



# Utility of Multiplex PCR in Detecting the Causative Pathogens for Pediatric Febrile Neutropenia

Mitsuda, Yoshihiro

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-09-25

(Date of Publication)

2011-10-17

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5324

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005324>

※ 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。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Utility of Multiplex PCR in Detecting the Causative Pathogens for Pediatric Febrile Neutropenia

小児の発熱性好中球減少症の原因病原体同定におけるマルチプレックス PCR の有用性

神戸大学大学院医学系研究科医学科専攻

小児科学

(指導教員：松尾雅文教授)

光田 好寛

発熱性好中球減少症 (以下、FN とする) は悪性疾患の化学療法中における致命的な合併症である。その原因は約半数において、発熱や炎症反応の存在にもかかわらず不明である。臨床的には、FN の症状のほとんどが抗生物質治療で改善されるため、原因は細菌感染症と考えられている。よって、原因となる細菌を標的とする適切な抗生物質の投与が重要である。血液培養 (以下、血培とする) が細菌感染症の診断の現在の標準である。しかし、その結果が判明するには数日を要する。従って、原因を推測し経験的に薬物投与を行っているのが実情である。近年、細菌感染症の原因検索における PCR の有用性についての報告が散見される。PCR は迅速に原因物質が検出でき、適正な抗菌療法を行うことができる。FN の原因が細菌感染症であるならば、PCR は血培よりもその迅速性において有用であると考えられる。さらに、マルチプレックス PCR を用いることで複数の病原体を同時に増幅することが可能である。この研究の目的は、FN の治療におけるマルチプレックス PCR の有用性を調べることである。

2005 年 7 月から 2009 年 8 月、神戸大学病院の小児科病棟において FN と入院中に診断された悪性腫瘍の患者 40 名より、静脈血を計 128 サンプル採取した。サンプルは 2 分し、マルチプレックス PCR および血培を行った。マルチプレックス PCR は、静脈血全血よりゲノム DNA を抽出し行った。2005 年 7 月 2007 年 6 月 (以下前半とする)、2007 年 8 月 2009 年 8 月 (以下、後半とする) の 2 つの期間において異なるプライマーを使用し PCR を行った。マルチプレックス PCR の結果の精度を評価するために、マルチプレックス PCR の結果と血培の結果を比較した。

128 サンプル (前半 74、後半 54) 中、3 例 (前半 1 例、後半 2 例) においてマルチプレックス PCR により原因病原体検索が可能であった。症例 1 は横紋筋肉腫の治療のため入院の 16 歳男児。化学療法と病巣 (右肘) 摘出術を施行。末梢血幹細胞移植前の大量化学療法中に発熱を認めた。当日にサンプルを採取し血培および PCR を施行。マルチプレックス PCR の分析では、緑膿菌に対応する DNA 断片が増幅された。血培の結果は 2 日後に判明した。PCR の結果をもとに抗生物質による治療を開始し、2 日後に解熱した。症例 2 は急性リンパ性白血病 (ALL) の治療のため入院の 3 歳男児。化学療法中に発熱を認めた。マルチプレックス PCR の結果、当日より適切な抗生物質治療を開始できた。血培の結果は翌日に判明した (緑膿菌)。症例 3 も ALL の治療のため入院の 2 歳女児。化学療法中に発熱。マルチプレックス PCR の結果は血培の前に得られた。マルチプレックス PCR により原因病原体が迅速に判明し、FN の発症後数時間以内に適切な抗生物質治療を開始できた。

128 サンプル中 20 例 (前半 17 例、後半 3 例) では、血培により原因検索が可能であったが、PCR では増幅されなかった。これらのうち、18 例は本研究にお

いて使用した PCR プライマーのリストに含まれていなかった。残りの 2 例は適切なプライマーが含まれているにもかかわらず PCR で検出されなかった（大腸菌、表皮ブドウ球菌）。

本研究の目的は、FN において、原因病原体同定におけるマルチプレックス PCR の有用性を調べ、血培の結果と比較することであるが、前述の 3 例においては、マルチプレックス PCR により原因病原体同定に成功した。これらの症例では、血培の結果よりも早期に結果が得られ、迅速かつ適正な抗菌療法を施行できた。したがって、マルチプレックス PCR は臨床的に有用であった。しかし、2 例においては、血培により原因が同定されながらマルチプレックス PCR にて検出できなかった。以前の研究においても血培で陽性であっても、PCR にて原因病原体を検出できなかった例を報告している。これらより PCR は血培より高感度とは言えず、未だ血培が不可欠であることを示している。血培で陽性でありながら、PCR にて陰性となる理由について、Louie らは DNA の target site がプライマーとプローブの結合に影響すると考察している。彼らの研究では、血培により腸球菌が同定された例では PCR の結果が陰性であった。彼らは、地域特有の菌株が存在し、プローブの塩基配列が、設定したプライマーでは結合、増幅しなかった可能性を示唆した。Westh らと Burkardt は PCR 陰性、血培陽性の例について、PCR の反応の阻害または不適切なサンプル採取の可能性について言及している。Lamoth らは血培に必要な血液量に対して、PCR に要する血液がより少ないことが PCR による原因検索に至らない原因である可能性があるとしている。その他の原因として、サンプル中の細菌量の問題が考えられる。マルチプレックス PCR にて原因を特定できた前述の 3 例のうち 2 例（症例 1 および 2）においては、細菌量が多かったと推測された。症例 1 では、PCR を実施した当日の血中エンドトキシン濃度が 51,320 pg/mL と異常高値を示していた。この結果より、症例 1 のサンプル中には、採取時にすでに多くの細菌が存在していたと考えられる。症例 2 においては、通常数日後に結果が判明する血培の結果が、サンプル採取翌日に確認された。これもサンプル中の多くの細菌の存在を示している。前半に使用したプライマーセットは、後半に使用したものと異なっている。前半に使用したプライマーセットでは、FN の原因となる病原体の一部だけを対象としており、原因病原体が判明したのは 74 サンプル中で 1 例のみであったため、感度の向上を目的にプライマーセットを変更した。しかし、マルチプレックス PCR の感度は、後半にも改善されなかった。本研究では、前後半を通じて、*Pseudomonas* 属しか検出されなかった。したがって、いずれのプライマーセットが有用であるかの判断は困難であった。FN の原因は細菌感染症と考えられているが、血培陽性例は 23/128 (18.0%) であった。以前の研究においても血培陽性例は 43/200 (21.5%)、46/119 (38.7%)、74/613

(12.1%) と低値であった。FN 患者において血培にて病原体が検出されない例が存在する原因も、細菌量の問題で説明が可能である。すなわち、FN の症状は少量の細菌引き起こされるため、血培による同定が困難である可能性があると考えられる。

結論として、我々の研究においてマルチプレックス PCR は血培よりも迅速に FN の原因病原体を同定できたが、感度の面では血培の方が優れていた。血培は依然として FN の原因診断、治療には欠かせないと考えられる。血培とマルチプレックス PCR を組み合わせた解析により、FN 患者に対する抗生物質治療におけるより適切な情報が得られるものとする。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2190号	氏名	光田 好寛
論文題目 Title of Dissertation	小児の発熱性好中球減少症の原因病原体同定におけるマルチプレックス PCR の有用性 Utility of Multiplex PCR in Detecting the Causative Pathogens for Pediatric Febrile Neutropenia		
審査委員 Examiner	主査 錦織 千佳子 Chief Examiner 副査 堀田 博 Vice-examiner 副査 高 博信 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

発熱性好中球減少症（以下、FN とする）は悪性疾患の化学療法中における致命的な合併症である。その原因は約半数において、発熱や炎症反応の存在にもかかわらず不明である。臨床的には、FN の症状のほとんどが抗生物質治療で改善されるため、原因は細菌感染症と考えられている。血液培養（以下、血培とする）が細菌感染症の診断の現在の標準であるが、その結果が判明するには数日を要するため、原因を推測し経験的に薬物投与を行っているのが実情である。近年、細菌感染症の原因検索における PCR の有用性についての報告が散見される。PCR は迅速に原因物質が検出でき、適正な抗菌療法を行うことができる。FN の原因が細菌感染症であるならば、PCR は血培よりもその迅速性において有用であると考えられる。さらに、マルチプレックス PCR を用いることで複数の病原体を同時に増幅することが可能である。この研究は、FN の治療におけるマルチプレックス PCR の有用性を調べることを目的として実施された。

2005年7月から2009年8月、神戸大学病院の小児科病棟においてFNと入院中に診断された悪性腫瘍の患者40名より、静脈血を計128サンプル採取した。サンプルを2分し、マルチプレックスPCRおよび血培を行った。マルチプレックスPCRは、静脈血全血よりゲノムDNAを抽出し行った。2005年7月から2007年6月（以下前半とする）、2007年8月から2009年8月（以下、後半とする）の2つの期間において異なるプライマーを使用しPCRを行った。マルチプレックスPCRの結果の精度を評価するために、マルチプレックスPCRの結果と血培の結果を比較した。

128サンプル（前半74、後半54）中、3例（前半1例、後半2例）においてマルチプレックスPCRにより原因病原体検索が可能であった。症例1は横紋筋肉腫の治療のため入院した16歳男児で、化学療法と病巣（右肘）摘出術を受けたが、末梢血幹細胞移植前の大量化学療法中に発熱を認めた。当日にサンプルを採取し血培およびPCRを実施した。マルチプレックスPCRの分析では、緑膿菌に対応するDNA断片が増幅された。血培の結果は2日後に判明した。PCRの結果をもとに抗生物質による治療を開始し、2日後に解熱した。症例2は急性リンパ性白血病（ALL）の治療のため入院の3歳男児で、化学療法中に発熱を認めた。マルチプレックスPCRの結果、当日より適切な抗生物質治療を開始できた。血培の結果は翌日に判明した（緑膿菌）。症例3もALLの治療のため入院の2歳女児。化学療法中に発熱。マルチプレックスPCRの結果は血培の前に得られた。マルチプレックスPCRにより原因病原体が迅速に判明し、FNの発症後数時間以内に適切な抗生物質治療を開始できた。

128サンプル中20例（前半17例、後半3例）において、血培により原因検索が可能であったが、PCRでは増幅されなかった。これらのうち、18例は本研究において使用したPCRプライマーのリストに含まれていなかった。残りの2例は適切なプライマーが含まれているにもかかわらずPCRで検出されなかった（大腸菌、表皮ブドウ球菌）。

3例においては、マルチプレックス PCR により原因病原体同定に成功し、これらの症例では、血培の結果よりも早期に結果が得られ、迅速かつ適正な抗菌療法を施行できた。しかし、2例においては、血培により原因が同定されながらマルチプレックス PCR にて検出できなかった。以前の研究においても血培で陽性であっても、PCR にて原因病原体を検出できなかった例を報告しており、PCR は血培より高感度とは言えず、未だ血培が不可欠であることを示している。血培で陽性でありながら、PCR にて陰性となる理由として、① DNA の target site がプライマーとプローブ の結合に影響する可能性、②PCR の反応の阻害、③PCR における不適切なサンプル採取の可能性、④血培に必要な血液量に対して、PCR に要する血液がより少ないこと、⑤サンプル中の細菌量の問題などを挙げている。

本研究では、前後半を通じて、Pseudomonas 属しか検出されなかった。したがって、いずれのプライマーセットが有用であるかの判断は困難であった。FN の原因は細菌感染症と考えられているが、血培陽性例 は 23/128 (18.0%) であった。以前の研究においても血培陽性例は 43/200 (21.5%)、46/119 (38.7%)、74/613 (12.1%) と低値であった。FN 患者において血培にて病原体が検出されない例が存在する原因も、細菌量の問題で説明が可能である。すなわち、FN の症状は少量の細菌引き起こされるため、血培による同定が困難である可能性があると考えられる。

結論として、申請者たちの研究においてマルチプレックス PCR は血培よりも迅速に FN の原因病原体を同定できたが、感度の面では血培の方が優れており、血培は依然として FN の原因診断、治療には欠かせないことを示した。

以上のことより、本研究は、血培とマルチプレックス PCR を組み合わせた解析により、FN 患者に対する抗生物質治療における重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。