

## VITEK MS の使用経験

### 3 類感染症、食中毒起因菌を中心に

◎杉本 直樹<sup>1)</sup>

地方独立行政法人 静岡市立静岡病院<sup>1)</sup>

#### 【はじめに】

当院は、2013 年 11 月、VITEK II がレンタル契約終了となったため、質量分析技術を用いた細菌同定機器、VITEK MS (シスメックス・ビオメリュー：現ビオメリュー・ジャパン) を導入した。その理由は、各種同定キットと同じ数値同定に基づく判定を行う従来型の自動同定機器 (VITEK II を含む) への更新では、革新性がないため、遺伝子同定レベルに近い精度をもつ質量分析機器を選択した。特に、外来性の病原菌同定に期待した。

しかしながら、*Escherichia coli* と *Shigella* を判別できない、*Salmonella Typhi* を追加試験なしで確定できない等、質量分析機器の限界 (特徴) もある。そこで、当院の臨床分離株である 3 類感染症および食中毒の起因菌 51 株 (国立感染症研究所と地方衛生研究所のクロスチェック済) の VITEK MS 判定結果を報告し、併せて、必須である従来同定法について説明する。

また、遭遇した稀な細菌を報告する。

#### 【VITEK MS の判定結果への対応】

VITEK MS で感染症法上の菌名が判定されれば行政対応の可能性があるが、ここでの検査室判断が大切と考える。つまり、判定結果の自施設による確認をどこまでした上で、それ以後の精査を行政機関へお願いするかという見極めである。当院の VITEK MS 判定結果では、チフス菌、パラチフス A 菌、それ以外の食中毒起因菌としてのサルモネラの鑑別は、完全でなかったことから、結果が「食中毒起因菌としてのサルモネラ」であってもチフス菌を否定できない場合があり得る。また、その逆もあり得る。かといって、海外渡航者でないサルモネラ疑いの検査段階で、その精査を行政機関にお願いするわけにはいかない。TSI 寒天培地、LIM 培地、シモンズのクエン酸塩培地を用いれば前記サルモネラの鑑別は容易であり、その精度は高い。よって、これらの確認培地による確認 (従来同定法) を実施しなければならない。VITEK MS 取扱説明書 (Ver.3 臨床用) には、各種サルモネラ分類群が判定された場合は血清検査による同定結果の確認をするよう記載があるが、サルモネラ以外の菌群との類属反応も起こり得るため、前記の確認培地による性状確認が優先であり、いくつもの成書にその手順が示されてい

る。

*Shigella* の VITEK MS 判定結果はすべて *Escherichia coli* であった。よって、*Shigella* では確認培地が重要となる。さて、不適切な例を挙げる。インドール反応が陽性であったにもかかわらず、赤痢菌診断用免疫血清でソルネ血清に凝集が認められたということで、某総合病院より当院に精査依頼があった。インドール反応陽性結果は *Shigella sonnei* の除外性状であると伝えたが、実施してほしいとのことで行った当院での血清反応は陰性であった。これは、インドール反応陽性の時点で *S.sonnei* を除外しなかつただけでなく、期限切れの赤痢菌診断用免疫血清へあたる (大腸菌等との類属反応もある) という誤った手順であった。*Shigella* については、診断用免疫血清の常備がなくとも、そのスクリーニングが確実にできる力量が必要である。そのためには、疑わしいコロニーの釣菌力と確認培地の鑑別力を習得しなければならない。確認培地は、一次的には TSI 寒天培地と LIM 培地、二次的には酢酸ナトリウム培地を推奨する。酢酸ナトリウム培地を加えることにより、血清反応へ進める頻度はきわめて少なくなる。なお、*Shigella* に関しては、質量分析機器よりも数値同定に基づく判定を行う従来型の自動同定機器や同定キットのほうが役に立つが、同定機器を 2 種類保有するのは不経済である。いずれの自動機器もガス発生や運動性は判らない。

#### 【遭遇した稀な細菌】

昨年、耳鼻科の咽頭粘液からの検出菌が、*Corynebacterium diphtheriae* (ジフテリア菌) と VITEK MS で判定された。当院が常備する検査キット API Coryne の結果も *C. diphtheriae* が推定された。

#### 【結語】

これまでの検査時間を約 1 日以上短縮させた質量分析機器の超迅速同定は素晴らしい。その精度は、被検菌のマススペクトルと、データベースの細菌マススペクトルとのマッチングにかかっており、菌種によっては完全ではない。したがって、細菌の性状を判別する従来同定法の重要性はいささかも変わらない。

まずは、起因菌を発育させ、そのコロニーを確実に釣菌することが大切と考える。

(連絡先：054-253-3125)

# MALDI バイオタイパーの使用経験

～導入後1年の経験から～

◎栗田 泉<sup>1)</sup>  
市立島田市民病院<sup>1)</sup>

## 【はじめに】

質量分析法の一種であるマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: MALDI-TOF MS)は、1988年に考案され2002年にノーベル化学賞を受賞した島津製作所の田中耕一博士により開発された技術である。

2011年から大学附属病院等を中心に臨床微生物分野での運用が開始され、この数年で市中病院や検査センターでの導入も急速に進んでいる。

MALDI-TOF MSは、菌体内蛋白質のマススペクトルをあらかじめデータベース化し、被検菌のマススペクトルとマッチングさせ同定する方法である。分離培養後の被検菌があれば、10分以内に菌名を得ることが可能であり、従来の自動分析器を用いた同定検査より1日短縮される。また、リボゾーム蛋白質を主体としたマススペクトルをとるため、16S rRNA シークエンスを用いた同定法に限りなく近い精度が得られる。このことは、従来法で数日要した同定困難な被検菌を精度高く僅かな時間で同定可能であり、再同定も容易であり、検査担当技師の重圧が非常に軽減される。

しかし、MALDI-TOF MSであっても被検菌のマススペクトルがデータベースに登録されている菌種とのパターンマッチングが一致しなければ、同定は困難である。また、16S rRNAの相同性の高い *Streptococcus mitis* group (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis* 等)が誤同定されることがあるように、同定が困難あるいは同定不能である菌種もいくつか存在する。その代表的な菌は、*Escherichia coli* と *Shigella* spp. であり鑑別はできない。これらは、自動分析器においても同定が不十分であり、生化学的性状や血清型別等を追加し検査する必要がある。

今回のセミナーでは、MALDI-TOF MS 導入後約1年の経験を基に、当院臨床分離株において同定が困難であったもの、他法による追加試験が必要であったものを紹介する。

## 【MALDI-TOF MS の運用】

当院は、2016年11月より MALDI バイオタイパー (MBT) “ブルカー・ダルトニクス” による細菌同定運用を開始し、2017年1月より従来使用の MicroScan

WalkAway96Si “ベックマン・コールター”、および細菌検査システム SMIL “オネスト” によるオンライン運用を開始した。これに伴い、同定・薬剤感受性検査用 Combo パネルから、基本的に薬剤感受性検査用 MIC パネルへ変更した。MBT による同定結果の信頼度が低い場合や確認試験が必要と思われた場合に、Combo パネルの使用や各種確認試験を実施している。

## 【MBT 以外に確認試験等を実施した例】

食品関連企業に従事する東南アジア国籍の成人男性。外部委託による検便検査の結果、赤痢菌が疑われるとの報告。精査のため当院消化器内科を受診し、直腸拭いスワブを用いた便培養検査を実施。翌日、BTB 乳糖加寒天培地 “BD” 上に乳糖分解の黄色を呈した *E. coli* 様コロニー(1+)、乳糖非分解のグレー色を呈した *Shigella* 様コロニー(少量)が認められ、直接スミア法により MBT を用いて測定した結果、両者とも *E. coli* (*E. coli* と *Shigella* spp. は鑑別不能:アラート)と同定された。両者とも SIM 培地 “栄研” に接種し翌日、前者はインドールテスト陽性および運動性陽性、後者はインドールテスト陰性および運動性陰性と判定され、後者は、赤痢菌免疫血清 2 号セット “生研” によりフレキシネル赤痢菌 II 型に凝集を認めた。無症候性保菌者と診断され、除菌を目的に抗菌薬治療を開始し、2回の培養陰性確認後職場復帰となる。

## 【おわりに】

MBT を用いた細菌同定は、簡便・迅速・安価・高精度であることは誰もが承知のことである。しかし、*E. coli* および *Shigella* spp. の様に鑑別不能な菌種や同定性能の低い菌種が存在することも事実である。

MBT を用いた細菌同定を実施するにあたり、不得意菌種の存在を理解し、従来からの同定検査法を用いた対応策を習得することにより、臨床微生物検査技師として検査結果を報告することが可能であると考えられる。

市立島田市民病院 0547-35-2111 (2162)

## 質量分析・PCRの前におさえておきたい基本姿勢

### 「集落ひろい隊」から「起炎菌とらえ隊」への意識改革

◎大楠 清文<sup>1)</sup>

東京医科大学 微生物学分野<sup>1)</sup>

#### 【はじめに】

このところ、森友学園や加計（かけ）学園問題が世間を騒がしている。一方、臨床微生物検査室における「キットに何でもかけ学園」問題を私は指摘しているが、この問題が依然として認識されていないこと自体が由々しき問題である。さらに、先月から質量分析による同定で迅速加算措置（40点）が認められたことから、今後は「質量分析装置に何でもかけ学園」問題が追い討ちをかけるであろう。すなわち、菌株の同定法や最新技術の導入以前に、目の前の集落をとにかく拾って同定したい、通称「集落ひろい隊」の臨床微生物検査技師の意識改革が必要である。そして、患者情報とグラム染色所見を重視した「起炎菌とらえ隊」へ一刻も早く移行してもらいたい」と私は切に願っているのである。

もう1つの由々しき問題は、同定キット、自動同定機器や質量分析装置が出す菌種名を正しいと思っている技師が多いことである。これらのキットや機器が出す菌名に付度することなく、自らの知識と経験で起炎菌を決定することが大切である。つまり、付度すべき対象は、目の前の集落が患者に悪さをしている起炎菌なのか、その集落の同定・薬剤感受性試験を実施することで患者の感染症診療に貢献できるか、なのである。「そだねー」と一歩踏み出す勇気を持ってほしい。

#### 【菌種の同定】

私が想起する“菌種の同定”は「その菌株が分離された患者の臨床症状、病態、治療経過を把握・検討しながら、グラム染色所見、集落の特徴、簡単な生化学性状などから菌種を想定したうえで、自動同定機器やキット、遺伝子解析、質量分析などのデータを“道具”として総合的な視点で行うこと」である。さらに、“究極の同定”とは、患者の臨床症状、病態、治療経過を把握・検討しながら、グラム染色所見、集落の特徴、簡単な生化学性状などを基にして“一瞬で菌種を想定”できることではないでしょうか。つまり、日常検査における同定の第一歩は snap identification, 一発同定にある。最初にグラム染色像や集落を観察して“ひらめく”かどうか、そこからスタートするのではないのでしょうか。そして、菌種同定のプロセスは経験や勘に基づく直観的な判断（暗黙知）をいかに客観的な証拠（形式知）で明らかにして、ウラを取りながら迅速かつ正確な同定へとつなげていくかが重要である。自動同定機器やキット、遺伝子解析、質量分析などのデータはウラを取るための“道具”だとの意識改革が何より重要である。

#### 【継続的な菌力アップトレーニングの重要性】

患者の臨床症状、病態を把握したうえでのグラム染色

像や集落観察のパターン認識によって“一発同定 Snap Identification”が可能な菌種を日々「筋トレ」よろしく「菌トレ」で訓練してもらいたい。例えば、BD ウェビナーを活用して「菌トレ」に励んでもらいながら、勘、直感力、インスピレーションともいわれているシックスセンス（第六勘）に磨きをかけてもらえれば幸いである。

#### 【おわりに】

臨床情報から起炎微生物を想定する訓練をさらに進めて、感染症診断の知識と経験を積み重ねながら、患者診療に貢献してもらいたい。私が挑む「プロフェッショナル 臨床微生物検査の流儀」を以下の8箇条に表現してみた。

1. 菌は生き物である。
2. 菌は嘘つかない。
3. 臨床情報から菌名を想定する訓練が大切。
4. 我々は時々自分の目標を見失う。
5. そんなとき・・・その検体が自分の最も大切な人から採取されたものだったら・・・。
6. 前向きな失敗は、次の挑戦への勇気とバネを与えてくれる「何事も経験！」。
7. 臨床微生物検査でしか得られない喜びとやりがいがある。
8. 患者診療に貢献するべく知識、経験、そして“匠”の技を融合して「実践臨床微生物学」の実践。

連絡メールアドレス ; [ohkusu@tokyo-med.ac.jp](mailto:ohkusu@tokyo-med.ac.jp)

## 忘れてはいけない性状確認

◎佐藤 智明<sup>1)</sup>

東京大学医学部附属病院<sup>1)</sup>

### 【はじめに】

感染症診療の基本は、①感染部位（臓器）の特定、②原因菌の決定、③治療抗菌薬の選択の3つの要素からなる。感染症診療では原因菌が判明することで、その原因菌による感染症の臨床症状（病態）の予想が可能であり、抗菌薬による治療期間なども決定されるため、細菌同定検査（原因菌の決定）は感染症診断・治療において薬剤感受性検査と並んで重要な検査である。細菌同定方法は生化学的性状による同定と分子生物学的同定（遺伝子検査、質量分析）に大別される。近年では自動化により容易に同定結果（菌名）が得られるようになったが、今回は同定検査の基本について改めて考えてみる。

### 【同定検査の現状】

現在、細菌同定検査は同定キットまたは自動細菌検査装置（自動機器）を用いた生化学的性状による同定検査を実施している検査室が大多数である。近年では質量分析装置を用いた同定検査や血液培養検出菌を中心に遺伝子検査による迅速同定検査を導入する検査室も増加しつつあるが、分子生物学的同定法を実施している施設は限られている。現在、質量分析装置を日常検査に導入している施設は約120施設程度と推定され、遺伝子検査を用いた同定検査を実施している施設はさらに少数施設であると推定される。2017年度の日本臨床衛生検査技師会精度管理調査では同定検査の参加施設は1,200施設を超える参加施設数であったことから、分子生物学的同定法を日常検査に導入している施設は同定検査実施施設の1割にも満たないのが現状である。

同定キットでの同定検査は生化学性状の“+”、“-”の判定結果から得られる菌コードにより菌名を検索するため、菌の性状について多くの知識は必要としない。更に自動機器や質量分析装置、遺伝子検査による同定検査は自動的に同定菌名が出力されるため、菌の性状についての知識はほとんど必要とせず同定菌名が得られる。このため、得られた結果が誤っていた場合でも疑うことなく報告してしまう可能性も否定できない。

### 【同定検査の基本】

同定検査はグラム染色やコロニー所見などにより菌

種または、腸内細菌科細菌などの菌グループを推定することが基本である。現在のように同定キットや自動細菌検査装置が普及する以前の細菌同定検査は、分離培地に発育したコロニー所見やTSI寒天培地など数種類の確認培地に菌を接種・培養し、菌の鑑別性状を確認することにより同定を行ってきた。確認培地による同定検査には細菌の生化学性状の知識が必要であり、同定キットや自動機器が普及する以前は、推定菌種と結果が異なった場合は再度ポイントとなる鑑別性状を確認することにより菌種を決定してきた。極論を述べれば、確認培地による同定検査を経験してきた技師は、自分が推定した菌種名の確認のために同定キットや自動機器による同定検査を実施していたと言っても過言ではないかもしれない。

### 【同定検査のピットホール】

自動機器による同定検査手順は、①規定濃度の菌液を調整する、②菌液をプレートに分注し培養する、③培養時間経過後に自動判定し結果が出力される。一方、質量分析装置では、①被験菌をターゲットプレートに塗布する、②マトリックス試薬を1μL添加し乾燥させる、③装置にセットしスイッチを押す、④結果が出力される。このように自動機器や質量分析装置による同定検査は微生物検査の経験がほとんどない技師でも容易に結果を得ることができる。しかし、当然であるがデータベースに登録されていない菌種の同定はできない。また、自動機器ではコンタミネーションにより複数菌種が混在する菌液では、それぞれの生化学的性状から全く別の同定菌名が高確率での結果として出力されることがある。

質量分析装置ではマススペクトルのパターンが極めて類似している菌種は同定が困難な菌種も公表されている。このように、現在の自動機器や質量分析装置でもすべての菌種を正確に同定することは難しい。これらの装置を使用する我々が、装置の特徴をよく理解して使用することが必要である。さらに、自動機器や質量分析装置から出力された同定結果に矛盾が無いかを確認することが重要である。そのためには少なくとも主要検出菌種のコロニー所見や鑑別性状を熟知し、微生物検査担当技師が自動機器に使われることなく使いこなすことが重要である。