

<シンポジウム(3)-8-1>中枢神経系感染症の遺伝子診断の進歩

細菌性髄膜炎の遺伝子診断

生方 公子¹⁾

要旨：市中において発症する細菌性髄膜炎の主たる原因菌 8 種を同時に検索できる網羅的 real-time PCR 法の概略，ならびに髄液に対して培養法と本方法とを併行しておこなった結果について述べた。本方法は，もっとも適切な対応が求められる当該疾患の診断法として有用であり，その普及が望まれる。

(臨床神経 2013;53:1184-1186)

Key words：細菌性髄膜炎，迅速診断，リアルタイム PCR

はじめに

細菌性髄膜炎は乳幼児にとってはもっとも重篤な急性疾患であるが，2010 年末から施行された「子宮頸がん等ワクチン接種緊急促進事業」による公的助成により，2011 年から小児に対する Hib コンジュゲートワクチン (Hib ワクチン) と肺炎球菌 7 価コンジュゲートワクチン (PCV7) の接種が本格化した。2012 年の Hib と PCV7 の推定接種率は全国平均で 85% を超え，その結果 Hib 髄膜炎はいちじるしく減少¹⁾ し，肺炎球菌のそれ²⁾ も半減してきている。

その一方，高齢化社会の到来，交通網の発達や経済のグローバル化にともない，成人例の髄膜炎が増加しつつある。後遺症を残さずに救命するには，発症時に短時間で起炎菌を推定し，もっとも適切な抗菌薬投与と処置をおこなうことが必要である。とくに高齢者においては，感染症そのものは治癒し

えても QOL がいちじるしく低下し，本人のみならず社会的な経済負担も大きくなる。

ここでは，私どもが細菌性髄膜炎の迅速診断として，原因菌として頻度の高い菌種を網羅的に検索できるよう構築した real-time PCR 法について述べる。

対象と方法

髄液に対する real-time PCR 法の確立

細菌性髄膜炎例においては，多くのばあいすでに抗菌薬が投与されており，培養しても菌の発育をみとめないことが多い。このようなことから現実的に即して，原因菌が死滅あるいは損傷を受けていても迅速に菌種を推定できる網羅的 real-time PCR 法が必要と考えた。

プロトコルの概略は Fig. 1 に示す。検索可能菌種と遺伝子は，i) 肺炎球菌 (*lytA* 遺伝子)，ii) インフルエンザ菌 (16S

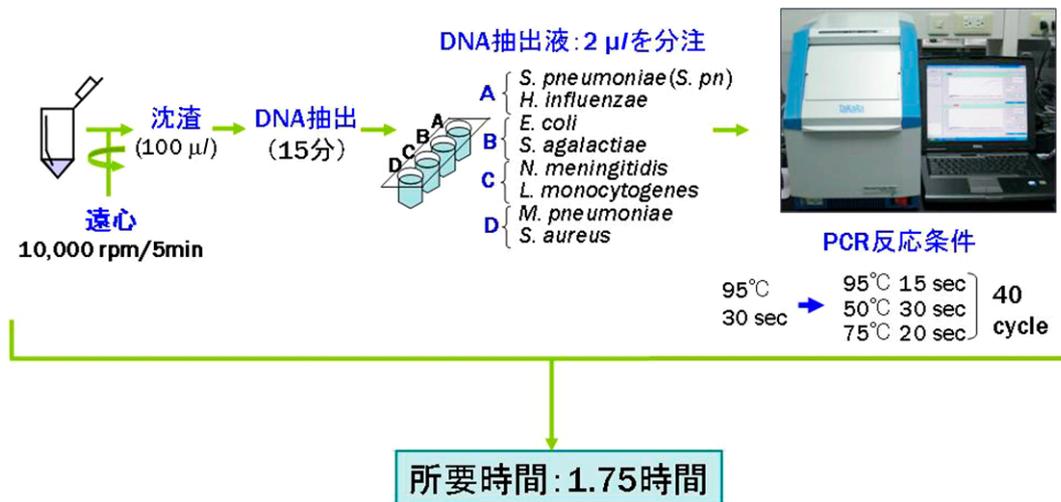


Fig. 1 髄液の細菌検索にもちいる real-time PCR 法の概略。

¹⁾ 慶應義塾大学医学部感染症学教室 [〒 160-8582 東京都新宿区信濃町 35]
(受付日: 2013 年 5 月 31 日)

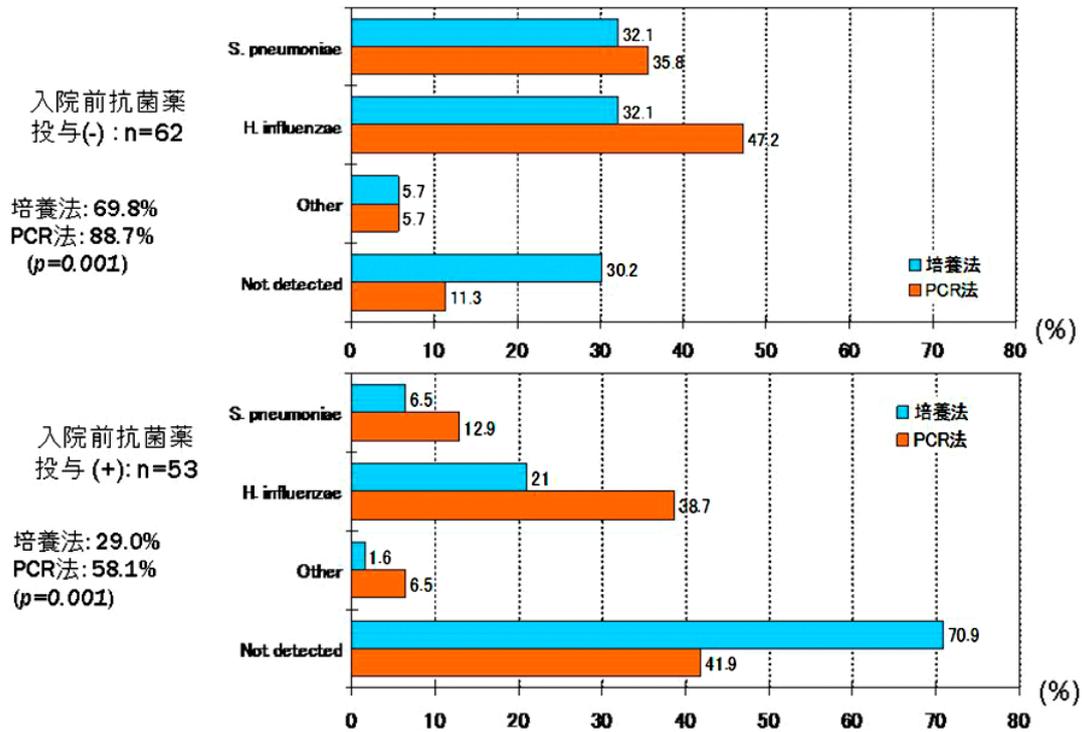


Fig. 2 抗菌薬投与の有無と細菌陽性率の関係 (n = 115).

rRNA 遺伝子), iii) 大腸菌 (16S rRNA 遺伝子), iv) B 群溶血性レンサ球菌 (*dltS* 遺伝子), v) 髄膜炎菌 (16S rRNA 遺伝子), vi) リステリア菌 (16S rRNA 遺伝子), vii) 黄色ブドウ球菌 (*spa* 遺伝子), viii) 肺炎マイコプラズマ菌 (16S rRNA 遺伝子と *mip* 遺伝子) である³⁾.

ひとつのチューブで2菌種ずつ検索可能としている。ちなみに、3菌種以上のmultiplexにすると感度が低下し、かつ非特異反応がみられるばあいがあるので注意を要する。

また、髄液中の菌数はきわめて少ないこともあるので、DNAの増幅サイクルを35以上にすると非特異反応が生じやすい。そのような検体では再検査などを試みるべきである。

なお、PCR法の感度と特異度は、標準菌株をもちいて検討されすでに報告³⁾しているが、PCR用反応チューブに数個の菌、あるいはDNAが存在すれば、理論的には32～35サイクルで陽性反応がみとめられるはずである。

Real-time PCR法による成績と今後の課題

Fig. 2には著者らが解析依頼を受けた115例の髄液について、real-time PCR法と培養法を同時に実施した陽性率の比較を示す。“抗菌薬の前投与なし”例が46%，“抗菌薬の前投与あり”例が54%とほぼ半数ずつであった。前投与なし例における培養法とreal-time PCR法での原因菌の推定率をみると、培養では69.8%であったのに対し、PCRでは88.7%と高い確率で原因菌が明らかにされている。

一方、抗菌薬がすでに投与されていると、菌の分離率は

29.0%といちじるしく低下、PCRでも58.1%と約半数例しか推定できていない。とくに小児においては注射用抗菌薬のセフトリアキソンがoutpatient parenteral antimicrobial therapy (OPAT)として1度でも使用されていると、菌によってはその影響を強く受け、ほとんど原因菌を特定できていない。PCR法といえども抗菌薬の前投与の有無は結果に大きく影響する。

なお、遭遇する機会の少ないリステリア菌や肺炎マイコプラズマ菌、あるいはB群溶血性レンサ球菌などの検索には、網羅的real-time PCR法はきわめて有用である。

21世紀における重症感染症を考える際、先ず問題となるのは、「急速な高齢化社会」による基礎疾患保持例の増加である。その背景には医療の進歩の恩恵もあるが、このような宿主側の変化が市中型重症感染症の増加と原因菌の変化に繋がっている。

二つ目は「人々の多極化移動」である。グローバルな経済活動による激しい人々の移動は、新たな病原細菌や耐性菌を、知らない間に世界中へ拡散させている。一度持ち込まれると人口密度の高いわが国では、瞬間に全国へと拡散していく。第三には、原因菌の「耐性化と耐性率の変化」である。耐性化にもっとも影響する「外来処方抗菌薬の変化」を各系統別にみると、2010年にはセフェム系薬、マクロライド系薬、そしてキノロン系薬がおおよそ30%ずつ処方されており、今後これらの薬剤耐性菌増加に留意する必要がある。

環境要因の変化を念頭に今後を予測すると、腎機能や肝機能低下、心疾患、糖尿病などのリスクを抱えた高齢者の髄膜

炎は増加することが懸念される。そのような例には、益々原因菌の迅速診断が求められ、適切な抗菌薬がすみやかに投与されないと、予後はきわめて不良となりやすい⁴⁾。

Real-time PCR 法による原因微生物の網羅的迅速診断はその有用性は理解されても、まれな疾患を対象としているがゆえに、“診断キット”にはなりがたい。この解決のためには、迅速診断の集中検査システムの構築が望まれる。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれもありません。

文 献

1) Ubukata K, Chiba N, Morozumi M, et al. Longitudinal

surveillance of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000-2011. *J Infect Chemother* 2013;19:34-41.

2) Chiba N, Morozumi M, Shouji M, et al. Rapid decrease of 7-valent conjugate vaccine coverage for invasive pneumococcal diseases in pediatric patients in Japan. *Microb Drug Resist* 2013;19:308-315.

3) Chiba N, Murayama S, Morozumi M, et al. Rapid detection of causative eight pathogens for diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. *J Infect Chemother* 2009;15:92-98.

4) 生方公子. 重症型のレンサ球菌・肺炎球菌感染症に対するサーベイランスの構築と病因解析その診断・治療に関する研究. 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 (H22-新興-一般-013). 2012

Abstract

Rapid identification of meningitis due to bacterial pathogens

Kimiko Ubukata, Ph.D.¹⁾

¹⁾Department of Infectious Diseases, Keio University School of Medicine

We constructed a new real-time PCR method to detect causative pathogens in cerebrospinal fluid (CSF) from patient due to bacterial meningitis. The eight pathogens targeted in the PCR are *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Mycoplasma pneumoniae*. The total time from DNA extraction from CSF to PCR analysis was 1.5 hour. The pathogens were detected in 72% of the CSF samples (n=115) by real-time PCR, but in only 48% by culture, although the microorganisms were completely concordant. The detection rate of pathogens with PCR was significantly better than that with cultures in patients with antibiotic administration.

In conclusion, detection with real-time PCR is useful for rapidly identifying the causative pathogens of meningitis and for examining the clinical course of chemotherapy.

(*Clin Neurol* 2013;53:1184-1186)

Key words: bacterial meningitis, rapid diagnosis, real-time PCR