

## 第 42 回日本小児感染症学会教育講演

侵襲性ならびに呼吸器系感染症の原因微生物検索  
—網羅的検索法へのパラダイムシフト—

生 方 公 子\*

## はじめに

筆者は、2000 年頃「肺炎球菌等による市中感染症研究会」によって収集される小児由来検査材料の細菌検索を担当していたが、その多くは侵襲性の少ない「上咽頭拭い液」であり、それらから原因微生物を推定せざるを得ない状況にあった。しかし、乳幼児の上咽頭には肺炎球菌やインフルエンザ菌が常在化していることが多く、このためグラム染色を施した検体の炎症所見を観察することにより、原因菌か否かを識別できないか検討を重ねていた。そのなかに、多数の菌が認められるにもかかわらず、線毛上皮細胞や単球と思える細胞が優位に観察され、しかもそれらの症例の WBC 値や CRP 値をみると、細菌感染を疑わせないものが多いことに気づいた。

細菌検査の妥当性が気になりつつも、筆者らはその時点では一般細菌以外を速やかに検索できる方法をもち合わせていなかった。しかし、この事象は、細菌とウイルスとが別々に検査されている現状を何とかブレイクスルーするため、「一般細菌以外の微生物についても、網羅的にしかも迅速に検索できる手法を確立したい」と考える大きなきっかけとなったのである。

本稿では、そのような視点で筆者らによって構築された網羅的迅速検索キットとはどのようなものであるのか、それをを用いた際の推定原因微生物の内訳はどのようになっているのかを中心に、将

来の感染症診断学のあるべき姿について述べたい。

## I. PCR 機器の発展と網羅的迅速法の確立

網羅的迅速法の構築を具体的に開始したのは 2003 年のことである。ちょうどその頃に、蛍光色素量を測定する PCR 機器が開発されたことが大きく寄与している。特に、蛍光色素が何種類か使用できること、蛍光色素をつけた probe を増幅された DNA に結合させてその発色量を測定するため検出の特異性が高まること、電気泳動が不要のため DNA 汚染が避けられるなどの点に注目した。

小児科領域において病原微生物を速やかに確定すべき感染症は、まず化膿性髄膜炎が疑われる症例（類似疾患を含む）であるが、症例数からいえば何といても入院を要する市中肺炎（CAP）例である。入院時における迅速検索のメリットは、原因微生物がどのような細菌であるのかが明らかになれば、最も適切な抗菌薬が選択でき、ウイルスのみと判明すれば抗菌薬の投与なしでも経過観察が可能となることである。試行錯誤を重ねた末に、小児と成人の CAP 例を想定して構築されたものが、タカラバイオ株式会社から網羅的検索用試薬キットとして市販されている細菌用（Code CY214）と、ウイルス用（Code CY216）の 2 種類である。

最近、世界的にも網羅的検索用としてキットが

\* 北里大学北里生命科学研究所病原微生物分子疫学研究室 Kimiko Ubukata  
〔〒 108-8641 東京都港区白金 5-9-1〕

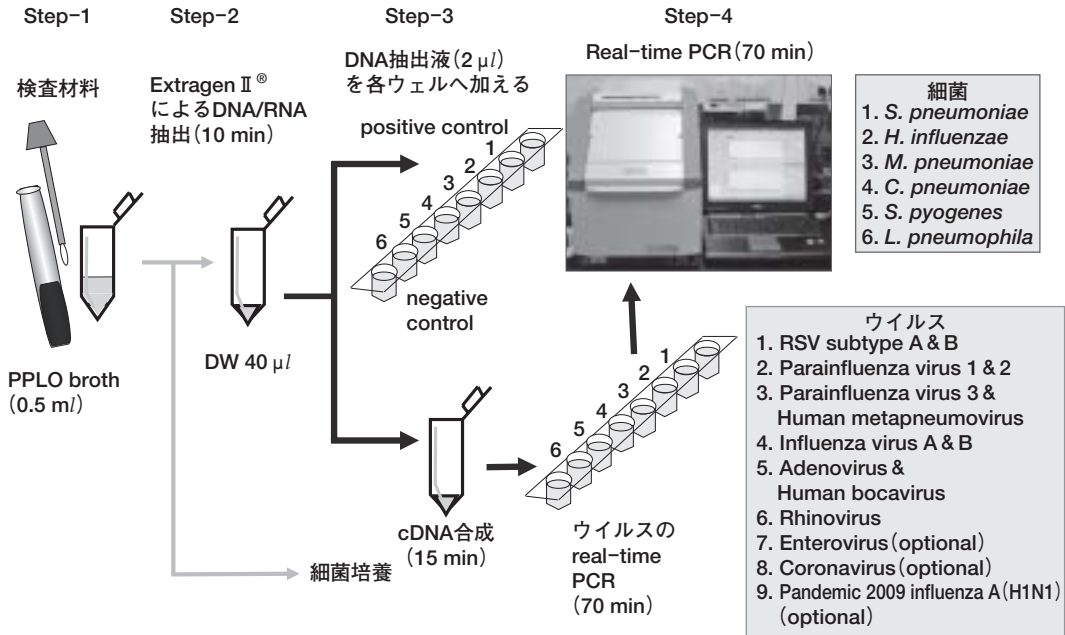


図 1 細菌/ウイルスの real-time PCR・プロトコール

いくつか開発されている<sup>1-3)</sup>。なかでも、筆者らと手法は異なるが、xTAG Respiratory Virus Panel FAST (RVPFast)<sup>® 2)</sup>は、本年に FDA の承認を取得している。18 種類と多くのウイルスを検索できるものの、増幅された DNA のパネルへのハイブリダイズ工程があるので、完全に自動化されないと増幅産物の汚染が生じることが懸念される。

## II. 網羅的 real-time PCR のプロトコール

図 1 には筆者らの構築した real-time PCR のプロトコールを示す。

検体からの核酸 (DNA/RNA) 抽出は、Extragen II キット (東ソー株式会社) で効率よく抽出でき、最後に 40 µl の核酸サンプルとする。細菌検索にはこの核酸サンプルを、試薬があらかじめ分注されたウェルへ 2 µl ずつ加え、直ちに PCR を実行する。ウイルス検索では 5 µl の核酸サンプルから逆転写反応を行い、cDNA を合成後 (キットにはこの試薬も含まれる)、ウイルス検索用試薬があらかじめ分注されたウェルへ 2 µl ずつ加え、PCR を実行する。

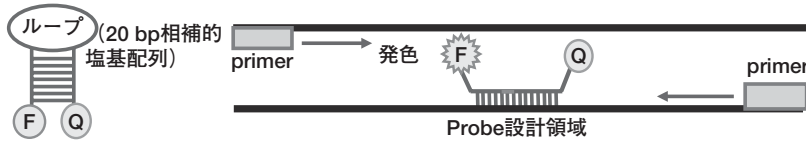
細菌は図中に示した菌種が検索できるが、*S.*

*pyogenes* (GAS) および *L. pneumophila* は他のレンサ球菌あるいはレジオネラ菌と区別するために、1 ウェル/2 遺伝子を検索している。*L. pneumophila* が検索対象に加えられているのは成人肺炎も対象としているためである<sup>4)</sup>。

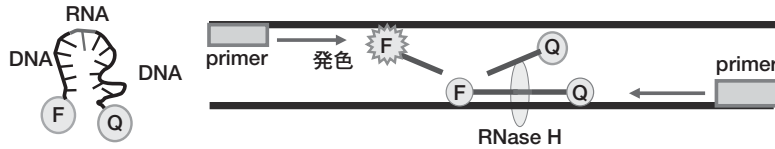
一方、ウイルスは RSV-A と RSV-B, influenza virus A と B のように、基本的に 1 ウェル/2 種類とし、キットでは 11 種検索できる<sup>5)</sup>。その他に、必要に応じて enterovirus, pandemic 2009 influenza A (H1N1) なども検索することが可能である<sup>6,7)</sup>。

図 2 に real-time PCR で用いる probe の設計と蛍光発色の原理を示した。パイロットスタディでは molecular beacon (MB) probe, キットでは RNA が挿入された chimera probe (cycling probe) が用いられている。いずれの菌種に対する probe も、増幅される DNA 断片内のさらに特異性の高い領域に結合するように設計されている。蛍光発色量は 1 サイクルごとに測定され、そのデータは接続されたパーソナルコンピュータ (PC) 内に蓄積されていく (図 1)。本法が従来の PCR 法と最も異なるのは、増幅される DNA 断片内部にさらに probe を結合させるため、結果の特異性が極め

## 1) Molecular Beacon Probe (30~35 bp)



## 2) Cycling Probe (12~15 bp)



蛍光物質：FAM (6-carboxyfluorescein), ROX (carboxy-X-rhodamine) など  
クエンチャー：BHQ-1 (black hole quencher 1) など

図 2 Real-time PCR 法の原理：プローブの設計と蛍光発色

て高いことである。

### III. Real-time PCR 法の感度と特異度

PCR における DNA 増幅は、標的遺伝子 1 分子から PCR がスタートしても、30 サイクル後には理論上  $10^9$ /チューブとなる。

ここにはそのデータは示さないが、10 倍希釈した細菌数を横軸、陽性シグナルが認められたサイクル数を縦軸にその相関をみると、どの菌種の検出感度も 10 コピー/ウェル、その陽性シグナルは 33~35 サイクルで認められる<sup>4)</sup>。

ウイルスに対する検出感度は、RSV-A と RSV-B の成績を図 3 に示す。RSV 検索の標的には F 蛋白遺伝子を選択しているが、当該遺伝子は大腸菌ベクターヘクローニングし、DNA 量を測定してコピー数を算出、その検出感度は 10 コピー/ウェルである。他のウイルスでも同様で、おおよそ 35 サイクルまでに陽性反応を示せば、該当するウイルスが検査材料中に存在すると判断できる。

筆者らは、ウイルスの検出感度ならびに特異度の裏づけとして、ウイルス検索専用スワブで採取された上咽頭拭い液から、PCR と並行して RSV (HEp2 細胞) および Pdm (H1N1) 2009 (MDCK 細胞) の分離培養を行っているが、前者では 32 サイクルで陽性、後者では 31 サイクルで陽性反応がみられたサンプルからウイルス分離ができている。

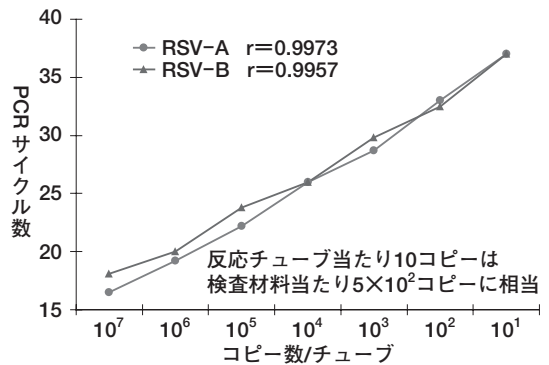


図 3 RSV-A と RSV-B (F 蛋白遺伝子) の検出感度

ウイルスは目的遺伝子大腸菌ベクターヘクローニングしてコピー数を算出。

今までに多数例を解析した結果に基づくと、real-time PCR で 30 サイクルまでに陽性反応が確認できたなら、当該ウイルスの関与を推定してほぼ差し支えない。しかし、それよりも遅い 31~40 サイクルでの陽性反応は、電気泳動などの何らかの手段で目的遺伝子の増幅であることを確認する必要のあることを強調しておきたい。

### IV. 肺炎例の解析

図 4 には胸部 XP によって肺炎と診断された 4 例の解析結果を示す。Real-time PCR 終了後に PC 内に蓄積されたデータである。A は肺炎球菌

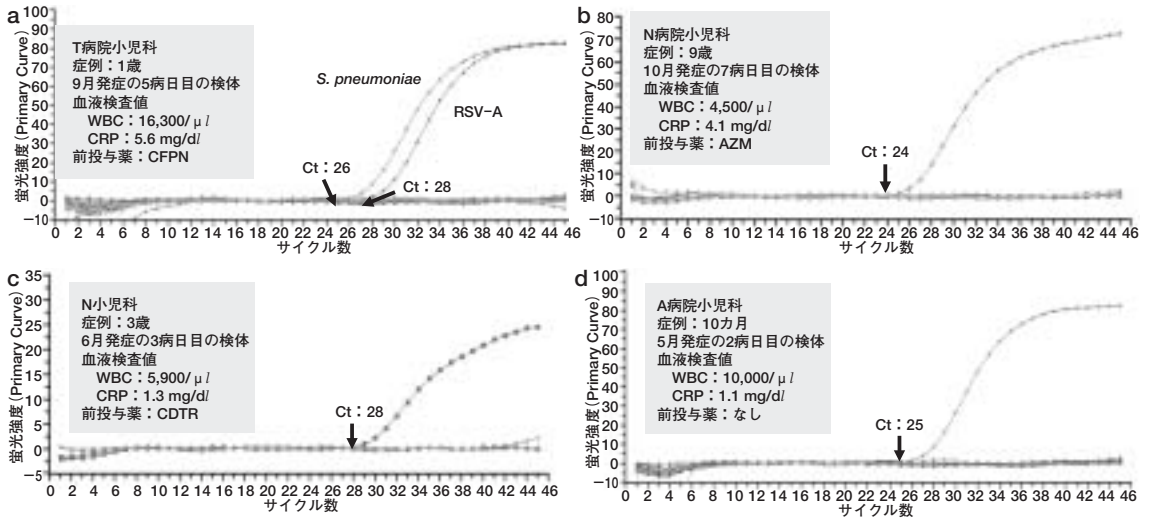


図 4 Real-time PCR 法を用いた網羅的迅速検索での陽性例の実際

a: RSV-A と *S. pneumoniae* b: *M. pneumoniae* c: Human metapneumovirus (hMPV) d: Human Bocavirus (HBoV)

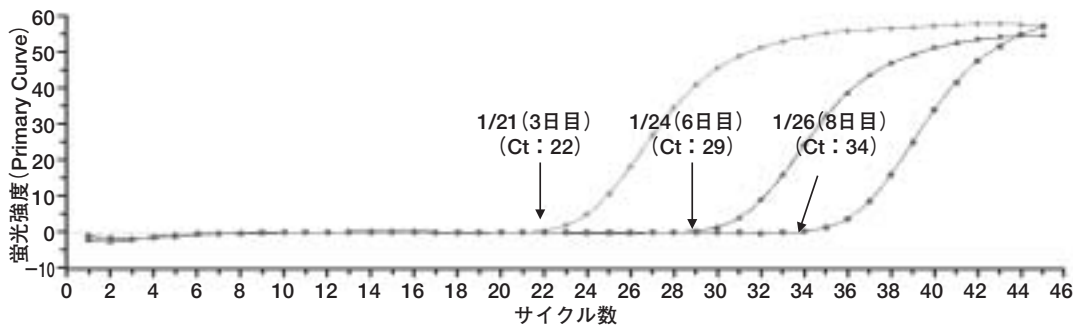


図 5 RSV-A 感染例における発症病日からの陽性反応の推移

と RSV の混合感染, B は肺炎マイコプラズマ, C は hMPV, D は HBoV による肺炎と推定される。このように検索に上咽頭拭い液を用いる場合, 非定型肺炎の原因であるマイコプラズマ, あるいはウイルスが明らかな陽性反応を示した場合は原因微生物と判断してほぼ間違いないが, 肺炎球菌やインフルエンザ菌は常在化している場合が多いので, 血液検査値 (白血球数, 好中球数, リンパ球数, そして CRP 値など) と併せた総合的な判断を要する。

なお, ウイルス検索では発症からの病日が重要で, 発症後 5 日を経過すると陽性率は急速に低下する。図 5 は発症日時から 3 回にわたって陽性反応の推移をみた成績であるが, 発症 6 日目までの

検査材料では RSV 陽性の判定とウイルス分離は可能であったが, 8 日目の検索ではウイルス分離は不可能であった。また, ウイルスには季節性や流行年があることはよく知られたこと<sup>5)</sup>で, 検索時にはそれらに対する考慮も必要となる。

また, 原因が細菌であると判断するには, 前投与薬の有無やその種類が菌量に大きく影響していることに留意する。特に, CTRX が outpatient antimicrobial therapy (OPAT) として使用された例では, PCR 陽性を示した細菌が真の原因であるのか否かの判断には慎重さが求められる。

## V. 入院肺炎例に対する多施設解析

筆者らは多施設参加の「ARD 研究会 (代表: 慶

應義塾大学医学部 岩田敏教授)」を組織し、今までに多数の入院肺炎例を解析してきている。その主たる目的は、本来無菌的でない検査材料である上咽頭拭い液を用いた場合、得られた PCR データをどのように解釈すれば原因微生物を間違いなく推定できるかにあった。

図 6 には 2005～2006 年にかけて、胸部 XP で肺炎と診断された症例のみに対し、real-time PCR と同時に細菌には培養を実施、さらに血液検査値と併せて最終的に原因微生物を推定した成績を示す<sup>5)</sup>。細菌とウイルスがほぼ同じ割合で、細菌では肺炎球菌、肺炎マイコプラズマ菌、インフルエンザ菌が多くを占める。ウイルスでは Rhinovirus (細菌との混合感染が多い)、RSV, hMPV, PIV が多いことが示されている。

肺炎や急性中耳炎を発症した場合、その原因微生物は上咽頭に存在するはずと考えているが、上述したように細菌は常在化している場合も多いので、ウイルスと同時に細菌陽性であった際には、混合感染か単なるコロナイズかの判断が必要である。

理論的には、real-time PCR によるデータが肺炎マイコプラズマ菌、肺炎クラミジア菌、各種ウイルスに明らかな陽性の場合には、それらをまず原因微生物と考え<sup>5,8)</sup>、その後肺炎球菌やインフルエンザ菌などの関与を判断する 2 ステップ解釈法が妥当ではないかと考えている。それには血液検査値が重要で、筆者らの今までの統計学的解析からは、① WBC が 13,000 cells/ $\mu$ l 以上であることと好中球が 6,000 cells/ $\mu$ l 以上の両方を満たしていること、② あるいは CRP が  $\geq 6.0$  mg/dl の場合、細菌関与が推定される (未発表データ)。

## VI. 化膿性髄膜炎疑い例の網羅的検索

図 7 には、臨床所見ならびに髄液細胞所見から細菌性髄膜炎が疑われ、担当医から筆者らの元へ精査依頼のあった髄液について、網羅的 real-time PCR と培養を並行して実施した成績である。成人例も含めて 3 年間で 168 例が解析されている<sup>9)</sup>。

小児と成人を対象とし、結核菌と真菌を除いた一般細菌による化膿性髄膜炎の 90% の原因菌を

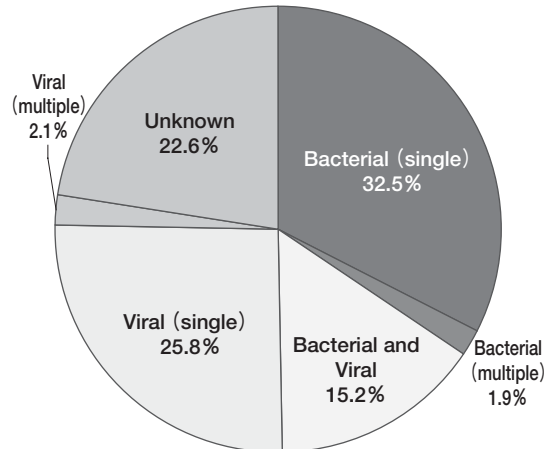


図 6 小児肺炎例における原因微生物の内訳

### 細菌の内訳

1. <i>S. pneumoniae</i>	24.4%
2. <i>M. pneumoniae</i>	14.8%
3. <i>H. influenzae</i>	11.3%
4. <i>C. pneumoniae</i>	1.4%
5. <i>S. pyogenes</i>	0.1%

### ウイルスの内訳

1. RV	14.5%
2. RSV-A & -B	9.4%
3. hMPV	7.4%
4. PIV-1, -2, 3	7.2%
5. HBoV	2.9%
6. ADV	1.8%
7. Other	2.2%

(文献 5) より引用)

明らかにしたいと考えると、①肺炎球菌、②インフルエンザ菌、③大腸菌、④B群溶血性レンサ球菌 (GBS)、⑤髄膜炎菌 (*N. meningitidis*)、⑥リステリア菌 (*L. monocytogenes*)、⑦黄色ブドウ球菌、⑧マイコプラズマ菌 (*M. hominis* 含む) の同時検索が必要である。手法は先に述べた肺炎例と基本的に同じであるが、肺炎球菌やインフルエンザ菌の陽性反応が強ければ、さらに同一 DNA 抽出液を用いて PCR による耐性遺伝子検索が実行でき、遺伝子レベルでの感性/耐性が 3 時間以内

に明らかにできる。ちなみに、依頼検体全体では、莢膜 b 型インフルエンザ菌の陽性例が圧倒的に多く、次いで肺炎球菌となっていたが、その他としたなかに 3 カ月未満の GBS 例が 4 例、大腸菌が 3 例、リステリア菌と肺炎マイコプラズマ菌が各 1 例含まれていた。

対象とした化膿性髄膜炎例ではその約半数に注射薬が投与されていた。それらでは前投与薬なしの例に比べ、肺炎球菌の陽性率は明らかに低く、

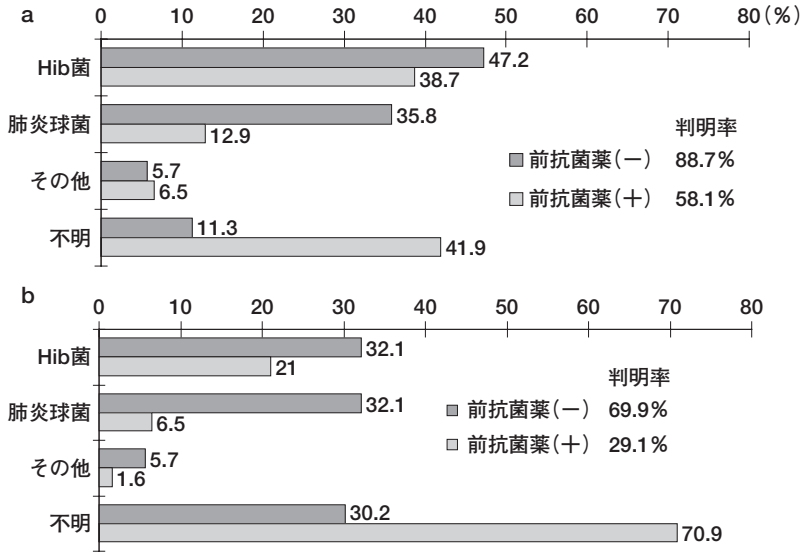


図7 化膿性髄膜炎疑い例に対する real-time PCR による網羅的迅速検索  
a: Real-time PCR b: 培養 (文献9)より引用)

抗菌薬の影響を受けやすいことが示されている。抗菌薬の前投与がなければ real-time PCR では不明が 11.3% となり、原因菌判明率は 88.7% と算出される。しかし、すでに注射用抗菌薬が投与されていた場合には、PCR といえども判明率は 58.1% と低下する。

同一検体に対して実施した培養による原因菌判明率はさらに劣り、抗菌薬の前投与なしでも判明率 69.9%、抗菌薬が使用されていれば 29.1% と極めて低い。

### まとめ

微生物検査をとりまく課題は山積している。最も根本的なことは、細菌検査が依然として時間を要する培養に依存していること、ウイルスの迅速キットも限られていることである。

そのこともあって各種ガイドラインが作成され、臨床所見から empiric therapy としての抗菌薬が推奨されている<sup>10)</sup>。しかし、今後はガイドラインの推奨する抗菌薬、あるいは原因微生物の推定は、確実に進歩している網羅的迅速検索法を積極的に採り入れた多施設解析によって検証していく必要がある。

原因微生物が短時間で明らかにされれば、治療

をスムーズに行うことができ、結局は患者自身のため、ひいては医療経済上のメリットは大きいと確信する。Real-time PCR 法を含む網羅的な検索手法はすでに診断ツールとして実用段階に入っているが、簡便化された操作ゆえ、PCR 理論とその操作に対する基礎知識をマスターして慎重に解釈しなければならない。なぜなら、現段階では研究用試薬キットであるが、診断に直結するからである。

### 文献

- 1) Mahony J, et al: Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol* 45: 2965-2970, 2007
- 2) Pabbaraju K, et al: Comparison of the luminex xTAG respiratory viral panel with xTAG respiratory viral panel fast for diagnosis of respiratory virus infections. *J Clin Microbiol* 49: 1738-1744, 2011
- 3) Stevenson JB, et al: A novel capillary electrophoresis-based multiplex PCR assay for detection of respiratory pathogens. *Ann Clin Lab* 41: 33-38, 2011

- 4) Morozumi M, et al : Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. *J Clin Microbiol* 44 : 1440-1446, 2006
- 5) Hamano HK, et al : Comprehensive detection of causative pathogens using real-time PCR to diagnose pediatric community-acquired pneumonia. *J Infect Chemother* 14 : 424-432, 2008
- 6) Hasegawa M, et al : Spontaneous pneumomediastinum complicating pneumonia in children infected with the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. *Clin Microbiol Infect* 16 : 195-199, 2009
- 7) Hasegawa M, et al : Pandemic (H1N1) 2009-associated pneumonia in children, Japan. *Emerg Infect Dis* 17 : 277-280, 2011
- 8) Nakayama E, et al : Rapid optimization of antimicrobial chemotherapy given to pediatric patients with community-acquired pneumonia using PCR techniques with serology and standard culture. *J Infect Chemother* 13 : 305-313, 2007
- 9) Chiba N, et al : Rapid detection of eight causative pathogens for diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. *J Infect Chemother* 15 : 92-98, 2009
- 10) 小児呼吸器感染症診療ガイドライン作成委員会 : 小児呼吸器感染症診療ガイドライン 2011, 協和企画, 東京, 2011

\* \* \*