

小児科診療 UP-to-DATE

2019年10月22日放送

小児感染症診断における新たな進歩

東邦大学 微生物・感染症学講座
教授 舘田 一博

AMR時代に求められる検査法

ご承知のように、2016年4月に薬剤耐性（AMR）対策アクションプランが発表されました。

これは耐性菌問題に対して日本が世界のリーダーとしてコミットしていくことを宣言した重要な行動目標です。このアクションプランは6項目からなっておりますが、その中に「薬剤耐性の研究や、薬剤耐性微生物に対する予防・診断・治療手段を確保するための研究開発を促進する」という1項目が示されています。理想の感染症検査法としては、抗菌薬投与前の診断、すなわち患者が来院してから30分以内の診断法の開発が重要です。これまでの培養法や遺伝子診断法では30分以内の診断は難しく、新しい技術の開発が必須であり、遺伝子診断法におけるさらなる展開が期待されているところです。一方で、肺炎球菌やレジオネラの尿中抗原、A群溶連菌やインフルエンザの診断法として開発された免疫クロマトグラフィー法が Point Of Care Testing（POCT法）として“30分診断”を可能にしたことはご承知の通りです。

新しい検査法の開発においては、その検査法の臨床的・社会的・経済的インパクトについて平行して考えていくことが必要になってきました。その検査によって得られる患者のメリットは何か、その検査は抗菌薬適正使用にどれだけ貢献するのか、さらには、その検査法の導入が医療費全体の抑制につながる可能性があるのか、などという視点で新しい検査法の開発を進めていくことが必要となっています。

病原体抗原の迅速検出法

近年、広く使用されるようになった検査法として病原体抗原の迅速検出法があります。

病原体特異抗原を呼吸器検体、血液、あるいは尿から検出する方法が開発されています。血中の真菌抗原としてアスペルギルス、クリプトコックス、カンジダを対象とした検査法が、また細胞内に存在するサイトメガロウイルス抗原を検出する診断法が利用可能となっています。今日、レジオネラおよび肺炎球菌感染症に対する尿中抗原検出キットが広く応用されその有用性が確認されていますが、これらは何れも免疫クロマトグラフィー法を用いた検出キットで、約 15 分で尿中抗原を検出することができます。

呼吸器検体を用いた検査では常に口腔内常在菌による汚染の可能性を考えなければならぬのに対し、血中あるいは尿中抗原の場合には病原体特異抗原が検出された場合にはこれを原因病原体と判断することが可能となります。ただし小児の肺炎球菌尿中抗原検査においては、高率に偽陽性を示すことが確認されており利用で

きません。その理由として小児上気道における高い肺炎球菌の保菌率、そして粘膜防御機構の未熟性による血中への抗原の取り込みなどの可能性が考えられています。この問題をどのように解決するか、小児でも利用できる肺炎球菌の尿中抗原検査の開発が期待されています。

一方で、免疫クロマトグラフィー法を用いて喀痰からこれまでとは異なる肺炎球菌抗原を検出するキットが開発され臨床応用されています。従来の肺炎球菌尿中抗原検査は、莢膜抗原を検出するものですが、莢膜型の種類によっては偽陰性となる可能性が指摘されていました。これに対して大塚製薬が開発した「ラピラン肺炎球菌」では、肺炎球菌が共通して保有する細胞壁抗原を検出することが特徴であり、理論的には全ての肺炎球菌感染症を診断することができるとされています。泉川らはこの検査法と従来の尿中抗原検査を比較し、「ラピラン肺炎球菌」の感度・特異度が従来法に比べて優れていたことを報告しています。今後、肺炎球菌を高率に保菌する小児を対象とした本法の有用性に関しても研究も実施していく必要があると思われます。

リボゾームタンパク L7/L12 をターゲットとする新しい診断法

最近になって、病原体のリボゾームタンパク L7/L12 をターゲットとする新しい診断法が開発されました。

2013 年にマイコプラズマ感染症の新しい診断法として開発されたリボテスト[®]マイコプラズマがその 1 例です。これまで肺炎球菌やレジオネラ感染症の尿中抗原診断においては病原体の多糖

表1. 呼吸器感染症における抗原検出検査の種類と特徴

原因病原体および抗原	主な対象疾患	測定原理	使用検体
アデノウイルス	咽頭炎	免疫クロマト法	咽頭ぬぐい
RSウイルス	咽頭炎・肺炎	免疫クロマト法	咽頭ぬぐい・喀痰
インフルエンザ	咽頭炎・肺炎	免疫クロマト法	咽頭・鼻腔ぬぐいなど
サイトメガロウイルス	肺炎・敗血症	免疫染色法	血液
ヒトサイトメガロウイルス	咽頭炎・肺炎	免疫クロマト法	咽頭・鼻腔ぬぐいなど
マイコプラズマ	咽頭炎・肺炎	免疫クロマト法	咽頭ぬぐい・喀痰
A群溶連菌	咽頭炎・扁桃炎	免疫クロマト法	咽頭ぬぐい
肺炎球菌	肺炎・咽頭炎	免疫クロマト法	咽頭ぬぐい・尿
レジオネラ	肺炎	免疫クロマト法	尿
βDグルカン*	肺炎・敗血症	発色合成基質法	血液
アスペルギルス	肺炎・敗血症など	ELISA法	血液
クリプトコックス	肺炎・敗血症など	ラテックス凝集法	血液

* βDグルカンは、アスペルギルス、カンジダ、ニューモシステスなどの真菌感染症で陽性となる。ムーコム、クリプトコックス症では通常陰性。

体抗原を検出する系が用いられていたのに対し、リボテスト[®]マイコプラズマでは、病原体のリボゾームタンパク L7/L12 を検出する診断法として開発されたことが特徴です。リボゾームタンパク L7/L12 は菌体中に多量に存在する蛋白であり、これを特異性の高いモノクローナル抗体の組合せで検出することにより診断することができます。リボゾームタンパク L7/L12 は全ての病原体が保有する蛋白であり、マイコプラズマ感染症以外の感染症への応用が期待されています。実際に、肺炎球菌感染モデルを用いた検討で、リボゾームタンパク L7/L12 を標的とする検出系で感染とコロニゼーションを鑑別できることが示されており、本法の小児肺炎球菌感染症への応用の可能性が示唆されています。

迅速遺伝子診断法の新しい展開

迅速遺伝子診断法に関しても新しい展開がみられています。

PCR 法などの遺伝子増幅法を応用することにより、感度・特異度の高い遺伝子検出系が可能となりますが、これまでの遺伝子検査法では検査開始から結果の報告まで少なくとも 3~6 時間が必要であり抗菌薬投与前の診断法としては時間がかかり過ぎるという問題がありました。このような状況の中で、特異なプライマーによる鎖置換反応を一定温度かつ高い増幅効率で実現する LAMP 法が多くの感染症の診断法として応用されています。

LAMP 法は栄研化学が開発した遺伝子増幅系で、感染症領域を含め多領域での応用が期待される検査技術の 1 つです。これまでの PCR 反応の場合にはサーマルサイクラーを用いた反応温度のサイクリングが必要でありましたが、LAMP 法では 65℃の恒温槽 1 つで反応を進めることも可能です。体外診断用医薬品として感染症領域の LAMP 法診断キットとして製品化されているのはレジオネラ、マイコプラズマ、結核、SARS コロナウイルス、インフルエンザウイルスによる感染症ですが、その他多くの病原体への応用が可能です。本法の増幅効率は極めて高く、目的とする DNA を 15 分~1 時間で 10⁹ に増幅し、その高い増幅性から増幅産物の有無を肉眼で確認することができるほどです。現在、結核とインフルエンザに関しては目視判定が可能な検査が確立しており、今後さまざまな感染症診断への応用が期待されています。

表2. 呼吸器感染症における主な核酸検出検査の種類と特徴

病原菌/病原体	主な対象疾患	測定原理	使用検体
結核菌	結核症	PCR法, LAMP法 TMA法, TRC法など	体液, 組織, 気管支洗浄液など
非定型抗酸菌	非結核性抗酸菌症	PCR法, ITC法など	体液, 組織, 気管支洗浄液など
SARSコロナウイルス	肺炎	LAMP法	咽頭ぬぐい, 鼻腔ぬぐい, 糞便
H5亜型インフルエンザ	咽頭炎・肺炎	LAMP法	咽頭ぬぐい
新型インフルエンザ	咽頭炎・肺炎	LAMP法	鼻腔ぬぐい・咽頭ぬぐい
A型インフルエンザ	咽頭炎・肺炎	LAMP法	鼻腔ぬぐい・咽頭ぬぐい
百日咳菌	百日咳	LAMP法	後鼻腔ぬぐい
レジオネラ	レジオネラ肺炎	LAMP法	喀痰
マイコプラズマ	マイコプラズマ肺炎	PCR法	咽頭ぬぐい
呼吸器関連ウイルス*	肺炎・咽頭炎	Multiple PCR法	鼻腔ぬぐい・咽頭ぬぐい

* 対象病原体は、インフルエンザウイルス、コロナウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、アデノウイルス、RSウイルス、ヒトライウイルス/エンテロウイルス、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミア・ニューモニエ、百日咳菌

注目される新しい遺伝子診断法・機器

最後に、その他の注目される新しい遺伝子診断法・機器についてご紹介させていただきます。

これまでに感染症の新しい遺伝子検査の方向性を示す診断法・機器がいくつか開発されています。今日においてももっとも重要な耐性菌である MRSA のスクリーニング法を例にとると、日本

ベクトンディッキンソン社、ロッシュ・ダイアグノスティック社、ビオメリュー社がそれぞれ新しい機器を開発しています。いずれも MRSA の *SCCmec* 領域を増幅することによりその存在を確認する検査法ですが、検査時間としては 2~3 時間が必要となります。ベクトンディッキンソン社の BD マックスにおいては、オンデマンド形式での検体の挿入が可能であり、また検体を挿入したのちほぼ全自動で検査が進行することが特徴です。米国セフィエド社も GeneXpert と呼ばれる新しい遺伝子検査機器を開発しています。これは手のひらサイズのカセットに検体を挿入して機器にセットすれば、約 1 時間で MRSA の存在を推定できるという検査法です。すでに結核、クロストリディオイデス・ディフィシルなどを対象としたカセットが利用されており、さらにカルバペネム耐性菌の検出用カセットなども開発中です。WHO が本検査法を発展途上国における結核診断法として推奨したことから、本法の有用性を理解することができるかと思えます。

以上、感染症の迅速診断における新しい検査法の中の代表的なものを解説させていただきました。薬剤耐性対策アクションプランのもとで、新しい感染症診断法の開発が進行中であり、その臨床応用が期待されています。

「小児科診療 UP-to-DATE」

<http://medical.radionikkei.jp/uptodate/>