



2018年5月23日放送

「感染症検査の最新トピックス」

東京医科大学 微生物学教授 大楠 清文

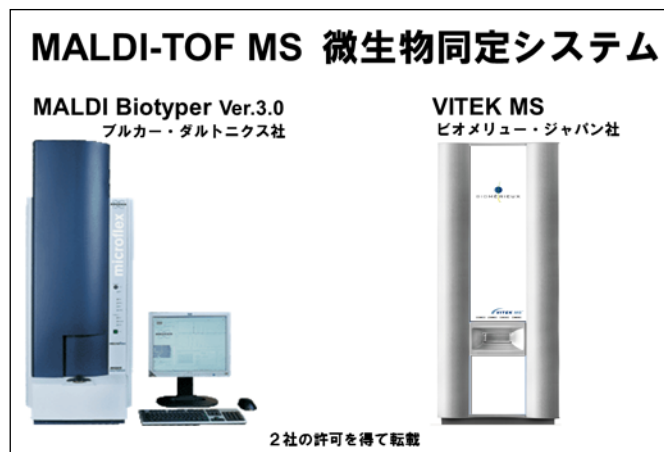
はじめに

本日は、感染症検査において最近、話題となっている最新技術についてお話します。具体的には、質量分析法、POCT 型の全自動遺伝子検査、蛍光分光法、実用化が期待される迅速な薬剤感受性検査に関する最新の動向を順にご紹介します。

質量分析法による微生物同定システム

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計 (MALDI-TOF MS) による微生物の新しい同定法が注目されています。病原体に由来するタンパク質成分のマスペクトルのパターンから、わずか 10 分足らずで分離菌株の同定ができるようになりました。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 2011 年から臨床微生物検査の現場での使用が開始され、現在約 150 施設で導入されています。2018 年 4 月には MALDI-TOF MS で同定すると保険点数 40 点の加算が認められたので、今後急速に普及していくものと思われます。

質量分析法による細菌同定の装置とシステムとして 2 種類が使用されています。ブルカー・ダルトニクス社 (ドイツ) から「MALDI Biotyper」、シスメックス・ビオメリユース社から「VITEK MS」が販売されています。質量分析装置を用いた菌種の同定は、「データベースに登録されている菌種のマスペクトルとのパターンマッチング」です。マスペクトルが指紋となって同じ指紋の細菌を探して同定するイメージです。一



般細菌だけでなく、嫌気性菌、抗酸菌、酵母様真菌、糸状菌の同定も実施できることが大きな利点です。すなわち、1つのシステムで臨床的に重要なあらゆる菌種を取り扱うことができます。さらに、最も臨床的に有用性が高いのが、血液培養が陽性になった培養液から直接、菌種の同定を行うこともできます。前処理の時間を含めて、1時間以内に菌名がわかります。

マルディノミクス

質量分析装置による菌種同定は、単なる菌株同定コストの低減だけでなく、迅速性に優れているので、適切な抗菌薬治療、入院期間の短縮、院内感染防止など医療経済的にも大きな影響、すなわちエコノミカルなインパクトを与えるものと考えています。さらに、質量分析技術を今後、医療現場でうまく活用することで、患者の感染症診療に貢献できるので、クリニカルなインパクトを与えるような実践的な分野となることを願って、私は「マルディノミクス」という造語で命名しました。

「マルディノミクス」
MALDInomics[®]

ゲノミクス(genomics):ゲノムと遺伝子について研究する分野
 プロテオミクス(proteomics):生体内の細胞や組織におけるタンパク質の構造や機能を総合的に研究する分野

economics (エコノミクス:経済学)
家 管理:家政(家計)

MALDInomics

「単なる菌株同定コストの低減ではなく、適切な抗菌薬治療、入院期間の短縮、院内感染防止など医療経済的にも大きな影響を与える質量分析技術をつまぐ管理・発展させながら、患者の感染症診療に貢献するべく、実践的な分野(実学)となること」
 クリニカルインパクト! & エコノミカルインパクト! を願って名付けました[®]

マルディノミクスの評価

では、実際にこの「マルディノミクス」を裏付けるようなデータをご紹介します。欧米では質量分析装置による菌種の迅速同定とその結果に基づいた Antimicrobial Stewardship、つまり抗菌薬の適正使用支援によって入院期間短縮¹⁾や医療費低減の効果²⁾があったことが報告されています。すなわち、介入前後において、効果的な抗菌薬治療までにかかった時間(h)が、30.1h から 20.4h に、入院期間が 14.2 日から 11.4 日に、死亡率が 20.3%から 14.5%に低下したとの報告¹⁾や入院費用が 45,709 ドル(約 457 万円)から 26,162 ドル(約 262 万円)に低減したとの報告²⁾があります。なお、値はすべて平均値です。ただし、「起炎微生物の迅速同定だけでは迅速かつ適切な抗菌薬治療には結びつきません。抗菌薬の適正使用支援チームとの連携が何より重要で、臨床と検査サイドとの緊密なコラボレーションなくして適切な感染症診療は成り立

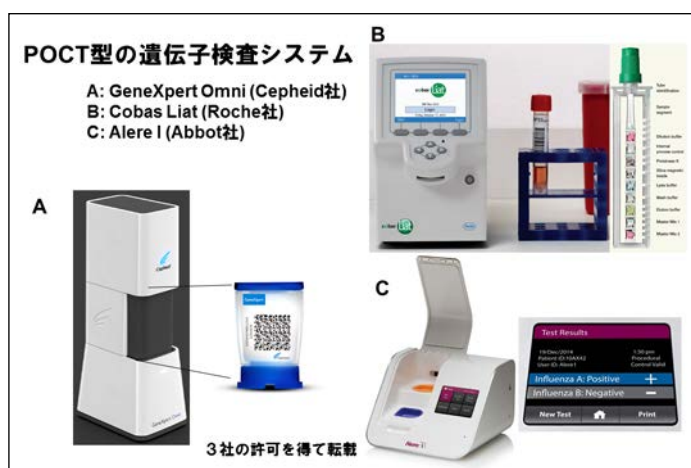
Outcome	介入前 (n = 256)	介入後 (n = 245)	P Value
臨床的な評価			
30日時の全死因死亡者	52 (20.3%)	31 (12.7%)	.021
培養陰性までの日数	3.3±4.8	3.3±5.7	.928
入院期間	14.2±20.6	11.4±12.9	.066
ICU入室期間	14.9±24.2	8.3±9.0	.014
BSIの再発者	15 (5.9%)	5 (2.0%)	.038
30日時の同一BSIによる再入院者	9 (3.5%)	4 (1.6%)	.262
治療に関連した評価			
効果的な治療導入に要した時間 (h)	30.1±67.7	20.4±20.7	.021
適切な治療導入に要した時間 (h)	90.3±75.4	47.3±121.5	<.001

数値はNo. (%)もしくは平均値±標準偏差
入院期間とICU入室期間は血液培養が陽性になった時点から退院(退室)までに要した日数

たないことが再三再四、強調されています。

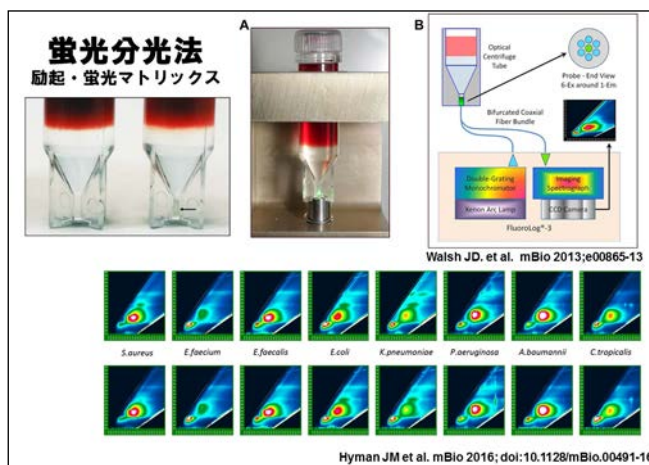
POCT 型の遺伝子検査システム

遺伝子検査の最新トレンドは、POCT (Point of Care Testing) として導入可能な機器・試薬の登場です。GAS、インフルエンザウイルス、RS ウイルスなど単項目の測定ですが、Hands-on-Time が短く、検体を投入後は全自動で測定結果が得られること (Sample to Result)、その Turn Around Time (TAT) が 8~15 分と極めて短いことなどが特長です。POCT は開業医院、病院内の集中治療室など診療の現場で行う検査の総称でしたが、近年ではその概念がやや変化しており、欧米では Decentralized Testing (分散化された検査) として定着しつつあります。すなわち、検体を病院の中央検査室や検査センターに搬送して集中的に検査する (Centralized Testing in Central Lab.) のではなく、患者がいる各々の診療の現場で検査を行うことを意味しています。現在、感染症検査の POCT の主役は免疫クロマトグラフィー法ですが、今後、POCT 型遺伝子検査の機器・試薬の低価格化と検査項目のラインナップの充実が共に実現すれば、病院検査室はもちろんのこと診療所、開業医の現場で、感染症の診断に遺伝子検査が活用されるようになるかと思えます。



蛍光分光法

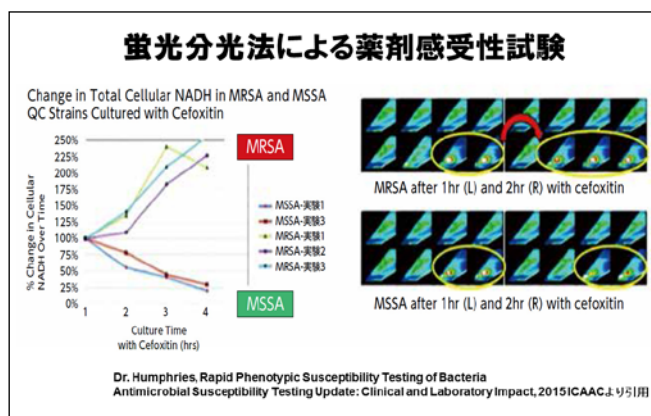
細菌が内在性に保有する、NADH、トリプトファン、ポルフィリン、フラビンなどの発光分子 Intrinsic fluorescence に励起光を照射して、その発光を測定する励起・蛍光マトリックス excitation-emission matrices で菌種を同定する技術が注目されています。血液培養で陽性になった培養液を前処理後 (赤血球を溶解) に集菌して、レーザー光を照射して、縦軸に励起光の波長



(260～800 nm)、横軸に蛍光の波長 (260～1,100 nm) をスキャンしたその画像パターンから約 20 分で菌種を同定することができます。ご覧のように「お魚の目」のような画像パターンは菌種によって異なるので、この“蛍光指紋”がどの菌種のものに一致するかで同定します³⁾。

蛍光分光法による薬剤感受性試験

また、薬剤感受性試験においても、この技術を適用して、薬剤を作用させた後の内部発光のマトリックスパターンの変化から感性菌か耐性菌かを数時間で判定できます。例えば、黄色ブドウ球菌では、菌液と薬剤 (cefoxitin) を混合した後、励起光を照射して、その発光を 1 時間毎に測定します。菌が内在的に保有する発光分子 (NADH) が時間経過とともに消失していけば MSSA (上段)、ずっと発光していれば菌が生存しているため MRSA (下段) と判定できます。



迅速な薬剤感受性検査の最新技術

現在、日常検査で実施されている薬剤感受性試験は、純培養された集落を用いて薬剤を含む培地に一定の菌量を接種して 18～24 時間培養後に判定を行っています。実際には、自動感受性システムで行われていますが、迅速パネルを使用しても報告までに 8～12 時間を要しています。先ほどご紹介しましたように、菌種の同定は質量分析装置の登場によって集落からわずか 10 分で行うことができるようになりましたので、次はもっと早いタイミングで適切な抗菌薬選択や変更を行ってもらうために、薬剤感受性試験を数時間で実施できるような開発に世界中の企業が取り組んでいます。このような背景のなか、3～6 時間で感性菌か耐性菌を判定する画期的な技術が登場しています。

例えば、最初にご紹介しました質量分析装置を活用して、耐性に関与する蛋白ピークを検出したり、酵素活性をモニタリングしたり、薬剤と一定時間作用後のスペクトラム変化を観察する方法などが検討されています。

レーザー光を細菌に照射して菌数や菌体の大きさや形態の変化をモニタリングして MIC 値に換算する方法もあります⁴⁾。あるいは、欧米で使用が開始された Accelerate 社の機器では、薬剤作用による菌体の形態変化をデジタル顕微鏡で経時的にモニタリングして薬剤感受性試験を 5 時間で実施できます⁵⁾。その他、先ほどご紹介しました蛍光指紋を用いた方法や、細菌が放出する有機酸のパターンから菌種を同定する方法も検

討が開始されています。細菌が出す揮発性の有機酸を検知することから“臭いセンサー”とも言われています。これらの最新技術の適用は、現段階では血液培養液が主体ですが、今後は検体を培養することなく、直接に同定と薬剤感受性検査、いわゆる「Culture-Free Microbiology」の時代へ突入する可能性を秘めています。

おわりに

感染症検査のワークフローを一変させる検査機器の最新動向を紹介しました。これからの感染症診療においても、鏡検・培養・薬剤感受性試験の「三種の基本技術」が大切であることに変わりありませんが、質量分析法による菌種の迅速同定、全自動遺伝子検査システム、迅速な薬剤感受性試験などを適宜活用することによって、抗菌薬・抗ウイルス薬の適正使用、入院期間の短縮、医療関連感染の予防などから、費用対効果のさらなる向上が期待できます。そのためには、今後も「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本日のお話を終わります。

迅速な薬剤感受性検査の最新技術

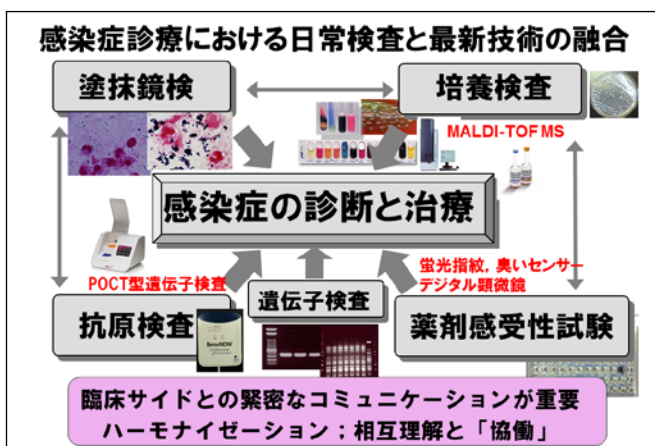
1. MALDI-TOF MS (質量分析装置)
 - 1) 耐性に関する蛋白ピークの検出
 - 2) 酵素活性のモニタリング
 - 3) 薬剤と一定時間作用後のスペクトラム変化
2. レーザー光散乱法 (BacterioScan社)

血液培養液 (将来的には臨床検体から直接) を薬剤と一緒に培養しながら細菌にレーザー光を照射して菌数、菌体の大きさや形態の変化をモニタリングしてMIC値に換算する。所要時間は3~5時間
3. デジタル顕微鏡 (Accelerate社)

血液培養液 (将来的にはBAL, 便, 尿検体) から直接の菌種同定と薬剤感受性試験を5時間で実施。薬剤作用による菌体の形態変化をデジタル顕微鏡で経時的にモニタリングする
4. 蛍光分光法 “蛍光指紋”

血液培養液 (将来的には臨床検体から直接) レーザー光を照射して、縦軸に励起光の波長 (260~800 nm), 横軸に蛍光の波長 (260~1,100 nm) をスキャンしたその画像パターン (NADHの蛍光度合いほか) から約4時間で判定
5. “臭いセンサー” による揮発性有機酸の検出とモニタリング

約80種類の揮発性有機酸を色調の変化で検知する比色センサーアレイを用いる。細菌が放出する有機酸を検知することから“臭いセンサー”と称される。菌種によって色調の変化・パターンが異なるので、そのパターン変化をデータベースに登録しておき、どのパターンであるかを照合することで菌種を同定する



文献

- 1) Huang AM, et al: Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis* 57:1237-1245, 2013.
- 2) Perez KK, et al.: Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med* 137:1247-1254, 2013.
- 3) Walsh JD, et al.: Rapid intrinsic fluorescence method for direct identification of pathogens in blood cultures. *mBio* 4:e00865-13, 2013.
- 4) Hayden RT, et al.: Rapid antimicrobial susceptibility testing using forward laser light scatter technology. *J Clin Microbiol* 54:2701-2706, 2016.
- 5) Marschal M, et al: Evaluation of the Accelerate Pheno system for fast identification and antimicrobial susceptibility testing from positive blood cultures in blood stream infections cause by Gram-negative pathogens. *J Clin Microbiol* 55:2116-2126, 2017.