

## 【総説】

## 遺伝子解析技術の新たな潮流と感染制御への適応

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23年7月8日受付・平成23年7月11日受理)

遺伝子解析技術は、検体から直接、微量な病原体の遺伝子を増幅・検出して感染症の迅速診断と治療に貢献しているのみならず、分離菌株の迅速な菌種の同定、病原因子や薬剤耐性遺伝子の検出にも威力を発揮している。さらに、感染源の特定や感染拡大を防ぐために、分子疫学的な解析にも利用されている。本総説では近い将来、医療関連感染管理の現場で活用が期待される遺伝子解析技術の新たな潮流を紹介しながら、その適応について実際に解析した事例も交えて解説したい。

**Key words:** molecular diagnostics, infection control, molecular epidemiology, multiplex PCR, microarray

PCR法をはじめとする遺伝子増幅法やシグナル増幅法を用いた感染症の迅速診断技術は急速な進歩を遂げている。近年、PCR法とは原理の異なる等温核酸増幅法が実用化され、自動核酸抽出装置と試薬キットも普及していることから、技術的には感染症の遺伝子診断がより身近なものになりつつある<sup>1)</sup>。一方、適切な感染制御を行うためには、感染症の原因微生物を迅速に特定することが重要である。遺伝子解析技術の医療関連感染制御への適応には、①分離された菌株に対するもの、②臨床検体から直接、病原体に特徴的な遺伝子領域を増幅する系の2つに大別される。前者では16S rRNA遺伝子の塩基配列による菌種の同定、病原因子検索、薬剤耐性遺伝子の検出、病原体の型別などがその実用例としてあげられる。後者では感染症の迅速診断のみならず、培養が不可能な困難な病原体あるいは遅発育性病原体の検出、抗菌薬先行投与後の病因診断に威力を発揮する。本稿では、遺伝子解析技術や全自動遺伝子検査に関する最近の動向をまとめながら、感染制御におけるその適応と今後の展望について紹介したい。

### 1. 感染症遺伝子検査の新たな潮流

遺伝子検査の基本的なステップは、①検体採取と搬送(保存)、②核酸(DNA/RNA)の抽出、③増幅反応、④増幅産物の検出、⑤結果の判定と報告、の5つからなる。各ステップの特徴と解析技術の新たな潮流は以下のとおりである。

#### 1. 検体採取と搬送(保存)

どんなに高感度な検出系を用いても、ないものからは何も検出できない。したがって、適切な材料の採取と保存が何より重要であることはいささかも変わらない。

検出対象の核酸がRNAの場合は、検体保存と搬送にとりわけ注意が必要である。すなわち、RNAはヒトや病

原体の細胞に存在するRNaseによって分解されるためDNAと比べて非常に不安定であり、検体採取から測定までの管理を厳格に行うべきである。検体採取後は可及的すみやかに核酸抽出を行う。組織や細胞の搬送にはRNAlater<sup>®</sup>(アンピオン社)やPAXgene<sup>™</sup> Tube(キアゲン社)に入れておくと安定である。材料をすぐに処理できない場合には、チオシアン酸グアニジンで細胞膜を可容化すると同時にRNaseを不活化し、DNAが酸性フェノールに溶解込むことを利用してRNAを回収後、-20℃あるいは-80℃で凍結保存する。

#### 2. 核酸(DNA/RNA)の抽出

検体からの核酸抽出は遺伝子検査の最初のステップであるが、自動化に関しては最後のステップとして取り残された感があった。しかし近年、磁気ビーズやシリカ膜を用いた自動核酸抽出装置が販売されている(Table 1)。機器は数百万規模の初期投資が必要であるが、省力化が可能である。今後は、血液のみならず広範囲の検体種に対応した抽出試薬の普及が期待される。なお、核酸の抽出から増幅、検出までを全自動で行うシステムが最近開発され、販売されているので、その詳細を後の章で紹介したい。

#### 3. 核酸増幅反応

臨床検体や病原体から目的とする微量なDNAあるいはRNAを探し当て、検出できるレベルまでに増やす技術は、①標的の核酸そのものを増幅する“ターゲット核酸増幅法”、②目的の核酸を探し当てるためのプローブを増幅する“プローブ増幅法”、③プローブの目印として標識したシグナルを増幅する“シグナル増幅法”の3つに大別される。各増幅技術に関する個々の原理や詳細に関

\*岐阜県岐阜市柳戸1-1

Table 1. Summary of automated nucleic acid extraction systems

Instrument	PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation	NucliSens miniMAG	NucliSens easyMAG	QuikGene-810	BioRobot EZ1 Advanced	MagNA Pure Compact System
Manufacturer	ABI	bioMerieux/ Kainos	bioMerieux	FUJIFILM	QIAGEN	Roche
Isolation kits	BloodPrep Chemistry	NucliSens Lysis Buffer, Magnetic Extraction Reagents	NucliSens easyMAG Lysis buffer, Extraction buffer, Magnetic silica	QuickGene DNA Blood Kit S	EZ1 DNA Blood kit	MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I
Isolation technique	Silica vacuum manifold plate	Magnetic silica particles	Magnetic silica particles	Porous membrane	Magnetic silica particles	Magnetic silica particles
Type of nucleic acid	DNA or RNA	DNA & RNA	DNA & RNA	DNA	DNA	DNA & RNA
Type of specimen	Blood	Blood, CSF, Sputum, Stool, Urine	Blood, CSF, Sputum, Stool, Urine	Blood	Blood	Blood
Time required (min.)	30	45/12 samples	40/24 samples	6/8 samples	15-20	15-30/8 samples
Sample batch size (no. of specimens)	96	12	24	8	6	8

Table 2. Comparison of isothermal amplification methods

Amplification method	NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification)	TRC (Transcription Reverse transcription Concerted Amplification)	LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification)	SDA (Strand Displacement Amplification)	ICAN (Isothermal and Chimeric primer-Initiated Amplification of Nucleic acids)
Target	ssRNA	ssRNA	dsDNA	dsDNA	dsDNA
Product	ssRNA	ssRNA	ssDNA	dsDNA	dsDNA
Reaction Temperature	41°C	41°C	65°C	54°C	55°C
Enzyme	AMV-RT RNaseH T7-RNA poly.	AMV-RT RNaseH T7-RNA poly.	<i>Bst</i> DNA poly.	<i>Bst</i> DNA poly. <i>Bso</i> BI	<i>Bca</i> DNA poly. RNaseH

しては既刊の総説<sup>2,3)</sup>があるので、参照されたい。

目的の核酸そのものを増幅する方法として、PCRが頻用されている。PCR法はサーマルサイクラーを用いて、3段階の反応温度を周期的に変更する必要がある。この問題を解決するべく国内外で開発された核酸増幅法 (Table 2) に共通しているのは、一定の温度 (等温あるいは定温) で反応が進行し、短時間 (30~60分) のうちに高感度な検出が可能なことである。

新規の核酸増幅法が実用化される一方で、PCR法自体もこの約20年間にさまざまな改善が加えられ、発展を遂げている。すなわち、PCR増幅産物をリアルタイムに検出して、簡便かつ迅速な遺伝子の定量が可能で、real-time PCR法と1回の反応で複数の病原体検出を試みる multiplex PCRであり、それぞれ順に概説する。

#### 1) Real-time PCR法

Real-time PCRの実施には、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7500 FastやLightCycler<sup>®</sup>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。Real-time PCRの増幅産物は、2本鎖DNAに入り込んで蛍光を発するSYBR<sup>®</sup> Green IやTaqMan<sup>®</sup>, Molecular Beaconなどのプローブを用いてリアルタイムに検出できる (Fig. 1)。Real-time PCRの特徴を整理すると、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<sup>4)</sup>が可能、などがあげられる。サイトメガロウイルス (CMV)、EBウイルス (EBV)、水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV)、ヒトヘルペスウイルス6型などの潜伏しているウイルスの病態 (潜伏状態もしくは活性化、顕在化ないし感染) の把握や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

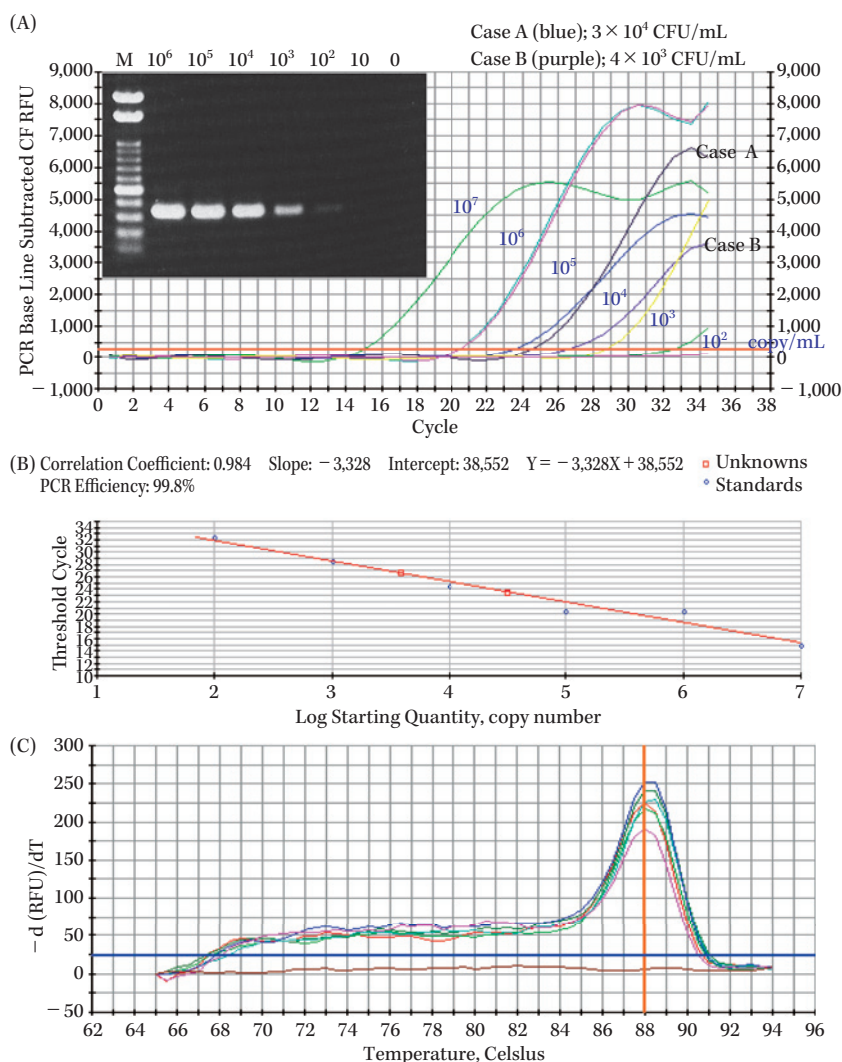


Fig. 1. Typical real-time PCR amplification monitored with SYBR Green I. (A) Amplification curves, (B) A standard curve, (C) Derivative melting curves

PCR法は迅速性、操作性、定量性において優れているものの、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高価(200万~500万円)であることが欠点である。

## 2) Multiplex PCR法

Multiplex PCRは、1つの反応チューブに2組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<sup>5,6)</sup>。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が感染症の迅速診断において重要である。さらに、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の*mecA*、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の*vanA*、*vanB*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。菌種の特異性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ただけでなく、感染制御の面からもMRSAやVREなどの迅速

な検出に有用である。移植後あるいは免疫不全患者の感染管理において想定される複数病原体(CMV、EBV、VZVなど)のスクリーニング検査も可能である。また、院内感染対策上も診断が必要な呼吸器感染症の病原体については、網羅的な検索ができる試薬キットが市販されている(Table 3)。呼吸器感染症を惹起する可能性が高い10~20種類のウイルスや細菌を一度に検出できるのが特長である。また、免疫クロマトグラフィー法が実用化されていないウイルスの検出にとりわけ有用である。ただ、現在のところ保険収載されておらず(研究用試薬)、試薬代として1検体で約1万円のコストがかかることが普及を妨げている要因であろう。しかしながら、網羅的な病原体の検出に約1万円のコストをかけたとしても、実施した検査の結果で投与が不要となった抗菌薬や抗ウイルス薬の費用削減、入院期間の短縮、医療関連感染の防止など、費用対効果の向上を念頭に置いた検査体制が今後ますます重要になると考える。

Table 3. Commercially available multiplex assays for the diagnosis of respiratory pathogens

Assay name	CycleavePCR 呼吸器系感染症 起因菌検出キット	CycleavePCR 呼吸器系感染症 起因ウイルス検出キット	Seeplex RV15 OneStep ACE Detection	xTAG Respiratory Viral Panel
Manufacturer	TaKaRa	TaKaRa	Seegene	Luminex
Amplification method	Multiplex real-time PCR	Multiplex real-time PCR	Multiplex PCR	Multiplex PCR
Detection method	Cycling probe	Cycling probe	Capillary electrophoresis	Bead-based hybridization
No. of targets	6	11	15	20
Pathogens detected	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Respiratory syncytial virus subtype A Respiratory syncytial virus subtype B Parainfluenza virus 1 Parainfluenza virus 2 Parainfluenza virus 3 Metapneumovirus Influenza A virus Influenza B virus Adenovirus Bocavirus Rhinovirus	Respiratory syncytial virus subtype A Respiratory syncytial virus subtype B Influenza A virus Influenza B virus Parainfluenza virus 1 Parainfluenza virus 2 Parainfluenza virus 3 Parainfluenza virus 4 Enterovirus Metapneumovirus Bocavirus 1/2/3/4 Adenovirus Rhinovirus A/B/C Corona virus OC43/HKU1 Corona virus 229E/NL63	Respiratory syncytial virus subtype A Respiratory syncytial virus subtype B Parainfluenza virus 1 Parainfluenza virus 2 Parainfluenza virus 3 Parainfluenza virus 4 Metapneumovirus Influenza A virus Influenza A virus (H1) Influenza A virus (H3) Influenza A virus (H5) Influenza B virus Adenovirus Bocavirus Rhinovirus Enterovirus SARS corona virus Corona virus NL63 Corona virus 229E Corona virus OC43 Corona virus HKU1

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。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<sub>m</sub>値の差をできるだけ小さくすること、プライマー同士がどれも相補的でないこと、増幅産物の長さも短くすることなどが肝要である。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。

#### 4. 増幅産物の検出

増幅された産物（アンプリコン）が、目的のものであったかを確認する方法を以下に概説する。

##### 1) アンプリコンの長さを調べる

最も古典的で簡便な方法である電気泳動を用いる。DNAは、外部から電場をかけると、アガロースゲルのなかでは-極から+極に向かって移動する。長いDNAは遅く、短いDNAは速く長い距離を移動して、ふるいにか

けられる。泳動後は二本鎖のDNAに入り込むエチジウムブロマイドで染色し、紫外線をあてる。DNAがオレンジ色に光ってバンドとして観察される。

アガロース電気泳動法に替わる新しい方法として、マイクロチップを利用したキャピラリー電気泳動装置が島津製作所やアジレント社から販売されている。専用の機器と試薬を必要とするが、アンプリコンのサイズと量を正確に計測できるのが特長である。

##### 2) ハイブリダイゼーション法

相補的な配列をもつ核酸の鎖が再び互いに結合して二本鎖になることをハイブリダイゼーション（雑種形成）とよぶ。互いが相補的な配列の場合にだけ二本鎖を形成するという事は、2つの鎖の塩基配列は相補的であることの確かな証拠となる。この性質を利用して目的の塩基配列を探し当てる道具をプローブ（probe）とよんでいる。このプローブには一般に、アンプリコンのなかほど約25-bpと相補的なDNA配列を用いる。プローブが結合したかどうかを探るために、プローブに目印をつけておく（標識：labeling）。プライマーとプローブの特異性が高いほど、増幅されたDNAの特異度も向上する。プローブの標識には、蛍光色素、ピオチン、ジゴキシゲニ

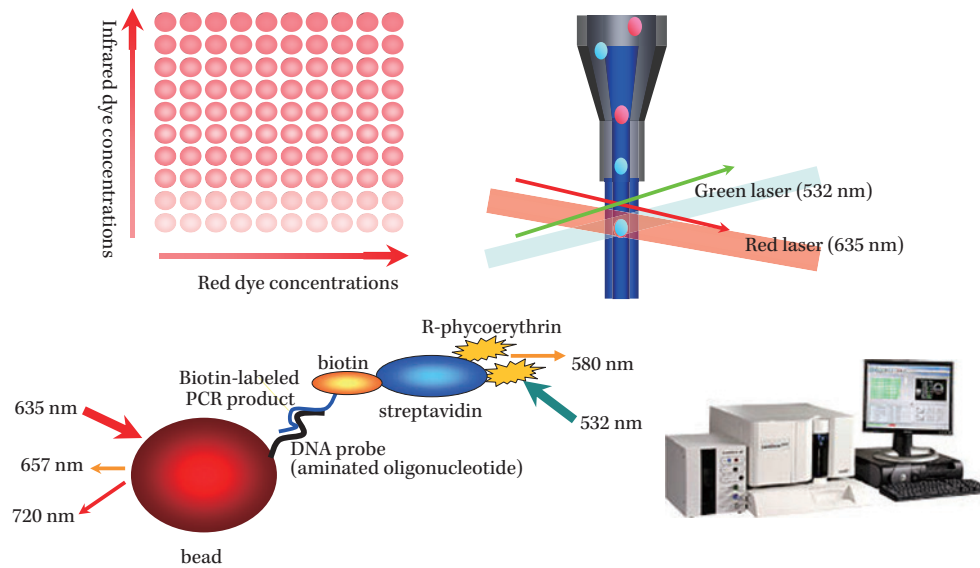
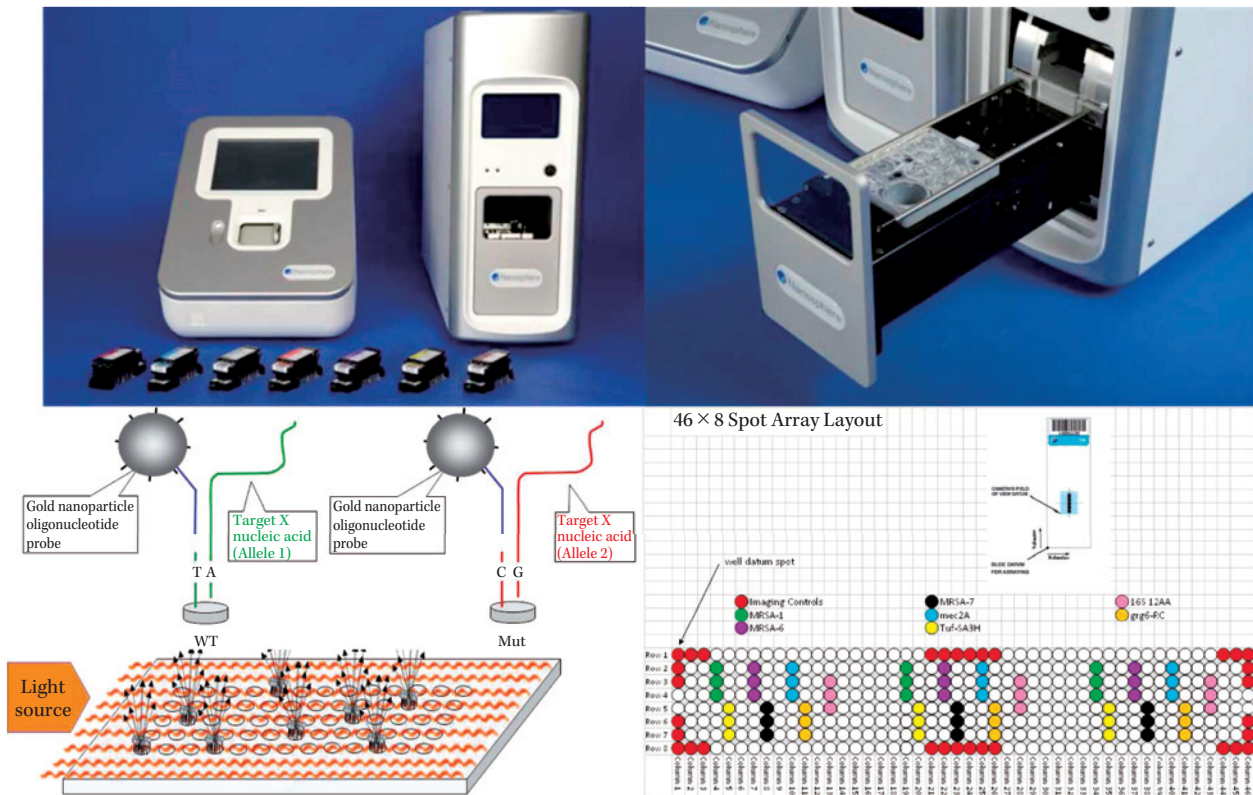


Fig. 2. Liquid bead suspension microarray from Luminex.

Fig. 3. The Verigene<sup>®</sup> System from Nanosphere.

ン (DIG), 酵素などを用いて, 発光や発色の有無をシグナルとして検出する。PCR 反応液のなかに蛍光色素で標識したプローブを混ぜておき, 増幅と同時にプローブの蛍光を測定するのが real-time PCR である。ハイブリダイゼーションを行う媒体は, 反応液 (液相), メンブレン (固相), 細胞・組織の 3 つに大別される。近年, 注目さ

れている検出法として, 液相ではフローサイトメトリーと原理をともにする蛍光マイクロビーズアレイ法, 固相ではマイクロアレイ法があげられる。前者は Luminex<sup>®</sup> システム<sup>7)</sup> が利用可能である (Fig. 2)。本測定システムは 100 種類に色分けされたポリスチレン製ビーズを使用する。ビーズ表面にオリゴプローブを固定化し, ピオチン

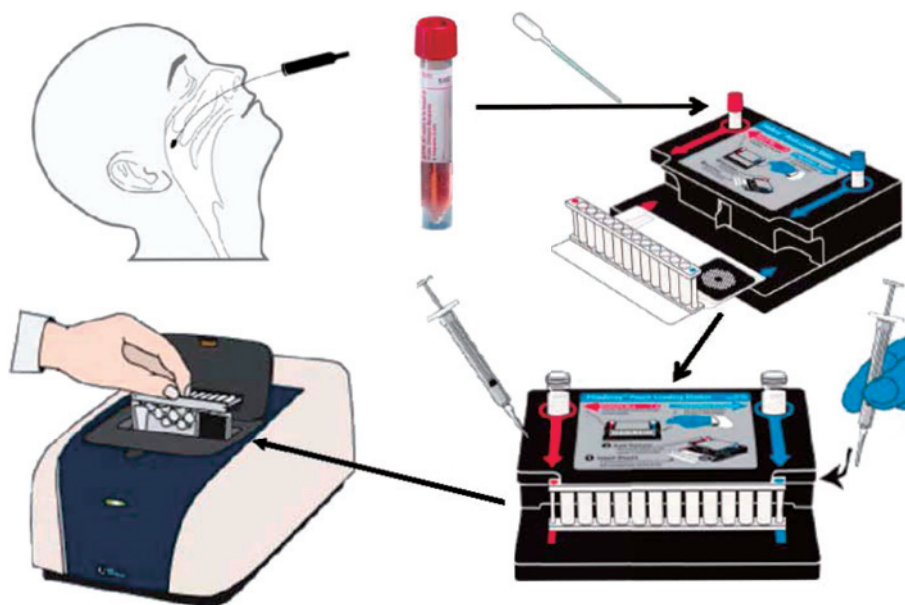


Fig. 4. The FilmArray® System from Idaho Technology: work flow.

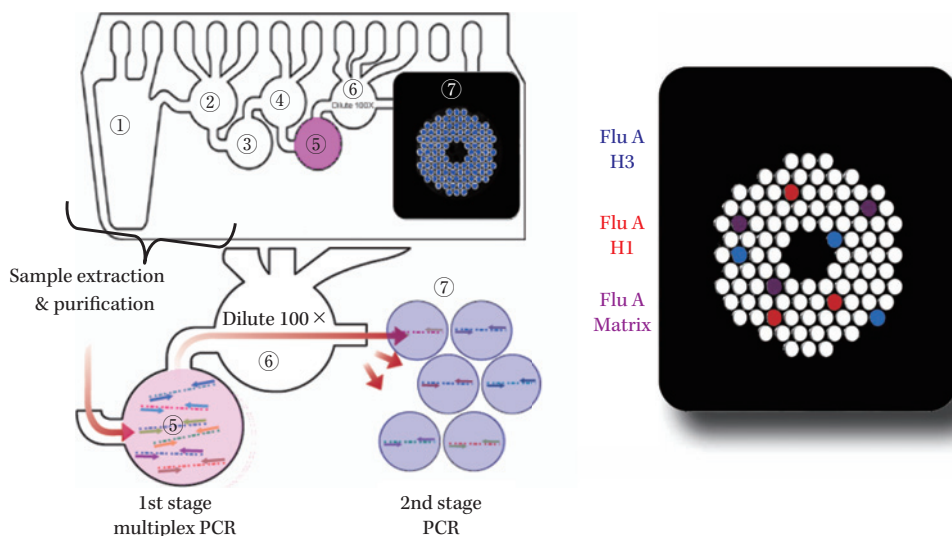


Fig. 5. The FilmArray® System from Idaho Technology: PCR amplification & detection.

標識した DNA 増幅産物とハイブリダイゼーションさせ、蛍光標識したストレプトアビジンを反応させる。各ビーズ表面にレーザー光を照射してビーズを識別しながら、蛍光量を測定する。1本のマイクロチューブ内で最大100種類の反応を同時に測定できる。

マイクロアレイ法では今年(2011年)、アメリカの2社から注目すべき解析技術が開発されている。これらのシステムで最大の特長は、その検出技術のみならず、核酸抽出から増幅反応、ハイブリダイゼーションが全自動で1~2.5時間以内に完了することである。

1つ目は、Nanosphere社によって開発され、実用化されている Verigene®システムである (Fig. 3)。標識に金ナノ微粒粒子を用いてシグナル増幅した後、各プローブのシ

グナルを光分散によって検出する。光分散による検出は、これまでの蛍光法より1,000倍以上感度が高い。金ナノ微粒粒子の表面に、DNAのかわりに抗体を結合させて、生体の微量なタンパクを直接検出するといった多様な測定系が構築できるのも特長の一つである。実際、アメリカでは心筋梗塞の早期診断に、超高感度なトロポニンIの定量検査(検出限界: 0.2 pg/mL)がFDAの承認を得て、実用化されている。2011年7月現在、わが国では呼吸器感染症のウイルス8項目を同時に検出可能な系(約2.5時間)と血液培養が陽性となった後に培養液からグラム陽性菌の同定と薬剤耐性遺伝子の15項目を検出・同定できる系(約2.5時間)の2種類のカートリッジが販売されている(国内の販売元はFinggal Link社)。双方ともに

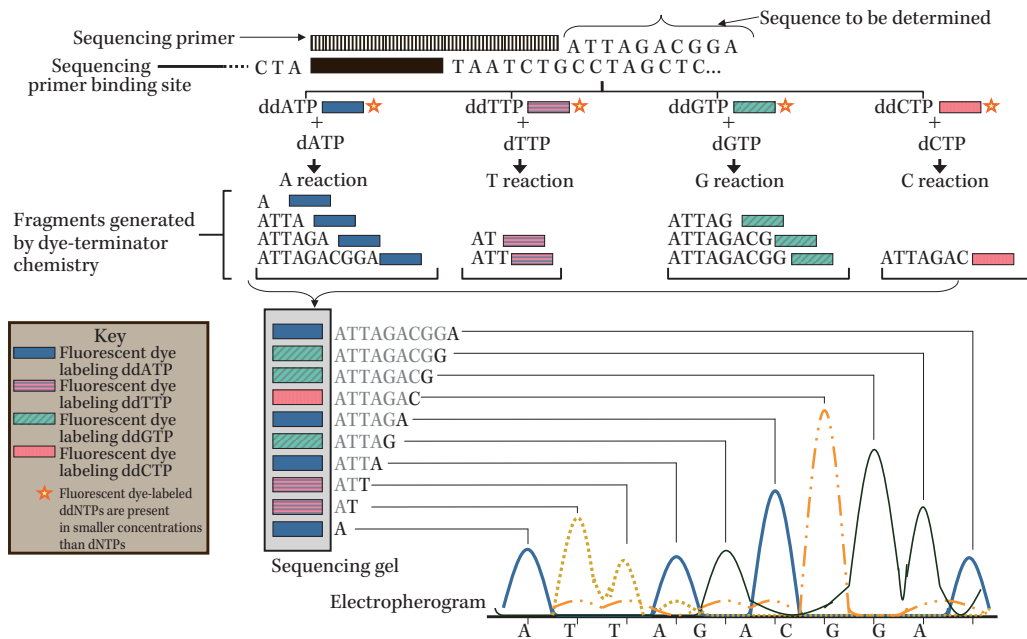


Fig. 6. Principle of dye-terminator cycle sequencing of DNA.

その臨床的有用性に関する検討が国内で実施されている。今後は血液培養陽性時のグラム陰性菌同定用, *Clostridium difficile* 毒素検出用, 呼吸器病原体検出用 (*Mycoplasma pneumoniae* を含む), そして腸管感染症の病原体検出用 (ノロウイルスを含む) カートリッジの販売が予定されている。

2つ目のシステムは, Idaho Technology 社が開発・販売している FilmArray<sup>®</sup>である (Fig. 4)。凍結乾燥した試薬がフィルム製のパウチに装填されており, 自動的に検体の破碎 (Fig. 5 ステップ①), 核酸の精製 (Fig. 5 ②, ③), multiplex PCR による DNA の増幅 (Fig. 5 ⑤), 産物の 100 倍希釈後, 2 回目の PCR (nested PCR) が行われて, 各病原体の DNA をアレイ上のそれぞれ 3 カ所で再び増幅した後, 融解温度の解析によって検出する (Fig. 5 ⑦)。名前のごとくすべての反応がフィルムパウチ内で行われる画期的な全自動検査システムである。アメリカでは呼吸器病原体 21 項目用の網羅的検出試薬がすでに FDA で承認され, 実際の医療現場において, 他の測定システムとの比較・検討結果が報告<sup>8)</sup>されている。本システムは, 検体を専用の試薬容器に溶解したシリンジと試薬溶解用の水を入れたシリンジを双方パウチに挿入するだけのわずか数分の操作 (hands-on time) のみで, かつ 1 時間で測定が完了することから, point-of-care testing (POCT) として外来診療やベッドサイドでの実施が現実味をおびてきた (Fig. 4)。なお, 現在 (2011 年 7 月), わが国での FilmArray<sup>®</sup>システムの販売は未定である。

### 3) アンプリコンの塩基配列を決定する

どのような産物が増えてきたかを知るには, DNA の塩基配列を決めることが最も確実な方法である。DNA

を構成する 4 種類の ATCG の配列を読みとることを, シークエンシング (Sequencing) という。蛍光シークエンス法の原理を Fig. 6 に示す。DNA の基本単位である 4 種類のヌクレオチドの一部を改変したジデオキシヌクレオチド (ddNTP) と DNA 合成酵素である DNA ポリメラーゼを用いる。現在では, 4 種の塩基を別々の蛍光色素 (ddATP-R6G : 緑, ddTTP-TAMURA : 黄, ddGTP-R110 : 青, ddCTP-ROX : 赤) で標識して 1 本のチューブ内で反応させる色素終結法 (Fig. 6) が, 操作性の簡便化と高速な自動シークエンサーの普及に伴って頻用されている。

シークエンス解析技術で注目すべきは, 生物発光を応用したパイロシークエンス法<sup>9)</sup>の実用化である。この方法は DNA 合成時に生成するピロリン酸を ATP に変換し, ATP とルシフェラーゼによりルシフェリンが発光することを利用して塩基配列を解読する方法である (Fig. 7)。実際には dNTP を 1 種類ずつ加えて発光量を測定し, 余剰な dNTP を除去することの繰り返しで配列を決定する。すなわち, DNA の合成を監視しながら塩基配列を決定する方法である。PCR 反応産物を加工することなく, そのままシークエンスが可能であり, 大幅な省力化と自動化が特徴である。すでにこの原理は第二世代シークエンサーにも応用されており, 半日で数百メガ塩基を解読できる状況となっている。

## II. 分子疫学的な解析法の潮流

ここでは細菌の分類と同定, タイピングに用いるゲノムの基礎的な知識を整理しながら, 分子疫学的な解析で主流となりつつある multilocus sequence typing (MLST) について解説を加えたい。細菌のゲノムサイズ

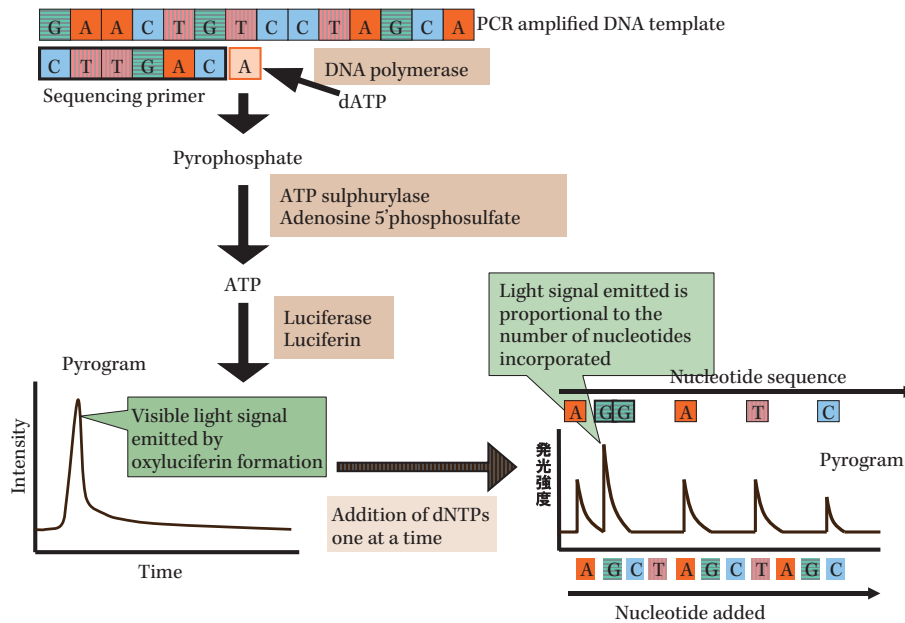


Fig. 7. Principle of pyrosequencing.

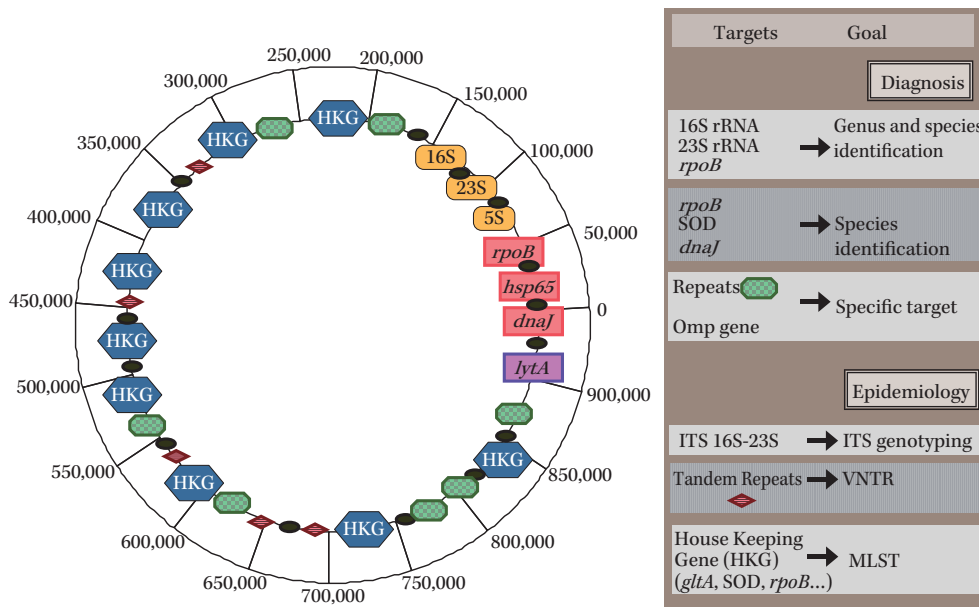


Fig. 8. Strategies for the molecular identification and genotyping of bacterial pathogens.

は最も小さい *Mycoplasma genitalium* の 580 kb から、最も大きい *Streptomyces coelicolor* の 8,668 kb まで約 15 倍の開きがあるが、基本的には Fig. 8 のようにさまざまな遺伝子を保有している。16S rRNA, *rpoB*, *hsp65*, *dnaJ* 遺伝子などは代謝機能をつかさどり、菌生存の根幹にかかわるため、ハウスキープ遺伝子とよばれている。これらの遺伝子の塩基配列を各菌種の基準株のそれと同一性を比較したり系統解析を行うことで菌種の同定あるいは属レベルの決定が可能である<sup>10)</sup>。細菌分類の変遷や最近の動向に関しては既刊の総説<sup>11)</sup>があるので参照され

たい。

ある菌種だけを特異的に検出する場合には、それぞれの病原細菌に特徴的な遺伝子領域や病原因子を支配する遺伝子がターゲットとして使用される。例えば、肺炎球菌では肺炎球菌のみ保有する自己融解酵素 (*lytA* gene) を、黄色ブドウ球菌ではコアグラーゼを支配する遺伝子をターゲットとする。

以上は細菌の属や菌種レベルの同定であるが、株レベルのタイピングではパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) に代表される制限酵素断片多型 (RFLP) 解



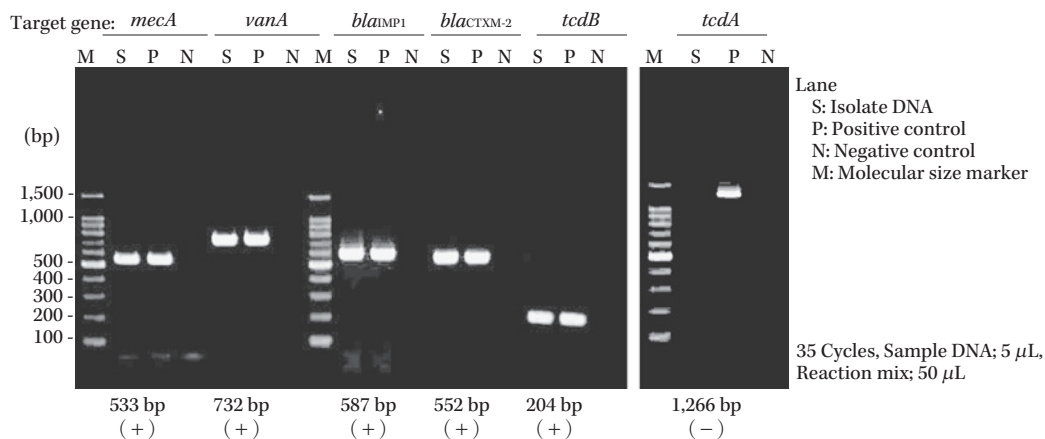


Fig. 9. PCR assays for genes and toxins associated with antimicrobial resistance.

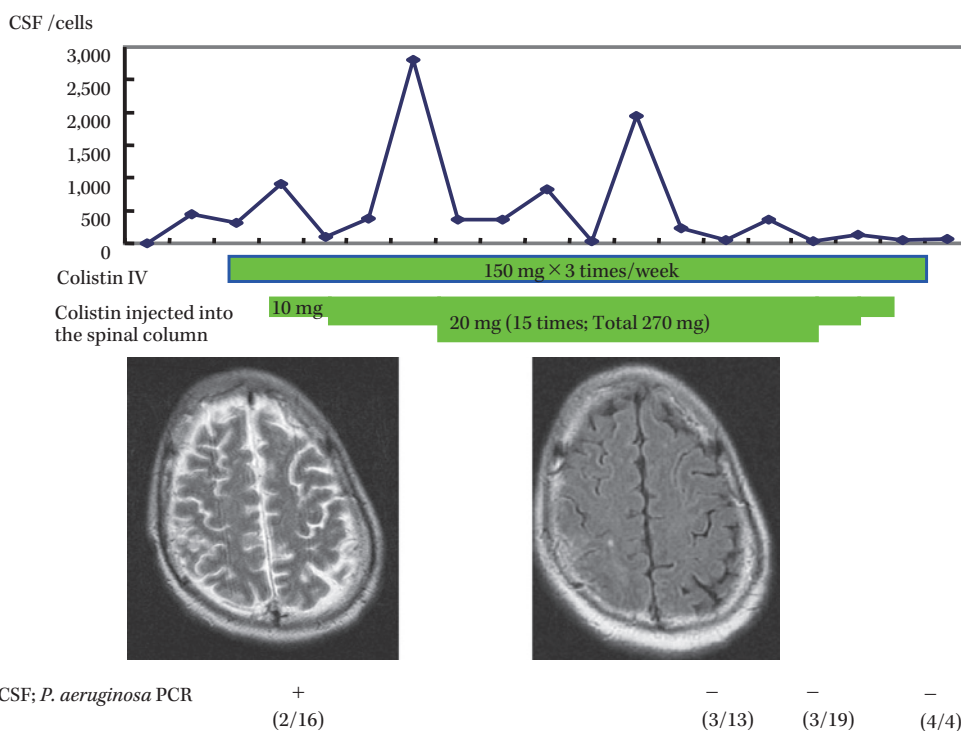


Fig. 10. PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in CSF from a patient with meningitis.

析が主流である。PFGE法は現在でもタイピングのゴールドスタンダードであるが、操作が煩雑で解析に長時間を要するという欠点がある。近年、前述したようにDNA塩基配列の決定が容易となり、高速化と低コスト化の潮流のなかで、細菌の5~7領域のハウスキーピング遺伝子をそれぞれ400~600塩基を解読して、これらの配列を比較することでタイピングを行うMLST法が普及している。識別したい菌株ごとに複数遺伝子の塩基配列の差異をパターン化(allele)して系統解析を行う。MLST法の最大の特長は、主要な病原細菌や食中毒菌の解析プロトコルがWebサイト(<http://www.mlst.net/>)で公開されており、世界中の研究室や検査室で配列データが比較

可能なことである。

その他の遺伝子タイピング法としては、細菌の反復配列(tandem repeats)の多型を解析する反復配列多型分析法(VNTR法)がある。細菌ゲノム上の繰り返し配列領域をPCR法によって増幅して、その産物の大きさから繰り返し配列のコピー数を調べる方法で、おもには結核菌のタイピングに利用されている。

自動細菌タイピング装置は、rep-PCR法<sup>12)</sup>を原理としたDiversiLab<sup>®</sup>システムがシスメック・バイオメリュー社から販売されている。DNA抽出から自動結果解析までの所要時間は4時間と迅速かつ簡便で、日常検査の現場での活用が期待される。MRSAや緑膿菌など約35菌種

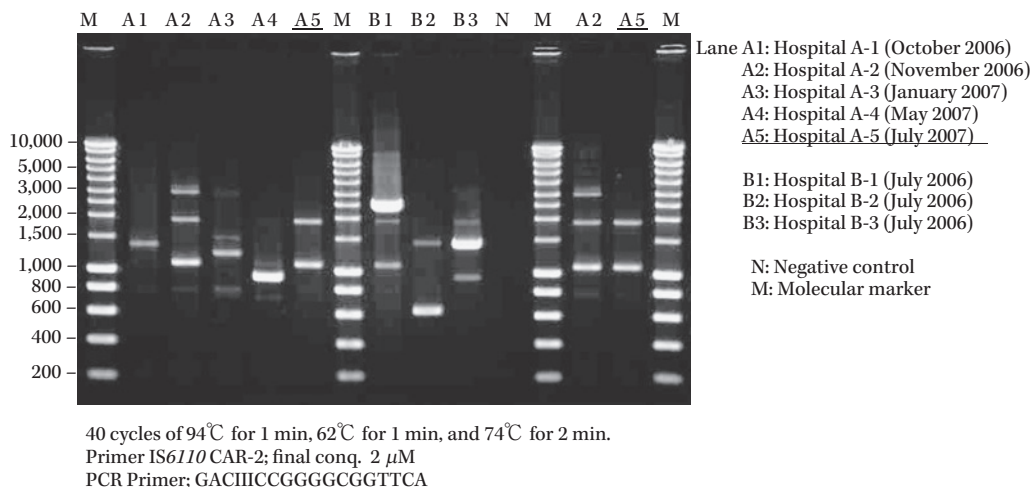


Fig. 11. PCR analysis based on polymorphism of IS6110 for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains.

のタイピング試薬キットが入手可能である。

### III. 遺伝子解析技術の感染制御への適応事例

#### 1. 薬剤耐性遺伝子の検索

菌株の薬剤感受性試験の結果から想定される薬剤耐性遺伝子を PCR 法によって検出する。具体的には、MRSA の *mecA*, VRE では *vanA*, *vanB* など、多剤耐性緑膿菌 (MDRP) では *bla<sub>IMP-1</sub>*, *bla<sub>VIM-1</sub>* など、ESBL では *bla<sub>CTX-M</sub>* の各グループを検索している (Fig. 9)。また、院内感染で問題となる *C. difficile* の毒素産生遺伝子 (*tcdA*, *tcdB*) の検出を試みるケースがある。

#### 2. MDRP による髄膜炎症例<sup>13)</sup>

患者は 45 歳、男性で某年 12 月 8 日 37.5 度の発熱、全身倦怠感、歯肉出血を認めた。近医受診したところ、白血球増加、芽球を認めたため急性白血病疑いにて入院となった。急性前骨髄球性白血病と診断し、寛解導入療法を行い翌年 1 月 15 日寛解に達した。1 月 23 日から地固め療法を行った。1 月 31 日、便秘後の排便から肛門部に裂肛を生じた。2 月 1 日 38.7 度の発熱を認め、各種抗生剤治療を行うも治療抵抗性であり、発熱持続し頭痛が著明となった。便および肛門部病変から MDRP が検出された。項部硬直を認め、髄液所見では細胞数 440 cells/mm<sup>3</sup> の上昇を認めたが、培養は陰性。コリスチンによる治療が必要と判断され、病院の倫理委員会で承認を得てコリスチン点滴が開始された。さらに、感染源である肛門部周囲膿瘍のデブリードマンを施行。2 月 16 日、髄液検査で細胞数 910 cells/mm<sup>3</sup> と悪化を認めたため、髄液の遺伝子検査を依頼された。解析の結果、緑膿菌の DNA が検出された (Fig. 10)。コリスチン点滴治療では不十分であると考え、コリスチン髄注が開始された。2 月 19 日、髄液検査で細胞数 102 cells/mm<sup>3</sup> とコリスチン髄注は著効し意識状態および麻痺症状も改善した。その後、肛門病変は著明に改善し、3 月 2 日頭部 MRI にて髄膜脳炎の改善を認めた。3 月 7 日、ふたたび 38.5 度の発熱を認め髄

液検査を行ったところ細胞数 1,950 cells/mm<sup>3</sup> と増悪したため、アミカシン、アズトレオナム、コリスチン点滴、髄注およびリファンピシンに変更した。その後、解熱し髄膜炎症状の改善を認めていたが、3 月中旬から四肢の痺れ、ミオクロームスが出現したため、MRI を施行したところ、中脳、橋、延髄から胸髄、腰髄にいたる広範囲な T2 高信号の異常所見を認めた。髄液の緑膿菌検出の PCR は陰性であり髄膜炎症状は改善していたため、コリスチンによる薬剤性髄膜炎脊髄炎と診断、コリスチンの髄注および点滴は減量中止した。以後、発熱もなく CRP も陰性で経過しており、四肢の痺れ、ミオクロームスの改善を認めた。髄液の迅速遺伝子検査が MDRP 髄膜炎の診断とコリスチン点滴・髄注の効果判定に活用され、救命できたケースであった。

#### 3. 結核病棟担当の看護師から分離された結核菌のタイピング

結核病棟を担当していた女性看護師が 2007 年 7 月に肺結核を発症した。結核病棟の担当になった 2006 年 10 月より 2007 年 5 月までに入院患者から分離された結核菌 4 株とのタイピングを依頼された。PCR 法を用いて IS6110 の多型に基づく解析<sup>14)</sup>を行った結果 (Fig. 11)、看護師から分離された結核菌 (Fig. 11 の A5) と病棟患者から分離された結核菌 (A1~A4) とはバンドパターンが異なっていたことから、院内感染ではない可能性が示唆された。なお、同居している父親に結核の既往があり、家族内伝播が疑われた。

#### 4. 結核菌 PCR 陽性の骨髄炎例：検体から直接 BCG 株であることを証明<sup>15)</sup>

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症例である。4 歳女児で左肋骨融解像と皮下腫を認めた (Fig. 12)。検査室で実施の結核菌群 PCR 法が陽性となったが *Mycobacterium tuberculosis* と BCG 株を含

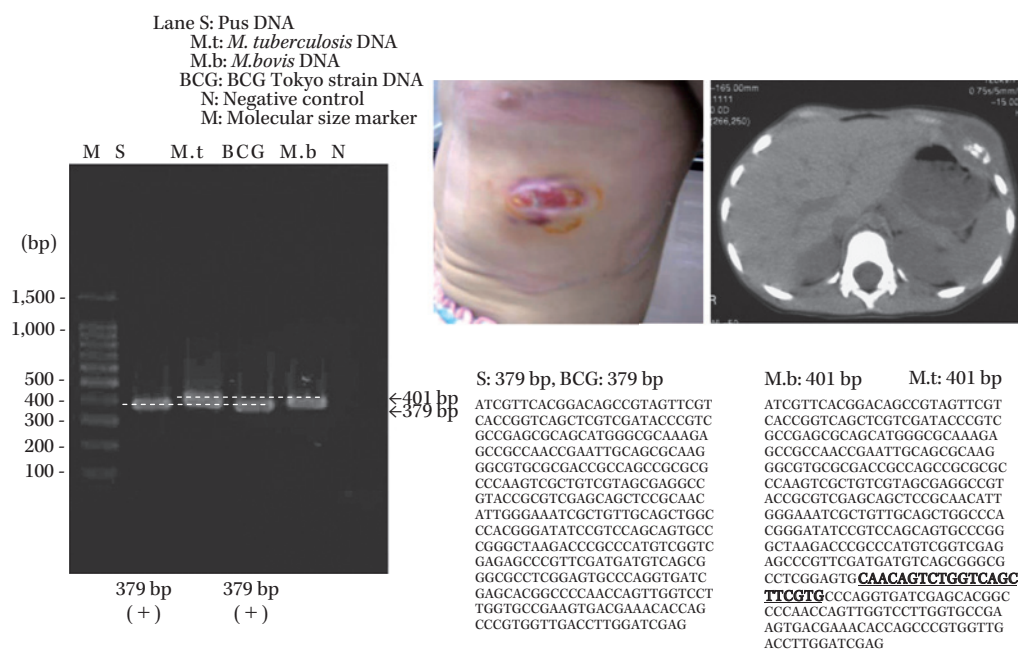


Fig. 12. PCR amplification and sequencing of the RD16 region for detection & identification of *M. bovis* BCG Tokyo strain.

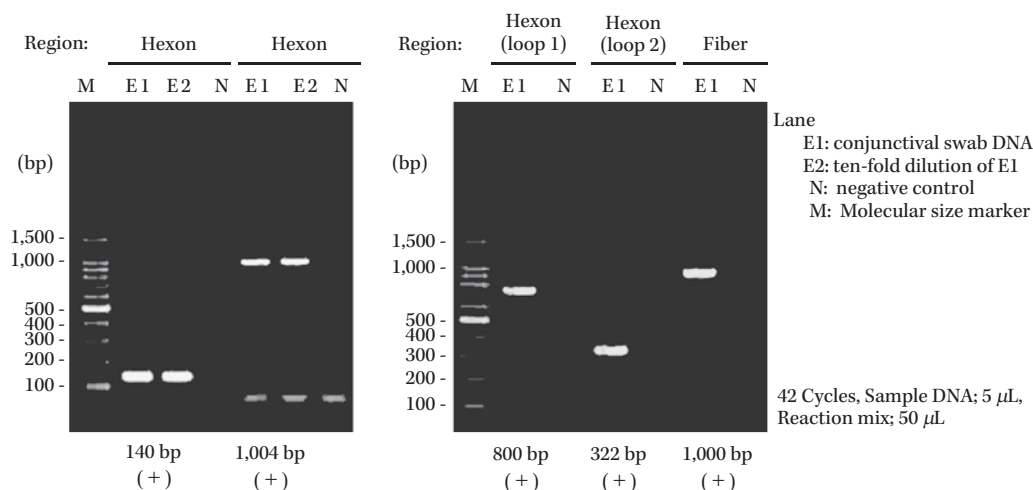


Fig. 13. Detection of human adenovirus DNA from a conjunctival swab using PCR.

む *Mycobacterium 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) を調べる、あるいは産物 DNA 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 (Fig. 12)。起炎菌が BCG 株であることを検体から直接、迅速に証明すること

によって内服薬による外来治療が可能となったケースである。

##### 5. 外来勤務をしている看護師のアデノウイルス結膜炎の迅速診断と血清型の決定<sup>16)</sup>

大学病院の外来勤務の看護師が流行性結膜炎 (EKC) の診断にて、アデノウイルス検出の依頼があった。眼脂から抽出した DNA を用いてアデノウイルスを特異的に検出する PCR を実施した結果、陽性であった (Fig. 13)。看護師の子供が通う保育園で EKC の流行があり子供も罹患していたことから、家族内伝播が疑われた。検体から直接に血清型を決定するべく、アデノウイルスの hexon (conserved region, loop 1, loop 2) や fi-

## Hexon (conserved region)

Human adenovirus 53; 99.1% (884/892)Human adenovirus 37; 99.2% (885/892)

GGCCAGCAGCAACGACGACGCTTCCATCCCTCGCGCAACTGGCGCGCTTCCGGGCTGGAGTT  
GGCCAGGCGACCAAGTGGCTTATCCCTCGCGCAACTGGCGCGCTTCCGGGCTGGAGTT  
CACCCTGGCTCAAGCAGCAAGGAACTCCCTCTGGCTGGGTTTGGACCCCTACTTGTCTACTCGGG  
CTCCATCCCTACTCGACGGGACTTCTACTCAACCACTTCCAGAGGTTTCCATCATGTGGA  
CTCCCTGGCTAGCTGGCCCGCGCAAGCGCTGCTTACCGCGAAGGTTTGGAGTCAAGCGCAGCG  
TCGACGGGGAGGGTACAAGCTGGCCCAATGCAACATGACCAAGGACTGGTCTCTGTCAGATGCTC  
TCCCACTACAACATCGGCTACAGGGCTTCCATGTGCGCGAGGGCTACAGAGGACCGATCTCTCT  
TTCGCAACTTCCAGCCATGAGCAGGAGGTGGTGGATGAGTCAACTACAAGGACTACAAGGCGT  
CACCCTGGCTTCCAGCAGCAACCACTCGGCTTCCGCGTACTGGACCCCATGCTGTCAGGGGA  
GCCCTACCCGCAACTTCCCTACCGCTTCCGCTACCGCTACCGCTACCGCTACCGCTACCGCTACCG  
GTTCTCTGCGCAGGGTCAATGTGGCCACTCCCTCTCTCAGCAACTTCAATGTCATGGCCGCTCAC  
CGACTGGGTGAGAACATGCTCTACGCAACTCGCCAGCGCTGCGACATGACCTTGGAGTGGACC  
CCATGGATGAGCCANCTCTCTATCTCTCTCGAAGTTTTCGAGTGGTTCAGAGTGCACGACCGG

## Hexon (Loop 1)

Human adenovirus 53; 100% (706/706)Human adenovirus 22; 99.6% (703/706)

ACCGCGTCCAGCTCAACCTACTCGGGCAGGGCTTACACAGGCTGGCCCCAAGGGCGCCCT  
AACTCCAGTCAAGTGGCGAGAAAGACTGTGAGAGCAATCAAMCTGAACAGCACTTATTAACAAAGAA  
GCCCGCTATGGGTGGAACTATTGTAATAAAGTGTCTCAGATTGGAAAGATGAACAAACCGG  
ATAACAGGAATTTATGACAGCAAAACATTCAGCCAGCACTCAAAAGGTGAAGAAATCGGCA  
AGATTGGAGTGTTCATGAGGAGGAGGACTTAAAGGAAACAAATGAAGCATGCTATGGCT  
CATTGCGCAGCCACTAATGAAAGGAGGAGTCAAGCAAAATTAACCTAATGCCAGGTCAGCCG  
ACAGAGGAGTTAGACTTACCTGAATCTTGTATTAATGAGGAGGCGAGGTGATATGAATTTAAC  
CGAGACTGATGATGCTGAGAAATGAACTGAGAGACCGAGATACCACTGTGGTGTACAAAC  
TGGAACTTCAGATGACATCTGAGGTAACCTAGCGCAGCATGCTACGCCAAGACCAACTACA  
TTGGCTCAGAGCAATTTGTGGGGCTCATGTACTACAACGACTGGCCACATGGGGTGTCTGGCT  
GTCAGGACTCATGTTGAATGCTGT

## Hexon (Loop 2)

Human adenovirus 53; 100% (304/304)Human adenovirus 22; 100% (304/304)

TGCGTGGAGTAACTCTCATGGTACAGTATGGCTGGCAAAATTTGGTCTGGAGCAACATTTG  
GATCTTTTCACATCACTTGGAGAGCTTTCTTTAAACCCCTGGATGTAAGAAATTTGGTGGAGTGGC  
ATCCATGGGAAGCAATTTGGAGTTCATCTCCACACCGTATCTCAATGATCTGACATCGG  
ATCATAGCTGTCCAGCAGAGTCCACATGCTAAAGTATCTGTCTGTCCAGCAGAAATCTAGCA  
GAGCTGGTAAGACAGCTAGTATTTCT

## Fiber

Human adenovirus 53; 100% (874/874)Human adenovirus 8; 100% (874/874)

AATTAACAGTTAATACTGACCACTTTGCACTTACAATAACAATAAGGATAGTCTTAGAGCGCT  
CATTTGATGATGACCAATAGCTTACAGTATGAGAGGCACTGGCTGTCTATTATAACAAAGAA  
CATCAACACTGGCTGGCTGGTAAATGCTTGTAGATTAACTGGAAAGGATTTGGAACAGATTAT  
CAATAATGGTGAATATATGTTAGAGTTGGGAAGCGCGCTTATCTAATATGACAATGGA  
GACTTGGTAGCATTAAATAAAGAAAGCAACAGCACCTATGGCACTCCAGACACATCTCAAA  
TTGCAAGATTGATCAGGATAAGGACTTAAGTAACTTTGGCTTCAAAAGTGGGAAGTCAATAT  
AGCCAAATGTCATTAATTTGTTGAGCTGGAGGTTACAAATTAACAATAACTAATTCAGCTCT  
TAAGGATTTGACATAAATTTGTTGATAAATAAGGAGTCTTATGGAAATCTCAAACTTGGTAA  
ATCATTTGGAATTTGAAATCAAAATCAATATGTCACAGCTTATGAAAGCTATTGGTTTAT  
GCCTAATTTGGTAGCTTCCAAAACCTACACTGGCTTAAAAAATATGCAAGATATAGTTATGG  
AAACATFACCTTGGGGAAAGCCACATCAACCACTGATCACTTAACTTAACTTAACTTAACTT  
GATGTGAATACTTACTTATGATTTTATTTGTTGGCCAAACTTATGAAATGTGAATTTGAAACTAC  
CTCTTTACCTTTCTATATGCGCAAGATAAAGGATAAATAAG

Fig. 14. Sequence homology searched using BLAST.

ber 領域の DNA を増幅した。シーケンス解析で塩基配列を決定した (Fig. 14)。その結果、53 型であることが判明した。アデノウイルスの血清型はこれまで 1~51 型が登録されていたが、この数年で新しい型がいくつか登場した。すなわち、胃腸炎からの 52 型、EKC からの 53 型と 54 型である。特筆すべきは、53 型は異なる血清型間 (37 型, 22 型, 8 型) で組み換えが起こったタイプである。本症例は各遺伝子領域のシーケンス解析の結果から、3 つの血清型のハイブリッドタイプであることを、ウイルス分離することなく実証できた。

## IV. おわりに

現在、利用可能な遺伝子解析技術の特徴をまとめた後、実際に解析した症例を紹介しながら感染制御領域における適応について取り上げた。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まだまだ残されている。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あるい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、診断率の向上や適切な感染制御につながるであろう。今後は核酸の抽出から増幅そして検出までの全自動遺伝子検査機器の汎用化と網羅的な診断試薬キット<sup>17)</sup>の普及によって、抗菌薬・抗ウイルス薬の適正使用、入院期間の短縮、医療関連感染の予防など、医療の費用対効果のさらなる向上を期待したい。

## 文 献

- 1) 大楠清文, 江崎孝行: 遺伝子検査。臨床と微生物 2004; 31: 610-22
- 2) 大楠清文, 江崎孝行: 遺伝子およびシグナル増幅法。

臨床と微生物 2007; 34: 459-78

- 3) Wolk D, Mitchell S, Patel R: Principles of molecular microbiology testing methods. Infect Dis Clin N Am 2001; 15: 1157-204
- 4) Morozumi M, Nakayama E, Iwata S, Aoki Y, Hasegawa K, Kobayashi R, 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 2006; 44: 1440-6
- 5) Markoulatos P, Sisfakas N, Moncany M: Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. J Clin Lab Anal 2002; 16: 47-51
- 6) Chiba N, Murayama S Y, Morozumi M, Nakayama E, Okada T, Iwata S, et al: Rapid detection of eight causative pathogens for the diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. J Infect Chemother 2009; 15: 92-8
- 7) Dunbar S A, Jacobson J W: Parallel processing in microbiology: Detection of infectious pathogens by Luminex xMAP multiplexed suspension array technology. Clin Microbiol Newslett 2007; 29: 79-86
- 8) Rand K H, Rampersaud H, Houck H J: Comparison of Two Multiplex Methods for Detection of Respiratory Viruses: FilmArray RP and xTAG RVP. J Clin Microbiol 2011; 49: 2449-53
- 9) Ahmadian A, Ehn M, Hober S: Pyrosequencing: History, biochemistry and future. Clinica Chimica Acta 2006; 363: 83-94
- 10) Maiwald M: Broad-range PCR for detection and identification of bacteria. In Persing D H, Tenover F C, Tang Y W, Nolte F S, Hayden R T, von Belkum A (eds.), Molecular microbiology: Diagnostic principles and practice, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC., 2011; 491-505
- 11) 大楠清文, 江崎孝行: 病原微生物の分類。山中喜代治編, 新・カラーアトラス微生物検査, 医歯薬出版, 東京, 2009; 190-206

- 12) Frye S R, Healy M: Repetive sequence-based PCR typing bacteria and fungi. *In* Persing D H, Tenover F C, Tang Y W, Nolte F S, Hayden R T, von Belkum A (eds.), *Molecular microbiology: Diagnostic principles and practice*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC., 2011; 199-212
- 13) 田岡和城, 仲宗根秀樹, 木田理子, 壺岐聖子, 白杵憲祐, 館田一博, 他: 急性前骨髄球性白血病の寛解中に合併した多剤耐性緑膿菌による肛門周囲野膿瘍と髄膜脳炎から敗血症に至りコリスチン点滴と髄注で救命できた一例。臨床血液 2008; 49: 124
- 14) Otal I, Samper S, Asensio M P, Vitoria M A, Rubio M C, Gómez-Lus R, et al: Use of a PCR method based on IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 273-7
- 15) 石和田稔彦, 菱木はるか, 渡邊正治, 大楠清文, 河野陽一: BCG菌とヒト型結核菌の迅速鑑別に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 2008; 82: 30-3
- 16) 望月清文, 堅田利彦, 大楠清文, 金子久俊: 医療従事者に生じたアデノウイルス結膜炎の3例。感染症学雑誌 2010; 84: 469-73
- 17) Caliendo A M: Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens. *Clin Infect Dis* 2011; 52(Suppl 4): S326-30

## Update on molecular diagnostic and typing techniques and their use in the control of infectious diseases

Kiyofumi Ohkusu and Takayuki Ezaki

Department of Microbiology, Gifu University Graduate School of Medicine, 1-1 Yanagito, Gifu, Japan

Molecular microbiology techniques have been proven to be a major technological advance that can make a positive contribution to healthcare. They are useful supplements to conventional techniques not only in directly detecting pathogens from clinical specimens, but also in characterizing organisms from cultures. In addition, molecular methods are an essential tool in epidemiology by providing strain-typing information that support outbreak investigations, and reduce the risk of nosocomial transmission within healthcare facilities. It is anticipated that molecular methods will soon be adapted by laboratories for routine use. This review will focus on emerging molecular technologies and their clinical utility for the identification and characterization of pathogens with a focus on those that cause hospital-acquired infection.