

Topics 2

診 断

—診断法における新しい展開と
方向性は？—

舘田 一博

要旨：呼吸器感染症の原因病原体は一般細菌，抗酸菌，ウイルスに加え，真菌，マイコプラズマ，クラミドフィラまで多岐にわたることが特徴である。遺伝子診断法，免疫クロマト法など新しい診断技術が応用されているが，それでも原因がわからない呼吸器感染症が多数存在することを，改めて認識する必要がある。本稿では multiplex PCR 法，LAMP 法などの遺伝子検査の呼吸器感染症への応用に加え，最近認可されたマイコプラズマ迅速診断法の特徴，さらに中・長期的な視点でみた呼吸器感染症診断法の開発の方向性について概説する。

キーワード：免疫クロマト法，Multiplex PCR 法，LAMP 法
Immunochromatography method, Multiplex PCR,
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

連絡先：舘田 一博
〒143-0015 東京都大田区大森西 5-21-16
東邦大学医学部微生物・感染症学講座
(E-mail: kazu@med.toho-u.ac.jp)

呼吸器感染症原因病原体の 多様性と診断の難しさ

肺炎の診療においては、日本呼吸器学会が市中肺炎、院内肺炎、さらに医療・介護関連肺炎診療ガイドラインを発売している。肺炎の病原体診断に際しては、基礎疾患の有無、感染防御能の障害程度、入院期間、抗菌薬の投与状況などの情報が重要となる。すなわち、感染防御能の障害が高度になればなるほど日和見病原体による感染症の頻度が高くなり、また先行する抗菌薬の投与が薬剤耐性菌感染症の危険を増加させることになる。これら患者情報を参考にしながら、病態別にみた肺炎の原因菌に関する疫学情報を考慮し適切な検査を選択・実施する。市中肺炎では肺炎球菌が原因となることが最も多く、これに加えて若年者であればマイコプラズマが重要な原因となる。そのほかに、一般細菌としてはインフルエンザ菌や *Moraxella*、黄色ブドウ球菌、非定型病原体としては *Legionella*、クラミドフィラ、そしてインフルエンザを代表とする多数のウイルスが肺炎の原因となる。院内肺炎では、上記市中感染症の原因に加えて、MRSA を代表とする薬剤耐性菌、*Enterobacter*、*Acinetobacter*、*Serratia* などのグラム陰性桿菌、緑膿菌、*Stenotrophomonas*、*Burkholderia cepacia* などのブドウ糖非発酵菌の頻度が増加する。さらに症例によっては、*Aspergillus*、*Cryptococcus*、*Pneumocystis* などの真菌を考慮する必要も出てくる。このように、肺炎の原因は多岐にわたることが特徴であり、今日においても原因が特定できない呼吸器感染症が多数存在していることを、改めて認識する必要がある。その理由としては、現在の微生物検査の感度・特異度の問題があげられ、また未知の病原体が隠れている可能性も否定できない。

Johansson らは 184 例の市中肺炎症例を対象に、血液、喀痰、鼻腔吸引液、尿などの検体を対象に、通常の培養法に加えて血清抗体価、遺伝子診断、尿中抗原など今日利用できる検査法をすべて取り入れながら、一般細菌から非定型病原体・呼吸器原因ウイルスを含めその原因の頻度について報告している¹⁾。その結果によると、全症例を対象とした場合の原因病原体の判明率は 67% であったが、全検体が採取されて検討された症例では診断率が 89% であったことを報告している。予想されたように肺炎球菌の頻度が 38% と最も高く、これに次いでウイルスが原因と考えられた症例が 29% であった。この結果

は従来の報告に類似したものであるが、新しい検査法の導入により肺炎球菌の重要性がさらに強調され、また通常の検査では診断されないウイルスの関与が改めて確認されている。また 30% 近くの症例で混合感染を疑わせる成績が得られていることも重要である。

理想の微生物・感染症検査法

感染症診療において原因病原体の特定はきわめて重要であるが、実際には原因病原体が判明する前に抗菌薬が投与される（投与せざるをえない）ことがほとんどである（empiric therapy）。このような現実のなかで、最初は広域の抗菌薬でターゲットを外さない治療を開始し、数日後の原因菌の特定と薬剤感受性の結果を待って狭域の抗菌薬に変更する、いわゆる de-escalation therapy が推奨されるに至っている。理想の微生物・感染症検査の一つの形は、「抗菌薬処方の前に原因病原体と薬剤感受性を推定することができる検査法」ということができる。そのためには検体を採取してから 60 分（可能であれば 30 分）以内に結果が判明する検査が必要であろう。また、MRSA や多剤耐性緑膿菌などの耐性菌が原因となる場合には、分離された菌が原因菌であるのか、汚染菌であるのかの鑑別が重要である。これら理想の微生物・感染症検査法の開発に向けてさまざまな検討が行われており、そのいくつかは臨床応用可能な状況にまで到達しつつある。免疫クロマト法はその代表であり、インフルエンザをはじめ、肺炎の診断としての尿中抗原検査（肺炎球菌、*Legionella*）、腸管感染症としての *Clostridium difficile*、ノロウイルス感染症の診断が可能となっている。また遺伝子診断法としては、多くの病原体を一度に検索する multiplex PCR 法、増幅感度を高めた loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法、さらには検体採取から約 1 時間で結果が判明する遺伝子診断法などの開発も進んでいる。

免疫クロマト法の 呼吸器感染症への応用

1. 免疫クロマト法の種類と注意点

これまで、感染症診断に応用されている免疫クロマト法の種類を表 1 に示した。その原理は、特異抗体（多

表 1 免疫クロマト法が診断に応用されている検体と病原体

検体	病原体
呼吸器検体	A 群溶血性連鎖球菌 アデノウイルス インフルエンザウイルス RS ウイルス 肺炎球菌 マイコプラズマ
尿	<i>Legionella</i> 肺炎球菌
糞便	ロタウイルス ノロウイルス アデノウイルス <i>Clostridium difficile</i> 大腸菌 O157 <i>Helicobacter pylori</i>
泌尿器検体	淋菌 クラミドフィラ

くはモノクローナル抗体)による病原体抗原の認識と金コロイドなどの増幅系を組み合わせた検査法で、約 10^6 CFU/ml の病原体抗原の存在を検出することができる。尿、咽頭ぬぐい、便などの検体を綿棒で採取したのちにキットに挿入、約 15 分で出現する特異バンドの存在を肉眼で判定する検査法として開発されている。「いつでも、どこでも、誰にでもできて、肉眼ですぐに判定できる」という理想の検査法の一つとして普及している。

特に、尿中抗原を用いた肺炎球菌やレジオネラ肺炎の診断は、肺炎の病原体抗原を尿中から検出することから、感染症の確定診断に直結する検査法として汎用されている²⁾。しかし、これら尿中抗原はいったん陽性となると長期間にわたって陽性が持続すること、肺炎球菌では小児で偽陽性例が多いことなどが指摘されていた。また、*Legionella* では基本的に *L. pneumophila* 血清群 1 感染症だけしか診断することができないことから、次世代免疫クロマト法としてはこれらの点が改善されるべきポイントとなっている。特にレジオネラ肺炎では、すべての *Legionella* 属感染症 (*L. pneumophila* のみならず *L. gormanii*, *L. dumoffii*, *L. micdadei*, *L. longbeachae* など 40 菌種以上がヒトに病原性を示すことが報告されている)を診断できる検査法の開発が待たれる。図 1 に東邦大学医学部微生物・感染症学講座で診断したレジオネラ肺炎症例の原因菌の頻度を示した。

2. 免疫クロマト法によるマイコプラズマ感染症診断

2013 年 8 月にマイコプラズマ感染症の新しい診断法

として 2 つの免疫クロマト法が利用可能となった。リボテスト[®]マイコプラズマ (旭化成ファーマ) とプライムチェック[®]マイコプラズマ抗原 (アルフレッサファーマ) である。これまで肺炎球菌や *Legionella* 感染症の尿中抗原診断においては病原体の多糖体抗原を検出する系が用いられていたのに対し、この 2 つの診断キットではまったく新しい分子を標的としていることが特徴である。プライムチェック[®]マイコプラズマ抗原では、マイコプラズマがヒトの気道上皮細胞に付着する蛋白 (P1 抗原) を検出する系として開発されており、咽頭ぬぐい液を対象とした検討で高い感度 (91.7%)・特異度 (92.7%) を示す成績が報告されている³⁾。P1 蛋白は気道において多量に発現している可能性があり、標的分子として重要な候補となりうる。一方、リボテスト[®]マイコプラズマは、病原体のリボゾム蛋白 L7/L12 を検出する診断法として開発された。リボゾム蛋白 L7/L12 は菌体中に多量に存在する蛋白であり、これを特異性の高いモノクローナル抗体の組合せで検出することにより診断する。リボゾム蛋白 L7/L12 はすべての病原体が保有する分子であり、マイコプラズマ感染症以外の感染症への本系の応用が期待されている。実際に、肺炎球菌感染モデルを用いた検討で、リボゾム蛋白 L7/L12 を標的とする検出系で感染とコロニゼーションを鑑別できること、また小児における偽陽性がみられにくい可能性が示されている⁴⁾。マイコプラズマ感染症における 2 つの免疫クロマト法の有用性を比較した成績は現在までのところ発表されていない。今後、臨床症例のなかで、それぞれの検査法の特徴と有用性を評価していくことが必要である。

遺伝子診断法の進歩

1. Multiplex PCR 法を用いた病原体診断

呼吸器感染症の原因病原体の検索のために各種 multiplex PCR 法を用いた遺伝子検査法が報告されている。その原理の詳細は省略するが、臨床検体が入った試験管内で多数の病原体に対する PCR 増幅反応をまとめて行い、これを高感度にしかも高い特異性をもって検出する方法である。Lieberman らは、183 例の成人市中肺炎症例を対象に 12 種類の呼吸器関連ウイルスの関与について multiplex PCR 法を用いて検討している⁵⁾。その結果、30% 以上の症例でウイルスの関与が示唆され、コロナウイルス (13%)、RS ウイルス (7%) の頻度が高かった

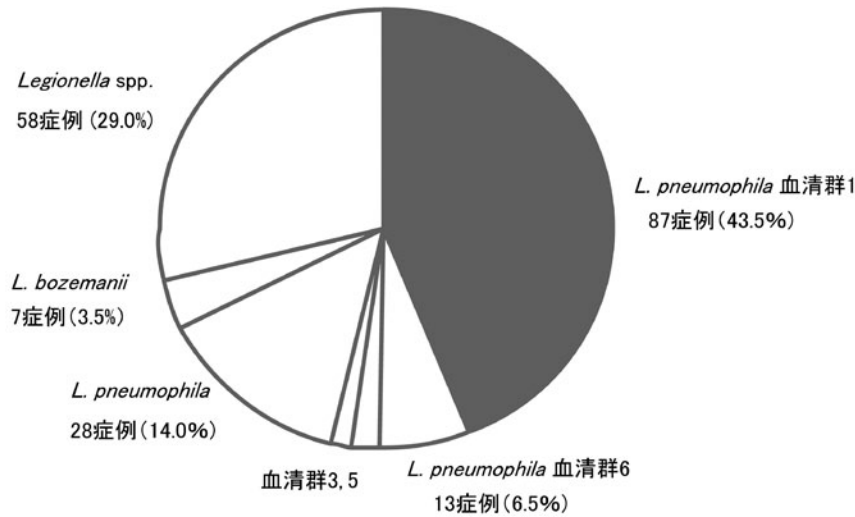


図1 レジオネラ肺炎の起炎菌分布：200 症例の解析。我が国で経験されるレジオネラ症の半数近くは *L. pneumophila* 血清群1である。それ以外の *Legionella* 属細菌による感染症では尿中抗原検査が陰性となることに注意しなければならない。

ことを報告している。Templetonらは105例の成人市中肺炎症例を対象に *Legionella*、マイコプラズマ、インフルエンザウイルス、コロナウイルス、ライノウイルスに対する multiplex PCR 法を実施し、従来法との比較を行っている⁶⁾。原因病原体が推定できたのは、従来法では約50%、一方 multiplex PCR 法では約76%の症例で原因と思われる病原体で陽性結果が得られた。特にウイルスの関与に関して、従来法では約14%、これに対して multiplex PCR 法では約56%の症例で陽性結果が報告されている。

すでにキット化され市販されている multiplex PCR 法としては、パピローマウイルス関連（子宮頸癌との関連が強いウイルス型判定）、淋菌・クラミドフィラ同時検出系、結核菌およびその抗菌薬耐性などが代表例である。最近になって、Seegene社が結核菌関連（リファンピシン・イソニアジド・キノロン耐性）、呼吸器ウイルス関連（16種類）、呼吸器細菌関連（*Legionella*、マイコプラズマ、クラミドフィラ、百日咳、パラ百日咳）、感染症関連（7菌種）、パピローマ関連（28種類）の診断を可能にする、新しい multiplex PCR キットを開発している。日本ではまだその有用性に関する情報は得られていない。今後、このような multiplex PCR 法をどのように臨床応用していくか、その有用性とコストとの関連も含めて議論していく必要がある。

2. 鎖置換反応を用いた高感度遺伝子増幅系：LAMP 法

LAMP 法は栄研化学が発明した次世代遺伝子増幅系で、感染症領域を含め多領域での応用が期待される検査技術の一つである。本法では、標的遺伝子の6つの領域に対して4種類のプライマーを設定し、鎖置換反応を利用して一定温度で反応させることが特徴である。具体的には、サンプルとなる遺伝子、プライマー、鎖置換型 DNA 合成酵素、基質等を混合し、一定温度（65℃付近）で保温することによって反応が進み、検出までの工程を1ステップで行うことができる。これまでの PCR 反応の場合にはサーマルサイクラーを用いた反応温度のサイクリングが必要であったが（例：93℃ 1分—55℃ 30秒—70℃ 1分を30サイクルなど）、LAMP 法では65℃の恒温槽1つで反応を進めることも可能である。現在のところ、体外診断用医薬品として感染症領域の LAMP 法診断キットとして製品化されているのは *Legionella*、マイコプラズマ、結核、SARS コロナウイルス、インフルエンザウイルス（A型、2009 pdm、H5 亜系）による感染症が対象であるが、その他多くの病原体・感染症への応用が可能である。本法の増幅効率はきわめて高く、目的とする DNA を15分～1時間で 10^9 ～ 10^{10} 倍に増幅し、その高い増幅性から増幅産物の有無を肉眼で確認することができるほどである。現在、結核とインフルエンザに関しては目視判定が可能な LAMP 法検査が確立しており、今後さまざまな感染症診断への応用が期待されている。

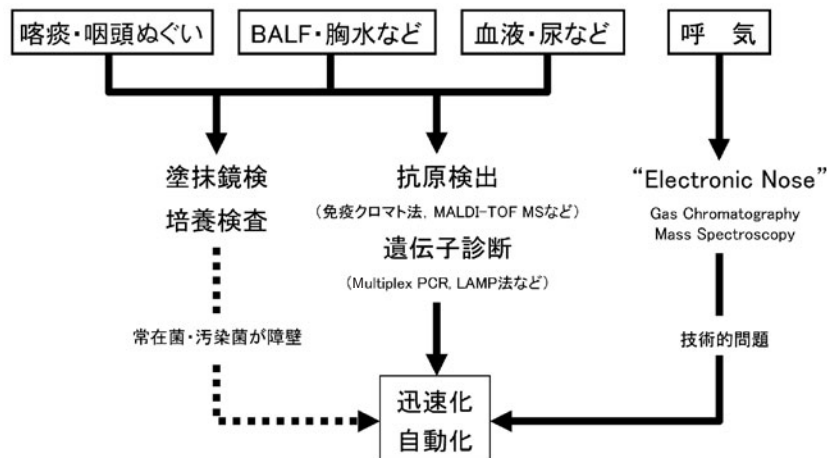


図2 呼吸器感染症の診断法における将来展望.

3. 注目される次世代遺伝子診断法・機器：自動化・単純化・短時間化の方向性

これまでに感染症領域の次世代遺伝子検査の方向性を示す診断法・機器がいくつか開発されている。今日においても最も重要な耐性菌である MRSA のスクリーニング法を例にとると、日本ベクトンディッキンソン社、ロシュ・ダイアグノスティックス社、日本ビオメリュー社がそれぞれ BD マックス、LightCycler、EasyQ を開発販売している。いずれも MRSA の SCCmec 領域を増幅することによりその存在を確認する検査法であり、検査時間としては2~3時間が必要である。BD マックスにおいては、オンデマンド形式での検体の挿入が可能であり、また検体を挿入したのちほぼ全自動で検査が進行すること、さらに独自のプライマーを調整することによりオーダーメイドの遺伝子診断ができることが特徴である。感度・特異度に関しては、いずれの検査法においても90%以上と報告されている。最近になって、米国 Cepheid 社が Xpert SA Nasal Complete という製品を開発し注目されている。これは手のひらサイズのカセットに検体を挿入して機器にセットすれば、約1時間で MRSA の存在を推定できるという検査法である。東邦大学医療センター大森病院および大橋病院において実施した検討では、入院患者156例の鼻腔における MRSA の保菌に関して、感度・特異度ともに100%に近い成績が得られている。WHO が Cepheid 社の Xpert 検査を発展途上国

における結核診断法として推奨したことは特記されるべき事実である⁷⁾。

将来展望： 新しい検査法開発の方向性

これまでとは全く異なる新しい検査法として、呼吸器感染症患者の呼気中から病原体が産生する揮発性物質を検出する方法が考案されている。Syhre らは、結核菌がニコチン酸を産生することに着目し、これを揮発性分子に変換したのちガスクロマトグラフィーで検出する可能性について報告している⁸⁾。検討された症例数はたかだか10例前後であるが、喀痰塗抹検査で陽性を示した患者において特異的陽性シグナルが得られている。Chambers らは、アスペルギルス症患者の呼気中から2-pentylfuran を検出することの、診断への応用の可能性を報告している⁹⁾。細菌由来の揮発性物質をターゲットとする診断法の臨床応用にはまだまだ多数のハードルが残されているが、大変興味深い研究テーマである。

また、新しい機器の感染症診断分野への応用についてもいくつか新しい報告がみられる。その一つが質量分析装置の細菌同定への応用である (MALDI-TOF MS)。本法は分離された細菌を対象に迅速かつ正確に菌種を同定する方法として開発されているが、これを臨床検体か

らの病原体の推定に直接応用しようとする研究も展開されている。またフローサイトメトリーを感染症分野へ応用する試みも報告されている¹⁰⁾。Barbosaらは、*Pneumocystis jirovecii* 感染症が疑われた420例の呼吸器検体を対象に、蛍光染色法とフローサイトメトリーを比較して報告している。蛍光染色法で陽性となった症例はすべて、フローサイトメトリーでも陽性となっている。特にフローサイトメトリーを応用することにより、細胞質内に存在する病原体抗原、すなわち貪食されたと考えられる病原体抗原を、迅速かつ特異的に定量検出できる可能性がある。最近になって、オンチップバイオテクノロジー社が卓上のセルソーターと閉鎖式チップを用いたディスプレイ・フローサイトメトリーを考案しており、感染症分野への応用が期待される。検出された病原体が感染症の原因菌であるのか、あるいは単なる汚染菌であるのかの判定は、感染症分野における最も難しい問題の一つであるが、フローサイトメトリーを用いた細胞内病原体抗原の検出が感染症の病原診断におけるブレイクスルーにつながることを期待している。

おわりに

これからの感染症診断法がどのように展開していくのか、その方向性は必ずしも明確ではない(図2)。しかし、免疫クロマト法で実現した尿中抗原・血中抗原の迅速検出系に関しては、今後もさらなる進歩がみられるものと予想される。また、無菌検体からの抗原・遺伝子の検出系、あるいは呼気を用いた揮発性物質の検出など迅速化・自動化が可能な検査法においてどのような展開がみられるのか、これからの10年に期待したい。

Abstract

Diagnosis for respiratory infections: Current status and future directions

Kazuhiro Tateda

Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine

A variety of organisms play a critical role in respiratory infections, which may include mycoplasma, *Chlamydomytila*, and fungus in addition to bacteria, virus and mycobacterium. Although novel techniques, such as molecular diagnosis and an immunochromatographic test (ICT), were applied in the clinical setting, it may be important that there are many cases of respiratory infections with unknown etiology. In this chapter, the usefulness of molecular diagnoses, such as multiplex PCR and the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method and newly developed ICT for mycoplasma infections, was introduced. Furthermore, future directions of development of novel technology and instruments for rapid and correct diagnoses of respiratory infections will be discussed.

引用文献

- 1) Johansson N, et al. Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 202-9.
- 2) 館田一博. 免疫クロマトグラフィー法による肺炎球菌尿中抗原検査. *モダンメディア* 2005; 51: 129-32.
- 3) 大野令央義, 他. 新規開発されたマイコプラズマ抗原迅速検出キットの有用性の検討. 第116回日本小児科学会学術集会. 2013.
- 4) Sawa T, et al. Diagnostic usefulness of ribosomal protein 17/112 for pneumococcal pneumonia in a mouse model. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 70-6.
- 5) Lieberman D, et al. Respiratory viruses in adults with community-acquired pneumonia. *Chest* 2010; 138: 811-6.
- 6) Templeton KE, et al. Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 345-51.
- 7) Nicol MP, et al. Accuracy of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children admitted to hospital in Cape Town, South Africa: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 819-24.
- 8) Syhre M, et al. The scent of *Mycobacterium tuberculosis*—part II breath. *Tuberculosis (Edinb)* 2009; 89: 263-6.
- 9) Chambers ST, et al. Detection of 2-pentylfuran in the breath of patients with *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 2009; 47: 468-76.
- 10) Barbosa J, et al. A new method for the detection of *Pneumocystis jirovecii* using flow cytometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 1147-52.