感染症診療における検査法

要 旨

近年、新規検査機器の開発が進められている。代表的なものとして、質量分析装置（matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry : MALDI-TOF MS）と遺伝子検査機器が挙げられる。MALDI-TOF MSは、迅速性と経済性を兼ね備えた微生物同定機器である。遺伝子検査は、従来、特殊な技術や機器が必要であったために運用が制限されていたが、これからは同時多項目検査と全自動機器の開発によって広く普及することが期待される。これらの機器は、従来の検査法より、正確且つ迅速な微生物同定を可能にする。これらの新しい機器の特徴を理解し、感染症診療に上手く活用していくことが必要である。

〔日内会誌 107 : 2230～2239, 2018〕

柳原 克紀

Key words 質量分析装置, 同時多項目検査, 全自動遺伝子検査機器

はじめに

薬剤耐性菌の蔓延や免疫不全宿主の増加に伴い、近年、感染症診療の複雑性が増してきた。救急搬送される重症感染症患者の治療も大きな課題である。そのような背景のなかで、感染症診療における微生物検査の重要性は高まっている。感染症検査結果に基づく抗微生物薬投与は、有効性を向上させるのみならず、薬剤耐性菌の抑制にも効果的であることも明らかになってきた。早期に原因微生物を推定・同定することは、微生物検査において最も期待されることの1つである。近年の科学技術の進歩に伴い、新規検査機器が開発されてきた。従来から行われている分離培養法及び生化学的同定法と比較し、より早く微生物を検出し、有用な情報を提

供することができる。代表的なものとして、質量分析装置（matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry : MALDI-TOF MS）と全自動且つ迅速な遺伝子検査（機器）が挙げられる¹⁾。本稿では、これらの臨床検査機器が感染症診療で果たす役割と今後の展望について概説する。

1. 質量分析装置の概要

MALDI-TOF MSは、優れた診断機器であり、この技術には、2002年にノーベル化学賞を受賞した田中耕一先生が大きく貢献したことで広く知られている。簡便且つ短時間で結果が得られ、試薬を使わないため、ランニングコストの面からも大きなメリットがある。MALDI-TOF

長崎大学大学院病態解析・診断学分野（臨床検査医学）、長崎大学病院検査部

Leading Edge of Infectious Diseases. Topics : I. Laboratory diagnosis of infectious disease.

Katsunori Yanagihara : Department of Laboratory Medicine, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Japan, Laboratory Medicine, Nagasaki University Hospital, Japan.

図1 質量分析の原理(1)

図2 質量分析の原理(2)

MSは、レーザーでイオン化した高分子を飛散させ (MALDI, 図1), 真空管のなかでの飛行時間 (TOF, 図2A) を測定し、マスペクトル (MS, 図2B) を作成することで、主にタンパク質の質量を分析する。この飛行速度は、質量が小さい分子ほど速く、質量が大きい分子ほど遅くなるという特徴がある。検出器までの到達時間が分子の質量によって変化するため、飛行時間を分子質量に置き換えてマスペクトルが作成される。実際の操作は、極めて簡便である。寒天培地に発育したコロニーを鉤菌し、専用プレート上でマトリクスと菌株を混ぜる。このマトリクスがあることにより、タンパク質が分解されずにイオン化が可能となる。プレートを乾燥後、

装置本体に組み込み、レーザーで励起することでマスペクトルが得られる。このスペクトルは菌によって異なっており、同一菌種は同じスペクトルを有する。スペクトルの例を図3に示す。機器内に登録されているデータベースを照合し、独自のアルゴリズムによって信頼度のスコアが高い菌種が同定結果として提示される (図4)。同定には、主にリボソームタンパク質のマスペクトルパターンが利用されており、一般的な生化学的同定法との一致率は種レベルで約86%、属レベルで約95%と報告されている²⁾。従来の生化学的同定法及び遺伝子検査と特徴を比較した (図5)。生化学的性質に基づく従来法に比べ、簡便性と精度の両方において優

図3 スペクトルパターンの例

れる。遺伝子検査と比較すると、同定精度はやや劣るものの、はるかに簡便である。

2. 臨床応用におけるメリット

コロニー釣菌から同定まで約10分という迅速性は大きなメリットであり、高い正確性と再現性を併せ持っている。我々の施設においても、導入によって、報告までの時間が1日程度短くなることが示された。一般細菌以外にも真菌、嫌気性菌の同定も可能である。従来の検査では同定できなかった菌株が、本装置で同定できることがしばしば経験され、生化学的同定検査のデメリットを補う側面もある。前処理も単純な操作で可能であり、必ずしも特別な知識や経験を必要とせず、消耗品はマトリクス程度で

あり、ランニングコストの面からも優れる等、多くのメリットがある。従来同定できなかった菌が判明することは、新しい疾患群の確立や感染病態の解明につながる等、学問的な発展にも貢献し得る。

デメリットとしては、一部には識別が困難な微生物が存在し、*Streptococcus*属、*Enterobacter*属ならびに*Acinetobacter*属では、同定の信頼度が低下することがある。また、*Shigella*属は同定できない代表的な菌で、*Escherichia coli*と誤同定してしまうため、その判断には十分注意しなければならない。今後は、データベースの充実により、同定精度がさらに向上するものと思われる。

血液培養陽性検体からの直接迅速同定の臨床応用が期待される。通常の作業とは別に、専用

図 4 MALDI-TOF MS による菌の同定

図 5 MALDI-TOF MS による同定の位置付け

図6 MALDI-TOF MSによる耐性菌の検出

の試薬を用いて菌体抽出のための前処理を行うことで、血液培養陽性検体からの同定も可能である。この前処理は約30分程度の時間と抽出のための試薬費用が別にかかる。臨床検体からの直接の検出も不可能ではないが、種々の問題がある。体細胞等の混入物がない検体が望ましい。混入物が一般的に少ない尿検体を用いた研究は報告されており、 1×10^5 個程度の菌数があれば、同定可能であった³⁾。

3. 薬剤耐性菌の検出

2016年、我が国は「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン2016-2020」（国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議）を公表し、世界的な脅威となっている耐性菌感染症に積極的に取り組む姿勢を示した。薬剤耐性菌を正確に検出することは、同アクションプランの根幹となる。

MALDI-TOF MSによる薬剤耐性菌の検出は今後の展望である。薬剤耐性菌の機序の1つである β -ラクタマーゼは抗菌薬を分解する酵素の一種であり、理論的には検出が可能である。しかしながら、臨床応用を考える場合は安定した検出系が必要であり、検査で使用できるレベルには至っていない。 β -ラクタマーゼそのものを検出するのではなく、菌が抗菌薬を分解するかどうかを識別することで耐性菌の検出が可能である。この方法では、検出するのは菌体成分ではなく、抗菌薬と β -ラクタマーゼによる分解産物になる。図6に示すように、対象となる菌が β -ラクタマーゼを産生すると抗菌薬が分解され、ピーク消失と分解産物ピーク出現が認められる。

我々は、近年増加している耐性菌である基質拡張型 β -ラクタマーゼ（extended-spectrum β -lactamase：ESBL）産生菌及びカルバペネマー

ゼ産生腸内細菌科細菌 (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* : CPE) をMALDI-TOF MSで耐性菌を検出できるかどうかを検討した。培養された菌のコロニーを対象の抗菌薬に懸濁し、37℃で2〜3時間振とう培養した。ESBL株は、セフトキシム (cefotaxime : CTX) の分解能を、CPE株はメロペネム (meropenem : MEPM) の分解能について評価した。質量分析装置により、培養後の菌液から対象抗菌薬の分解の有無を解析することで、 β -ラクタマーゼ産生を検出した。最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) が低い菌株においても感度が高く、抗菌薬分解能 (カルバペネマーゼ産生) を検出できた。カルバペネム耐性であっても、カルバペネマーゼ非産生の耐性菌はMEM分解なしと判定され、 β -ラクタマーゼ検出の特異性が高いと考えられた⁴⁾。薬剤耐性菌の検出においては、改良の余地があるものの、将来的には実臨床における検査方法として使用されるものと期待される。

4. 遺伝子検査

微生物の遺伝子検査は、古くから培養が困難な微生物を検出する手段として用いられてきたが、その対象は拡大し、その役割は大きくなってきている。遺伝子検査は抗原検査に比べて感度が高く、培養が不可能または困難もしくは時間を要する細菌や抗酸菌、ウイルスの検出のために用いられている。また、感染症の診断のみならず、スクリーニングやモニタリング、サーベイランスにも用いられ、感染制御や感染症疫学等の分野でも活用されている。

5. 遺伝子増幅法 (PCR法, LAMP法)

遺伝子増幅法では、特定の病原微生物をターゲットとして、その核酸を増幅・検出する。日常診療では、PCR (polymerase chain reaction)

法またはLAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法がよく用いられている。PCR法は、抗酸菌の検出等で広く用いられているが、サーマルサイクラー等の機器が必要となる。一方で、LAMP法は増幅反応が65℃前後の定温で進行するため、特別な機器を必要としない。また、微量の遺伝子の特異的且つ効率的に増幅することができるため、PCR法よりも感度・特異度ともに優れるとされている。LAMP法としては、結核菌群、レジオネラ、マイコプラズマ、百日咳菌、インフルエンザウイルス (A型, H1 pdm 2009, H5重型), SARS (severe acute respiratory syndrome) コロナウイルスを対象としたキットが栄研化学 (株) より体外診断用医薬品として商品化されている。レジオネラは、尿中抗原検査では *L. pneumophila* 血清群 1 しか検出できないのに対し、LAMP法では、尿中抗原検査に比べ、より多くのレジオネラ属菌種を検出可能である。そのため、レジオネラ肺炎が強く疑われる症例には有用な検査法となる。

6. 全自動核酸抽出増幅検査機器

全自動核酸抽出増幅検査機器は、核酸抽出から増幅、検出まで1台で行うことができる「次世代型」検査機器である。このシステムにおいては、核酸の抽出を自動的に機器で行うため、コンタミネーションのリスクが低下するだけでなく、操作者の技術に依らず、再現性が担保される。また、全自動核酸抽出増幅検査システムでは、病原微生物や薬事耐性遺伝子等を同時に多項目検出できる試薬が開発されている。このような試薬を使用することによって、一度の検査で細菌、真菌、ウイルスならびに寄生虫等の感染症の原因微生物や薬剤耐性遺伝子まで検出することができる。以下、全自動核酸抽出増幅検査システムの代表的な機器を4つ紹介する。

図7 BD マックス（全自動核酸増幅システム）の概要

1) BDマックス[®]

サンプルを機器に装着後、全自動で核酸抽出から増幅、検出までの過程を行うため、時間の短縮に加え、コンタミネーションのリスクが回避できる。また、操作のプロセスが少なく、施行者の技術にも左右されにくい。同時に、24検体で測定可能であるため、多検体処理にも対応できる。本装置は、海外において先行して利用されており、米国ではB群溶連菌、MRSA (methicillin-resistant *staphylococcus aureus*) ならびに *Clostridium difficile* の検出キットが承認されているほか、オリジナルのプライマー・プローブを用いて、独自の検出系を作成することもできる⁵⁾(図7)。

2) GeneXpert[®]

項目毎に設計された専用のカートリッジ内で核酸の抽出から解析までの全ての工程が完了する(図8)。例えば、Xpert[®] MTB/RIFカートリッジでは、喀痰から直接結核菌遺伝子とリファン

ピシン耐性遺伝子を同時に2時間以内に検出することができる。抗酸菌染色等の塗抹検査よりも高い感度で結核菌を検出することができるため、特に薬剤耐性リスクの高い症例では優先的にXpert[®] MTB/RIFを用いることをWHO (World Health Organization) が推奨している。我が国でも2016年11月から体外診断用医薬品として販売開始され、利用が可能となった。また、*Clostridium difficile* 腸炎の毒素であるトキシンBを高精度で検出できるキットも開発されており、今後の保険収載が待たれる。

3) Verigene[®]システム

DNA (deoxyribonucleic acid) マイクロアレイを用いており、多項目を同時に検出することが可能な自動多項目同時遺伝子検査システムである。現在、グラム陽性菌・薬剤耐性核酸テスト (Gram-Negative Blood Culture Nucleic Acid Test: BC-GP) とグラム陰性菌・薬剤耐性核酸テスト (Gram-Positive Blood Culture Nucleic Acid Test: BC-GN) の2種類の試薬が日本で販売され

- リアルタイムPCRの全工程（核酸抽出・PCR増幅・検出）をカートリッジの中で実施
- 機器・試薬が閉鎖系のためコンタミのリスクが最小限
- 検体処理コントロール（SPC）とブローブチェックコントロール（PCC）により、外部コントロールが不要
- 簡便な操作 ほとんどの項目は2～3分の手操作のみ
- 必要な時にすぐに実施可能なオンデマンド検査
- 様々な臨床検体に対応 喀痰、鼻腔スワブ、便（スワブ）、血液、血清、血漿、尿
- 試薬の保存温度は2～28℃、室温管理が可能

遺伝子検査室がカートリッジのなかに

図8 GeneXpertの簡単なアッセイワークフロー

表1 検出できる菌の種類と薬剤耐性遺伝子

検出対象	Verigene システム	
	BC-GP	BC-GN
細菌	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> <i>Listeria</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. lugdunensis</i> <i>Streptococcus</i> spp. <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> <i>S. anginosus</i> Group	<i>Acinetobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp., <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i>
薬剤耐性遺伝子	<i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i>	CTX-M, IMP, KPC, NDM, OXA, VIM

ており、菌血症の原因菌となる細菌の多くが網羅されている（表1）。このVerigene®システムを用いることで、血液培養陽性となった培養液から3時間以内に原因菌及び薬剤耐性遺伝子を同時に検出することができる^{6,7)}。

4) FilmArray®

フィルム製のパウチに凍結乾燥した試薬が充填されており、核酸の生成、増幅から検出まで全自動で行われる。検査結果は1時間以内という比較的短時間で得られる。現在、呼吸器感染症パネル、血流感染症パネル、消化管感染症パネルならびに髄膜炎・脳炎パネルが開発されており、それぞれの代表的な原因微生物（細菌、

ウイルス、酵母、寄生虫）、耐性遺伝子を検出できる（表2）。なかでも、髄膜炎・脳炎パネルは、重症例の多い髄膜炎の原因微生物を幅広く網羅しているため、迅速且つ正確な診断を要する髄膜炎の診断・治療に大きく寄与すると考えられる⁸⁾。

7. 多項目遺伝子検査指針

感染症の原因菌の予測は必ずしも容易ではない。感染部位に応じて、頻度が高い微生物から順に原因菌を推測するが、それらを一つひとつ検査するよりも、複数の微生物を同時に検査の方が効率的であり、臨床検査として有用性が

表 2 Filmarray®の各パネルにより検出可能な微生物

	細菌・真菌	ウイルス
髄膜炎・脳炎	<i>Escherichia coli</i> K1 <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Cryptococcus neoformans/gatti</i>	Cytomegalovirus Enterovirus Herpes simplex virus 1 Herpes simplex virus 2 Human herpes virus 6 Human parechovirus Varicella zoster virus
呼吸器感染症	<i>Bordetella pertussis</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Adenovirus Coronavirus (229E, HKU1, OC43, NL63) Human Metapneumovirus Human Rhinovirus/Enterovirus Influenza A (H1, H1-2009, H3) Influenza B Parainfluenza (1, 2, 3, 4) RS virus

髄膜炎・脳炎パネルでは、無菌性髄膜炎の原因となるウイルスも検出対象となっており、診断に大きく寄与すると考えられる。血流感染症パネル、消化管感染症パネルの対象微生物については、製品ホームページを参照されたい。

<http://www.biomerieux-diagnostics.com/filmarrayr-multiplex-pcr-system>

高い。薬剤耐性の情報が同時に得られれば、その有用性はさらに高くなる。この観点から、多項目遺伝子検査は重要である。前述したように、全自動で多項目の遺伝子検査を行える機器も開発されている。そのような背景で、2017年3月、日本感染症学会感染症遺伝子検査委員会及び日本臨床微生物学会感染症領域新規検査検討委員会の合同チームは、新しい敗血症診断用検査法の適正な運用を目的として、「敗血症などの重症感染症に対する遺伝子関連検査の実施指針」を作成した⁸⁾。その後、呼吸器感染症での多項目遺伝子関連検査が開発された。今後も消化管感染症や中枢神経感染症等の新たな領域での多項目遺伝子関連検査が登場すると考えられたため、2018年4月に「多項目遺伝子関連検査の実施指針」と名称を変更し、改訂版が公表された。本実施指針では、推奨される医療機関、対象患者群ならびに結果の解釈等に関して記載されている。

日本感染症学会では、遺伝子検査の現状や要望を把握する目的で、アンケート調査が実施された。この調査でも、①感染症遺伝子検査につ

いては、専門医・非専門医に関係なく、多くの医師がその必要性・重要性を認識していた、②コストや保険適用の問題から、院内で感染症遺伝子検査を実施していない施設が多い、③全自動遺伝子検査システム等の感染症遺伝子検査は、感染症診療及び感染制御に貢献できる検査であるが、欧米と比べて日本では導入が遅れている、といったことが明らかになった。この海外とのギャップについては、行政とも連携して解決していく必要がある⁹⁾。

おわりに

感染症の検査は大きく変貌し、新時代へと移行しつつある。新たな検査機器は精度が高く、迅速に結果を得られる反面、デメリットもあるため、従来のグラム染色、生化学的同定検査ならびに薬剤感受性試験等にとって代わるものではない。新しい検査法の有用性と限界を正しく把握し、使いこなすことが大切である。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：柳原克紀；講演料（日本ベクトン・ディッキンソン，バイオメリュー・ジャパン，ベックマン・コールター），研究費・助成金（日本ベクトン・ディッキンソン，バイオメリュー・ジャパン，日立ハイテクノロジーズ，ベックマン・コールター）

文献

- 1) 柳原克紀：感染症検査法の進歩—MALDI-TOF MSと遺伝子検査を中心に—。臨床病理 64 : 942–953, 2016.
- 2) van Veen SQ, et al : High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol 48 : 900–907, 2010.
- 3) Ferreira L, et al : Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 48 : 2110–2115, 2010.
- 4) Kawamoto Y, et al : Performance evaluation of the MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance- β -Lactamase (MBT STAR-BL) assay for the detection of IMP metallo- β -lactamase activity in *Enterobacteriaceae*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2018. pii : S0732-8893 (18) 30217–7.
- 5) Morinaga Y, et al : Active Surveillance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using Fully Automated Molecular Test in an Emergency Medical Center. Jpn J Infect Dis 68 : 376–380, 2015.
- 6) Uno N, et al : Multicenter evaluation of the Verigene Gram-negative blood culture nucleic acid test for rapid detection of bacteria and resistance determinants in positive blood cultures. Diagn Microbiol Infect Dis 83 : 344–348, 2015.
- 7) Suzuki H, et al : Prospective intervention study with a microarray-based, multiplexed, automated molecular diagnosis instrument (Verigene system) for the rapid diagnosis of bloodstream infections, and its impact on the clinical outcomes. J Infect Chemother 21 : 849–856, 2015.
- 8) 日本感染症学会：多項目遺伝子関連検査の実施指針について。 http://www.kansensho.or.jp/guidelines/1804_sepsis.html
- 9) 柳原克紀，他：感染症遺伝子検査についてのアンケート調査結果。感染症誌 92 : 331–338, 2018.