

図 1 Penicillin G の感受性分布と PBP 遺伝子変異との関係

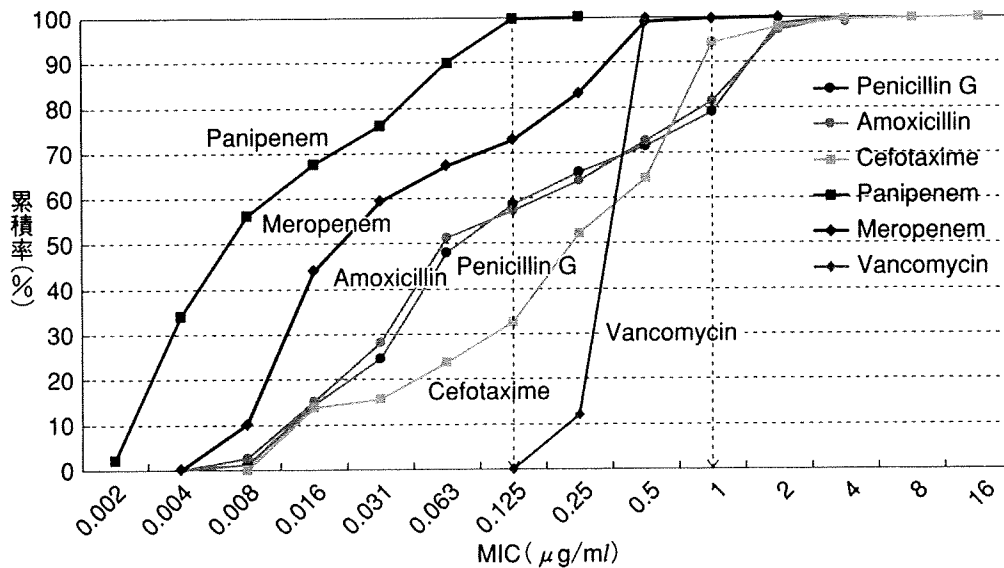


図 2 肺炎球菌に対するβ-ラクタム系薬の感受性累積分布

PBP 変異検索を行ったほうが、治療抗菌薬を選択するうえで合理的であろうと考えている<sup>5)</sup>。

なお、米国 Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) の勧告する“S”，“I”，“R”の識別は、肺炎などに対する注射薬で得られる薬物濃度に適用されるものである。化膿性髄膜炎の場合には、“I”は“R”として対応することと記載されている。わが国のように投与量が相対的に少なく、さらに病巣濃度の低い経口抗菌薬には適用できな

い。

ちなみに、欧米での分離株とわが国の分離株で明らかに異なるのは、セフェム系薬の感受性低下に影響する PBP2X 単独変異株がわが国では多く、ペニシリンが多く処方されている欧米では少ないことである。

図 2 には参考までに注射薬の肺炎球菌全体に対する感受性累積分布を示す。肺炎での薬物濃度の指標として 1μg/ml、化膿性髄膜炎の指標として

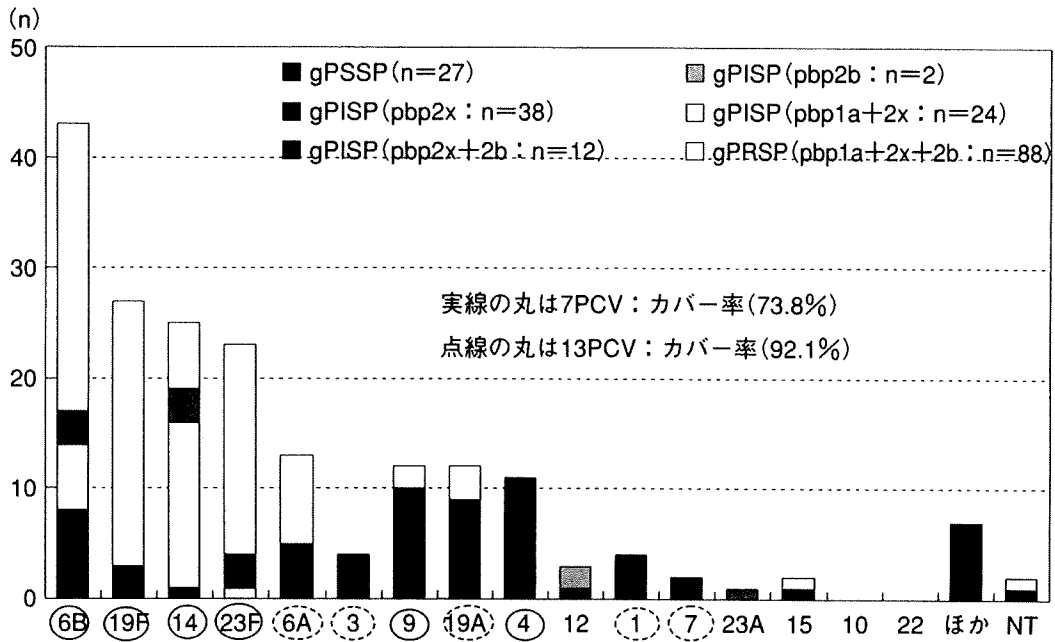


図 3 小児侵襲性感染症由来の肺炎球菌の莢膜型

0.125 μg/ml に点線を引いたが、一部の薬剤では無効例となる可能性もあるので注意が必要である。

ここにはその成績は示さなかったが、肺炎球菌の80%以上はすでにML系薬に耐性化している。耐性化の原因の一つは、以前からよく知られている *erm*(B) 遺伝子によるリボソームをジメチル化する酵素によるもので、この遺伝子を保持すると既存のML系薬すべてに高度耐性化する。もう一つは *mef*(A) 遺伝子保持株で、菌体内へいったん取り込まれたMLを排出する膜蛋白を産生してEM, CAM, AZMに1~8 μg/mlと軽度耐性化している。耐性菌のなかに占める割合は前者が65%、後者が35%前後である。

ここで、肺炎球菌に対するワクチンについて触れておきたい。欧米においては耐性肺炎球菌感染症に対する予防対策として、本菌の病原性にかかわる莢膜(多糖体)に対する7価コンジュゲートワクチン(7PCV)が作られ、すでに接種が施行されて5年経過し、その効果と莢膜型の変化について次々と報告がなされている。一定の感染防御効果は明らかにされているが、莢膜の型が90種もある本菌では、接種後分離される菌の莢膜型が替わってきているとする報告がみられる。わが国においてもいずれ7PCVが登場するであろうが、現状におけるカバー率は図3に示したように、7PCV

(6B, 19F, 14, 23F, 4, 9V, 18C)にはPRSPが多い6B, 19F, 14, および23Fが含まれ、分離菌全体の70%をカバーしている。しかし、19Aや6A、あるいは重症化しやすい中耳炎の原因菌であるムコイド型の3型がカバーされておらず、そのことを考えると可能であれば13PCV接種のほうが望ましい。

### III. インフルエンザ菌

本菌は肺炎球菌とともに上気道からポピュラーに分離され、常在菌として棲息していることが多い。このため、喀痰や咽頭拭い液から分離されたからといって、即原因菌とは判断できない菌でもある。分離菌がそのまま治療対象となるのは、莢膜b型(Hib)菌やその他の莢膜(a, c, d, e, f)を有するインフルエンザ菌が分離された場合と思われる。分離菌の90%以上を占めている莢膜を有しない型別不能株(NT株)を原因菌と確定するには、炎症所見や貪食像などの補助手段が必要となる。

わが国において、β-ラクタマーゼによらない耐性インフルエンザ菌(BLNAR)は2000年前後から出現し始めたが、初期に分離されたBLNARのABPC感受性は、感性菌のピーク(0.25 μg/ml)から微妙にずれて、1~2 μg/ml程度のMICを示

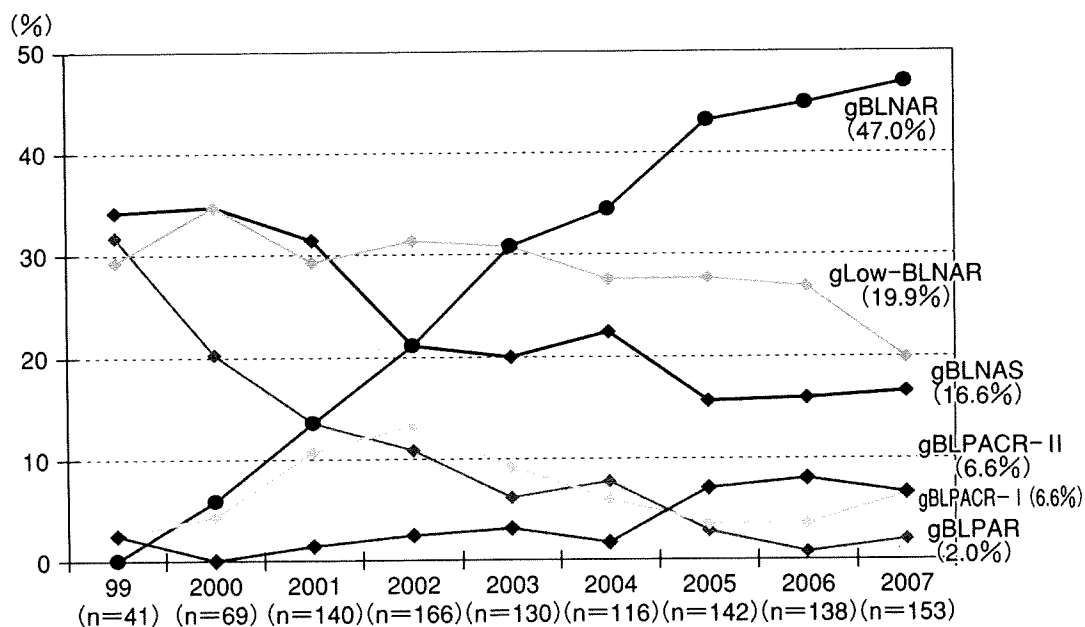


図4 化膿性髄膜炎由来インフルエンザ菌の年次的耐性化動向

す菌であった。また、それらの株ではペニシリン系薬よりも経口セフェム系薬の感受性低下が大きかった。その現象が手がかりとなって、インフルエンザ菌においてもセフェム系薬の主たる作用標的である隔壁合成酵素のPBP3をコードする遺伝子(*ftsI*)に変異が始まっていることを見出した<sup>6)</sup>。

図4には、われわれが化膿性髄膜炎由来のインフルエンザ菌における遺伝子解析を目的として組織した「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究班」が、過去約8年間に小児科の先生方より精査の目的でお送りいただいた菌株における経年的な耐性菌の推移を示す。この98%の株がHib株であり、急速にBLNARが増加し、逆相関のかたちで感性菌(BLNAS)が減少してきている。PFGE解析により菌の相同性を比較すると、その多くが近似のDNAパターンを示し、起原を同じくするHib株が全国へと短期間に拡散したことが示唆される<sup>7~10)</sup>。発症年齢は低年齢化し、1歳未満が70%を占めていた。

図5には、2006~2007年にかけて、全国規模で収集した侵襲性感染症由来株のABPCとCTXの感受性成績と遺伝子変異との関係を示す。遺伝子変異を有するBLNARはBLNASとは離れて耐性側に明らかなグループを形成しているが、感受性低下はセフェム系薬のほうが明らかである。Hibに

よる重症感染症では耐性菌を考慮した治療薬の選択が必要であることが示されているが、 $\beta$ -ラクタマーゼ産生能をも有するPBP変異株(BLPACR-II)が増加傾向にあることにも注意が必要である。

図6にはインフルエンザ菌に対する主な抗菌薬の感受性累積分布を示す。治療上留意しなければならないこととして、インフルエンザ菌に対するCTXやCTRXなどのセフェム系薬の作用は、一見MICが良好にみえるが、本菌の特性として溶菌に時間がかかる。その理由は、MIC前後のセフェム系薬やペニシリン系薬を作用させても、菌は隔壁合成のみが阻害されてフィラメント状を呈するのみであり、その状態では菌は死滅しておらず、薬剤が除去されると容易に元の桿菌へと戻ることができるという特性による。

BLNARによる化膿性髄膜炎の場合には、その耐性レベルによっては作用標的がそれぞれ異なるセフェム系薬とカルバペネム系薬の併用が必要となる。また、図には示していないが、MICが優れているという理由でPIPCを選択する際には、必ず $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌でないことを確認したい。

このようなHibによる侵襲性感染症を防ぐ唯一の対策はHibワクチンの接種であり、一刻も早い接種の開始が期待される<sup>11)</sup>。

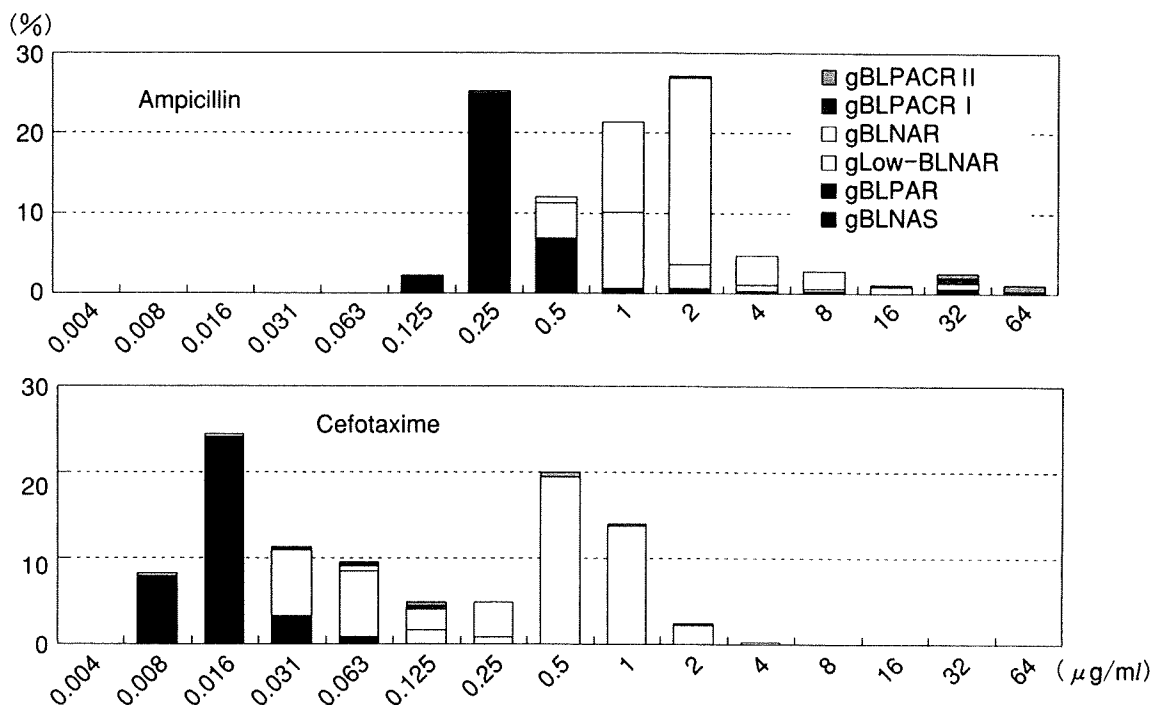


図 5 小児肺炎由来インフルエンザ菌 (2006 年, n=365)

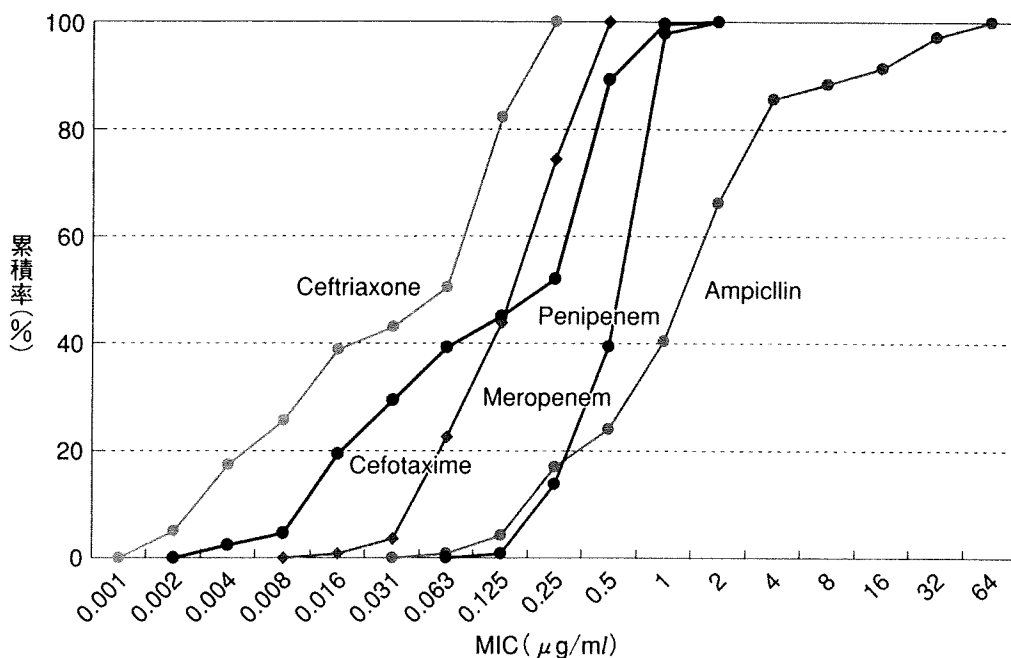


図 6 インフルエンザ菌に対する注射薬の感受性累積分布

IV. 肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*)

ML 耐性マイコプラズマを小児例から初めて分離したのは岡崎ら<sup>12)</sup>であるが、同時期に筆者らの研究室ではマイコプラズマを含む網羅的迅速診断法

の構築を行っており、その精査のために本菌の培養も行っていた<sup>13)</sup>。本菌は呼吸器感染症の重要な原因菌でありながら、分離培養は診断に役立たないためほとんど実施されなくなっているのが現状であるが、ML の広範な使用は、いつか耐性マイコプラズマを選択するであろうと予測していた。

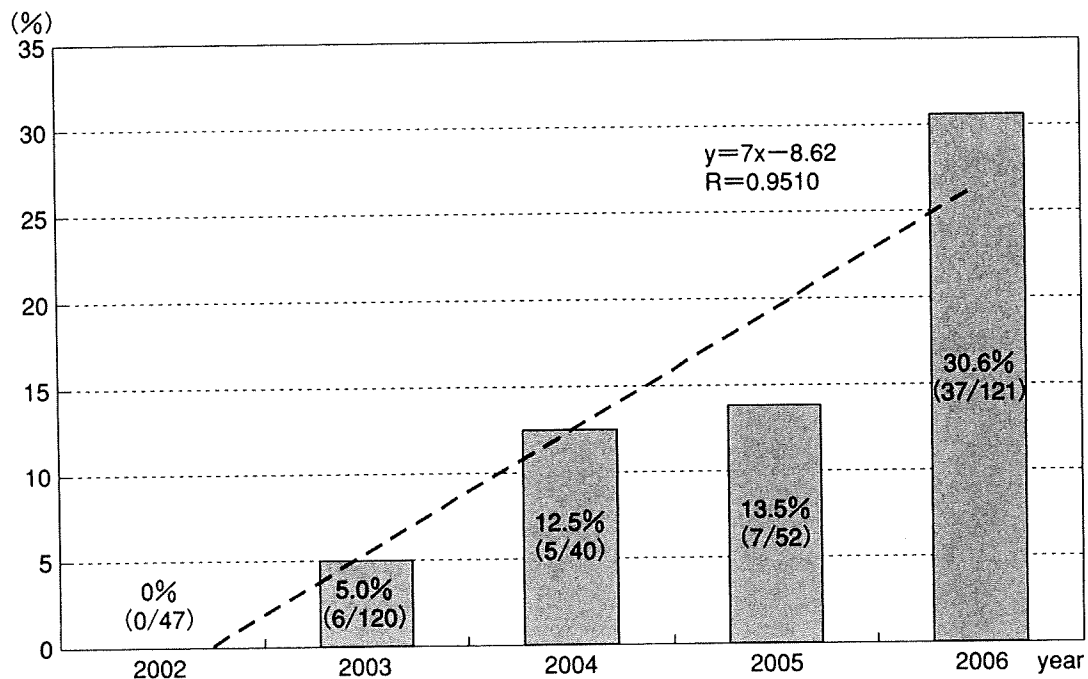


図 7 小児の肺炎例から分離されたマクロライド耐性マイコプラズマの経年的推移

足掛け7年にわたり、小児肺炎例を対象としてPCRによるマイコプラズマ陽性例から菌の分離を行っているが、肺炎例の15~20%がPCR法でマイコプラズマ陽性反応を示し、そのうちの約75%前後から菌そのものを分離している<sup>14)</sup>。

図7には2002年からの小児肺炎例におけるML耐性マイコプラズマの年次推移を示すが、急速に耐性菌が増加してきていることが示されている<sup>15)</sup>。これらの症例は一次診療所において抗菌薬が投与され、解熱しないか、あるいは咳嗽が続くなどの臨床所見から病院受診をしており、必ずしもこの耐性率がそのまま一次診療機関の成績にあてはまるわけではないが、耐性菌が増加してきていることは事実であろう。

図8には、今までに分離した380株のマイコプラズマに対するAZMの感受性成績を示すが、耐性菌の感受性は16μg/ml以上と明らかな耐性である。ここには示していないEM, CAM, TEL, JMなども同様の耐性パターンを示す。この耐性化には、図示したリボソームを構成する23S rRNAのドメインVのアデニン2063がグアニンへ置換、あるいはアデニン2064がグアニンへ置換したことによって生じている<sup>16)</sup>。

マイコプラズマ感染症は自然治癒傾向が強いと

いわれるが、耐性マイコプラズマ感染症ではML系薬を投与しても臨床症状が遷延化する例が有意に多く、抗菌薬をMINOなどに変更せざるを得ない例が増えているとされる。耐性マイコプラズマの場合には、治療薬として適切な抗菌薬が少なく、今後いずれの治療法が最適であるのか検討が必要であろう。

#### V. A群溶血性レンサ球菌 (GAS) と B群溶血性レンサ球菌 (GBS)

GASおよびGBSにおいては、ペニシリン耐性菌は存在せず、また耐性菌も出現しないのではないかと考えられてきた。表2に示すように、確かに両菌種ともペニシリン系薬に明らかな耐性を示す菌株は分離されていないが、GBSではごくわずかではあるものの肺炎球菌のPBP2Xの遺伝子に相当する遺伝子に変異を有する菌株が出現し始めている。ペニシリン系薬には試験管で2~3管程度の感受性低下であるが、セフェム系注射薬には感受性が明らかに低下してきているので、GBSによる化膿性髄膜炎などにおいては今後注意を払わなければならないと考える。また、GASにおいても今後このような耐性菌が出現してくる可能性は十分に考えられる。

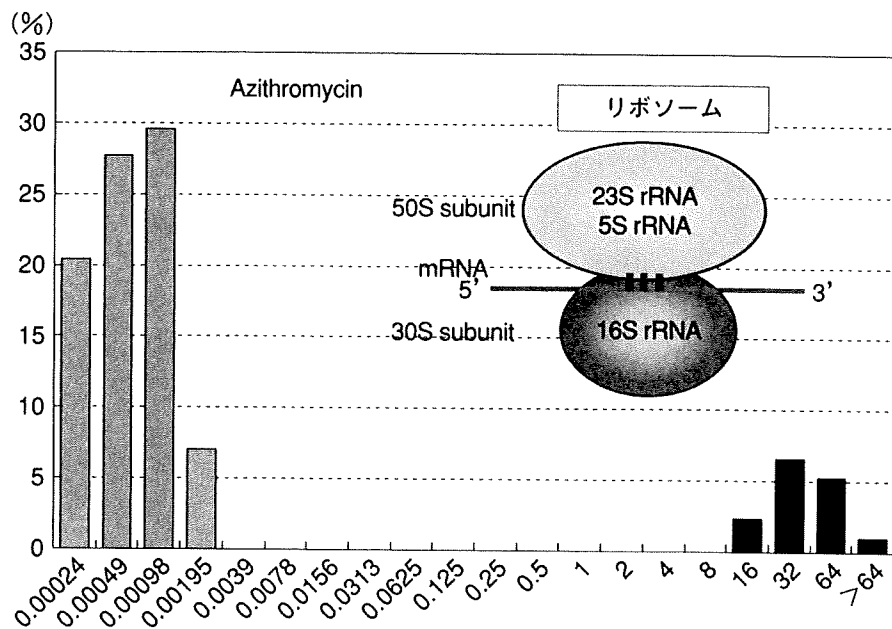


図 8 マイコプラズマのマクロライド薬感受性 (n=380) EM, CAM, TEL などにも同様の感受性パターンを示す。

表 2 GAS と GBS の各種抗菌薬感受性

抗菌薬	GAS		GBS	
	MIC range	MIC <sub>90</sub>	MIC range	MIC <sub>90</sub>
ampicillin amoxicillin	0.008~0.031	0.031	0.031~0.25	0.125
cefdinir cefditoren	0.002~0.016	0.016 0.008	0.016~0.125 0.016~0.063	0.063 0.031
cefazolin	0.063~0.125	0.125	0.063~0.5	0.25
cefotiam	0.031~0.125	0.063	0.125~2	0.5
cefotaxime	0.004~0.031	0.016	0.016~0.125	0.063
panipenem	0.002~0.008	0.008	0.008~0.031	0.031
meropenem	0.002~0.016	0.008	0.031~0.125	0.063
vancomycin	0.25~1	0.5	0.25~0.5	0.5

一方、ML 耐性であるが、これらの耐性化には菌種を越えて共通している耐性遺伝子がかかわっている。すなわち、高度耐性化には ML を修飾 (ジメチル化) して耐性化する *erm* (A) あるいは *erm* (B) 遺伝子、軽度耐性化には ML を排出する機構の *mef* (A) 遺伝子が関与している。これらの耐性菌は全分離株の 15% 前後であるが、2000 年代の初期には耐性菌は 2~3% であったことを思うと、漸増傾向にあることが示唆される。

ま と め

抗菌薬の登場から 60 年近い年月における耐性菌

出現と薬剤との関係を見ると、新たに開発された新規骨格を有する抗菌薬であっても、その出現の時期が早いか遅いかは別として、いつかは必ず耐性菌が出現してくるととらえることができる。なぜなら、菌の分裂速度が速い大腸菌から遅い結核菌までさまざまではあるが、それらの宿主であるヒトの世代交代に較べれば比べものにならない増殖スピードであることによる。つまり、ある系統の薬剤の使用量が短期間で爆発的に増加すると、菌のポピュレーション中に含まれる耐性菌は選択されやすいことになる。ニューキノロン系薬耐性肺炎球菌や VRE については、わが国よりもその

使用頻度が高かった欧米において先に出現したのはこのことを物語っている。

優れた抗菌薬を長期にわたって使うためには、原因細菌を特定した後に最適な抗菌薬を適切な期間使用することにつきる。しかし、実行しようとなると、なかなか難しいことも事実である。適切な抗菌薬療法を普及させるため、小児科、耳鼻咽喉科をはじめとして各種ガイドラインが作成されている。

その一方、検査の現場においては、ルーチンに使用可能な PCR 法が構築されつつある。筆者らは短時間にしかも網羅的に原因微生物を検索できる real-time PCR 法を構築した。上咽頭拭い液、鼓膜穿刺液、喀痰、胸水、閉鎖性膿汁、髄液などの検査材料に用いることが可能で、①肺炎球菌、②インフルエンザ菌、③マイコプラズマ、④ GAS を含む  $\beta$  溶血性レンサ球菌、⑤ *Chlamydomphila pneumoniae*、⑥ *Legionella pneumophila* が検索対象菌種となっている<sup>17)</sup>。

この方法に 1 ステップ加わるが、呼吸器系ウイルスの 12 種類を同時に検索することも可能である。アデノウイルス (AdV)、インフルエンザ (Flu) A, B, RSV, パラインフルエンザウイルス (PIV) 1, 2, 3, ライノ (RV), エンテロ (EV), コロナ (CoV) ウイルス, そして比較的最近発見されたヒューマンメタニューモウイルス (hMPV), ヒューマンボカウイルス (HBoV) である。

細菌とウイルスを同時検索することにより、原因微生物の推定ができるようになると、診断においても、また抗菌薬適正使用のうえでもそのメリットは大きいと考える<sup>18)</sup>。

## 文 献

- 1) 紺野昌俊：抗菌薬の開発と薬剤耐性菌の歴史。日本臨床微生物学雑誌 14：1-23, 2004
- 2) Ubukata, K：Problems associated with high prevalence of multidrug-resistant bacteria in patients with community-acquired infections. J Infect Chemother 9：285-291, 2003
- 3) 生方公子：呼吸器感染症原因微生物の質的变化による薬剤耐性化。日化療誌 54：69-94, 2006
- 4) 紺野昌俊, 生方公子編：改定ペニシリン耐性肺炎球菌。協和企画通信, 東京, 1999
- 5) Ubukata K, Muraki T, Igarashi A, et al：Identification of penicillin and other  $\beta$ -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by PCR. J Infect Chemother 3：190-197, 1997
- 6) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, et al：Association of amino acid substitution in penicillin-binding protein 3 with  $\beta$ -lactam resistance in  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 45：1693-1699, 2001
- 7) Hasegawa K, et al：Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. Microbial Drug Resistance 9：39-46, 2003
- 8) Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, et al：Rapidly increasing prevalence of  $\beta$ -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in meningitis. Antimicrob Agents Chemother 48：1509-1514, 2004
- 9) 長谷川恵子, 千葉菜穂子, 小林玲子, 他：化膿性髄膜炎例から分離された *Haemophilus influenzae* の疫学解析—1999 年から 2003 年の分離株について—。感染症学雑誌 78：835-845, 2004
- 10) Hasegawa K, Kobayashi R, Nakayama E, et al：High prevalence of type b  $\beta$ -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in meningitis：the situation in Japan where Hib vaccine has not been introduced. J Antimicrob Chemother 57：1077-1082, 2006
- 11) 岩田 敏：肺炎球菌およびインフルエンザ菌感染症に対するワクチン接種の意義と今後の展望。日本臨床微生物学雑誌 18：1-7, 2008
- 12) Okazaki N, Narita M, Yamada S, et al：Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro*. Microbiol Immunol 45：617-620, 2001
- 13) Morozumi M, Hasegawa K, Chiba N, et al：Application of PCR for *Mycoplasma pneumoniae* detection in children with community-acquired pneumonia. J Infect Chemother 10：274-279, 2004
- 14) Morozumi M, Ito A, Murayama SY, et al：Assessment of real-time PCR for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients. Can J Microbiol 52：125-129, 2005
- 15) Morozumi M, Hasegawa K, Kobayashi R, et al：

- Emergence of macrolides-resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA gene mutation. *Antimicrob Agents Chemother* 49 : 2302-2306, 2005
- 16) Morozumi M, Iwata S, Hasegawa K, et al : Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric patients with community-acquired pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 52 : 348-350, 2008
- 17) Morozumi M, Nakayama E, Iwata S, 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
- 18) Nakayama E, Hasegawa K, Morozumi M, 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 Chemther* 13 : 305-313, 2007

\* \* \*



# リアルタイムPCR法による 呼吸器系ウイルスの網羅的検索

\* 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  
諸角美由紀, 生方公子

## はじめに

近年、肺炎球菌、インフルエンザ菌、肺炎マイコプラズマ、A群溶血性レンサ球菌等の呼吸器感染症原因菌において、急速に耐性化が進行し、難治例が認められている<sup>1-3)</sup>。細菌感染症に対し、適切に対応するためには、入院時に短時間で原因微生物が特定されることが望ましいことは論を待たない。そのためには、抗菌薬投与の対象となる細菌感染と、対象とはならないウイルス感染の検索が同時に実施できれば、最も適切な抗菌薬選択が可能となるはずである。

ウイルス検査では外来診療で簡便に使用できるRSVやinfluenza

virusの迅速診断キットが普及してきているが<sup>3)</sup>、その感度は $10^3 \sim 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL程度である。また、発症後の経過日数によってもウイルス陰性と判定される場合も多い。このようなことから、従来のPCR法に較べさらに進歩したリアルタイムPCR法によるウイルスの同時検策が<sup>3)</sup>、診断を目的として注目され始めている<sup>4-6)</sup>。

ここでは、私達が新たに構築した12種類の呼吸器系ウイルスを同時に検策するリアルタイムPCR法について、その概略と成績を述べる。

## 1. リアルタイムPCR法の原理と検索ウイルス

リアルタイムPCR法にはいくつかの方法が報告されているが、私達はその中のモレキュラービーコンプローブ(MB)を用いたリアルタイムPCR法を選択している。この原理を図1に示す。この特徴は、蛍光色素と発色抑制物質(クエンチャー)を付けたMBプローブを用いていることにある。プライマーによって増幅されたDNA鎖の内側にMBプローブが結合すると、蛍光物質がクエンチャーの抑制から解除され、発色する。DNAの増幅量と併行して蛍光発色量が増加するのを自動的に測定する仕組みである。MBプローブは増幅DNAに結合するので、通常のPCRに較べて特異度が高く、陽性シグナルが35サイクルよりも早い段階で確認できれば、その時点で該当するウイルス陽性であろうと報告できる。

表1には構築されたキット中に含まれる12種のウイルスを示してある。Respiratory syncytial virus (RSV) subgroup AとB, influenza virus AとB (Flu A, Flu B), parainfluenza virus 1-3 (PIV1, PIV2, PIV3), adenovirus (AdV), rhinovirus (RV), enterovirus (EV), coronavirus (CoV), hu-

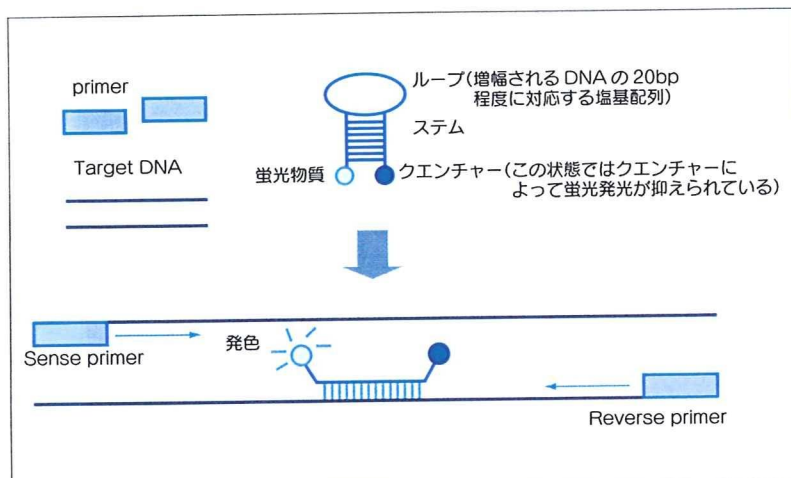


図1 蛍光プローブを用いるリアルタイムPCR法

\* 〒108-8641 東京都港区白金5-9-1  
E-mail ubukatak@lisci.kitasato-u.ac.jp

man metapneumovirus (hMPV) や human bocavirus (HBoV) である<sup>7~9)</sup>。なお、AdVとEVについてはタイプが多いためそれぞれすべてを検索できるわけではなく、主なタイプのみ検索可能である。

## 2. DNA/RNA抽出から結果判定までの操作

検査材料処理から結果を得るまでのプロトコールは図2に示す。材料からのDNA/RNA抽出にはEXTRAGEN II<sup>®</sup>核酸抽出キット(東ソー株式会社)を用いる。簡単な遠心操作を2回行わなければならないが、抽出の所要時間は10~15分程度である。得られた40 $\mu$ Lの抽出液は、細菌検索用とウイルス検索用とに二分し、細菌は直ちにリアルタイムPCRを実行、ウイルス検索にはまずcDNAの合成を行う。合成には15分で終了するPrimeScript<sup>™</sup> RT reagent kit(タカラバイオ株式会社)を使用する。サンプル処理から結果が得られるまでの所要時間は、約2時間である。ただし、前述したように、ウイルスが大量に含まれるサンプルでは、陽性反応の蛍光シグナルが早い段階で確認できるので、さらに短時間で結果が得られる。

表1 検索対象としたウイルス

ウイルス名	標的タンパク*
1. Respiratory syncytial virus (RSV) subgroup A と subgroup B	Fタンパク(F)
2. Influenza virus A (FluA)	非構造タンパク(NS1)
3. Influenza virus B (FluB)	核タンパク質(NP)
4. Parainfluenza virus 1 (PIV1)	ヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ(HN)
5. Parainfluenza virus 2 (PIV2)	ヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ(HN)
6. Parainfluenza virus 3 (PIV3)	ヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ(HN)
7. Adenovirus (AdV)	ヘキソン(hexon)
8. Rhinovirus (RV)	非翻訳領域(5' NCR)
9. Enterovirus (EV)	非翻訳領域(5' NCR)
10. Coronavirus (CoV)	スパイク糖タンパク(S)
11. Human metapneumovirus (hMPV)	核蛋白質(NP)
12. Human bocavirus (HBoV)	非構造タンパク(NP-1)

\*プライマーにはこれらのタンパクをコードする遺伝子の特異性の高い領域を選択

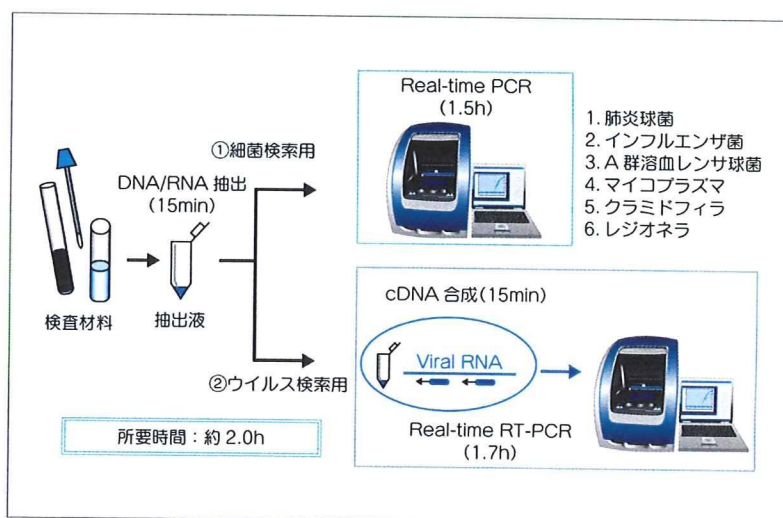


図2 リアルタイム PCRによる細菌/ウイルスの迅速検索プロトコール

## 3. 小児肺炎例への応用

図3Aには小児の肺炎例を対象として細菌とウイルスを同時に検索した際の原因微生物の内訳を示す。これらはARD (Acute Respiratory

Diseases) 研究会(代表: 独立行政法人国立病院機構東京医療センター 岩田 敏先生)に参加した医療機関の小児科医師より送付を受けた1,700症例の成績である<sup>10)</sup>。

細菌検索については、肺炎球

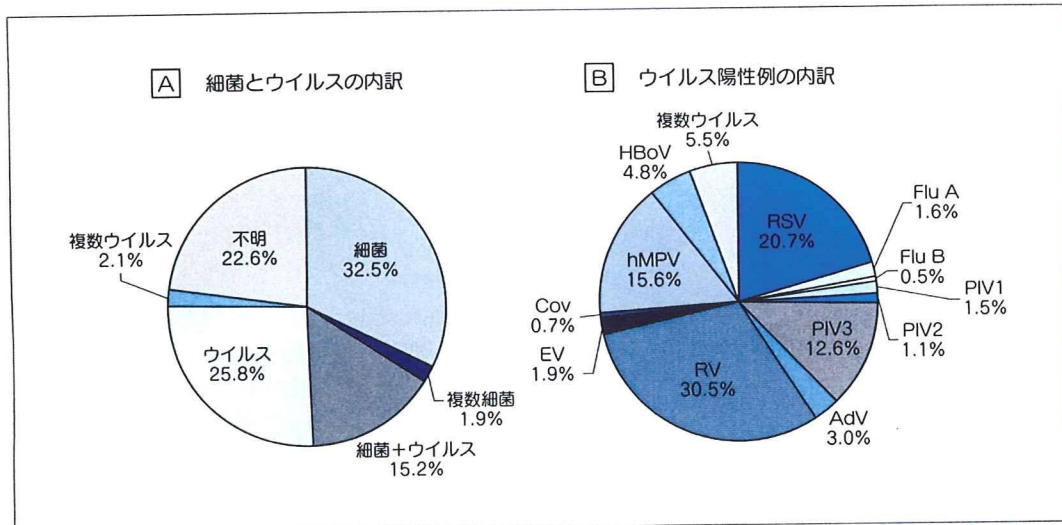


図3 小児肺炎例に対するリアルタイムPCRでの陽性例の内訳

菌、インフルエンザ菌、肺炎マイコプラズマ、肺炎クラミドフィルなどを網羅的に検索するキット「CycleavePCR®呼吸器系感染症起因菌検出キット」と培養法を併用している。細菌の場合、臨床検査値なども参考にしているが、細菌単独感染と推定された症例は32.5%、複数菌感染推定例が1.9%、ウイルスと細菌の混合感染推定例が15.2%、ウイルス単独感染推定例が25.8%、複数ウイルスの感染推定例が2.1%であった。残りの22.6%は原因微生物が特定できていない。

全体としてのウイルス陽性率は43.0%であったが、その内訳は図3Bに示す。最も多かったのはRVで30.5%、次いでRSVが20.7%、最近注目されているhMPVが15.6%、PIV3が12.6%、そして最も新しいHBoVが4.8%であった。ウイル

ス単独感染が多かったのはRSV(67.3%)、hMPV(67.2%)、PIV(60.7%)であった。RV陽性例では、ほぼその半数が細菌との混合感染であろうと推定された。

誌面の関係でその成績は示さなかったが、ウイルス検索では検体採取日が重要であり、発症から4病日頃までの陽性率は40~50%台であったのに対し、5病日以降の陽性率は急速に低下していた。ウイルス検索ではその点留意すべきであろう。

また当然のことながら、ウイルスには季節性があるので、季節にあわせて検索ウイルス数を少なくすることができるように考える。

### おわりに

抗菌薬の適正使用には、原因微生物を迅速に確定し、それに基づいて抗菌薬を選択し、使用するこ

とに尽きる。診断としての原因微生物の迅速検索には、細菌のみならず、ウイルスをも網羅的に調べることが必要である。ウイルス単独感染であることが明らかになれば、本来、対症療法のみで十分なはずである。

「正確な診断に基づいて治療抗菌薬を選択する」という視点に立つと、リアルタイムPCR法によるウイルスと細菌の網羅的検索法は、そのための有用な手段となるであろうことが期待されている。

## 参 考 文 献

- 1) Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, *et al.* Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb Drug Resist* 2003; 9: 39-46.
- 2) Morozumi M, Iwata S, Hasegawa K, *et al.* Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric patients with community-acquired pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 348-50.
- 3) Ubukata K, Iwata S, Sunakawa K. *In vitro* activities of new ketolide, telithromycin, and eight other macrolide antibiotics against *Streptococcus pneumoniae* having *mefA* and *ermB* genes that mediate macrolide resistance. *J Infect Chemother* 2003; 9: 221-6.
- 4) Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, *et al.* Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol* 2006; 19: 165-256.
- 5) Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, *et al.* Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1564-9.
- 6) U.S. Food and Drug Administration. [cited January 2008]. Available from: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2008/NEW01770.html>
- 7) Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, *et al.* Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 2004; 72: 484-95.
- 8) Grondahl B, Puppe W, Hoppe A, *et al.* Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1-7.
- 9) Kusel MM, Klerk de NH, Holt PG, *et al.* Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: a birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: 680-6.
- 10) Hasegawa K, Morozumi M, Nakayama E, Chiba N, Takayanagi R, Iwata S, Ubukata K, and Acute Respiratory Diseases Study Group. Comprehensive Detection of Causative Pathogens Using Real-time PCR to Diagnose Pediatric Community-Acquired Pneumonia. *Can J Microbiol* に投稿中.



## 技 | 術 | 講 | 座 |

# リアルタイム PCR 法の原理と呼吸器感染症原因菌の網羅的検索への応用

Theory and practice of real-time PCR for simultaneous detection of etiologic agent in patients with respiratory tract infection



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\* / 同教授\*\*  
諸角美由紀\*・生方公子\*\*

MOROZUMI Miyuki ; UBUKATA Kimiko : Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents, Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University

呼吸器感染症原因菌を網羅的に検索する方法として、私達が構築した、主要な細菌 6 種類とウイルス 13 種類を同時に検索できるリアルタイム PCR 法について概説する。本法では 2 時間弱で結果が得られ、ルーチン検査へも応用可能と思われる。原因菌の網羅的迅速検索は、適切な抗菌薬療法のうでが必要不可欠である。

## はじめに

市中で罹患する急性呼吸器感染症のおもな起炎菌は、肺炎球菌、インフルエンザ菌、マイコプラズマ・ニューモニエ (マイコプラズマ), A 群溶血性連鎖球菌 (GAS), クラミドフィラ・ニューモニエ (クラミドフィラ) などであるが、小児と成人におけるそれらの割合は著しく異なる。5 歳以下の小児では、肺炎球菌やインフルエンザ菌の割合が高く、学童期にはマイコプラズマやクラミドフィラの割合が高くなる。また、肺炎などにおいては、原発感染としてウイルス関与が大きいとされる。他方、成人においては、宿主側の基礎疾患の有無が重要で、それによって起炎菌も異なってくる。加えて、呼吸器感染症の原因菌において急速に耐性化が進行し、難治例や予後不良例が増加している。

細菌感染症例に対して入院初期から適切な抗菌薬療法を行うには、その対象となる細菌感染症例と、本来対症療法のみでよいはずのウイルス感染

症例を短時間で特定できることが望ましく、診断学上も有用なはずである。

近年、細菌やウイルスの一部で、外来診療の場で使用可能な迅速診断キットが普及してきている。しかし、これらのキットの感度には限界があり、偽陰性や偽陽性を示すことも少なくないのが現状である。また、ウイルスにおいては、発症後の経過日数によってもウイルス陰性と判定される場合も多い。

このような背景から、従来の電気泳動を伴う PCR (polymerase chain reaction) 法から格段に進歩したリアルタイム PCR 法が、臨床への応用といった視点で注目されている。

本稿では、私達が構築した呼吸器感染症原因菌の 6 菌種と、呼吸器系ウイルス 13 種類を同時に検索するリアルタイム PCR 法について、その概略を述べ、また小児、成人での成績を述べたい<sup>1-3)</sup>。

## リアルタイム PCR 法の原理

リアルタイム PCR 法には、LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法を含めていくつかの方法が報告されている。私達はそのなかで、図 1 に示すモレキュラービーコン (MB)・プローブ、あるいはサイクリング・プローブを用いた方法を選択している。この MB 法の特徴は、プローブの 5'末端に蛍光色素として FAM (6-carboxyfluorescein) あるいは ROX (carboxy-X-rhodamine) を結合し、3'末端には発色抑制物質であるクエンチャー (black hole quencher 1, BHQ-1) を結合

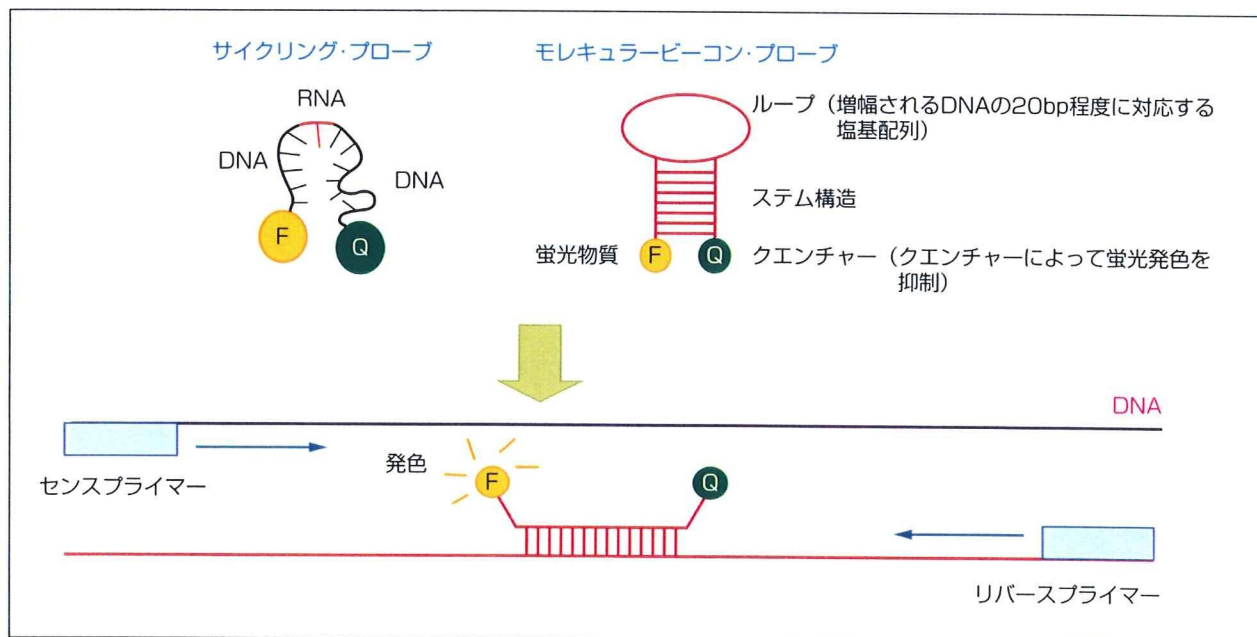


図 1 蛍光プローブを用いるリアルタイム PCR 法  
 蛍光物質：FAM (6-carboxyfluorescein), ROX (carboxy-X-rhodamine).  
 クエンチャー：BHQ-1 (black hole quencher 1).

させる。センスプライマーとリバースプライマーによって増幅された DNA 鎖の内側に MB プローブが結合すると、蛍光物質がクエンチャーの抑制から解除され発色する。DNA の増幅量と併行して蛍光発色量が増加するので、その発色量をレーザーで 1 サイクルごとに自動測定する仕組みである。MB プローブは増幅 DNA に結合するため、従来の PCR 法に較べて特異度が高く、陽性シグナルが 30 サイクルよりも早い段階で確認できれば、その時点で該当する細菌あるいはウイルスは陽性であろうと報告できる。

蛍光色素をつけたプローブを用いる本法は、従来法に較べ、DNA の増幅がモニターできること、非特異な増幅がほとんどみられないこと、抗菌薬療法によってダメージを受けた微生物の DNA 断片も検索可能であること、そして電気泳動が不要などの利点がある。今日、PCR 機器類と試薬の著しい進歩により、臨床検査室への導入も可能となっている。

ちなみに、リアルタイム PCR 用の機器としては、Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> (タカラバイオ), Mx3000P<sup>®</sup>

(アジレント・テクノロジー), LightCycler<sup>®</sup> (ロシュ・ダイアグノスティックス), リアルタイム PCR システム (アプライドバイオシステムズジャパン) などがおもなものである。

### 細菌とウイルス検索の標的遺伝子

私達が構築した呼吸器感染症起炎菌検出用キット (タカラバイオ) には、①肺炎球菌 (自己融解酵素をコードする *lytA* 遺伝子), ②インフルエンザ菌 (16S rRNA 遺伝子), ③β溶血性連鎖球菌 (16S rRNA 遺伝子と *slo* 遺伝子), ④マイコプラズマ (16S rRNA 遺伝子), ⑤クラミドフィラ (16S rRNA 遺伝子), ⑥レジオネラ・ニューモフィラ (16S rRNA 遺伝子と *mip* 遺伝子) の 6 種が含まれている。β溶血性連鎖球菌は 2 種類の遺伝子で GAS とその他のβ溶血性連鎖球菌を区別、レジオネラも同様に 2 種類の遺伝子でレジオネラ・ニューモフィラと他のレジオネラ属を区別している。この場合には一つのウェルで 2 種の遺伝子を解析するため、蛍光色素は FAM と ROX を用いている。

表 1 検索対象とした呼吸器系ウイルス

ウイルス (略称)	核酸の種類	増幅する目的遺伝子
1. adenovirus (AdV)	DNA	ヘキソン (hexon)
2. influenza virus A (Flu A)	RNA	非構造蛋白 (NP1)
3. influenza virus B (Flu B)	RNA	核蛋白質 (NP)
4. RSV (subgroup A)	RNA	F 蛋白 (F)
5. RSV (subgroup B)	RNA	F 蛋白 (F)
6. parainfluenza virus 1 (PIV1)	RNA	ヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ (HN)
7. parainfluenza virus 2 (PIV2)	RNA	ヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ (HN)
8. parainfluenza virus 3 (PIV3)	RNA	ヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ (HN)
9. rhinovirus (RV)	RNA	非翻訳領域 (5'NCR)
10. enterovirus (EV)	RNA	非翻訳領域 (5'NCR)
11. coronavirus (CoV)	RNA	スパイク糖蛋白 (S)
12. human metapneumovirus (hMPV)	RNA	核蛋白質 (NP)
13. human bocavirus (HBoV)	DNA	非構造蛋白 (NP1)

Adeno は 16/51 血清型を増幅する。

Enterovirus は coxsackie A9, A16, B5, B6, echo 6, 11, 30, entero 71 を増幅する。

一方、構築されたウイルスのキット中に含まれる 13 種ウイルスと増幅する目的遺伝子は表 1 に示す<sup>3)</sup>。①adenovirus (AdV), ②influenza virus A (Flu A), ③influenza virus B (Flu B), ④respiratory syncytial virus subgroup A (RSV-A), ⑤respiratory syncytial virus subgroup B (RSV-B), ⑥parainfluenza virus 1 (PIV1), ⑦parainfluenza virus 2 (PIV2), ⑧parainfluenza virus 3 (PIV3), ⑨rhinovirus (RV), ⑩enterovirus (EV), ⑪coronavirus (CoV), ⑫human metapneumovirus (hMPV), および⑬human bocavirus (HBoV) である。なお、AdV と EV についてはタイプが多いため、そのすべてを検索できるわけではない。

## DNA/RNA 抽出とリアルタイム PCR の操作

検査材料処理から結果を得るまでのプロトコルを図 2 に示す。上咽頭拭い液は、1 ml のブロスに混釈した後 DNA/RNA の抽出操作を行う。抽出操作はいかに簡単に、しかも効率よくできるかがキーポイントであるが、私達は DNA と RNA が同時に抽出できる核酸抽出キット EXTRAGEN II (東ソー) を用いている。所要時間は 10~15 分である。

図 2 に示すように、得られた抽出液は細菌とウイルス検索用に二分して用いる。ただし、ウイルスの検索には RNA からの complementary DNA (cDNA) 合成のステップが一工程加わる。この合成には従来 1 時間を要していたが、現在では PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit (タカラバイオ) を用い、15 分で終了できる。

一方、PCR 用試薬であるが、細菌とウイルスの各反応液はあらかじめ 96 穴のウェルに分注し、-20℃ に保存しておく。用時に、症例数に応じて 8 連チューブを 1 症例分としてカットして用いる。細菌では、氷上にて各ウェル内に抽出 DNA サンプルを 2 μl ずつ加え、ただちにリアルタイム PCR を実行する。ウイルスも同様に実施する。

DNA の増幅サイクル数は 40 サイクルをリミットとし、陽性反応が 35 サイクル以上のウイルスについては、電気泳動によって目的 DNA 断片か否かを確認した方がよい。

## リアルタイム PCR の感度と特異度

図 3 にはマイコプラズマ検索の感度を示す。図で明らかなように、陽性を示すサイクル数 (Ct 値) と目的遺伝子のコピー数との相関は 10<sup>1</sup>~10<sup>6</sup> の範

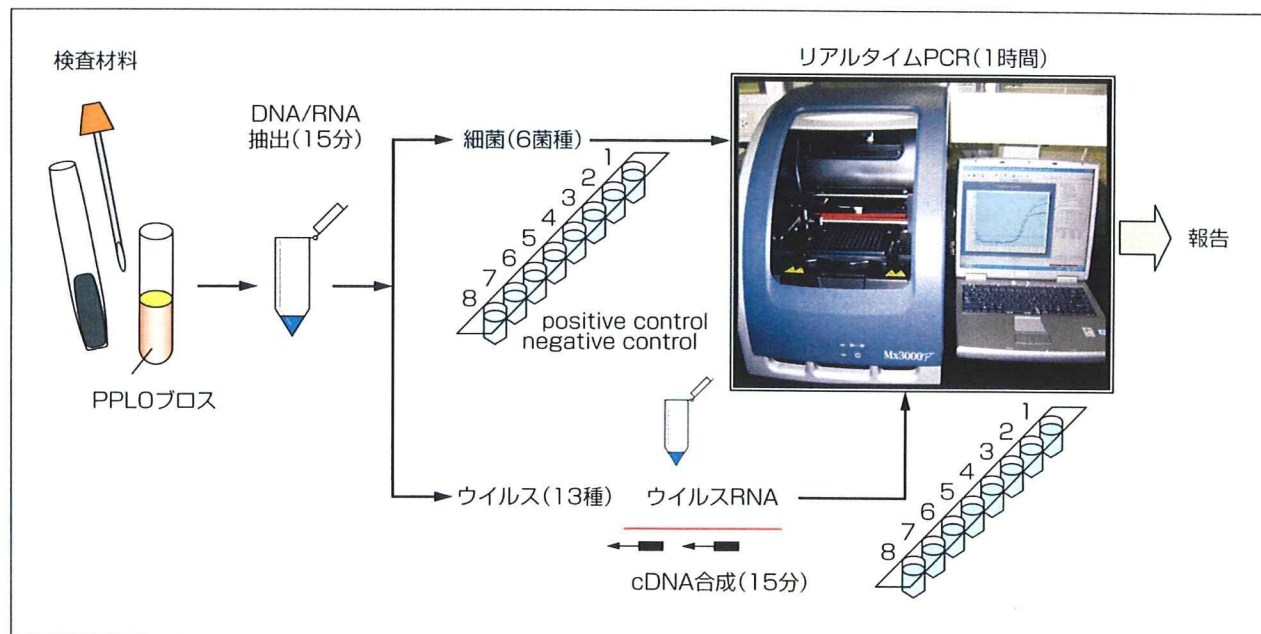


図2 リアルタイムPCRによる細菌・ウイルスの迅速検索プロトコル  
PPLO: pleuropneumonia-like organisms.

囲で0.9997と高く、反応チューブ当りに数コピー存在すれば、32~34サイクルで陽性反応を示す感度である。その他の菌種についても反応チューブ当り1~10コピーの菌量が32~36サイクルで陽性反応を示す感度に設定されている。

ウイルスについてもほぼ同様の感度となっているが、それぞれのウイルスに対して設計されたプライマーとプローブの特異性は13種それぞれのクロス反応によって確認しているが、いずれも偽陽性は認められず、特異性は高い。

### 小児肺炎例への応用

図4には、小児市中肺炎例から採取された上咽頭拭い液に対し、リアルタイムPCRを行ったなかから、インフルエンザ菌、マイコプラズマ、およびウイルスのPIV3とhMPV陽性例について、症例の年齢、WBC、CRPの成績とともに示す。

私達の今までの解析によると、インフルエンザ菌や肺炎球菌による肺炎例では、WBCは好中球優位で15,000/ $\mu$ l以上、CRPも>5 mg/dlの場合が多い。これに対し、マイコプラズマやクラミドフィラ例では、発症年齢は3歳以上(平均6歳)で、

WBCは正常値よりもやや高いものの12,000/ $\mu$ l以下、CRPも2~3 mg/dl程度である。ウイルス単独罹患例では、WBCがやはり10,000/ $\mu$ lであることに加え、その大半でCRPが1 mg/dl前後である。また、リンパ球の割合が相対的に高い。

図5には小児の市中肺炎例を対象として、細菌とウイルスとを同時に検索した際の原因微生物の内訳を示す。細菌単独感染と推定された症例は32.5%、複数菌感染と推定された症例が1.9%、ウイルスと細菌の混合感染と推定された症例が15.2%、ウイルス単独感染推定例が25.8%、複数ウイルスの感染推定例が2.1%であった。残りの22.6%では、検査材料採取のタイミングが不適で原因微生物が特定できていない。

細菌の内訳をみると、肺炎球菌が49.2%、マイコプラズマが29.6%、インフルエンザ菌は22.5%、クラミドフィラは2.7%、GASが0.1%であった。マイコプラズマが予想以上に多かったが、PCR陽性と判定された症例のマイコプラズマに対する抗体価は、数例を除いて明らかに上昇しており、またその75%から菌も分離されている。

一方、ウイルスの延べ陽性率は43.0%であっ



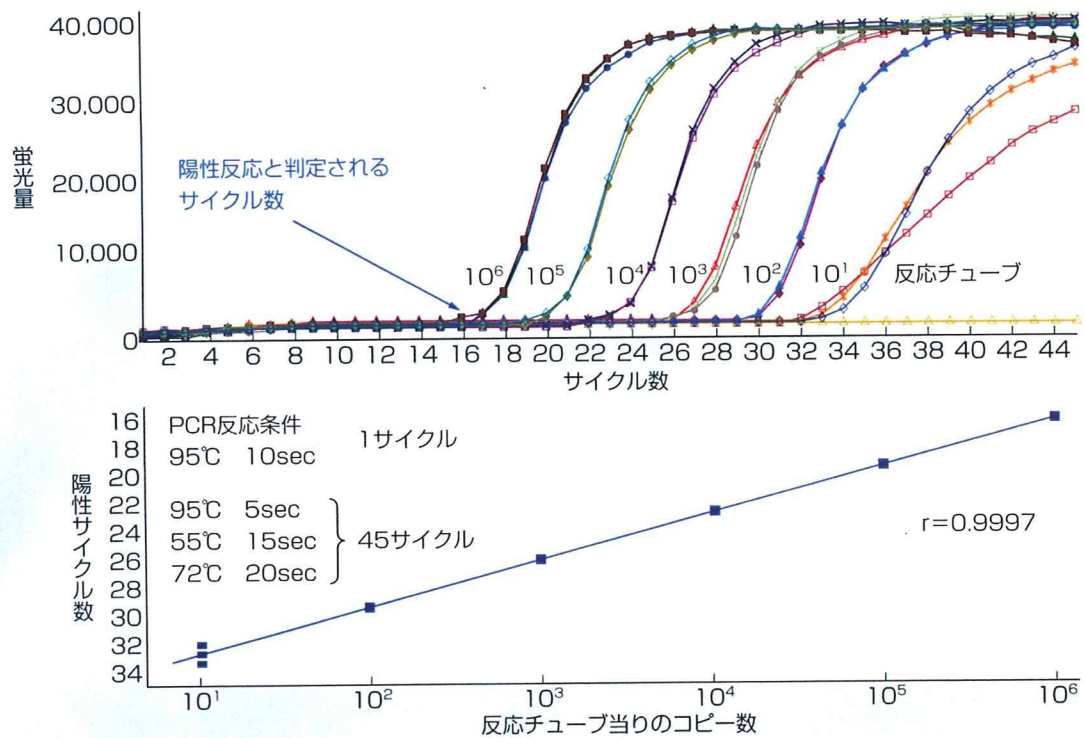


図 3 マイコプラズマ・ニューモニエの感度

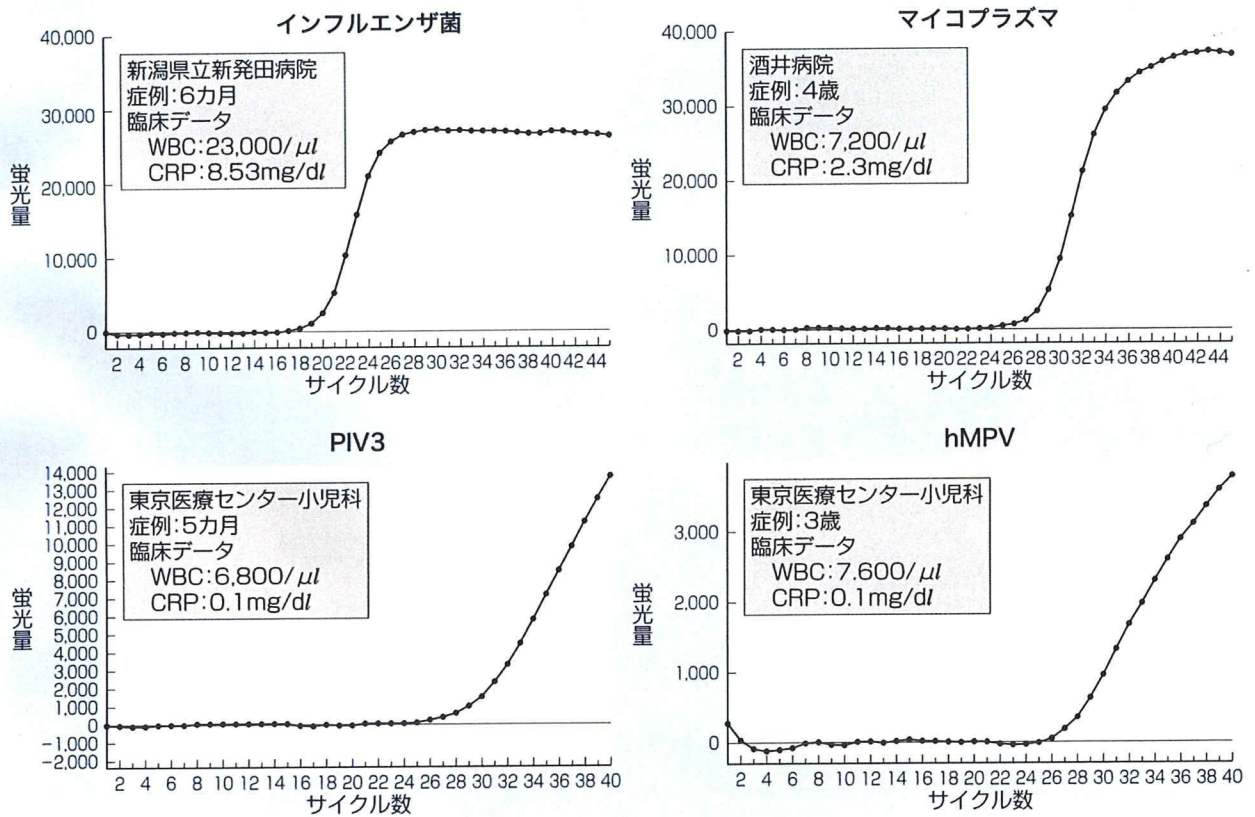


図 4 リアルタイム PCR による小児市中肺炎例の細菌とウイルスの迅速検索

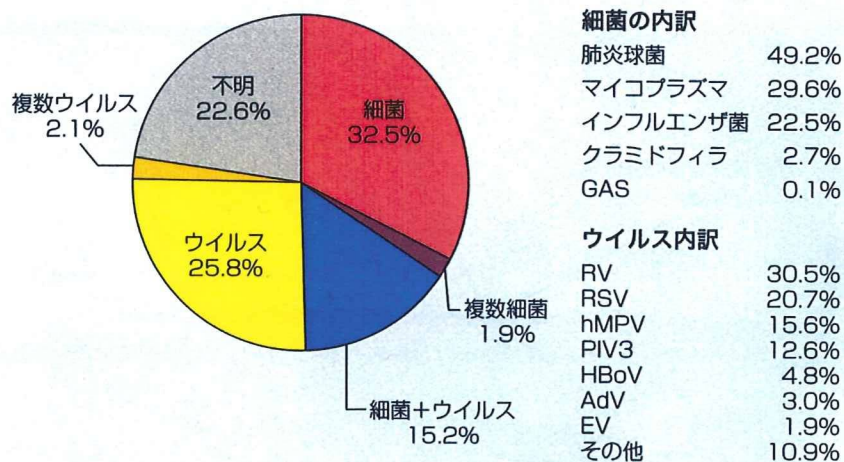


図 5 小児市中肺炎例における細菌とウイルスの内訳 (n=1,700)

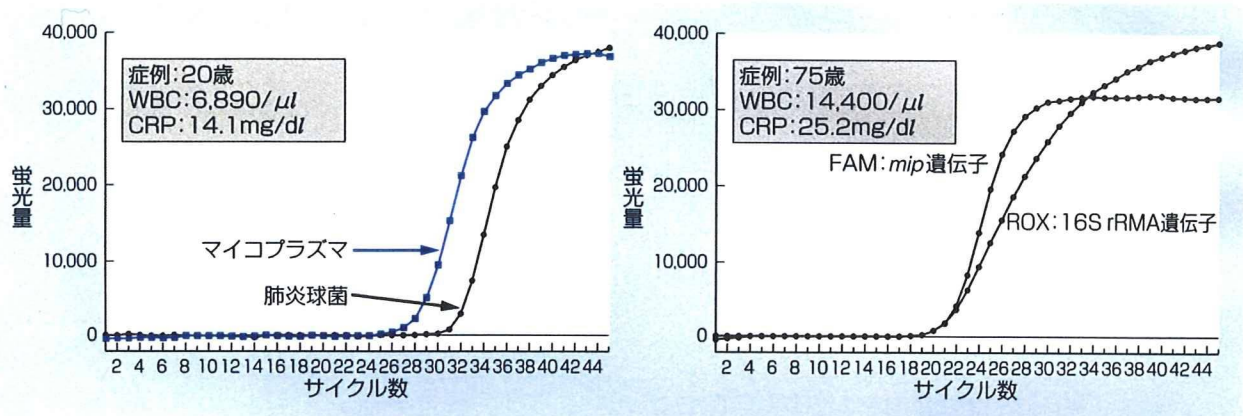


図 6 リアルタイム PCR による成人市中肺炎例の細菌の迅速検索  
(独) 東京医療センター内科 青木泰子先生よりご提供.

た. RV が 30.5% と最も多く、次いで RSV が 20.7%、最近注目されている hMPV が 15.6%、PIV3 が 12.6%、そして最も最近発見された HBoV が 4.8% であった。ウイルス単独感染例が多かったのは RSV (67.3%)、hMPV (67.2%)、PIV (60.7%) である。RV 陽性例では、その半数が細菌との混合感染であることが推測されている。

ウイルスについても抗体価の測定できるものは調べられているが、大半の例において抗体価は有意に上昇していた。

ウイルス検索では発症から検体採取までの日数が重要で、発症 4 病日頃までの陽性率は 40~50% 台であるのに対し、5 病日以降は急速に低下する。

また、RSV は 9~1 月、PIV3 は 5~7 月、hMPV は 2~7 月に陽性例が多く認められるというように、ウイルスには明らかな季節性が認められること、年ごとに流行ウイルスが異なることなども考慮しなければならない。

### 成人肺炎例への応用

成人の喀痰を検索した成績を図 6 に示す。1 例は、肺炎球菌とマイコプラズマの陽性例 (症例: 20 歳, 男性) である。PCR による検索時の WBC 値は 6,890/μl、CRP 値は 14.1 mg/dl、X 線像は大葉性肺炎を呈し、肺炎球菌の関与が示唆されたが、すでにフロモックス (一般名: セフカペン ピボキ

シル塩酸塩水和物)が3日ほど投与されている。しかし、強い咳嗽が持続しており、マイコプラズマ感染が先行していたことを疑わせた症例である。

もう1例は、レジオネラ・ニューモフィラによる肺炎例(症例:75歳,男性)である。入院時のWBCは14,400/ $\mu$ l, CRPは25.2 mg/dlで、X線像は肺全体に強い陰影を示していた。尿中抗原は陰性、喀痰の培養でも菌は分離できなかったが、同時期の風呂水からは serogroup 5 の本菌が検出されていた例である。尿中抗原は serogroup 1 のみ陽性を呈するので、本例では陰性であったのであろう。

## おわりに

院内感染の原因菌のみならず、市中で生ずる感染症の原因菌においても急速に耐性化が進行しており、抗菌薬の適正使用がいっそう強く求められている。それには、原因微生物を迅速に確定し、それに基づいたもっとも適切な抗菌薬療法を行うことであるが、診断のうえからは、細菌のみならずウイルスをも網羅的に調べ、抗菌薬が必要な症例とそうでない症例とを識別することが重要である。

ここでは誌面の制約上示すことができなかった

が、リアルタイム PCR は髄液、胸水、関節液などの検索にも使用可能である。しかし、感度に優れた方法であるからこそ、検査材料として不適に採取された検体、タイミングを失って採取された検体、抗菌薬前投与歴がある検体への使用には慎重さが要求される。

リアルタイム PCR 法によるウイルスと細菌の網羅的な検索法は、「正確な診断に基づいて治療抗菌薬を選択する」うえできわめて有用な手段ではあるが、その臨床への応用には細心の注意が必要である。

## 参考文献

- 1) Morozumi, M., Nakayama, E., Iwata, S., 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.
- 2) Nakayama, E., Hasegawa, K., Morozumi, M., 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. Chemther.*, **13** : 305~313, 2007.
- 3) Hasegawa, K., Morozumi, M., Nakayama, E., et al. : Comprehensive detection of causative pathogens using real-time PCR to diagnose pediatric community-acquired pneumonia. *J. Infect. Chemther.*, 2008 (印刷中).

\* \* \*

## VII 遺伝子診断

### 2. 呼吸器感染症原因微生物の遺伝子迅速診断

Key words : 成人市中肺炎, リアルタイム PCR, モレキュラービーコン・プローブ, 網羅的検索, 細菌, ウイルス/community-acquired pneumonia, real-time PCR, molecular beacon probe

生方公子\*

#### 要 旨

われわれが、市中肺炎例の原因微生物を検索する方法として構築した「リアルタイム PCR 法による網羅的な迅速検索」について述べる。この方法は、プライマーのほかに蛍光色素を付けたプローブを用いるもので、主要な細菌 6 菌種とウイルス 13 種の両方を 2 時間弱で解析可能である。従来の培養法では数日要した原因菌検索が短時間でできることは、適切な抗菌薬療法に寄与すると同時に医療経済上からも期待される方法である。

#### はじめに

近年わが国においても、肺炎球菌、インフルエンザ菌、肺炎マイコプラズマ菌(マイコプラズマ), A 群溶血性レンサ球菌 (GAS) 等の呼吸器感染症の主要な原因菌において耐性化が急速に進行し、成人例においてもそれらによる重症感染症例が認められている<sup>1)~4)</sup>。症状の進行が早い細菌感染症に対して適切な抗菌薬療法で対応するためには、入院時に短時間で原因微生物が特定されることが望ましいのはいうまでもない。それには、抗菌薬投与の対象となる細菌感染症例と、その対象とならないウイルス性感染が同時に検索できることが理想である。

最近、肺炎球菌や GAS, マイコプラズマ, ある

いは一部のウイルス検査が外来診療の場で簡単にできる迅速診断キットが普及してきている。この場合、キットによっては使用時に注意しなければならないものがみられる。つまり、感度がそれほど高くないこと、偽陽性を示す例が意外に多いことである。

一方、PCR 法 (conventional PCR) は感度や特異度はキットに比べて優れているが、多くの作業を併行して行う検査室においては、ルーチンに使用するには煩雑過ぎるのが実情であった。

そのような中から、蛍光色素をつけたプライマー、あるいはプローブを用いて DNA の増幅を行い、それを自動的に検知する real-time (リアルタイム) PCR 法が開発され、注目されている<sup>5)~7)</sup>。

ここでは、われわれが市中肺炎の原因微生物検索のために新たに構築した、細菌と呼吸器系ウイルスを同時に検策するリアルタイム PCR 法について、その概略と成人での成績を述べたい。

#### リアルタイム PCR 法の原理と検索可能な細菌とウイルス

LAMP 法は本邦で開発されたリアルタイム法の一つであるが、固定された温度で DNA の増幅が可能であるという長所があるものの、多くのプライマーを準備しなければならないことや、そのため変異の多い標的遺伝子にはプライマーが設計できないといった問題点もみられる。

われわれがリアルタイム PCR 法として選択しているのは、図 1 に示すモレキュラービーコン・プローブ (MB プローブ) あるいはキメラプローブを用いる方法である。この特徴は、FAM (carboxyfluorecein) や ROX (carboxy-X-rhodamine) といった蛍光色素と発色抑制物質 (クエンチャー: black hole quencher) を付けた MB プローブを用いることにある。MB プローブは目的 DNA 鎖に結合していないときはクエンチャーによって蛍光発色が抑制されているが、増幅された DNA 鎖に MB プローブが結合すると、蛍光物質がクエンチャーの抑制から解除され、発色する。

Rapid Detection of Causative Pathogens Using Real-Time PCR to Diagnose Community-Acquired Pneumonia

Kimiko UBUKATA\*

\* Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents, Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, Tokyo

\* 北里大学大学院感染制御科学府, 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 (〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1)