



2015年12月9日放送

「血流感染症診断における新しいアプローチ」

長崎大学大学院 病態解析・診断学分野教授
柳原 克紀

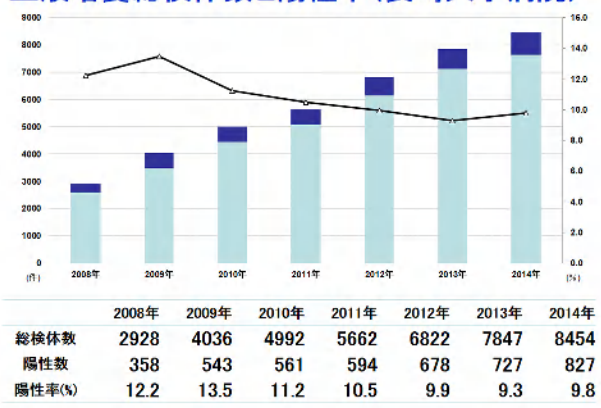
はじめに

血流感染症は、重症の敗血症や敗血症性ショックの原因の30%程度を占めており、死に直結する病態です。血流感染症発症者では高い死亡率が報告されていますが、直接的に死亡に寄与するのは30%と推定されています。特に原因微生物を同定できずに、適切な抗菌薬治療がなされない場合には予後が悪くなることもわかっています。ショックを呈した症例の解析では、1時間以内に有効な抗菌薬を開始すると生存率は80%程度ですが、発症6時間後は1時間遅れる毎に7%ずつ低下することが報告されています。また、原因菌ではなく汚染菌を検出した場合には、診断が不確実になるとともに不要な抗菌薬を投与することになります。副作用やコストの増加につながります。ですから、迅速かつ正確な原因菌の推定が重要になります。

血液培養検査は血流感染症の診断において最も重要な検査です。その意識の高まりとともに長崎大学病院でも血液培養検体数は増加しています。

血液培養検査は原因微生物の同定に加えて薬剤感受性検査を実施することができるため、標的治療を行う際に役に立ちます。しかしながら、菌の同定や薬剤感受性検査の結果がでるまで時間がかかることが指摘されていました。これを解決するための新しいアプローチとして、質量分析装置や遺伝子検査が応用されつつありますので、その有用性と課題についてお話しします。

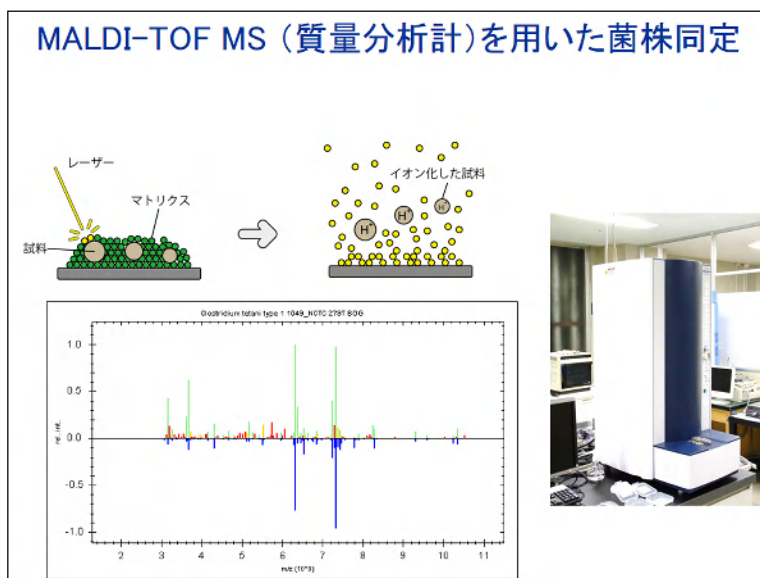
血液培養総検体数と陽性率(長崎大学病院)



質量分析装置

質量分析装置は、今後期待されている診断機器です。簡便であり、短時間で結果が得られます。ランニングコストも安価であり、多くの医療機関で導入されることが予想されています。レーザーでイオン化した高分子を飛散させ、真空管の中での飛行時間を測定してマススペクトルを作成することで、主にタンパク質の質量を分析する装置です。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ります。検出器までの到達時間が分子の質量によって変化しますので、飛行時間を分子質量に置き換えてマススペクトルを作成することができます。実際の検査手技は、きわめて簡単です。寒天培地に発育した菌を、専用プレート上でマトリクスを混ぜあわせます。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になります。プレートを乾燥後、装置本体に組み込み、コンピュータ制御下にレーザーで励起し、得られたマススペクトルと、装置内に登録されている約 3000 菌種のデータベースを照合します。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ます。同定には主にリボソームタンパク質のマス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 85%、属レベルで約 95%程度の高い成績がえられています。同定まで約 10 分という迅速性は大きな長所であり、高い正確性と再現性を併せ持っています。我々の検討でも、臨床サイドへの報告は一日程度早くなることが示されました。一般細菌以外にも真菌や嫌気性菌の同定も可能です。従来の検査では同定できなかった株が、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弱点を補う側面もあります。消耗品はマトリクス程度であり、ランニングコ



質量分析装置で識別が難しい菌種

Shigella / *E.coli*

Enterobacter cloacae complex

Streptococcus pneumoniae / mitis / oralis

Bordetella pertussis / *B. bronchioseptica*

Aeromonas sp.

Klebsiella oxytoca / *Raoutella ornitholytia*

Yersinia pestis / *Yersinia pseudotuberculosis*

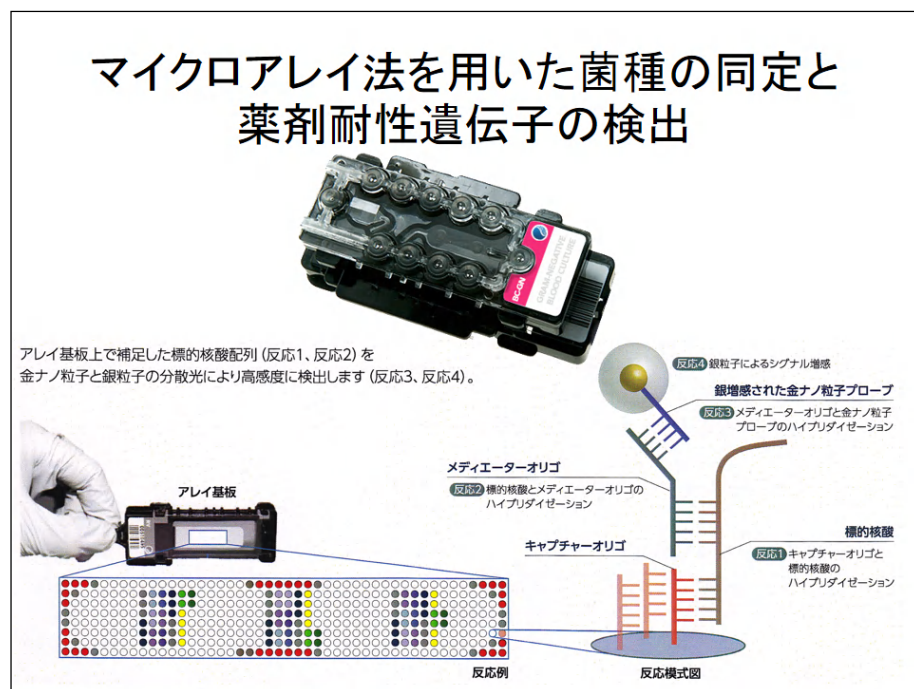
ストの面からも優れます。弱点としては一部には識別が困難な微生物が存在し、*Streptococcus* 属、*Enterobacter* 属ならびに *Acinetobacter* 属では同定の信頼度がやや低下します。また、*Shigella* 属は同定が不可能な代表的な菌で、*Escherichia coli* と誤同定してしまうため、その判断には十分に注意する必要があります。今後は、データベースの充実により同定精度が向上することが期待されています。

遺伝子検査

続きまして、遺伝子検査についてお話しします。先ほど述べましたように、血流感染症における微生物の同定は、迅速で感度、特異度ともに高いことが求められます。従来法に遺伝子検査を追加することで、血液培養が陽性となった後の同定や薬剤耐性遺伝子の検出において、検査室での作業時間や結果判明までの時間を短縮することができるため、その有用性が期待されています。遺伝子検査は、ある一定の知識や手技などの習得が必要な上に、特殊な機器を要する点やコストの面などから、臨床現場での活用場面は限られていました。最近では、新しい技術を用いた機器や工夫を凝らした手法が開発され、応用範囲が広がってきています。血液培養陽性検体から微生物を同定するための遺伝子学的方法は、大きく2つに分類されます。1つはハイブリダイゼーションを用いた方法であり、もうひとつは遺伝子増幅を利用した方法です。これらは主に検出頻度の高い病原体を標的にしています。

血液培養陽性検体のスライドガラス標本を用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションは、ターゲットである菌体の RNA と蛍光ラベルされたオリゴヌクレオチドが相補的に複合体を形成し、顕微鏡で可視化する方法です。この方法は目的の病原体を数時間以内で高率に検出できます。

マイクロアレイ法で捕捉した標的核酸配列に銀増幅された金ナノプローブをハイブリダイズすることで高感度に病原体を検出するシステムも開発されています。

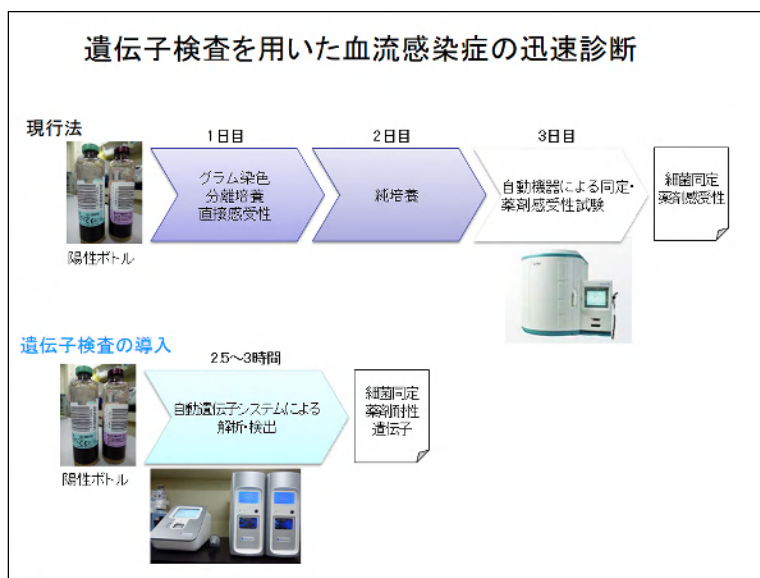


ることで高感度に病原体を検出するシステムも開発されています。

遺伝子増幅を利用した方法としてはPCR法が最もよく利用されています。血液培養陽性検体を用いてリアルタイムPCR法により検出、同定する方法が一般的です。マルチプレックスPCRを用いて、1回の反応で複数の目的遺伝子を検出する方法もあります。薬剤耐性遺伝子を検出することで薬剤耐性菌かどうかを通常よりも短い時間で判定することができます。遺伝子を保有していても、必ずしも表現型として耐性を示すとは限りません。反対に薬剤耐性遺伝子を保有していなくても、その他の機序により耐性を示すことも十分あります。しかしながら、重要な薬剤耐性遺伝子の有無を知ることは、治療をする上で有益な情報になります。

血液培養陽性検体を用いて2種類の遺伝子検査の性能を検討した臨床研究を紹介します。培養が陽性となった173検体で検討された結果、従来法で同定された微生物のうち、90%程度が同定可能でした。また、結果判明までの時間についても大幅な短縮を認めました。いずれの方法についても一部に偽陰性や疑陽性、不一致などを認めており、その真偽やコンタミネーションの可能性、臨床的解釈について考慮する必要があります。臨床的判断における遺伝子検査の有用性についても検討されています。黄色ブドウ球菌とコアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (coagulase-negative Staphylococci, CNS) を鑑別し、その情報を臨床にフィードバックした際の影響が解析されています。菌の情報を迅速に提供した群ではICUにおいて死亡率低下が顕著であり、抗菌薬の投与期間が短縮されたことが報告されています。また、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を検出できる遺伝子検査をもちいることで在院日数が短く、医療費も少なかったことも示されました。

血液培養陽性検体における遺伝子検査の大きなメリットはその迅速性です。現行法で3日間程度かかっていた菌種同定と薬剤感受性成績が、数時間程度でわかることとなります。迅速な診断と適切な抗菌薬の投与が求められる血流感染症の診療に大きく貢献できます。一方で、もともと標的とされていない微生物は同定できない、同定された微生物のviabilityに言及できないなどの欠点も指摘されています。つまり現時点では遺伝子検査が従来法に取って代わるものではなく、相互補完的なものと理解するべきでしょう。



い、同定された微生物のviabilityに言及できないなどの欠点も指摘されています。つまり現時点では遺伝子検査が従来法に取って代わるものではなく、相互補完的なものと理解するべきでしょう。

遺伝子検査の利点と問題点（まとめ）

血液培養陽性検体における遺伝子検査の利点と問題点についてまとめます。利点としては、迅速であること、感度が高いこと、ならびに特異的な薬剤耐性遺伝子が検出できることがあげられます。解決されるべき問題点として、すべての病原体をカバーできないこと、薬剤感受性検査ができないこと、死菌やDNA血症を検出すること、ならびに、従来法と一致しない場合、解釈や意義づけが困難であることなどがあります。

血液培養陽性検体における 遺伝子検査の利点と問題点	
利点	問題点
迅速である 感度が高い 特異的な薬剤耐性遺伝子の 検出が可能	すべての病原体をカバーできない 薬剤感受性検査ができない 死菌やDNA血症を検出する 従来法と一致しない場合、解釈や意 義づけが困難

以上、血流感染症診断における新しいアプローチとして、質量分析装置や遺伝子検査について、ご紹介しました。これらの新しい検査法は、血流感染症の診断や治療に大きく貢献することは間違いありません。我々はこれらの新しい検査法についてそれぞれの検査の長所、短所などの特徴、従来法との違いなどを理解した上で、実際の臨床現場で活用していくこととなります。従来法とどのように使い分けるか、あるいはどのように組み合わせるかっていくかについてもさらなる研究や議論が必要になるでしょう。