

新型コロナウイルス感染症 *Up-to-date* 24

ポストコロナ遺伝子検査機器の活用・運用例

Examples of utilization and operation of genetic analysis instruments
in the post-COVID-19 eraくち びろ とも かず
口 広 智 一
Tomokazu KUCHIBIRO

はじめに

2019年に発生した新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の世界的パンデミックは、わが国においても大きな感染流行を引き起こし、多数の罹患者や死亡者が発生した歴史的な未曾有の感染症の大流行となった。発生当初のCOVID-19の検査方法としては、解明されていたCOVID-19ウイルスの遺伝子を検出するPCR法が最も早く確立された検査方法であり、最も精度の高い検査方法であったことから、世界中でCOVID-19のPCR検査が急激に普及していった。

しかしながら、COVID-19流行前のわが国の一般医療機関における遺伝子検査機器は、一部の大学病院等の大規模医療施設や医療施設でのみ運用されており、他国と比較して大きく遅れていたといっても過言ではない状況であった。そのため、遺伝子検査装置を兼ね備えた医療施設の臨床検査室の割合は低く、わが国の遺伝子検査の普及率や検査力の低さを露呈することとなった。そこで、国を主とした行政は、補助金などを使用して全国の多くの医療施設に遺伝子検査機器を導入し、COVID-19の迅速診断に対応することとした。それらは中小規模の医療施設だけでなく、診療所やクリニックにおいても導入される状況となり、遅れていたわが国の医療施設における遺伝子検査機器の整備は、一気に加速されることとなった。また、遺伝子検査機器自体も迅速化、簡便化、小型化と急激な進化と発展を見せた。

その後、COVID-19は変異を繰り返し、何度か大きな流行を見せたものの、ワクチンや治療薬の開発、当

初と比較して弱毒化傾向を示し、死亡率が低下したことなどを考慮し、わが国では2023年5月より5類感染症の一つとして扱われることとなった。これにより、COVID-19と共存していく世界にシフトチェンジされ、ポストコロナ時代に突入することとなった。

この間に普及したこれらの遺伝子検査機器を今後どのように有効活用するかは、ポストコロナ時代における臨床微生物検査において重要な課題であり、遅れていたわが国の遺伝子検査を充実させる千載一遇のチャンスでもある。本稿では、著者の自施設での遺伝子検査の活用事例を紹介しながら、今後の遺伝子検査機器の活用と課題を考えてみたい。

I. 遺伝子検査機器の実情

遺伝子検査機器といってもさまざまな種類の機器や検査方法が存在する。最もベーシックなタイプは汎用型遺伝子検査装置であり、反応試薬やプライマー試薬を変更することで、さまざまなターゲットとする遺伝子の検出が可能となる。そのため、新たな感染症や変異型が発生しても、目的とする遺伝子が検出可能なプライマー試薬設計などの検出系を確立できれば、すぐに検査を実施できるのが大きなメリットである。

微生物検査室に汎用型遺伝子検査装置が導入された施設では、反応試薬やプライマー試薬を準備するだけで、目的とする微生物や耐性遺伝子、病原遺伝子などの検出が可能となった。メーカーにより、反応試薬やプライマー試薬がキット化された製品を使用することも可能である。ただし、核酸抽出や検出

系、判定方法など、検査手順を最初から最後まで、すべてのプロセスを検証して、正しい検査体制を管理する必要がある。増幅と検出を同時に実施できるリアルタイム PCR 装置もある。それ以外の機器の場合には、検出にアガロースゲル電気泳動装置や UV 撮影装置の使用、キャピラリー電気泳動装置を使用して判定する必要がある。

もう一方が自動遺伝子検査装置である。各メーカーにより、さまざまな自動検査機器が販売されている。遺伝子検査の工程に必要な手技の多くが自動化により技師の手技や判定が簡便化され、自動判定や検査時間が短縮されている機器もある。一部の製品では、コントロール試薬も販売・付属されており、精度管理面でも考慮されている。ただし、その機器に応じた専用試薬を使用する必要がある、異なるメーカーの試薬は使用することはできない。また、非常に簡便で迅速な結果を得られる反面、機器によっては測定原理や検査工程が異なることから、偽陽性や偽陰性の発生率など、検査精度に機種間差があることに留意すべきである。表 1 に汎用機器と自動機器の特徴を示したため、参考にされたい。

II. 公立那賀病院における 遺伝子検査の実施状況

当院は、和歌山県北部に位置する 300 床の地域の拠点となる二次救急指定病院であり、微生物検査室としては規模が小さい部類に入るものと思われる。しかしながら、通常の細菌検査だけでは捉えきれない微生物も含めた感染症検査を実施したいと考え、

COVID-19 流行前より、数種類の遺伝子検査機器を使用した遺伝子検査を行っており、通常の汎用型サーマルサイクラーを使用した自家製 PCR 検査 (in house PCR) として、キット試薬を使用した PCR-based open reading frame typing (POT) 法 (関東化学株式会社、以下関東化学) による MRSA の分子疫学解析、POT キット試薬を用いたカルバペネマーゼ産生遺伝子の検査などを実施していた。他にも、特異的プライマーを用いた菌種同定、耐性遺伝子の検出 (Carbapenemase、プラスミド性 AmpC, ESBL, mecA, VanA,B など)、病原遺伝子検出 (ペロ毒素、PVL など)、16SrRNA シークエンスによる細菌の菌種同定、ITS 領域シークエンスによる真菌の菌種同定 (シークエンス解析は外注) を実施していた。

診療報酬算定項目としては、TRC Ready[®]-80 (東ソー株式会社) を用いて結核菌、*Mycobacterium avium* complex (MAC)、淋菌・クラミジアの院内測定を、スマートジーン[®] (ミズホメディター) を用いてマイコプラズマ DNA の検出を実施していた。ポストコロナ期に入り、CD トキシシン B、*Helicobacter pylori* の遺伝子検査の運用を開始し、現在に至っている。

III. 各遺伝子検査項目の特徴

1. 診療報酬算定可能項目

1) 結核菌・MAC

結核菌および MAC は、わが国における重要な抗酸菌感染症の原因菌であり、特に結核は 2 類感染症に指定されている重要な感染症である。診断の遅れ

表 1 自動遺伝子検査装置と汎用型遺伝子検査装置の特徴

| | 自動遺伝子検査装置 | 汎用型遺伝子検査装置 |
|----------|--|--|
| 手技 | 自動化により一部が簡便化 | 試薬調整やピペッティングなど、マニュアル操作が多い |
| 検査時間 | 短い (等温型など) | 核酸抽出や試薬調整にマンパワーが必要 |
| 判定 | 主に機器による判定 | 機種によるが、自動機器と比較するとやや長い |
| 試薬 | 機器メーカーの専用試薬しか使用できない パッケージが大きすぎたり、使用期限がある プライマー試薬の自由設計が困難 (一部機器では可) | プライマー試薬の自由設計が容易 プライマー試薬は長期保存かつ使用が可能 他社のキット試薬も使用可能 |
| コスト | 専用試薬は高い傾向あり | 自家製試薬は安価、キット試薬はやや高め傾向 |
| 測定項目 | 機器により測定可能項目は限定的 (表 2 参照) | プライマー試薬があれば測定は可能、陽性対象を用いた検証が必須 |
| 診療報酬算定項目 | 算定可能項目あり、研究用項目もあり | 一部キット試薬のみ算定可。算定できないケースが多い |
| 多項目測定 | 一部の機器のみ多項目マルチプレックス PCR が可能 | プライマー試薬の組み合わせにてマルチプレックス PCR も可能 |
| 精度管理 | 一部の機器や製品では精度管理試薬の付属や販売あり 内部コントロール搭載機器あり | 一部キット試薬では精度管理試薬が付属されている in house PCR では精度管理が大きな課題、測定毎のコントロール測定が必須 |
| その他の課題 | 機器の原理や方法により検出感度・特異度に機種間差あり | 技師の操作手技、経験、知識等が結果に影響しやすい |

はさらなる感染拡大を引き起こし、院内感染や家族内感染にもつながるため、迅速検査は非常に重要である。

培養での検出には3～8週間を要し、遺伝子検査の外注は数日を要するため、当院では2010年よりTRC法を用いた院内検査を実施している。その結果、迅速報告が可能になり、結核診断までの日数が短縮し、結核疑い患者の空気感染対策解除までの日数が格段に縮小した。これには、医師だけではなくベッドコントロール係を含めた看護部からも非常に好評を得た。また、PCRの結果が迅速となり、夜間休日の抗酸菌塗抹至急検査の件数が激減（現行ではほぼ依頼なし）した。これは、遺伝子検査結果報告が早くなったことと、抗酸菌塗抹検査だけでは結核とMACの鑑別ができないことが浸透したためであると推測される。また、医師が想定していなかった入院患者で結核が判明した場合、接触者検診（IGRA）の検査が多数必要な場合が想定されるが、迅速報告によりその対象者の大幅減少にも貢献することができる。一部の機器の専用試薬では、結核菌と同時にリファンピシン耐性遺伝子を検出可能な製品もある。MAC陽性の迅速報告は、臨床的意義が高くないと思われがちであるが、呼吸器内科の医師にとって、特に抗酸菌塗抹検査陽性患者が早期にMACと確定することは、診断治療を進めるうえで非常にありがたいとの高い評価を得ている。

2) クラミジア/淋菌

性行為感染症（STD）における重要な原因微生物であるクラミジアは、人工培地による培養が不可であるため、抗原検査または遺伝子検査が有用な微生物の一つである。

当院では、かつてクラミジア抗原検査を長く実施していたが、PCRと比較して感度が低く、判定が非常に難しいケースに遭遇したことが少なくはなかった。そのため、検出感度特異度が高い遺伝子検査を実施することは、非常に有用であると考えられる。

淋菌は培養で検出可能だが、培養同定に2～3日を要する。また、女性性器からの分離は、他の多くの菌種の存在により困難な場合があるため、遺伝子検査が有用となる微生物の一つである。この2菌種の原因微生物の遺伝子検出を同時に迅速かつ精度よく検出することは、適切な抗菌薬選択につながるも

のと思われる。当院では、骨盤内炎症性疾患（PID）が疑われる症例において、至急検査として依頼されるケースがある。

3) 肺炎マイコプラズマ

マイコプラズマは、呼吸器感染症の重要な原因菌の一つであるが、細菌培養法はPPLO（pleuropneumonia-like organism）等の専用培地を要し、2～3週間程の培養期間を要するため、迅速診断には不向きである。かつて使用されていたイムノクロマト法のIgM抗体は迅速性に優れていたが、偽陽性・偽陰性が多く、臨床診断との相関が低いとされてきた。一方で、血清IgM抗体価測定はペア血清測定が必要であり、結果に時間を要するため、迅速検査には不向きであった。イムノクロマト法によるマイコプラズマ抗原キットは、簡便かつ迅速性に優れているが、他の微生物抗原検出キットよりPCR法との比較において検出感度が低い傾向にあった。そのため、当院では臨床的価値が高い迅速PCR法を導入した。

当院で実施しているスマートジーン[®]マイコプラズマ（ミズホメディー）は、Quenching Probe法により簡易に迅速報告が可能（約30～45分）である。標的遺伝子の変異も検出可能であるため、遺伝子変異からマクロライド耐性を判定報告可能であり、抗菌薬適正使用にも貢献できる方法である¹⁾。迅速、簡易、高感度、薬剤耐性の検査が可能であるため、当院では夜間休日を含む24時間対応を実施している。また、1箱5検体包装であるため、当院のような小規模施設でも期限内使用など試薬管理が可能となっている。

4) CDトキシシンB

Clostridioides difficile は、抗菌薬関連下痢症の重要な原因菌であり、施設内感染対策上でも重要な菌種である。腸管内の常在菌の減少に伴い、毒素産生株が増加することにより下痢症の原因となり、施設内伝播を引き起こす。治療には、メトロニタゾールやバンコマイシン散などが選択されるため、*C. difficile* 感染症（CDI）の迅速診断は抗菌薬適正使用においても重要である一方で、芽胞形成菌でありアルコールに耐性を示すことから院内感染対策の観点からも早期診断が重要となる。CDIの検査法とし

ては、抗原を用いたイムノクロマト法や、培養にて発育した菌株を用いた toxigenic culture が用いられていた。しかしながら、前者には CD トキシンの検出感度が低いこと、後者には CCFA (cycloserine-cefoxitin fructose agar) 培地等の専用培地による嫌気培養が必要、かつ 48 時間以上の培養が必要であることなどの欠点があることから、遺伝子検査を用いた迅速診断が有用とされている。当院で使用しているスマートジーン[®]CD トキシン B は、クイックチェイサー[®]CD GDH/TOX (ミズホメディー) と共通抽出液が使用可能なため、簡便に測定が可能である。測定時間は約 40～60 分であり、toxigenic culture は 2 日以上を要するため、大幅な検査時間の短縮にて抗菌薬適正使用に貢献することができる。ただし、診療報酬算定には、検体検査加算 2 以上、感染対策向上加算 1 の施設基準が必要であり、かつイムノクロマト法での抗原陽性毒素陰性の結果が出た場合の条件がある。本試薬は、1 箱 5 検体包装であり、期限内使用など試薬管理が容易で、利用しやすい側面がある。

C. difficile 感染症診療ガイドライン 2022 では、イムノクロマト法を実施せず、直接遺伝子検査を実施する運用も推奨されており²⁾、今後の診療報酬算定条件の改定に注目すべきである。

5) ヘリコバクター・ピロリ

Helicobacter pylori は、胃に感染し、胃潰瘍や胃癌発生リスク上昇などの原因菌として知られている。これまでの検査法としては、鏡検法、培養法、便中抗原法、迅速ウレアーゼ試験、尿素呼気試験、抗体法などが実施されていたが、2022 年 11 月に内視鏡廃液や胃液を用いた遺伝子検査法が保険収載された。本法は感度特異度が高く、簡便に測定することが可能である。また、胃酸分泌抑制剤である PPI (プロトンポンプ阻害薬) や P-CAB 内服の検査への影響が少ないことも利点である。加えて、同時にマクロライド耐性遺伝子変異を検出できるため、耐性を考慮した早期の適切な抗菌薬選択が可能となり、抗菌薬適正使用の面でも有用である³⁾。ただし、抗菌薬治療後の除菌確認には不向きである。

6) レジオネラ

レジオネラ症は、*Legionella pneumophila* を主と

する細菌感染症であり、感染症法にて 4 類感染症に分類されている重要な感染症である。主に、清掃が不十分な加湿器や温泉などの汚染された水のエアロゾルを吸入することで感染し、主として呼吸器感染症を引き起こす。時に重症肺炎となり死に至るケースもあるため、迅速かつ正確な検査が求められている。

検査法としては、尿中レジオネラ抗原検査や培養検査が用いられているが、抗原検査では、キット試薬の種類によっては検出可能な菌種が *L. pneumophila* 血清型 1 型のみと限定的であることや、キットの検査精度に課題がある。培養検査では、発育に 5～7 日程度を要するため、迅速診断には不向きである。そのため、迅速で高感度、かつ幅広い *Legionella* 属を検出可能な遺伝子検査が非常に有用となる⁴⁾。本菌は主に、経験的治療として使用される機会の多い β -ラクタム系抗菌薬に耐性を示すため、適切な早期診断で、正しい抗菌薬治療を実施することが極めて重要である。

7) 百日咳

百日咳は、主に百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の感染によって起こる呼吸器感染症である。主な症状は長期の咳 (遷延性咳嗽) であり、乳児で重篤化しやすく、かつては 5 類感染症小児科定点把握疾患であったが、2018 年より全数把握疾患に変更となり、検査診断が必須となっている。検査法には、百日咳 IgG・IgA 抗体を用いた血清診断法があるが、免疫が発達していない乳児やワクチン接種との鑑別が難しい点が欠点である。培養検査法は、Bordet-Gengou 培地などの専用の選択培地を必要とし、かつ結果が出るまでに約 5～7 日程度の日数を要することから、迅速診断には不向きであった。そのため、本菌の検出にも遺伝子検査が非常に有用となっている⁵⁾。一部の遺伝子検査機器では、稀に原因菌となるパラ百日咳菌の検出も可能な試薬が市販されている。

8) 血液培養陽性の黄色ブドウ球菌感染症

血液培養において黄色ブドウ球菌が検出されることは、重症感染症である可能性があるため、早期に適切な抗菌薬治療を開始する必要がある。特に重要となるのがメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) であり、 β -ラクタム系に耐性を示すことから、パ

ンコマイシン等の抗 MRSA 薬への変更が必要となる。そのため、血液培養中から黄色ブドウ球菌の菌種固有遺伝子 (*spa* 遺伝子または *nuc* 遺伝子など) と耐性メカニズムの原因となる *mecA* 遺伝子を同時に検出することで、MRSA の早期検出が可能となる。*mecA* 遺伝子が検出されなければ、高確率で β -ラクタム系抗菌薬での治療可能と推測することができる。ただし、コンタミネーションや複数菌感染において偽陽性が発生する可能性があるため、注意が必要である。

9) その他

近年、いくつかの培養検査やその他の検査による検出が困難な菌種の遺伝子検査が、一部の機器で診療報酬算定可能となり、測定が可能となっている。肺炎クラミジアの原因菌である *Chlamydia pneumoniae* は、かつては IgG や IgA 抗体を用いた方法のみであったが、一部の機器で遺伝子検査が可能となっている。STD の原因菌としては、*Trichomonas vaginalis* と *Mycoplasma genitalium* 同時核酸検出などが測定可能となった。特に、*M. genitalium* は多剤耐性傾向を示す場合があり、本邦ではこれまで有用な検査法がなかったことから、この遺伝子検査は極めて有用な方法となる。また、これまで培養と抗原検査が主流であった A 群溶血性レンサ球菌においても、遺伝子検査での診療報酬算定が可能となっている。表 2 に各機器の測定項目を示したので、参考にされたい。

10) 多項目同時検出検査

多くの自動遺伝子検査装置が同時に測定できる項目は 1～3 項目程度である。しかしながら、FilmArray[®] (バイオメリュー・ジャパン) はマルチプレックス PCR を用いることで、1 度に 20 種類以上の多項目を約 1 時間で測定することが可能な装置である。そのため、疑われる感染症の種類に応じて、疑わしい微生物をほぼ網羅的に検出することが可能となる。現在、血液培養、呼吸器、髄膜炎・脳炎パネルが診療報酬算定可能で使用可能となっている。

血液培養パネルは、病原菌と同時に主な耐性遺伝子も検出することで、早期の抗菌薬適正使用につなげることができる。

髄膜炎パネルは、主な髄膜炎の原因微生物がほぼ網羅されているため、これまで髄膜炎疑い時に実施されていた多数の薬剤や検査をスリム化できる可能性があり、大きなインパクトがある検査法であると思われる。試薬コストが高いためパネルの適正使用が課題ではあるが、早期の原因菌特定から適正治療につなげることで、不要な経験的治療の投薬コストを省略することを可能とする利点がある⁶⁾。

2. 研究用試薬項目

1) MRSA POT 法の運用

POT 法は、より簡便な分子疫学解析による株の

表 2 主な診療報酬算定可能な感染症関連遺伝子検査項目と専用測定機器 (筆者調べ、2024 年 2 月現在、COVID-19 を除く)

| | LAMP | TRC | GeneX | GC | SG | cobas | BDM | ミュータス | IDN |
|------------------|------|-----|-------|----|----|-------|-----|-------|-----|
| 結核 | ○ | ○ | ◎ | ○ | | ○ | | ○ | |
| MAC | | ○ | | ○ | | ○ | | ○ | |
| 淋菌/クラミジア | | ○ | ○ | ○ | | ○ | | | |
| 肺炎マイコプラズマ | ○ | ○ | | ◎ | ◎ | | | | |
| CDトキシンB | | | ○ | ○ | ○ | | ○ | | |
| ヘリコバクターピロリ | | | | | ◎ | | | | |
| レジオネラ | ○ | | | | | | | | |
| 百日咳 | ○ | | | ○ | | | | | |
| MRSA (血液培養) | | | ○ | ○ | | | ○ | | |
| トリコモナス/M ジェニタリウム | | | | | | ○ | | | |
| A群溶血性レンサ球菌 | | | | | | | | | ○ |

◎薬剤耐性遺伝子同時測定

LAMP: LAMP 法測定装置、TRC: TRCraedy[®]-80、GeneX: GeneXpert[®]、GC: GENECUBE[®]、SG: スマートジーン[®]、cobas: コバス[®] シリーズ (一部を除く)、BDM: BD マックス[™]、ミュータス: ミュータスワコー g1、IDN: ID NOW[™]

タイピング法として開発された遺伝子検査法である。かつてゴールドスタンダードであったパルスフィールド電気泳動 (PFGE) と同等の分類能を持ち、安価、簡便、迅速性に優れた方法である⁷⁾。試薬はシカジーニクス[®]分子疫学解析 POT キット (関東化学) として販売されており、汎用型サーマルサイクラーがあれば実施可能である。対象菌種は MRSA、*Pseudomonas aeruginosa*、*Escherichia coli*、*Acinetobacter* spp、*C. difficile*、*Enterobacter cloacae* complex などが販売されている。また、解析結果を数値化 (POT 値) することで、菌体間の相同性を比較可能であるため、自施設だけでなく他施設との比較も可能である。

当院では、入院患者から分離された MRSA (持ち込み症例も含めて) を対象に POT 法を実施している。キット化された試薬を用いたマルチプレックス PCR を実施し、1 株につき 22 種の PCR を実施して、MRSA を分子疫学的に POT 値として分類している。POT 型データベースを構築し、院内陽性化の事例では、その POT 型とデータベースを比較し、伝播原因を推定するための情報の一つとして用いている。アウトブレイク兆候 (1 病棟 / 月 3 名以上) があれば POT 型を用いて調査し、ICT の介入検討の重要な情報となる。もしも同一 POT 型の伝播など院内伝播事例を強く疑う場合には、介入のための重要なエビデンスとなる。疑わしい事例においても、POT 型が異なれば同一株伝播を否定できる証拠にもなり得るため、伝播か否かの推定の一助となる場合もある。これらの結果は、毎月の院内感染対策委員会 (ICC) にて報告し、施設内の MRSA の動向としてデータを報告している。研究用試薬であるため診療報酬には直結しないが、耐性菌の感染制御の観点から有用な方法であると思われる。アウトブレイク発生時の菌株タイピングにはもちろん有用であるが、MRSA の感染制御は入院期間、抗菌薬使用量、各職種の負担などの軽減効果があり、施設の感染制御への貢献度は大きいと思われる。

2) 16SrRNA 塩基配列解析を用いた菌種同定

16SrRNA は、細菌種が保有する約 1,500bp からなるハウスキーピング遺伝子の一つであり、現在における菌種分類や同定に広く用いられている。現在、同定機器として普及しつつある質量分析装置

(MALDI-TOF MS) による菌種鑑別のためのデータベースにも用いられている。この遺伝子配列を解析することにより、菌種を同定することが可能となる⁸⁾。汎用型機器を使用すれば、プライマー試薬などを準備するだけで実施が可能となる。当院では、対象菌株の DNA を抽出し、増幅用プライマー試薬 (8UA、1485B) を用いて broad-range PCR を実施し、その増幅産物を精製キット試薬を用いて精製 DNA を作成している。その後、目的とする解析領域に応じてシーケンス解析用プライマーを添加し、外注業者に精製 DNA を送付して、シーケンス解析を依頼している。外注先から送付された解析結果を BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)⁹⁾ などのデータベースサイトを利用して解析し、基準株と高い相同性を比較することで菌種鑑別を実施している。約 1,500bp の全領域の解析には、3 種類のプライマー試薬を用いた 3 つの解析データを合わせる必要があるが、多くの場合、前半 500bp のシーケンス解析結果 1 つのみで、ほぼ菌種同定が可能である。判定基準は、CLSI の MM18-A ドキュメントにも記載されており、 $\geq 99.0\%$ の基準株 (Type Strain) との一致や、2 番目に近い基準株との差が 0.5 ~ 0.8% 以上で菌種確定が可能となる。菌種により設定が異なるが、97.0 ~ 99.0% の一致では属レベルでの一致のみとなる¹⁰⁾。本法の利点としては、わずかな菌量で実施可能 (つまようじの先につく程度) であること、PCR の増幅にかかる費用は非常に安価であること、グラム染色性などの分類にかかわらず、細菌なら実施可能であることなどが挙げられる。また、一定の菌量があれば検体から直接遺伝子を検出することも可能であり、抗菌薬投与後の検体などで培養陰性の検体でも、残っている遺伝子が検出できれば、そこに存在していた原因菌を特定することができる可能性がある。注意点としては、大腸菌と赤痢菌のような相同性の近い菌種では、この検査だけでは鑑別できない菌種があること、検出感度はそれほど高くなく、ある程度の菌量は必要であること、コンタミネーションや複数菌の存在下では鑑別は不可となることなどが挙げられる。真菌の菌種同定には、細菌とは異なり ITS 領域や D1/D2 領域を増幅し、シーケンス解析を用いることで、同様に菌種鑑別が可能となる。

3) 薬剤耐性遺伝子検査

菌の薬剤耐性機構は、薬剤感受性検査だけでは検出が困難な場合がある。特に、グラム陰性桿菌における β -ラクタマーゼ産生菌は、表現型試験では耐性を示さないステルス型が存在し、感性と判定されて検査をすり抜けてしまう場合がある。これらの検出漏れは、抗菌薬治療がうまくいかない原因となったり、施設内拡散を見逃してしまう恐れがあるため、抗菌薬適正使用や感染対策上においても重要な問題である。そのため、耐性遺伝子検査は、表現型試験だけでは検出が困難な場合において特に大きな力を発揮することができる。特に、ステルス型が多いとされるカルバペネマーゼ産生遺伝子の検出においては、遺伝子検査が大きな力を発揮する。キット試薬としてもシカジーニクス®カルバペネマーゼ検出キット（関東化学）が、GeneXpert®（ベクマンコールター）の専用試薬としてカルバペネマーゼやVRE関連遺伝子検査試薬などが市販されている。キット試薬によっては、検出対象となる遺伝子以外の耐性遺伝子は検出できないため、使用時には注意が必要である。

4) 微生物特異性プライマーを用いた検査

感染症の原因となる微生物が保有する特異的な遺伝子配列を検出する方法である。各文献等にて報告されている特異的な領域を検出するプライマー試薬を用いることで、微生物を検出することが可能となる。特に、培養が困難であったり、時間を要する菌種の検出や、抗菌薬使用により培養での発育が難しいケースなどで非常に有用である。

著者の経験として、重症敗血症ショックで血液培養陽性となった症例を紹介する。特徴的な細長い紡錘状グラム陰性桿菌を認めたため、*Capnocytophaga canimorsus*を疑いPCRを実施した。血液培養ボトルから直接DNAを抽出し、*Capnocytophaga*属の数種の特異的プライマー試薬を用いてPCRを実施したところ、*C. canimorsus*の特異的プライマーにのみ遺伝子の増幅を認めた。これにより、早期に原因菌の特定につながり、適切な抗菌薬治療につなげることができた経験であった。本菌は、コロニー形成に3日以上時間を要し、質量分析以外での同定は困難な場合が多いため、このような遺伝子検査が極

めて効果的であったと思われる。他にも、病原性や毒素を遺伝子検査にて検出することが可能であり、必要な状況に応じて検査することは感染症診断の一助になるものと思われる。例えば、大腸菌のペロ毒素などの下痢原生大腸菌の検査に関しては、従来の血清型の検査では病原菌特定の精度が非常に低く、病原遺伝子のPCRが高精度で有用であることが報告されており¹¹⁾、非常に有用な方法である。In house PCRでも実施可能であるが、これらの病原遺伝子検出用のキット試薬（関東化学）が市販されている。

5) 核酸クロマト法を用いた遺伝子検査

核酸クロマト法は、PCRでの増幅産物の確認を目視にて簡便な判定を可能とする方法である。本法を用いた場合、アガロースゲルの作成や電気泳動を実施する必要がなく、増幅産物に展開液を加えて、そこにクロマトストリップを加えるだけであり、非常に簡便である。研究用試薬として、核酸クロマト法を用いた下痢原生大腸菌におけるペロ毒素などの病原因子用のキット（株式会社カネカ）や、*Mycobacterium abscessus complex*における菌種同定とマクロライド耐性遺伝子検査キット（極東製薬工業）などが販売されている。

*Mycobacterium abscessus complex*の亜種の菌種同定は、亜種により薬剤感受性傾向が異なるため非常に重要であるが、質量分析装置や16SrRNA塩基配列解析でも鑑別が困難であり、本菌の治療に重要なマクロライド系の薬剤感受性検査で結果を得るには、最大約2週間の時間を要することから、核酸クロマトを用いた本キットでの迅速な亜種同定と耐性遺伝子検出は、極めて有用性が高い検査であると思われる¹²⁾。

おわりに

COVID-19パンデミックへの対応策として、わが国の医療施設には大規模から中小規模施設まで多くの遺伝子検査機器が整備された。これまで遅れていたわが国の感染症遺伝子検査を発展させるチャンスである。臨床微生物検査室としては、培養検査での検出困難、または時間を要する微生物の検出、病原因子や毒素、および耐性メカニズムの検出など、多

くの場面において遺伝子検査の活用が有用となることから、これらの特徴を活かした検査体制を構築し、これまで検査困難であった微生物を含めた感染症検査に対応していくことが求められている。とはいえ、施設内での遺伝子検査の立ち上げや、その運用を維持継続していくためには、いくつかの大きな課題が見受けられる。

第一に、適切な検査項目について診療報酬が算定できる仕組みの整備が最も重要であると考え。近年、多くの遺伝子検査項目が診療報酬算定可能となったが、まだまだ項目や内容は不十分ではないかと考える。また、診療報酬算定を得るためには研究用試薬の試作と検討が必要であるが、その開発費用や検討時間は、メーカーにとって非常に重く、厳しい道りであると思われる。この現在の算定承認までの仕組み自体が、感染症遺伝子検査の普及の足かせとなっている可能性があるのではないだろうか。

第二に、現在診療報酬が算定可能な試薬においても、使用期限内に使い切れないケースが多く存在することである。自施設で遺伝子検査項目を新たに実施しようとして計画しても、包装内の試薬数が多すぎて使用期限内に使いきれず、廃棄せざるをえない試薬が多くなることでコスト面でのデメリットが生じ、自施設での実施を断念せざるをえないケースが多く存在する。現在の医療法に準じた精度保証の観点からは、臨床検査の現場で使用期限を超過した試薬を使用することはまず不可能である。各試薬メーカーにおいては、さまざまな施設規模のニーズに対応した検査項目、包装サイズ、価格などを考慮していただきたい。加えて、現行よりさらに長く使用可能な製品の作成を検討いただきたいと考える。中小規模施設でも期限内に使用可能な試薬パッケージが拡大すれば、わが国の遺伝子検査は施設規模を問わず、継続的に広く普及していく可能性があると思われる。

そして第三に、各施設の現場の臨床検査技師自身の遺伝子検査の知見と技術のレベルアップが必要だと思われる。病原遺伝子検査の基本的な技術や知見を学ぶ場が少ないと思われるため、学会や技師会での教育が必要であろう。これらの課題を克服して遺伝子検査を発展させていくためには、学会（現場の医師、技師）、行政、およびメーカー三者の協力が

必要不可欠であると考え。これまでの枠組みにとられず、三位一体となり有効な方法を検討していただきたい。ポストコロナにおける遺伝子検査機器をこれからどう活用するかが、わが国の感染症検査の将来に大きく影響することは明白である。数年後に訪れる各施設の遺伝子検査機器の更新時に、適切な遺伝子検査の実績を元に、適切に次の世代に機器更新が実施されていくことを願い、稿を閉じたい。

文 献

- 1) 田中 裕士. 迅速マクロライド耐性マイコプラズマ遺伝子診断が外来治療に及ぼすインパクト. 日本化学療法学会雑誌.2020;68(3): 371-375.
- 2) 公益社団法人日本化学療法学会・一般社団法人日本感染症学会CDI診療ガイドライン作成委員会. *Clostridioides difficile*感染症診療ガイドライン2022. 感染症学雑誌.2023;97 Supplement 01: S26-S28.
- 3) 古田 隆久. ピロリ菌の新しい検査「ヘリコバクターピロリ核酸およびクラリスロマイシン耐性遺伝子検出」について. モダンメディア.2023;69(7):16-20.
- 4) 白坂 渉, 篠崎 正博, 櫛引 千恵子, 他. レジオネラ肺炎における尿中抗原検査と LAMP 法遺伝子検査のレジオネラ属菌検出率の比較. 日本臨床微生物学会雑誌.2019;29(4): 203-206.
- 5) 岡田 賢司. LAMP法による百日咳の診断. モダンメディア.2016;62(9): 304-310.
- 6) 太田 和馬, 藤原 悟, 石井 淳子, 他. 髄膜炎・脳炎の急性期診療における脳脊髄液多項目 PCR パネル (FilmArray® ME パネル) の有用性. 臨床神経学.2023;63(8): 528-531.
- 7) 森山 英彦, 松田 親史, 柴田 宏, 他. MRSA の院内伝播制御に有用な POT 法を用いた分子疫学解析. 感染症学雑誌.2012;86(2): 115-120.
- 8) 大楠 清文, 江崎 孝行. 分子系統解析に基づいた細菌の分類と同定. Sysmex journal Web.2009; 10(2).
- 9) BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) ホームページ.
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
(引用2024年2月28日)
- 10) CLSI. Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by Targeted DNA Sequencing. 2nd ed. CLSI guideline MM18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- 11) 磯崎 将博, 小林 治, 星子 文香, 他. 下痢症患者から分離された下痢原性大腸菌の各種病原因子の保有状況について. 日本臨床微生物学会雑誌.2016;26(1): 24-29.
- 12) Yoshida M, Sano S, Chien JY, et al. A novel DNA chromatography method to discriminate *Mycobacterium abscessus* subspecies and macrolide susceptibility. EBioMedicine.2021;64:103187.