

**Table 2** Amino acid substitutions identified in the *ftsI* genes from gBLNAR and gBLPACR II *H. influenzae* strains

| Resistance class    | Subgroup           | No. of strains | Amino acid substitution |         |         |         |         |                        |         |         |                        |   | MIC <sub>90</sub> (mg/l) |     |      |     |       |       |       |       |      |       |      |
|---------------------|--------------------|----------------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|------------------------|---------|---------|------------------------|---|--------------------------|-----|------|-----|-------|-------|-------|-------|------|-------|------|
|                     |                    |                | STVK <sup>a</sup>       |         |         |         |         | SSN motif <sup>b</sup> |         |         |                        |   | AMP                      | AMX | CDR  | CDN | CTX   | MEM   | TBM   |       |      |       |      |
|                     |                    |                | Val-329                 | Met-377 | Ser-385 | Leu-389 | Ala-502 | Val-511                | Arg-517 | Asn-526 | KTG motif <sup>c</sup> |   |                          |     |      |     |       |       |       |       |      |       |      |
| gBLNAS <sup>d</sup> |                    |                | -                       | -       | -       | -       | -       | -                      | -       | -       | -                      | - | -                        | -   | 0.25 | 0.5 | 0.25  | 0.008 | 0.008 | 0.063 | 0.5  | 0.125 |      |
| gLow-BLNAR (n = 13) |                    | 6              | -                       | -       | -       | -       | -       | -                      | -       | -       | -                      | - | -                        | Lys | 1    | 4   | 1     | 0.063 | 0.063 | 0.5   | 0.5  | 0.5   |      |
|                     |                    | 3              | -                       | -       | -       | -       | Thr     | -                      | -       | -       | -                      | - | -                        | Lys |      |     |       |       |       |       |      |       |      |
|                     |                    | 3              | -                       | -       | -       | -       | Val     | -                      | -       | -       | -                      | - | -                        | Lys |      |     |       |       |       |       |      |       |      |
|                     |                    | 1              | -                       | Ile     | -       | -       | Val     | -                      | -       | -       | -                      | - | -                        | Lys |      |     |       |       |       |       |      |       |      |
|                     |                    | 1              | -                       | -       | Thr     | -       | -       | -                      | -       | -       | His                    | - | -                        | -   | 4    | 4   | 32    | 0.25  | 1     | 0.25  | 1    | 0.25  | 0.25 |
| gBLNAR (n = 94)     | ii                 | 1              | -                       | Ile     | Thr     | -       | -       | -                      | -       | His     | -                      | - | -                        | -   | -    | -   | -     | -     | -     | -     | -    | -     | -    |
|                     | iii                | 8              | -                       | Ile     | Thr     | Phe     | -       | -                      | -       | His     | -                      | - | -                        | -   | -    | -   | -     | -     | -     | -     | -    | -     | -    |
|                     | iv                 | 1              | -                       | -       | Thr     | -       | -       | -                      | -       | -       | -                      | - | -                        | Lys | 4    | 32  | 32    | 0.25  | 1     | 0.5   | 1    | 0.5   | 1    |
|                     | v                  | 2              | Ala                     | -       | Thr     | -       | -       | -                      | -       | -       | -                      | - | -                        | Lys |      |     |       |       |       |       |      |       |      |
|                     | vi                 | 3              | -                       | -       | Thr     | -       | -       | Thr                    | -       | -       | -                      | - | -                        | Lys |      |     |       |       |       |       |      |       |      |
|                     | vii                | 75             | -                       | Ile     | Thr     | Phe     | -       | -                      | -       | -       | -                      | - | -                        | Lys | 16   | 32  | 32    | 0.5   | 1     | 0.5   | 1    | 0.5   | 1    |
|                     | viii               | 1              | -                       | Ile     | Thr     | Phe     | -       | -                      | Ala     | -       | -                      | - | -                        | Lys |      |     |       |       |       |       |      |       |      |
|                     | ix                 | 2              | -                       | Ile     | Thr     | Phe     | Val     | -                      | -       | -       | -                      | - | -                        | Lys |      |     |       |       |       |       |      |       |      |
|                     | gBLPACR-II (n = 7) | ii             | 1                       | -       | Ile     | Thr     | -       | -                      | -       | -       | His                    | - | -                        | -   | 16   | 64  | 8     | 0.125 | 0.5   | 0.25  | 0.25 | 0.25  | 0.25 |
| iii                 |                    | 1              | -                       | Ile     | Thr     | Phe     | -       | -                      | -       | His     | -                      | - | -                        | >64 | >64  | 16  | 0.125 | 0.5   | 0.25  | 0.5   | 0.25 | 0.5   |      |
| vii                 |                    | 5              | -                       | Ile     | Thr     | Phe     | -       | -                      | -       | -       | -                      | - | -                        | Lys | >64  | >64 | 16    | 0.125 | 0.5   | 0.25  | 0.25 | 0.5   |      |

AMP ampicillin, AMX amoxicillin, CDR cefdimir, CDN ceftidoren, CTX cefotaxime, MEM meropenem, TBM tebipenem

<sup>a</sup> STVK, Ser327-Thr-Val-Lys

<sup>b</sup> SSN, Ser379-Ser-Asn

<sup>c</sup> KTG, Lys512-Thr-Gly

<sup>d</sup> Control, ATCC49766

**Table 3** MICs of *H. influenzae* strains transformed with a *ftsI* DNA fragment and donor strains

| Strains             | Amino acid substitution |         |         |         |         |                        |         |         |   |   | MIC (mg/l) |     |     |       |       |       |       |
|---------------------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|------------------------|---------|---------|---|---|------------|-----|-----|-------|-------|-------|-------|
|                     | SSN motif <sup>b</sup>  |         |         |         |         | KTG motif <sup>c</sup> |         |         |   |   | AMP        | AMX | CDR | CDN   | CTX   | MEM   | TBM   |
|                     | Val-329                 | Met-377 | Ser-385 | Leu-389 | Ala-502 | Val-511                | Arg-517 | Asn-526 |   |   |            |     |     |       |       |       |       |
| Recipient Rd        | -                       | -       | -       | -       | -       | -                      | -       | -       | - | - | 0.125      | 0.5 | 1   | 0.008 | 0.016 | 0.063 | 0.063 |
| Donor KU 046        | -                       | -       | -       | -       | -       | -                      | Lys     | -       | - | - | 1          | 2   | 1   | 0.016 | 0.031 | 0.25  | 0.25  |
| Donor KU 001        | -                       | -       | Thr     | -       | -       | -                      | Lys     | -       | - | - | 2          | 2   | 16  | 0.125 | 0.5   | 0.5   | 0.5   |
| Donor KU 007        | -                       | -       | Thr     | -       | -       | -                      | Lys     | -       | - | - | 1          | 64  | 64  | 0.25  | 4     | 0.5   | 0.25  |
| Donor KU 002        | -                       | Ile     | Thr     | Phe     | -       | -                      | Lys     | -       | - | - | 2          | 4   | 16  | 0.25  | 2     | 0.25  | 0.5   |
| Donor KU 026        | -                       | Ile     | Thr     | Phe     | -       | Ala                    | Lys     | -       | - | - | 2          | 64  | 64  | 0.25  | 2     | 0.5   | 0.5   |
| Rd <sup>KU046</sup> | -                       | -       | -       | -       | -       | -                      | Lys     | -       | - | - | 0.5        | 1   | 1   | 0.008 | 0.031 | 0.125 | 0.125 |
| Rd <sup>KU001</sup> | -                       | -       | Thr     | -       | -       | -                      | Lys     | -       | - | - | 1          | 2   | 16  | 0.063 | 0.5   | 0.25  | 0.25  |
| Rd <sup>KU007</sup> | -                       | -       | Thr     | -       | -       | -                      | Lys     | -       | - | - | 1          | 32  | 64  | 0.25  | 2     | 0.25  | 0.25  |
| Rd <sup>KU002</sup> | -                       | Ile     | Thr     | Phe     | -       | -                      | Lys     | -       | - | - | 1          | 2   | 16  | 0.125 | 2     | 0.25  | 0.25  |
| Rd <sup>KU026</sup> | -                       | Ile     | Thr     | Phe     | -       | Ala                    | Lys     | -       | - | - | 1          | 32  | 64  | 0.125 | 2     | 0.25  | 0.5   |

AMP ampicillin, AMX amoxicillin, CDR ceftidoren, CDN ceftioaxime, MEM meropenem, TBM tebipenem

<sup>a</sup> STVK, Ser327-Thr-Val-Lys

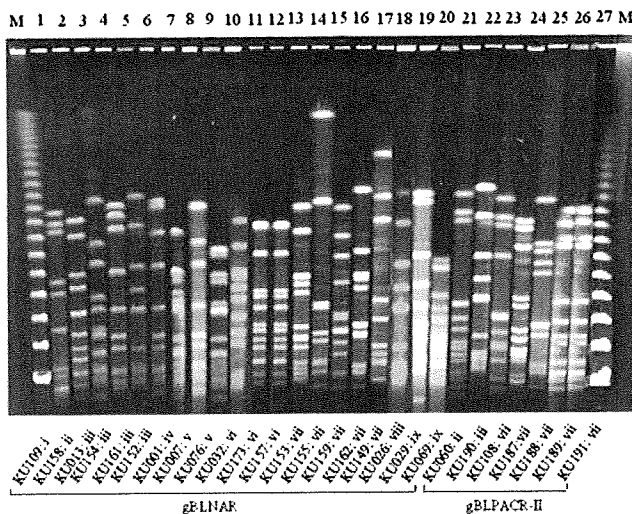
<sup>b</sup> SSN, Ser379-Ser-Asn

<sup>c</sup> KTG, Lys512-Thr-Gly

Table 3 shows the MICs of seven  $\beta$ -lactam antibiotics for each transformant and donor strains. The MICs of AMX, CDR, CDN, and CTX for transformant Rd<sup>KU007</sup> were higher than those for transformant Rd<sup>KU001</sup>. Especially, the AMX MIC of transformant Rd<sup>KU007</sup> was 16 times higher than that for transformant Rd<sup>KU001</sup>. On the other hand, the MICs of AMP, MEM, and TBM for transformant Rd<sup>KU007</sup> were same as those for transformant Rd<sup>KU001</sup>. The MICs of AMX and CDR for transformant Rd<sup>KU026</sup> were 16 and 4 times higher than those for transformant Rd<sup>KU002</sup>. In contrast, the MICs of AMP, CDN, CTX, MEM, and TBM for transformant Rd<sup>KU026</sup> were equal or almost equal to those for transformant Rd<sup>KU002</sup>.

Electrophoretic profiles

Figure 1 shows the PFGE profiles of 20 gBLNAR and 7 gBLPACR II strains selected randomly from each amino acid substitution subgroup. The profiles were extremely diverse and could not be classified into groups. Interestingly, the strains that shared an amino acid substitution subgroup and had the same resistance type differed in PFGE profiles. This diversity represents evidence that the resistant strains were clonally different from each other.



**Fig. 1** Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of chromosomal DNA from gLow- $\beta$ -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant (*BLNAR*), *gBLNAR*, and *g*  $\beta$ -lactamase-producing, amoxicillin-clavulanic acid-resistant II (*gBLPACR II*) strains ( $n = 27$ ) digested with *SmaI* restriction enzyme ('g' in the strain name denotes genetic identification). Lanes M,  $\lambda$  Ladder molecular size marker; 1, *gBLNAR* subgroup i (KU109); 2, *gBLNAR* subgroup ii (KU158); 3-6, *gBLNAR* subgroup iii (KU013, 154, 161, and 152); 7, *gBLNAR* subgroup iv (KU001); 8-9, *gBLNAR* subgroup v (KU007 and 076); 10-12, *gBLNAR* subgroup vi (KU032, 173, and 157); 13-17, *gBLNAR* subgroup vii (KU153, 155, 159, 162, and 149); 18, *gBLNAR* subgroup viii (KU026); 19-20, *gBLNAR* subgroup ix (KU029 and 069); 21, *gBLPACR-II* subgroup ii (KU060); 22, *gBLPACR-II* subgroup iii (KU190); 23-27, *gBLPACR-II* subgroup vii (KU108, 187, 188, 189, and 191)

## Discussion

In 2001, Ubukata et al. [5] found three amino acid substitutions near the SSN motif: Met377Ile, Ser 385Thr, and Leu389Phe; and two amino acid substitutions near the KTG motif: Asn526Lys and Arg517His; in PBP3 of BLNAR strains isolated in Japan. They reported that these amino acid substitutions affected the MICs of cephalosporin antibiotics more than those of AMP. Additional new amino acid substitutions of Val329Ala in the STVK motif and Val511Ala adjacent to the KTG motif were identified in 2006 in Japan [14]. However, their effects upon antibiotic susceptibilities have remained to be clarified. In the present study, we demonstrated that Val329Ala affected the MICs of AMX and the cephalosporin antibiotics, CDR, CDN, and CTX, while Val511Ala affected the MICs of AMX and CDR. In particular, we found that either of these amino acid substitutions increased the MIC of AMX by 16 times. AMX is the antibiotic most often used to treat community-acquired respiratory infections in the United States and Europe [25]. Similarly, since around 2005, AMX has commonly been used to treat pediatric outpatients with respiratory infections and AOM in Japan. In the present study, three patients from whom the BLNAR strains with the new amino acid substitutions were isolated had not been treated with AMX for 7 days before the strains were isolated. However, AMX may have been used previously to treat their AOM or respiratory infections, because they were aged 3, 4, and 6 years, i.e., they were older than the pediatric patients commonly seen with AOM, who are usually age 1 and under. We suggest that the change of antibiotic use in Japan, from oral cephalosporin to AMX, may have promoted the emergence of these two amino acid substitutions, Val329Ala and Val511Ala, which influenced the MICs of AMX.

The AMP-resistant strains tested in the present study showed incredible diversity in their PFGE profiles, although some of them had the same amino acid substitution subgroup and the same resistance type. The diversity is equivalent to that in *H. influenzae* as normal flora [26, 27]. From the above finding, we suppose that *H. influenzae* as normal flora in healthy children acquired resistance in some way and turned out to be a causative strain. Horizontal transfer of the mutated *ftsI* gene may be one of the ways of acquiring resistance. Takahata et al. [28, 29] reported horizontal transfer of the mutated *ftsI* gene from clinical isolates of BLNAR to the Rd strain of BLNAS. When we examined this phenomenon using clinically isolated *H. influenzae* as a recipient, horizontal transfer of the mutated *ftsI* gene was not identified (data not shown). The spread of resistant *H. influenzae* by horizontal transfer of the mutated *ftsI* gene is a reasonable possibility, because *H. influenzae* in nature is capable of transformation [30, 31].

However,  $\beta$ -lactam antibiotics at doses that provide inadequate concentrations may more likely favor mutations in the *ftsI* gene and select gBLNAR.

In summary, we have described evolutionary molecular changes in the *ftsI* gene involving the reduced antibiotic susceptibilities of *H. influenzae* isolated from pediatric patients with AOM. These molecular changes seem to be related to a change in antibiotic use. Thus, strict control of antibiotic use, based on evidence such as trends concerning resistant strains and their molecular changes, is important to prevent increases of resistant strains.

**Acknowledgments** We thank A. Ono for assistance with manuscript preparation. This work was supported by a grant from the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare (Research Project for Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, H20-004).

## References

1. Karlowsky JA, Verma G, Zhanel GG, Hoban DJ. Presence of ROB-1  $\beta$ -lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45:871–5.
2. Medeiros AA, Levesque R, Jacoby GA. An animal source for the ROB-1 beta-lactamase of *Haemophilus influenzae* type b. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;29:212–5.
3. Sriver SR, Walmsley SL, Kau CL, Hoban DJ, Brunton J, McGeer A, et al. Determination of antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae* and characterization of their beta-lactamases. *Canadian Haemophilus Study Group. Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:1678–80.
4. Vega R, Sadoff HL, Patterson MJ. Mechanisms of ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* type B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1976;9:164–8.
5. Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, et al. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with  $\beta$ -lactam resistance in  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1693–9.
6. Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, Bennamani S, et al. Diversity of  $\beta$ -lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2208–18.
7. Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, et al. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb Drug Resist.* 2003;9:39–46.
8. Osaki Y, Sanbongi Y, Ishikawa M, Osaki Y, Kataoka H, Suzuki T, et al. Genetic approach to study the relationship between penicillin-binding protein 3 mutations and *Haemophilus influenzae*  $\beta$ -lactam resistance by using site-directed mutagenesis and gene recombinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2834–9.
9. Straker K, Wootton M, Simm AM, Bennett PM, MacGowan AP, Walsh TR. Cefuroxime resistance in non- $\beta$ -lactamase *Haemophilus influenzae* is linked to mutations in *ftsI*. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:523–30.
10. Karlowsky JA, Critchley IA, Blosser-Middleton RS, Karginova EA, Jones ME, Thornsberry C, et al. Antimicrobial surveillance of *Haemophilus influenzae* in the United States during 2000–2001 leads to detection of clonal dissemination of a  $\beta$ -lactamase-negative and ampicillin-resistant strain. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1063–6.

11. Jansen WTM, Verel A, Beitsma M, Verhoef J, Milatovic D. Longitudinal European surveillance study of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. J Antimicrob Chemother. 2006;58: 873–7.
12. García-Cobos S, Campos J, Lázaro E, Román F, Cercenado E, García-Rey C, et al. Ampicillin-resistant non- $\beta$ -lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:2564–73.
13. Pérez-Trallero E, García-de-la-Fuente C, García-Rey C, Baquero F, Aguilar L, Dal-Ré R, et al. Geographical and ecological analysis of resistance, co-resistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:1965–72.
14. Sanbongi Y, Suzuki T, Osaki Y, Senju N, Ida T, Ubukata K. Molecular evolution of  $\beta$ -lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50: 2487–92.
15. Hotomi M, Fujihara K, Sakai A, Billal DS, Shimada J, Suzumoto M, et al. Antimicrobial resistance of *Haemophilus influenzae* isolated from the nasopharynx of Japanese children with acute otitis media. Acta Otolaryngol. 2006;126:240–7.
16. Yamanaka N, Hotomi M, Billal DS. Clinical bacteriology and immunology in acute otitis media in children. J Infect Chemother. 2008;14:180–7.
17. Nelson MB, Apicella MA, Murphy TF, Vankeulen H, Spotila LD, Rekosh D. Cloning and sequencing of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6. Infect Immun. 1988;56:128–34.
18. Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. Proc Natl Acad Sci USA. 1978;75:3737–41.
19. Juteau JM, Levesque RC. Sequence analysis and evolutionary perspectives of ROB-1 beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34:1354–9.
20. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science. 1995;269:496–512.
21. Van Eldere J, Brophy L, Loynds B, Celis P, Hancock I, Carman S, et al. Region II of the *Haemophilus influenzae* type b capsulation locus is involved in serotype-specific polysaccharide synthesis. Mol Microbiol. 1995;15:107–18.
22. Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, Murayama SY, Iwata S, Sunakawa K, et al. Rapidly increasing prevalence of  $\beta$ -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:1509–14.
23. Yano H, Suetake M, Kuga A, Irinoda K, Okamoto R, Kobayashi T, et al. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. J Clin Microbiol. 2000;38:625–9.
24. Hasegawa K, Kobayashi R, Takada E, Ono A, Chiba N, Morozumi M, 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. 2006;57:1077–82.
25. García-Cobos S, Campos J, Román F, Carrera C, Pérez-Vázquez M, Aracil B, et al. Low  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains are best detected by testing amoxicillin susceptibility by the broth microdilution method. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:2407–14.
26. LaCross NC, Marrs CF, Patel M, Sandstedt SA, Gilsdorf JR. High genetic diversity of nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates from two children attending a day care center. J Clin Microbiol. 2008;46:3817–21.
27. St. Sauver J, Marrs CF, Foxman B, Somsel P, Madera R, Gilsdorf JR. Risk factors for otitis media and carriage of multiple strains of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. Emerg Infect Dis. 2000;6:622–30.
28. Takahata S, Ida T, Senju T, Sanbongi Y, Miyata A, Maebashi K, et al. Horizontal gene transfer of *ftsI*, encoding penicillin-binding protein 3, in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:1589–95.
29. Takahata S, Kato Y, Sanbongi Y, Maebashi K, Ida T. Comparison of the efficacies of oral  $\beta$ -lactams in selection of *Haemophilus influenzae* transformants with mutated *ftsI* genes. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:1880–3.
30. Goodgal SH, Mitchell MA. Sequence and uptake specificity of cloned sonicated fragments of *Haemophilus influenzae* DNA. J Bacteriol. 1990;172:5924–8.
31. Bakkali M. Genome dynamics of short oligonucleotides: the example of bacterial DNA uptake enhancing sequences. PLoS One. 2007;2:e741.

# Real-time PCR 法を活用した 細菌学的検索

MOROZUMI MIYUKI/UBUKATA KIMIKO

諸角美由紀/生方公子

◎北里大学大学院感染制御科学府・北里生命科学研究所病原微生物分子疫学研究室

**要 旨** 経口カルバペネム系薬, tebipenem pivoxil (TBPM-PI) の小児急性中耳炎例に対する臨床試験において, 原因微生物の検索精度を高める目的で, 従来の培養による細菌検索と並行し, 主要な細菌とウイルスとを網羅的に検索できる real-time PCR 法の応用を試みた. 対象症例 399 例のうち, 原因菌が培養と real-time PCR の両手法で陽性であったのは 224 例 (56.1%) であった. 88 例 (22.1%) は real-time PCR 法のみ陽性, そのうちさらに 41 例 (10.3%) は PCR により耐性遺伝子型まで判明した. その他にウイルス陽性例が 8 例 (2.0%) 認められた.

細菌感染症において, 治療抗菌薬に対する耐性化が国内外を問わず深刻な問題となってきたが, 耐性菌の増加を防ぎ, 治療抗菌薬を適正に使用するためには, 発症初期に原因菌を正確に特定することが重要である. そのような視点からみると, real-time PCR 法は, 感度や特異性, あるいは省力化といった点で, 臨床応用が可能なレベルに達している. 本手法の臨床試験のみならず臨床検査への応用は, 原因菌の検索精度を高める上できわめて有用である.

## はじめに

*Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) および *Haemophilus influenzae* (インフルエンザ菌) は, 小児の急性中耳炎, 急性副鼻腔炎, あるいは肺炎等の原因菌として最も重要な細菌である<sup>1-3)</sup>.

新規抗菌薬の臨床試験時におけるこれら感染症に対する原因菌の検索は, 従来培養検査によって実施されてきた. しかし, 小児においては検体採取が難しく, また検体量も微量であるため, 成人の検体のように様々な菌検索を行うことは困難であるといった問題をかかえている. 小児のみならず, 細菌感染症が疑われる場合には, 短時間で原因微生物が特定されることが望ましく, それには

急速に進歩している PCR 法のような感度に優れた手法を採り入れていくことが理想である.

このような背景から, 小児の急性中耳炎 (AOM) に対する新規経口カルバペネム系薬の tebipenem pivoxil (TBPM-PI) 臨床試験時において, 細菌の検査精度を高める目的で, 著者らが構築した細菌<sup>5)</sup>とウイルス<sup>6)</sup>に対する網羅的 real-time PCR 法 (以下, PCR 法と略) の応用を試みた.

ここでは, その具体的方法と得られた成績について記す.

## ■Real-time PCR 法

### 1. 対象症例と検査材料

対象とした AOM 例は phase II 試験（一般臨床試験）の 186 例と，phase III 試験（比較試験）の 213 例，合計 399 例である．年齢は 1 歳未満が 14 例（3.5%），1 歳が 57 例（14.3%），2 歳が 54 例（13.5%），3 歳が 58 例（14.5%），4 歳以上が 216 例（54.1%）という内訳で，AOM の一般的な好発年齢よりもやや高い年齢の児が多かった．小児急性中耳炎診療ガイドライン（2006 年版）に準ずると重症例が多かったためか，検査材料としては中耳貯留液（鼓膜穿刺もしくは鼓膜切開液）が大多数を占めているという特徴を有していた．また，上咽頭ぬぐい液も必須項目で採取され，同様の細菌検査が行われた．

なお，検査材料は，投与開始前，投与 3 日後，投与終了（中止）時，投与終了 1～2 週間後の 4 回にわたって採取され，PCR と培養による微生物検索が実施されている．

### 2. 検査材料からの DNA/RNA 抽出と real-time PCR

検査材料に対する微生物検査手順の概略は図 1 に示す．検体は 1.5mL の PPLO broth 培地に混釈後，エッペンドルフ・チューブに移して 5,000 rpm，4℃，5 分の遠心を行い，検体中に含まれる細菌と線毛上皮細胞等を集めた．PPLO 培地の使用と上皮細胞を集めたのは，マイコプラズマやウイルスの検索精度を高めるためである．次いで，150  $\mu$ L の沈渣部分を残して上清を捨て去り，軽くミキシングしたものを検査のスタート時サンプルとした．サンプルは常法に従って血液寒天培地，チョコレート寒天培地，嫌気用 BHK 培地などに 5  $\mu$ L ずつ塗布し，以後，プロトコールに従って菌の分離や菌種の同定を実施している．培養した残りサンプルの 100  $\mu$ L を DNA/RNA 抽出用に用いた．

100  $\mu$ L のサンプルからの DNA/RNA の抽出は，

EXTRAGEN II<sup>®</sup>（東ソー）を用いて行ったが，抽出に要する時間は 10～15 分，PCR の鋳型となる DNA/RNA は最終的に 40  $\mu$ L に調整した．図に示したように，得られたサンプルは細菌とウイルス検出用とに二分して用いるが，ウイルス検出には RNA からの complementary DNA（cDNA）合成が一工程加わる．近年 PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent kit（タカラバイオ）を用いることにより，従来 1 時間を要していた cDNA 合成が 15 分で終了できるようになった．

細菌の網羅的検索の対象菌種は，著者らがすでに報告<sup>5)</sup>しているように，① 肺炎球菌，② インフルエンザ菌，③ *Streptococcus pyogenes*（GAS），④ *Mycoplasma pneumoniae*（マイコプラズマ），⑤ *Chlamydia pneumoniae*（クラミドフィラ），⑥ *Legionella pneumophila*（レジオネラ）である．しかし，GAS はその他の  $\beta$  溶血性レンサ球菌と，マイコプラズマもその他のマイコプラズマと，またレジオネラも *L. pneumophila* とその他が区別できるように構築されている．PCR の感度はチューブあたり 10 コピー以下，特異度も非常に高い．

一方，呼吸器系ウイルスについては，① adenovirus（AdV），② influenza virus A（FluA），③ influenza virus B（FluB），④ RSV subgroup A（RSV-A），⑤ RSV subgroup B（RSV-B），⑥ parainfluenza virus 1（PIV1），⑦ parainfluenza virus 2（PIV2），⑧ parainfluenza virus 3（PIV3），⑨ human metapneumovirus（hMPV），⑩ human bocavirus（HBoV），⑪ enterovirus（EV），⑫ rhinovirus（RV），⑬ corona virus（CoV）の 13 種類が検索できる<sup>6-8)</sup>．

## ■PCR 法と培養法での結果の比較

### 1. 急性中耳炎例の原因微生物とグレード分類

PCR 法と培養法を同時に実施しているため，得られた検索結果はグレード分類した．そのグレード分類に基づく急性中耳炎 399 例の成績は表 1 に示す．「グレード 1」とは，耳漏のような外耳

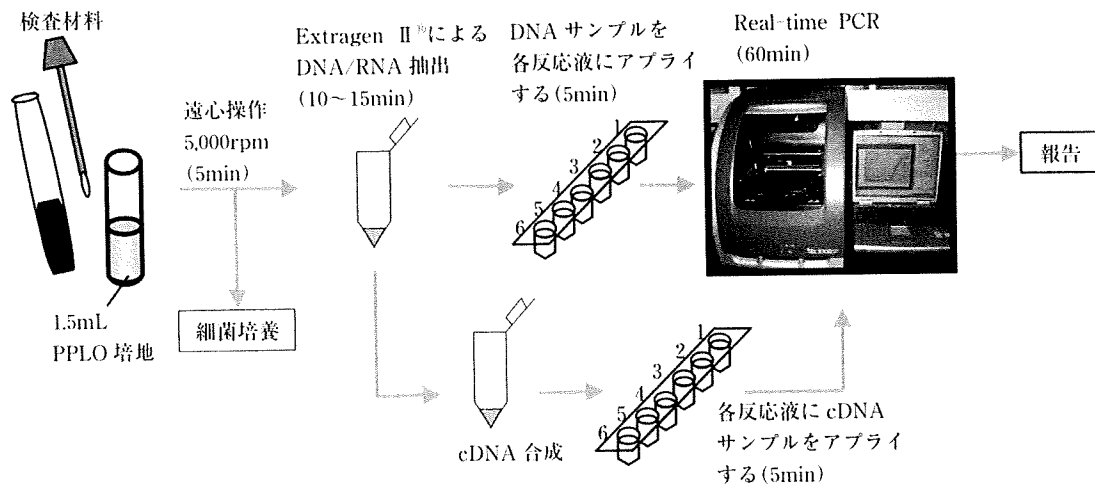


図 1 Real-time PCR による細菌とウイルスの網羅的検索のプロトコール

表 1 急性中耳炎患者における中耳貯留液に対する real-time PCR 法と培養法による成績の比較

| グレード                 | 培養    |     | real-time PCR (菌種) | PCR (耐性遺伝子) | 症例数 (%)     |
|----------------------|-------|-----|--------------------|-------------|-------------|
|                      | 中耳貯留液 | 上咽頭 | 中耳貯留液              | 中耳貯留液       |             |
| グレード 1               |       |     |                    |             | 202         |
| グレード 1* <sup>1</sup> | +     | +   | +                  | +           | 4           |
| グレード 1* <sup>2</sup> |       |     |                    |             | 18          |
| グレード 2 <sup>3</sup>  | -     | +   | +                  | +           | 38          |
| グレード 2* <sup>3</sup> |       |     |                    |             | 3           |
| グレード 3               | -     | +   | +                  | -           | 47          |
| グレード 4* <sup>4</sup> | ND    | ND  | +                  | ND          | 8           |
| グレード 5               | -     | -   | -                  | ND          | 79          |
| 合計                   |       |     |                    |             | 399 (100.0) |

\*<sup>1</sup>: グレード 1 に加えグレード 2 の菌種を重複して証明

\*<sup>2</sup>: グレード 1 に加えグレード 3 の菌種を重複して証明

\*<sup>3</sup>: グレード 2 に加えグレード 3 の菌種を重複して証明

\*<sup>4</sup>: グレード 4 はウイルス陽性

#: グレード 2 とは中耳貯留液の PCR 成績が上咽頭からの分離菌と一致したもののみとした。

道の菌が混入する可能性のある検体は対象とせず、中耳貯留液から培養で菌が分離できた場合のみとしている。「グレード 2」とは中耳貯留液の PCR は陽性、さらに続けて実施した PCR で耐性遺伝子型まで明らかにでき、さらに上咽頭からも同じ耐性型の菌が分離できた場合である。一方、「グレード 3」とは中耳貯留液の PCR は陽性、耐性遺伝子型は特定できなかったものの上咽頭からも中耳検体で PCR 陽性であった菌種と同一菌種が

分離できた場合とした。「グレード 4」とは PCR でウイルスのみが陽性、そして「グレード 5」は原因微生物が推定できなかった場合である。

グレード分類に従って集計すると、「グレード 1」は 56.1% (n=224)、「グレード 2」は 10.3% (n=41)、「グレード 3」は 11.8% (n=47)であった。「グレード 4」のウイルスのみ陽性例は 2.0%認められ、最終的に原因微生物が推定できなかったのは 19.8% (n=79)であった。つまり、PCR を応用

表2 小児急性中耳炎患者の中耳貯留液の培養によって分離された細菌の内訳：グレード1

| 分離された病原体  | 例数 (%)     |
|---|------------|
| <i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i>         | 17( 7.6)   |
| <i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> + virus | 3( 1.3)    |
| Subtotal  | 20( 8.9)   |
| <i>S. pneumoniae</i>                                | 77( 34.4)  |
| <i>S. pneumoniae</i> + <i>M. catarrhalis</i>        | 1( 0.4)    |
| <i>S. pneumoniae</i> + <i>C. pneumoniae</i>         | 1( 0.4)    |
| <i>S. pneumoniae</i> + virus                        | 4( 1.8)    |
| <i>S. pneumoniae</i> + other                        | 13( 5.8)   |
| Subtotal  | 96( 42.9)  |
| <i>H. influenzae</i>                                | 79( 35.3)  |
| <i>H. influenzae</i> + <i>S. pyogenes</i>           | 1( 0.4)    |
| <i>H. influenzae</i> + <i>M. catarrhalis</i>        | 1( 0.4)    |
| <i>H. influenzae</i> + <i>C. pneumoniae</i>         | 3( 1.3)    |
| <i>H. influenzae</i> + <i>C. pneumoniae</i> + other | 1( 0.4)    |
| <i>H. influenzae</i> + virus                        | 4( 1.8)    |
| <i>H. influenzae</i> + other                        | 3( 1.3)    |
| Subtotal  | 92( 41.1)  |
| <i>S. pyogenes</i>                                  | 4( 1.8)    |
| <i>S. pyogenes</i> + virus                          | 1( 0.4)    |
| <i>S. pyogenes</i> + other                          | 2( 0.9)    |
| Subtotal  | 7( 3.1)    |
| <i>M. catarrhalis</i>                               | 5( 2.2)    |
| <i>M. catarrhalis</i> + virus + other               | 1( 0.4)    |
| <i>M. catarrhalis</i> + other                       | 1( 0.4)    |
| Subtotal  | 7( 3.1)    |
| MSSA  | 1( 0.4)    |
| MSSA + other  | 1( 0.4)    |
| Subtotal  | 2( 0.9)    |
| Total   | 224(100.0) |

other には、グレード2あるいは3に分類した菌種が含まれる。*C. pneumoniae* やウイルスはPCRの結果である。

しなければ半数例近くは原因菌不明となるが、PCRを応用すれば、全体の80.2%は原因微生物が推定できることになる。

現在、臨床治験においては培養法で菌が分離された症例のみの集計となっているが、わずかな菌量の場合には発育してこない場合も多く、また前投与抗菌薬があると、その影響を受けることも多いので、PCRの成績を今後どのレベルまで結果

表3 小児の急性中耳炎患者の中耳貯留液においてreal-time PCRによって推定された原因微生物

| 推定病原体  | 例数 (%)   |          |
|--|----------|----------|
|  | グレード2    | グレード3    |
| <i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i>                | 2( 4.9)  | 3( 6.4)  |
| <i>S. pneumoniae</i>                                       | 24(58.5) | 6(12.8)  |
| <i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> * <sup>1</sup> | 2( 4.9)  |          |
| <i>S. pneumoniae</i> + <i>C. pneumoniae</i>                | 1( 2.4)  |          |
| <i>S. pneumoniae</i> + virus* <sup>2</sup>                 | 3( 7.3)  |          |
| Subtotal   | 30       | 6        |
| <i>H. influenzae</i>                                       | 8(19.5)  | 37(78.7) |
| <i>H. influenzae</i> + <i>S. pneumoniae</i> * <sup>1</sup> | 1( 2.4)  |          |
| <i>H. influenzae</i> + virus* <sup>2</sup>                 |          | 1( 2.1)  |
| Subtotal   | 9        | 38       |
| Total  | 41       | 47       |

\*<sup>1</sup>: グレード3

\*<sup>2</sup>: Rhinovirus

として採用するのか、議論の余地がある。

## 2. 「グレード1」として分離された菌の内訳

表2には、「グレード1」に分類された224例の原因菌の内訳を示す。

Subtotalとして集計したように、6グループに分けることができる。すなわち、①肺炎球菌+インフルエンザ菌 ( $n=20$ )、②肺炎球菌 ( $n=96$ )、③インフルエンザ菌 ( $n=92$ )、④GAS ( $n=8$ )、⑤ *Moraxella catarrhalis* (モラキセラ菌) ( $n=7$ )、⑥ *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) ( $n=2$ )である。

これらの中にはクラミドフィラにも同時に陽性を示した例が5例、ウイルスにも同時に陽性を示した例が13例(5.8%)含まれている。それらウイルスの内訳は、RVが6例、RSVが3例、HBoV、EV、FluB、PIV3がそれぞれ1例ずつであった。

菌種別に合計すると、肺炎球菌は29.3% ( $n=117$ )、インフルエンザ菌は29.1% ( $n=112$ )、GASは2.0% ( $n=8$ )、モラキセラ菌は2.3% ( $n=9$ )、黄色ブドウ球菌は0.5% ( $n=2$ )であった。厳密な検索を行うと、小児のAOMではモラキセラ菌や黄色ブドウ球菌の割合は非常に少ないことが



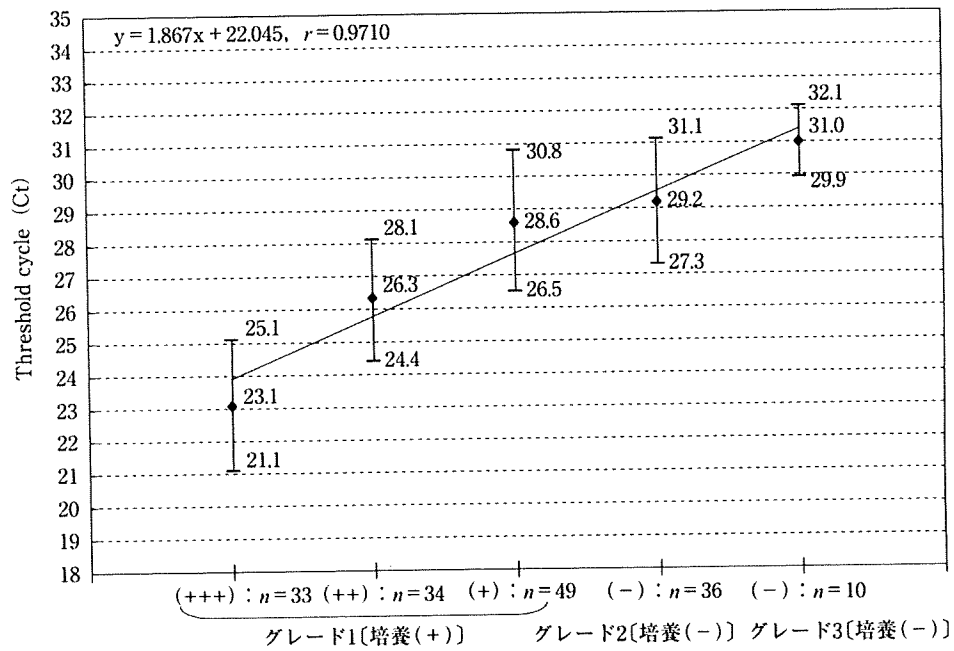


図2 肺炎球菌陽性の real-time PCR の Ct 値と培養結果との関係

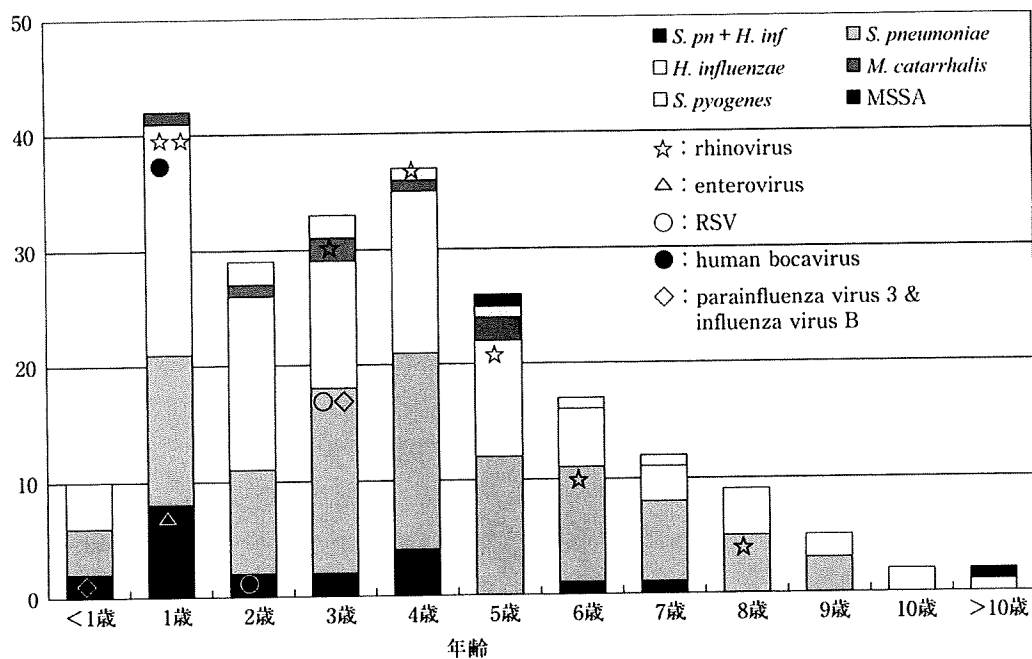


図3 中耳貯留液より細菌が分離できた小児急性中耳炎例の年齢分布と菌種の内訳

わかる。

### 3. 「グレード2と3」としてPCRでのみ推定された原因菌の内訳

中耳貯留液から釣菌はできなかったが、PCR

で耐性遺伝子型まで明らかにできた「グレード2」と、PCRで菌の存在は推定できたものの、耐性遺伝子型までは明らかにできなかった「グレード3」とした症例の推定原因菌の内訳を表3に示す。

「グレード2」は41例認められたが、そのう

ち肺炎球菌は 32 例、インフルエンザ菌は 11 例で推定されている。検出感度がやや優れた肺炎球菌において、耐性遺伝子まで判明した例が多かった。

一方、「グレード 3」は 47 例認められたが、インフルエンザ菌推定例が 41 例と多く、肺炎球菌推定例は 9 例のみであった。

#### 4. Real-time PCR と培養での成績の関係

Real-time PCR で陽性反応を示したサイクル数 (Ct 値) と、「グレード 1」とした培養での菌量レベル、「グレード 2」あるいは「グレード 3」との関係について、肺炎球菌の成績を図 2 に示す。培養結果は、(+++)は $\geq 1.0 \times 10^4$  CFU/サンプル、(++)は $1.0 \times 10^3 \sim 9.6 \times 10^3$  CFU/サンプル、(+)は $4.0 \times 10^1 \sim 9.6 \times 10^2$  CFU/サンプルに相当している。肺炎球菌では、菌量とサイクル数との間に、 $r = 0.9710$  と高い相関性が認められている。培地上から釣菌できた 116 例のうち、平均 Ct 値は、(+++)で 23.1 サイクル、(++)で 26.3 サイクル、(+)で 28.6 サイクルと計算される。

「グレード 2」の 36 例の Ct 値平均は 29.2 サイクル、「グレード 3」は Ct 値平均が 31.0 サイクルであった。つまり、肺炎球菌が釣菌可能な Ct 値の上限は 30 サイクル前後となる。

ここには示さないが、インフルエンザ菌でも同様である。

#### 5. 症例の年齢分布

菌が分離できた「グレード 1」の 224 例の年齢分布と原因菌との関係は図 3 に示したとおりである。臨床試験の対象症例のため患児の年齢はやや高いが、肺炎球菌、インフルエンザ菌は全年齢層から分離されていたのに対し、モラキセラ菌、GAS、そして黄色ブドウ球菌が検出された症例は 2 歳以上が多かった。

また、ウイルスも同時に陽性であった症例は 13 例 (5.8%) 認められている。

#### おわりに

小児の市中型呼吸器感染症における原因微生物

014 ● 014 — 臨床と微生物 Vol.37 No.1 2010.1.

の検索に際しては、重症例であればあるほど、感度と特異度が高く、かつ網羅的に短時間で原因微生物が検索できることが望ましいことはいうまでもない。成人における重症肺炎例も同様である。

近年、急速に進歩した real-time PCR 法を応用した手法は、従来の電気泳動を伴ういわゆる conventional な PCR 法に比べ、① DNA/RNA の抽出以外はほとんど自動化されていること、② 原因菌の菌量が推定できること、③ 特異度と感度に優れ、病原微生物を推定できること、④ 抗菌薬の前投与のため培養が陰性であっても原因菌が推定できること、⑤ 原因菌を短時間で推定できること等のメリットがあり、臨床への応用が期待されている。特に、本方法が有用性であるのは、培養が難しいマイコプラズマやクラミドフィラ、そしてウイルス検索等であるが、その他に細菌とウイルスを同時に検索することにより、呼吸器感染症の多くの症例でウイルスも関与していることが明らかにできる<sup>6,8)</sup>。

一方、小児 AOM 例の原因菌の分離率は、従来の報告では 50%以下であることが多く<sup>9,10)</sup>、またウイルス関与の詳細も明らかではなかった<sup>11-13)</sup>。そのような経緯から、TBPM-PI の臨床試験時における原因微生物の検索に際し、real-time PCR 法を導入することにより、その検索精度を高めようとしたものである。

本手法を導入した結果、原因菌の分離率は 56.1%と高く、また上咽頭にも同一タイプの菌が存在していたことを証明しており、高い精度の菌検索ができたと考えている。その他に、菌は分離されなくとも DNA の存在から原因菌の推定できた症例が 24%もあったことが注目される。

上述した成績は、細菌検査業務においても、積極的な網羅的 real-time PCR 法の導入が必要であることを支持するものであろう。

#### 文 献

- 1) 生方公子：再検討が迫られる市中感染症。- PRSP, BLNAR を中心に -。 *J J Antibiotics* 52 (Suppl. B) : 4-13, 1998.

- 2) 生方公子, 千葉菜穂子, 小林玲子ほか: 本邦において1998年から2000年の間に分離された *Haemophilus influenzae* の分子疫学解析 - 肺炎球菌等による市中感染症研究会収集株のまとめ -, 日本化学療法学会雑誌 50 : 794-804, 2002.
- 3) 生方公子, 小林玲子, 千葉菜穂子ほか: 本邦において1998年から2000年の間に分離された *Streptococcus pneumoniae* の分子疫学解析 - 肺炎球菌等による市中感染症研究会収集株のまとめ -, 日本化学療法学会雑誌 51 : 60-70, 2003.
- 4) 山中 昇: 変貌する急性中耳炎. ペニシリン耐性肺炎球菌性中耳炎の現状と対策, 金原出版, 東京, 2000.
- 5) 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.
- 6) 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 Chemother* 14 : 424-432, 2008.
- 7) Centers for Disease Control and Prevention (CDC) : specimen collection and transport guidelines <http://www.cdc.gov/index.htm>.
- 8) 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 Chemother* 13 : 305-313, 2007.
- 9) 肺炎球菌等による市中感染症研究会 1 : 4-5, 1998.
- 10) Pichichero ME, Pichichero CL : Persistent acute otitis media : I. Causative pathogens. *Pediatr Infect Dis J* 14 : 178-183, 1995.
- 11) Sagai S, Suetake M, Yano H *et al.* : Relationship between respiratory syncytial virus infection and acute otitis media in children. *Auris Nasus Larynx* 31 : 341-345, 2004.
- 12) Soriano F : Microbial etiologies of acute otitis media. *Clin Microbiol Infect* 3 : S23-S25, 1997.
- 13) Sung BS, Chonmaitree T, Broemeling LD *et al.* : Association of rhinovirus infection with poor bacteriologic outcome of bacterial-viral otitis media. *Clin Infect Dis* 17 : 38-42, 1993.

\* \* \*

診断法の進歩

# マルチプレックス呼吸器ウイルス ゲノム・リアルタイム検査

MOROZUMI MIYUKI/UBUKATA KIMIKO

諸角美由紀/生方公子

◎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

**要旨** 呼吸器感染症原因菌を網羅的に検索する方法として、私たちが構築した主要な細菌 6 種類と、ウイルス 13 種類と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。さらに、それらを小児と成人肺炎例に対して応用した際の成績についても述べる。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本法は、適切な抗菌薬療法を行う上で必要不可欠であると考えられる。

はじめに

市中で罹患する急性呼吸器系感染症の主な起炎菌は、肺炎球菌、インフルエンザ菌、*Mycoplasma pneumoniae* (マイコプラズマ)、A 群溶血性レンサ球菌 (GAS)、*Chlamydomphila pneumoniae* (クラミドフィラ)、*Legionella pneumophila* (レジオネラ) などさまざまであるが、それらの割合は小児と成人においては著しく異なる。例えば、乳幼児期の小児肺炎例では、肺炎球菌やインフルエンザ菌の割合が高いのに対し、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、これらの症例においては、原発感染としてウイルスの関与が大きいとされる。一方、成人例においては、宿主側の基礎疾患の有無等が重要で、それにより起炎菌も異なってくる。

これら原因菌の一部において耐性化が急速に進行し、難治例や予後不良例が増加している<sup>1-3)</sup>。適切な抗菌薬の選択と菌の耐性化を防ぐには、発症例の入院時に起炎微生物が短時間で確定されることが望まれる。また医療経済上からも、抗菌薬投与の対象となる細菌感染症と、補助療法のみで

よいとされるウイルス感染症とを短時間で区別できることは有用なはずである。

近年、その解決手段として外来診療の場で一部の細菌やウイルスを調べることができる迅速診断キットが普及してきている。呼吸器系ウイルス検査では RSV や influenza virus の迅速診断キットが多用されているが、その感度は  $10^3 \sim 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL とやや低い。世界的には診断を目的としたいくつかの PCR 法が開発され、注目されているが<sup>4-7)</sup>、本稿では、私たち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 種類とを、ひとつのサンプルから同時に検索するリアルタイム PCR 法について解説し、将来の微生物検査のあるべき姿について言及する<sup>8-10)</sup>。

## ■リアルタイム PCR 法の原理

リアルタイム PCR 法には、本邦で開発された LAMP 法を含めていくつかの方法が開発されている<sup>1-7)</sup>。私たちはその中で、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法を検索系に用いるリアルタイ

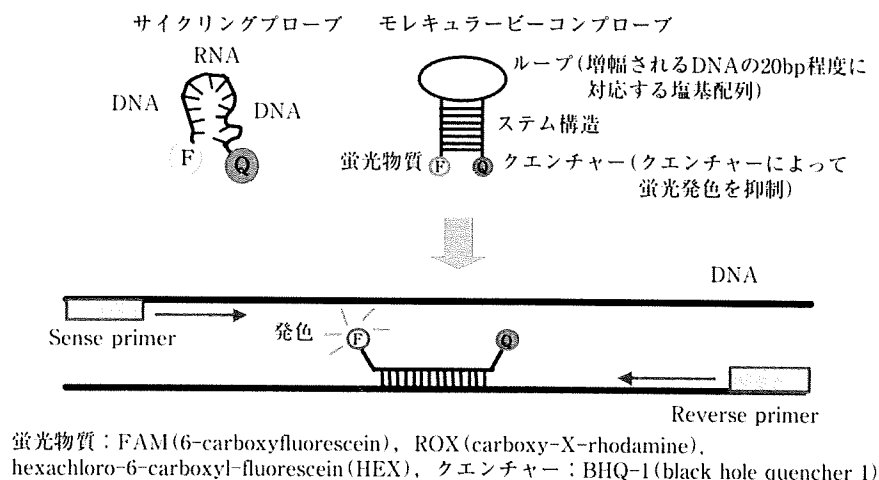


図1 モレキュラービーコンプローブを用いるリアルタイムPCR法

ムPCR法を選択している。MBプローブの5'末端に蛍光色素のFAM(6-carboxyfluorescein), ROX(carboxy-X-rhodamine),あるいはhexachloro-6-carboxyl-fluorescein(HEX),3'末端に発色抑制物質のクエンチャー(black hole quencher 1: BHQ-1)を結合させている点が特徴である。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となっている。

この方法は増幅されるDNAに結合したプローブを検出するため、非特異反応が出現しにくく、従来のPCR法に比べて特異度がきわめて高い。また、DNAの増幅がモニターでき、陽性シグナルから菌数が推定できる。サイクル数の早い段階で陽性シグナルが確認できれば、その時点で臨床サイドへ報告可能である。

現在、リアルタイムPCR機器としては、Thermal Cycler Dice™(タカラバイオ), Mx-3000P™(アジレント・テクノロジー), Light Cycler®(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)などが市販されている。機器は300万~500万円であるが、使いやすさと価

格とは必ずしも一致しないので、購入にあたってはそれぞれの特徴を比較・理解した上で判断されたい。

## ■細菌とウイルス検索の標的遺伝子

市中肺炎(CAP)を念頭において私たちが構築した呼吸器感染症起炎菌検索用キット(タカラバイオ)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溶血性レンサ球菌(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(16S rRNA遺伝子と*mip*遺伝子)の6種を含む。β溶血性レンサ球菌では2種類の遺伝子検索でGASとそのほかのβ溶血性レンサ球菌を区別、レジオネラも同様に2種類の遺伝子検索で*L. pneumophila*と他のレジオネラ属が区別できるようになっている。この場合、ひとつのウエルで2種の遺伝子を解析するため、それぞれのプローブには異なった蛍光色素が結合されている。検索できる菌種は多い方がよいのには違いないが、病態が急速に悪化しやすい細菌、あるいは治療抗生薬の系統が異なる細菌、小児と成人の両方に使用できるか否か、CAPの原因菌の90%をカバーできるか否か、などの諸条件をある程度満たすものとして構築されている。

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 (FluA)     | RNA   | 非構造蛋白 (NS1)           |
| ③ influenza virus B (FluB)     | 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 (NP-1)          |

adeno は 16/51 血清型を増幅する.

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

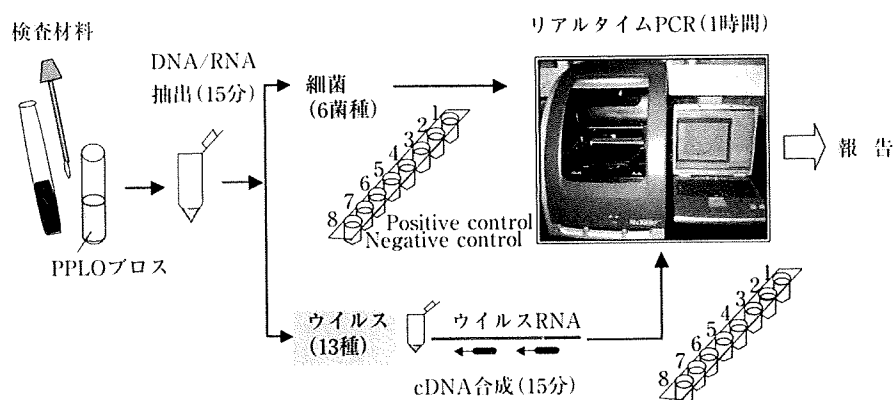


図2 リアルタイム PCR による細菌/ウイルスの迅速検索プロトコール

将来検出試薬等がコストダウンされれば、この限りでないことは明白であろう。

一方、検索可能な呼吸器系ウイルスは表1に示す13種類である。すなわち、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。AdV と EV についてはタイプが多いため、それぞれの中の主なタイプのみ検索できる。また、AdV と HBoV を除き、すべて RNA ウイルスである。

### ■DNA/RNA 抽出とリアルタイム PCR の操作

検査材料処理から報告までのプロトコールは図2に示す。ルーチンに用いるには DNA と RNA の抽出操作が大事で、いかに簡単に、しかも効率よく、短時間に行うことができるかがキーポイントである。私たちは DNA と RNA が同時に抽出

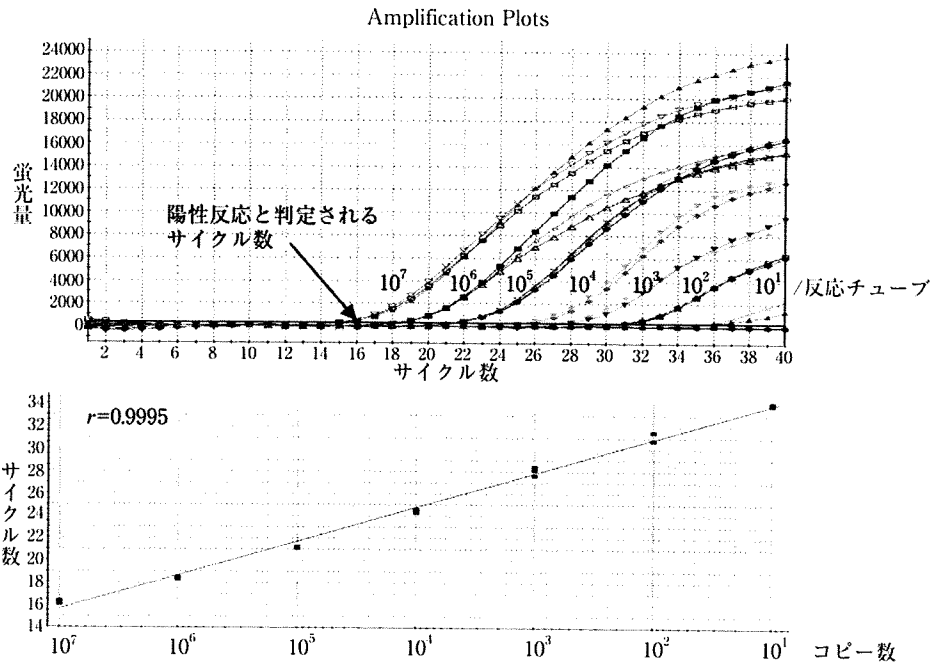


図3 Influenza virus A の感度

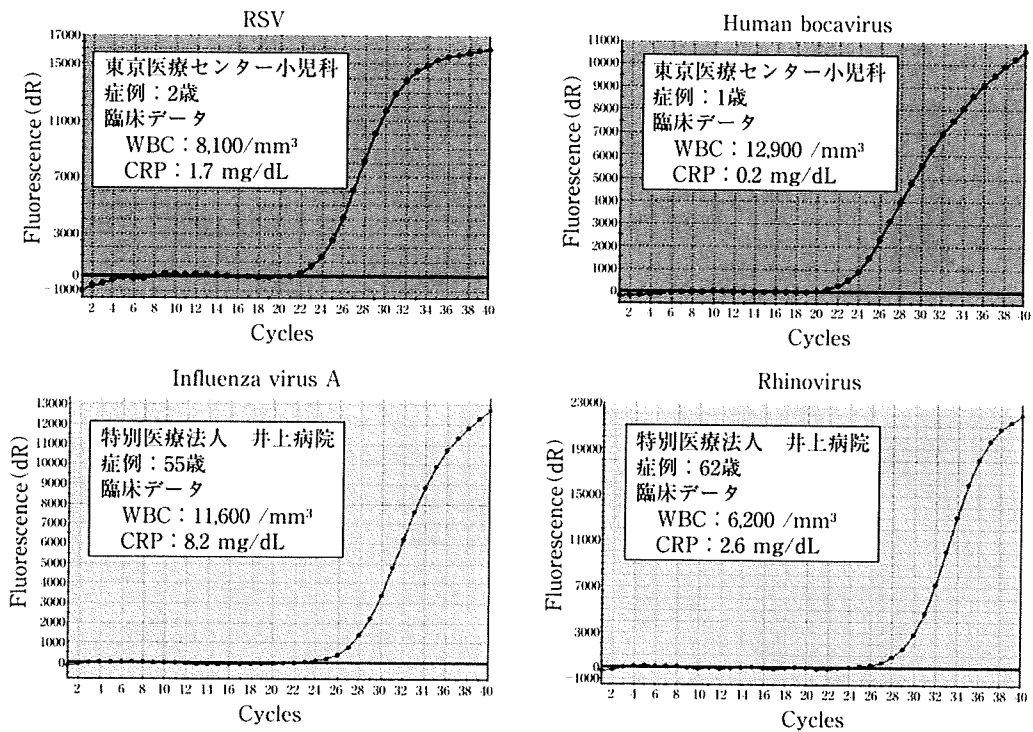


図4 リアルタイム PCR による小児・成人市中肺炎例のウイルスの迅速検索

できる EXTRAGEN II 核酸抽出キット（東ソー）を用い、所要時間は 10～15 分程度であるが、コンパクトな自動抽出機器が開発されれば、なお一層効率的であろう。

得られた核酸抽出液は細菌とウイルス検索用と

に二分し、細菌用は直ちに PCR 反応チューブに分注してリアルタイム PCR を開始する。ウイルスは RNA から complementary DNA (cDNA) 合成のステップを一工程加える。PrimeScript™ RT reagent kit (タカラバイオ) を用いると、15

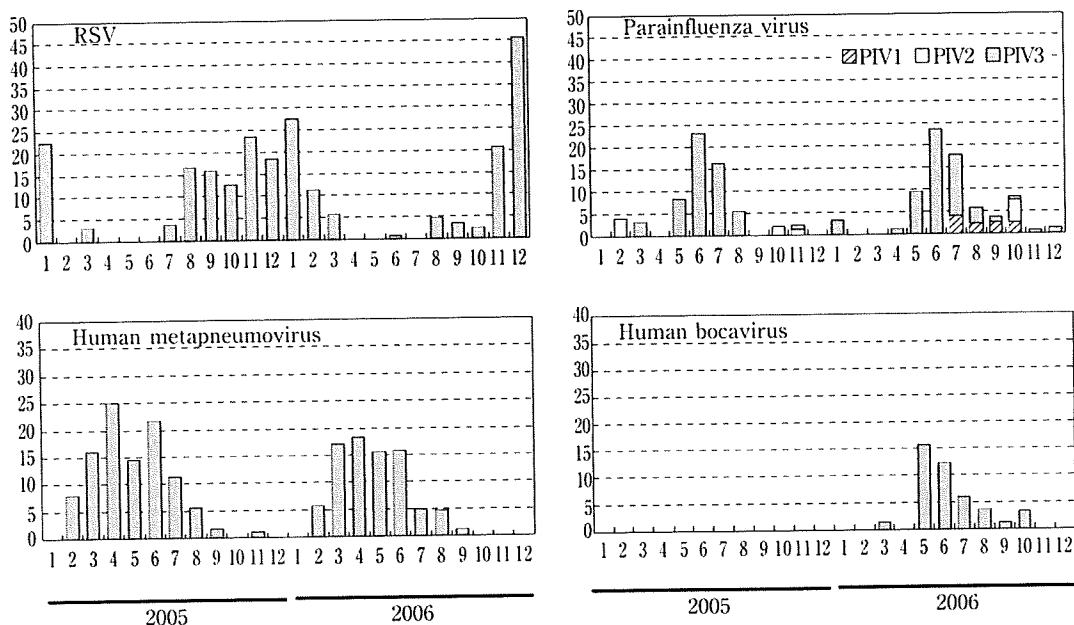


図5 ウイルス陽性例の季節別推移\*

分で逆転写反応が終了し、次いでcDNAをウイルス用PCR反応チューブへ分注してリアルタイムPCRを開始する。

細菌とウイルス用のPCR試薬類は、あらかじめ96穴のウエルに分注し、 $-20^{\circ}\text{C}$ に保存しておく、用時に症例数に応じてカットして用いる。私たちの今までの経験から、リアルタイムPCRの増幅サイクル数は40サイクルをリミット(cut offサイクル数)としている。前投与薬等があり、また無菌検査材料ではないサンプルにおける35サイクル以上での陽性反応は、念のため電気泳動によって目的DNAの増幅か否か慎重に判断する。

### ■リアルタイムPCRの感度と特異度

図3には、標的遺伝子部分のクローニングを行い、その感度を検討したinfluenza virus Aの成績を例として示す。陽性反応を示すサイクル数(Ct値)と目的遺伝子のコピー数は $10^1 \sim 10^7$ の範囲で $r=0.9995$ と相関性が高く、反応チューブあたり数コピー存在すれば、35サイクル前後で陽性反応を示す感度である。ここには示さないが、その他のウイルスや細菌においても、反応チュー

ブあたり1~10コピーの該当遺伝子が存在すれば、32~36サイクルで陽性反応を示す感度に設定されている。

### ■小児と成人肺炎例への応用

図4には、(独)国立病院機構東京医療センター小児科と特別医療法人井上病院呼吸器内科へ入院となった市中肺炎例の成績である。

採取された上咽頭ぬぐい液、あるいは咽頭ぬぐい液を対象としているが、RSV、HBoV、FluA、RV陽性例について、それぞれの年齢、WBC、CRPの値とともにPCR上の画面を示している。抗体価の測定できるウイルス症例においては、その値は有意に上昇していた。

私たちの研究室では、現在小児の市中肺炎例で入院となった症例を対象として、細菌とウイルスの網羅的検索を実施しているが、ウイルスの延べ陽性率は49.0%と約半数例近くに達している。一方、成人におけるウイルス陽性率は約7%と低い。ウイルス検索は検体採取のタイミングが大きく影響し、発症2~4病日頃までの陽性率は高いが、発症1病日、あるいは5病日以降は明らかに低い。



また、ウイルスについては、図5に示すように、その種類によって明らかな季節性が認められる。RSVは9~1月、PIV3は5~7月、hMPVは2~7月、HBoVは5~7月に陽性例が多く認められるので、検索には季節性の考慮も必要である。細菌検索では前投薬の有無が影響し、特に注射薬の投与があるとPCRといえども起炎菌を推定できないことが多くなる。

#### おわりに

急速に進行する耐性菌の増加に対し、抗菌薬の適正使用が世界的に強く求められている。また本邦においては医療コストの面からも入院期間の短縮が問題化しており、微生物検査もこれらに応えることがますます要求されつつある。抗菌薬の適正使用には、原因微生物あるいはウイルスを迅速に確定し、それに基づいた抗菌薬療法を行うことが必要である。本稿で述べたリアルタイムPCR法によるウイルスと細菌の網羅的な検索法は、小児から成人に対して使用可能であり、「正確な診断に基づいて治療抗菌薬を選択する」という原則論上、臨床への応用が最も期待されている手法である。

#### 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* 9 : 39-46, 2003.
- 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* 52 : 348-350, 2008.
- 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* 9 : 221-226, 2003.
- 4) 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* 72 : 484-495, 2004.
- 5) Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM *et al.* : Real-time PCR in clinical microbiology : applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol* 19 : 165-256, 2006.
- 6) 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* 37 : 1-7, 1999.
- 7) Bonzel L, Tenenbaum T, Schrotten H *et al.* : Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J* 27 : 589-594, 2008.
- 8) Hamano-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 Chemother* 14 : 424-432, 2008.
- 9) 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.
- 10) 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 Chemother* 13 : 305-313, 2007.

\* \* \*

### 3. 市中肺炎原因微生物の検索 — 網羅的検策法へのパラダイムシフト —

諸角 美由紀\*<sup>1)</sup> 長谷川 真紀\*\* 生方 公子\*<sup>2)</sup>

市中肺炎(CAP)を惹起する細菌においても薬剤耐性化が急速に進行し、抗菌薬の適正使用が強く求められている。原因となっている微生物(細菌とウイルス)が確定され、それに基づいて抗菌薬使用が判断されるのが本来あるべき姿である。しかし実際には、培養による従来法では結果判明までに数日を要することから、経験的な empiric therapy が行われている。従来型 PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法から蛍光色素を結合させたプローブを用いるリアルタイム PCR 法への進歩は、検査の精度・感度の向上とともに、省力化と短時間化、さらには多種類の微生物の網羅的検索が可能となっている。この手法によって、入院当日に原因微生物を確定できることを具体的に解説した。

**Key Words** : リアルタイム PCR / 小児市中肺炎 / pdm (H1N1) 2009 ウイルス

#### I はじめに

市中で罹患する急性呼吸器系感染症の起炎微生物は、ウイルスから細菌までさまざまである。肺炎では、原発感染としてウイルスの関与の割合が高く、細菌は続発感染の原因となる場合が多いと位置づけられている。これらの原因微生物は、小児と成人ではその種類や割合は大きく異なることも知られている。

急性期感染症における的確な抗菌薬の選択には、入院時に起炎微生物が短時間で確定されることが理想である。抗菌薬が必要な細菌感染症と、補助療法のみでよいとされるウイルス感染症とを短時間で区別できることは、医療経済上からも有益である。近年、その手段として、外来診療の場で一部の細菌やウイルスを調べることでできる迅速診断キットが普及してきている。しかし、その

感度は一般的に  $10^3$ - $10^4$  TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infectious dose)/mL と低く、偽陰性を示す例も少なくないといわれる。

昨年、新型インフルエンザウイルス (pdm (H1N1) 2009 ウイルス) が世界的に大流行し、わが国においても多くの感染例が小・中・高生を中心に発生した。小児肺炎例の中には、縦隔気腫<sup>1)</sup> や無気肺<sup>2)</sup> などの合併症をとまなう重症例も少なからず認められている。その診断には、迅速診断キットと PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法が用いられたが、現在、このように病原性を有するさまざまな微生物に対して、迅速診断を目的とした PCR 法が開発され、注目されつつある<sup>3)~6)</sup>。

本稿では、筆者らが構築した呼吸器感染症原因菌と、新型インフルエンザを含む呼吸器系ウイルスとを、1本の検査材料から同時に検策できるリアルタイム PCR 法について解説する<sup>7)~9)</sup>。

Paradigm shift for simultaneous detection of pathogens in community-acquired pneumonia by real-time PCR

\*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 <sup>1)</sup> 研究員 Miyuki Morozumi <sup>2)</sup> 教授 Kimiko Ubukata

\*\*日本大学医学部付属練馬光が丘病院小児総合診療科 医師 Maki Hasegawa

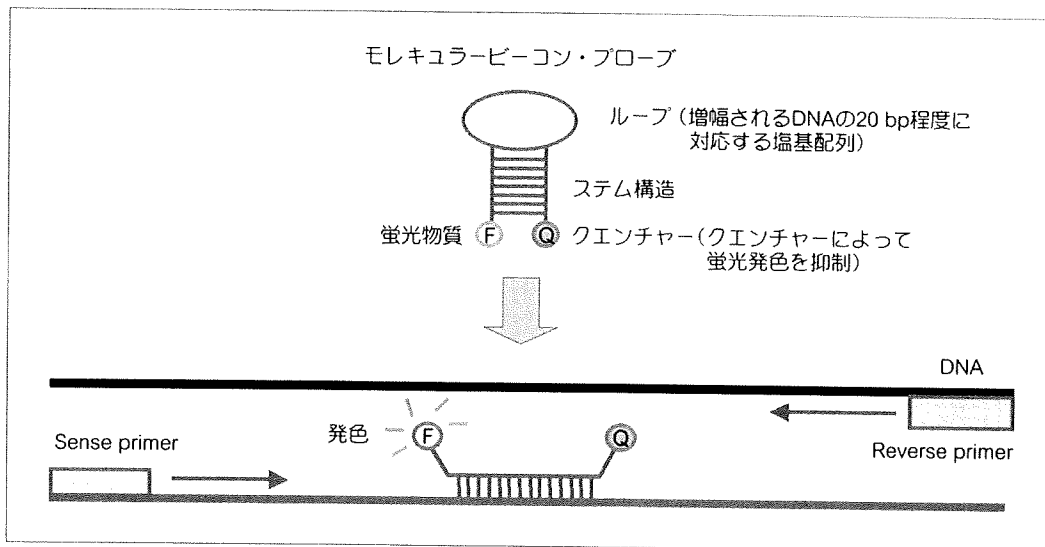


図1 (A) モレキュラービーコン・プローブを用いるリアルタイム PCR 法

モレキュラービーコン・プローブ法は、特異性のある primer による増幅産物に、さらに特異性のある probe を結合させるので、従来 PCR に比べ特異性が高い。

PCR：ポリメラーゼ連鎖反応

(筆者作成)

## II リアルタイム PCR 法

### 1. リアルタイム PCR 法の原理

リアルタイム PCR 法による微生物検索が世界的にも注目され、現在多くの方法が開発されている<sup>6)~9)</sup>。それぞれ特徴を有しているが、筆者らはその中で、図1 (A) 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・プローブを検索系に用いるリアルタイム PCR 法を選択している。MB プローブの 5'末端には、蛍光色素の FAM (6-carboxyfluorescein), ROX (carboxy-X-rhodamine), あるいは HEX (hexachloro-6-carboxyl-fluorescein), 3'末端には、発色抑制物質のクエンチャー (black hole quencher I : BHQ-1) を結合させている点の特徴である。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蛍光発色する。

一方、図1 (B) に示したサイクリングプローブは DNA と RNA のキメラプローブで、RNase (リボヌクレアーゼ) H と組み合わせることが特徴である。プローブは増幅される DNA 鎖上に対応する塩基配列を選択し、その配列の 1 塩基が RNA になっている。その両端には蛍光物質とクエンチャーが付けられている。アニーリング温度域で PCR 増幅産物にプローブがハイブリダイズするが、この時点では、プローブの蛍光はクエンチャーによって抑制されている。その後、RNase H によってこのハイブリッドしたプローブ側の RNA 部分が切断されるが、これにより蛍光物質とクエンチャーが分離し、強い蛍光を発する仕組みである。両方法とも DNA の増幅量と併行して蛍光発色量が増加し、その発色量がレーザーで 1 サイクルごとに自動測定される。

TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infectious dose)

MB (モレキュラービーコン)

ROX (carboxy-X-rhodamine)

BHQ-1 (black hole quencher I)

38 (778)

PCR (ポリメラーゼ連鎖反応)

FAM (6-carboxyfluorescein)

HEX (hexachloro-6-carboxyl-fluorescein)

RNase (リボヌクレアーゼ)

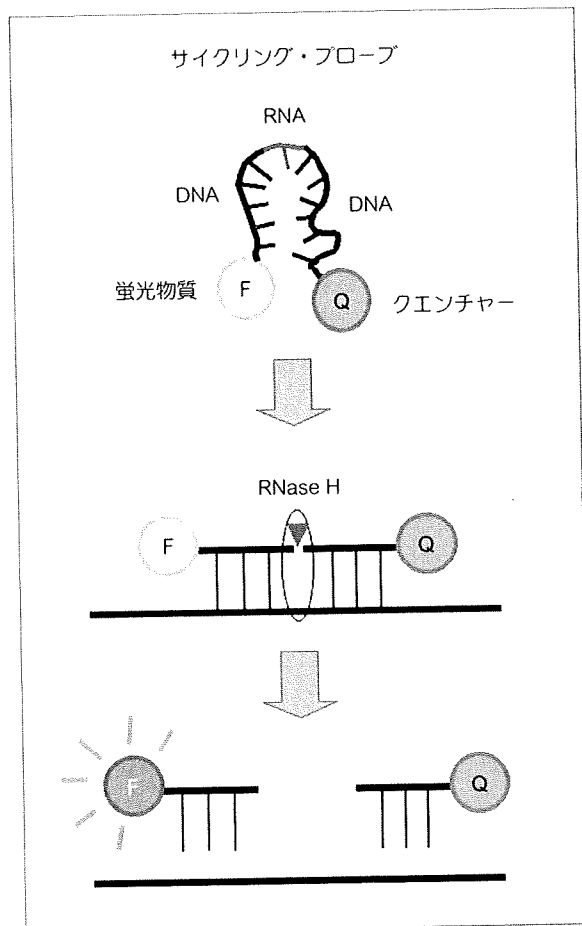


図1(B) サイクリング・プローブを用いるリアルタイムPCR法

サイクリング・プローブは、プローブのRNA部分が異なっていれば、RNaseによって切断されることがないので、1塩基の違いも識別できる特異性の高い検出法といえる。

PCR：ポリメラーゼ連鎖反応

RNase (リボスクレアーゼ)

(筆者作成)

図1からも明らかなように、プローブは増幅されたDNA断片に結合するので、これらの方法は非特異反応が少なく、従来のプライマーのみを用いるPCR法(conventional PCR)に比べて特異度がきわめて高い。また、DNAの増幅が接続されたPCでモニターでき、陽性シグナルを示したサイ

クル数から菌数、あるいはウイルス数が推定できる利点もある。サイクル数の早い段階で陽性シグナルが確認できれば、その時点で臨床サイドへの報告が可能である。

現在、リアルタイムPCR機器としては、Thermal Cycler Dice™「タカラバイオ(株)」、Mx-3000P™「アジレント・テクノロジー(株)」、Light Cycler®「ロシュ・ダイアグノスティクス(株)」、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(株)」などが市販されている。機器は300～500万円であるが、使いやすさと価格とは必ずしも一致しない。購入に当たってはそれぞれの特徴を比較し、理解した上で、自分達の目的に合った機器を選択することをお勧めする。

## 2. 細菌とウイルス検索の標的遺伝子(表1)

市中肺炎(CAP)を念頭において筆者らが構築した呼吸器感染症起炎菌検索用キット「タカラバイオ(株)」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溶血性レンサ球菌(16S rRNA遺伝子と*slo*遺伝子)、④マイコプラズマ・ニューモニエ(16S rRNA遺伝子)、⑤クラミドフィラ・ニューモニエ(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種を含む。β溶血性レンサ球菌では、2種類の遺伝子検索でGAS(A群溶血性レンサ球菌)とそのほかのβ溶血性レンサ球菌を区別、レジオネラも同様に、2種類の遺伝子検索でレジオネラ・ニューモフィラと他のレジオネラ属が区別できる。この場合、ひとつのウェルで2種の遺伝子を解析するため、それぞれのプローブには異なる蛍光色素が結合されている。基本的には、小児と成人CAPにおいて検出頻度の高い細菌を検索対象としている。

一方、呼吸器系ウイルスは表1に示す13種類である。すなわち、①adenovirus(AdV)、②influenza virus A(Flu A)、③influenza virus B(Flu B)、④respiratory syncytial virus subgroup A

CAP(市中肺炎)

AdV(adenovirus)

GAS(A群溶血性レンサ球菌)

Flu A(influenza virus A)