

[総 説]

感染症診断における遺伝子解析技術の適応

大楠清文・江崎孝行

岐阜大学大学院医学系研究科 病原体制御学分野

(平成 20 年 6 月 6 日受付)

近年、遺伝子解析技術は、分離菌株の迅速な菌種の同定のみならず、検体から直接、微量な病原体を検出・同定する際に追加の検査として利用されている。核酸増幅法の最大の利点は、ヒトに感染症を起こすほとんどすべての細菌、真菌、原虫、ウイルスを迅速かつ高感度に検出できることである。抗菌薬投与後あるいは投与中の細菌感染症、とりわけ髄膜炎や心内膜炎では、培養法で原因菌を検出できない場合においても病因診断が可能である。さらに、培養が困難な病原体、培養に長い時間を要する細菌の検出にも威力を発揮する。日常検査では鏡検で細菌が観察されたにもかかわらず、培養で生えてこない場合がある。このようなケースでは検体から直接 broad-range PCR 法で細菌の DNA を増幅後、産物をシーケンス解析することで菌種名を決定できるだけでなく、その細菌を分離するための培地の追加、温度やガス環境などの培養条件の変更、培養期間を延長することが可能となり、生菌を得ることに寄与する。筆者らは、以上のような利点を有する遺伝子解析技術を実際に用いて、全国の病院において日常検査法で診断できなかった 260 症例以上の臨床検体を精査してきた。本稿では、「どのような状況で遺伝子検査を活用するのか？」を把握・認識してもらうべく、解析した代表的な症例の病態や診断名と原因微生物、病因診断までのプロセスを紹介する。遺伝子解析技術を用いた感染症の診断においても、臨床医との緊密なコミュニケーションにより得られた情報を熟慮しながら解析にあたることが必須であることを強調したい。

Key words: molecular diagnostics, conventional PCR, broad-range PCR, sequencing, 16S rRNA

はじめに

実際に病院の臨床微生物検査を経験した後、遺伝子解析技術を用いて感染症の診断に携わるようになった現在、「遺伝子検査は主役にはなれない。しかし、すばらしい脇役としては活躍できる」というのが率直な感想である。すなわち、遺伝子解析技術が今後どのように進歩しようとも、臨床情報の活用、塗抹鏡検所見、簡便な迅速抗原検出法、培養法、そして薬剤感受性試験の重要性はいささかも変わらないということである。これらの日常検査法で診断がつかない状況や治療経過のなかで追加の検査として遺伝子解析技術を活用

することが現況では最善の策と考える。よって、まずは「どのような状況で遺伝子検査を活用するのか？」を認識することが喫緊のテーマだと思う。

感染症の原因微生物検索における遺伝子学的診断法には、①臨床材料から直接、病原体に特徴的な遺伝子領域や病原因子にかかわる遺伝子を検出する、②培養にて分離された菌株の菌種同定¹⁾、もしくは病原因子や耐性遺伝子を検索する、の二つに大別される。本稿では狭義の感染症の遺伝子検査である前者、臨床検体から分離培養を経ることなく病原体を検出する系を中心として、現状の遺伝子解析技術を整理しながら、その適応について実際に経験した臨床検体の解析事例をもとに概説してみたい。

1. 遺伝子解析技術の潮流

1990年代から PCR をはじめとする遺伝子増幅による感染症の迅速診断技術は急速な進歩を遂げてきた。PCR 法は迅速性に優れ、検出感度および特異性も

著者連絡先: (〒501-1194) 岐阜市柳戸 1-1
岐阜大学大学院医学系研究科
病原体制御学分野
大楠清文
TEL: 058-230-6491
FAX: 058-230-6489
E-mail: ohkusu@gifu-u.ac.jp

高いことから、その有用性に関する論文が数多く報告され、今日に至っている。しかし、PCR法は研究室や外注ラボでは頻用されているものの、病院検査室では専用の機器・試薬を用いる抗酸菌群や淋菌・クラミジア検出などを除き、遺伝子検査法が感染症診断に広く利用されていないのが実情である。すなわち、これまでのPCRによる遺伝子検査は病院検査室で簡便に行えるレベルまで進化していなかったのである。

では、PCR法 (conventional PCR) が感染症診断に広く利用されなかった要因は何であろうか。技術的な側面から鑑みるに、①1反応で1病原体のみの検出、②増幅産物の検出・確認にゲル電気泳動が必要で手技が煩雑、③正確な定量解析を行うことができない、などの限界と問題点をかかえていたからであろう²⁾。近年、これらの課題を打開するべく、技術革新の恩恵を受けながらPCRにさまざまな改良が加えられ、感染症の診療に活かされる遺伝子検査の実用化が見えてきた。すなわち、どんな細菌のDNAであっても一対のプライマーで増幅することによって想定外の起炎菌をも検出・同定できる broad-range PCR、PCR増幅産物をリアルタイムに検出して、遺伝子の定量を簡便かつ迅速に行うことが可能な real-time PCR法、1回の反応で2~5種類の病原体検出を試みる multiplex PCR法が適宜活用されることに期待を寄せている。従来のPCRから進歩向上している三つのPCRバリエーションの特徴を次に紹介する。

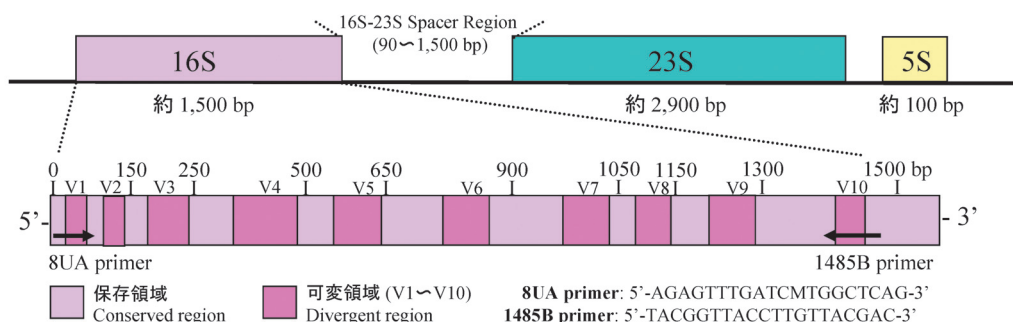
ーションの特徴を次に紹介する。

a. ブロード・レンジ PCR

通常のPCR法が菌種あるいは病原因子の特異的な塩基配列領域を増幅するのに対して、broad-range PCRでは細菌に共通な16S rRNAあるいは真菌の18S rRNA領域を増幅する(図1)。一組のプライマーで多種類の細菌もしくは真菌をユニバーサルに検出できることが最大の利点である。増幅されたrRNAには特定の細菌/真菌において特徴的な可変領域DNAを含むため、ATCGの塩基配列を決定し (sequencing), その配列をGenBank, RIDOM³⁾, EzTaxon⁴⁾などのデータベースと比較・解析することによって菌種を特定することができる。高速な自動DNAシーケンサーの普及と相まって、DNA塩基配列解析による微生物の同定が数時間で実施可能である。通常は無菌的な検体である血液、髄液、関節液、胸水、腹水、リンパ節ほかの組織や膿汁からの微生物検出に broad-range PCRが活躍する余地は非常に大きい⁵⁾。とりわけ感染性心内膜炎⁶⁾、リンパ節炎のような起炎菌がバリエーションに富む感染症の診断において威力を発揮する。

Broad-range PCRは培養が困難あるいは培養できない病原体の検出、新菌種の検出・同定、未知の病原体発見においても極めて重要な役割を果たしている。具体的には、このシーケンスに基づいた手法により

a. 細菌のリボソームRNAの構成と16S rRNAの配列



b. 真菌のリボソームRNAの構成と真菌同定に有用な領域

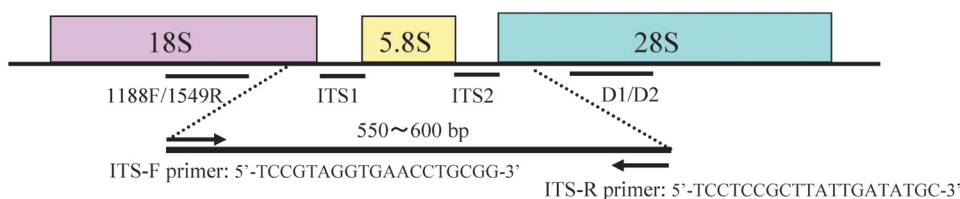


図1. Broad-range PCRの標的遺伝子とプライマー

Whipple's disease の病原体である *Tropheryma whipplei* や猫ひっかき病の *Bartonella henselae* が新種として発見されたことなどが挙げられる⁷⁾。

b. リアルタイム PCR

Real-time PCR は標的遺伝子の増幅と同時に産物を検出、解析する方法である。実施にはサーマルサイクラーと蛍光測定器が一体化した専用の装置が必要である。ABI 社の Prism シリーズや 7300/7500/7500 Fast, Roche 社の LightCycler, BioRad 社の iCycler iQ, Cepheid 社の SmartCycler, Stratagene 社の Mx 4000 などが市販されている。ABI 社の 7500 Fast や LightCycler では PCR の温度サイクルを高速に行うことができ、典型的な 30~40 サイクルの PCR が約 30 分で完了する⁸⁾。さらには、増幅と検出が約 5 分で完了する超高速の装置が開発され、近く販売の予定となっている (トラス社; <http://www.trustweb.jp/>)。

PCR 産物の検出は、2 本鎖 DNA に結合して蛍光を発する色素の SYBR Green I や TaqMan プローブ, Molecular Beacon などを用いてリアルタイムに実施できる。したがって、①PCR 後の電気泳動と染色操作が不要、②目的とする病原体が検体中に多く含まれる場合には測定途中でも陽性反応が確認できる、③段階希釈の既知濃度 DNA サンプルを同時に測定することで定量解析が可能、などの特徴がある。これらの特色は以下の利点に対応する。①反応チューブを開けないのでクロスコンタミネーションによる偽陽性のリスクを最低限に抑えられる、②強陽性の場合には反応の完了を待つことなく迅速に結果を得ることができる、③サイトメガロウイルス (CMV), EB ウイルス (EBV), ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV-6) などの潜伏感染するウイルスの病態の把握 (潜伏状態なのか活性化か顕在化ないし感染) そして DNA 定量値の経時的なモニタリングにより、抗ウイルス薬治療の効果判定や予防的な治療介入の判断に利用できる。

以上のように real-time PCR 法は迅速性、操作性、定量性において優れており、将来的にも遺伝子検出法の主流となるであろう。事実、米国の病院ではウイルス感染症の診断を培養法から real-time PCR を利用した遺伝子検出法に置き換える施設が着実に増加している⁹⁾。

c. マルチプレックス PCR

Multiplex PCR 法では一つの反応チューブに二つ以上のプライマー対を含み、一度の反応で複数病原体あるいは病原因子が検出可能である。細菌だけの組み合わせのみならず、ウイルス、クラミジアなど通常の

臨床細菌検査室では培養が困難な病原体、培養に長い時間を要する細菌との同時検出系に利用されている。すなわち、multiplex PCR は費用対効果を重視したうえで、感染症の種類や検査材料別に起炎菌として頻度の高い複数の病原体を約 2~4 時間で一度に検索できる。前述の Molecular Beacon や TaqMan などのプローブを用いた real-time PCR 法による multiplex PCR、いわゆる multiplex real-time PCR も普及しており、想定される複数の病原体を定量解析する方向に進んでいる。さらに、multiplex PCR 法の適応は、臨床検体からの直接的な病原体の検出と同時に、①病原因子と毒素の検索、②薬剤耐性遺伝子の検出、③human β -globin あるいは β -actin などの housekeeping gene を検出することにより、各チューブ内の反応状況 (特に偽陰性反応の検知) や検体採取および核酸抽出行程の適否を監視する。特に前者において、病気の原因が病原体の出す毒素に由来する場合には、その病原体の検出・同定と同時に毒素産生遺伝子の有無を確認することは感染症の迅速診断において重要な検査である。MRSA の *mecA*, VRE の *vanA*, *vanB*, *vanC* などのように特定の遺伝子の存在が確認されれば、薬剤耐性であることが強く示唆される場合がある。菌種の特定と耐性遺伝子の検出が同時に行えるようになり、抗菌薬選択の参考にできるだけでなく、院内感染対策からも MRSA や VRE などの迅速な検出に有用である。

Multiplex PCR 法の欠点は、プライマーのアニーリング温度や反応液組成の濃度調整など至適反応条件の設定が複雑となること、シングル反応に比して検出感度が低下する傾向にあることなどである¹⁰⁾。しかし、近年、multiplex PCR を実施するための最適化 (至適化) された反応キット (マスターミックス) が普及しており、反応系の構築が容易になってきた。プライマーの設計については、アニーリング温度の関係から各プライマーの T_m 値 (融解温度) の差をできるだけ小さくして、増幅産物の長さも短くすることが肝要である。また、非特異的増幅の有無や検出感度が低下しないかをあらかじめ確認しておくことが大切である。

2. 感染症の診断における遺伝子検査の適応

感染症の迅速診断法として遺伝子検査を活用する利点には、①早期の診断、②抗菌薬前投与後の病因診断、③培養不可能か困難な病原体の検出、④遅発育性病原体の検出、⑤極めて病原性の強い微生物の検出、⑥耐性遺伝子の検出、⑦病原因子や毒素の検出、⑧未知の病原体検出、などが挙げられる。

著者らは、全国の病院から培養法や免疫学的抗原検出法ほかの日常検査法で診断できなかった症例の検体解析を依頼されている。2007年5月末までに、約80病院から260症例以上（最近の1年間で約150症例）の臨床検体を前述の遺伝子解析法にて精査してきた。解析結果の報告は大半の症例で検体到着日に、遅くとも2,3日以内に行っている。これらの症例の多くは原因微生物を特定できており、診断と治療に少なからず寄与できたとの実感がある。したがって、ここでは感染症の遺伝子検査の適応を探るうえで、実際にどのようなケースで診断に結びついたかについて提示しておきたい。

臨床検体の種類は、骨髄、髄液、血清、関節液、眼内液、羊水、膿汁（脳、肺嚢胞、脾臓、腹腔内、骨盤内、卵巣、リンパ節、皮下）、組織（脳、脊髄、角膜、心臓、僧帽弁、三尖弁、肺、胸膜、肝臓、脾臓、腹膜、リンパ節、皮膚）、パラフィン切片（僧帽弁、回盲部組織、直腸生検、リンパ節）、BAL、胸水、喀痰、眼脂、鼻咽頭粘液、耳漏、胃液、尿、糞便など多岐にわたっていた。その他、解析対象として検体ではないが分離菌株ともいえない、血液培養陽性のカルチャーボトルがあった。血液培養液から適切な培地に培養しても発育しなかった12症例では、培養液よりDNAを抽出後、菌種に特異的なプライマーを用いてPCRを行い、インフルエンザ菌b型（Hib；喉頭蓋炎の1症例）、淋菌（播種性淋菌感染症1例）、肺炎球菌（敗血症2例）、*Campylobacter fetus*（敗血症2例）、*Helicobacter cinaedi*（敗血症6例）の各々が検出され同定・診断が可能となった。

遺伝子診断を依頼してきた背景を以下のa~gの七つのカテゴリーに分類して、解析した代表的な症例の病態や診断名と原因微生物を列挙する。

a. 抗菌薬投与後の細菌性髄膜炎の病因診断

解析依頼があった260検体中53件（約2割）は塗抹、培養検査、迅速抗原検出にて診断がつかなかった細菌性髄膜炎疑いの症例であった。このようなケースでは、発症年齢や臨床経過も考慮しながら解析にあたるが、基本的にはHib、肺炎球菌、GBS、大腸菌、リステリア菌、そして髄膜炎菌の6菌種に特異的な遺伝子の検出を考慮する。さらに、臨床経過によってはこれら想定される菌種以外の細菌全般をカバーするために前述のbroad-range PCR（図1）も同時に実施する場合がある。大半の症例がHib、ついで肺炎球菌、GBS、大腸菌、髄膜炎菌Y型、緑膿菌、*C. fetus*などが検出されて病因診断に至った。その他、解析手法の面から特筆すべきは、2症例は*Streptococcus constellatus*¹¹⁾、

*Bacteroides fragilis*¹²⁾が各々起炎菌であったが、これらはbroad-range PCRにて陽性、このDNA産物をシーケンス解析して菌種を特定できたことである。さらには、髄液の遺伝子解析による検出菌種の報告を行ったことによって、後に前者では中耳腔と髄腔との交通が示唆され、後者には腰仙部に先天性皮膚洞が存在したことが判明した。

b. 抗菌薬投与後あるいは投与中で培養陰性（髄膜炎以外の病態）

1) 感染性心内膜炎：検体として僧帽弁の疣贅が送付されてきた。アトピー性皮膚炎および歯科処置歴のある症例であったことから細菌全般をとらえるbroad-range PCRを実施した。増幅DNAのシーケンス解析にて黄色ブドウ球菌と判明（図2）。確認のためにコアグラウゼ産生性と相関の高い遺伝子(nuclease; *nuc*)の検出を試みた結果、陽性。さらに、*mecA*遺伝子を検出するPCRも同時に実施したが陰性であったため（図3）、methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA)の可能性が極めて高いと報告した。この結果にて抗菌薬をceftriaxoneに変更し、経過良好でその後退院となった症例¹³⁾である。

2 症例目¹⁴⁾は同様に僧帽弁の疣贅からbroad-range PCRとシーケンス解析によって、*Corynebacterium amycolatum*を検出・同定。本症例は弁置換術を実施する前の血液培養が陽性であったが、分離菌株も本菌種と同定された。

これら2症例を含めて、感染性心内膜炎の弁組織から直接細菌のDNAを検出・同定できた7例の特徴を表にまとめた。抗菌薬治療がすでに施行されていたため、培養法では全例陰性であった。また、血液培養で起炎菌が検出されていた症例は2例のみである。疣贅の遺伝子解析で起炎菌が確定したことによって弁置換術後に確信をもちながら抗菌薬治療を実施できたとのコメントを各症例の主治医から頂戴した。

2) 脊椎膿瘍：膿汁のbroad-range PCRで黄色ブドウ球菌検出、*nuc*遺伝子検出も陽性、*mecA*遺伝子は陰性にてMSSAと確定。

3) 先天性肺嚢胞¹⁵⁾：肺嚢胞膿汁からHibと肺炎球菌に特異的な遺伝子検出。さらにreal-time PCR法による各遺伝子の定量解析から双方の菌種が感染に関与していた可能性が高いことを報告した。

4) 脾臓膿瘍：真菌感染が疑われて抗真菌薬を投与中（培養検査陰性）の症例で脾臓膿瘍の膿汁を解析依頼された。上述の真菌全般を検出可能なプライマー（図1）を用いたbroad-range PCR（ITS領域）で増幅産物が得られ、シーケンス解析した結果、*Candida*

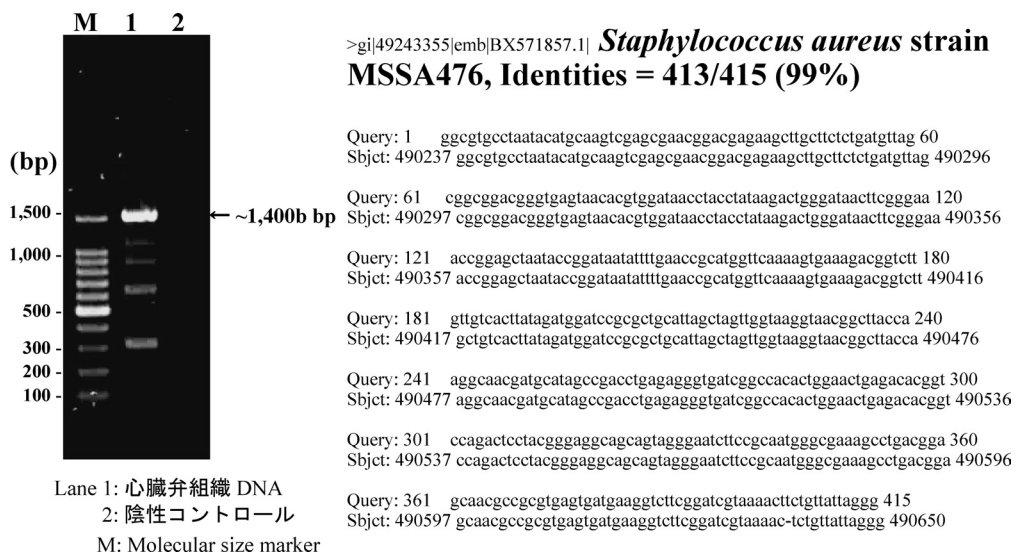


図2. Broad-range PCR による細菌 DNA の増幅と産物の塩基配列解析 & BLAST 検索

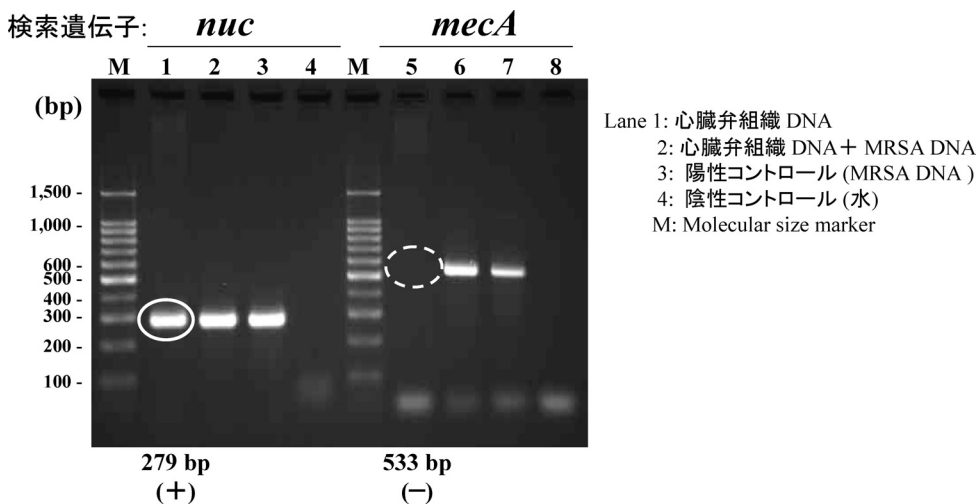


図3. PCR 法による *nuc*, *mecA* 遺伝子の検出

表. 術後弁組織からの起炎菌検出と同定

No.	組織	年齢/性別	培養結果	PCR & DNA 解析による同定菌種名	血液培養検出菌種
1	僧帽弁	20/M	陰性	<i>Staphylococcus aureus</i>	陰性
2	僧帽弁	56/M	陰性	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>
3	僧帽弁	68/F	陰性	<i>Streptococcus mitis</i>	N.D.*
4	三尖弁	78/F	陰性	<i>Streptococcus sanguinis</i>	陰性
5	僧帽弁	65/M	陰性	<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>A. defectiva</i>
6	僧帽弁	65/M	陰性	<i>Streptococcus mutans</i>	陰性
7	僧帽弁	55/M	陰性	<i>Streptococcus sanguinis</i>	陰性

*実施せず

tropicalis であることが判明した。

c. 細菌感染が疑われるも培養陰性

1) 猫ひっかき病¹⁶⁾: 頸部腫瘍膿汁の broad-range PCR で増幅産物が得られ、シーケンス解析の結果、*Bartonella henselae* であることが判明。すぐに、*Bartonella henselae* 検出の特異的なプライマー 2 種類 (16S rRNA および *htrA* 遺伝子領域) を用いて PCR を実施した。双方の特異的遺伝子検出ともに陽性で確診。

2) 先天梅毒¹⁷⁾: 緑白色の混濁した羊水のグラム染色にて好中球が多数観察されるも細菌が観察されない (培養検査も陰性) とのことで精査依頼。細菌性髄膜炎惹起の起炎菌を想定して Hib, 肺炎球菌, GBS, 大腸菌, リステリア菌, そして髄膜炎菌の 6 菌種に特異的な遺伝子の検出を試みるもすべて陰性。平行して実施した broad-range PCR で増幅産物が得られ、シーケンス解析した結果、驚いたことに *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* であることが明らかになった。確認のために、すぐに梅毒トリポネーマに特異的な 47-kDa membrane immunogen 遺伝子を検出するプライマーを設計、準備した後 PCR を実施した結果、陽性。この遺伝子検査にて先天梅毒であることが判明し治療続行。母親の妊娠 12 週での血清梅毒反応は陰性。妊娠後期の感染が示唆された症例である。

d. 染色鏡検で細菌が観察されたが培養で生えてこない

1) 肺膿瘍¹⁸⁾: 胸水のグラム染色にて陰性桿菌が多数観察されるも好気培養および嫌気培養ともに陰性であったことから胸水の精査を依頼された。broad-

range PCR にて増幅産物が得られ、シーケンス解析した結果、*Prevotella* 属の菌種であることがわかったが既存の菌種とは 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性が 97% 以下により新菌種と判明。しかし、新種の登録には菌株そのものを得た後、詳細な性状を明らかにしなければならない。そこで *Prevotella* 属の菌種であることを報告した後、検体採取と輸送および培養環境の嫌気状態を厳密にすることが臨床医と検査室との“ハーモナイゼーション”にて可能となった。この連携の甲斐あって、約 1 カ月後に本菌を培養することに成功。新種 *Prevotella pleuritidis* sp. nov. が記載・登録された¹⁹⁾。本症例は broad-range PCR によって未知の病原体を検出した事例ともいえる。

これと類似したケースとして、腹膜炎症例で腹腔膿汁のグラム染色にて陰性桿菌が多数観察されるも培養陰性。膿汁の同様な遺伝子解析によって *Prevotella melaninogenica* が検出・同定された症例がある。

2) 化膿性リンパ節炎²⁰⁾: 皮膚組織および頸部リンパ節の病理組織学的検査にて抗酸菌が観察されたが、抗酸菌用液体培地で 2 週間培養するも検出できないとのことで凍結していた組織の精査を依頼された。遅速発育抗酸菌全般を検出可能なプライマー (16S rRNA 遺伝子) と抗酸菌の種同定に用いられる *rpoB* と *hsp65* 遺伝子を増幅するプライマーを用いて PCR を実施し、増幅産物を得ることができた (図 4)。これらの増幅された DNA の塩基配列を決定した結果、*Mycobacterium haemophilum* であることが判明。本菌種は至適発育温度が 30°C 前後で、さらにヘミン (鉄) 要求性の抗酸菌であるため汎用されている抗酸菌用液

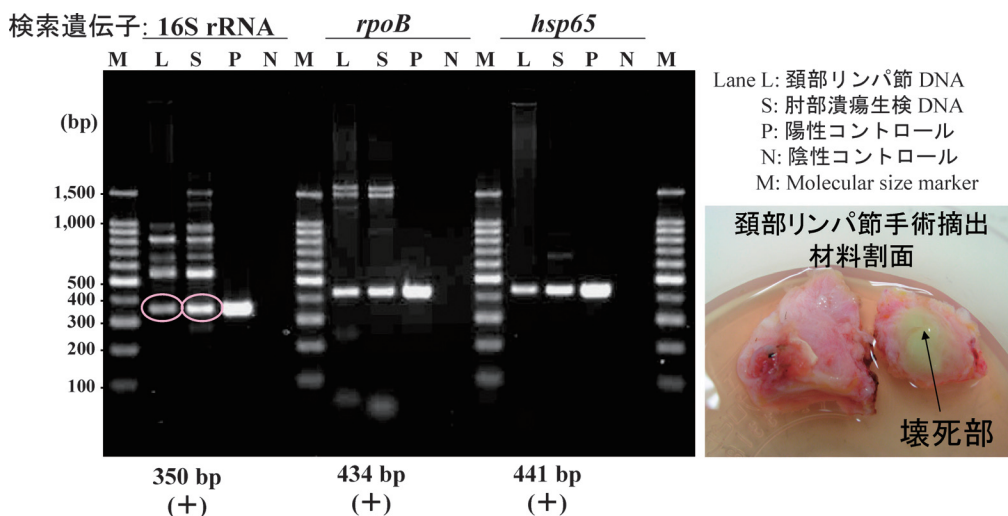


図 4. PCR 法による組織からの *Mycobacterium* 属菌 DNA の検索

体培地や小川培地には発育しない。血液寒天培地や X 因子添加の抗酸菌培地を用いて培養した結果、本菌を分離培養することに成功した。

3) 皮膚潰瘍²¹⁾: 右耳部の結節から採取された膿汁の抗酸染色で菌体が観察され、7H11 培地、小川培地、血液寒天培地を用いて培養を開始。2 週間経過後も集落形成を認めなかったため、膿汁の遺伝子解析依頼があった。膿汁から直接抗酸菌 DNA の検出と同定を試みたところ “*Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense*” であることが判明。培養の温度を 27°C に変更してもらい再度培養を開始。9 週目に数コロニーが得られた。分離菌の遺伝子解析でも本菌種と同定された。

以上の 3 症例は検体の遺伝子解析結果が分離培養条件の変更をも示唆する有益な情報を提供し、さらには新菌種の発見や薬剤感受性実施のための生菌そのものを得ることに結びついた貴重な事例といえる。

4) 尋常性狼瘡²²⁾: 皮膚組織の病理組織学的検査にて抗酸菌が観察されたが外注検査所に依頼した抗酸菌検出の PCR が陰性であったとのことで、皮膚組織の精査依頼。前述の 3 症例と同様な解析手法にて *M. tuberculosis* の遺伝子を検出できた。真性皮膚結核の診断となる。

5) 腸結核: 剖検の回盲部組織の病理組織学的検査にて抗酸菌が観察されたが、数カ月前の症例で組織自体は保存されていなかった。よって、培養で生えてこ

なかったのではなく培養を実施できなかった症例といえる。パラフィン切片を入手してキシレンで溶解した後、DNA を回収した。PCR 法にて抗酸菌の検出を試みた結果、16S rRNA, *rpoB*, *hsp65* 遺伝子がすべて増幅された (図 5)。*M. tuberculosis* の塩基配列であることが判明した。

参考までに、その他パラフィン切片の解析症例としては、リンパ節生検標本から BCG 株の DNA を同定した小児リンパ節炎例、直腸生検組織標本から *Chlamydia trachomatis* の DNA を検出し得たクラミジア直腸炎の 6 例などが挙げられる。

ここで、鏡検で菌が見えているにもかかわらず培養で生えてこない場合の要因をまとめてみよう。①抗菌薬投与後あるいは投与中、②検体搬送もしくは保存中に菌が死滅した、③培養の環境 (嫌気性、微好気性ほかガス濃度) が不適切、④培養の温度が不適切、⑤培養に使用した培地が不適切 (栄養要求性が異なる)、⑥遅発育性の病原体、⑦人工培地での発育が困難な病原体 (前出の梅毒トリポネマ、らい菌ほか) などである。①と②は検査室に到着以前の原因、⑥と⑦は病原体自体に起因するものであるが、臨床サイドとの緊密なコミュニケーションで状況を把握することによって抗原検出や遺伝子検査の選択と実施が可能となるであろう。③～⑤に関しては現場にて対応可能なケースが多く、特に念頭に入れながら検査にあたるのが重要である。

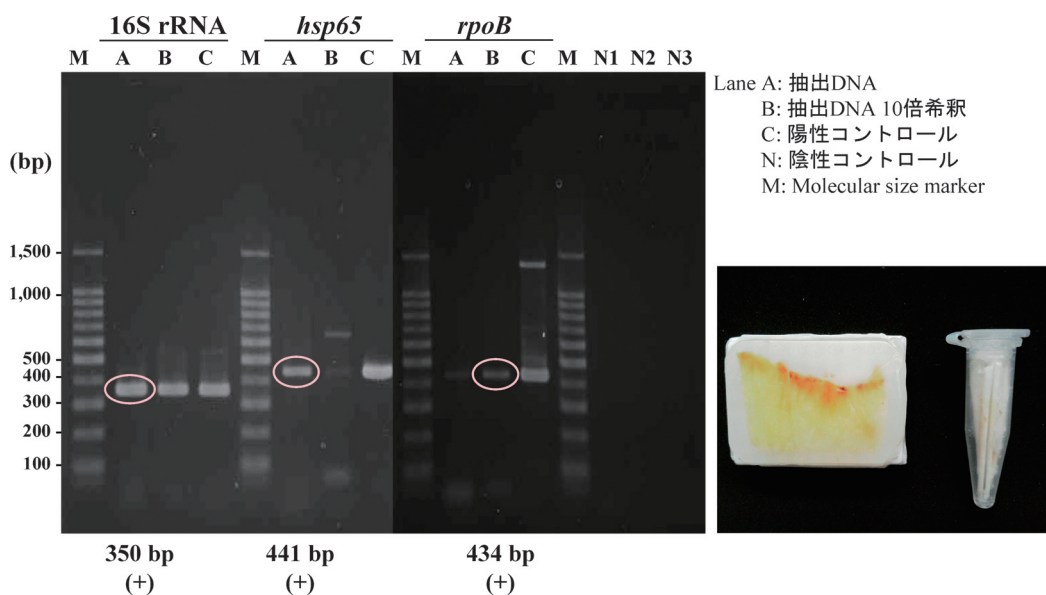


図 5. PCR 法によるパラフィン切片からの *Mycobacterium* 属菌 DNA の検索

e. 抗菌薬治療に全く反応にしない

1) **BCG 骨髄炎の3症例**: 近医の小児科で抗菌薬による治療が行われるも症状の改善をみなかったため、大学病院小児科に紹介入院となった3症例である。症例1²³⁾(岐阜大学)は1歳5カ月の男児で左脛骨の骨透亮像と骨膜肥厚, 症例2²⁴⁾(千葉大学)は4歳女児で左肋骨融解像と皮下腫瘤, そして症例3²⁵⁾(鹿児島大学)は左前胸部の皮下腫瘤と左第6肋骨の溶骨性変化を認めた。症例2と3は検査室で実施の結核菌群PCR法が陽性となったが *M. tuberculosis* と BCG 株を含む *M. bovis* との鑑別はできないことから精査依頼された。このようなケースにおいては, BCG 株では欠損している遺伝子領域 RD1 の両端に特異的なプライマーを使用して PCR を実施する。増幅産物が得られれば BCG 株であることが確認できる。さらに, BCG 東京株は他国で使用されている BCG 株や *M. tuberculosis*, *M. bovis* に存在する RD16 領域に 22塩基分が欠損しているという特徴がある。よって, この RD16 領域の遺伝子を PCR で増幅した後, 産物 DNA の長さ (379 bp) あるいは産物をシーケンス解析して BCG 東京株であることを確認している (図6)。

f. 真菌/原虫感染症の診断

1) **肺アスペルギルス症の2例**²⁶⁾: 症例1は58歳男性。肺癌脳転移に対して2007年2月より全脳照射とステロイド投与を開始した。4週間後より右肺に空洞を伴う浸潤影出現。panipenem, ciprofloxacin にて

改善せず。病変は悪化の一途をたどったが, 生検肺組織の遺伝子解析法にて *Aspergillus fumigatus* が検出され (図7), アスペルギルス感染症と診断された。voriconazole + micafungin 投与にて著明な改善を得て退院。症例2は76歳女性。糖尿病治療中。発熱, 黄色痰にて受診。気腫性変化を背景に左上葉に consolidation。Panipenem, pazufloxacin が無効で急速に悪化した。気管支洗浄液の遺伝子解析にて *A. fumigatus* を検出。肺アスペルギルス症と診断。Voriconazole を投与したところ, 一転軽快し退院。2症例とも通常の培養検査からは起炎菌が同定できず, 血清診断 (β -D-グルカン, アスペルギルス抗原) も陰性であり, 重症化した。遺伝子解析法にて初めて診断が付き, 治療が可能となった症例である。

2) **赤痢アメーバ性脳膿瘍**: 36歳男性。2007年10月より HIV 治療 (HAART) を開始して経過良好であった。2008年2月15日まで元気に仕事をしていった。頭痛と左・上下肢脱力のため21日に緊急入院, 意識はほぼ清明, 歩行困難であった。CT/MRI で右・前頭-頭頂部正中側に脳浮腫を伴う腫瘍病変を認めた。急速に病状進行, 脳膿瘍と思われ, 25日に緊急膿瘍排膿術とドレナージを施行。しかしながら脳浮腫は改善乏しく, 翌日に広汎減圧開頭術を施行し, 人工呼吸器で呼吸管理を開始。トキソプラズマ感染を疑い pyrimethamine, sulfadiazine による治療が開始された。高度な脳腫脹のため一部脳ヘルニアによる脳梗塞を併発, 救命自体が危ぶまれる状況が続いた。28日に脳内

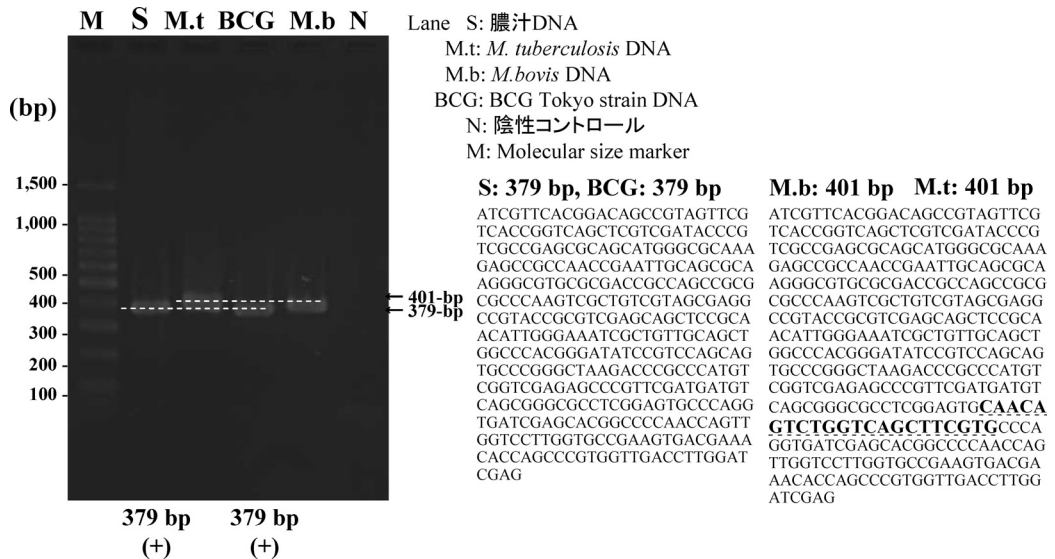


図6. PCR法と塩基配列解析による *M. bovis* BCG 株の同定 (RD16 領域)

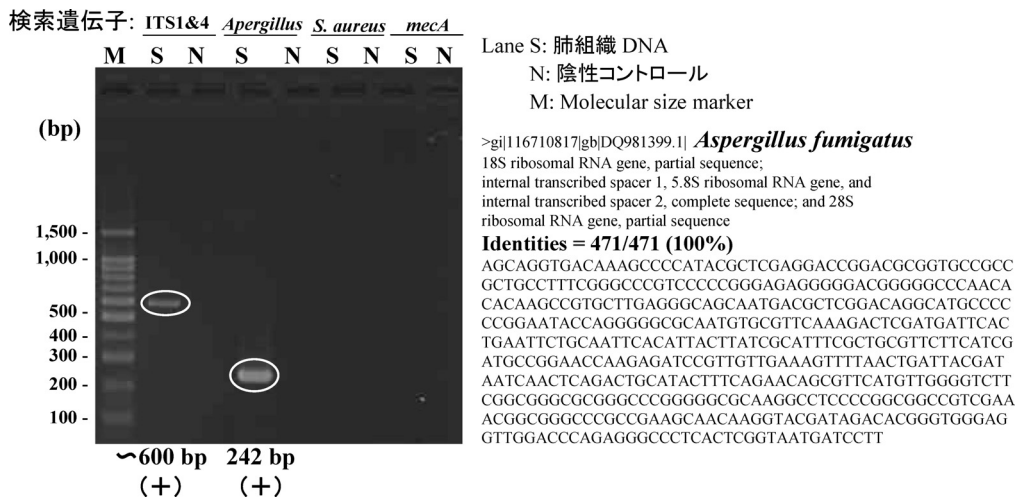


図7. PCR法による肺生検組織からの病原体DNA検出と同定

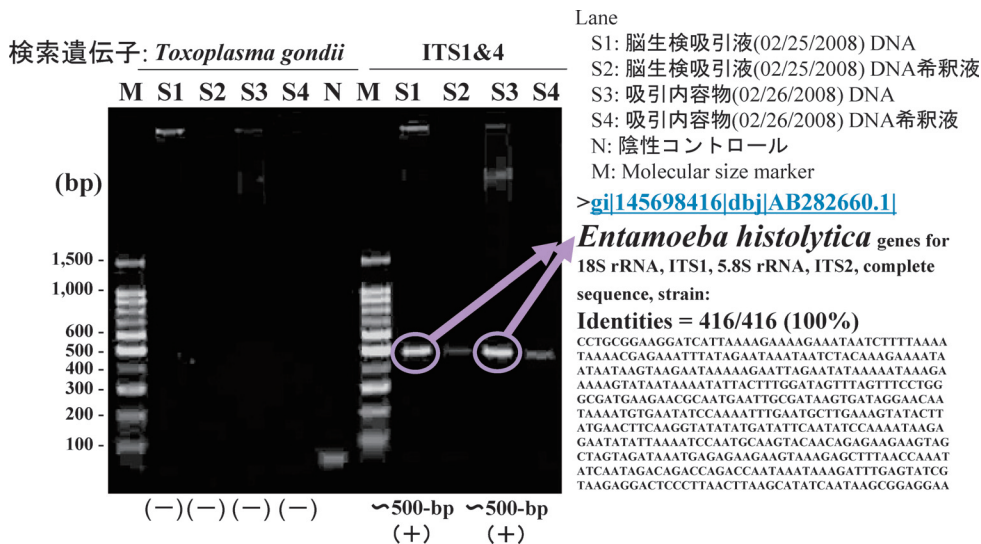


図8. 脳内容液からの病原体DNA検出と同定

容物からのトキソプラズマ検出を依頼された。*Toxoplasma gondii* を特異的に検出するプライマーを用いてPCRを実施するも陰性。念のためにと真菌全般を検出するPCRも同時に実施していたが、増幅産物が得られた(図8)。真菌としては産物の長さが短いと思いつつ大至急この産物のシーケンス解析を行った。その結果、真菌ではなく赤痢アメーバの塩基配列であることが判明。検体到着の夜、電話で主治医に連絡した。すぐに大量のmetronidazole経鼻的投与が奏功して、3月第1週には、右大脳半球腫張の軽減が確認された。10日に脳膿瘍2回目の排膿、ドレナージ術

を行い、3月11日に人工呼吸器から離脱した。

入院時下痢を伴う腸炎はあったもののアメーバは陰性で、腹部エコーで肝膿瘍も認めなかったため赤痢アメーバは想定外だったとのこと。臨床医から提供された患者のサマリーを読み、直感的に真菌もマークしようと考えたが、アメーバも真核微生物で結果的には真菌検出のプライマーで増幅されたことが患者治療に結びついたといえる。つまり、「*T. gondii*を検出のPCRが陰性であった」と報告しただけでは患者を救命できなかったのである。遺伝子検査の“光と影”を実感した症例である。なお、その後実施した赤痢アメーバを

特異的に検出する PCR も陽性であった (図9)。

3) アカントアメーバ角膜炎: 24歳女性。左角膜炎でコンタクトレンズを使用していることやそれまでの治療経過から *Acanthamoeba* sp. が疑われた。鏡検では原虫を確認できなかったことから PCR 法による解析依頼。*Acanthamoeba* sp. を特異的に検出するプライマーを2セット使用して PCR を実施した結果、両方ともに陽性。増幅産物の塩基配列解析でも *Acanthamoeba* sp. であることを確認した。なお、後日培養法でも陽性。

g. ウイルス感染症の診断

1) 新生児ヘルペス²⁷⁾: 血清から単純ヘルペスウイルス (HSV) を検出するプライマーを用いて PCR および real-time PCR を実施した結果、陽性。このプライマーは HSV-1 と HSV-2 の両方の型を一つのプライマー対で検出できるが、その増幅産物の塩基配列を決定することによってどちらの型かを鑑別できるように設計されている。本症例で検出の HSV は 1 型であることもすぐに報告した (図10)。

2) 頸部リンパ節炎²⁸⁾: 抗菌薬療法に抵抗性の化膿性リンパ節炎の診断にて患部穿刺液の精査依頼。細菌に関しては broad-range PCR にて *Streptococcus*

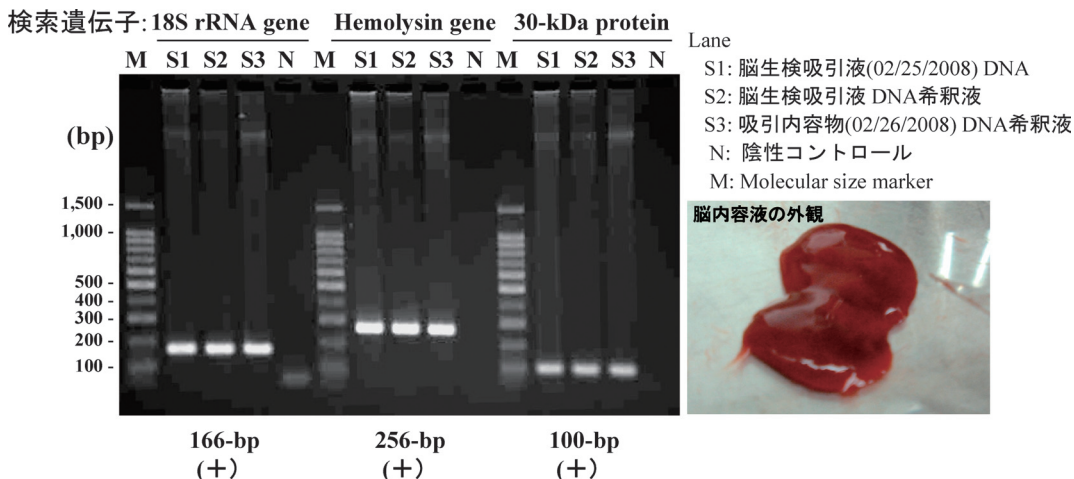


図9. 脳内容液からの赤痢アメーバ DNA 検出

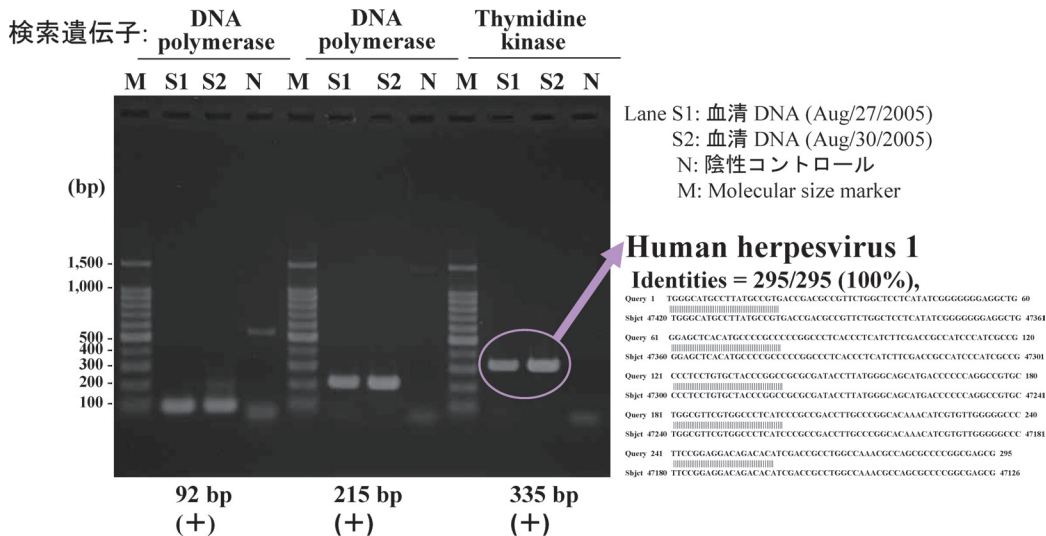


図10. 血清からの Herpes Simplex Virus (HSV-1 & 2) の検出と同定

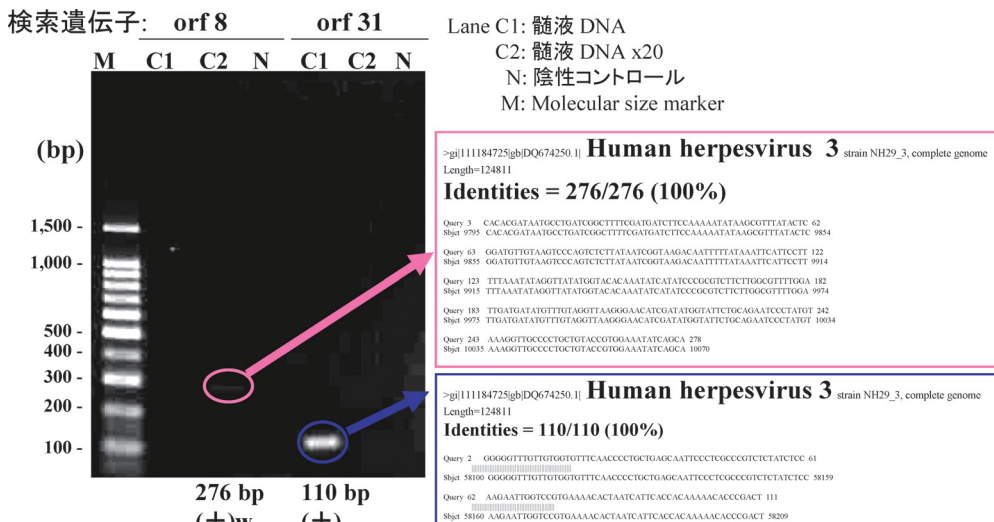


図 11. 髄液からの Varicella Zoster Virus (VZV) DNA の検出と同定

pyogenes が検出され、次に *S. pyogenes* に特異的な遺伝子 (streptolysin O, streptococcal pyrogenic exotoxin B) 検出のプライマーを使用して行った PCR もすべて陽性。ウイルスに関しては HSV, CMV, HHV-6, EBV の検出を試みた結果、EBV のみ陽性であった。*S. pyogenes* と EBV の重複感染による頸部リンパ節炎と診断された。

3) 帯状疱疹に伴う VZV 髄膜炎: 生来健康な 13 歳男児、水痘罹患歴あり。2 日前からの発熱、前日から頭痛、嘔吐を認め、当日体幹に水疱を認め 2007 年 8 月 7 日外来受診した。軽度項部硬直を認め、髄液検査にて細胞数 453/μl (単 452/多 1) であった。無菌性髄膜炎合併帯状疱疹と診断し、同日入院し aciclovir 30 mg/kg/day を 1 週間投与した。入院 2 日後には解熱し経過良好であった。入院時の髄液 PCR にて水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) を検出し、入院 1 週間後の血清 VZV-IgM の陽転化と髄液中 VZV-IgG 陽転化と合わせて VZV 髄膜炎と確定診断。

夏季で無菌性髄膜炎も流行していたことから鑑別のために VZV 検出の PCR 解析を依頼された症例である。臨床経過からウイルス検出には苦戦を強いられることが予想できたので VZV を特異的に検出するプライマーは遺伝子領域を代えて 2 種類準備して、さらに、PCR のサイクル数も通常 40 サイクルのところを 45 サイクルに増加して対応したのが功を奏した。増幅産物が確かに VZV の塩基配列であることもシーケンス解析にて証明した後、報告した (図 11)。

4) 単純ヘルペスウイルス角膜炎: 57 歳女性。コン

タクトレンズを装着していることから、角膜擦過物とコンタクトレンズの洗浄液より *Acanthamoeba* sp. と HSV の検出を依頼された。*Acanthamoeba* sp. 検出の PCR は陰性であったが、HSV 検出の PCR は 2 種類 (遺伝子領域を代えて) 陽性。1) の症例と同様に増幅産物の塩基配列を決定して HSV-1 であることを報告した。この結果報告によって患者はすぐに入院となり、内科的全身治療として HSV の増殖阻止を目的とした aciclovir の投与と炎症の増悪によって生じる膜組織障害を軽減させるためにステロイド薬の投与が開始された。

5) アデノウイルス結膜炎: 36 歳男性。1, 2 週間ほど前に風俗店へ行った後に排尿痛と尿道分泌物を認めていたことから *C. trachomatis* 性結膜炎が疑われた。肉眼的所見はアデノウイルス感染も否定できないためイムノクロマト法による検出を試みたが陰性だったとのこと。そこで PCR 法による *C. trachomatis* とアデノウイルスの検出依頼があった。*C. trachomatis* 検出の PCR は陰性。一方、アデノウイルスを検出する PCR は陽性であった。産物 DNA の塩基配列がアデノウイルスであることも確認した。さらに、性感染症関連でのアデノウイルスの血清型として 19 型と 37 型の頻度が高いことを把握していたため、アデノウイルスの hexon 領域約 900 bp を増幅するプライマーを準備して検体 DNA から直接 PCR 法で検出を試みた。増幅産物が得られ、シーケンス解析の結果、37 型の塩基配列と相同性が極めて高いことが判明した。

眼科医の経験に基づいた臨床診断と経過から日常検

査で確定できなかった原因微生物を、さらに遺伝子解析技術を活用して追及するという臨床医のその熱意に対して検査する側も何とか応えるべく、疫学的な情報も加味して解析を実施した。この診断へのアプローチは単に本症例の診断がついたというだけでなく、臨床医の今後の患者診療にも帰納されていくのだと思うのである。

ウイルス感染症において臨床的に検査の優先度が高いケースとその代表的なウイルスもしくは疾患は次のとおりである。①有効な抗ウイルス薬があり、迅速診断が治療に直結している場合；CMV, HSV, VZV, HIV など、②中枢神経感染症が疑われ、細菌感染との鑑別を要する場合；HSV, HHV-6, インフルエンザ, VZV, エンテロウイルスなど、③移植後もしくは免疫不全患者の日和見感染が疑われる場合；CMV, EBV, VZV など、④院内感染対策上診断が必要な場合；RSV, ノロ, アデノウイルスなど、⑤ワクチンと関連した疾患で疫学上確定診断が必要な場合；麻疹, 風疹, 水痘・帯状疱疹, 日本脳炎, ムンプスなど。その他、治療に使用する抗ウイルス薬が存在しない疾患の場合においても、診断が確定することで不必要な抗ウイルス薬や抗菌薬の投与を見合わせる事が可能となる。

おわりに

以上、現在利用可能な核酸増幅法の特徴をまとめたのち、実際に経験した臨床検体の解析症例を紹介しながら感染症診断における遺伝子解析技術の適応について取り上げた。本稿は感染症の診療における遺伝子検査の役割を紹介しているだけにとどまらない。確かに病因診断に至った切り札は遺伝子解析技術であったかもしれないが、このプロセスの根底に、「感染症の診断と治療は、医師と臨床検査技師との緊密な情報交換による共同作業である」ということを感じ取ってもらえれば幸いである。何よりこのコラボレーションと種々の検査手段を最大限に活用することが、患者診療における貴重な診断的価値としての検査結果をもたらすのだと確信している。

遺伝子検査がかなり身近な存在になったものの、病院検査室で導入するには簡便性、自動化、そして費用対効果の面から克服すべき問題は多々残されている。現時点では塗抹鏡検、抗原検出法、培養法を主体とした日常検査の結果を中心として診断を行いながら、遺伝子検査を活用するのはどのような症例もしくは臨床経過であるかを適切に判断したうえで、外注ラボやしかるべき研究室を利用すれば診断率の向上につながるであろう。なお、私どもの研究室では感染症の診断が

かない臨床検体の解析や同定できない菌株の精査などを今後もできる限り継続して社会貢献活動に取り組んでいきたいと考えている。菌株の系統保存ならびに貴重な症例では共同発表に同意して頂ける場合には、解析を無料にて対応しているので診断、同定に何かお困りの際は筆者までご相談ください (E-mail: ohkusu@gifu-u.ac.jp)。

謝 辞 本稿を終えるにあたり、たいへん貴重な症例の検体を解析する機会を与えていただいた諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 大楠清文, 河村好章, 江崎孝行. 2005. ゲノムベースの細菌検査の基礎. 化学療法領域 21: 323-332.
- 2) 大楠清文. 2004. PCR 法を使った臨床微生物検査の導入時の障害と改善策. p. 28-29, 感染症診療のコツと落とし穴 (斎藤 厚編), 中山書店, 東京.
- 3) Harmasen, D., J. Rothganger, M. Frosch, et al. 2002. RIDOM: Ribosomal differentiation of medical micor-organisms database. *Nucleic Acids Res.* 30: 416-417.
- 4) Chun, J., J. Lee, Y. Jung, et al. 2007. EzTaxon: A web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 57: 2259-2261.
- 5) Rantakokko-Jalava, K., S. Nikkari, L. Jalava, et al. 2000. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J. Clin. Microbiol.* 38: 32-39.
- 6) Brouqui, P., D. Raoult. 2006. New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47: 1-13.
- 7) Fredricks, D. N., D. A. Relman. 1996. Sequence-based identification of microbial pathogens: A reconsideration of Koch's postulates. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 18-33.
- 8) Cockerill, F. R., J. R. Uhl. 2002. Application and challenges of real-time PCR for the clinical microbiology laboratory. p. 3-27, In: *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Application* (U. Reichl, et al. ed.), Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- 9) 大楠清文. 2007. 経済効率を追求した私達の提案米国の現状から考える. *医学検査* 56: 364.
- 10) Markoulatos, P., N. Sifakas, M. Moncany, et al. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.* 16: 47-51.

- 11) 奈田 俊, 馬場尚志, 大楠清文, 他. 2006. *Streptococcus constellatus* による化膿性髄膜炎の1例. 日本臨床微生物学雑誌 16: 抄録集 p. 121.
- 12) 梶濱あや, 坂田 宏, 大楠清文, 他. 2007. *Bacteroides fragilis* による新生児化膿性髄膜炎の1例. 小児感染免疫 19: 101.
- 13) 福岡麻美, 青木洋介, 大楠清文, 他. 2006. 疣贅の遺伝子解析により起炎菌が同定できた急性感染性心内膜炎の1例. 感染症学雑誌 80: 321.
- 14) 竹澤理子, 小野由可, 大楠清文, 他. 2006. 感染性心内膜炎患者の血液と僧帽弁疣贅から *Corynebacterium amycolatum* を検出した1例. 日本臨床微生物学雑誌 16: 抄録集 p. 126.
- 15) Fukazawa, C., K. Ohkusu, Y. Sanayama, et al. 2006. A mixed bacterial infection of a bronchogenic lung cyst diagnosed by PCR. J. Med. Microbiol. 55: 791-794.
- 16) 仲野敦子, 工藤典代, 大楠清文, 他. 2007. 2カ所に頸部膿瘍を形成した猫ひっかき病の小児例. 日本耳鼻咽喉科感染小研究会会誌 25: 157-160.
- 17) 杉原 進, 香月耕多, 大楠清文, 他. 2006. 羊水PCR法により診断がついた先天梅毒の1例. 日本小児科学会雑誌 110: 981-982.
- 18) 正木孝幸, 大楠清文, 江崎孝行. 2006. 化膿性胸膜炎患者の胸水から分離された *Prevotella* 属の新菌種について. 日本臨床微生物学雑誌 16: 抄録集 p. 128.
- 19) Sakamoto, M., K. Ohkusu, T. Masaki, et al. 2007. *Prevotella pleuritidis* sp. nov., isolated from pleural fluid. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 57: 1725-1728.
- 20) 阿部教行, 大楠清文, 小松 方, 他. 2006. 皮膚潰瘍性病変より *Mycobacterium haemophilum* を検出した1例. 日本臨床微生物学雑誌 16: 抄録集 p. 130.
- 21) 鈴木智子, 浅野裕子, 大楠清文, 他. 2008. "*M. ulcerans* subsp. *shinshuense*" による皮膚潰瘍. 皮膚病診療 30: 145-148.
- 22) 長澤智佳子, 清島真理子, 大楠清文, 他. 2007. 高齢者に生じた尋常性狼瘡の2例. 臨床皮膚科 61: 235-238.
- 23) Funato, M., K. Ohkusu, N. Kondo, et al. 2007. Refractory osteomyelitis caused by bacille Calmette-Guérin vaccination: A case report. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 59: 89-91.
- 24) 石和田稔彦, 菱木はるか, 大楠清文, 他. 2008. BCG菌とヒト型結核菌の鑑別にPCR法が有用であった胸部皮下膿瘍・肋骨骨髓炎の1小児例. 感染症学雑誌 82: 30-33.
- 25) 上野健太郎, 西 順一郎, 大楠清文, 他. 2007. BCG 骨髓炎が疑われた2幼児例. 日本小児科学会雑誌 111: 1629.
- 26) 石塚聖洋, 大河内康実, 徳田 均, 他. 2008. 診断に難渋し, 遺伝子解析法が有用であった肺アスペルギルス症の2症例. 第48回日本呼吸器学会抄録集 46: p. 164.
- 27) 菱木はるか, 石和田稔彦, 大楠清文, 他. 2006. 血球貪食症候群を合併した新生児単純ヘルペスウイルス感染症の1例. 感染症学雑誌 80: 739.
- 28) 遠藤真美子, 石和田稔彦, 大楠清文, 他. 2007. A群 β 溶連菌およびEBウイルスの重複感染と考えられた頸部化膿性リンパ節の1例. 感染症学雑誌 81: 94.

Applications of Molecular Diagnostic Techniques for Infectious Diseases

Kiyofumi Ohkusu, Takayuki Ezaki

Department of Microbiology, Gifu University Graduate School of Medicine

In recent years, molecular microbiology techniques have been proven to be useful supplement to conventional assays not only to characterize organisms from culture, but also to directly detect pathogens from clinical samples. PCR-based diagnostics have been effectively developed for a wide range of microbes, including bacteria, fungi, protozoa, and viruses. When culture results remain negative and the clinical suspicion for infection remains high, broad-range PCR and DNA sequencing can be extremely useful. This is especially true when patients have received antimicrobial therapy prior to sample collection (e.g., acute meningitis, culture-negative endocarditis) or when the likely agents are fastidious, slow-growing or uncultivable microorganisms. Furthermore, some pathogens may not be difficult to cultivate but may require special media, growth conditions, or lengthy incubation. Therefore molecular detection and identification should be considered to isolate these organisms, notably in settings where bacteria were microscopically visible in clinical samples but had not been cultured. This review is intended to explore the application of molecular diagnostic techniques for infectious diseases in certain clinical contexts. The overall goal of this article is to assess how these techniques can be integrated to enhance diagnostic capabilities for infectious diseases. Finally, we should put emphasis on the point that close collaboration between physician and clinical microbiologist is required in all cases where molecular diagnostics is contemplated because assays need to be individualized according to the clinical settings.