

〈特集〉

感染症領域のPOCT機器・試薬の変遷

古賀 稔

Transition of POCT devices and reagents in infectious disease field

Minoru Koga

Summary The development speed of POCT devices and reagents in the infectious disease field is accelerating year by year, and as a method of testing in the infectious disease field, in particular, rapid diagnostic kits for visual tests based on immunochromatography are widely used. However, issues such as lack of sensitivity and interobserver variation have been pointed out. Under such circumstances, Mizuho Medy Co., Ltd. has released the highly sensitive rapid diagnostic system using silver amplification, Quick Chaser Immuno Reader (diagnostic system Fuji Dry Chem IMMUNO AG1 was released simultaneously in 2011) and the fully automated gene analysis instrument Smart Gene (released in 2018) which was developed in aim of providing POCT for genetic testing. They have satisfactory performance in the early diagnosis of onset, and the two instruments and visual diagnostic test kit can be used accordingly to provide smooth and speedy medical care. As a result, further contribution can be expected to early diagnosis, treatment and infection control of infectious disease. In this article, the features of each test method are explained using the *Mycoplasma pneumoniae* test kit as an example.

Key words: POCT, Immuno Reader, Smart Gene, PCR, QProbe, *Mycoplasma*

I. はじめに

POCTはpoint of care testingの略でpoint of care (診察や治療の現場)でtest (検査)する仕組み (またはシステム)のこと¹⁾で、日本臨床検査自動化学会のPOCTガイドラインでは、「臨床現場即時検査」の和名を提唱している²⁾。

このPOCTの検査方法の一つとして、イムノクロマト法を原理とした目視判定の迅速診断キ

ットが広く普及しているが、発症早期の検出感度が不足していることや、検出感度下限付近の薄いラインの判定において、判定者間で結果が異なるなどの問題点が指摘されている³⁾。

そこで、それらの問題点を2011年に弊社 (株式会社ミズホメディー) が発売を開始した銀増幅イムノクロマトグラフィー法を用いた卓上型のデンシトメトリー分析装置と専用の試薬を組み合わせたクイックチェイサー Immuno Reader

株式会社 ミズホメディー
営業企画部 学術課
〒841-0048 佐賀県鳥栖市藤木町5番地の4
E-mail : m-koga@mizuho-m.co.jp

Science & technique support division
Head office, Factory, R&D
5-4 Fujinokimachi, Tosu, City, Saga
841-0048 Japan

システム（同じ診断システムとして富士ドライケム IMMUNO AGIも同時発売）により、高い感度と客観性の高い判定により解決した。

更にPOCTとしては不向きとされていた遺伝子検査の分野においては、全自動遺伝子解析装置Smart Gene（2018年 株式会社 ミズホメディーより発売）の登場によって、遺伝子検査のPOCT化が当たり前となる時代が直ぐそこまで来ていると言っても過言ではない。

本稿では、感染症領域のPOCT対応機器・試薬として現在使用されている目視判定の迅速診断キット、銀増幅を用いた高感度迅速診断システム、PCR（Polymerase chain reaction）・QProbe（Quenching Probe）法による全自動遺伝子解析システムのそれぞれの開発経緯と原理、メリット・デメリット、今後の展望について、マイコプラズマ・ニューモニエの検査キットを例に解説する。

Ⅱ. 目視判定の迅速診断キットの開発経緯と特徴

何時でも、何処でも、誰が行っても迅速で簡単に検査結果が出せるように開発された目視判

定の迅速診断キットの多くは、イムノクロマト法を原理としており、5分～15分以内に検査結果の提供が可能である。

マイコプラズマ・ニューモニエ抗原を検出するクイックチェイサー[®]Mycoを例に操作法と原理を解説する（Fig. 1）。

先ずマイコプラズマ感染の疑いのある患者の咽頭後壁を専用の綿棒で拭い、専用の抽出液に抽出して試料とする。抽出した試料は、フィルターを通して専用デバイスに規定量を滴下すると、イムノクロマト法の原理により、メンブレンフィルター（以下メンブレン）上の試料滴下部、感作金コロイド塗布部、判定ライン部、確認ライン部、最後に吸収部と試料が流れて行く。

マイコプラズマ抗原が存在する場合は免疫複合体が形成され、その結果、判定ライン部および確認ライン部に金コロイドのラインが発色するので、これを目視にて判定する。

それぞれのパーツには役割があり、各部材（キットに使用している抗体や標識物質の種類、メンブレンやろ紙の種類など）の選定や調製には長年培ってきた企業のノウハウの蓄積があり、これらの組み合わせによって検査時間や感度・特異度が決定される。

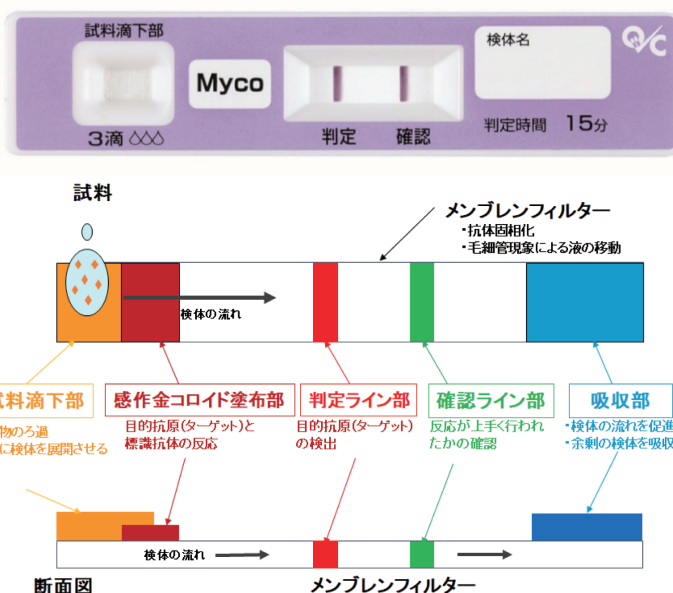


Fig. 1 目視判定の迅速診断キットの構成と原理（イメージ図）

また、キットに使用している抗体がマイコプラズマ・ニューモニエ抗原のどの部分をエピトープにするかによって、感度・特異度が変わってくる。

特に特異度に関しては、検体や試薬組成などに由来する異常反応にも注意が必要である。

例えば、検体由来の要因（血清を試料とするキットに多い）としては、リウマトイド因子や異好抗体としてフォルスマン抗体、ポール・バンネル抗体、HAMA（Human anti-mouse Antibodies）があるが、各メーカー、検体塗布部にブロッキング剤を組み込む方法や、動物のグロブリンを試薬に添加して回避する方法などの対策を講じている⁴⁾。

Ⅲ. 銀増幅を用いた高感度迅速診断システムの開発経緯と特徴

イムノクロマト法を用いた目視判定の迅速診断キットでも検体の適切な採取時期、採取方法であれば、感度・特異度ともに満足できる結果は提供できるが、発症早期や乳幼児の様な検体採取が困難な場合は、採取される病原微生物量が少ないため、偽陰性になる事が問題視されている。

この問題を解決する一つの方法に従来のイム

ノクロマト法に写真の現像技術を応用した銀増幅反応により、感度を向上させる方法がある（Fig. 2）。

この方法は、病原微生物である抗原と金コロイドと反応した免疫複合体が、固相化された抗体とサンドイッチ複合体を形成した後、還元剤（硫酸アンモニウム鉄）、銀イオン（硝酸銀）を添加して、金コロイド粒子を核に銀粒子が形成されることで、粒子径を約100倍大きくして視認性を高め、高感度化を実現させた。

高感度化に伴う特異度の低下に関しては、以下の3つの方法で抑制させた。

- ① 試薬に使用しているIgG抗体のFc部分を酵素処理して切断し、F(ab')₂として使用することで、Fc部分と反応するリウマトイド因子や異好性抗体などと反応することを抑制させた。
- ② 試薬に非特異反応を防ぐためにブロッキング剤での処理や動物由来のグロブリンを添加することで偽陽性を抑制させた。
- ③ 銀増幅工程前に流れる還元剤が洗浄工程も兼ねており、この処理によりバックグラウンドを低減させた。

銀増幅を用いる方法は、クイックチェイサー Immuno Reader又はクイックチェイサー Immuno

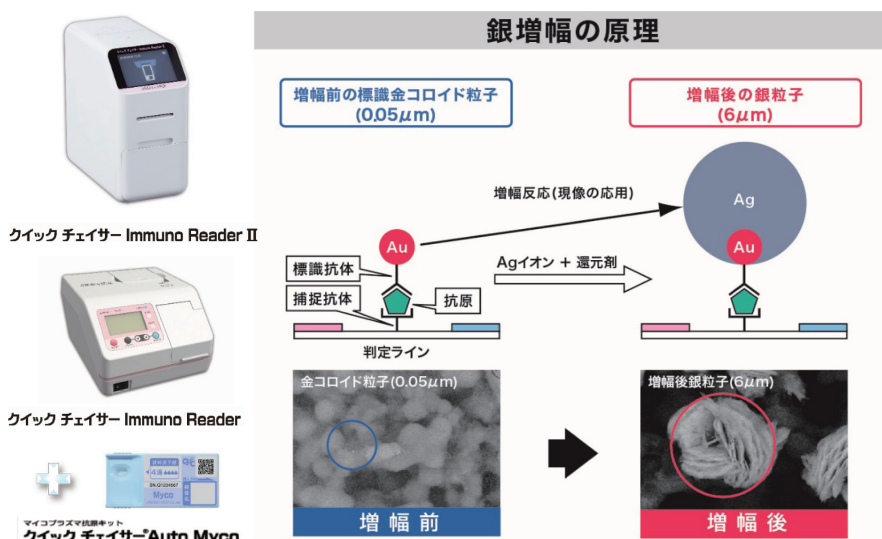


Fig. 2 銀増幅の原理（イメージ図）

Reader IIなどの専用の機器が必要となる。機器は、銀増幅に必要な各種溶液（テストカートリッジ内に内蔵）の適切なタイミングでの自動添加操作と免疫複合体で形成されるラインを画像取り込み後にライン強度として読み取とすることで、自動判定を可能にしている。

IV. PCR・QProbe法による 全自動遺伝子解析システムの開発経緯と特徴

これまで、遺伝子の検査を行うとなれば、遺伝子に関する一定レベルの専門知識や操作技術、専用の設備、更に高価な機器や備品等の購入が必要であった。また煩雑な前処理を含めた測定時間の長さが院内導入に踏み切れない要因

になっていたと推測されるが、2018年10月15日に「全自動遺伝子解析装置Smart Gene」とオールインワンカートリッジ「スマートジーン® Myco」の発売により、遺伝子検査がより身近になった（Fig. 3）。

このシステムは、構想から発売まで丸8年を要し、開発コンセプトは「遺伝子検査のPOCT化」から始まった。その為には、機器のコストをできるだけ抑えること、前処理（Fig. 4）とPCR・QProbe法（Fig. 5）による増幅および検出を連動させる仕組みを全て組み込んだオールインワンカートリッジの開発、検体採取から検査結果出力までの時間をできるだけ短くするために、パフォーマンスの良い酵素（DNAポリメラーゼ）を使用し、温度応答性の高い加温冷



Fig. 3 全自動遺伝子解析装置Smart Geneとスマートジーン®Myco
a) SmartGene®とスマートジーン®Mycoの外観
b) 結果表示画面と印刷（Myco陽性例）

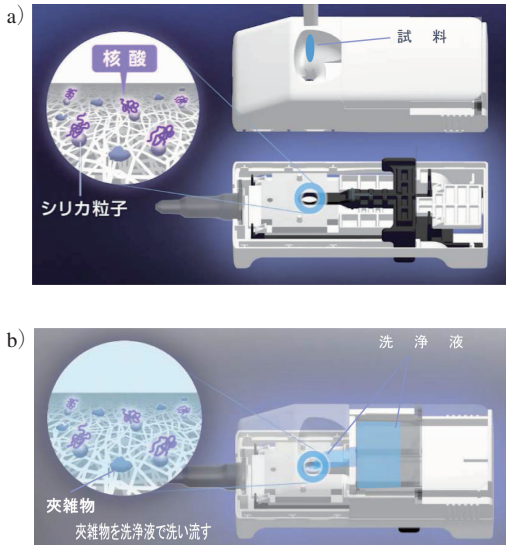


Fig. 4 前処理 (イメージ図)
 a) 核酸の吸着・回収
 b) 不要な成分の洗浄

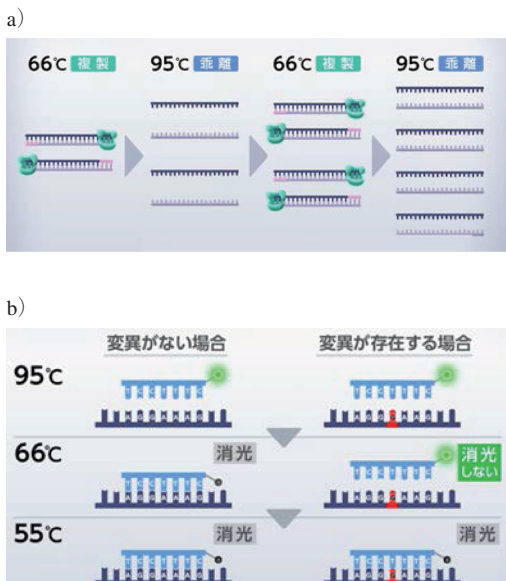


Fig. 5 PCR・QProbe法の原理 (イメージ図)
 a) PCR法による標的遺伝子の増幅
 b) QProbe法による目的遺伝子の検出

却器の部品を機器に採用、更に増幅産物の長さを短くすることなどにより、試料を専用カートリッジに滴下するだけで約30～50分での結果出力を可能にした。

本システムの基本的な原理は、PCR法での標

的遺伝子の増幅反応と標的核酸へのアニーリングによる蛍光消光現象を利用して目的の遺伝子を検出するQProbe法を用いていて、スマートジーン®Mycoは、マイコプラズマ23SリボソームRNA領域をPCR法により増幅させるが、この領域は2063番目あるいは2064番目の塩基に変異が生じ易いことが報告されている⁵⁾。

真藤らの検討⁶⁾では、遺伝子検査(シーケンス解析も実施)で陽性になった51例中19例で2063番目の塩基の変異(アデニンがグアニンに変異)が確認され、残りの32例の変異は確認されなかったと報告している(遺伝子変異の割合: 37.3%)。

ここで、QProbe法は95°Cのフリーの状態であり、66°Cで標的遺伝子に結合すると消光する蛍光物質を備え、標的部位に変異があると消光温度(結合温度)が55°Cまで下がる特徴がある。

前述の変異が確認された19例は、QProbe法において55°Cのみで検出され、変異のない残りの32例は66°C以下(66°Cと55°C)で全て検出されており、シーケンス解析結果と完全に一致していた。

またQProbe法とLAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法との相関性も良好な結果であったことも報告している。

V. 各検査法のメリット・デメリット

①目視判定の迅速診断キットのメリット・デメリット

メリットとしては、機器が不要であり、一度に複数の検体を処理できるなどが挙げられる。

デメリットとしては、感度不足や検出感度下限付近での測定者間において判定結果が違うことなどが指摘されている (Table 1)。

判定者間で結果が違う理由は、目視判定の迅速診断検査に従事した期間の長さではなく⁷⁾、判定する部屋の照度などの環境的要因や判定者の目のコンディションなどの要因が大きく影響すると考えられる。

②銀増幅を用いた高感度迅速診断システムのメリット・デメリット

メリットとしては、高感度であることで発症早期からの診断に有用であり、自動判定により誰が検査しても客観的な判定ができることが挙

Table 1 目視にて判定を行うキット4種での判定者3名による判定結果の比較

| 株 | 希釈倍率 | キットB判定者 | | | キットC判定者 | | | キットD判定者 | | | 文献7より抜粋 | | |
|---------|------|---------|------|------|---------|----|----|---------|----|----|---------|------|------|
| | | ① | ② | ③ | ① | ② | ③ | ① | ② | ③ | ① | ② | ③ |
| Flu A-1 | ×40 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | ×80 | + | +w | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | ×160 | - | - | - | + | +w | + | +w | +w | + | +w | - | + |
| | ×320 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Flu A-2 | ×40 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | ×80 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | ×160 | +w | +w | +w | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | ×320 | - | - | - | - | +w | +w | +w | + | + | +w | +w | + |
| | ×640 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Flu B-1 | ×40 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| | ×80 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | +w |
| | ×160 | - | - | + | - | - | + | - | +w | + | - | - | - |
| | ×320 | - | - | - | - | - | +w | - | - | +w | - | - | - |
| | ×640 | n.t. | n.t. | n.t. | - | - | - | - | - | - | n.t. | n.t. | n.t. |
| Flu B-2 | ×10 | + | + | + | + | +w | + | + | + | + | + | + | + |
| | ×20 | +w | + | + | +w | +w | + | + | +w | + | - | +w | +w |
| | ×40 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | ×80 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

判定者①:経験10年、判定者②:経験6年、判定者③:経験0.1年

+w:弱陽性, n.t.:not tested



Fig. 6 オンラインシステム

げられる。

また別費用となるが、検体と試薬をバーコード管理して、検査結果をオンラインで施設の検査システムへ送信することで、迅速な結果の報告とともに入力ミスを防ぐことができる (Fig. 6)。

デメリットとしては、専用機器を購入する初期費用が必要なこと、複数の検体を一度に処理することができないことなどが挙げられる。

③PCR・QProbe法による全自動遺伝子解析システムのメリット・デメリット

メリットとしては、前述の2法より、より精度が高い検査結果を提供できる遺伝子検査であるにも関わらず、他法と同じ簡便な操作ステップで自動判定できることや、QProbe法の特長として、特定遺伝子の検出と同時に一塩基の変異を識別することで薬剤耐性に関与する遺伝子の変異の有無も確認することが可能であることなどが挙げられる。

マイコプラズマ学会が作成しているマイコプラズマ診断のガイドライン「肺炎マイコプラズマ肺炎に対する治療指針」においても肺炎マイコプラズマ核酸同定検査の方法に「Qプローブ法」が新たに追加 (2019年7月) された。

また、大手検査センターも同タイミングでこの方法を採用したことで、今後QProbe法が急性期の肺炎マイコプラズマ肺炎の診断に広く浸透して行く予想される。

本機器は銀増幅を用いた高感度迅速診断システムと同系のオンライン接続も可能である (Fig. 6)。

デメリットとしては、専用機器を購入する初期費用が必要なこと、複数検体の処理ができない、測定時間が他法と比較して若干長い事などが挙げられる。

Table 2 各POCT対応機器・試薬の特徴

×:不満足 △:やや不満足 ○:満足 ◎:非常に満足

| POCT対応 機器・試薬 | 主な特徴 | 機器購入等の初期費用 | 簡便さ | 自動判定 | 測定時間 | 検出感度 | 特異度 | 1テスト単価 | 感染症領域における検査項目の種類 | 将来性* |
|----------------------------|------------|------------|-----|------|------|------|-----|--------|------------------|------|
| 目視判定の迅速診断キット | 迅速簡便 | ◎ | ◎ | × | ○～◎ | △ | ○ | ○～◎ | ◎ | △ |
| 銀増幅を用いた高感度迅速診断システム | 高感度自動判定 | ×～△ | ○ | ◎ | △～○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| PCR・Qprobe法による全自動遺伝子解析システム | 遺伝子検出前処理不要 | ×～△ | ○ | ◎ | △ | ◎ | ◎ | △ | △ | ◎ |

※将来性:オンラインや新規臨床検査項目の開発など

VI. まとめ

今回紹介したそれぞれの検査方法の特徴をTable 2にまとめた。

どの検査法もPOCT対応機器・試薬として、検査時間の短縮および被験者が検査を身近に感ずるという利点を活かし、迅速かつ適切な診療・看護、疾病の予防に寄与し、ひいては医療の質、被験者のQOL (quality of life) および満足度の向上に資する検査方法であるが、施設毎に検査の何を一番重要視しているかで検査法の選択が変わってくる。

例えば対象患者の年齢・重症度、病原微生物の種類及び院内感染の対策方法に応じて検査法を使い分けて行くことも重要である。

全ての検査法に共通することだが、目的とする病原微生物が体内に存在していても正しい検体採取が行われず、各検査法の検出限界より少ない量しか採取できなければ、正しい検査結果が得られない事も留意しておく必要がある。

今後、感染症領域のPOCT対応機器・試薬は、検体採取具を含めた医療機器等の更なる技術の進歩が望まれ、早期診断・治療 (test and treat)、薬剤の選択、薬剤耐性 (AMR) 対策及び二次感染予防に対する臨床現場即時検査としての役割は計り知れない。

これらを全て満足させるには遺伝子検査の

POCT化が一つのキーポイントとなるが、小型の全自動遺伝子解析装置の登場とともに臨床の現場で必要とされる検査項目を充実させて行くことが今後の課題である。

本論文内容に関連する著者らの利益相反: なし

文献

- 1) 金井 正光他: POCT検査. 臨床検査法提要 改訂第34版, 119, 金原出版, 東京(2015).
- 2) 日本臨床検査自動化学会: POCTの定義. POCTガイドライン第4版. 日本臨床検査自動化学会誌 43(Suppl.1): 10, 2018.
- 3) 山崎家春: 迅速キットの応用範囲～適材適所を考える. 医療と検査機器・試薬, 35: 476-479, 2012.
- 4) 柴崎光衛: POCT(イムノクロマト法)における異常反応. Medical Technology, 41: 763-768, 2013.
- 5) 成田光生: 薬剤耐性マイコプラズマの現状と今後の展望. モダンメディア, 53: 297-306, 2007.
- 6) 真藤和弘, 加藤匡平, 成田妙子, 花岩洋樹, 原田哲太, 京都敬祐, 船島由美子, 佐藤謙一, 永沢善三, 梅村創: 新しいマイコプラズマ迅速遺伝子検出試薬の検討. JARMAM, 28: 85-89, 2018.
- 7) 矢野 美由紀, 直本 拓己, 大沼 健一郎, 楠木 まり, 林 伸英, 木下 承皓, 大路 剛, 河野 誠司: 判定ラインの発色原理が異なる5種類のインフルエンザ迅速診断キットの比較評価. 医学検査, 63: 221-225, 2014.