



2014年7月23日放送

「感染症の新たな検査法の進歩」

東京医科大学 微生物学教授
大楠 清文

はじめに

今日は感染症の新たな検査法として注目されている、マルチプレックスPCR、次世代型遺伝子検査、そして質量分析法といった3つのキーワードを概説しながら、感染症の検査領域で実用化が進んでいる解析技術の現状と今後の展望についてお話しします。

感染症検査の「三大技術革新」

感染症の新たな検査法として近年開発・導入された①自動同定感受性や血液培養システム②遺伝子検査③質量分析法の3つを私は感染症検査の「三大技術革新」として位置づけております。

以前は患者検体から分離・培養された菌株の同定や薬剤感受性試験をすべて手作業で行って

いましたが、現在では自動機器を利用して簡便に実施できるようになりました。また、敗血症の診断に重要な血液培養検査でも、リアルタイムに菌の発育を検知できるようになったので、起炎菌を早く検出して同定することが可能となりました。

遺伝子検査は、検体から直接、微量な病原体の遺伝子を増幅・検出して、感染症の迅速診断と治療に役立っているだけでなく、分離菌株の迅速な菌種の同定、病原因子や薬剤耐性遺伝子の検出にも利用されています。

臨床検体に含まれる微量なDNAやRNAを探し当て、検出できるレベルまでに増幅する



技術として、PCR 法が利用されています。しかし、PCR が結核菌や淋菌、クラミジアの検査を除き、実際には病院の臨床検査室の現場でこれまで普及しなかった理由として①操作が煩雑で定量解析ができないこと②1つの反応で1つの病原体しか検出できないこと一などの問題点があったからだと思います。近年、これらの問題点を克服するべく、技術革新の恩恵を受けながら、PCR に様々な改良が加えられ、遺伝子検査の実用化がみえてきました。すなわち、PCR の増幅産物をリアルタイムに検出して、簡便で迅速な遺伝子の定量ができるリアルタイム PCR 法やデジタル PCR 法、そして1回の反応で複数の病原体検出を同時に行うマルチプレックス PCR 法です。

マルチプレックス PCR 法

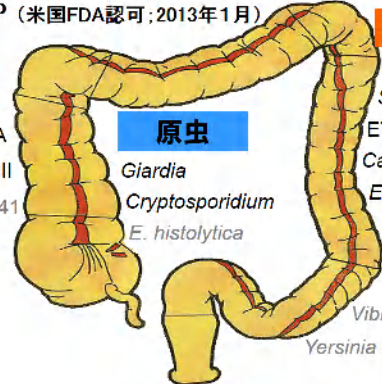
ここ数年で、マルチプレックス PCR 法を利用して病原体を網羅的に検査できる試薬キットの開発が進んでいます。例えば、呼吸器感染症を引き起こす可能性が高い約 20 種類のウイルスや細菌を一度に検索できるキットが既に販売されています。さらには、後ほどご紹介する核酸の抽出から増幅および検出をすべて全自動で行う、次世代型の遺伝子検査の機器と試薬も開発されています。これらを利用すれば、検体を採取して1時間ほどで呼吸器感染症の診断を実施できますので、外来診療やベットサイドでの導入がおおいに期待されます。

マルチプレックスPCRによる呼吸器病原体の検出システム				
商品名	xTAG™ respiratory Viral panel		FilmArray® Respiratory Panel (RP)	
販売元	Luminex社		BioFire社(バイオメリュース社)	
検出原理	蛍光マイクロビーズアレイ法		フィルムアレイ法	
検出数	20		21	
病原体名	RSV Type A	Metapneumovirus	RSV	Metapneumovirus
	RSV Type B	Rhinovirus	Influenza A	Rhinovirus/Enterovirus
	Influenza A	Enterovirus	Influenza A(H1)	Adenovirus
	Influenza A(H1)	Adenovirus	Influenza A(H3)	CoV NL63
	Influenza A(H3)	Influenza A(H5)	Influenza A(H1N1)	CoV 229E
	Influenza B	SARS CoV	Influenza B	CoV OC43
	Parainfluenza 1	CoV NL63	Parainfluenza 1	CoV HKU1
	Parainfluenza 2	CoV 229E	Parainfluenza 2	Bocavirus
	Parainfluenza 3	CoV OC43	Parainfluenza 3	Bordetella pertussis
	Parainfluenza 4	CoV HKU1	Parainfluenza 4	Mycoplasma pneumoniae
			Chlamydia pneumoniae	

その他、多項目の病原体同時に検査する試薬キットとして、下痢症の原因となる細菌やその毒素、原虫、ウイルスなどの約 15 種類を検出できる試薬が昨年の 1 月に認可されました。下痢症の原因となる腸管出血性大腸菌のベロ毒素や赤痢菌、キャンピロバクター、そして医療関連感染症として問題となる *Clostridium difficile*、ノロウイルスやロタウイルスも一度にチェックできるのが特徴です。

マルチプレックスPCRによる腸管病原体の検出キット

xTAG GPP (米国FDA認可; 2013年1月)

	原虫	細菌 & 毒素
ウイルス	<i>Giardia</i> <i>Cryptosporidium</i> <i>E. histolytica</i>	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> ETEC ST/LT <i>Campylobacter</i> <i>E. coli</i> O157 stx1/stx2 <i>C. difficile</i> Toxin A/B <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>
Rotavirus A Norovirus GI/GII Adenovirus 40/41		

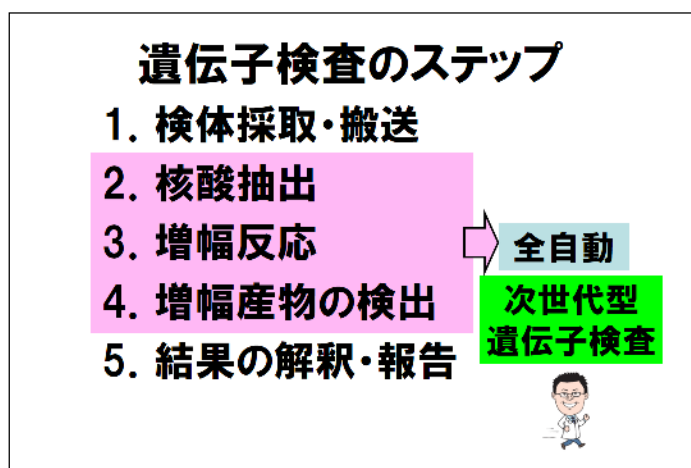
以上のように、感染症の病態別に想定される多項目の病原体を同時に検索する診断キットの開発は今後も続くと思っています。すでにご紹介した呼吸器感染症の診断キットは今後、市中肺炎、院内肺炎、医療・介護関連肺炎と細分化され、これらの肺炎を引き起こしやすい病原体を網羅的に検索して、同時にその病原体がどのような薬剤に耐性であるかも検査できるようになれば、適切な抗菌薬を早く決定することができます。

また、一刻を争うような髄膜炎や脳炎などの中枢神経系感染症、複数の病原体が関与する性感染症などの網羅的な診断キットの開発も進むと予想しています。

これら病態別の網羅的な検査が導入されれば、抗菌薬や抗ウイルス薬の不必要な投与がなくなり、入院期間の短縮、医療関連感染の防止など、感染症診療における費用対効果の向上にも繋がると考えています。



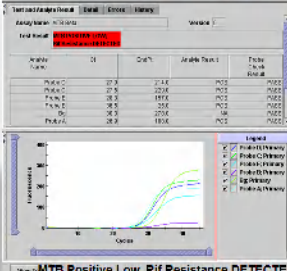
次世代型遺伝子検査

遺伝子検査はこれまでは、核酸の抽出と増幅・検出を別々に行わなければいけなかったため、特に最初のステップである核酸抽出が作業量や労力の面から病院検査室での遺伝子検査の導入のネックになっていました。最近、核酸抽出から増幅反応、検出までをすべて自動で行うことができるシステムが開発され、臨床検査の現場で実際に利用が開始されました。核酸の抽出から検出までを全自動で1～3時間以内に完了するので、次世代型の遺伝子検査システムと呼ばれています。



その一つとして、米国の Cepheid 社から販売されている GenXpert™ システムをご紹介します。本システムは1つのカートリッジで結核菌の検出とリファンピシン耐性か否かを同時に約2時間で判定できます。その他、院内感染対策上も重要な MRSA、ESBL などの薬剤耐性菌の同定と耐性遺伝子の検出や *Clostridium difficile* 毒素の検出も実施できます。国内でも現在、結核菌や MRSA 検出システムの評価・検討が進んでいます。

GenXpert™ (Cepheid社)のカートリッジと測定装置

The GenXpert™ Cartridge – an 11 room stand-alone molecular laboratory

Cepheid社の許可を得て転載

Analysis	SI	SI%	SI/SA Ratio	Result	Time (min)
MRSA C	27.9	27.4%	100%	POS	10:02
MRSA S	27.9	27.4%	100%	POS	10:02
MRSA BC	28.5	147%	100%	POS	10:02
MRSA SSTI	28.5	25%	100%	POS	10:02
CD	28.5	25%	10%	NEG	10:02
MRSA V	28.5	18%	100%	POS	10:02

MTB Positive Low, Rif Resistance DETECTED

MRSA

MRSA/SA Nasal

MRSA/SA BC

MRSA/SA SSTI

C. difficile

vanA/vanB

MTB/RIF

Flu

EV

GBS

BCR-ABL Monitor

HemosIL® FII & FV

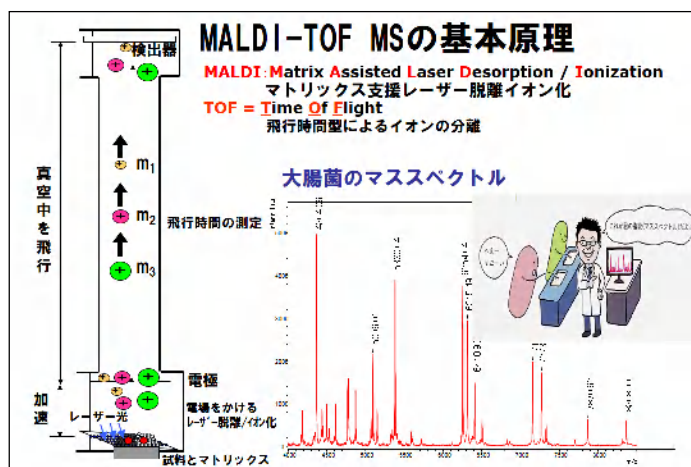
質量分析法

これまでは病原体の遺伝子を扱う技術に関する新たな動向でしたが、ポストゲノムの時代を迎えた今日、基礎的研究が新しい理論や技術を生み出し、社会や産業を一変させる成果へと進展した姿を見ることができます。その1つが2002年にノーベル化学賞を受賞した田中耕一博士が開発したタンパク質の質量分析技術です。この質量分析による微生物の新しい同定法が注目を集めており、そのシステムとして2種類が販売されています。

1つはドイツのブルカー・ダルトニクス社が開発・販売している「MALDI Biotyper」です。国内ではブルカー・ダルトニクスの日本法人と日本 BD そしてシーメンス、栄研化学などが取り扱っています。もう1つはシスメックス・バイオメリュウ社から販売されている「VITEK MS」です。

質量分析法は①サンプルにレーザーを照射してイオン化する②そのイオンを真空中で飛行させて、重さで分ける③そのイオンを検出する—の3つのステップからなります。それでは、この質量分析装置を用いて実際に細菌を同定してみます。例えば、大腸菌をまるごと測定してみましょ！待つこと数分でこのようなマススペクトルの波形が得られます。いわば、この波形が大腸菌の「指紋」のようなものです。病原体に含まれているタンパク質成分の分子量情報、これをマススペクトルといいます。さまざまな菌種のさまざまな菌株のマススペクトルをデータベースに登録しておき、コンピューターの力を借りて、その菌株のマススペクトルがどの菌種のパターンと一致しているかをデータベースの中から瞬時に探し

ます。これまで数時間から数日かかっていた菌株の同定がわずか10分足らずでできるようになったのです。まさしく、感染症検査のワークフローを一変させる技術革新そのものと言えます。わが国でも既に医療機器として認可され、一昨年から検査室現場での使用が開始されており、今後急速に普及していくこ



とが予想されます。

質量分析法は一般的な細菌だけでなく、嫌気性菌、抗酸菌、酵母様真菌、糸状菌の同定も可能です。さらに、培養された集落の同定だけでなく、血液培養で陽性になった菌液にも活用することができます。血液培養が陽性になった当日に菌種が判明するので、最適治療までの時間が短くなり、入院期間も短縮されて、患者予後が改善したとするデータも海外から報告され始めました。

おわりに

以上、感染症検査における「三大技術革新」ともいえる、自動同定・感受性機器、遺伝子検査、質量分析法の現状と今後の展望についてご紹介しました。感染症の診断と治療は、臨床情報を活用したうえで、塗抹鏡検、抗原検出法、培養法、そして薬剤感受性試験の4本柱が「主役」であることは、今後も変わりません。これら「主役」を引き立てる「名脇役」へと遺伝子検査が進化しつつありますが、されどこれらの技術はあくまでも感染症診断のツールに過ぎません。「感染症の診断と治療は、医師と臨床検査技師との緊密な情報交換によるコラボレーション」が何より大切であることを強調して今日のお話を終わりにします。

