

(特集：ワークショップ (第30回年次学術集会より))

感染症検査分野における遺伝子検査

真藤 和弘

Gene-related testing in the field of infectious disease testing

Kazuhiro Shinto

Summary Many tests and diagnostic methods have been established to control infectious diseases. In infectious disease testing, genetic diagnostic methods are more sensitive than microscopic and immunological diagnostic methods and can be applied to various pathogens. Therefore, gene-related tests have a wide range of roles. Currently, among gene-related tests used for the identification and analysis of pathogenic microorganisms, analysis methods such as 16S rRNA gene analysis and the POT method are widely used and can greatly contribute to infection control. However, since gene-related tests are highly sensitive, it is necessary to pay sufficient attention to the contamination of pathogens and reagents when performing operations. Work area division, participation in workshops, and acquisition of specialized qualifications are required. Therefore, it is essential to acquire knowledge and skills, including how to control the spread of infectious diseases.

Key words: Gene-related tests, Infectious diseases, 16S rRNA gene, PCR, Infection control

I. はじめに

検体検査分野は、血液や尿、組織、細胞などの提出された検体から患者の病態や疾患の診断を行う分野である。その中で遺伝子検査分野は、様々な検査分野と横断的に関わり合う。ゲノム医学が推進し、診断や治療方針の決定に必要不可欠な分野となっている。

今回、「遺伝子検査と検体検査の接点」というテーマにおいて、特に感染症検査分野における遺伝子検査に焦点をあて、臨床検査への展開、さらに当院での取り組みについて述べる。

II. 感染症・感染症検査の歴史

人類はこれまで数多くの感染症と対峙してきた。感染症の歴史は生物の発生と共にあり、近代までヒトの病気の大部分を占めてきた。感染症は、様々な民族や文化の接触や交流、世界の一体化などにより規模が拡大していった。

感染症の伝染性を初めて唱えたのは、11世紀のイスラム世界を代表する医学者 イブン・シーナー (Avicenna) で、「隔離により感染症の拡大を止められる」「体液が何らかの天然物により汚染されることで感染性を獲得する」と記述している。感染症の記録としては、13世紀

医療法人社団高邦会高木病院検査技術部
〒831-0016 福岡県大川市酒見141-11
Tel: +81-944-88-8283
E-mail: Kazu.shinto.TH@gmail.com

Inspection Technology Department, Medical
Corporation Kohokai Takagi Hospital
141-11 Sakemi, Okawa-shi, Fukuoka 831-0016, Japan

のハンセン病に始まり、ペスト・梅毒・天然痘と多くの死者を伴う感染症が世界の様々な地域で蔓延した。近代になっても、結核やインフルエンザなど未だに感染流行が認められる感染症が発生している。近年でも国内で様々な感染症の流行があり、また国際交流の発展に伴い海外で確認されていた感染症が国内で検出されることも少なくなかった。

感染症検査の歴史としては、単眼顕微鏡の発明により微生物を初めて観察したレーウエンフック (A van.Leewenhoek) と、顕微鏡の改良により多くの微生物を観察したホーク (R.Hooke) に始まる。その後、液体培養の発明や嫌気性菌を発見したパスツール (L.Pasteur) や、固体培養の発明や結核菌・炭疽菌の発見で知られるコッホ (R.Koch) ら、近代細菌学の開祖により現在の感染症検査の土台が築かれていった¹⁾。微生物検査のオーソドックスな流れとしては鏡検検査・培養検査が挙げられるが、ゲノム解析の進歩により微生物の遺伝子解析技術が発展し今日に至る。主な感染症検査の特徴を示す (Table.1)。微生物検査で用いられる鏡検検査・培養検査や免疫学的診断検査に比べて、遺伝子検査は検出感度が高く、診断までの所要時間も短い利点があるが、感度が高いゆえにコンタミネーションによる偽陽性反応に注意しなければならない。

Ⅲ. 遺伝子関連検査

医療に資する遺伝子検査を遺伝子関連検査とよび、① B型肝炎ウイルスやC型肝炎ウイルスなどの、ヒトに感染症を引き起こす外来性の病原体の核酸 (DNAあるいはRNA) を検出・解析する病原体遺伝子検査 (病原体核酸検査)、② *EGFR* 遺伝子変異や *JAK2* 遺伝子変異などの癌細胞特有の遺伝子の構造異常等を検出する遺伝子検査や、遺伝子発現解析など疾患病変部・組織に局限して症状とともに変化し得る一時的な遺伝子情報を明らかにする体細胞遺伝子検査、③ 出生前診断や遺伝性疾患などの、単一遺伝子疾患、多因子疾患、薬物の効果・副作用・代謝、個人識別に関わる遺伝学的検査など、ゲノム及びミトコンドリア内の原則的に生涯変化しない、個体が生来的に保有する遺伝学的情報を

明らかにする生殖細胞系列遺伝子検査 (ヒト遺伝学的検査) の3つに分類される²⁾。今回取り上げる「① 病原体遺伝子検査」ではTable.2に示すような病原体の検出に用いられている。

遺伝子関連検査の方法としては、主に任意の核酸配列を増幅し検出する核酸増幅法と、ターゲットとなる特異的な核酸配列を増幅せずに検出する核酸プローブ法がある。核酸増幅法には、PCR (Polymerase chain reaction) 法やLAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法などのDNA増幅法、RT-PCR (Reverse transcription PCR) 法やTMA (Transcription mediated amplification) 法などのRNA増幅法、分岐プローブ法などのシグナル増幅法がある。核酸プローブ法には液相ハイブリダイゼーションや固相ハイブリダイゼーション、*in situ*ハイブリダイゼーション法などがある。各ステップの方法としては以下のようになる。

1. 細菌の代表的なDNA抽出法

- 1) 熱抽出法：主にグラム陰性菌からDNAを抽出する方法で、グラム陽性菌や真菌は細胞壁の構造上、適していない。
- 2) アルカリ熱抽出法：熱抽出法に加え、DNAのアルカリ変性を利用してDNAを抽出する。
- 3) DNA抽出キットを用いた方法：DNA吸着メンブレンや磁気ビーズを利用して抽出する。

2. プライマー

DNAの合成・複製に必要な核酸の断片で、約20塩基からなる。ターゲットとなる配列に設計することにより、任意の領域を特異的に増幅することを可能とする。

3. PCR

DNA配列上の特定の領域を、耐熱性DNAポリメラーゼを用いて増幅させる方法。熱変性 (95℃程度)、アニーリング (60℃前後)、伸長反応 (72℃前後) の反応を繰り返すことにより、目的の領域を2ⁿ倍に増幅させることができる。

4. アガロースゲル電気泳動

アガロースは2種類の糖が結合し合って網目状の構造を取っており、大きなDNAは移動速

Table 1 Features of major infectious disease tests

診断法	検査法	特徴
鏡検 分離・培養	病原体の直接鏡検検査 培養検査	簡便 培養には時間を要する
免疫学的診断	抗原検出 抗体検査	迅速な検査 検出感度はバラツキがある
遺伝子診断	DNA、RNAの検出	検出感度が高い コンタミネーションに注意

Table 2 Indications for gene-related tests in infectious disease testing

検査目的	検出対象
培養不可能または培養困難な 病原体の検出	HIV、らい菌、HPV、赤痢アメーバ など
分離同定に時間を要する病原体の直接迅速 検出法	抗酸菌、レジオネラ、肺炎マイコプラズマ、 クラミジア など
型判定による診断、モニタリング	HBV、HCV、HPV など
致死的感染症のwindow period、 無症候性キャリア検索	HIV、HBV、HCV、HTLV-1 など
移植後感染症の診断、モニタリング	CMV、EBV など
病原遺伝子、耐性遺伝子の検出	ベロ毒素遺伝子 (EHEC)、 <i>mec A</i> 遺伝子 (MRSA) など
分子疫学的調査研究	POT法 (MRSA、緑膿菌) など
相同性解析による同定困難な菌の解析	16S rRNA遺伝子相同性解析

度が遅く、小さなDNAは網目をすり抜けて移動速度が速い、という性質を利用したものである。エチジウムブロマイドなどで染色してDNAを検出する。

遺伝子検査ではPCR法などを用いて核酸を数百万倍以上に増幅することができるが、取扱いを正しく実施しなければ環境汚染などを引き起こす可能性がある。設備として最も重要な点は作業エリアの分けである。遺伝子検査を実施するエリアの中で、試薬領域・検体領域・増幅産物領域を明確に区別する必要がある、特に増幅産物領域は増幅前の試料等を取り扱う領域と完全に区分しなければならない。また、病原体や試薬のコンタミネーションを防ぐためには適切な手技の実施を行う必要がある、検査者の正しい知識習得が求められる。各地方などで開催されている研修会への参加や、日本臨床衛生検査技師会や日本臨床検査同学院主催の認定資格の取得が推奨される。

Ⅳ. 当院における遺伝子関連検査

2015年7月より、従来外注検査で対応していた遺伝子検査・微生物検査を院内検査で実施する、臨床微生物・遺伝子検査研究センターを開設した。対応項目としては、リアルタイムPCR法 (Abbott) での肝炎ウイルス定量検査と性感染症定性検査の3項目と、LAMP法 (栄研化学) での結核菌群核酸検出やマイコプラズマ核酸検出など5項目を実施している。結核菌検査はLAMP法の導入により、検体提出から結果陽性と判明するまでの時間が従来の数週間から最短1.5時間と大幅に短縮でき、迅速な感染対策を実施する重要なツールになっている (Fig.1)。

併設する微生物検査部門で同定できない菌が検出された場合は16S rRNA遺伝子相同性解析を用いた菌の同定で対応し、院内感染を疑う耐性菌が検出された場合はPOT法による疫学解析で対応している。

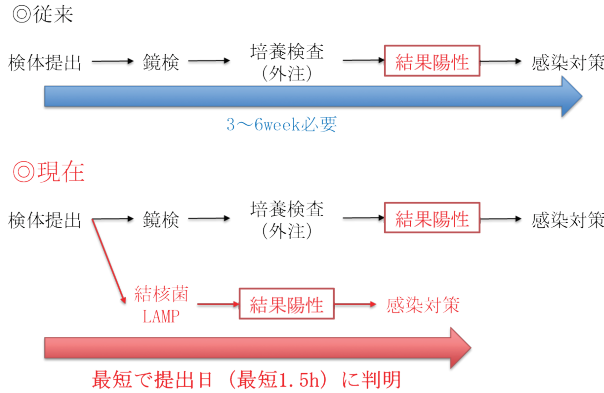


Fig.1 Differences in the flow of *M.tuberculosis* test between the conventional method and the current method at our laboratory

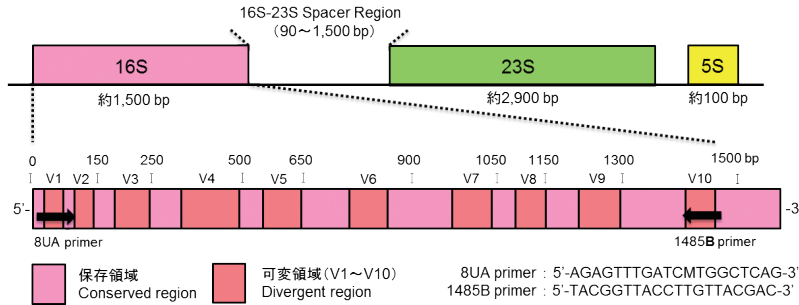


Fig.2 16S rRNA gene sequence (文献3より引用改変)

1. 16S rRNA遺伝子相同性解析

細菌のrRNAは16S、23S、5Sの3種類で構成されており、これらの3種類のrRNAのうち、特にサイズが手頃な16S rRNA遺伝子が解析対象とされる (Fig.2)^{3,4)}。16S rRNA遺伝子は配列の保存性が高く、機能変化に伴う遺伝子変異が起こる可能性が極めて低い。また、系統解析を行う上で十分な情報量を持つため、微生物系統学分野において利用される。現在、200万配列以上の16S rRNA配列が決定され、公的な遺伝子バンクに情報が登録されている。以下に不明菌の解析方法を示す。

<解析方法>

シカジーニアス®DNA抽出試薬 (関東化学) を用いて、解析したい不明菌の単独コロニーからDNAを抽出する。16S rRNA領域の両末端の保存領域をターゲットとした8UAプライマー・

1485Bプライマーを用いて、抽出したDNAをPCRで増幅する。

PCR条件：95℃・3分

⇒ <<95℃・30秒 ⇒ 55℃・30秒 ⇒ 72℃・1分>>

を35サイクル

⇒ 72℃・7分

PCR後、100V・30分間のアガロースゲル電気泳動を行う。シカジーニアスPCRプレップキット (関東化学) にて反応産物の精製を行う。増幅産物は約1,500 bpと長い塩基となっているため、3種類のプライマー (341A・519B・907A) を用いて、約500 bpの塩基に区分してサイクルシーケンス反応を行う。BigDye XTerminator精製キット (Thermo Fisher) にて精製を行う。Genetic Analyzerにて塩基配列の解析を行い、不明菌の16S rRNA領域の塩基配列を決定する。得られた塩基配列データのblast検索により相同性解析を行い、起因菌を推定する。

2. 薬剤耐性菌の検出

MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) やESBL (Extended spectrum β -lactamases) 産生菌などの薬剤耐性菌が院内アウトブレイクを起こした場合、その対象菌が病院内で水平伝播したのか、個別に感染したのか明確にする必要がある。その際、POT (PCR-based ORF Typing) 法を用いることで水平伝播した範囲を明確に特定することが可能であり、院内感染対策に広く用いられている。例として以下にMRSAのPOT法による解析方法を示す。

<解析方法>

シカジーニアス®DNA抽出試薬を用いて、解析したい黄色ブドウ球菌の単独コロニーからDNAを抽出する。シカジーニアス®分子疫学解析POTキット (黄色ブドウ球菌用) のプライマーミックスを用いて、抽出したDNAをPCRで増幅する。

PCR条件：《94℃・15秒⇒60℃・3分》を30サイクル

PCR後、100 V・60分間のアガロースゲル電気泳動を行う。ゲルをエチジウムブロマイド液に浸しDNAを染色する。UVトランスイルミネーターを用いてバンドパターンを解析する。同一菌株による水平伝播であればバンドパターンが一致し、個別感染であればバンドパターンは不一致となる^{5,6)}。

ICT (Infection Control Team) の一員として院内感染対策委員会の出席、病棟や外来での環境検査の実施、薬剤耐性対策として耐性菌の解析の実施により、院内の感染対策に貢献している。このように当センターは検査部門としての役割のみならず、研究的な解析も実施することで研究機関としての役割も担っている。

3. 新型コロナウイルス核酸検出

2020年4月より新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 核酸検出の対応を追加し、2020年10月末現在で5,000件超の検査を実施している。2020年4月から5月まではリアルタイムPCR法で、2020年6月以降はLAMP法で対応している。

<解析方法>

被検者の鼻咽頭を拭ったスワブをインフルエンザ用抽出試薬 (栄研化学) に入れ、簡易抽出法にてRNAを抽出する。新型コロナウイルス2019 (SARS-CoV-2) 検出試薬キット (栄研化学) のRNA増幅用乾燥試薬にプライマーミックス2019-nCoVを15 μ L添加する。陰性コントロール・抽出したRNA・陽性コントロール2019-nCoVの順にコンタミネーションに留意しながら10 μ L添加する。全てのチューブの蓋を閉め、チューブを倒立し蓋に付いている乾燥試薬と2分間混和させる。スピンドウン後、35分間LAMP反応を実施する。

<当院での検査実績>

2020年4月：123件 (うち陽性1件)
 2020年5月：48件
 2020年6月：46件
 2020年7月：216件 (うち陽性3件)
 2020年8月：1,291件 (うち陽性9件)
 2020年9月：2,418件 (うち陽性22件)
 2020年10月：853件

現在、当院の新型コロナウイルス核酸検出検査はLAMP法での対応が主であるが、臨床症状と検査結果に乖離が見られるケースや偽陽性反応を疑うケースなどはリアルタイムPCR法で対応している。リアルタイムPCR法の場合はカラム法でRNA抽出を行い、純度の高いRNAを回収することによりLAMP法よりも低コピーの新型コロナウイルスの検出も可能とする。検出感度が高いリアルタイムPCR法ではなくLAMP法を主として実施している理由としては、操作の簡便性や操作者の安全性、短時間で大量の検体測定が可能である点が挙げられる。当院では事例により測定方法を使い分けることで、陽性患者の見落としがないよう細心の注意を払って実施している。

V. まとめ

感染症検査の歴史の中で様々な検査法が発見・確立されてきたが、遺伝子関連検査は検出感度や特異度が高く、広く用いられるようになってきている。遺伝子関連検査は、起因菌の同

定のみに留まらず、疫学解析など感染対策の役割を担う。

遺伝子関連検査を利用した解析方法は様々あるが、検査の目的や対象によって使い分けることによりその効果を発揮すると考えられる。

遺伝子関連検査を実施するには専門的な知識・技術の習得が必須である。そのため、学会や研修会などに出席することにより常に最新の情報を仕入れ、また、各種認定資格の取得をするなど技術・知識の研磨が必要である。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

文 献

- 1) 岡田淳, 他: 微生物学、臨床微生物学とは. 微生物学/臨床微生物学 第3版. 1-2, 医歯薬出版 (2011)
- 2) 堤正好: 遺伝子解析研究・人を対象とする医学的研究に関する倫理指針. 遺伝子検査技術改訂第2版, 162-166, 宇宙堂, (2016)
- 3) 大楠清文、江崎孝行: 16S rRNA配列のシーケンス解析による細菌の同定. 臨床と微生物, Vol.39 (増刊号): 601-610, 2012.
- 4) Woese CR: Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-271, 1987.
- 5) Suzuki. M. *et al.* Development of a rapid strain differentiation method for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Japan by detecting phage-coded open reading frames. *J.Appl. Microbiol.* 101 (4): 938-947 (2006)
- 6) Suzuki. M. *et al.* Identification of the clonal complexes of *Staphylococcus aureus* strains by determination of the conservation patterns of small genomic islets. *J. Appl. Microbiol.* 107 (4): 1367-1374 (2009)