

総説

我が国における自動細菌検査装置の歴史

— AutoMicrobic System (AMS) から 30 年 —

山根 誠久

琉球大学医学部臨床検査医学分野：沖縄県中頭郡西原町上原 207 (〒 903-0215)

Key Words 自動細菌検査装置, AutoMicrobic System (AMS), 菌種同定, 薬剤感受性試験

はじめに

AutoMicrobic System (AMS) として開発され、その後“VITEK”と改称された自動細菌検査装置が我が国の細菌検査室で稼働を始めてからちょうど 30 年が経過すると聞きます。これらの自動細菌検査装置と共に歩んだ私も既に還暦を迎え、そろそろ引退の時期が近いという今、その歴史を記しておくこともまた一興という心境から、この原稿に向かっています。今やこの種の自動機器の存在なしには細菌検査も成り立たない時代にありますが、ここに至るまでには様々な紆余曲折があり、一朝一夕の変化で今があるわけではないのです。多少、私的な感慨に流れる節もありますが、細菌検査に関与する若き次世代関係者へのメッセージにしたいと思います。

自動細菌検査装置の創世記

The Hazelwood site (Remes says) was a spinoff from the space program. McDonnell Douglas was working in this space technology and eventually created Vitek, a research project that was part of the NASA space program. BioMérieux bought Vitek in 1988.

“This technology was originally intended for use in space for two different reasons. One, it was for astronauts to diagnose themselves, specifically for urinary tract infections, and secondly, it was also intended to be used to study the growth of bacteria in space,” (Remes says).

(St. Louis Business Journal)

米国ミズーリ州セントルイス (St. Louis) の地方経済新聞に掲載された記事の引用です。飛行機 (特にジェット戦闘機やミサイルで有名) を生産する McDonnell Douglas 社こそセントルイスを代表する企業と言えるでしょう。ランバート国際空港に隣接する敷地内の工場で F-15 Eagle やら、F-18 Hornet, Tomahawk ミサイルが組み立てられていました。なぜ、このような企業が自動細菌検査装置 AutoMicrobic System (AMS) を生み出したのかというのは長年の大きな疑問でした。現地の担当者に直接尋ねたところ、「McDonnell Douglas 社長が病院に入院した時、採取された自分の検体の細菌検査に大変長い時間 (日数) がかかるのに驚き、自ら迅速に結果を出せる細菌検査機器を試作することにしたと聞いています」とのことでした。その社長はさらに、当時 McDonnell Douglas 社が共同企画、共同開発に参加していた NASA 宇宙プログラムにこのアイデアを持ち込んだのです。宇宙空間で飛行士が尿路感染に悩み苦しんでいる時、どのようにすれば病原菌を特定できるのでしょうか。さらに宇宙空間で細菌微生物はどのように増殖、繁殖するのでしょうか。我が国も宇宙実験室“希望”を完成させ、人類が宇宙空間で長期に生活するようになり、宇宙滞在中に感染症に罹患することも充分想定されます。そのような状況を既に 40 年以上も昔、思い描いていたヒトがいたのです。非常にコンパクトなプロトタイプ (試作モデル) が考案されました (30 年程前に McDonnell Douglas 社を訪問した時には確かに展示してあったのを憶えているのですが、写真がまったく残っていないのです) が、一説ではこのプロトタイプの装置は 1986 年 1 月の

スペースシャトル・オービタ「チャレンジャー」に搭載されたものの、その爆発事故で結局、一度も宇宙空間を飛べなかったという噂もあります。

細菌検査の自動化を実現した技術

細菌検査の自動化を可能にした技術は、今から言えば“コロンプスの卵”，とても当たり前のことに映ると思います。私なりにまとめると3つの技術に支えられたと思います。

(1) 光学的に菌発育を測定する技術

適当な液体培地に菌接種して、35～37℃に置くと菌が増殖し、その結果として培地が濁ってくることは誰もが知っている現象です。日常的に、この濁りを肉眼で観察して菌発育の有無を(定性)判定していた細菌検査室ですが、これを定量的に、かつ経

時的に測定してみようという試みを忘れていたのです。比較的長波長の可視光線(赤色光)を固定角度で照射し、その光散乱強度から培地の濁りを定量することができるのです。光散乱強度の変化の経過を追ったモニタリングによる、培養開始後の比較的早い時期に菌発育の有無を迅速に判定する技術が、まず最初に採用されたのです。原理的に最も応用しやすい検査は薬剤感受性試験です。一定濃度の薬剤を含む液体培地とまったく薬剤を含まない培地での菌増殖(培地の濁りの変化)を比較して、この薬剤に対する感受性を判定するわけです(図1)。この原理を最初に採用した自動機器が Technicon Automated Susceptibility System や Autobac II であり(いずれも培養装置と解析装置が直接接続されていない off-line 培養)、それ以後の Abbott MS-2/Avantage や AMS の機種では on-line 培養を採用したものの、ほとんど同じ測定原理が応用されています。

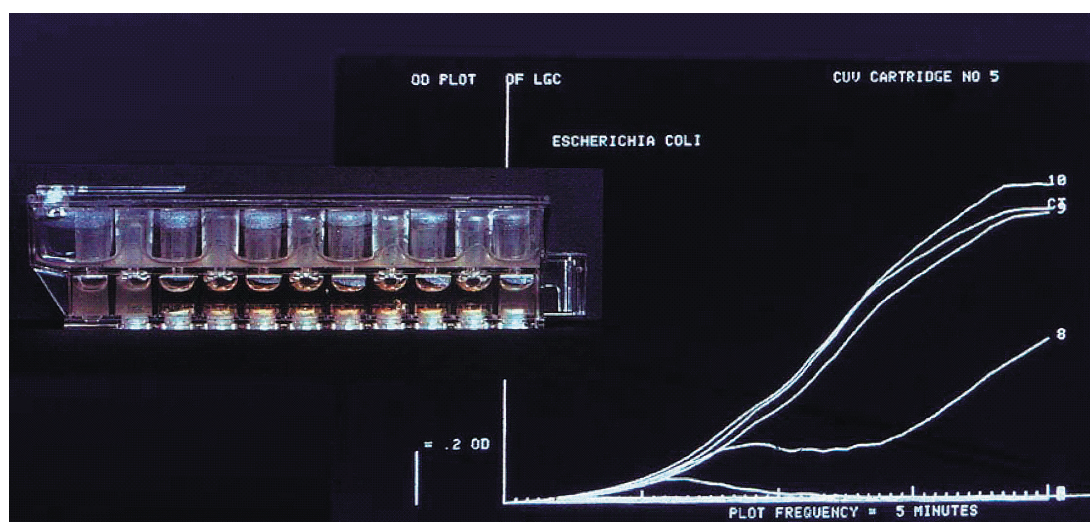


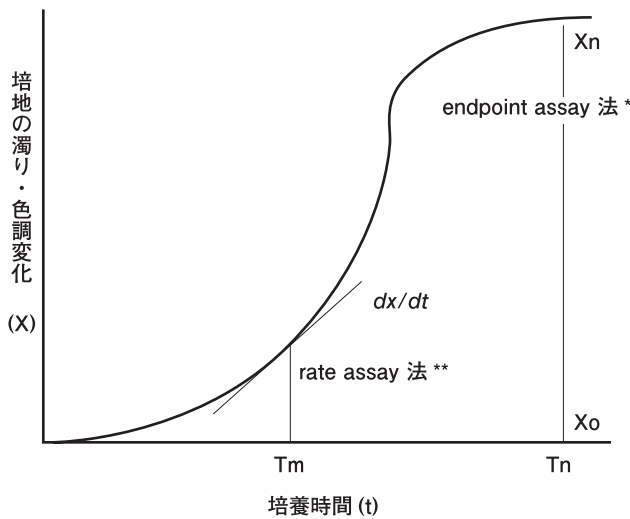
図1. 自動細菌検査装置 MS-2 System での薬剤感受性試験

上層の培養槽で前培養し、接種菌が対数増殖期に入り、一定の菌濁度に達した時点で下層キュベットに圧入される。下層のキュベットの底には抗菌薬を含ませたディスクが封入されており、圧入された broth 液体培地は一定濃度の抗菌薬を含む状態になる。それぞれのキュベットの吸光度を5分間隔で測定する。濁りの増加を示す薬剤(図中9, 10)が耐性(R)、増加の見られない薬剤を感性(S)に判定する。ウェル8のような発育曲線では中間(I)に判定される。培養開始後、4時間で結果が判定されている。

(2) Rate Assay 原理の導入

今では常識とまでなっている生化学分野での“rate assay”も、以前は酵素液（例えば血清検体）と基質液を長時間反応させて最終反応産物の「量」を測定する“endpoint assay”と激しく鏝を削る時代があったと聞いています。1960年代、LKB Reaction Rate Analyzerが我が国で汎用されるようになるまでには、細菌検査の自動化と同じく、様々な紆余曲折があったと聞いています。まさしく当時の細菌検査は、教科書にも記載される“一夜培養”という endpoint assay の世界にあったのです。比較的長時間の反応により反応生成物の量がプラトーに達した頃、その量を定量する endpoint assay と比べ、短時間の反応から初期反応スピード (dx/dt) を測定して目的とする物や活性を測定する技術は、原理的に迅速な結果判定を可能とします(図2)¹⁾。ただし、このような測定原理を

薬剤感受性試験や菌種同定検査に採用するとなると、生化学検査とは異なり、膨大な情報量を迅速に取り扱うことが必要になります。例えば1菌株を検査対象として薬剤感受性試験を行う場合、通常10～20種類程度の薬剤を同時に検査します。しかも、一定時間(例えば1時間)毎に各薬剤ウェルの濁りの程度をモニタリングしていきます。情報量としては1菌株当たり10～20薬剤×4～10時間の培養時間となり、さらに1つの検査装置で同時に30～200株を超える菌株を検査します。菌種同定検査においても、同時に検査できる菌株数×生化学反応の種類(30～40種類)×測定回数というマトリックス計算を行っているのです。このような膨大な情報量を処理するには、ヒトの手では到底不可能な作業であり、大容量の記憶装置と極めて迅速な演算処理を可能とするコンピュータ技術の進歩が不可欠でした。



- *) 変化の程度を $(X_n - X_0)$ として定量。
変化がプラトーに達するまで十分培養する — 一夜培養法
- ***) 変化率を dx/dt として定量。
培養の早期に結果判定できる

図2. 自動細菌検査装置での rate assay 原理の応用 (文献 1) より引用)

(3) 信頼性の高い数値同定

この分野では、現在でも表現型 (phenotype) 同定法として最も信頼されている API (シスメックス・ビオメリュー社) の普及が大きく貢献しました (API の信頼性に裏書きし、その普及に尽力された坂崎利一博士 [最近話題の *Enterobacter sakazakii* として献名された] の貢献です)。ほとんどの教科書では未だに各種の同定試験用の培地 (例えば triple sugar iron ; TSI, sulfide-indole-motility agar ; SIM などの培地) が記載され、臨床検査技師を志す学生を悩ませています。これらの同定試験用培地のみを用いて菌種同定を行っている検査施設は現在ではほとんど見られないはず。自動細菌検査装置による菌種同定以前に、まず数値同定 (numerical identification) の原理に基づく API を含む各種のミニチュア化された簡易同定キットが広く普及していききました。数値同定以前の従来法では、特定の反応での陽性/陰性を積み上げて最終同定に至る、いわば枝分かれ同定法であったのに対し、数値同定では試験したすべての反応を等価とみなすことに根本的な違いがありました (原理的に、ブドウ糖を分解・発

酵しない大腸菌も存在する)。数多くの既知菌株を試験して得られた個々の菌種あるいは分類単位 (taxon) での反応陽性率 (1~99%あるいは0.1~99.9%, 0%および100%を設定しない) からマトリックス化したデータベースを構築し、このデータベースから得られる特定の菌種の典型的な性状との近似度から未知菌株の菌種を同定していくのです (表1)²⁾。簡易同定キットでは、3つの反応を1桁の数値で表示する7進法 (++++;7, +++-;6, +-++;5, +--+;4, -+++;3, -+-;2, ---+;1, ----;0) で個々の反応の陽性/陰性を表し (この方法では30種類の反応を10桁の数値で表すことができる)、発生し得るすべての反応パターンを、予め数値コードと菌種名の組み合わせで提供していたのですが、自動細菌検査装置ではコンピュータが逐一これを計算、検索して、オンラインあるいはプリントアウト出力してくれるのです。自動細菌検査装置による菌種同定では、先に述べた rate assay 法とこの数値同定の組み合わせが大きな特徴であり、コンピュータ技術の進歩がこれを支え、迅速で信頼性の高い同定検査が保証されるようになったのです。

表1. 数値同定 (numerical identification) の原理 (文献2) より引用)

(1) データ・ベースの構成

(例: 5つの性状試験から、5つの菌種を同定するキット)

試験1~5について、菌種A~Eでの陽性率を示す

	試験1	試験2	試験3	試験4	試験5
菌種A	75%	50%	10%	0%	10%
菌種B	0	0	99	0	50
菌種C	99	0	0	0	50
菌種D	0	99	0	10	99
菌種E	50	0	99	99	0

(2) 被検菌 (未知の菌株) での試験結果

	試験1	試験2	試験3	試験4	試験5
被検菌	-	+	-	+	+

(3) 各反応結果の出現確率

	試験1	試験2	試験3	試験4	試験5
被検菌	-	+	-	+	+
菌種A	0.25	0.50	0.90	0.01	0.10
菌種B	0.99	0.01	0.01	0.01	0.50
菌種C	0.01	0.01	0.99	0.01	0.50
菌種D	0.99	0.99	0.99	0.10	0.99
菌種E	0.50	0.01	0.01	0.99	0.01

(陽性の場合にはデータ・ベースの数値そのまま、陰性の場合には100からデータ・ベースの数値を減算する。100は99に、0は1に計算する)

(4) 5つの反応結果 (プロファイル) がそろう出現確率

菌種A	$0.25 \times 0.50 \times 0.90 \times 0.01 \times 0.10 = 0.0001125$
菌種B	$0.99 \times 0.01 \times 0.01 \times 0.01 \times 0.50 = 0.0000004$
菌種C	$0.01 \times 0.01 \times 0.99 \times 0.01 \times 0.50 = 0.0000004$
菌種D	$0.99 \times 0.99 \times 0.99 \times 0.10 \times 0.99 = 0.0960596$
菌種E	$0.50 \times 0.01 \times 0.01 \times 0.99 \times 0.01 = 0.0000004$
	$\Sigma = 0.0961733$

(5) 菌種A~Eの相対同定確率

菌種A	$0.0001125 / 0.0961733 = 0.12 (\%)$
菌種B	$0.0000004 / 0.0961733 = 0.0004$
菌種C	$0.0000004 / 0.0961733 = 0.0004$
*菌種D	$0.0960596 / 0.0961733 = 99.88 *$
菌種E	$0.0000004 / 0.0961733 = 0.0004$
	$\Sigma = 100 \%$

この結果、菌種Dが相対同定確率99.9%でただ1つの同定菌種として選ばれる。

我が国への導入

私が東北大学医学部附属病院検査部細菌検査室に助手として赴任したのが昭和53年(1978年)。当時の私は、インフルエンザウイルスを研究テーマに、宮城県のカモやブタを追いかけて廻っていました。私が九州大学医学部で「細菌学」を学んだ頃はちょうど大学紛争の真只中であり、本来は丸々1年をかけて学ぶべき「細菌学」をストライキ解除後の数ヶ月で修了したので。そのような私がまさか細菌検査を担当するとは!! 本当は私が細菌に関してまったくの素人であること、そのことを百戦錬磨の臨床検査技師にどうしたら見抜かれないか、そればかり考えている自分がいました。そのような頃、二人の人物が私の前に忽然と現われたのです。結局、今にしてみれば、お二人共、神様が悩み苦しむ私に遣わした天使様だったのです。一人は、アボット社の小崎孝浩氏。大手コンピュータ・メーカーのNECを経験する、見るからに生え抜きのビジネス紳士。もう一人は、欧米先進国の優秀な医療機器の輸入を手掛け、閉鎖循環式全身麻酔装置(1951年)から始まる数々の医療機器の導入と普及に貢献してきたアムコ(AMCO)社の高倍正典氏。東京に本社があるにも拘わらず、生っ粋の関西人で、初対面で思わず「東北では、関西弁で商売できないよ」と辛い苦言を呈してしまいました。小崎氏はアボット社のMS-2 Systemの紹介を、高倍氏はMcDonnell Douglas社のAutoMicrobic System(AMS)の紹介を目的に、東北新幹線もまだない仙台の地を訪られたのです(未だに、なぜお二人がほぼ同じ頃に、東北辺境の地、仙台を細

菌検査自動化の出発点として共通の着眼をもたれたのか、不可解なままです)。MS-2 System(薬剤感受性試験)、AMS(菌種同定検査)、いずれの自動細菌検査装置にも私は甚だしく魅せられ、直ちに飛びつきました。理由は、とても簡単、しかも納得できて、「細菌学」に素人の私でも、さも専門家風に取り扱える。とは言っても、当時、細菌検査は培地と白金耳とガスバーナーさえあれば、どこでもできる、お金のいらぬ臨床検査だと看做されていた時代です。先立つもの、予算がない。欲しくても買えない。そこで、私は東北大学の事務部を相手に大芝居を打って交渉したのです。その方法が今で言う“試薬リース”です。当時はラジオイムノアッセイで、密かに、小規模にこの試薬リースが行われていたようですが、予算も現金もない細菌検査の領域では、専用機器・専用試薬であることから、購入する試薬代で機器本体の減価償却を図るしか即座にとれる方法がなかったのです。自動細菌検査装置が未だ世に認知されていない時期、この方法しか、その有用性と効果をアピールする術がなかったのです。東北大学にやっと、全国に先駆けてMS-2 SystemとAMSの2種類の自動細菌検査装置が導入され、日常検査で使用するようになりました(図3)。ただし、この後、試薬リースには個人的に大きな“罪”を感じていました。新しい分野で新規の展開を図るには必要なことかもしれないとは考えたのですが、その後の血中薬物測定装置(TDM)、各種の免疫測定装置にまで野放図に拡大していく試薬リースの実態を横目で見ると、(1)毎年、真面目に正規の手続きで予算要求を繰り返す、ひたすら予算化を待つ施設と、電話一本で安直に



図3. 東北大学医学部附属病院検査部細菌検査室で稼動したAutoMicrobic System(AMS)

納入してもらおう施設の不公平、(2) 真っ当な値段で機器本体を購入した、あるいは真っ当に試薬を購入し続けて機器本体の減価償却を終えた施設と、試薬リース中の施設との間で、試薬単価や顧客サービスに差がない不公正、さらに(3) 機器本体の価値は0(ゼロ)とみなす、あるいは機器本体に真面目にお金を支払って購入する施設は“世間知らず”といった偏見に満ちた認識が広がるなか、機器本体を設計、製作した専門家の誇りと価値を踏みにじる風潮がありました。そのような背景から、国立大学が法人化された後、琉球大学(私)は他の旧国立大学に先駆け、正規にリース料金を支払うファイナンス・リースへの道を拓いて“罪”を贖ったのです。

1970年代、東北大学から全国キャンペーンを進めるにあたっては、アボット社のMS-2、アムコ社+McDonnell Douglas社のAMSに、それぞれアメリカ合衆国から大きな支援が続けられました。アボット社からはMr. George Fukui(現在もテキサス州ダラスに健在で、かつては米軍に所属し、ペスト菌も取り扱った経験をもつ日系二世)、McDonnell Douglas社からはMr. Fortune(幸運)が来られました。ベトナムの空を飛び、Tomahawk ミサイルを設計した方ですが、仙台の居酒屋では“雀の丸焼き”やら、“蛙のもも肉”など、得体の知れぬものを共に啄んだものでした。お二人はしばしば来日され、その度に仙台の地で楽しい意見交換をしたものです。彼らにとって、当時の日本は正しく未知の世界であり、スライドの映写機はあるのだろうか、スクリーンはあるのだろうか、ちょうどその頃公開された映画の一シーン(アメリカ企業の一人の社員が名古屋近辺(豊田?)にあるという日本企業に新製品の説明に行く。日本という国がどんな国かも分からず、スライド映写機やスクリーンを背負って、とぼとぼ田圃のあぜ道を歩く姿が印象的でした)を思い浮かべて失笑の日々だったようです。

二人の支援者と小崎孝浩氏、高倍正典氏、そして私、当時最も難儀したのが、日本の検査室、特に細菌検査室の頑なな保守性でした。そんな機械で細菌検査ができると思っているの!? そんな機械が私の“匠の技”にとって代わられると考えているの!? 購入予算については試薬リースでなんとかできるようになったのですが、この頑なさには唯々説得しかありませんでした。

そんな悪戦苦闘のなか、ひとつの明かりが見えてきたのは、東京、大阪という大都市圏ではその芽も見えない暗黒の時期、東北や九州という地方ほど、新しいものに対する抵抗感が薄く、逆に強い興味を示すという現象でした。生化学検査の世界でも、rate assay という今や常識となっている測定原理は、東北の片田舎から始まり、最後に東京という経緯だったと聞いています。細菌検査の自動化も、まさしくそのような推移を示し、片田舎から、じわじわと東京に向け普及が拡大していったのです。東京で常識となれば、私の興味も、役割もそれで終わりとなります。

この間、いくつかの論文を書いてきました。今から読み返すと紹介するには余りにも陳腐なものばかりですが、ひとつのエピソードと三つの論文を紹介しておきます。そのエピソードは、私がいかに細菌学に素人であったかの実証であり、三つの論文は、今現在、自動細菌検査装置を用いている方々に基本的な知識として欠落している部分があると感じているため、再確認して欲しい意図から書きました。

(エピソード)

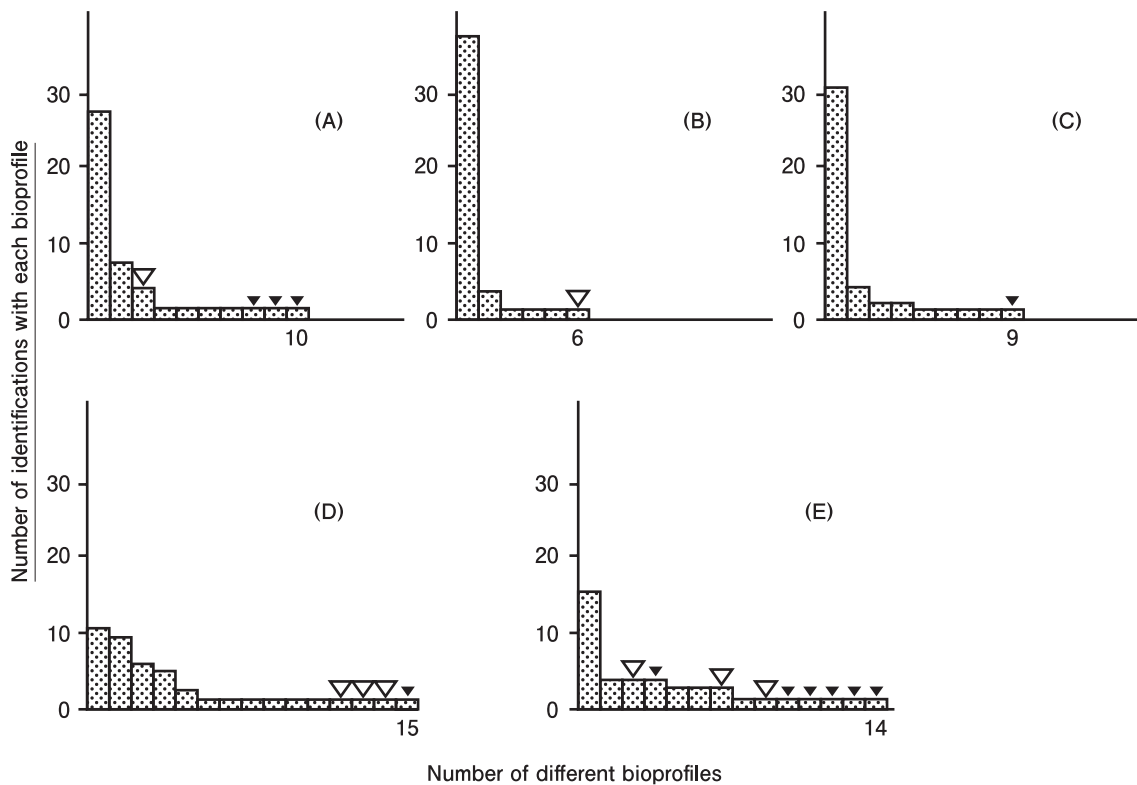
・1990年のAmerican Society for Microbiology(ASM)のGeneral Meetingで、留学していたアイオワ大学で行ったVitek YBCカードでの最新データ・ベースを用いた酵母真菌同定の評価成績がスライド発表(oral presentation)に採択されたのです。その評価にあたって私の知識では、サブロー寒天培地に現れる菌集落は紛れもなく真菌だと信じていました。とにかくサブロー寒天培地に生えた菌集落から菌浮遊液を作成し、YBCカードに充填して装置に読み取らせていたのです。ところが、報告される菌種名が奇妙なものばかりだったのです。試しにグラム陰性菌用カードで試験してみると、これが立派な*Pseudomonas aeruginosa*(緑膿菌)。実は、ほとんどの保存菌株が純培養ではなかったということです。そこでサブロー寒天培地上の菌集落の肉眼的観察において、細菌と真菌を区別できない私が採ったのは以下の方法でした。菌浮遊液の生鮮標本の400倍拡大の顕微鏡で菌体が見えるのが真菌、見えないのが細菌でした。それから後の評価は順調のように思えました。ところがある日、はっと気付きました。

ポスター発表ではなく、スライド発表で *Candida albicans* はどう発音する？ *Saccharomyces cerevisiae* はどう発音する？ 発表の直前まで、API の toll-free の電話番号にアクセスし、コード番号を入力し、電話の向こうから聞こえてくる英語風ラテン語の菌名の発音を聞き憶えたものです（菌名の発音でも、必ずアクセントをはっきりさせることがコツです）。

（論文1）

- ・ Reproducibility of the MS-2 System for Identification of Members of the Family *Enterobacteriaceae*: a collaborative Study with Blindly Assigned Reference Strains. J Clin Microbiol. 20 : 1135-1139, 1984.³⁾

MS-2 System を使用しての腸内細菌科の菌種の同定で、複数施設へ標準菌株を配布し、同定結果の再現性を評価した論文です。この論文で明らかになったことは、自動細菌検査装置は出力される同定菌種名（あるいは taxon）での再現性と互換性を保証するものであり、個々の生化学反応の陽性・陰性の再現性を必ずしも保証するものではない（同定に際して得られるコード番号、bioprofile を phenotyping に用いてはなりません）（図4）ということです。



The distribution of different biochemical patterns (bio-profile) for the identification of five reference *Enterobacteriaceae*: (A) *P. vulgaris*, (B) *K. pneumoniae*, (C) *E. coli*, (D) *S. marcescens* and (E) *Enterobacter cloacae*. The histogram indicates the number of identifications with the particular bioprofile for each bacterium. Open triangles indicate correct identifications with less than 90% likelihood, and closed triangles represent misidentifications.

図4. MS-2 System で腸内細菌科の5菌株を複数施設で反復同定し、同定に際して得られた生化学反応の性状 (bioprofile) の出現頻度 (ヒストグラム) 各菌株、計44回の同定試験で6～15の異なる bioprofile が得られた (文献3) より引用

(論文 2)

・自動細菌検査装置 AMS - EBC + カードによる腸内細菌属同定の検討. 臨床と細菌. 10 : 327-336, 1983.⁴⁾

自動細菌検査装置 AMS での腸内細菌科菌種の同定精度を評価した初期の論文です。異なる複数菌

種の混在で, [A + B = C] の現象, 試験した 2 菌種とはまったく別の物, 同定反応系には存在しない “C” という菌種に同定される場合があることが明らかにされました(表 2)。この現象は 25 年後の 2008 年に追試され, 再確認されました。

表 2. 2 種類の異なる菌種の菌株を混和して作成された菌浮遊液を AutoMicrobic System (AMS) - EBC+ カードで菌種同定した際に得られた同定菌種名と % 相対同定確率。ボルド字体が [A + B = C] となった成績を示す。(文献 4) より引用)

混和した菌種と混和比率		同定菌種名 (%相対同定確率)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	
100	0	<i>Escherichia coli</i> (99%)
100	0.1	<i>Escherichia coli</i> (99%)
99	1	<i>Escherichia coli</i> (99%)
90	10	<i>Serratia liquefaciens</i> (54%)
50	50	<i>Citrobacter freundii</i> (79%)
10	90	<i>Citrobacter freundii</i> (79%)
1	99	<i>Citrobacter freundii</i> (99%)
0.1	100	<i>Citrobacter freundii</i> (99%)
0	100	<i>Citrobacter freundii</i> (99%)

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
100	0	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (99%)
100	0.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (99%)
99	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (99%)
90	10	<i>Enterobacter aerogenes</i> (88%)
50	50	<i>Enterobacter aerogenes</i> (88%)
10	90	<i>Enterobacter aerogenes</i> (57%)
1	99	<i>Enterobacter cloacae</i> (97%)
0.1	100	<i>Enterobacter cloacae</i> (87%)
0	100	<i>Proteus mirabilis</i> (99%)

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	
100	0	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (99%)
100	0.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (99%)
99	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (99%)
90	10	<i>Enterobacter aerogenes</i> (88%)
50	50	<i>Enterobacter aerogenes</i> (88%)
10	90	<i>Enterobacter cloacae</i> (93%)
1	99	<i>Enterobacter cloacae</i> (99%)
0.1	100	<i>Enterobacter cloacae</i> (99%)
0	100	<i>Enterobacter cloacae</i> (99%)

(論文3)

・複数菌種、複数菌株の混在が自動細菌検査装置での菌種同定および薬剤感受性試験の結果に与える影響. 臨床病理 .56 : 283-289, 2008.⁵⁾

複数種類の自動細菌検査装置で、[A + B = C]の現象が観察され、被検菌株の純培養の重要性が再確認されました。その意味では、かつては自動細菌検査装置で菌種同定する際、最低限 TSI 培地に菌浮遊液を接種、培養して、接種した菌液が純培養

であることを確認していました。緑膿菌を酵母真菌用同定カードで試験しても、なんらかの酵母の菌種名が報告されるものです。自動細菌検査装置での誤同定を一方的に問題にする前に、pre-analytical QC (検査前精度管理)を正しく認識することの必要性が強く感じられるのです。さらにこの論文では、自動細菌検査装置での薬剤感受性試験は耐性菌を見つけだすことに主眼を置いた、いわば“耐性試験”の位置付けにあることも確認されました(表3)。

表3. 各菌種について感性菌の菌浮遊液に耐性菌を添加して薬剤感受性試験を実施し、どの程度の耐性菌の混和比率 (%) で菌浮遊液全体を耐性 (R) に判定するか試験した。(文献5)より引用)

Antimicrobial susceptibility test results by the automated susceptibility systems when a small amount of resistant cells were spiked into the susceptible cell suspensions

Bacterial species and antimicrobial resistance	WalkAway-40	VITEK 2 Compact	RAISUS
<i>Escherichia coli</i> Non-ESBL plus ESBL	ESBL (1%) ¹⁾	ESBL (1%)	ESBL (1%)
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA plus MRSA	MRSA (1%)	MRSA (8%)	MRSA (70%)
<i>Enterococcus Faecalis</i> Non-VRE plus VanA-type VRE	VRE (1%)	VanA like (30%) VanB like (3%)	VRE (2%)
Non-VRE plus VanB-type VRE	VRE (1%)	VanB like (3%)	VIE (1%)

¹⁾In parenthesis, minimum % proportion of resistant cells to detect the respective antimicrobial resistance.
Abbreviations : ESBL, extended-spectrum β -lactamase-producing; MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; VRE, vancomycin-resistant enterococci; VIE, vancomycin-intermediate enterococci.

その後の展開

自動細菌検査装置での菌種同定と薬剤感受性試験が全国、特に首都圏で常識となってからは、私は次なる領域を求めて微生物の抗原あるいは特異抗体を測定する免疫測定装置、Vitek Immuno Diagnostic Assay System (以下、VIDAS, シスメックス・バイオメリュー社: 図5) へ軸足を移していったのです。幾多の評価項目の中で、最も苦労したのが *Clostridium difficile* toxin A です。当時は菌体抗原を検出する C.D. チェック・D-1 (シオノギ製薬社) が検査市場を席卷し、toxin A は見向きもされませんでした。HEp-2 細胞を自ら培養して細胞毒性試験を参照結果として評価したのですが⁶⁾、それでも *C. difficile* に関しては、“toxin A - toxin B +” 株の出現によって再認識され、三人の紳士の尽力で、我が国でも 21 世紀となった 2007 年、TOX A/B QUIK CHEK 「NISSUI」(日水製薬社) として比較的早く結実したことに喜んでます⁷⁾。

VIDAS に続く次なる軸足として選んだのが、血液培養と抗酸菌培養の世界でした。20 年程前に米国アイオワ大学に留学していた当時、日本からの一団が冬のメリーランドを訪れ、¹⁴C を用いる抗酸菌培養装置 Bactec 460 TB System (Becton Dickinson 社) の研修に私

も一緒に参加したことを思い出します。その後、相次いで全自動の血液培養装置が開発され、血液培養こそ感染症診断の gold standard であるというキャンペーンを開始しました。実は今盛んに使われている “gold standard”, “TAT (turnaround time)” といった言葉を最初に輸入したのは不肖、私なのです。ただ、全自動血液培養装置については、今にして思えば、検査原理はちょっと化学を齧ったヒトなら思い付きそうなものなのに、なぜ国産の血液培養装置を考案、開発しようとしなかったのか、悔いが残ります(細菌がグルコースを分解すれば、炭酸ガスと水が作られ、培地の pH が下がります。地学と物理で九州大学医学部を受験した私でさえ理解できます)(図6)。現在は bioMérieux 社が揃える自動検査機器構成の一部を占める BacT/ALERT を素早く購入し、血液培養での複数セット採血の普及に努めたのです⁸⁾。少し遅れて non-radiometric 法の抗酸菌培養装置 (MB/BacT) が開発され、Middlebrook 7H9 broth 液体培地を用いた抗酸菌分離の手順を確立し、提案したのです⁹⁾。この抗酸菌培養装置には大変苦労させられました。喀痰検体を使った培養で、混在する雑菌の発育による “偽陽性” が頻発し、海外の文献にある *N*-acetyl-L-cysteine-NaOH (NALC-NaOH) 法を正確に



図5. bioMérieux-Vitek が開発した Vitek Immuno Diagnostic Assay System (VIDAS)

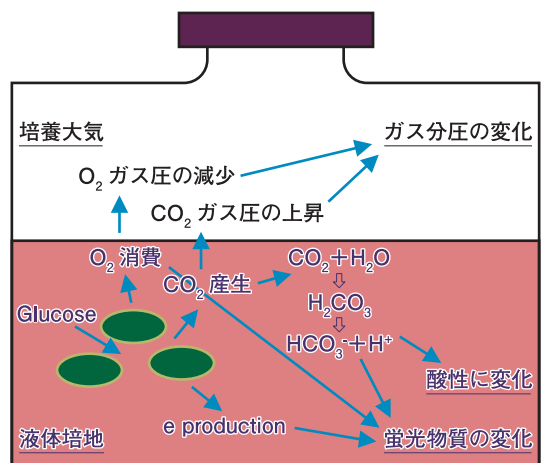


図6. 全自動血液培養装置での菌発育検出の原理

- (1) 培養装置と検出装置を一体化した on-line 培養
- (2) 24 時間、365 日の連続モニタリング
- (3) 菌検出にあたって、培地を採取しない (non-invasive)
 - …ガラス越しに菌検出

追試しても頻発したのです。今から考えれば、radiometric Bactec と non-radiometric 法で使われている Middlebrook 7H9 broth の違いを「細菌学」の素人の私に、誰も説明してくれなかったのです。Radiometric 法による Bactec 460 (Becton Dickinson 社) で使う broth は、栄養素を極端に乏しくしていて、一般細菌が生えてくるような培地組成ではなかったのです(その結果として、喀痰検体に混在する雑菌の混入発育は問題になりませんでした)。東北大学から熊本大学に移った頃に発表した論文¹⁰⁾で、Middlebrook 培地は“かび”の培養に極めて優れた性能を持つことを経験したことを忘れていたのです。加えて、日本の結核患者は多くが高齢者で、緑膿菌や“かび”による慢性の呼吸器感染症を基礎疾患として持っていました。欧米の教科書にある標準的な NALC-NaOH 法のみで上手くいくはずがありません。結局、semi-alkaline protease を併用する喀痰前処理操作を確立するに至るまでに2年を要しました。

全自動の血液培養装置と抗酸菌培養装置で強調したいのは、血液培養を全自動培養装置で検査する最も優

位な点は迅速性(TATの短縮)であり、3日間の培養でほとんどすべての菌血症を診断できることです(培養陽性率は向上しません)。他方、抗酸菌培養を全自動培養装置で検査する優位点は、もちろん迅速性もあるのですが、むしろ Middlebrook 7H9 broth を採用したことによる陽性率(yield)の向上、特に非結核性抗酸菌(nontuberculous mycobacteria: NTM)の分離率が飛躍的に向上することです(表4)。換言すれば、過去の用手法(肉眼的な濁りの観察と盲分離培養)による血液培養では、培養「陽性」を報告しても、すでに時遅く、その臨床的有効性はほとんどなかったのです。抗酸菌培養では、喀痰を高い濃度の NaOH で処理して卵小川培地(強い pH 緩衝能をもつ)に流し込む抗酸菌培養では、無視できない頻度で“偽陰性”を報告していたことになるのです。その意味で今、菌種同定と薬剤感受性試験の機能をもつ自動細菌検査装置に加え、全自動の血液培養装置と抗酸菌培養装置を標準的な機器設備として数多くの細菌検査室が具備するようになったことは、私としてはとても嬉しいことなのです。

表4. 各種の抗酸菌培養法での結核菌群 (*M. tuberculosis* complex) および非結核性抗酸菌 (nontuberculous mycobacteria) の分離頻度 (文献9)より引用)

Culture media	<i>M. tuberculosis</i> complex (n = 267)	Nontuberculous mycobacteria (n = 201)	Total (n = 468)
MB/BacT	256 (95.9%)	195 (97.0%)	451 (96.4%)
Egg-based media			
3% Ogawa	163 (61.0%)	120 (59.7%)	283 (60.5%)
Ogawa K	181 (67.8%)	133 (66.2%)	314 (67.1%)
Vite	198 (74.2%)	155 (77.1%)	353 (75.4%)
Middlebrook 7H10	242 (90.6%)	182 (90.5%)	424 (90.6%)

Of 464 positive samples, four were positive for two different mycobacteria; three were *M. tuberculosis* complex plus *M. intracellulare* and one was *M. intracellulare* plus *M. avium*.

χ^2 test for differences in recovery of *M. tuberculosis* complex and in total number of isolate: MB/BacT versus 3% Ogawa, $p < 0.0001$; MB/BacT versus Ogawa K, $p < 0.0001$; MB/BacT versus Vite, $p < 0.005$; MB/BacT versus Middlebrook 7H10, no significant difference.

さらなる展開に向けて

現役残余期間 4 年余りとなった今、さらなる展開に向けて模索しています。2 年前のヨーロッパでの会議で、次なる展開として期待したい部分が bioMérieux 社より提案されました。細菌微生物のゲノム内に埋め込まれた ssDNA の反復配列を rep-PCR 法で菌株タイピングするものです。DiversiLab System と命名された装置は、高い再現性をもって迅速 (24 時間以内) に菌株の相同性を解析する能力を提供しています (図 7)。これまで菌株の相同性の解析には pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) が gold standard として用いられてきましたが、

解析に 2~3 日を必要とし、どうしてもある程度の菌株数を収集してから泳動するという即時性を欠いています。その点、DiversiLab では、結果をファイリングして保存することができ、その高い再現性から、異なる日や場所で得られた成績を任意に組み合わせて解析することも可能です (生きた菌株を持たない施設でも、既にファイリングされている国際的な菌株と比較できます)。さて、この種の検査装置が、検鏡、培養、同定、薬剤感受性試験という細菌検査の日常的な基本業務に、さらに “typing” という機能を実際に付加して常識化できるのか、現役最後の仕事としてひと踏ん張りしてみようかと考えているところです。

(a)



(b)

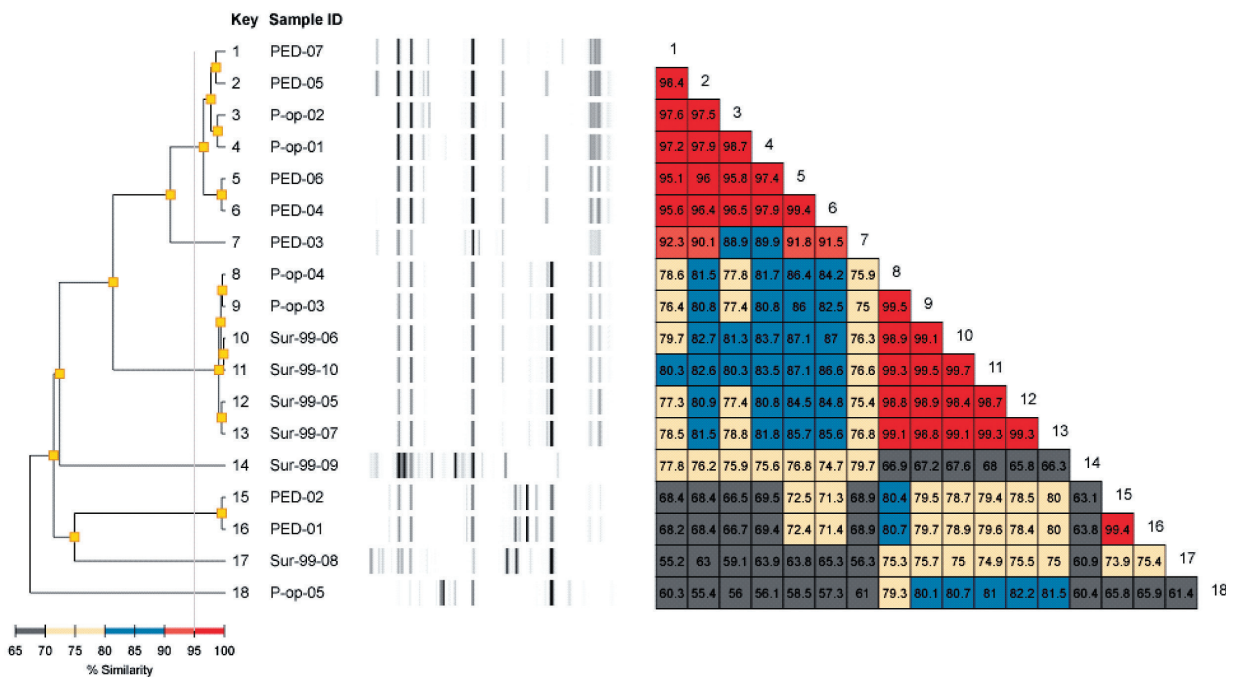


図 7. 菌株の相同性を rep-PCR 法から解析する DiversiLab System 機器装置の外観 (a) と解析結果の一例 (b)

おわりに

今現在、沖縄の地に住む私ですが、沖縄に移住する直前、アメリカに本社を置く、ある有名な微生物関係の企業から Medical Officer にならないかという申し出がありました。密かにサンフランシスコのホテルで副社長のインタビュー（面接試験）まで受けたものです。琉球大学の臨床検査医学の教授の席を選ぶか、アメリカ合衆国をベースとするビジネスの世界（太平洋線のファースト・クラスの席）に座るかという選択です。悩みました。しかし今は、窓越しに遠く東シナ海を望みながら、沖縄を選んだことに非常に満足しています。Harvest するよりも Seed することの喜びを噛み締めながら。

おわりのおわりに一言。写真（図8）は、世界各国から集まった VITEK ユーザーの会に参加した日本からの一団です。今は十分に年を重ねた方々が、一団となって「荒城の月」を斉唱した場面です。向かって左、じっと聞き惚れている方が当時の VITEK 社長。細菌検査自動化の初期、日本は臆することなく世界の先頭グループを走っていたのです。今の若い人は何している！！



図8. 約30年前、Vitek ユーザー会に参加するために渡米した日本人関係者の一団は、世界各国からの参加者を前に、臆することなく、堂々と「荒城の月」を斉唱し、大喝采を浴びた

参考文献

- 1) 山根誠久. 同定・薬剤感受性試験における自動化機器の有用性と限界. Med Technol. 1995; 23 (3): 189-195.
- 2) 山根誠久. 細菌自動器械の原理と使用法. 検査と技術. 1994; 22 (9): 695-700.
- 3) Yamane N et al. Reproducibility of the MS-2 System for Identification of Members of the Family *Enterobacteriaceae*: a Collaborative Study with Blindly Assigned Reference Strains. J Clin Microbio. 1984; 20 (6): 1135-1139.
- 4) 山根誠久, 加藤仁美. 自動細菌検査装置 AMS - EBC + カードによる腸内細菌属同定の検討. 臨床と細菌. 1983; 10 (3): 327-336.
- 5) 比嘉美也子 他. 複数菌種, 複数菌株の混在が自動細菌検査装置での菌種同定および薬剤感受性試験の結果に与える影響. 臨床病理. 2008; 56 (4): 283-289.
- 6) 山根誠久 他. Vitek Immuno Diagnostic Assay Sytem (VIDAS) での糞便中 *Clostridium difficile* Toxin A 検出. 臨床と微生物. 1993; 20 (6): 1045-1049.
- 7) 仲宗根勇, 潮平知佳, 山根誠久. *Clostridium difficile* Toxin A および Toxin B 検出用試薬, TOX A / B QUICK CHEK 「ニッスイ」の一次性能評価. JARMAM. 2007; 18 (2): 109-116.
- 8) 宮川静代, 山根誠久, 戸坂雅一. 全自動血液培養システム, BacT / Alert での成績解析—1年間の使用経験から—. 日本臨床検査自動化学会会誌. 1994; 19 (2): 130-136.
- 9) 斉藤 宏, 山根誠久. Semi-Alkaline Protease 処理を併用した *N*-Acetyl-L-Cysteine-NaOH (NALC-NaOH) 喀痰前処理法での全自動抗酸菌培養システム, MB/BacT の評価. JARMAM. 1999; 10 (2): 103-110.
- 10) 小本優美子 他. Middlebrook 7H-10 寒天培地による抗酸菌迅速培養法の検討. 臨床病理. 1986; 34 (7): 855-860.

Automation in Clinical Microbiology - History of 30 years Passed since Introduction of AutoMicrobic System (ASM) in Japan -

Nobuhisa YAMANE

Department of Laboratory Medicine, Graduate School and Faculty of Medicine, University of the Ryukyus,
207 Uehara, Nishihara, Nakagami-Okinawa 903-0215

Key Words

Automated Microbiology Systems, AutoMicrobic System (AMS), Species-identification,
Antimicrobial Susceptibility Test
