



講演 2 臨床微生物検査の今後の展望

— 三大技術革新と患者診療への貢献 —

微生物の検査機器は自動化が進み、臨床現場に取り入れられている。微生物の同定方法には複数あり、それぞれの方法には限界があって完璧ではないのと同様に、自動機器も細菌の同定には機器を扱う検査技師のテクニックやノウハウ、スキルが求められる。本稿では、自動機器の仕組みやその活用方法について解説するとともに、検査結果が日常診療にどのように貢献しているかを紹介する。

10年を振り返って

講演 1

講演 2

講演 3

講演を終えて

語句解説

COMO開催
事務局後記

最新トピックス

連載
ダイエット

検査と私

医の提言

徒然なるままに。

キーワード

微生物検査の“三種の神器”，質量分析計，MALDI-TOF MS，マトリックス，*Helicobacter cinaedi*，*Campylobacter fetus*，PCR



おおくす きよふみ

大楠 清文

岐阜大学大学院医学系研究科
准教授

微生物検査の機器・装置

感染症の原因となる微生物には細菌，真菌，ウイルス，原虫などがあります。原因となる微生物を同定することは，感染症の適切な治療選択という点で非常に重要で，臨床症状が特徴的であれば病原体は比較的容易に同定・推定できることがあります，そうでないこともあります。

微生物検査における“三種の神器”，それは菌や検体を培地に塗る際に用いる「白金耳」，微生物の存在を確認したり染色した際に使用する「顕微鏡」，菌の培養に必須の「培地」と言えるのではないのでしょうか。これらの装置・機器が感染症の診断・治療に大きな貢献を果たしてきたことは言うまでもありません。

微生物検査では，これらの機器や装置を使用して微生物を「見える化(可視化)」するのですが，それには4つの方法があります(図1)。1つ目は染色(色分け)して，顕微鏡で拡大する方法です。

2つ目は培地により環境を整えて育てる方法，すなわち培養です。3つ目は抗原抗体反応を利用して病原菌の成分(抗原)と反応させる方法。4つ目はDNAを増幅する方法です。DNAの大きさは2nm ($2 \times 10^{-9}m$) ですが， 10^9 倍に増やすことで「見える化」が可能になります。これらの技術を

図1 細菌を「見える化」する技術

① 染色(色分け)して顕微鏡で拡大

② 環境を整えて育てる(培養)

③ バイ菌の成分(抗原)と反応させる

④ DNAを増やす
DNAの大きさ2nm ($10^{-9}m$)
↓
10⁹倍に増やす
見える!

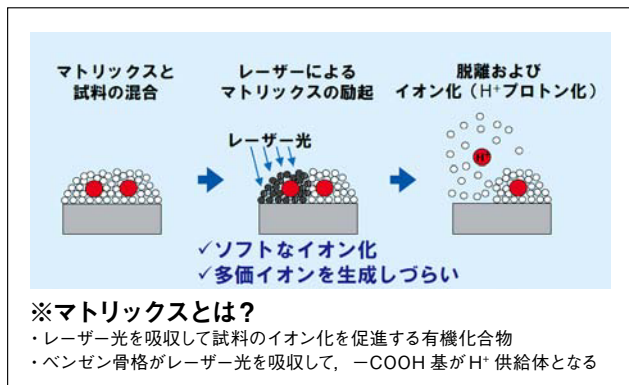
活用し、さらに発展させた検査装置として自動機器が開発されました。

質量分析計による菌の同定

菌の同定とは、分離された菌株の性状について、既に判明している菌種の情報データベースの中から最も近いものを選び出すことを意味し、その方法には、集落の性状、染色性、形態や配列、同定キット、自動機器の数値、免疫血清学的反応、遺伝子学的な解析、蛋白質の分析などがあります。そして、蛋白質を分析する機器が質量分析計で、臨床微生物検査を革新的に進化させた自動機器と言えます。ちなみにこの「質量分析計」に加えて「自動同定感受性機器」、「遺伝子検査機器」の3つが微生物検査の中でも特に革新的なものといえます。

質量分析計を使用する方法は遺伝子ではなく、例えばMALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) は、試料に含まれている蛋白質の成分を質量の違いにより分析するものです。これには3つのステップがあります。試料をイオン化する(ステップ1)、そのイオン化した蛋白質を分離し、飛ばす(ステップ2)、イオン化した蛋白質は質量によって飛ぶ距離が異なるため、飛距離の遠近により分類する(ステップ3)です。蛋白質をイオン化させる方法は2002年にノーベル賞

図2 マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI)



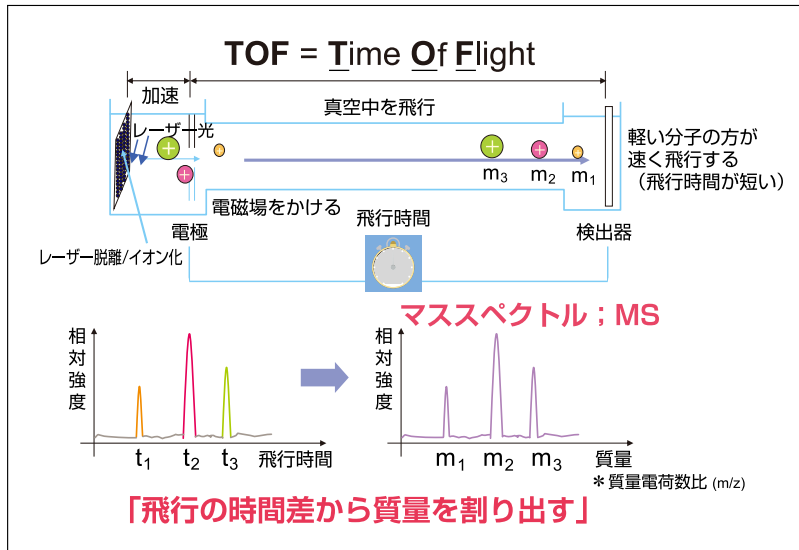
を受賞した田中耕一さんが発明しました。蛋白質は酸化しにくいという性質があるため、イオン化には高エネルギーが必要になります。しかし、エネルギーの高いレーザーを直接当てると分解してしまうことから、マトリックスと呼ばれる有機溶媒を試料に混合することで、レーザー光線がマトリックスにより吸収され、蛋白質をイオン化することが可能になります(図2)。マトリックスとはレーザー光線を吸収する有機化合物で、蛋白質のイオン化を促進します。

イオン化した蛋白質は真空中で飛ばされますが、小さい分子は大きい分子よりも先に飛行先にある検出器に到達します(図3上)。この飛行時間の差から質量を換算し、質量と相対強度をグラフ化したものがマススペクトルで、このマススペクトルのパターンにより菌種を同定するので(図3下)。

大腸菌のマススペクトルを例にすると、大腸菌をそのままマトリックスと混ぜてイオン化し、飛ばして分析した結果について横軸に質量、縦軸に強度を取ってグラフ化します。これを大腸菌のデータとしてデータベースに登録し、以後、検体から得られたマススペクトルのパターンが一致した場合は大腸菌と同定されます。データは毎年、更新されます。

ただし、質量分析計で測定している蛋白質は主にリボゾームであるため、16S rRNA 遺伝子の検査で同定が難しいものは質量分析計でも困難です。従って、例えば肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) と *Streptococcus mitis* の鑑別は困難になります。しかし、この二つの鑑別には、コロニーを直接見て陥没の有無を確認することで可能です。また、分類学上の問題になりますが、大腸菌 (*Escherichia coli*) と赤痢菌 (*Shigella sonnei*) も鑑別できません。ですから、質量分析計を使用すればあらゆる細菌と真菌が同定できると誤解している方がいるようですが、どんな菌種でも同定できるわけではなく、人間の目、経験、知識、ノウ

図3 飛行時間型によるイオンの分離 (TOF)



ハウが必要な分野であるということに変わりありません。

質量分析法は、コロニーからの菌同定だけではなく、血液培養で陽性と判明した時点で前処理して測定可能です。こうすれば1時間以内に70～80%の精度で同定できます。臨床医の中には時間をかけても100%に近い正確なデータが欲しいという先生もいれば、70～80%の精度でいいので早くデータをもらって、その日のうちに感受性のある抗菌薬を選択したいという先生もいます。提供するデータは臨床医と相談し、病院ごとに方針を決めることが望ましいと思います。ただし、質量分析法で同定すると、先に菌名を返却するので、後で感受性データから菌種の妥当性を判断することができなくなることに留意する必要があります。

MALDI-TOF MSによる同定の特徴としては、迅速、安価、簡便という点が挙げられます。ただし、抗酸菌やノカルジア [P38参照]、真菌、酵母様真菌の一部は同定できますが、データベースに登録されていない菌種は同定できません。また、質量分析には $10^4 \sim 10^5$ /mL以上の菌量が必要になるため、直接血液からの同定は難しい状況です。一方、尿や髄液を検体とする場合には、直接菌種の

同定が可能な場合があります。

検体内に複数の細菌が混在しても同時に同定が可能です。2菌種が4対1以下あるいは5対1以下であれば、2菌種がそのまま同定できます。最も同定が難しいと思われる嫌気性菌、放線菌、抗酸菌についてもデータベースに登録が進んでおり、年々充実しています。データベースは刻々と変化しているのでデータの比較には注意が必要です。

また、毒素の検出や薬剤耐性菌の鑑別も一部進んでおり、今後はMRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) やMDRP (多剤耐性緑膿菌) など耐性菌

の同定についても検討されると思うので、検査室ではこれを踏まえたワークフローの最適化を考えることが必要になってくると思われます。

同定が困難な3菌種

次に、細菌の中でも同定が難しく解析依頼の多い3菌種を取り上げ、同定する際の注意点について述べたいと思います。

< *Helicobacter cinaedi* >

1つ目は*Helicobacter cinaedi*で、私は“シナジーちゃん”という愛称を付けています。ヒトの腸管内に常在し、培養に4～10日かかるグラム陰性のらせん菌で、糞便からも時々検出されます。鞭毛による遊走性があり、培地上に薄くフィルム状の発育が認められます。培養に10日かかることもあるので、培養期間が5日や7日の検査機関では見逃している可能性があり注意が必要です。

“シナジーちゃん”は敗血症の原因菌となり、悪性腫瘍で化学療法中の患者さんや透析患者さんに多くみられます。臨床症状として発赤や蜂窩織炎があり、院内感染の事例も報告されています。各種抗菌薬への感受性は良好です。菌種の同定には患者背景を知ることがまずは重要で、発赤や蜂

10年を振り返って

講演 1

講演 2

講演 3

講演を終えて

語句解説

COE 開催事務局後記

最新トピックス

連載 たいエット

検査と私

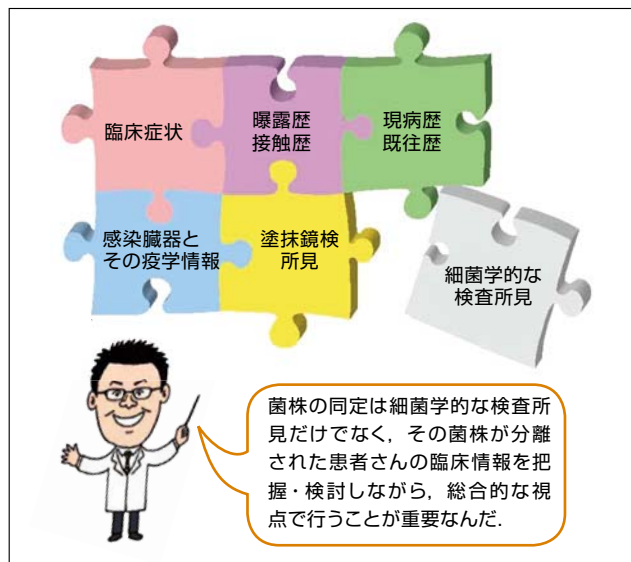
医の提言

徒然なるままに。

臨床微生物検査の今後の展望

— 三大技術革新と患者診療への貢献 —

図 4 臨床細菌学的な思考に基づく同定の概念



窩織炎といった臨床症状がみられないか確認することが大切です。

菌種を同定するための情報は多い方が望ましいと考えます(図4)。情報の1つ1つがジグソーパズルのピースだと考えて、全体のピースをそろえるように生化学的性状や患者さんの臨床症状、グラム染色の様子や細菌の形態など、さまざまな角度から細菌・感染症の情報を収集し、トータルで菌種を同定する必要があると考えます。

< *Campylobacter fetus* >

2番目の菌はイヌやネコの口腔内にいる *Campylobacter fetus* で、愛称“カニモックくん”です。イヌ・ネコの80～90%が口腔内に保有しており、グラム陰性桿菌で紡錘形のような形をしており、二酸化炭素要求性があるので滑走能を示します。イヌに咬まれた時に思い浮かべるのは狂犬病 [P38 参照] ですが、国内では1957年以来、海外渡航者が帰国後に発症した3例を除いて発症していません。 *C. fetus* の抗菌薬に対する薬剤感受性は概ね良好ですが、致死率は約30%と高いです。

“カニモックくん”に感染した症例を分析すると、基礎疾患として糖尿病やアルコール依存症を有する人、また、過去に脾臓の摘出術を受けた人、あ

るいは高齢者に多くみられますが、これらに該当しない人にも感染します。例えば今、ペットブームでイヌやネコを飼っている方が多いので注意が必要です。

では、64歳男性の症例を紹介します。敗血症で多臓器不全になり、両足切断となりました。11月15日に自転車で転倒し、顔面と両肘を打撲。17日頃から打撲部を中心とした紫斑が目立ち始め、18日には無尿となり、救急センターに転院しました。感染病巣が不明な状態だったものの、敗血症による多臓器不全と考え、治療を開始しました。主治医は当初、転倒により土中の微生物が傷口から入った感染症だろうと考えました。原因菌の検索を行ったところ、入院時の血液培養から *Campylobacter fetus* sp. が検出されたため、担当医に「イヌかネコに咬まれていると思います」と報告しました。患者さんに改めて問診すると、14日に飼いイヌに左手を咬まれていました。やはり、菌は嘘をつきません。

“カニモックくん”の同定には、敗血症、DIC、電撃性紫斑病の病態においてイヌ・ネコに咬まれたかを真先に確認することが重要です。

< *Campylobacter fetus* >

3番目の菌は *Campylobacter fetus* で、愛称は“ふいー太くん”です。グラム陰性のらせん菌で、血液、髄液、膿汁から分離され、敗血症、髄膜炎、大動脈瘤を引き起こします。生レバーや鶏刺しの摂食によって感染症を引き起こす場合があります。

妊娠後期に貧血改善のために生レバーを食べたことから、数日後に赤ちゃんが新生児髄膜炎になって早産で生まれたという症例がありました。また、ステロイドを服用しているにもかかわらず、生肉が好きで定期的にユッケを食べたため、髄膜炎を2回、敗血症を1回発症しているという患者さんもいます。生レバーは嗜好品なので厚生労働省による禁止は不適切であるという意見もありますが、このような事例がある以上、禁止はやむを得ないし、少なくとも妊婦は絶対に生肉を食べて

はいけないと考えます。

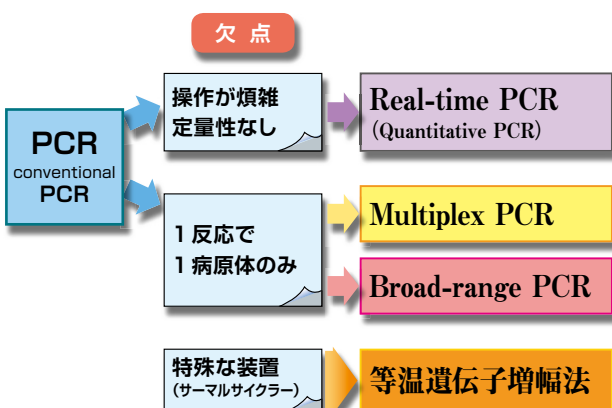
“ふいー太くん”の同定でも、患者背景を知ることが重要です。感染性大動脈瘤や蜂窩織炎はなにか、妊婦さんや免疫抑制剤を投与中の患者さんが生肉を食べていないかなどの確認が非常に大事です。

遺伝子検査の現在

遺伝子検査は5つのステップから成り立っています。①検体の採取および搬送、②核酸の抽出（DNA/RNAの抽出）、③増幅反応、④増幅産物の検出、⑤結果の解釈および報告です。遺伝子の増幅法にはPCR（Polymerase Chain Reaction）という方法があり、従来から実施されていることからconventional PCRとも呼ばれています。PCRには図5に示すように操作が煩雑な上に定量性がない、1反応で1病原体しか検査できない、反応溶液の温度を正確に上昇、下降させる必要があるためサーマルサイクラーという特殊な装置が必要などの欠点がありました。現在では次のように改善されています。

例えば、定量できなかった点はReal-time PCRという検査方法により可能となり、反応の途中で陽性が分かるようになりました。増幅物の一般的な検出方法はゲル電気泳動法ですが、Real-time PCRは蛍光物質を一緒に加えることで検出結果を

図5 PCRの欠点とその改善

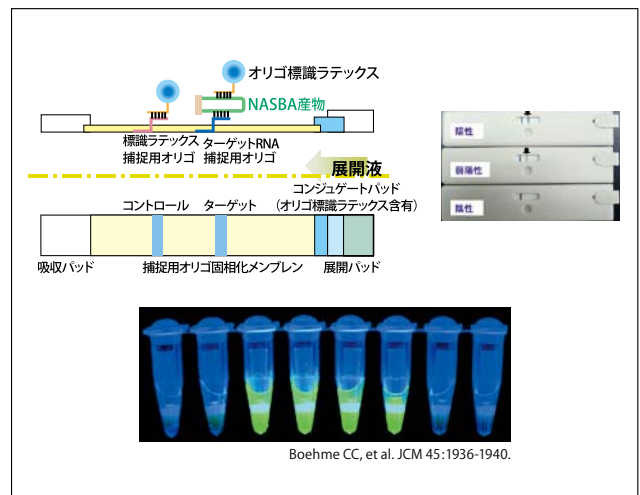


リアルタイムに、そして定量的に確認できます。マイクロチップを使用するタイプの検出機器にはMultiNAがあります。蛍光マイクロビーズアレイによる検出方法もありますが、臨床検査の分野ではまだまだ活用されていないようです。どちらかと言うと、いわゆるフローサイトメトリー[P38参照]のような原理に基づく検出法になります。

1反応で1病原体しか検査できなかった点は、近年、Multiplex PCRによって、可能性のある病原体を5種類、10種類、20種類と同時に検査できるようになりました。また、1対のプライマー[P38参照]であらゆる細菌もしくは真菌を検出できるBroad-range PCR法も活用されるようになっています。

そして、PCR法においてサーマルサイクラーという特殊な装置が必要だった欠点については、等温遺伝子増幅法により、孵卵器があれば等温で遺伝子を 10^9 倍に増幅できるようになりました。等温遺伝子増幅法の産物検出法には、核酸クロマトグラフィーがあり、これはイムノクロマトグラフィー法と同じ原理で検出されます(図6上)。また、LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法による増幅後に、蛍光の有無により目視で陽性・陰性を簡便に判定する検出法もあります(図6下)。LAMP法は抽出法も工夫されており、フィルター

図6 等温増幅法の産物簡易検出 (核酸クロマトグラフィー&蛍光目視判定)



10年を振り返って

講演 1

講演 2

講演 3

講演を終えて

語句解説

COVID-19開催事務局後記

最新トピックス

連載ダイエット

検査と私

医の提言

ままだに。徒然なる



を使ってDNAを5～10分で簡単に抽出でき、増幅効率が高いため反応時間は40分と短いです。例えば、インキュベーターで95度に加熱した後、67度で40分反応させると、結核菌の有無が確認できます。

日常検査での遺伝子検査の実際

それでは、日常検査において遺伝子検査を活用している5つのケースを紹介します。①抗菌薬を投与中もしくは投与後であるため、培養しても陽性にならないケース、②細菌感染が疑われたけれども培養は陰性、③染色鏡検では確認できるが、培養で確認できない、④抗菌薬治療に全く反応しない、⑤リケッチア、ウイルス、真菌、原虫による感染症です。

① 抗菌薬を投与中もしくは投与後であるため、培養しても陽性にならないケース

症例1 細菌性心内膜炎の患者さんで、疣贅の検体からグラム陽性菌は確認されたのですが、既に抗菌薬が投与されていたため培養しても何も検出されませんでした。このような場合、先ほど紹介したBroad-range PCRで検査を行います。この検査方法では、細菌に共通している16S rRNA領域を増幅するため、あらゆる細菌の増幅が可能です。全種類の細菌において16S rRNAを登録することが一般化されており、新種についても登録されます。16S rRNA遺伝子配列を決めて、相同性をみれば菌種を決めることができます。細菌だけでなく真菌でも、ITSや26S rRNA領域、D1/D2領域[P39参照]を増幅すれば同定が可能になります。この症例では、解析の結果、*Streptococcus mutans*と同定され、口腔内細菌が侵入して疣贅に付着していたことが推察されました。

症例2 急性感染性心内膜炎となった20歳の男性で、疣贅の遺伝子検査を実施した症例です。僧帽弁閉鎖不全症、感染性脳梗塞・脳腫瘍・感染性脳動脈瘤、両側腎梗塞を併発した、アトピー性皮

膚炎もある男性でした。アトピー性皮膚炎だけであれば黄色ブドウ球菌の可能性が考えられます。また、この患者さんは直近に歯科処置をしていたので、*Streptococcus*も考えられました。疣贅から得られた検体を検査した結果、*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)と同定できました。そして、次に黄色ブドウ球菌を確認するためにコアグラマーゼ遺伝子の検出を実施したところ陽性でした。治療方法に直結することから耐性遺伝子*mecA*を検査した結果、保有はしていませんでした。これらの結果からMSSA(メチシリン感受性黄色ブドウ球菌)の可能性が高いことを臨床医に報告。バンコマイシン、ゲンタマイシン、セフトリアキソンの3剤を投与していましたが、MSSAと判明したことから、セフトリアキソン単剤に変更となり、脳膿瘍の手術も計画されていましたが経過良好で中止になりました。原因菌が判明したことによって患者さんが受けた恩恵は計り知れないという礼状を医師からいただき、私としても記憶に残る症例となりました。

症例3 41歳男性で髄膜炎を起こした症例です。染色鏡検と細菌培養は陰性で、髄液の遺伝子検査により*Streptococcus constellatus*と同定しました。通常この細菌は髄膜炎の原因菌とはならないので、担当医に「慢性中耳炎を患っているのではないか」、「破壊像があるのではないか」と問い合わせをしましたが、医師は否定的でした。しかし、治療して3ヵ月後、再び髄膜炎で病院に搬送されたのです。

さらに検査したところ、中耳に骨溶解があり、耳と髄腔がつながっており、髄液から再度*S. constellatus*が同定されました。中耳の基礎疾患をしっかり治療しないと繰り返し髄膜炎を起こすという経験をした症例でした。

② 細菌感染が疑われたけれども、培養は陰性というケース

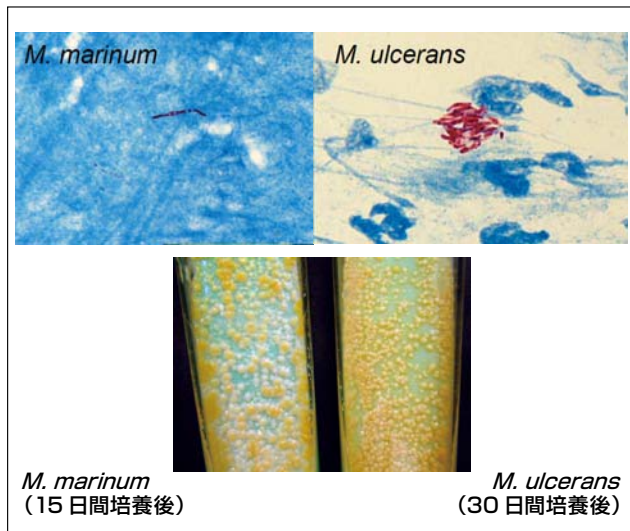
症例 日齢0日の男児で多呼吸および呻吟を主訴としていました。羊水が緑白色に混濁しており、好中球を多く認めたのですが、細菌が検出されず

遺伝子解析を実施しました。新生児ですから髄膜炎の原因菌として大腸菌，リステリア菌 [P39 参照]，GBS [P39 参照] を疑って検査を行いました，全て陰性で，細菌全般を対象にした PCR を実施したところ増幅されたためさらに解析しました。その結果，梅毒トレポネーマと同定され，先天梅毒ということでペニシリン投与により治癒となりました。

③ 染色鏡検では確認できるが，
培養で確認できないケース

症例 最も多いのは抗酸菌です。73歳の男性で，右耳介に潰瘍性の結節がありました。チール・ネルゼン法で染色すると菌が確認できるのに，培養するとコロニーを形成しないため，膿汁の遺伝子解析を行いました。その結果，*Mycobacterium ulcerans* による Buruli 潰瘍 [P39 参照] と判明しました。無痛性と言われていますが，日本の場合は有痛性が多いようで，熱帯地方の子どもが犠牲になる潰瘍です。*M. ulcerans* は小川培地で培養しますが 35 度ではコロニーは形成されないので 25 度に変更する必要があります。遺伝子検査により原因菌が分かると，細菌を確認するための培養試験の条件も最適なものに変更して検査を進めることができます。

図7 *M. marinum* と *M. ulcerans*



M. ulcerans は *M. marinum* と非常に似ていますが，*M. ulcerans* は染色鏡検では集塊状で見られ，培養期間は約 30 日，コロニーの色は黄色であるのに対し，*M. marinum* は染色鏡検では単体で見られ，培養期間は約 15 日，コロニーは最初は白色ですが徐々に黄色になるという違いがあります。このような違いを知っていれば，推定できると思います (図7)。

④ 抗菌薬治療に全く反応しないケース

症例 24歳の男性で，劇症型の肺炎により入院5日目に検査を行いました。非定型肺炎を疑い原因菌を検査したところ，*Mycoplasma pneumoniae* でした。夜中でしたが検査結果を報告し，病棟では当直医がミノサイクリンの投与にすぐ変更しました。実は，入院5日目から認められていた肝機能低下が，異型肺炎によるものか，薬剤性なのか判別できていなかったため，検査結果によって自信を持ってミノサイクリンを投与できたそうです。早い診断が患者さんの適切な治療へ与える影響は非常に大きいという一例だと思います。

⑤ リケッチア，ウイルス，真菌，原虫による
感染症のケース

症例1 62歳の女性で，紅斑，高熱，刺し口があり，検体として血液と痂皮の両方が届けられました。島根県の方だったため，西日本に多く発症する日本紅斑熱が疑われ，痂皮から DNA を抽出したところ，リケッチア (*Rickettsia japonica*) が増幅され，日本紅斑熱 [P39 参照] の診断となりました。血液の検体からは検出されませんでした，リケッチアの診断にも遺伝子検査は活用できます。

症例2 31歳の男性，AIDS の患者さんで脳膿瘍により入院しました。入院時にはトキソプラズマ IgG が 620 IU/mL と高値で，開頭手術時に採取されたゼリー状血液を PAS 染色したところ陽性でした。エイズ治療薬研究班の薬剤供給によりトキソプラズマの治療薬 (ピリメタミン，スルファジア

返って 10年を振り

講演 1

講演 2

講演 3

講演を 終えて

語句解説

COMO 開催 事務局後記

最新 トピックス

連載 タイエット

検査と私

医の提言

徒然なる ままに。

臨床微生物検査の今後の展望
— 三大技術革新と患者診療への貢献 —



ジン)を投与していましたが、症状悪化により瞳孔反射もなくなっていました。検体としてゼリー状膿汁が送付されてきました。トキソプラズマを疑い遺伝子検査を行いました。検出されませんでした。ところが、同時に真菌および原虫を疑い遺伝子検査を実施したところ増幅が見られたのですが、真菌とは異なる位置に検出されたためさらにシーケンス解析を行った結果、赤痢アメーバと同定されました。その後、治療薬はメトロニダゾールに変更され、患者さんは回復されました。

臨床検査技師の任務

私が考える臨床微生物検査の三大原則は次の通りです。

1. 菌は嘘をつかない。

人間は嘘をつくこともありますが、菌は絶対に嘘をつきません。

2. 3Yな仕事である。

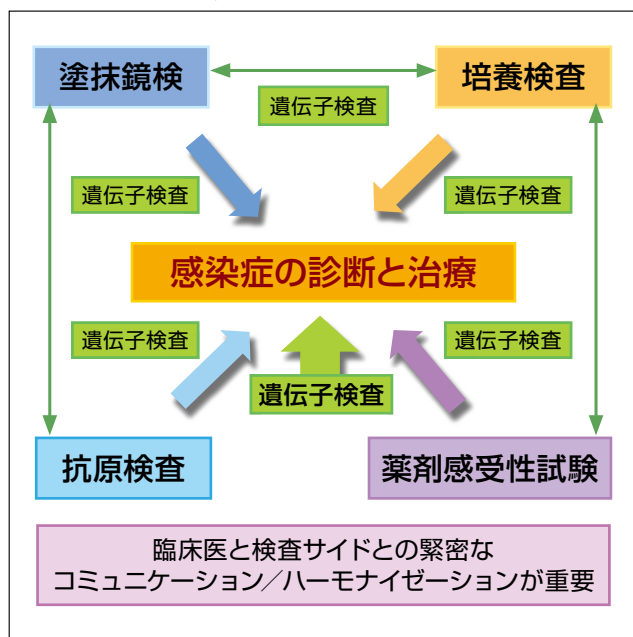
臨床微生物検査の仕事を3K(汚い、きつい、危険)と思う方もいるかもしれませんが、私は3Y(やりがいのある、役に立つ、やみつきになる)だと思います。

3. 検体が自分の最も大切な人、お父さん、お母さん、子どものものだと思って検査する。

例えば、自動機器や血液培養で陽性と判明したのが17時であっても、自分の大事な人の検体だったら帰宅せずに検査を続行するのではないのでしょうか。そのような心構えで検査を行うことが大事だと考えます。

図8に示すように、感染症の診断と治療には、「塗抹鏡検」「培養検査」「抗原検査」「薬剤感受性試験」の4本柱があり、遺伝子検査はこれらの隙間を埋める重要な検査と言えます。臨床検査技師は医師と協力して患者さんの治療を行う重要な仕事に就いているという自覚をもって、医師とのコミュニケーションを緊密にとりながら診断や治療に寄与することが非常に重要と考えます。

図8 感染症の診断と治療における遺伝子検査の位置付け



略歴 大楠 清文 (おおくす きよふみ)

1987年 東京医科歯科大学医学部附属臨床検査技師学校 卒業
虎の門病院臨床化学検査部
(1992年 東京理科大学理学部第Ⅱ部化学部 卒業)
1994年 千葉県こども病院検査科
(2001年 杏林大学大学院保健学研究科 保健学博士号修得)

2001年 南カルフォルニア大学臨床医学検査講座&ロサンゼルス小児病院ポスドクリサーチフェロー
2003年 岐阜大学大学院医学研究科 病原体制御学分野 助手
2006年 岐阜大学大学院医学系研究科 病原体制御学分野 助教授
2007年 岐阜大学大学院医学系研究科 病原体制御学分野 准教授
現在に至る

10年を振り返って

講演 1

講演 2

講演 3

講演を続けて

語句解説

FORUM 開催 事務局後記

最新 トピックス

連載 ダイエット

検査と私

医の提言

徒然なるままに。