配列、ヒト遺伝子配列それぞれの  $C_t$  値による、感染か定着かの判断には更なる検体蓄積と検査手技の改良が必要と考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

従来の喀痰培養検査のみならず、PCR などの遺伝子工学手法を用いても肺炎の起炎病原菌の同定は難しく、多くの症例では広域スペクトラム抗菌薬を使用せざるを得ない現状である。このような状況において、迅速で効率的な起炎菌の同定法を開発しようとした本研究の臨床的意義は大きい。

研究の第 1 段階として肺炎患者の喀痰検体から 16S rRNA 遺伝子配列を PCR の標的とし増幅し、研究者が独自に設定した細菌リストを用いて病原菌を同定しようと試みた。その中には、唾液からの *Streptococcus* 属の混入がみられたために肺炎の原因菌を同定できないものもあり、検体採取法や処理法を改良すべきことが指摘された。とはいえ、喀痰培養検査で検出しにくい肺炎起炎菌の同定に本法の可能性が示唆された。

第 2 段階として、喀痰のリアルタイム PCR で得られる  $\Delta C_{t_{\text{pathogen}}}$  を測定し、同定された病原菌の活動性を推定しようとしたが、今回の研究では 本法の有用性は示せなかった。これは技術的に  $\Delta C_t$  を測定できた検体数が少なかったことや唾液成分の混入による測定誤差が原因と考えられ、検体採取法から測定方法まで更なる改良が必要であることが示唆された。

白石氏から提出された論文は、実験手法にいくつかの問題点はみられたものの、実験の目ざす方向、および手法の将来性は評価されるべきものであり、学位論文に値するものと評価した。

## 最終試験の結果の要旨

白石氏の学位論文は、審査の段階で実験手法の記載や結果の解釈についていくつか問題点が指摘された。これらの点について、白石氏は口頭審査及び論文紙面上において適切に対応し修正した。実験手法にいくつかの改善すべき点は残るものの、白石氏の学位論文は実地臨床上において重要な研究として評価された。さらに論文審査における、申請者の研究者としての見識および態度は医学博士の値するものと評価した。