

感染症検査の最前線

—迅速な薬剤感受性検査の最新動向を含めて—

Emerging Technologies for the Clinical Microbiology Laboratory: Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing Update

東京医科大学 微生物学分野 教授 **大楠 清文**
Kiyofumi Ohkusu, PhD. (Professor)
Department of Microbiology, Tokyo Medical University



キーワード

薬剤感受性検査, 遺伝子検査, 質量分析法

01 | はじめに

近年の飛躍的な技術の進歩によって感染症検査が大きな変貌を遂げようとしている。すなわち、感染症検査における「三大技術革新」ともいえる、自動同定・感受性機器、遺伝子解析技術、そして質量分析法が日常検査に導入されつつある¹⁾。さらには、光散乱法や蛍光分光法を用いた集落や検体から直接の菌種同定や薬剤感受性試験も実用化の兆しが見える。

適切な感染症診療を行うための第一歩は、感染症の原因微生物を迅速に特定することであろう。そのために遺伝子解析技術や質量分析法などの活用が今後、重要なカギを握ると考えている。つまり、感染症診療におけるこれら迅速診断技術の適応には、①臨床検体から直接、病原体に特徴的な遺伝子領域を増幅・検出して迅速に感染症の診断を行う、②分離・培養された菌株を迅速かつ正確に同定あるいは毒素や薬剤耐性遺伝子の検出、③感染源の特定や感染拡大を防ぐための分子疫学的な解析、の3つに大別される。

本稿では、迅速な薬剤感受性検査の新たな知見を含めて、全自動遺伝子検査による臨床検体から直接の病原体検出、遺伝子解析技術や質量分析法による菌株同定、シーケンス解析による分子疫学的なタイピングに関する最新の動向を概説したい。

02 | 全自動遺伝子検査システム

遺伝子検査の基本的なステップは、① 検体採取と搬送（保存）、② 核酸（DNA/RNA）の抽出、③ 増幅反応、④ 増幅産物の検出、⑤ 結果の判定と報告、の5つからなる。これまでの検査は、核酸の抽出と増幅・検出が別々の実施であったため、時間と労力の面から病院検査室での遺伝子検査の導入のボトルネックになっていた。近年、核酸抽出から増幅反応、検出までをすべて自動で行うシステムが開発されており、遺伝子検査の利用が現実味を帯びてきた。すなわち、核酸の抽出から増幅と検出を全自動で2～3時間以内に完了する、いわゆる「次世代型」の遺

伝子検査システムとして（アルファベット順に）、ARIS (Luminex社)、BD マックス™全自走核酸抽出検査システム（日本ベクトン・ディッキンソン社）eSensor (GenMark Diagnostics社)、Verigene (Nanosphere社) などがある。これらのシステムは病態別に想定される病原体を網羅的に検索できるのが特長である。以下に、病原体の検出のみならず、薬剤耐性遺伝子の検索も同時に実施できる3社のシステムを紹介する。

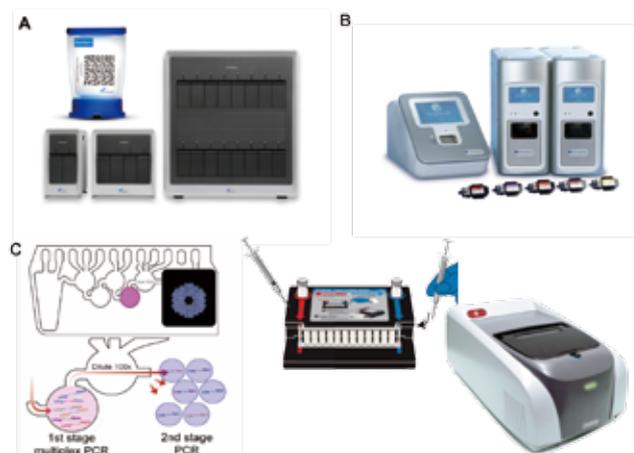


図1.次世代型の遺伝子検査システム

GenXpert™システム (米国Cepheid社)

本システム(図1-A)は1つのカートリッジで測定できる項目数は少ないが、結核菌の検出とリファンピシン耐性か否かを同時に判定できる。また、医療関連感染の対策上も重要なMRSA、ESBLなどの薬剤耐性菌の同定と耐性遺伝子の検出が同時に実施できる。そして、*Clostridium difficile*とその毒素の同時検出も可能である。現在、カルバペネマーゼ産生遺伝子(KPC、NDM、VIM、OXA-48、IMP-1)の検出キット(Xpert Carba-R)は既に研究用試薬として販売されている。

Verigeneシステム-自動多項目同時遺伝子関連検査システム (Nanosphere社)

標識に金ナノ微粒子を用いてシグナル増幅した後、各プロ

ブのシグナルを光分散によって検出する。光分散による検出は、これまでの蛍光法より1,000倍以上感度が高い。金ナノ微粒子の表面に、DNAのかわりに抗体を結合させて、生体の微量なタンパクを直接検出するといった多様な測定系が構築できるのも特長の1つである。米国では心筋梗塞の早期診断に、超高感度なトロポニンIの定量検査(検出限界:0.2 pg/ml)の開発が進められている。2015年12月現在、わが国では血液培養が陽性となった後の培養液から、グラム陽性菌と薬剤耐性遺伝子の15項目を同時に検出・同定できる試薬(約3時間)とグラム陰性菌と薬剤耐性遺伝子の15項目を検出する試薬(約2.5時間)の薬事申請が進められている。(表1&図1-B:国内の販売元は日立ハイテクノロジーズ社)。

表1 Verigene®BC-GP/GNテストカートリッジで検出可能な病原体と耐性遺伝子

| グラム陽性菌(GP) 12項目 | グラム陽性菌(GN) 9項目 |
|---|----------------------------|
| <i>Staphylococcus</i> spp., | <i>E. coli</i> , |
| <i>S. aureus</i> , | <i>K. pneumoniae</i> , |
| <i>S. epidermidis</i> , | <i>K. oxytoca</i> , |
| <i>S. lugdunensis</i> , | <i>P. aeruginosa</i> , |
| <i>Streptococcus</i> spp., | <i>S. marcescens</i> , |
| <i>S. pneumoniae</i> , | <i>Acinetobacter</i> spp., |
| <i>S. pyogenes</i> , | <i>Proteus</i> spp., |
| <i>S. agalactiae</i> | <i>Citrobacter</i> spp., |
| <i>S. anginosus</i> group | <i>Enterobacter</i> spp. |
| <i>Enterococcus faecalis</i> , | |
| <i>Enterococcus faecium</i> , | |
| <i>Listeria</i> spp. | |
| | 薬剤耐性遺伝子 6項目 |
| 薬剤耐性遺伝子 3項目 | KPC, NDM, CTX-M, |
| <i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> | VIM, IMP, OXA |

FilmArray®システム(米国Bio Fire社)

フィルム製のパウチに凍結乾燥した試薬が装填されており、検体の破碎、核酸の精製、multiplex PCRによるDNAの増幅、そして各病原体のDNAがアレイ上で自動的に検出される(図1-C)。欧米では呼吸器病原体パネル(20項目)や血液培養陽性用パネル(24病原体の同定と薬剤耐性遺伝子検出;*mecA*, *vanA/B*, KPC)などの網羅的検出試薬²⁾が既に販売されている。検体と試薬溶解用のシリンジを挿入するだけのわずか1、2分の操作(hands-on time)のみで、かつ1時間で測定が完了することから、point-of-care testing (POCT)として外来診療やベッドサイドでの実施が期待される。なお、現在(2015年12月)、わが国でのFilmArray®システムの販売は未定である。

03 | POCT型の全自動遺伝子検査

遺伝子検査の最新トレンドは、POCT (Point of Care Testing)として導入可能な機器・試薬の登場である(図2)。単項目(インフルエンザウイルス、GASなど)であるものの、Hands-on-Timeが短く、検体を投入後は全自動で測定結果が得られること(Sample to Result)、そのTurn Around Time (TAT)が8~15分と極めて短いことなどが特長である。POCTは開業医院、病院内の集中治療室など診療の現場で行う検査の総称であったが、近年ではその概念がやや変化しており、欧米ではDecentralized Testing(分散化された検査)として定



図2 POCT型の遺伝子検査システム

A: GeneXpert Omni (Cepheid社)

B: Cobas Liat (Roche社)

C: Alere I (Alere社)

着しつつある。すなわち、検体を病院の中央検査室や検査センターに搬送して集中的に検査する(Centralized Testing in Central Lab.)のではなく、患者がいる各々の診療の現場で検査を行うことを意味している。現在、感染症検査のPOCTの主役は免疫クロマトグラフィー法であるが、今後、POCT型遺伝子検査の機器・試薬の低価格化と検査項目のラインナップの充実が共に実現すれば、病院検査室はもちろんのこと診療所、開業医などでも感染症の診断に遺伝子検査が活用されるようになるであろう。

04 | 質量分析法による微生物の同定と費用対効果

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計(MALDI-TOF MS)による微生物の新しい同定法¹⁾が注目されている。病原体に由来したタンパク質成分の分子量情報(マスマスペクトル)のパターンから、わずか10分足らずで分離菌株の同定ができるようになったのである。まさしく、臨床微生物検査のワークフローを一変させる技術革新そのものと言える。わが国でも2011年から臨床微生物検査の現場での使用が開始され、現在(2015年12月)約100施設で導入されており、今後急速に普及していくであろう。ここでは質量分析法による菌種同定の原理と活用法について紹介したい。

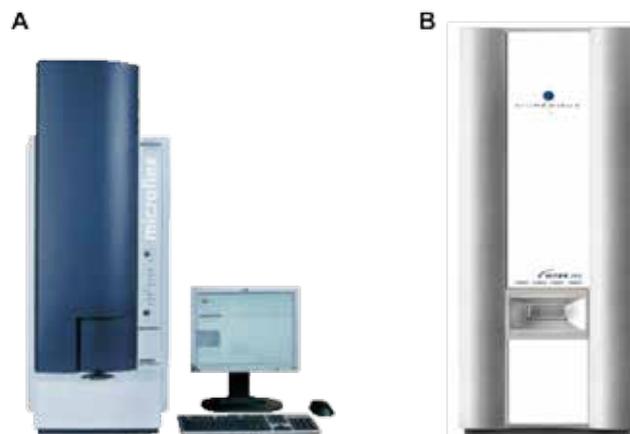


図3 MALDI-TOF MSを用いた微生物同定システム

A: MALDI Biotyper(ブルカー・ダルトニクス社)

B: VITEK MS(シスメックス・ビオメリュー社)

MALDI-TOF MSによる微生物同定の基本原理

さまざまな菌種のさまざまな菌株のマススペクトルをデータベース (DB) に登録しておき、コンピューターの力を借りて未知の菌株のマススペクトルがどの菌種のパターンと一致しているかをDBの中から瞬時に探す。つまり、MALDI-TOF MSを用いた菌種の同定は、「データベースに登録されている菌種のマススペクトルとのパターンマッチング」である。

MALDI-TOF MSシステムによる微生物同定の実際

質量分析法による細菌同定の装置・システムとして2種類が販売されている。1つはブルカー・ダルトニクス社 (ドイツ) の「MALDI Biotyper」である (図3-A)。シスメックス・ビオメリュー社から「VITEK MS」が販売されている (図3-B)。質量分析法による菌株の同定は3つのステップからなる。①菌体とマトリックス試薬を混ぜて乾燥させる、②MALDI-TOF MSでマススペクトルを取得する、③そのマススペクトルをデータベースに照合してパターンマッチングを行う。

MALDI-TOF MSシステムの適用

MALDI-TOF MSは一般細菌だけでなく、嫌気性菌、抗酸菌、酵母様真菌、糸状菌の同定も実施できることが大きな利点

である。すなわち、1つのシステムで臨床的に重要なあらゆる菌種を取り扱うことができる。

MALDI-TOF MSの活用として最も臨床的に有用性が高いのが、血液培養陽性時の培養液から直接の菌種同定である。既に多くの施設で検討されており、約70~80%の同定精度との報告³⁾が多い。

次にはおそらく臨床検体から直接に菌種の同定ができないかとの期待が大きく膨らむであろう。しかし、現在のシステムでは10⁵個くらいの菌量を必要とするため、敗血症の診断に血液から直接に菌種の同定は行うことは困難である。一方、感染時の菌量が多い尿や髄液では検体直接の同定が可能との報告³⁾がある。

薬剤耐性菌の鑑別については、β-ラクタム薬⁴⁾やカルバペネム系薬⁵⁾での検討結果が報告されている。分離菌株とβ-ラクタム薬あるいはカルバペネム系薬を含む培養液で2~4時間培養後にこれらの薬剤が加水分解されるとマススペクトルの波形が変化することを利用して (図4)、β-ラクタマーゼ産生あるいはカルバペネマーゼ産生⁶⁾の菌株であるかを判定できる (図5)。同じく、NDM-1、VIM-1、OXA-48、OXA-162型カルバペネマーゼの検出をMALDI-TOF MSのスペクトルパターンで検討した論文⁷⁾も発表されている。今後も同様な検討結果が次々と報告されるであろう。

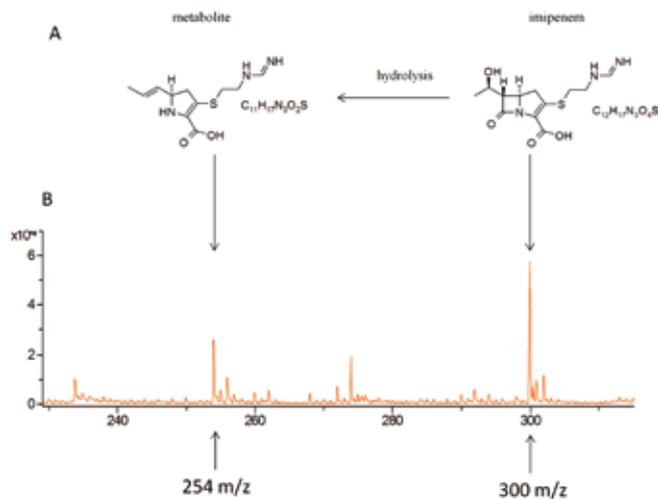


図4 imipenemの分解によるマススペクトルの変化⁶⁾

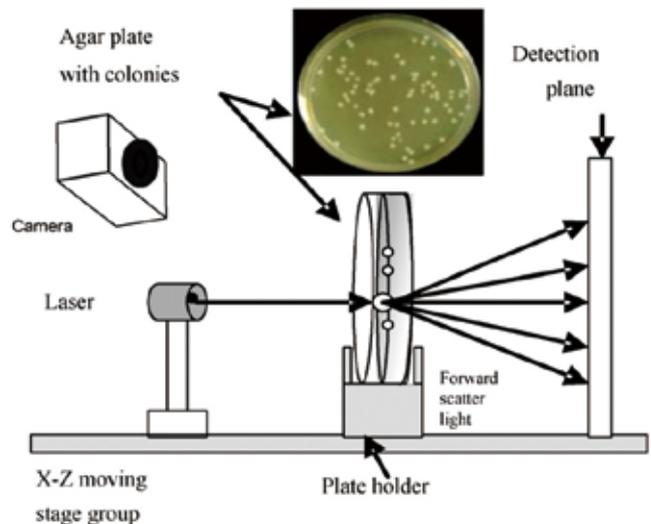


図6 BARDOT の原理¹⁰⁾

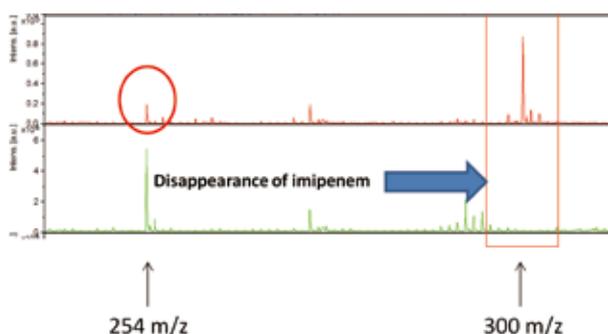


図5 imipenem感受性もしくは耐性の*A. baumannii*のマススペクトル⁶⁾
(上段は感受性株、下段は耐性株)

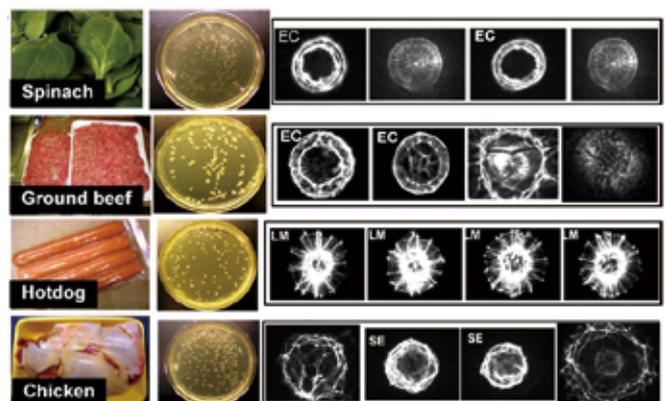


図7 光散乱法による各種食材の培養集落から直接の菌種同定¹⁰⁾

EC: *E. coli*, LS: *L. monocytogenes*, SE: *Salmonella Enteritidis*

費用対効果「マルディノミクス」

MALDI-TOF MSによる菌種同定は、単なる菌株同定コストの低減だけでなく、その迅速性に優れるが故に、適切な抗菌薬治療、入院期間の短縮、院内感染防止など医療経済的にも大きな影響(“エコノミカル”なインパクト)を与えるものと考えている。つまり、質量分析技術を今後、医療現場でうまく活用しながら、患者の感染症診療に貢献(“クリニカル”なインパクト)できるような実践的な学問分野となり”ダブル”インパクトを与えることを願い、私は「マルディノミクス」と命名した。実際、欧米ではMALDI-TOF MSによる菌種の迅速同定とその結果に基づいた抗菌薬適正使用への介入(Antimicrobial Stewardship)によって入院期間短縮⁸⁾や医療費低減の効果⁹⁾があったとしている。すなわち、介入前後において、効果的な抗菌薬治療までにかかった時間(h)が、30.1hから20.4hに、入院期間が14.2日から11.4日に、死亡率が20.3%から14.5%に低下したとの報告⁸⁾(表2)や入院費用が45,709ドル(約457万円)から26,162ドル(約262万円)に低減したとの報告⁹⁾がある(値はすべて平均値)。今後は国内からの「マルディノミクス」を裏付けるデータ報告に期待したい。

表2 MALDI-TOF MSによる迅速同定と Antimicrobial Stewardship介入前後における臨床的および治療的な評価⁸⁾

| Outcome | 介入前 (n = 256) | 介入後 (n = 245) | P Value |
|-------------------|---------------|---------------|---------|
| 臨床的な評価 | | | |
| 30日時の全死因死亡率 | 52(20.3%) | 31(12.7%) | .021 |
| 培養陰性までの日数 | 3.3±4.8 | 3.3±5.7 | .928 |
| 入院期間 | 14.2±20.6 | 11.4±12.9 | .066 |
| ICU入室期間 | 14.9±24.2 | 8.3±9.0 | .014 |
| BSIの再発者 | 15(5.9%) | 5(2.0%) | .038 |
| 30日時の同一BSIによる再入院者 | 9(3.5%) | 4(1.6%) | .262 |
| 治療に関連した評価 | | | |
| 効果的な治療導入に要した時間(h) | 30.1±67.7 | 20.4±20.7 | .021 |
| 適切な治療導入に要した時間(h) | 90.3±75.4 | 47.3±121.5 | <.001 |

数値はNo.(%)もしくは平均値±標準偏差
入院期間とICU入室期間は血液培養が陽性になった時点から退院(退室)までに要した日数

05 | 光散乱法による 集落から直接の菌種/血清型の同定

寒天培地に発育した集落をスキャンしながらレーザー光線(635nm)を照射して、各集落の透過・散乱光をCCDカメラで撮影した画像パターン(ライブラリーのイメージデータと照合)から菌種の同定を行うBARDOT (Bacterial Rapid Detection using Optical Scatter Technology)が開発¹⁰⁾されている(図6)。これまでに各種食材を培養した培地・集落から直接に腸管出血性大腸菌(EHEC)、サルモネラ、リステリア菌などを同定できることが報告されている(図7)。特筆すべきは、EHECの各種O抗原型(O157, O145, O121, O111, O103, O45, O26)の判定や、サルモネラでは各種血清型(Enteritidis, Typhimurium, Newportなど)も画像パターンで鑑別できることである。

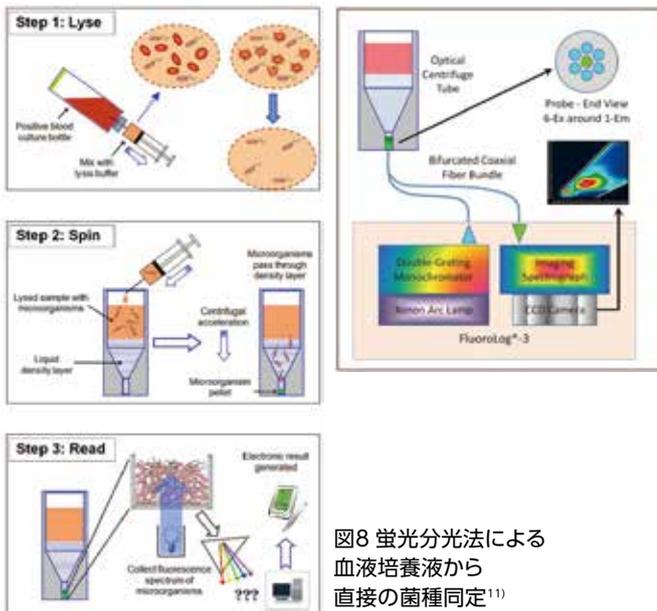


図8 蛍光分光法による 血液培養液から 直接の菌種同定¹¹⁾

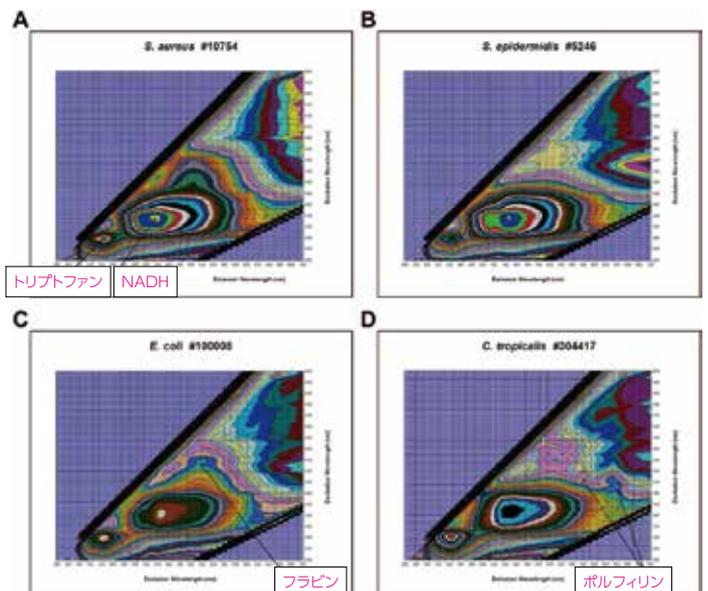


図9 Excitation-Emission Matrices (EEMs) 励起・蛍光マトリックス¹¹⁾

06 蛍光分光法(Fluorescence Spectroscopy)を用いた菌種同定と薬剤感受性試験

細菌が内在性に保有する発光分子 (Intrinsic fluorescence; NADH、トリプトファン、ポルフィリン、フラビンなど) に励起光を照射して、その発光を測定するExcitation-Emission Matrices (励起・蛍光マトリックス) で菌種を同定する技術が注目されている (図8)。血液培養で陽性になった培養液を前処理 (赤血球を溶解) 後に集菌し、レーザー光を照射して、縦軸に励起光の波長 (260~800 nm)、横軸に蛍光の波長 (260~1,100 nm) をスキャンしたその画像パターン (図9) から約20分で菌種を同定する。血液培養の陽性液1,121件を解析した結果、菌種レベルで96.5%の一致率であったとの報告¹¹⁾がある。また、薬剤感受性試験においても本技術を適用して、薬剤作用後の内部発光のマトリックスパターン変化から感受性か耐性かを数時間で判定する (図10)。

表3 迅速な薬剤感受性検査の最新技術

| |
|---|
| 1. MALDI-TOF (質量分析装置) |
| 1) 耐性に関する蛋白ピークの検出 |
| 2) 酵素活性のモニタリング |
| 3) 薬剤と一定時間作用後のスペクトラム変化 |
| 2. デジタル顕微鏡 (Accelerate Diagnostics社) |
| 血液培養液 (将来的にはBAL、便、尿検体) から直接の菌種同定と薬剤感受性試験を5時間で実施。薬剤作用による菌体の形態変化をデジタル顕微鏡で経時的にモニタリングする ¹²⁾ |
| 3. 病原体に特異的な人工粒子&蛍光法 (GeneWeave社/Roche社) |
| 菌種/属/科に特異的な人工粒子をファージのように菌体に取り込ませた後、薬剤と一定時間作用させた後その人工粒子の蛍光変化から判定 |
| 4. レーザー光散乱法 (BacterioScan社) |
| 血液培養液 (将来的には臨床検体から直接) を薬剤と一緒に培養しながら細菌にレーザー光を照射して菌数、菌体の大きさや形態の変化をモニタリングしてMIC値に換算する。所要時間は2~5時間 |
| 5. 蛍光分光法 (図10) |
| 血液培養液 (将来的には臨床検体から直接) レーザー光を照射して、縦軸に励起光の波長 (260~800 nm)、横軸に蛍光の波長 (260~1,100 nm) をスキャンしたその画像パターン (NADHの蛍光度合いほか) から約4時間で判定 ¹¹⁾ |

Change in Total Cellular NADH in MRSA and MSSA QC Strains Cultured with Cefoxitin

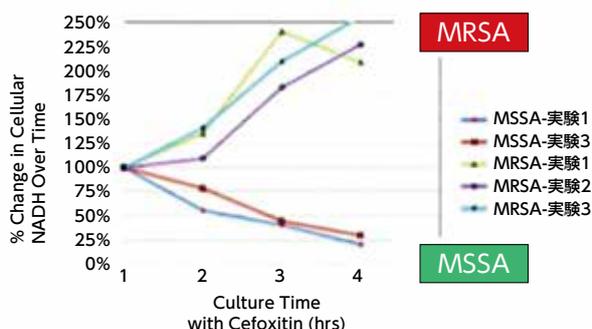


図10 蛍光分光法による薬剤感受性試験

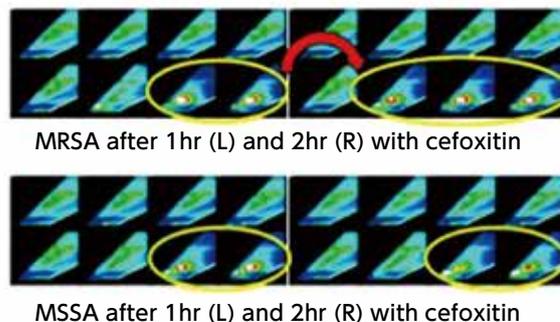
Dr. Humphries, Rapid Phenotypic Susceptibility Testing of Bacteria
Antimicrobial Susceptibility Testing Update: Clinical and Laboratory Impact, 2015 ICAAC

07 迅速な薬剤感受性検査の最新動向

現在、日常検査で実施されている薬剤感受性試験は、純培養された集落を用いて薬剤を含む培地に一定の菌量を接種して18~24時間培養後に判定を行う。実際には、自動感受性システムが頻用されているが、迅速パネルを利用しても報告までに8~12時間を要する。近年、菌種の同定だけでなく、薬剤感受性試験においても様々な技術革新の恩恵を受けながら、数時間で感受性菌か耐性菌を判定する画期的な技術¹²⁾が登場している (表3)。質量分析法の活用、デジタル顕微鏡や光散乱法による菌数や菌体の形態変化をモニタリングしてMIC値に換算、あるいは菌が内部に保有する蛍光物質を励起光と蛍光の画像変化で捉えて、2~5時間で薬剤感受性を判定する技術である。これらの最新技術の適用は、現段階では血液培養液が主体であるが、今後は検体から直接の同定・薬剤感受性検査、いわゆる「Culture-Free Microbiology」の時代へ突入する可能性を秘めている。

08 分子疫学的な解析法の新たな潮流

分離菌株が同じ由来 (クローン) であるか否かを判定することは、院内環境のアウトブレイクの検知、感染源の特定や伝播様式の探索のために重要である。いわゆる、株レベルの型別 (タイピング) ではパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE法) に代表される制限酵素断片多型 (RFLP) 解析が主流である。PFGE法は現在でもタイピングのゴールドスタンダードであるが、操作が煩雑で解析に長時間を要するという欠点がある。近年、DNA塩基配列の決定が容易となったので、細菌の5~7領域のハウスキーピング遺伝子をそれぞれ400~600塩基を解読して、これらの配列を比較することでタイピングを行うmultilocus sequence typing (MLST)法が普及している。MLST法の最大の特長は、主要な病原細菌や食中毒菌の解析プロトコールがWebサイト (<http://www.mlst.net/>) で公開されており、世界中の研究室や検査室で配列データを比較できることである。



MSSA after 1 hr (L) and 2hr (R) with cefoxitin

その他の遺伝子型別法としては、細菌の反復配列(tandem repeats)の多型を解析する反復配列多型分析法(VNTR法)がある。細菌ゲノム上の繰り返し配列領域をPCR法によって増幅して、その産物の大きさから繰り返し配列のコピー数を調べる方法で、おもに結核菌のタイピングに利用されている。rep-PCR(repetitive sequence-based PCR)法を用いた自動細菌タイピング装置としてDiversiLabシステムがシスメック・ビオメリュー社から販売されている。DNA抽出から自動結果解析までの所要時間は4時間と迅速かつ簡便で、日常検査の現場での活用が期待される。関東化学から販売されているPOT (PCR-based ORF Typing)法¹³⁾はおもにMRSA、緑膿菌、アシネトバクターのタイピングで実用化されている。ファージを構成するORF (open reading frame)の中からいくつか選んでマルチプレックスPCRで検出して、その保有パターンによって遺伝子型を決定する。

シーケンス解析で注目すべきは、生物発光を応用したパイロシーケンス法¹⁴⁾の実用化である。この方法はPCR反応産物を加工することなく、そのままシーケンスできるので、大幅な省力化と自動化が特徴である。既にこの原理は第二世代シーケンサーにも応用されており、半日で数百メガ塩基を解読できる状況となっている。アウトブレイク時に次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析(Whole-genome sequencing)による型別を実施した事例が、結核菌¹⁵⁾、MRSA¹⁶⁾、ノロウイルス¹⁷⁾などの病原体で報告されている。

さらには、塩基配列決定の能力が日進月歩の勢いで飛躍的に伸びている現在、“次の”第三世代シーケンサーや“次の次”第四世代シーケンサーの話題¹⁸⁾も出ている。第三世代シーケンサーは1分子リアルタイム・シーケンスを原理としており、1分子のDNAを鋳型としてDNAポリメラーゼの合成速度(1秒間に数塩基)で塩基配列を解読できるので、短時間当たりの配列決定数が多く、コストダウンにも繋がっている。分離菌株の全ゲノムを1時間足らずで解読できるようになる日もそう遠くはないようである。

09 | おわりに

感染症検査のワークフローを一変させる遺伝子解析技術と質量分析法の概略そして迅速な薬剤感受性検査の最新動向を紹介した。これからの感染症診療においても、鏡検・培養・感受性試験の「三種の基本技術」が大切であることはいささかもかわらないが、全自動遺伝子検査システム、質量分析法による菌種の迅速同定などを適宜活用することにより、抗菌薬・抗ウイルス薬の適正使用、入院期間の短縮、医療関連感染の予防などから、費用対効果のさらなる向上を期待したい。

文献

- 1) 大楠清文, いま知りたい臨床微生物検査 実践ガイド—珍しい細菌の同定・遺伝検査・質量分析—, (医歯薬出版, 東京, 2013).
- 2) K. H. Rand, H. Rampersaud, H. J. Houck, *J. Clin. Microbiol.* 49(7), 2449-2453 (2011).
- 3) A. E. Clark, E. J. Kaleta, A. Arora, D. M. Wolk, *Clin. Microbiol. Rev.* 26(3), 547-603 (2013).
- 4) K. Spärbier, S. Schubert, U. Weller, C. Boogen, M. Kostrzewa, *J. Clin. Microbiol.* 50(3), 927-937 (2012).
- 5) I. Burckhardt, S. Zimmermann, *J. Clin. Microbiol.* 49(9) 3321-3324 (2011).
- 6) M. Kempf, S. Bakour, C. Flaudrops, M. Berrazeg, J.-M. Brunel, M. Drissi, E. Mesli, A. Touati, J.-M. Rolain, *PLoS One.* 7(2), e31676 (2012).
- 7) J. Hrabák, V. Študentová, R. Walková, Helena Žemličková, V. Jakubů, E. Chudáčková, M. Gniadkowski, Y. Pfeifer, J. D. Perry, K. Wilkinson, T. Bergerová, *J. Clin. Microbiol.* 50(7), 2441-2443 (2012).
- 8) A. M. Huang, D. Newton, A. Kunapuli, T. N. Gandhi, L. L. Washer, J. Isip, C. D. Collins, J. L. Nagel, *Clin. Infect. Dis.* 57(9), 1237-1245 (2013).
- 9) K. K. Perez, R. J. Olsen, W. L. Musick, P. L. Cernoch, J. R. Davis, G. A. Land, L. E. Peterson, J. M. Musser, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 137(9), 1247-1254 (2013).
- 10) P. P. Banada, K. Huff, E. Bae, B. Rajwa, A. Aroonual, B. Bayraktar, A. Adil, J. P. Robinson, E. D. Hirleman, A. K. Bhunia, *Biosens Bioelectron.* 24(6), 1685-1692 (2009).
- 11) J. D. Walsh, J. M. Hyman, L. Borzhemskaya, A. Bowen, C. McKellar, M. Ullery, E. Mathias, C. Ronsick, J. Link, M. Wilson, B. Clay, R. Robinson, T. Thorpe, A. van Belkum, W. M. Dunne Jr, *mBio.* 4(6), e00865-13 (2013).
- 12) C. Chantell, *Clin. Microbiol. Newsl.* 37(20), 161-167 (2015).
- 13) 鈴木匠宏, THE CHEMICAL TIMES. 221, 16-21 (2011).
- 14) A. Ahmadian, M. Ehn, S. Hober, *Clin. Chim. Acta.* 363(1-2), 83-94 (2006).
- 15) J. L. Gardy, J. C. Johnston, S. J. H. Sui, V. J. Cook, L. Shah, E. Brodtkin, S. Rempel, R. Moore, Y. Zhao, R. Holt, R. Varhol, I. Biro, M. Lem, M. K. Sharma, K. Elwood, S. J. M. Jones, F. S. L. Brinkman, R. C. Brunham, P. Tang, *N. Eng. J. Med.* 364, 730-739 (2011).
- 16) S. R. Harris, E. J. P. Cartwright, M. E. Török, M. T. G. Holden, N. M. Brown, A. L. Ogilvy-Stuart, M. J. Ellington, M. A. Quail, S. D. Bentley, J. Parkhill, S. J. Peacock, *Lancet Infect Dis.* 13(2), 130-136 (2013).
- 17) S. Kundu, J. Lockwood, D. P. Depledge, Y. Chaudhry, A. Aston, K. Rao, J. C. Hartley, I. Goodfellow, J. Breuer, *Clin. Infect. Dis.* 57(3), 407-414 (2013).
- 18) N. J. Loman, M. L. Pallen, *Nature Review Microbiology.* 13(12), 787-794 (2015).