

## 2008 年度大阪小児感染症研究会助成による研究成果報告書

### 研究課題

好中球減少時発熱における起炎菌のリアルタイム PCR を用いた同定に関する検討

### 代表研究者(氏名・所属・連絡先電子メール)

近畿大学医学部小児科 坂田 尚己

E-mail; nsakata@med.kindai.ac.jp

### 共同研究者(氏名・所属)

近畿大学医学部小児科 上田 悟史

### 研究目的

化学療法後の好中球減少時に認められる敗血症の原因菌をリアルタイム PCR 法により迅速にかつ正確に同定することが可能かどうかを検討する。

### 研究成果

化学療法後の骨髄抑制時に認められる好中球減少時発熱 (febrile neutropenia、FN) は、造血器腫瘍や悪性固形腫瘍疾患の小児の治療における重要な合併症のひとつである。今回、FN 発症例の血液よりその起炎菌を、菌種で保存された 16S (23S) ribosomal RNA に対する逆転写定量ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法により検出できるかどうか検討した。

**方法：**対象例は 2008 年 2 月～12 月まで当科で治療した 16 例 (急性骨髄性白血病 6 例、急性リンパ性白血病 4 例、悪性リンパ腫 3 例、ランゲルハンス細胞組織球増殖症 2 例、神経芽腫 1 例)。化学療法 (43 回) および造血幹細胞移植 (4 回) 後に認められた 19 回の FN 時に EDTA 血を採取し、起炎菌の検討を施行した。また、同時に血液培養も施行した。本法の感度を検討する目的で、健常人から採取した血液に、あらかじめ菌数のわかった菌体を段階希釈して混入し、検出感度を検討した。PCR 法は、Matsuda らの方法に準じて\*、SYBR Green を用いたインターカレート法により ABI PRISM7900HT により施行した。菌種と primer sequence は次の通りである。

|                                     |                                            |
|-------------------------------------|--------------------------------------------|
| <i>Enterobacteriaceae</i> 23S rRNA: | En-lsu3F TGCCGTAACCTTCGGGAGAAGGCA (428 bp) |
|                                     | En-lsu3'RTCCAGGACCAGTGTTTCAGTGTC           |
| <i>Enterococcus</i> 16S rRNA:       | Ec-ssu1'FCCCATCAGAAGGGGATAACACTT (115 bp)  |
|                                     | Ec-ssu1R ACCGCGGGTCCATCCATC                |
| <i>Staphylococcus</i> 16S rRNA:     | STPYF ACCGTCTTGCTGTCACTTATA (257 bp)       |
|                                     | STPYR2 TACACATATGTTCTTCCCTAATAA            |
| <i>Pseudomonas</i> 16S rRNA:        | PSD7F CAAAACTACTGAGCTAGAGTACG (215 bp)     |
|                                     | PSD7R TAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCT            |

**結果：**19 回の FN 中で血液培養で起炎菌が検出されたのは 1 回のみで、起炎菌は *Enterobacteriaceae* であった。検体量や検出感度を決定する目的で、菌を段階希釈して加えた健常人の血液サンプルを用いて検討を行った。500  $\mu$ l の EDTA 血に、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、

$10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$  個の菌を混入したサンプルより Acid guanidinium-Phenol-Chloroform 法により RNA を抽出した。1  $\mu\text{g}$  の RNA を Dnase 処理を行った後に逆転写を施行した。その反応液の 2  $\mu\text{l}$  (total 20  $\mu\text{l}$  中)を鋳型として PCR を施行したところ、*Enterobacteriaceae* では検出感度は  $10^2$  個であったが、その他の菌種では  $10^0$  個のサンプルまで増幅が認められた。次に、FN サンプルで同様に解析した。*Enterococcus*や*Staphylococcus*は常在菌として治療後も咽頭や便培養等から検出されることが多いが、19 回の FN サンプルからは検出されなかった。*Pseudomonas* は 1 サンプルから検出され、菌量は  $10^0$  個 (数個) レベルと考えられた。*Enterobacteriaceae* は、19 回の FN 中で唯一血液培養から検出された菌であった。従来の定性法による RT-PCR 法では、428bp のバンドが検出された。しかし、リアルタイム PCR 法では 2  $\mu\text{l}$  の鋳型 cDNA では感度が悪く、cDNA の増量により  $C_T$  値の増加が認められたが、融解曲線の解析から、陽性コントロールとの温度に差が認められ、cDNA 量が少ないと非特異的な増幅が起こっている可能性があると考えられた。よって、今回の FN サンプルの解析では、*Enterobacteriaceae* は正確な検討はできなかった。

#### 【結果のサマリー】

- ①, 健康人の血液に細菌を混入することで行った感度実験では、本法では、数個レベルの細菌が検出されると考えられた。*Enterobacteriaceae* では  $10^2$  個レベルであった。
- ②, FN サンプルでは、本法により 2 回起炎菌が検出された。1 回は血液培養でも検出された。FN 例で検出された菌量は数個レベルのものであった。
- ③, *Enterobacteriaceae* ではプライマーの再設定により増幅の特異性を高める必要があると考えられた。

#### 将来の展望と感想

本法により、血液 500  $\mu\text{l}$  中の数個レベルの菌を検出可能であることが明らかになった。しかし、今回の 19 回の FN サンプルからの検討では、代表的な菌種について検討したが、起炎菌と考えられる菌が検出された頻度は、期待していたほど高くなかった。

*Enterobacteriaceae* では、今回のプライマーでは定性法に比較してリアルタイム PCR 法では、特異性や感度に問題があると考えられ、プライマー配列の再設定が必要と考えられた。また、 $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存していた FN サンプルでは、全血 500  $\mu\text{l}$  から 0.5  $\mu\text{g}$  程度の RNA しか回収できないこともあり、微量の菌体の RNA が回収されていない可能性も考えられた。今後、採血量を増やしたり、検体採取後に効率よく RNA を回収できる方法を検討していく必要があると考えられた。また、さらには、今後、真菌も含めて検出可能な菌種を増やしていくことで、本法の臨床的意義をさらに検討していく方針である。

#### \*参考文献

Matsuda K, Tsuji H, Asahara T et al. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**: 32-39.