



自動化機器による腸内細菌科同定の今昔

琉球大学医学部 臨床検査医学分野 山根 誠久

要 旨

約30年の経過で、自動化機器による腸内細菌科の同定は飛躍的に改善された。多くの自動化機器で、40以上の性状試験から100を超える菌種を精度高く同定できる性能が確認されている。しかし反面、コンピュータ環境の変化と同様、自動化機器でのブラック・ボックス化が急速に進み、性状試験の陽性率と分類単位で構成される菌種同定用のデータ・ベースすら公表しない(できない)製造元も多い。その意味では、「多少なりとも細菌学を学んだものとして、もう少し論に立った自動同定を考えてみたい」という向島達氏の言葉は重い。複数の菌集落を、あるいは液体培地に発育した細菌細胞集団をそのまま、安直に菌種同定に用いるといった基本原則を踏み外した臨床検査技師も見られる。基礎細菌学と臨床細菌学の違いを明確に意識しながら、行ってよいことと、行ってはならないことを正しく判別して欲しいものである。

はじめに

本誌「モダンメディア」が掲載している「医学検査のあゆみ」シリーズは、1984年から始まった企画、「臨床検査ひとくちメモ」にかつて取り上げられた記事の内から、特に歳月を経て変遷した臨床検査について、掲載当時から現在までの状況の変化、検査法の変化、改善された点、残された問題点、将来展望などを改めて論じるものとの編集室からの説明である。私が今回担当した「自動化機器による腸内細菌科同定の今昔」は、1987年発行の第33巻8号に掲載された向島達氏(東京女子医科大学リウマチ痛

風センター)の記事、“腸内細菌同定の自動化に対する考え方を知らせてください”¹⁾から選ばれた。自動化機器による細菌検査の今昔、この20年余の変遷を概説する。

I. コンピュータ環境の変化

向島達氏と言えば、まず最初に思い浮かぶことが細菌検査におけるコンピュータ・システム開発の先駆者であることです。1970年代、国立がんセンターに在職されていた頃、わが国で最初のコンピュータ・システムを細菌検査で自主開発されたのです²⁾。解説記事を読むと、懐かしいN₈₈-BASICで書かれた12行のプログラムがあります(図1)。当時は日本電気(NEC)のPC-8801、PC-9801全盛期で、IBM標準の8インチ・ディスクを記憶媒体としてプログラムが開発されました。また、customize(カスタマイズ)全盛期で、個々の施設でさまざまな創意工夫がプログラムに反映されていました。当時の記憶では、パソコン本体(ハード)とほぼ同額のプログラム開発費が必要だった時代で

```

490 FOR I=1 TO 29
498 KAI=0
500 FOR R=1 TO 14
510 KAI=KAI+(R(R)-A(I,R))/2/(A(I,R)*(1-A(I,R)))
520 NEXT R
530 KAI(I)=KAI
532 IF I=1 THEN SKI=KAI(1):ID=1
535 PRINT %2,I,KAI(I),
537 I1=I:REM FOR SWAP-ID
538 IF SKI>KAI(I) THEN SKI=KAI(I):ID=I1
539 IF I=4*INT(I/4) THEN PRINT %2,
540 NEXT I

```

図1 “カイ2乗の和”を用いた菌種同定用プログラム

向島達氏によって提案され、パソコン用にN₈₈-BASICで開発された。

29種類の菌種(FOR I=1 TO 29)について、14種類の性状確認培地の結果(FOR R=1 TO 14)から菌種を同定する。

文献1)より抜粋引用。

す。いわば、10の細菌検査室があれば、10の異なるプログラムが運用されていた時代です。個々の検査室がその開発したプログラムの優劣を競った時代でもあります³⁾。

この30年間で、コンピュータ環境は大きく変化しました。勿論、コンピュータの性能は格段に向上し、演算スピードも記憶容量も当時からすれば考えられない異次元の世界です。ただ、一人の顧客、一人のユーザーとして“寂しい思い”を避けられません。本来、コンピュータは自分ではなにもできない機械（ハード）で、それに御主人様であるユーザーがプログラムという“知性”を与えることで従順な召使いになるものです。現在のコンピュータ環境を見ると、Word、Excel、PowerPointといった既製のアプリケーションが世界を支配し、“customize”という言葉はほとんど死語になってしまいました。御主人様と召使いが逆転してしまったのです。このような時代の流れ、安直に既製品に依存する姿勢が常識となるにつれ、約20年前に向島達氏が「モダンメディア」で提案された“自前の”腸内細菌同定用データ・ベースの構築というアイディアは忘れ去ら

れ、それぞれの自動化機器が備えるデータ・ベースに完全に依存した、中身の見えないブラック・ボックスに依存した現状なのです（なんと一部の自動化機器では、その同定用データ・ベースを公開していない!!!）。向島達氏の言葉です…「数値同定は同定の均質化に役立ちましたが、ユーザーに、なぜこの同定に至るかの考え方が生まれにくくしてしまいました…多少なりとも細菌学を学んだものとして、もう少し論に立った自動同定を考えてみたい」。

II. 現状の腸内細菌科同定の自動化

表1には、Vitekシリーズを構成する1980年代のAutoMicrobic Sytemと最新のVitek 2 Compact Systemでのグラム陰性桿菌同定評価の成績をまとめている^{4,5)}。約30年前のAutoMicrobic Systemでは80%以上の相対同定確率で、既存の同定方法と一致した頻度は80～90%にとどまるが、最新のVitek 2では腸内細菌科で100%、腸内細菌科以外のグラム陰性桿菌でも93%の正解率を示した。かつては同定一致率90%が閾値とされていたが、現

表1 AutoMicrobic System/EBC+とVitek-2 Compact System/GNでのグラム陰性桿菌同定精度と性能

| 試験菌種名 | Vitek-2 Compact System/GN (2007年 評価成績) | AutoMicrobic System/EBC+ (1983年 評価成績) |
|----------------------------------|---|--|
| <i>Citrobacter</i> | 12/12 | 12/ 25 |
| <i>Enterobacter</i> | 11/11 | 18/ 26 |
| <i>Escherichia coli</i> | 12/12 | 90/100 |
| <i>Klebsiella</i> | 12/12 | 74/ 81 |
| <i>Morganella morganii</i> | 5/ 5 | 17/ 17 |
| <i>Proteus</i> | 10/10 | 13/ 20 |
| <i>Providencia rettgeri</i> | 6/ 6 | 0/ 1 |
| <i>Salmonella</i> | 13/13 | |
| <i>Serratia</i> | 12/12 | 10/ 23 |
| 腸内細菌科 小計 | 93/93 (100%) | 234/293 (79.9%) |
| 90% 同定終了時間 | 7時間 | 7時間 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 15/17 | 15/15 |
| <i>Aeromonas</i> | 10/10 | 2/ 3 |
| <i>Alcaligenes</i> | 21/21 | 0/ 1 |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | 2/ 2 | 4/ 4 |
| <i>Chryseobacterium</i> | 8/ 8 | 0/ 2 |
| <i>Ochrobacterium anthropi</i> | 2/ 2 | |
| <i>Pseudomonas</i> | 18/22 | 75/ 81 |
| <i>Rhizobium radiobacter</i> | 5/ 5 | |
| <i>Sphingomonas paucimobilis</i> | 1/ 1 | |
| 腸内細菌科以外 小計 | 82/88 (93.2%) | 96/106 (90.6%) |
| 90% 同定終了時間 | 8時間 | 評価せず |

試験菌種名は、Vitek-2 Compact System/GNではRAPID ID 32 EおよびID 32GNの同定菌種名に、適宜必要な追加試験を行って決定した。他方、AutoMicrobic System/EBC+ではEnterotube IIないしAPI 20Eを試験菌種名とし、80%以上の相対同定確率で得られた成績を集計した。属種名はVitek-2 Compact Systemに搭載するdatabaseに統一した。

文献4)および5)より抜粋引用して編集した。

在では95%以上の値が常識となっている。これはそれぞれの自動化機器で、より多くの性状試験から、より多くの属と種を網羅し、しかも同定精度を損なうことなく、むしろ向上させる努力によって実現した。Vitek 2 GNでは47の性状試験から、55の属、130の種の同定を可能にするdatabaseをもち、BD Phoenixにおいても、44の性状試験から60の属、155の種、5つのCDC entericグループを含むdatabaseを搭載している。ただ、この30年間、turnaround time (TAT) の短縮、迅速化にはあまり成果がみられていない。これは、同定精度の向上と迅速化がシーソー (seesaw) 現象を示すためであり、無闇に迅速化を優先すると精度が落ちるというジレンマを反映している。加えて、それぞれの自動化機器は検査支援、診療支援を目的にしたエキスパート・システムを備え、院内感染監視などのソフト・ウェアの充実を図っている。

Ⅲ. 解決されていない問題

昨今の自動化機器の流行は、1枚の試験パネル (マイクロプレート) で、菌種同定と薬剤感受性試験を一緒にやってしまうものです。約30年前、自動化機器がわが国に導入され始めた頃は、AutoMicrobic Systemも、MS-2も、そのような発想もっていませんでした。菌種同定には専用の同定用パネル、薬剤感受性試験には別途、感受性用パネルを用いるのが常識でした。それを変えたのがMicroScanです。1枚の試験パネルで菌種同定と薬剤感受性試験を一緒にやってしまう。[1+1]が“1”になった訳ですから、running costも格段に安くな

る道理です (実際には Vitek 2 で \$ 7.15/test、MicroScan Rapid で \$ 14.39/test なので、結局 1+1=2)⁶⁾。その後開発された BD Phoenix も、国産の RAISUS もこの試験方法を採用しています。ここに大きな矛盾があるのです。臨床細菌検査に携わる者の聖書、Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) の勧告には、薬剤感受性試験の方法 (CLSI M7-A7)⁷⁾ で、その接種菌液の調製方法を下記のように記載しています：

8.2 Direct Colony Suspension Method

(2) Prepare the inoculum by making a direct broth or saline suspension of isolated colonies (複数形) selected from an 18- to 24-hour agar plate.

8.3 Growth Method

(2) Select at least three to five well-isolated colonies (複数形) of the same morphologic type from an agar plate culture.

いずれも基本的に、薬剤感受性試験では複数の菌集落を釣菌して試験することを明記しているのです。1枚の試験パネルで菌種同定と薬剤感受性試験を一緒にやってしまう自動化機器では、菌種同定検査を複数の菌集落を用いて行っていることになるのです。AutoMicrobic System が日本に導入された当時、日常検査でこれを最初に採用した東北大学では、同定用カードに接種した菌浮遊液をすべて triple sugar iron (TSI) 培地に接種し、接種菌液の purity (純培養であること) を確認したものです。今やそのような施設はどこにもありません。菌種同定検査では、2つの異なる菌種を混和 [A+B] した場合、

表2 異なる2菌種の混和浮遊液における同定成績

| 混和した菌種と混和比率 | | 同定菌種名 (% 相対同定確率) |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Proteus mirabilis</i> | |
| 100 | 0 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (99%) |
| 100 | 0.1 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (99%) |
| 99 | 1 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (99%) |
| 90 | 10 | <i>Enterobacter aerogenes</i> (88%) |
| 50 | 50 | <i>Enterobacter aerogenes</i> (88%) |
| 10 | 90 | <i>Enterobacter aerogenes</i> (57%) |
| 1 | 99 | <i>Enterobacter cloacae</i> (97%) |
| 0.1 | 100 | <i>Enterobacter cloacae</i> (87%) |
| 0 | 100 | <i>Proteus mirabilis</i> (99%) |

Klebsiella pneumoniae と *Proteus mirabilis* の菌浮遊液をそれぞれの比率で混和した時、AutoMicrobic System (AMS) 腸内細菌同定用カード EBC+ で得られた同定結果。アンダーラインが [A+B=C] が成立した同定試験。

文献4) より抜粋引用。

Aでもない、Bでもない、接種した菌種とはまったく異なる“C”になってしまうことはすでに20年以上も前に報告されているのです(表2)⁴⁾。

一次分離用寒天培地に形成された個々の菌集落は、特定の表現型(酵素活性の有無、溶血活性の有無と種類など)から肉眼的に識別されます。しかし、観察できるそれらの表現型は、その菌株(クローン)のもつ極々一部の表現型に過ぎません。薬剤感受性に至っては、分離培地に発育したどの菌集落が耐性(R)で、どの菌集落が感性(S)なのか、まったく識別できません。このような根本的な違いが、クローン化された菌株を取り扱う基礎細菌学と患者由来の雑多な細菌細胞集団を取り扱う臨床細菌学を明確に区分している筈なのですが…同定精度は極めて高くなり、網羅される菌種、分類単位(taxon)も大きく拡大された自動化機器ですが、検体中に混在する(であろう)菌株(クローン)群、検体中の細菌細胞集団のheterogeneity(多様性)を有効に検査できる状況にはないのです。

おわりに

戦後50年、腸内細菌科は属(genus)の数も、種(species)の数も飛躍的に急増しました(表3)。16S rRNAの塩基配列や染色体DNAの定量的ハイブリダイゼーションといった遺伝子解析に基づく分類学者の活躍です。極々最近、2008年3月、全米微生物学会(American Society for Microbiology: ASM)の臨床微生物部門(Division C)の意見交換の場で大きな論議を呼んでいるのが“Reference

for old bacteria names”です。曰く…

Does anyone know of a website or reference guide that lists changes in genus/species nomenclature? I am old enough to remember *Pseudomonas maltophilia* becoming *Xanthomonas maltophilia*, then *Stenotrophomonas maltophilia*. My brain is too full to keep up with the avalanche of “new” names for “old” bugs. (どなたか、菌種、菌属の名称の変化を一覧にしたウェブ・サイトあるいは参照できるガイドを御存じないですか。私はもう充分年老いて、*Pseudomonas maltophilia*が*Xanthomonas maltophilia*に変わり、さらに*Stenotrophomonas maltophilia*に変更されたなんて憶えるのは難儀なのです。古くて馴染み深い細菌がころころと雪崩のように名前を変える中で最新の情報を維持するには私の脳味噌は既に限界です)。

As perhaps as a charter member of the Taxonomy Underground Resistance, except in those cases where the name changes suggests a different patient management strategy, I continue to question the wisdom of clinically irrelevant name changes. For every step we move forward for taxonomic purity, we move two steps backwards by needlessly confusing the physicians, resulting in having to field unnecessary phone calls, and making their infectious disease textbooks out of date. By forcing the manufacturers of our identification products to spend the money to having to update

表3 過去50年間の腸内細菌科を構成する属(Genus)と種(Species)の推移

| 年 | 属の数 | 種の数 | 参 照 文 献 |
|------|-----|-----|--|
| 1952 | 8 | 15 | Kauffmann F. and P.R. Edwards : Classification and nomenclature of <i>Enterobacteriaceae</i> . Int. Bull. Bacteriol. Nomen. Tax. 2 : 2-8, 1952. |
| 1962 | 10 | 24 | Edwards P.R. and W.H. Ewing : Identification of <i>Enterobacteriaceae</i> . Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn, U.S.A., 1962. |
| 1974 | 13 | 30 | Ewing W.H.: Differentiation of <i>Enterobacteriaceae</i> by biochemical reactions. Centers for Disease Control, Atlanta, Ga, U.S.A., 1974. |
| 1986 | 24 | 74 | Finegold S.M. and E.J. Baron : Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 7th ed. The C.V. Mosby Co., St. Louis, Mo, U.S.A., 1986. |
| 1995 | 28 | 114 | Centers for Disease Control and Prevention (not published) |
| 2003 | 31 | 130 | Farmer J.J., III : <i>Enterobacteriaceae</i> : Introduction and Identification, Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., U.S.A., 2003 |

文献6)より一部抜粋して編集引用。

their data bases, which in turn increases the costs of their products, we are also wasting money. (分類学地下抵抗グループの組織憲章委員として、適正な患者管理で異なる戦略に結びつくような名称変更を除き、臨床に無関係な名称の変更が賢明なことか否か、大きな疑問に思っている。確かに名称変更は、分類学的な純粋さへの一步の前進であろうが、同時に臨床医へ不必要な困惑を与えることで2歩後退している。無駄な確認のための電話や、感染症の教科書を書き換えるなどの必要がでてくる。さらに同定試薬の製造元はそのデータ・ベースを最新のものにするように強いられ、そのような作業は彼らの試薬価格を押し上げ、結果として我々もお金を大いに無駄にしている)。

All of us want to join the underground resistance. Is there an application process? (私達皆、貴方の地下抵抗組織に参加したいと思います。応募手続きがありますか?)。

Bacteria are bad enough, but perhaps yeasts and moulds are even worse. When I was a student in the 60's, I learned that Tinea versicolor was caused by *Malassezia furfur*. Then it became *Pityrosporum furfur*. This then changed to *Pityrosporum ovale*. Then, viola, it is now *Malassezia furfur*! (Oops, I forgot about *Pityrosporum orbiculare*.) (細菌の世界も十分に嘆かわしいが、酵母と糸状菌の世界はもっと酷い。私が学生だった1960年代、Tinea versicolor [癬風] は *Malassezia furfur* が原因とされた。それが *Pityrosporum furfur* になり、さらに *Pityrosporum ovale* に変更された。ところがびっくり、今では再び *Malassezia furfur* に!

(おっと、*Pityrosporum orbiculare* のことを忘れていた)。

遺伝子解析に基づく分類と命名を推し進める分類学者の一群と、酵素反応などの生化学的表現型に基づき菌種同定を行う臨床細菌の綱引きです。現状は分類学者が優勢ですが、果たしてこの解説を書き上げた20年後、2028年には、どのような力関係になっているのか、楽しみです。

文 献

- 1) 向島達：腸内細菌同定の自動化に対しての考え方を知らせてください。モダンメディア **33** : 447-451, 1987.
- 2) 向島達, 梅田彰子：細菌検査室のコンピュータ化とその情報検索および臨床応用。臨床と細菌 **4** : 280-288, 1977.
- 3) 山根誠久, 栗田幸男：細菌検査室におけるコンピュータシステム導入と菌種コード分類表の考案。臨床病理 **32** : 218-222, 1984.
- 4) 山根誠久, 加藤仁美：自動細菌検査装置 AMS-EBC+カードによる腸内細菌属同定の検討。臨床と細菌 **10** : 327-336, 1983.
- 5) Nakasone I, T. Kinjo, N. Yamane, K. Kisanuki, C.M. Shiohira : Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances : VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial susceptibility testing. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., **58** : 191-198, 2007.
- 6) O'Hara C.M.: Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic gram-negative bacilli. Clin. Microbiol. Rev., **18** : 147-162, 2005.
- 7) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically (Approved Standard M7-A7). Wayne, PA, USA : CLSI ; 2006.