



A Novel Diagnostic Tool for Detecting Neonatal Infections Using Multiplex Polymerase Chain Reaction

榎本，真宏

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4709

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004709>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	榎本 真宏
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4709 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

A Novel Diagnostic Tool for Detecting Neonatal Infections Using Multiplex Polymerase Chain Reaction （マルチプレックス PCR を用いた新しい新生児感染症診断法）

審 査 委 員

主 査	教 授	西尾 久英
	教 授	堀田 博
	教 授	藤澤 正人

(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

A Novel Diagnostic Tool for Detecting Neonatal Infections Using Multiplex Polymerase Chain Reaction

マルチプレックス PCR を用いた新しい新生児感染症診断法

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
小児科学
(指導教員：松尾雅文教授)

榎本 真宏

【背景】

感染症は、新生児期の主たる死因であり、今日においてもその診断や治療は、依然として重要な課題である。新生児、特に早産児は免疫能が低いため、感染症の進展が非常に速く、重症化しやすい傾向にあり、しばしば致命的となる。また、新生児感染症はその症状が非特異的であるため、その早期診断は新生児科医であっても難渋する症例が経験される。さらに成人の感染症とは異なる多様な細菌、ウイルス、真菌が原因となることが知られており、確定診断をさらに困難にしている。したがって、感染症に罹患した新生児患者においては、その原因となる病原体を迅速かつ正確に検出、同定することが求められているが、現在のところ新生児感染症の原因となる病原体を迅速に検出する技術は確立されていない。

【目的】

本研究の目的は、新生児感染症の原因となることがよく知られており、同定、治療が臨床的に非常に重要である8病原体 [B群溶血性連鎖球菌 (GBS)、大腸菌、緑膿菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、ウレアプラズマ、単純ヘルペスウイルス (HSV)、サイトメガロウイルス (CMV)、カンジダ] に対して、マルチプレックス PCR 法を用いた迅速診断法を確立することである。また、新生児集中治療室 (NICU) に入院中の新生児患者から得た臨床検体を用いて、この新しい迅速診断法の臨床的な実用性について検討を加えた。

【方法】

臨床検体

2005 年 6 月から 2006 年 9 月に神戸大学医学部附属病院周産母子センターに入院した新生児患者のうち、感染兆候をもつ症例、または感染症を疑う病歴 (母体の妊娠経過を含む) を持つ症例 62 名 (在胎週数 23-41 週、出生体重 546-4,065g) から、130 の臨床検体を得た。臨床検体の種類は血液、髄液、尿、気管洗浄液、咽頭ぬぐい液、胃液、皮膚擦過物、腹水、開放膿であった。また、コントロールとして、正常新生児の臍帯血 50 検体を用いた。

マルチプレックス PCR 法

まず、これらの検体から DNA を抽出した。この DNA を鋳型とし、研究対象とした 8 種類の病原体を認識する 8 種類のプライマーペアの混合液を用いて、1 度のマルチプレックス PCR を施行した。各プライマーペアは、PCR によって得られる増幅産

物の大きさがそれぞれ異なるように設計した。結果の判定には、陽性コントロールラダー（各病原体の DNA をそれぞれのプライマーペアを用いて PCR を行い、その産物を混和したもの。アガロース電気泳動を行うと一つの列に各病原体に相当する 8 本のバンドが出現する。）とともに、マルチプレックス PCR の増幅産物をアガロースゲル電気泳動し、陽性コントロールと同じ高さのバンドがある場合は、もとの臨床検体にはバンドの高さの示す病原体の DNA を含むと考えた。この方法によって、臨床検体から病原体の DNA を検出できた場合に、マルチプレックス PCR 陽性と判定した。

マルチプレックス PCR 法と細菌培養検査の比較

マルチプレックス PCR 法の正確性を評価するため、細菌による感染症を疑った症例から得た 77 検体について、マルチプレックス PCR 法とともに細菌培養検査を行った。

【結果と考察】

対象とした 130 検体（62 症例）のうち、17 検体（11 症例）において、マルチプレックス PCR 陽性であった。その内訳は、GBS 6 検体、緑膿菌 3 検体、MRSA 2 検体、CMV 3 検体、HSV 2 検体、カンジダ 1 検体であった。一方、正常新生児から得た臍帯血 50 検体は、すべてマルチプレックス PCR 陰性であった。臨床検体を得てから結果の判定までに要した時間は、3.5 から 4.5 時間であり、一般的な病原体の同定法である細菌培養検査や特異抗体価測定と比して、非常に迅速であった。

マルチプレックス PCR 陽性であった検体について、その方法の臨床的有用性を後方視的に検討した。感染症の疑いのある患者において診断が確定された場合、感染症の起因菌が同定された場合、診断名が変化した場合に臨床的有用性が認められると判断した。陽性であった 17 検体（11 症例）のうちの 14 検体（9 症例）において臨床的有用性が認められたことから、マルチプレックス PCR 法は NICU において実用的であることが示された。

さらに、細菌感染症に対するマルチプレックス PCR 法の正確性を検討するために、細菌培養検査との比較検討を行った。その結果、マルチプレックス PCR 法は細菌培養検査に比べて、特異度 93%、陰性的中率 96%、一致率 90%であり、本検査が診断の確定に適していることを示唆された。その一方で、感度は 50%と低いため、マルチプレックス PCR 法を新生児感染症のスクリーニングや除外診断に用いるには、技術の改善が必要であり、今後の課題と考えられた。

【結論】

我々は、マルチプレックス PCR 法を用いた迅速な病原体検出法を確立した。この方法によって NICU における新生児感染症の診断はより確かなものとなり、有用な方法であることが示された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2033号	氏 名	榎本 真宏
論文題目 Title of Dissertation	A Novel Diagnostic Tool for Detecting Neonatal Infections Using Multiplex Polymerase Chain Reaction マルチプレックス PCR を用いた新しい新生児感染症診断法		
審査委員 Examiner	主 査 西尾 久英 Chief Examiner 副 査 堀田 博 () Vice-examiner 副 査 阿部 正人 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【背景】
感染症は、新生児期の主たる死因であり、今日においてもその診断や治療は、依然として重要な課題である。新生児、特に早産児は免疫能が低いため、感染症の進展が非常に速く、重症化しやすい傾向にあり、しばしば致命的となる。また、新生児感染症はその症状が非特異的であるため、その早期診断は新生児科医であっても難渋する症例が経験される。さらに成人の感染症とは異なる多様な細菌、ウイルス、真菌が原因となることが知られており、確定診断をさらに困難にしている。したがって、感染症に罹患した新生児患者においては、その原因となる病原体を迅速かつ正確に検出、同定することが求められているが、現在のところ新生児感染症の原因となる病原体を迅速に検出する技術は確立されていない。
【目的】
本研究の目的は、新生児感染症の原因となることがよく知られており、同定、治療が臨床的に非常に重要である8病原体〔B群溶血性連鎖球菌（GBS）、大腸菌、緑膿菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、ウレアプラズマ、単純ヘルペスウイルス（HSV）、サイトメガロウイルス（CMV）、カンジダ〕に対して、マルチプレックス PCR 法を用いた迅速診断法を確立することである。また、新生児集中治療室（NICU）に入院中の新生児患者から得た臨床検体を用いて、この新しい迅速診断法の臨床的な実用性について検討を加えた。
【方法】
臨床検体
2005年6月から2006年9月に神戸大学医学部附属病院周産母子センターに入院した新生児患者のうち、感染兆候をもつ症例、または感染症を疑う病歴（母体の妊娠経過を含む）を持つ症例62名（在胎週数23-41週、出生体重546-4,065g）から、130の臨床検体を得た。臨床検体の種類は血液、髄液、尿、気管洗浄液、咽頭ぬぐい液、胃液、皮膚

擦過物、腹水、開放膿であった。また、コントロールとして、正常新生児の臍帯血 50
検体を用いた。
<u>マルチプレックス PCR 法</u>
まず、これらの検体から DNA を抽出した。この DNA を鋳型とし、研究対象とした 8
種類の病原体を認識する 8 種類のプライマーペアの混合液を用いて、1 度のマルチプレッ
クス PCR を施行した。各プライマーペアは、PCR によって得られる増幅産物の大きさが
それぞれ異なるように設計した。結果の判定には、陽性コントロールラダー（各病原体
の DNA をそれぞれのプライマーペアを用いて PCR を行い、その産物を混和したもの。ア
ガロース電気泳動を行うと一つの列に各病原体に相当する 8 本のバンドが出現する。）と
ともに、マルチプレックス PCR の増幅産物をアガロースゲル電気泳動し、陽性コント
ロールと同じ高さのバンドがある場合は、もとの臨床検体にはバンドの高さの示す病原
体の DNA を含むと考えた。この方法によって、臨床検体から病原体の DNA を検出でき
た場合に、マルチプレックス PCR 陽性と判定した。
<u>マルチプレックス PCR 法と細菌培養検査の比較</u>
マルチプレックス PCR 法の正確性を評価するため、細菌による感染症を疑った症例か
ら得た 77 検体について、マルチプレックス PCR 法とともに細菌培養検査を行った。
<u>【結果と考察】</u>
対象とした 130 検体(62 症例)のうち、17 検体（11 症例）において、マルチプレック
ス PCR 陽性であった。その内訳は、GBS 6 検体、緑膿菌 3 検体、MRSA 2 検体、CMV
3 検体、HSV 2 検体、カンジダ 1 検体であった。一方、正常新生児から得た臍帯血 50 検
体は、すべてマルチプレックス PCR 陰性であった。臨床検体を得てから結果の判定まで
に要した時間は、3.5 から 4.5 時間であり、一般的な病原体の同定法である細菌培養検
査や特異抗体価測定と比して、非常に迅速であった。
マルチプレックス PCR 陽性であった検体について、その方法の臨床的有用性を後方視

的に検討した。感染症の疑いのある患者において診断が確定された場合、感染症の起因菌が同定された場合、診断名が変化した場合に臨床的有用性が認められると判断した。陽性であった17検体(11症例)のうちの14検体(9症例)において臨床的有用性が認められたことから、マルチプレックスPCR法はNICUにおいて実用的であることが示された。

さらに、細菌感染症に対するマルチプレックスPCR法の正確性を検討するために、細菌培養検査との比較検討を行った。その結果、マルチプレックスPCR法は細菌培養検査に比べて、特異度93%、陰性的中率96%、一致率90%であり、本検査が診断の確定に適していることを示唆された。その一方で、感度は50%と低いため、マルチプレックスPCR法を新生児感染症のスクリーニングや除外診断に用いるには、技術の改善が必要であり、今後の課題と考えられた。

【結論】

本研究者は、マルチプレックスPCR法を用いた迅速な病原体検出法を確立した。

本研究者は、新生児感染症について、その迅速病原体検出法を研究したものであるが、従来ほとんど行なわれなかったマルチプレックスPCR法による感染症スクリーニングについて重要な知見を得たものであると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。