

ウイルス・細菌核酸多項目同時検出

Multiplex PCR panel tests using FilmArray system

うわ みの よし ふみ
上 蓑 義 典
Yoshifumi UWAMINO

<キーワード>

Multiplex PCR panel, FilmArray, SARS-CoV-2, Respiratory tract infections, Meningitis, Syndromic approach

はじめに

近年、微生物検査領域において病原体核酸検査の自動化が盛んになっている。多くの病原体核酸検査が、特定の病原体遺伝子や薬剤耐性遺伝子の有無の検出を目的とする一方、2017年6月に細菌核酸・薬剤耐性遺伝子検査が保険収載されたことを機に、感染臓器別に主要な病原細菌やウイルス、真菌やその薬剤耐性などを網羅的に検査する多項目パネル検査

と言われる全自動遺伝子検査が実施されるようになった。このように、従来の特定病原体の有無を調べるアプローチに加えて、特定の感染臓器で想定される主要な病原体を網羅的に検査するアプローチである Syndromic approach が可能な時代を迎えている。本稿では、現在 bioMérieux 社傘下の米国 BioFire 社が開発した全自動マルチプレックス遺伝子検査装置 FilmArray® システム (図 1) 向けの多項目遺伝子検査試薬である、FilmArray® 呼吸器パネル 2.1 を用いたウイルス・細菌核酸多項目同時検出 (SARS-CoV-2 含む) および、FilmArray® 髄膜炎/脳炎パネルを用いたウイルス・細菌核酸多項目同時検出 (髄液) について触れ、その適切な使用法や解釈、使用上の注意点について概説する。

I. ウイルス・細菌核酸多項目同時検出 (SARS-CoV-2含む)

2019年11月に、FilmArray® 呼吸器パネルを用いたウイルス・細菌核酸多項目同時検出が保険収載された。この際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、ヒトライノウイルス/エンテロウイルス、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミジア・ニューモニエ、百日咳菌を鼻腔・咽頭ぬぐい液より Multiplex Nested PCR 法を用いて定性的に検出するというものであった。保険適用についての条件も非常に厳しく、集中治療室管理料等の算定対象となる重症呼吸器感染症患者への実施に限られ、感染症または臨床検査を専門と



図 1 FilmArray 測定装置の例

図は FilmArray Torch システム、モジュール 12 台取り付け
(写真:ピオメリュー・ジャパン提供)

する医師の配置という施設基準も存在していた。元々、本検査は呼吸器ウイルス感染症とレジオネラ以外の非定型肺炎の原因細菌をターゲットとしていたため、重症例というのは限られ、あまり多用されることはなかった。

状況が変わったのは、やはり新型コロナウイルス感染症によるパンデミックである。SARS-CoV-2 核酸検査に対して当初 1,350 点（外注検査では 1,800 点）という破格の診療報酬が認められ、かつ、体外診断薬も極めて迅速に承認された。国際的にも SARS-CoV-2 核酸検査試薬の開発が急ピッチに進み、2020 年 5 月 5 日には、FilmArray[®] 呼吸器パネルを改良し、検出項目に SARS-CoV-2 を加えた BIOFIRE[®] Respiratory 2.1 panel がアメリカ食品医薬品局より緊急使用許可を得た。その約 1 か月後の 2020 年 6 月 2 日には FilmArray[®] 呼吸器パネル 2.1 という名で、SARS-CoV-2 を含む 18 種のウイルス、4 種の細菌の核酸を同時に 45 分で検出できる検査として、わが国でも体外診断薬承認を得ることになった（表 1）。速やかに保険収載され、ウイルス・細菌核酸多項目同時検出（SARS-CoV-2 含む）として院内検査に対しては 1,350 点の診療報酬が得られることになった。この点数は、SARS-CoV-2 核酸検査の診療報酬が 700 点に減額された現在でも維持されている。

本検査の保険適用は、「COVID-19 の患者であることが疑われる者」に対して検査を実施した場合となるため、あくまでも COVID-19 を疑う患者に対して検査を実施することになる。しかしながら、COVID-19 の症状は他の上気道ウイルス感染症と明確に区別することは困難であるため、現実的には、COVID-19 も含む上気道ウイルス感染症に対して検査を実施することになる。パンデミック初期には、人の往来が激減したこともあり、COVID-19 以外の呼吸器ウイルス感染症の頻度が激減したため、SARS-CoV-2 単

項目検査で十分という時期も多かったが、2021 年ごろより RS ウイルス（RSV）の流行が再び起こるようになり、さらに 2022/2023 シーズンにおいては、東京都を含む多くの自治体で、インフルエンザの流行が定点あたり 10.0 人を超えるなど、3 年ぶりにインフルエンザ流行注意報が発出される中で、同時検査の有用性は高まってきていると言える。

特に本検査の必要性が高いのが小児領域である。小児は、SARS-CoV-2 ウイルスの他にも、学校や園などを通じてインフルエンザウイルス、RSV、ヒトメタニューモウイルス（hMPV）、マイコプラズマなどの流行の影響を受けやすい。また乳幼児においては、インフルエンザウイルス、RSV、hMPV、百日咳（*Bordetella pertussis*）感染等が重篤な症状を引き起こしやすい。いずれも、イムノクロマト法あるいは核酸増幅法で、単一の抗原の有無を調べる検査法は存在するものの、それぞれの検査のために複数の検体採取を行うのは、患児の負担も大きく時間や医療資源の無駄も多い。FilmArray[®] 呼吸器パネル 2.1 の使用により、単回の検体採取と、ハンズオンタイムを合わせて約 1 時間の検査で全ての結果が判明するというメリットも大きいと言える。逆に、免疫不全のない成人においては、RSV、hMPV などに感染しても症状は軽症であり、いわゆる「感冒」に過ぎない。そういった事例でも、設備等の関係で他に迅速な検出法を有しない場合にはやむを得ないが、SARS-CoV-2 単独の検出に対して、他の全自動遺伝子検査装置等が利用可能な状況であれば、国民医療費は有限であり、その高額な診療報酬を考えるとウイルス・細菌核酸多項目同時検出（SARS-CoV-2 含む）を敢えて選択しなくともよいかもしれない。

実際に、当院でも FilmArray[®] 呼吸器パネル 2.1 検査の運用を実施しているが、直近の検査依頼の半数以上は小児患者であった。当院では、Roche Diag-

表 1 FilmArray[®] 呼吸器パネル 2.1 の検出微生物

ウイルス	Respiratory Syncytial Virus	細菌
Adenovirus	Influenza A/H1	<i>Bordetella parapertussis</i>
Coronavirus 229E	Influenza A/H3	<i>Bordetella pertussis</i>
Coronavirus HKU1	Influenza A/H1-2009	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
Coronavirus NL63	Influenza B	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Coronavirus OC43	Parainfluenza Virus 1	
SARS-CoV-2	Parainfluenza Virus 2	
Human Metapneumovirus	Parainfluenza Virus 3	
Influenza A	Parainfluenza Virus 4	

(バイオメリュー・ジャパン提供)

nostics の Liat システムによる SARS-CoV-2 とインフルエンザの同時検出も含め選択が可能という点はあるが、成人患者に関する検査は大半、GeneXpert システム（ベックマンコールター）、Cobas5800 システム、Liat システムを用いた、SARS-CoV-2 単独あるいは SARS-CoV-2 とインフルエンザの同時検査が依頼されている状況にある。

II. ウイルス・細菌核酸多項目同時検出(髄液)

髄膜炎、特に細菌性髄膜炎は内科緊急症と言われ、迅速かつ的確な抗微生物薬治療の開始が非常に重要である。診断後、早期に抗微生物薬を開始する必要があるため、髄液検体採取前に投薬が開始されることもあり、髄液培養検査の感度低下の一因ともなっている。また髄膜炎の原因微生物は、細菌だけではなく、ウイルス、真菌等も原因となる。髄液細胞数の多核細胞と単核細胞の割合、髄液糖などが鑑別には有用であるが、急性期にはこれらの所見だけで見分けることが難しい症例も多く存在する。

FilmArray[®] 髄膜炎 / 脳炎パネルは、髄膜炎や脳炎などの主要な 14 の原因微生物を、髄液検体を用いて、1 分程度のハンズオンタイムと 60 分程度の測定時間で迅速に同時検出可能な試薬である（表 2）。他の FilmArray[®] 試薬と同様に Multiplex Nested PCR 法を原理とし、2 段階目の PCR 反応が行われる各アレイごとに病原体特異的プライマーがセットされ、PCR 反応において蛍光インターカレーターの取り込みが行われる。その上で、PCR 反応終了後に DNA 融解曲線解析を実行し、求められた融解温度（T_m 値）が複数のウェルで一定条件を満たす場合、陽性と判定される。このアレイごとの PCR 反応により複数の病原体の同時検出を可能にし、さらに融解曲線解析を加えることで、反応の特異性が担保さ

れるという仕組みになっている。本試薬は 2019 年春に体外診断薬承認を取得していたが保険収載されておらず、完全自費診療で用いるか、あるいは医療機関等の研究費等負担で実施するしかなかった。ようやく 2022 年 10 月 1 日より「ウイルス・細菌核酸多項目同時検出（髄液）」として保険適用となり、小児科、神経内科、脳神経外科または救急科の経験を 5 年以上有する常勤の医師が 1 名以上配置されている場合に 1,700 点が算定可能になった。

FilmArray[®] 髄膜炎 / 脳炎パネルの臨床的有用性については、いくつかの既報が存在するが O'Brien¹⁾らは、オーストラリアの Royal Darwin Hospital で 2016 年 2 月に FilmArray[®] 髄膜炎 / 脳炎パネルを導入する前後 15 か月の比較を行っている。導入後の期間の中枢神経感染 26 例のうち 14 例は Enterovirus 感染、4 例は Human parechovirus 感染であった。これらの診断に要した日数は FilmArray[®] 髄膜炎 / 脳炎パネルの導入により中央値で 4 日程度短縮し、抗菌薬使用日数、入院期間も有意に短縮したと報告している。

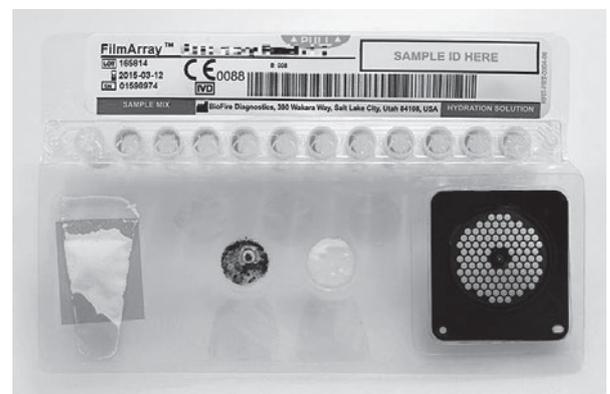


図 2 FilmArray[®] 試薬の構造

右の黒い蜂の巣状の部分で 2 段階目の PCR 反応を行い検出するアレイとなっている。

(写真：バイオメリュー・ジャパン提供)

表 2 FilmArray[®] 髄膜炎 / 脳炎パネルの検出微生物

細菌	ウイルス	真菌
<i>Escherichia coli</i> K1	Enterovirus (EV)	 <i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	Herpes simplex virus 1 (HSV-1)	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Herpes simplex virus 2 (HSV-2)	
<i>Neisseria meningitidis</i>	Human herpesvirus 6 (HHV-6)	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Human parechovirus (HPEV)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Varicella zoster virus (VZV)	
	Cytomegalovirus (CMV)	

(バイオメリュー・ジャパン提供)

また Péan de Ponfilly ら²⁾は、パリの大学病院での単施設後ろ向き研究の結果として、FilmArray[®] 髄膜炎 / 脳炎パネルの導入前後の期間の、髄液検査症例を review し、導入前 284 例、導入後 300 例の病原体感染による髄膜炎症例を比較した。特に Enterovirus、HSV、VZV などの検出率が上昇し、そのような病原体が確定した症例では抗菌薬使用率や入院期間の有意な短縮が認められている。

当院でも 2019 年より各診療科の研究費での検査として、FilmArray[®] 髄膜炎 / 脳炎パネルの運用を行ってきた。特に 3 次医療機関という特質からか、市中発症の無菌性髄膜炎症例や細菌性髄膜炎症例などは限られるため、Enterovirus などの早期検出や、肺炎球菌の早期同定などによる抗菌薬の適正使用効果というのは、残念ながらあまりはっきりしない。しかしながら、造血幹細胞移植患者や、免疫抑制剤使用患者が元々多いこともあって、こういった症例での髄膜炎や脳炎原因微生物の早期同定に大きく寄与している。

森ら³⁾は、当院で造血幹細胞移植後患者に対して FilmArray[®] 髄膜炎 / 脳炎パネルを使用した経験に関する報告を行っているが、造血幹細胞移植後に髄膜炎あるいは脳炎が疑われ FilmArray[®] 髄膜炎 / 脳炎パネル検査を行った 12 例中、4 例で FilmArray[®] 髄膜炎 / 脳炎パネル検査陽性になり、うち 3 例で HHV-6 陽性、1 例で CMV 陽性であったと述べている。これらの陽性の結果はいずれも各病原体検出に関する real-time PCR の結果と一致していた。特にこのうち、HHV-6 が陽性となった 1 例については、初回の髄液検査では FilmArray[®] 髄膜炎 / 脳炎パネルのみが陽性になり、HHV-6 の real-time PCR 検査では陰性であったが、7 日後に再度採取した髄液を用いた検査では HHV-6 real-time PCR 検査も陽性化している。多くの施設で HHV-6 の real-time PCR 検査は外部委託されていることも多いため、院内での FilmArray[®] 髄膜炎 / 脳炎パネルで早期診断が可能になり、結果として早期にガンシクロビル等の適切な治療薬投与が可能になったといえる。

このように、FilmArray[®] 髄膜炎 / 脳炎パネルは、非常にクリティカルで早期の適切な抗微生物薬投与が必須である中枢神経感染症の病原体診断について、非常に強力な武器と呼べる。また、現時点では

同じくパネル検査で同一の 1,700 点が算定される BioFire[®] 血液培養パネルに比べ、保険適用上の適用条件も使いやすいものとなっている。今後、測定装置の普及が進めば髄膜炎や脳炎の疑い例については、髄液培養検査等と並んで基本的には実施すべき検査という立ち位置になっていく可能性が高いと筆者は考えている。

おわりに

今回 2 つの FilmArray[®] パネル検査について、その適応やリアルワールドでの使い所について概説した。いずれも病原体核酸検査としては非常に高額な検査であるのは間違いないが、その迅速性と網羅性を考えると、適切な使用によりコスト以上の価値があると考えられる。本検査で何がわかるのかをしっかりと熟知した上で、鑑別疾患を考えて、網羅的に Syndromic Approach 戦略を取るべきか、あるいは、限られた鑑別疾患の中でその疾患の有無だけを調べる検査を行う方が効率的か、医師にとっては問われる場面が増えたと言える。また、こういった FilmArray[®] システムを含む全自動遺伝子検査装置の普及により、検査手技は容易になった反面、検査室は医師からの相談に対して、メリット、デメリットを踏まえて検査の提案ができる、検査のコンシェルジュとしての役割が求められる時代が来たのではないだろうか。

文 献

- 1) M P O'Brien, J R Francis, I M Marr, et al. Impact of Cerebrospinal Fluid Multiplex Assay on Diagnosis and Outcomes of Central Nervous System Infections in Children: A Before and After Cohort Study. *Pediatr Infect Dis J*. 2018 Sep; **37**(9): 867-871. doi:10.1097/0000000000001936.
- 2) G Péan de Ponfilly, A Chauvin, M Salmona, et al. Impact of a 24/7 multiplex-PCR on the management of patients with confirmed viral meningitis. *J Infect*. 2021 Dec; **83**(6): 650-655. doi:10.1016/j.jinf.2021.08.050. Epub 2021 Oct 6.
- 3) T Mori, Y Koda, J Kato, et al. Usefulness of the FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel in diagnosis of central nervous system infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Support Care Cancer*. 2022 Jan; **30**(1): 5-8. doi:10.1007/s00520-021-06474-5. Epub 2021 Aug 4.