

5. 細菌性髄膜炎における 起炎菌の遺伝子診断

起炎菌の遺伝子診断はどのように行うのか

回答

- 従来の PCR 法 (conventional PCR) に替わり、蛍光色素を結合させたプローブを用いる real-time PCR 法が臨床に応用され始めている。細菌性髄膜炎の起炎菌を効率的に検索するため選択すべき菌種として、①大腸菌、②B 群レンサ球菌 (Group B *Streptococcus* : GBS)、③肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、④インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、⑤髄膜炎菌、⑥リステリア菌、⑦黄色ブドウ球菌、⑧肺炎マイコプラズマの 8 菌種があげられる。抗菌薬投与のない症例における起炎菌の検出率は、培養法で 70%、PCR 法で 90%近くであり、PCR 法のほうが検出感度に優れている。

背景・目的

細菌性髄膜炎における起炎菌の遺伝子診断を検討し、実際の具体的方法を示す。

解説・エビデンス

1) 検索菌種

近年、髄液からの DNA 抽出や電気泳動などが煩雑であった従来の PCR 法 (conventional PCR) に替わって、蛍光色素を結合させたプローブを用いる real-time PCR 法が注目され、臨床に応用され始めている¹⁻⁴⁾。また、サーベイランスにルーチンとして取り入れようという試みもみられる⁵⁾。欧米ではすでにキット化されたものもあるが、対象菌種を肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、そして髄膜炎菌としたものが多い^{4,6-8)}。

一方、日本では検体数が極めて少ないため、このようなキットの有用性は認められるものの、残念ながら「細菌性髄膜炎起炎菌検索キット」として市販化には至っていない。日本において、実際に実験室レベルで実施されている具体例を示す。

新生児から成人の髄膜炎までの起炎菌を想定し、表 1 に示す 8 菌種のプライマーとプローブを設計、髄液そのものについて培養と併行して real-time PCR 法を実施し、その感度と特異度について検証している。これらのプライマーを参考にいただきたい¹⁾。

化膿性髄膜炎の起炎菌を効率的に検索するため選択した菌種は、①大腸菌、②B 群レンサ球菌 (Group B *Streptococcus* : GBS)、③肺炎球菌、④インフルエンザ菌、⑤髄膜炎菌、⑥リステリア菌、⑦黄色ブドウ球菌、⑧肺炎マイコプラズマの 8 菌種である。2 菌種をひとつのチューブで検索できるようにし、蛍光色素は発色強度の異なる 2 種の蛍光色素を使用する考え方をしたが、検索したい菌種は院内発症か市中発症かによって異なるのでそれぞれの目的に応じて変更されるのが望ましい。

表 1 8 菌種検索用プライマーと蛍光標識プローブ

tube (paired)	Species, primer, and probe	Primer or probe sequence	Target gene	Amplicon size (bp)
A	<i>S. pneumoniae</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-CAACCGTACAGAATGAAGCGG-3' 5'-TTATTCGTGCAATACTCGTGCG-3' HEX-CGCGATCAGGTCTCAGCATTC CAACCGCGATCGCG -BHQ1	lytA	319
A	<i>H. influenzae</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-TTGACATCCTAAGAAGAGCTC-3' 5'-TCTCCTTTGAGTTCCCGACCG-3' FAM-CGCGATCCTGACGACAGCCATGCAGCACGATCGCG-BHQ1	16S rRNA	167
B	<i>E. coli</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-GGGAGTAAAGTTAATACCTTTGC-3' 5'-CTCAAGCTTGCCAGTATCAG-3' HEX-CGCGATCACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGATCGCG-BHQ1	16S rRNA	204
B	<i>S. agalactiae</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-AGGAATACCAGGCGATGAAC-3' 5'-AGGCCCTACGATAAATCGAG-3' FAM-CGCGATCATTGGCTAGTTATGAAGTCCCTTATGCGATCGCG-BHQ1	dltS	331
C	<i>N. meningitidis</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-CATATCGGAACGTACCGAGT-3' 5'-GCCGCTGATATTAGCAACAG-3' HEX-CGCGATCCTATTCGAGCGGCCGATATCGATCGCG-BHQ1	16S rRNA	356
C	<i>L. monocytogenes</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-CGCTTTTGAAGATGGTTTCG-3' 5'-CTTCCAGTTTCCAATGACCC-3' FAM-CGCGATCGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTGATCGCG-BHQ1	16S rRNA	457
D	<i>M. pneumoniae</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-GTAATACTTTAGAGGCGAACG-3' 5'-TACTTCTCAGCATAGCTACAC-3' HEX-CGCGATACCAACTAGCTGATATGGCGCAATCGCG-BHQ1	16S rRNA	225
D	<i>S. aureus</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-TACATGTCGTTAAACCTGGTG-3' 5'-TACAGTTGTACCGATGAATGG-3' FAM-CGCGATCCAAGAACCTGTTGTTGATAAGAAGCAACCGATCGCG-BHQ1	spa	224

a) Stem oligonucleotides are underlined

2) real-time PCR 法の原理

real-time PCR 法の原理を図 1 に示す。本方法では増幅すべき遺伝子にセンスプライマーとリバースプライマーを設計すると同時に、さらにその内側にプローブを設計する。プローブには TaqMan® プローブ、サイクリングプローブ、モレキュラービーコン (MB) プローブなどが使用される。MB プローブの使用では、図 1 に示すように増幅される DNA 断片の内部に 15~20bp の相補的な塩基配列を選択し、5' 側に蛍光色素の FAM (6-carboxy fluorescein) あるいは HEX (6-carboxy-2',4,4',5',7,7'-hexachlorofluorescein)、3' 側にその蛍光発色を抑制する BHQ-1 (black hole quencher 1) を結合させたプローブを設計し、合成を依頼する。

髄液中に 8 菌種いずれかの DNA 断片 (死菌でも可) が存在すれば、プライマーによって DNA が増幅されると同時に、増幅された DNA にさらにプローブが結合し、蛍光色素と蛍光抑制物質の位置が離れて発色、その蛍光量を機器が読み取るという原理である。ほかのプローブ法も蛍光量の変化を測定する点では原理は同じである。

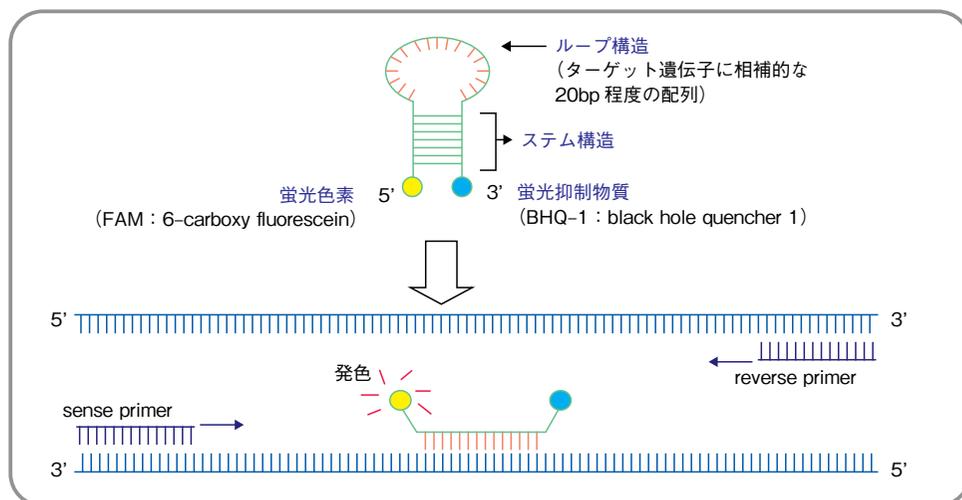


図1 real-time PCR法の原理：molecular beacon (MB) プローブの場合

3) real-time PCR の髄液に対するプロトコール

髄液サンプル (200~500 μL) は図2に示すプロトコールに従い、無菌操作に十分配慮しながら4 $^{\circ}\text{C}$ 、10,000 rpm、10分間の遠心を行い集菌する。髄液が混濁していれば遠心の必要はないが、一般的には遠心操作が必要である。上清は別の滅菌チューブへ移し、150 μL の沈渣とする。100 μL の沈渣部分から Extragen II kit (東ソー社) を用いてDNAを抽出する。所要時間は10~15分である。むろんほかのDNA抽出キット (QIAGEN社やタカラバイオ社) を用いても構わないが、検出感度が保たれていることの確認が必要である。

MBプローブを使用するreal-time PCR反応液 (50 μL) の組成は、①25 μL のiQ Multiplex powermix (バイオラッドラボラトリーズ社)、②0.3 μM の各プライマー、③0.3 μM の各MBプローブとする。これらの反応液はあらかじめチューブ (200 μL 用) へ分注し、要時まで-30 $^{\circ}\text{C}$ に保存できる。なお、TaqMan[®]プローブ検出系には Premix Ex Taq[™]、サイクリングプローブ検出系には CycleavePCR[®] Reaction Mix が推奨されており、推奨された試薬を用いないと感度に影響する。

試薬の入ったチューブは使用時には氷上で融かし、2 μL ずつのDNAサンプルを加え、直ちにPCRを実行する。PCRはファーストステップとして95 $^{\circ}\text{C}$ 、30sの熱処理、続いて95 $^{\circ}\text{C}$ 、15s/50 $^{\circ}\text{C}$ 、30s/75 $^{\circ}\text{C}$ 、20sを1サイクルとして40サイクル実行する。ネガティブコントロールとポジティブコントロールを必ずおく。DNA抽出からreal-time PCR終了までの所要時間はおおよそ1.5~2時間である。

なお、real-time PCR用の機器として、Thermal Cycler Dice[®] (タカラバイオ社)、LightCycler[®] (ロシュアプライドサイエンス社)、Stratagene Mx3000P[™] (アジレントテクノロジー社)、Applied Biosystems リアルタイムPCRシステム (アプライドバイオシステムズ社) などが発売されている。購入に際してはそれぞれの機器の特徴を把握することが重要である。

4) real-time PCR の感度と特異度

MBプローブを用いた目的菌の検出限界 (感度) は、 $1.3 \times 10^0 \sim 6.5 \times 10^1$ cfu/チューブで、非特

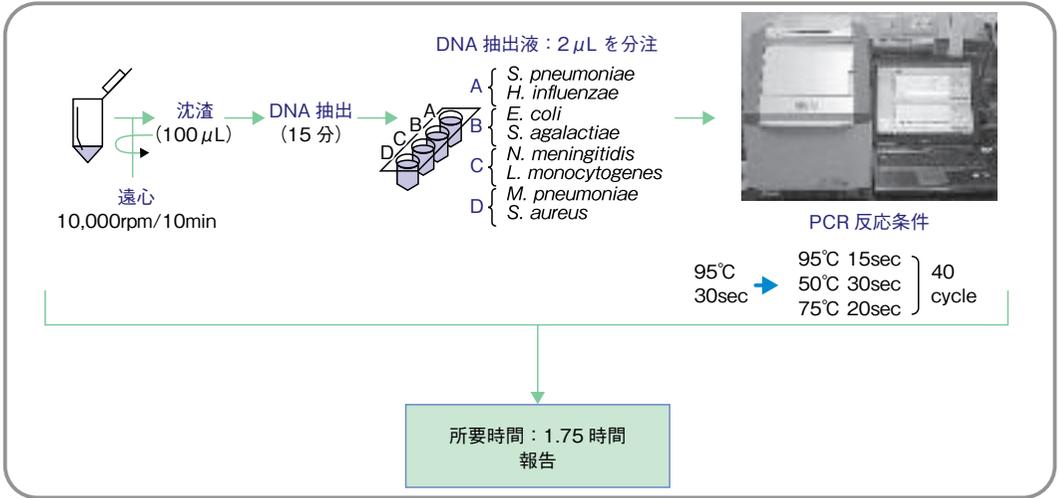


図 2 髄液に対する real-time PCR 法のプロトコール

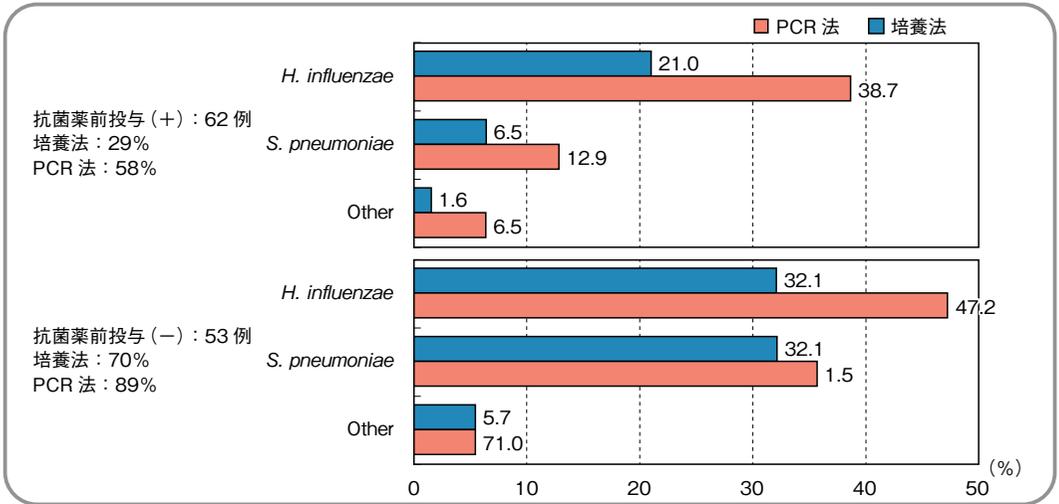


図 3 抗菌薬投与の有無と培養および PCR での起炎菌判明率の関係 (n=115)

異の陽性反応は認められていない¹⁾。ただし、陽性反応を示すサイクル数 (Ct 値) が 30 サイクル以上では、チューブあたりの菌数が検出限界に近い場合、必ず電気泳動で目的の DNA 断片が増幅されているのか否か確認する必要がある。特異度は 100% である。ただし、検査材料直接のサンプルであるため、サイクル数を 40 サイクル以上とすると偽陽性出現の可能性が高まる。理論的に PCR 法で陽性と判定できるのは 35 サイクルまでである。それ以上のサイクル数で陽性反応がみられた際には、検査値と照らし合わせた慎重な判断が要求される。

5) real-time PCR の有用性

送付を受けた髄液サンプルに対して実行された real-time PCR と、同時に実施した培養による起炎菌判明率の比較を図 3 に示す。判明率に最も影響するのは抗菌薬の前投与の有無で、特に

注射用抗菌薬が投与されていた場合の培養での菌判明率 30%程度である。髄液中の菌量が少なく、かつ抗菌薬が使用されていた際には、培養法ではほとんど菌を証明できていない。このような場合、無菌的に採取された髄液が残っていれば、real-time PCR にて約半数例に菌を証明することができる。

抗菌薬投与のない症例では、培養法で 70%、PCR 法で 90%近い判明率であるが、特に GBS やリステリア菌、マイコプラズマ、髄膜炎菌の確定に有用である。いずれにしても PCR での菌検索は培養法に比べ有意に優れているといえる。

6) まれな菌種が疑われる場合

髄液の検査データから細菌性であることが強く示唆されるものの、上述した 8 菌種以外の関与が否定できない場合には、髄液サンプルから抽出した DNA に対し 16S rRNA 遺伝子を増幅するプライマーを用いて DNA の増幅を行い、増幅産物がみられれば、次に塩基配列解析を行って既存の菌種データとマッチングを行い、菌種を確定する (broad-range PCR 法)。わずかな症例数の経験ではあるが、この方法で起炎菌を証明できている。特に成人例において口腔内レンサ球菌が起炎菌の場合、菌種同定はこの方法が効率的である。

16S rRNA 遺伝子 DNA 増幅のためのセンス側プライマーは AGAGTTTGATCMTGGCTCAG、リバースプライマー①は AAGGAGGTGWTCCARCC、リバースプライマー②は CTAGC-GATTCCGACTTCA である。1,500bp 前後を増幅したのち、塩基解析する。

文献

- 1) Chiba N, Murayama SY, Morozumi M, et al. Rapid detection of eight causative pathogens for the diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. *J Infect Chemother.* 2009; **15**: 92–98.
- 2) van Haeften R, Palladino S, Kay I, et al. A quantitative LightCycler PCR to detect *Streptococcus pneumoniae* in blood and CSF. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; **47**: 407–414.
- 3) Bryant PA, Li HY, Zaia A, et al. Prospective study of a real-time PCR that is highly sensitive, specific, and clinically useful for diagnosis of meningococcal disease in children. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**: 2919–2925.
- 4) Corless CE, Guiver M, Borrow R, et al. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001; **39**: 1553–1558.
- 5) Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, et al; RT-PCR Surveillance Project Team. Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. *PLoS ONE.* 2011; **6**: e20675.
- 6) Reyes SM, Torres T JP, Prado JV, et al. Multiplex PCR assay in spinal fluid to identify simultaneously bacterial pathogens associated to acute bacterial meningitis in Chilean children. *Rev Med Chil.* 2008; **136**: 338–346.
- 7) Favaro M, Savini V, Favalli C, et al. A multi-target real-time PCR assay for rapid identification of meningitis-associated microorganisms. *Mol Biotechnol.* 2013; **53**: 74–79.
- 8) Wang X, Theodore MJ, Mair R, et al. Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens. *J Clin Microbiol.* 2012; **50**: 702–708.

Knowledge gaps (今後の課題) 5. 細菌性髄膜炎における起炎菌の遺伝子診断

近年開発されつつある起炎菌の遺伝子診断にはどのようなものがあるのか

回答

- 細菌性髄膜炎の診療において、病原微生物ゲノムに特異的な PCR による病原微生物の検出が行われてきており、臨床上的有用性は高い。将来への展望としては、16S rRNA 遺伝子解析 (broad-range PCR 法) は、対象とする病原微生物が特定できない場合や難培養性の場合などにおいて、非常に有力な解析方法となると期待される。特に、抗菌薬投与下のように難培養性の条件下で威力を発揮する。今後さらに、次世代シーケンサーと呼ばれる新型高速シーケンサーを用いたメタゲノム解析も、本症の起炎菌同定において、有用であると考えられる。

背景・目的

抗菌薬の開発が進んでいる現代においても、多剤耐性菌の出現、新興感染症、再興感染症の出現など、今日においても、感染症は、診療上重要な領域であり続ける。特に、神経感染症の領域では、よりよい機能予後のためには、早期の診断と、一刻も早い適切な治療の開始が望まれる。細菌性感染症の診断は、起炎菌の培養による菌種の同定と抗菌薬に対する感受性の分析が基本であるが、起炎菌の培養に一定の時間を要すること、また、日常診療においては、empiric に抗菌薬の投与が行われ、そのような条件下では、起炎菌の培養が困難であり、起炎菌の同定ができないケースが少なくない。起炎菌の速やかな同定を目的として、迅速抗原検査やポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction : PCR) を用いた起炎菌のゲノム DNA を検出する方法が開発され、日常診療に導入され、診療上不可欠の検査となってきた。特に、結核菌の検出などにおいては、培養に長期の期間を要することからその有用性は高い。

一方、PCR による遺伝子検査は、検出感度が高いこと、数時間という短時間で結果が得られるという大きな利点があるが、PCR に用いるプライマーを選択するうえで、対象となる起炎菌をあらかじめ設定する必要がある。様々な種類の病原菌を可能性のひとつとして考慮する必要のある日常診療においては、PCR による検査法には一定の限界があることも留意すべきである。

現時点では、研究レベルでの対応であるが、病原菌のゲノム配列を直接的に解析することにより起炎菌を同定する方法が開発されており、日常診療のうえで、大変有用になると期待されている。

以上の背景を踏まえ、細菌性髄膜炎の起炎菌の遺伝子診断について検討する。

解説・エビデンス

1) 特定の病原微生物の検出を目的とする遺伝子検査 (PCR による病原微生物の同定方法)

現在では、PCR による病原微生物の検出が日常診療において頻用されるようになってきている。

る。たとえば東京大学神経内科では、結核菌の迅速診断が必要であると考え、1990年にPCRを用いた結核菌の検出法を報告した¹⁾。結核菌に関しては、鏡検による検出率が10~20%程度、培養による結核菌の同定には、8週間もの期間を要すること、培養により結核菌同定ができるのは50%以下であることを考えると、画期的な方法であった。PCRによる結核菌の検出の感度を高めるために、nested PCR法などの改良がなされてきており、検出感度はさらに高くなってきている^{2,3)}。また、1回のPCRで複数の病原体の検出を行うmultiplex PCR法なども開発されてきている。

2) ゲノム配列解析を応用した、病原微生物の同定方法

病原微生物のゲノム配列解析ができれば、原理的に病原微生物の同定が可能になると考えられる。ゲノム配列の解析方法としては、大きく分けて、①細菌間で保存性の高い16S rRNA遺伝子の領域にプライマーを設定してPCRにより増幅し、塩基配列解析をする方法(broad-range PCR法とも呼ばれる)、②検体中に存在する病原微生物のゲノムについて、丸ごとゲノム配列解析を行い、そのデータを分析することにより、そこに存在する微生物をすべて同定しようとする、メタゲノム解析と呼ばれる方法の2つがある。

①16S rRNA 遺伝子解析による病原菌の同定 (broad-range PCR法)

細菌の16S rRNA(リボソームRNA)をコードする遺伝子は、機能に関連すると考えられる保存性の高い領域に可変領域が混在する構造を取っている。可変領域には、9個の高頻度可変領域(hypervariable region)が含まれている。この高頻度可変領域は、50~100塩基の長さで、この配列を調べることで、菌種の同定が可能である。すなわち、保存性の高い領域にPCRプライマーを設定すれば、いずれの細菌の16S rRNA遺伝子であっても増幅することができ、得られたPCR産物について、直接塩基配列解析により高頻度可変領域の塩基配列を決定すれば菌種の同定が可能である⁴⁾。

東京大学神経内科では、起炎菌の同定が困難で、empiric therapyを継続するも、病状の悪化がみられた脳膿瘍の症例について、脳膿瘍の穿刺液を用いて、16S rRNA遺伝子のPCR増幅、塩基配列解析を行い、*Streptococcus intermedius*が起炎菌であることを同定することができた事例もある⁵⁾。また、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)髄膜炎の症例で、経過中に両側腸腰筋膿瘍を合併した。腸腰筋膿瘍の穿刺生検を施行し、培養により起炎菌の同定を試みたがno growthであった。その後、抗菌剤投与にもかかわらず、膿瘍は増大した。CTガイド下右腸腰筋膿瘍ドレナージ術を施行した。ドレナージ液の培養では起炎菌は同定されなかったが、16S rRNA遺伝子解析を施行したところ、肺炎球菌(Hungary19A-6株)と直ちに同定でき、髄膜炎と同一の起炎菌と考えられた。このように、培養では起炎菌の同定ができない場合であっても、16S rRNA遺伝子解析により速やかに起炎菌の同定ができたことは、診療上、特に、抗菌薬の選択において大変有用であった。

16S rRNA遺伝子解析では、細菌に共通な16S rRNA領域の増幅を行い、直接塩基配列解析を実施し、高頻度可変領域の塩基配列により細菌の同定が可能となるので、起炎菌について幅広く検索できるという点が最大のメリットである。また、抗菌薬投与下においては、培養が困難なことが多く、その点でも、16S rRNA遺伝子解析の有用性は高い。この方法では、抗菌薬の感受性まで調べることはできないものの、菌種が同定されると、抗菌薬の選択に反映できることが多く、大変有用である。また、適切な培地、培養法を選択することにより培養可能になることもあり、その点でも有用である。

課題としては、16S rRNA 遺伝子解析は、現在のところ、研究レベルで行われており、保険収載されておらず、このような解析技術を持っている研究室も限られており、普及していない点である。診療上の有用性は極めて高いので、技術の普及、保険収載の実現など、今後関係者の努力が期待されることである。

②メタゲノム解析による微生物の同定

16S rRNA 遺伝子解析は、細菌の16S rRNA をターゲットにした解析方法であるが、未知の病原微生物を幅広く検索するうえでは、限界もある。これに対して、微生物のゲノムについて、丸ごと塩基配列解析をして、そこに存在する微生物を網羅的に同定しようという方法がメタゲノム解析 (metagenomics) と呼ばれる。従来のシーケンサーでこのような解析をすることは困難であったが、スループットが極めて大きい次世代シーケンサーと呼ばれる新型高速シーケンサーが実用化されたことにより、メタゲノム解析が可能になってきている。

メタゲノム解析により病原微生物を同定できた例として、2010年にデンマークで発生したミンクの神経疾患(振戦、足取りの異常、失調症状)のアウトブレイクの例をあげることができる⁶⁾。脳 homogenates を用いた伝播実験で発症が確認され、感染症であることは確定したものの、通常の病原微生物の探索方法では病原微生物を同定することができなかった。そこで、脳 homogenates を用いて、メタゲノム解析を行ったところ、astrovirus のゲノム配列が確認された。astrovirus は、離乳前のミンクにみられる下痢症の起因ウイルスとして知られていたが、ゲノム配列解析からは、下痢症を引き起こす astrovirus に対しての相同性は80.4%で、新種の astrovirus と確認された。

日本では、原因不明の下痢症患者の便を用いたメタゲノム解析が報告されている⁷⁾。急性期と回復期の便のメタゲノム解析により、急性期にのみ存在した細菌として、*Campylobacter jejuni* が確認された。最近では、ヒラメ喫食に関連する嘔吐下痢症について、ヒラメ筋肉組織を用いたメタゲノム解析が行われ、*Kudoa septempunctata* が検出され、予防のための対策がとられた⁸⁾。このように、今後この次世代シーケンサーによるメタゲノム解析も本症における起炎菌同定にも活用される可能性があると考ええる。

文献

- 1) Kaneko K, Onodera O, Miyatake T, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction (PCR). *Neurology*. 1990; **40**: 1617-1618.
- 2) Takahashi T, Nakayama T, Tamura M, et al. Nested polymerase chain reaction for assessing the clinical course of tuberculous meningitis. *Neurology*. 2005; **64**: 1789-1793.
- 3) Takahashi T, Tamura M, Takahashi SN, et al. Quantitative nested real-time PCR assay for assessing the clinical course of tuberculous meningitis. *J Neurol Sci*. 2007; **255**: 69-76.
- 4) Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem*. 2009; **55**: 856-866.
- 5) Saito N, Hida A, Koide Y, et al. Culture-negative brain abscess with *Streptococcus intermedius* infection with diagnosis established by direct nucleotide sequence analysis of the 16s ribosomal RNA gene. *Intern Med*. 2012; **51**: 211-216.
- 6) Blomstrom AL, Widen F, Hammer AS, et al. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol*. 2010; **48**: 4392-4396.
- 7) Nakamura S, Maeda N, Miron IM, et al. Metagenomic diagnosis of bacterial infections. *Emerg Infect Dis*. 2008; **14**: 1784-1786.
- 8) Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, et al. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. *Clin Infect Dis*. 2012; **54**: 1046-1052.