トピックス

II. 診断法の進歩

2. 感染症の迅速診断

徳江 豊

要 旨

感染症検査は、原因微生物により検査法が大きく異なるうえ、原因微生物特異的な検査も少なくない。したがって、問診や身体診察、画像診断などから、感染部位や患者背景を把握し、原因微生物を推定したうえで実施する。感染症検査では抗原検査が簡便性、迅速性に優れているが、近年、遺伝子検査や質量分析計検査の臨床応用が始まっている。しかし、いかなる検査法もその感度、特異度に留意する必要がある、他の臨床所見と総合して結果を解釈することが肝要である。

〔日内会誌 103：2701～2707, 2014〕

Key words 感染症迅速検査, 抗原検査, 質量分析計, 遺伝子検査

はじめに

感染症は、患者の年齢、基礎疾患、感染臓器・解剖、感染の発生場所により原因微生物は様々である。感染症検査は、原因微生物により検査法が大きく異なるうえ、原因微生物特異的な検査も少なくない。したがって、問診や身体診察、画像診断などから、感染部位や患者背景を把握し、原因微生物を推定したうえで検査項目を選択し、実施することが肝要である。感染症を疑った場合には迅速診断がしばしば実施されるが、病原体特異的な検査において迅速診断として有用なのは、主に抗原検査となる。抗体検査は主にその感染症の免疫の有無やペア血清上昇による感染症治療後の病原体診断に用いられる¹⁾。

適切な化学療法を行うには、原因微生物の同定と薬剤感受性検査が重要となる。ところが、原因微生物の同定結果が得られるのには数日を要するため、実際の初期治療には経験的治療が行われている。抗菌薬の選択に際しては、感染症における原因微生物の統計学的頻度に基づいて行われるべきであるが、塗抹検査、抗原検査などの迅速検査の結果を参考にすることで、より精度の高いものが期待できる。

表1に感染症検査の種類を示した¹⁾。塗抹検査、培養検査、抗体検査、抗原検査、遺伝子検査のそれぞれの対象菌種と注意点を記したが、全ての検査が迅速性に優れているわけではない。表2は成人市中肺炎診療のガイドラインで示された初期治療に役立つ微生物迅速検査である²⁾。

群馬大学附属病院感染制御部

Progress in Diagnostic Technology and Management of Infectious Diseases. Topics : II. Progress in Diagnostic Technology ; 2. Rapid diagnostic test for infectious diseases.

Yutaka Tokue : Infection Control and Prevention Center, Gunma University Hospital, Japan.

トピックス

表 1. 感染症検査の種類

	主な検査対象	注意点
塗抹検査	グラム染色：細菌、真菌 抗酸菌染色：抗酸菌 直接検鏡：原虫 墨汁染色：クリプトコックス ギムサ染色：マラリア、ニューモチシスチス	一般に培養検査より低感度 特殊染色が必要な病原体有り 正確な菌種同定は不可
培養検査	細菌 真菌 ウイルス	時間を要する 培養困難な病原体がある 常在菌、定着菌との鑑別が必要
抗原検査	局所検体：細菌（A群レンサ球菌、クロストリジウム） ウイルス（インフルエンザ、アデノ、ロタ、ノロ、RS） 尿検体：肺炎球菌、レジオネラ 血液検体：ウイルス：CMVアンチゲネミア 真菌（アスペルギルス、クリプトコックス、カンジダ、βグルカン）	発症早期は低感度 感染後しばらく陽性が遷延するため 治療効果判定には利用困難
抗体検査	各種ウイルス 培養困難な細菌：マイコプラズマ、クラミジア、百日咳、梅毒） 原虫：トキソプラズマ、赤痢アメーバ	ウインドウ期間の存在 診断基準が様々
遺伝子検査	抗酸菌、HBV、HCV、HIV、淋菌、クラミジア レジオネラ、マイコプラズマ、HPV	生菌と死菌の鑑別不可

（文献 1 より引用、一部改変）

1. 塗抹検査

感染症の治療において、原因菌を明らかにするための診断検査が必要なことは明らかであるが、そのような検査を実施する本来の目的は、その検査結果によって個々の患者に対する抗菌薬治療を変更する必要があることである。すでに投与されている抗菌薬スペクトルをさらに広域または狭域に変更することであり、患者にとって最も有用な治療の変更は、通常経験的治療でカバーできない真菌、結核などの特殊な病原微生物や耐性菌に対する治療薬の拡大や変更である。不適切な抗菌薬治療を行うと、死亡率や臨床的効果に対して負のリスクが増加することが知られている。狭域なスペクトルの抗菌薬変更が可能になれば、薬剤の副作用および耐性菌出現のリスクを抑制する可能性がある。

グラム染色による喀痰塗抹検査は、手技が簡

便で迅速性に富み、その情報は検体の品質評価だけではなく、原因菌の推定が可能であるので、肺炎などの感染症の初期治療における抗菌薬選択の重要な指標となり得るとされるが、実施者の経験によって手技や結果の解釈が異なる場合がある^{3,4)}。

2. 培養検査

喀痰培養の陽性率は様々であり、培養検査の手順の質（喀痰採取、輸送、迅速な処理、検査所見の解釈力など）により大きく影響される。このような検査を実施する本来の目的は、培養検査によって得られる感受性結果によって個々の患者に対する抗菌薬治療を変更する必要があることである。すでに投与されている抗菌薬スペクトルをさらに広域または狭域に変更することである。患者にとって最も有用な治療の変更は、通常経験的治療でカバーできない真菌、

表 2. 肺炎初期治療に役立つ感染症迅速検査

I. 簡便で外来、ベッドサイドでも実施可能な検査
1. 抗原検査
1) 呼吸器由来検体を用いるもの インフルエンザ、RSV、A群溶連菌、アデノウイルス
2) 尿検体を用いるもの 肺炎球菌、レジオネラ
2. 塗抹検鏡検査
1) グラム染色
2) 特殊染色 ヒメネス染色（レジオネラ）、Diff-Quik染色（ニューモシスチス）
II. 手技が複雑、あるいは特定の機器、施設が必要な検査
1. 塗抹検鏡検査
1) 抗酸菌染色（結核菌、非結核性抗酸菌）
2) 蛍光抗体法（レジオネラ、クラミジア、マイコプラズマ、ニューモシスチス）
3) PAS染色（真菌）
4) グロコット染色（真菌、ニューモシスチス）
5) ギムザ染色（ニューモシスチス）
6) トルイジンブルー染色（ニューモシスチス）
2. 抗原検査
1) 呼吸器検体を用いるもの アデノウイルス
2) 血液、尿検体を用いるもの レジオネラ、アスペルギルス、カンジダ、クリプトコックス、CMV
3. 遺伝子検査
1) 呼吸器検体を用いるもの 結核菌、非結核性抗酸菌、レジオネラ
2) 血液検体を用いるもの コクシエラ、CMV

（文献 2、表 7-3 より引用一部改変）

結核などの特殊な病原微生物や耐性菌に対する治療薬の拡大や変更である。不適切な抗菌薬治療を行うと、死亡率や臨床的効果に対して負のリスクが増加することが知られている。狭域なスペクトルの抗菌薬変更が可能になれば、薬剤の副作用および耐性菌出現のリスクを抑制する可能性がある⁴⁾。

3. 抗体検査（表 3）

迅速診断としての有用性は少ないが、抗体検査法とその特徴について表に示す。急性期の診断には感染初期から上昇するIgMを検査する一方、感染防御能の評価にはIgGやHI法、NT法な

ど長期間持続する指標を用いるなど、目的により検査すべき方法が異なる。急性期と回復期に採取したペア血清を用いて、4倍以上の有意な抗体価の上昇により急性感染の診断が可能となるが、回復期まで診断ができないことから、疫学的な意義はあるものの臨床的な有用性に欠ける。

4. 抗原検査（表 4）

簡便で、外来やベッドサイドでも実施可能な検査として、インフルエンザウイルス、RSウイルス、A群溶血性レンサ球菌、肺炎球菌、レジオネラの抗原検査法がある。細菌やインフルエンザに対する迅速抗原検査は短時間で結果が得ら

トピックス

表 3. 抗体検査

検査方法	原理	特徴
補体結合反応（CF）	抗原抗体複合体と結合した補体を感作血球の不溶血を指標として間接的に証明.	●群特異性が高い ●比較的早期に抗体消失 ●感染スクリーニング用
赤血球凝集抑制反応（HI）	赤血球凝集能をもつウイルスの場合、その凝集を抑制する抗体を証明.	●型特異性が高い ●早期に抗体が上昇、持続する
蛍光抗体法（FA）	感染細胞中のウイルスと抗体との反応を蛍光標識抗体で証明.	●抗体分画が可能
中和反応（NT）	活性ウイルスを抗体により中和させ、感染防御抗体を証明.	●型特異性が高い
酵素免疫法（EIA）	固相化したウイルス抗原と抗体を反応させ、酵素標識抗体との反応により証明.	●抗体分画が可能 ●定量的データ ●他法に比して高感度
受身赤血球凝集反応（PHA）	固相化赤血球にウイルスを吸着させ、これに抗体を反応させ、凝集の有無により証明.	●高感度
受身（粒子）凝集反応（PA）	固相化ゼラチン粒子にウイルスを吸着させ、これに抗体を反応させ、凝集の有無により証明.	●PHAに比し非特異的凝集が少ない
ウエスタンブロット法（WB）	転写膜に分画された抗原タンパクのバンドと特異的に反応する抗体を検出.	●特異性が高い ●確認試験

（SRLホームページより引用、一部改変）

表 4. 抗原検査

検査方法	原理	特徴
酵素免疫法（EIA）	ウイルス抗原と特異抗体を反応させ、酵素反応により検出. 特異抗体に直接酵素を標識して検出する直接法と二次抗体に酵素標識する間接法がある.	高感度
蛍光抗体法（FA）	ウイルス抗原と特異抗体を反応させ、蛍光色素により検出. 特異抗体に直接蛍光物質を標識して検出する直接法と二次抗体に蛍光物質を標識する間接法がある.	特異性が高い
遺伝子増幅法（PCR）	熱変性 1 本鎖DNAに目的のプライマーを結合させ、DNAポリメラーゼによりDNA合成反応を行い、これを繰返す事により目的とするDNA配列を指数関数的に増幅.	高感度・特異性が高い
サザンブロット ハイブリダイゼーション	制限酵素で消化した検体DNAをアガロース電気泳動で分画、変性させた 1 本鎖DNAをメンブランに転写後、標識プローブとハイブリダイゼーションさせ、目的遺伝子を検出.	DNAの量的、質的変化の異常を解析
液相（核酸） ハイブリダイゼーション	液相中で検体を溶菌処理し、遊離したrRNAと標識プローブをハイブリダイゼーションさせ、形成した 2 本鎖ハイブリッドを分離、目的遺伝子を検出.	病原体のrRNAを標的とし、直接菌体を検出
<i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	スライドガラス上で、細胞や染色体のDNA、あるいはrRNAと標識プローブをハイブリダイゼーションさせ、顕微鏡下で検出.	ウイルス感染細胞の確認・目的遺伝子の局在性を証明

（SRLホームページより引用、一部改変）

れ、初期治療選択に有用である。また、アデノウイルスやノロウイルスなどの迅速抗原検査も、適切な感染対策を実施するうえで有用である。しかし、いずれの検査においても、偽陽性、偽

陰性の可能性は考慮して対応することが肝要である。遺伝子学的手法により病原体そのものを検出する検査もある。結核菌など発育の遅い菌や培養困難な細菌、ウイルスなどが対象となる。培養検査が比較的多くの病原体を同時に検出できるのに対し、遺伝子検査は対象となる病原体のみしか検出できず、高価でもあり、臨床症状や患者背景などから病原体の推定を行い、検査の必要性を十分に検討したうえで実施する必要がある。

5. 尿中抗原検査

肺炎球菌とレジオネラの迅速診断キットについては、その簡便性、迅速性、そして正確性が高く評価されており、重症例には実施すべきであるとされている。ICU管理、白血球減少、アルコール症、無脾症、胸水合併、外来抗菌化学療法無効の場合は、肺炎球菌尿中抗原検査が推奨されている。呼吸器感染症患者において喀痰検体を用いる場合は、上気道や口腔内常在菌による検体汚染の危険性が問題となるのに対し、尿中抗原ではその関与を考慮しないでもよい点が臨床判断するうえで有用である。また、尿中への病原体抗原の排出は血中抗原の濃縮を意味するものであり、診断的意義は高い。さらに、喀痰や血液などと異なり、尿は大量に採取することができ、これを濃縮することにより、感度を高めることが可能である。日本呼吸器学会成人市中肺炎診療ガイドライン²⁾では、原因菌として最も頻度の高い肺炎球菌性肺炎を早期に診断する観点から、外来での迅速診断検査として肺炎球菌尿中抗原検査を喀痰検査よりも重要視している。入院の場合は、肺炎球菌はもちろん、レジオネラの迅速診断検査を、グラム染色、喀痰培養とともに推奨している。我が国と医療保険制度をはじめとする医療事情の差を反映しているためか、2007 IDSA/ATS市中肺炎ガイドライ

ン⁴⁾では、外来の全ての患者に対して原因菌判定のための検査は必要でないとしている。さらに、入院であっても、患者背景によって血液検査、喀痰培養、尿中抗原などの迅速診断検査など、必要な検査が推奨されている。

尿中の肺炎球菌荚膜抗原は、症例によって異なるが、尿中に排出されるのは症状出現後3日目以降であり、発症後まもない検体では検出できないこともある。一方、患者の炎症所見が改善して2カ月以上にわたって検出されることも知られており、治療効果の判定には適していない。特に肺炎球菌感染症の既往のある患者に肺炎がみられた場合に、尿中抗原陽性の臨床的意義の判断には注意が必要である。また、乳幼児を対象にした場合、健常児の50%以上で鼻咽頭に保菌していることから偽陽性が生じる恐れがあること、肺炎球菌が原因菌となる中耳炎患者においても注意が必要である⁵⁾。

レジオネラ肺炎の50%以上は*L. pneumophila* 血清型1が原因菌となるが、それ以外の菌種や血清型が原因となる場合は、当レジオネラキットでは診断できないことに留意する必要がある。血清型1の頻度が80%以上を占める欧米における培養検査により、レジオネラ症と診断された患者を対象にした検討では、尿中抗原検査による検出感度は70~90%、特異度はほぼ99%であることが示されているが、我が国では偽陰性に対する注意が必要であり、尿中抗原検査陰性でもレジオネラを強く疑う症例では特殊培地による培養やPCR検査を行う必要がある。肺炎球菌の尿中抗原と同様に、尿中のレジオネラ抗原は通常では肺炎症状出現後3日目以降から検出感度以上に達し、その後数日から数週間にわたって排出されることがあるため、測定結果の解釈にあたっては既往歴や発症日、症状などを十分に考慮する必要がある。治療効果判定には使用できない⁵⁾。

トピックス

6. プロカルシトニン

プロカルシトニン (PCT) は細菌感染症特異マーカーとして注目されているが、敗血症における感度、特異度としてはCRPを凌駕するものでない⁶⁾。敗血症が疑われる症例においては、PCTが高値であることをもって抗菌薬を投与する方法は比較的安全と推察されるが、PCTが低値であることをもって抗菌薬を投与しないとするのはリスクが高まる可能性がある。状況に応じて使用すれば、感染症の重症度のマーカーとして、あるいは抗菌薬治療の指標として用いることも可能であるが、万能ではないので、PCTはあくまでも参考所見にとどめるべきである。逆に、細菌感染ではない重症病態の際は、むしろPCTの低さが感染症除外に役立つ可能性がある。

7. 質量分析計 (MALDI-TOF MS) を用いた細菌同定

研究的な側面がまだ強いが、迅速性と正確性に優れた細菌同定法として、質量分析計が注目されている。従来の細菌同定は、グラム染色やコロニーの形状などの形態学的手法や生化学的分析法を用いているが、正確な結果を得るには高い専門性や熟練を要する。一方、質量分析計はサンプル調整が容易で、測定操作も簡便であり、低いランニングコストで同定可能な方法として臨床応用の試みが増えている。MALDI-TOF MSとは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix assisted laser desorption ionization: MALDI) と飛行時間型 (time of flight: TOF) 質量分析計 (MS) の組み合わせにより、主として生体高分子の質量を決定する装置である。MALDIは、分析試料にマトリックス (レーザー光を吸収する化合物) を混合し、数ナノ秒という短時間のレーザー光を照射することで分

析試料をイオン化する。タンパク質や糖質、オリゴヌクレオチド、脂質などの幅広い生体関連物質をほとんど分解しないソフトな条件でイオン化する特長をもつ。TOF-MSは、イオン化した試料を高電圧の電極間で加速し、高真空無電場領域のフライトチューブと呼ばれる管中へ導入して等速度飛行させ、一定距離を飛行するのに要する時間を測定して質量を算出する。高分子の分析に適した質量分析計である。培養にて得られたコロニーをこの方法で分析し、細菌の種類によって異なるマスペクトルのパターンをデータベース化し、測定した細菌資料から得られたマスペクトルを照合し細菌同定することが可能である⁷⁾。現在は培養したコロニーを対象とすることが多いが、血液培養陽性培養液や臨床検体から直接同定する試みがなされている。

8. 16SrRNA遺伝子解析による細菌同定

我々は、病院感染の領域で分子生物学的微生物同定法を応用し、培養法と比較しつつ培養不能な微生物を含めて、16SrRNA遺伝子を標的とした解析を行っている。16SrRNAは蛋白合成を行うリボソームを構成するRNAであり、細菌のrRNAは23S、16S、5Sの3種類で構成されている。進化速度が比較的遅いため配列の保存性が高く、種のレベルにおいては高い相同性を示す。各細菌に共通した保存領域と各菌属や種に特異的な領域が存在し、共通部分を認識するuniversal primerを用いて遺伝子を増幅し、特異的な部分の塩基配列により菌種の同定を行うものである。具体的には、喀痰などの検体からDNA抽出を行い、16SrRNA遺伝子を標的としたuniversal primerを用いてPCRを施行しライブラリーを作成する。培養後のコロニーを使用する場合は直接塩基配列を決定できるが、複数菌存在する可能性のある検体や環境からの検出の場合はPCR断片をクローニングした後、シーケンスを決

定し、GenBankなどのデータベースにて相同性を比較して微生物の同定を行っている。手技がやや煩雑で迅速性、簡便性にやや難があるが、通常の生化学的検査で菌が同定できない場合や培養が困難な菌による感染症の場合には、通常の検査を補完する意味で、より迅速で正確な菌種の同定に貢献できる方法である。

おわりに

患者検体からの病原体の検出は感染症診断において重要であるが、微生物検査に供する検体の採取法と保存法は検査結果に大きな影響を及ぼすので正しい方法で採取し、検査に適した良質なものを検査しなければならない。抗菌薬投与前に採取すること、乾燥を避け、適切な環境で保存すること、患者の協力を得て良質な検体を採取することなどが大切である。呼吸器感染症患者において、喀痰検体を用いる場合は上気道や口腔内常在菌による検体汚染の危険性が問題となる。喀痰の品質管理法として、肉眼的評価（Miller & Jones分類）と顕微鏡的評価（Geckler分類）を応用して微生物検査に適した検体かどうか判断する。

結果解釈における注意点としては、いかなる検査法もその感度、特異度に留意する必要がある。感染症検査単独で判断するのではなく、他の臨床所見と総合して結果を解釈することが肝

要である。培養検査では原因菌として治療すべきかの判断が必要であり、定着菌や汚染菌との鑑別に塗抹検査や抗原検査も利用する。抗体検査ではウインドウピリオドの存在など発症直後に偽陰性となる可能性に注意が必要である。また、抗体検査の場合、キットによるカットオフ値の違いや、感染防御能の評価を目的とした場合に異なる判断基準が適応されることなどにも注意が必要である。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：徳江 豊：講演料（第一三共、大正富山医薬品、ファイザー）

文 献

- 1) 馬場尚志：感染症検査，臨床検査のガイドラインJSLM 2012. 日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会編. 1 版，宇宙堂八木書店，東京，2012, 27-30.
- 2) 日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会：成人市中肺炎診療ガイドライン. 日本呼吸器学会，東京，2007, 14-23.
- 3) 徳江 豊：喀痰検査はどこまで有用か？ 日内会誌 100: 3510-3515, 2011.
- 4) Mandell LA, et al: Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adult. Clin Infect Dis 41: S27-72, 2007.
- 5) 徳江 豊：尿中抗原診断法の現状と将来. 日内会誌 99: 2696-2702, 2010.
- 6) Tang BM, et al: Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 7: 210-217, 2007.
- 7) Sauer S, Klien N: Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nat Rev Microbiol 8: 74-82, 2010.