

主論文の要旨

**Comprehensive detection of pathogens in  
immunocompromised children with bloodstream  
infections by next-generation sequencing**

〔 小児血流感染症における病原微生物診断への  
次世代シーケンスの応用 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

堀場 千尋

## 【緒言】

血流感染症（blood stream infection, BSI）は免疫不全状態の患者にとって重要な合併症であり、敗血症へとつながる病態であるため、迅速な病原体診断と経験的抗菌薬治療の開始が必要とされる。BSI における病原微生物診断のゴールドスタンダードは血液培養検査であるが、通常の血液培養検査では検出できない難培養微生物やウイルスも BSI の原因となり得るため十分な検査ではない。実際、30%未満の発熱性好中球減少症、50%の敗血症性ショックでしか血液培養が陽性とならない。このため、培養を必要としない迅速で網羅的な病原微生物診断法の開発が求められている。

次世代シーケンス（next-generation sequencing, NGS）は大量の DNA 断片を並列に塩基配列解析することができる技術であり、特にショットガンシーケンス法を用いることで検体中に含まれるすべての生物種由来の塩基配列を網羅的に解析することが可能である。このため、感染症患者の臨床検体に対する病原微生物診断への応用が期待されている。本研究は小児の BSI の病原微生物診断への NGS の応用について検討することを目的とした。

## 【対象及び方法】

2010 年 10 月から 2016 年 8 月までの期間に BSI が疑われ血液培養陽性であった小児患者 12 例（BSI 群）の発症前、発症時（血液培養採取時）、抗菌薬治療後の血液検体 37 検体と、BSI が疑われたが血液培養陰性であった小児患者 23 例（BSI 疑い群）の発症時の血液検体 23 検体の NGS 解析を行った。BSI は血液培養からの病原微生物の検出かつ、38.0 度以上の発熱または C 反応性蛋白の上昇（> 1.0mg/dl）を認めるものと定義した。血漿または血清 140 $\mu$ L から核酸抽出した後、ライブラリー調製し、HiSeq2500（illumina）を用いてシーケンスを行い、病原微生物を検索した。病原微生物検索には国立感染症研究所より公開されているパイプライン MePIC を用いた。また、解析結果より 100 万リードあたりの細菌由来リード数（BR）、最も検出された微生物の相対優占度（P1）、検体中の生物多様性を評価する Shannon Index（H'）を算出し、NGS 解析による病原微生物の検出基準を設定した。その後、設定した基準値を用いて BSI 疑い群の NGS 解析による病原微生物診断を行った。さらに病原微生物を診断できた症例については、抗菌薬耐性遺伝子を検索した。

## 【結果】

BSI 群の発症時の検体について、12 例中 8 例が血液培養で検出された細菌と NGS で優勢であった細菌のいずれかの生物分類（科、属、種）で一致し、すべての症例で培養された細菌由来の塩基配列が検出できた（図 1）。NGS で優占度の高い細菌と血液培養で検出された細菌が一致した 8 例については、発症前、発症時、抗菌薬治療後の BR、P1、H'を比較すると発症時と治療後に有意な差を認めた（図 2）。この結果より NGS 解析による病原微生物の検出基準を BR > 200 かつ P1 > 0.5 と設定し、BSI 群の NGS 解析結果を再検討すると 8 症例が NGS 検出基準陽性と判定され、細菌種も決定できた

(表 1)。そして、NGS で病原微生物を特定した 8 症例のうち 7 症例は血液培養の結果と一致した。さらに、カテーテル関連 BSI であった患者 2 例では、発症 7 日前の血液検体中から起因菌を検出した。症例 B10 はさらに発症 14 日前の血液検体からも起因菌が検出された (図 3)。

次に前述の NGS 解析による病原微生物の検出基準を用いて BSI 疑い群を検討した。23 例中 3 例が NGS 検出基準陽性と判定され、*Tatlockia micdadei*、*Escherichia coli*、アデノウイルスを有意な病原微生物として特定した。代表株ゲノムに対するカバー率はそれぞれ 31%、1%未満、100%であった。最後に、NGS 検出基準陽性であった 9 例 (BSI 群：血液培養の結果と一致した 7 例、BSI 疑い群：2 例) に対して抗菌薬耐性遺伝子を検索し、62 遺伝子を検出した。

### 【考察】

NGS を用いると血清・血漿中の微生物ゲノムが網羅的に検出されるため、その中から原因微生物を特定するために、血液培養陽性患者の解析結果から、BR > 200 かつ P1 > 0.5 といった検出基準を提案した。この検出基準によって、BSI 群の 8 例、BSI 疑い群の 3 例より病原微生物を決定した (表 1)。BSI 疑い群より NGS 検出基準陽性となった 3 例では、(1) *T. micdadei* が検出された症例はフルオロキノロン系抗生物質で治療効果があったこと、(2) *E. coli* が検出された症例は抗菌薬治療開始後の血液培養検査であったこと、(3) アデノウイルスが検出された症例は臨床経過で血尿と肝障害を呈したことから、NGS による診断と臨床経過には矛盾がなかった。

カテーテル関連 BSI の 2 例で BSI 発症前より NGS によって起因細菌を検出することができた。解析された血液検体はカテーテルから採取されたものであったことから、BSI の原因となり得るカテーテル内腔に定着していた細菌を NGS で検出できる可能性が示唆された。

### 【結語】

本研究で NGS により血液培養で分離できなかった細菌、ウイルスによる血流感染症を診断することができた。NGS は BSI の病原微生物を検出する新しい方法として臨床応用可能であり、BSI 発症の予測や病原菌の耐性遺伝子検出ができることが示唆された。