

AMR対策に役立つ微生物検査法 ～AMRのスクリーニングおよび同定～

Microbiological testing method useful for measures against AMR
～Screening and identification of AMR～

京都橋大学 健康科学部 臨床検査学科 **中村 竜也**

Tatsuya NAKAMURA, PhD (Associate Professor)

Kyoto Tachibana University, Department of Medical technology and Sciences faculty of Healyh Sciences.



キーワード

薬剤耐性菌 (AMR)、スクリーニング、カルバペナーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE)

01 はじめに

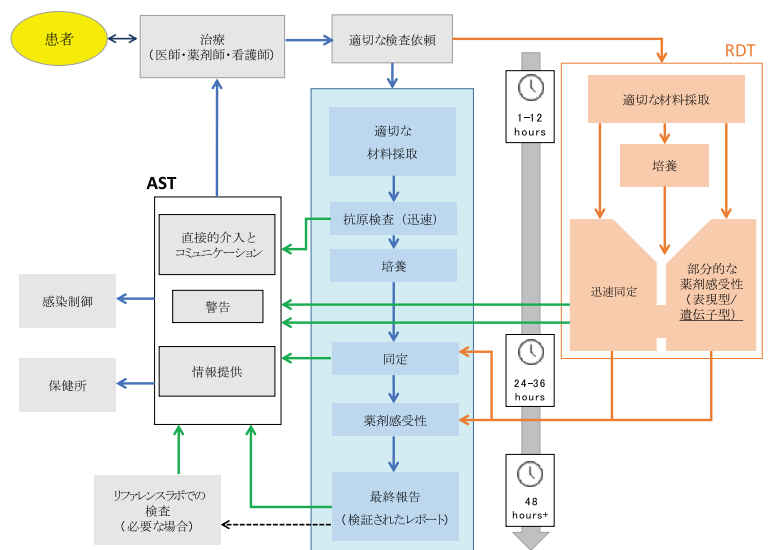
1929年にフレミングによりペニシリウムが産生する黄色ブドウ球菌の発育を阻止する物質すなわちペニシリンが発見され¹⁾、抗菌薬の開発の歴史がスタートした。一方で、ペニシリンの発見以降、様々な抗菌薬が世に登場してきたが、ほとんどの抗菌薬において耐性を獲得した菌が検出されている。しかし、新規抗菌薬の開発は困難を極め、2010年以降に新たに市販された抗菌薬は10薬剤に満たない。それゆえに、早期に耐性菌を検出し拡散を防止することが、抗菌薬適正使用も含めた感染制御において重要である。

薬剤耐性菌は1960年代にmethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)が出現し、1980年代に入るとvancomycin-resistant Enterococci (VRE)やextended spectrum β -lactamase (ESBL)産生菌が出現し、1990年代には、multi-drug-resistant Tuberculosis (MDR-TB)やmulti-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP)などが問題となってきた。近年では、カルバペネムを含む複数の抗菌薬に多剤耐性を獲得したグラム陰性桿菌が世界的な問題となっており、2013年には米国CDCも勧告を出している。これらによる感染症は、有効性が期待できる抗菌薬がほとんどなく予後もきわめて深刻なことから、EUや米国ではカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE)等の新型多剤耐性菌への対策を政府主導のもと強化し、新規抗菌薬の開発を含む包括的戦略が実行されつつある。

これらの背景から2016年には日本においても薬剤耐性 (antimicrobial resistance:AMR) 対策として『AMR対策アクションプラン』を掲げ行動計画が立てられた。2013年と比較して、2020年までに成果指標としてMRSAなどの耐性菌減少と特定抗菌薬の使用減少についてそれぞれ数値目標が設定された。これらの目標を達成するためにも、微生物検査室の果たす役割は大きいと考える。また、AMRはヒトからの

分離だけでなく、自然や家畜など地球環境全域に存在することがすでに数多く報告されている²⁻³⁾。One Healthの概念からもAMRが検出される背景を知り、検査体制を構築する必要がある。加えて、グラム陰性桿菌を代表とする薬剤耐性菌の増加問題はグローバル化しており、AMR対策において今まで以上に抗菌薬適正使用 (Antimicrobial Stewardship) が重要となる。Philippeら⁴⁾は、Antimicrobial Stewardshipを正しい方向に導くためにはどのように微生物検査室を運営すべきかをレビューしており、その中でRapid Diagnostic Testing (RDT) やRapid Antimicrobial Susceptibility Testingの必要性について述べている (図1)。AMRのスクリーニングや耐性因子の迅速な決定は、抗菌薬を選択する上で重要であり、それらを担っているのも微生物検査室ということになる。

本稿では、AMR対策に役立つ微生物検査法について、AMRのスクリーニングおよび同定について概説する。



4) Clin Microbiol Rev. 2016 ;30:381-407.より作成

図1 従来の微生物学検査および迅速検査 (RDT) のためのワークフロー
迅速な検査は、微生物検査室のワークフローを複雑にするが、結果を早く返却することができる。結果に関する他職種とのコミュニケーションは重要な要素である。青色の矢印は従来の微生物学の経路を示し、オレンジ色の矢印はRDT経路を示し、緑色の矢印は検査室および抗菌薬適正使用チームが結果の伝達を改善する機会を表している。

02 病院内感染に関連する 薬剤耐性菌の現在の状況

1) 世界における薬剤耐性菌の動向に注目

国や地域、施設毎で流行している薬剤耐性菌のタイプが異なることは、数多くの報告において周知の事実である。例えば、カルバペネマーゼ産生遺伝子の検出は、米国ではKPC型、ヨーロッパではNDM型やOXA型、日本ではIMP型が多く検出されている⁵⁾。それら流行地域にて医療行為を受けた場合、流行株を想定したスクリーニングを行う必要があると考える。例えば、オランダの研究では、海外旅行前にESBLの定着が確認されなかった人が、東南アジアおよび南アジアに滞在した際に、それぞれ全体の34%と75%が旅行後にESBL産生菌を獲得したとしている。ちなみに、北米、ヨーロッパ、オセアニアへの旅行では5.9%であったと報告されている⁶⁾。この報告では、ESBL産生腸内細菌科細菌の獲得のリスク因子として、米国およびヨーロッパからアジアへの旅行が挙げられている(図2)。このように、単なる旅行だけでも薬剤耐性菌を保菌する現状を踏まえると、下痢症などの急性細菌感染症だけでなく薬剤耐性菌感染に関しても渡航歴は重要な患者情報となる。また、ペニシリンの発見以降、多種類の抗菌薬を開発し、長きにわたり使用してきたが、細菌がそれを嘲笑うかのように様々な薬剤耐性菌を排出し進化してきた。細菌は意図も簡単に耐性遺伝子の獲得や自身の変異により抗菌薬に耐性化する。その進化のスピードを我々は認識しなくてはならない。例えば、MRSAに関しても進化しており、MRSAは耐性を司る遺伝子がmecAと考えられていたが、近年mecB,C,Dの報告がある⁷⁻⁹⁾。それぞれにmecAとは違った特徴を持つが、本質的にはMRSAである。mecCは37°Cでの培養では、Cefoxitinに感性となりメチシリン感性と判定される¹⁰⁾。これも菌側が生き残るための巧妙な手口だと感じる。日々進化する細菌に関する新しい情報を入手することは必須である。

2) 市中感染症にも広がる薬剤耐性菌

さて、近年新たな耐性菌が出現し世界各地に拡散していく中で、病院内感染の原因菌としてクローズアップされていた耐性菌が市中においても広がりを見せつつある。市中の感染症で問題となってきた薬剤耐性菌は、従来は主にマクロライド系薬やキノロン系薬といった経口抗菌薬に対するものであった。しかし近年、MRSAやESBL産生菌、carbapenem resistant Enterobacteriaceae (CRE) など多くの抗菌薬に耐性を獲得した菌が市中にも蔓延しつつある。また、家畜や食物などから

も耐性菌が検出されており、それらを通じて健常人にも定着している可能性が示唆されている。

現在、市中感染症で最も重要な薬剤耐性菌がMRSAと考えられる。病院内でのhospital-acquired MRSA (HA-MRSA)とは異なる特徴を有する市中感染型MRSA (community-acquired MRSA: CA-MRSA)が出現してきている。CA-MRSAはHA-MRSAと比較していくつかの異なる特徴を有している。CA-MRSAの多くはMRSAの遺伝子的分類法のひとつであるstaphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)がIV型であり、Panton-Valentine型ロイコシジン(PVL)を産生する遺伝子を獲得している株が多いと報告されている¹¹⁾。また、CA-MRSAの薬剤感受性はHA-MRSAと異なりオキサシリンやセフォキシチン以外のほとんどの抗菌薬(マクロライド系薬耐性は比較的耐性株が多い)に対して感受性を示す。臨床的には、トキシックショックや重篤な軟部組織感染例からの分離が多く、また致死率も高い傾向にある。CA-MRSAの高病原性はPVLなどをHA-MRSAと比較して高頻度に産生するためであると考えられている。HA-MRSA感染は手術、人工透析、カテーテル留置、長期療養施設の入所などがリスク因子として挙げられ、感染者の多くが高齢者なのに対して、CA-MRSAは健常若年者においての報告が多いことも特徴の一つである。今後は単にMRSAをスクリーニングするだけでなく、病原因子などの他のファクターに関しても、スクリーニングする必要性があるのかもしれない。

ESBL産生菌も市中で増加している耐性菌のひとつである。ESBL産生菌が検出され始めた当初はTEM-型やSHV-型と呼ばれる遺伝子が多くを占めていた。しかし、2000年頃からCTX-M-型遺伝子へと変化してきたことが報告され、アジア・オセアニア、北米、南米、アフリカ、ヨーロッパなどでも分離されており、世界的な傾向であると考えられる。CTX-M-型ESBL産生株が他のβラクタマーゼ産生株と大きく異なる点は、院内のみならず市中からも分離され、さらには健常人からもCTX-M型ESBL産生菌が検出される時代になっている。近年では、河川などの環境からの検出報告もある。よって、ESBL産生菌のスクリーニングはMRSA同様の考え方をする必要があると考える。また、薬剤耐性菌を獲得した場合、一般的に入院期間が長くなり、より多くの薬剤耐性菌を保持する可能性がある。医療現場における多剤耐性菌対策のためのCDCガイドライン中でも、免疫が低下している患者は他の耐性菌を獲得し続けるため、単一の病原体や抗菌薬に焦点を合わせた対策プログラムは成功しないとしている¹²⁾。我々の調査では、MRSA患者のESBL産生



図2 海外旅行におけるESBL産生菌の獲得率

オランダの報告によると、海外旅行前にESBLの定着がなかった健常人が、東南アジアおよび南アジアに行った人において、全体の34%と75%が旅行後にESBL産生菌を獲得したとしている。ちなみに、北米、ヨーロッパ、オセアニアへの旅行では5.9%であったと報告されている。市中へのESBL産生菌の拡散は、このような背景が原因とされている。

6) Lancet Infect Dis. 2017 Jan;17(1):78-85. より作図。

菌の検出が6.1%であったのに対して、MSSA患者では1.6%と有意差を持って低値であった。薬剤耐性菌を獲得した患者に対しては、複数の薬剤耐性菌獲得を考慮した検査体制を構築しておく必要がある。

CREは現在のところ日本では数%の検出率であり、市中への拡散の程度も低いと考えられるが、日本において多く検出されているIMP-6型メタロβラクタマーゼはCTX-M-2型を同時に獲得し、さらには伝達頻度が高いプラスミド上に存在するとされている¹³⁾。今後、市中での拡散に注意が必要であるとされる。他にも、マクロライド耐性マイコプラズマやキノロン耐性淋菌さらにはpenicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP)やβラクタマーゼ陰性Ampicillin耐性インフルエンザ菌(BLNAR)など耐性化が問題となっている菌も存在するが、これらは幸いにして今のところ多剤耐性化の傾向にはない。

3) 病院内感染の状況は変化してきている

CDCが2002年に“Campaign to Prevent Antimicrobial Resistance in Healthcare Settings”と題し¹⁴⁾、薬剤耐性を防止するための12のステップを提言し、院内における薬剤耐性菌の抑制を目的としたキャンペーンを実施した。それらの効果もあり、病院内でのMRSAやMDRPなど問題となる耐性菌の検出状況は減少傾向にある。しかし、特定の地域や個々の施設におけるCREやmulti-drug resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRAB)のOutbreakの報告は後を絶たない状況である。Outbreakを未然に防止するには、院内で問題となる多剤耐性菌の特徴を十分に理解し、早期発見に努めることが重要であると考えられる。また、市中での耐性菌の増加に伴い、院内への耐性菌の持ち込みの有無を判別することが不可欠になってきているMRSAにおいても、市中感染型とされるタイプが院内で主流となっている施設も存在するなど、院内における薬剤耐性菌の状況は様相を変えつつあると考えられる。

03 | 病院内感染に関連する 薬剤耐性菌のスクリーニング

1) 薬剤耐性菌スクリーニングのポイント

薬剤耐性菌のスクリーニングを実施するにあたって重要なことは、闇雲に検出するのではなく、病院内のInfection Control Teamにおいてスクリーニング実施のコンセンサスを取り、薬剤耐性菌検出後の対応を明確にしておくことが重要である。どのような患者に対して、どのような種類の薬剤耐性菌を検出するのかなど、まずは院内におけるルール作りをする必要がある。それらが整備された上で、薬剤耐性菌のスクリーニングには、2つの手順があると考えられる。第1は、検体から直接目的とする薬剤耐性菌をスクリーニングする方法と、第2は原因菌に対する薬剤感受性試験を実施後、特定の抗菌薬のMIC値を基準としてスクリーニングする方法である。直接材料から検出する場合には、目的とする薬剤耐性菌を検出するための抗菌薬が添加されている培地を使用し、培地上に発育した菌株を、精査・同定し最終決定する。MRSAやVRE、ESBL、CREを検出する培地が上市されている。また、近年血液培養からmecAやCTX-Mなどの薬剤耐性遺伝子を直接検出する自動機器なども

使用することができ、薬剤耐性菌検出の迅速化がはかられている。薬剤感受性試験実施後の耐性菌検出は、CLSIやEUCASTから基準が設定されている。MRSAであればCefoxitinが、ESBL産生菌であれば第3世代セファロスポリン系薬が該当する。EUCASTでは、耐性の指標としてEpidemiological cutoffを菌種と薬剤の組み合わせで各々設定されているが、設定されているMIC値が低く使用不可能な場合もある。日常検査では、これらを組み合わせて、対象となる薬剤耐性菌を検出することとなる。

2) CPEのスクリーニング

では、carbapenemase produced Enterobacteriaceae (CPE)を例にスクリーニングについて考えてみたい。CPEの検体からのスクリーニング基準に関する明確な規定はない。Dr. Roberto Viau¹⁵⁾は、CPE検出について様々な角度からレビューしている。その中でスクリーニングの対象となる患者は、地域流行していない場合は、①ICU患者、②過去12ヶ月の間に流行地域で治療を受けた患者、③carbapenemase produced organism(CPO)感染の既往歴がある、④保菌者である患者、⑤以前に長期入院していた患者、⑥流行地域からきた患者などを挙げている。日本におけるCPEの検出率は諸外国と比較して低い。そのため、特に海外の流行地域からのCPEの流入と拡散を阻止する必要がある。海外の流行地域において、治療を行なった患者を受け入れる場合には、積極的なスクリーニングを実施することが望ましい。また、日本国内におけるCPEの流行地域やOutbreakの報告施設からの転院については、アクティブサーベイランスを実施するなどの対応策が必要である。そのためには、地域における情報(感染対策)ネットワークの充実が不可欠である。検体からの検出には、カルバペネマーゼスクリーニング用に選択培地が用いられることが多い。Dr. Roberto Viau¹⁵⁾の報告では、SuperCarba培地が感度・特異度ともに良好な結果となっている。CDCも少し煩雑ではあるが糞便からのスクリーニング法について液体培地を用いた方法を提案している。我々も、日本国内で発売されているCPEスクリーニング培地の検討を実施した。(図3)当施設保

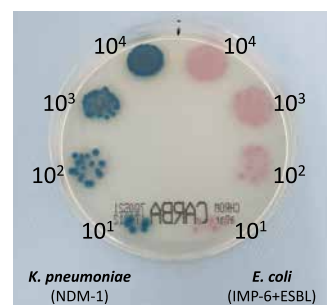


図3 クロモアガー mSuper CARBA上のコロニーと他の選択培地との比較
クロモアガー mSuper CARBA培地は、大腸菌であればピンク色のコロニーを、それ以外は青色を呈する。菌量が少なくても比較的検出感度が高い選択培地である。また、他の選択培地と比較しても、遺伝子型の種類にかかわらず発育することがわかる。

当施設検討結果

	mSuper CARBA	chromID Carba	ESBL/MBL
Detection of CPE (n=18)	18	14	11
Sensitivity (%)	100	77.8	61.1
False negative		OXA-48, IMP	KPC, GES, IMP, OXA-48, VIM
False positive (n)	0	1 (ESBL)	1 (AmpC)
Specificity (%)	100	90	90

【使用菌株】

IMP型 12株、KPC型 1株、GES型 1株、VIM型 1株、OXA48型 1株、NDM型 1株、SMB型 1株

存株50株を用いて行ったmSuper CARBAの性能評価は、感度100%、特異度86.4%であった。本検討で用いたIMP型16株のうち、13株は良好な感度で検出可能であったが、IMP-1型2株、IMP-6型1株については 10^5 CFU/mL濃度での発育を認めなかった。これらに対して、希釈倍率を下げて再検討したところ、 10^6 CFU/mL濃度ではすべて発育を認めた。いずれの薬剤耐性菌にも共通して言えることだが、菌量が少ない場合にはスクリーニング培地といえども検出が困難な場合がある。あくまでも選択培地であることを念頭におくことが重要である。CPEの薬剤感受性試験を用いたスクリーニングは、Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)のMeropenem (MEPM)の判定基準を使用している施設が多いと思われる。しかし、国内ではIMP型が主流であり、カルバペネム系抗菌薬の耐性度が低い株も存在するため、現行の基準では見落とししてしまう可能性がある。一方、European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)のCPEスクリーニング基準はCLSIよりも低値に設定されている(MEPM MIC >0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$)ため、感度はCLSIよりも良いと考えられるが、日本で使用可能な薬剤感受性測定用パネルには低濃度測定が可能なものが少ない。ゆえに、CPEはカルバペネム系薬だけを指標とするのではなく、CAZやCMZを指標とし、これら薬剤のMICが高値の場合にはCPEを疑うことが望ましい。一方、染色体性にAmpCを産生する菌種においては、CAZやCMZに通常耐性を示すことが多いため、我々はFaropenem (5 μg /ディスク)を使用したCPEのスクリーニングを推奨してきた¹⁶⁾。ディスク法ではあるが、非常に感度良くスクリーニングすることが可能である。ESBL産生菌の確認試験の際にFaropenem (FRPM) ディスクを置くことでESBL検出と同時にCPEスクリーニングも行うことができる。FRPMの阻止円が15mm以下であればCPEを疑い、さらに精査を実施する。カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlus(関東化学)にもFRPM(10 μg /mL)が使用されており、本ディスクを使用したCPEのスクリーニングも可能である。本ディスクにおいても、阻止円15mm以下であればCPEが疑われる(図4)。

我々の検討においても感度は100%であった。また、2016年のCLSIミーティングにおいて、カルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌の新たな検出法として、Carbapenemase Inactivation Method (CIM) testが提案された¹⁷⁾。本法の利点として、特殊な試薬や器具を用いないためどの検査室でも安価で簡単に検査が可能であり、検出感度も99%と良好な結果を得ていることが挙げられる。2016年6月には、改良型CIM法も提案され、現在は本方法がCLSIのドキュメントに記載されて

おり、CPE検出の標準的方法とされている。

以上のように、薬剤耐性菌スクリーニングは様々な背景を考えて実施する必要があり、さらに1つの方法だけでは見落とすケースも存在する。複数の方法を組み合わせて、重大な薬剤耐性菌を確実に検出できるような工夫が日常から必要である。

04 | 病院内感染に関連する薬剤耐性因子の同定

1) 耐性因子の確定

薬剤耐性菌スクリーニングで検出された菌株は、耐性因子の確定には至っていないため、必要に応じて確認試験を実施しなければならない。もちろん、MRSAやPRSPなどは特別な確認方法を必要とせず、MICだけで確定できるものもある。耐性因子を確定する必要性は、その特徴に合わせた感染対策を可能とするところにある。CLSIやEUCASTでは、耐性因子毎に確認方法が記載されている。特にEUCASTでは、ESBL産生菌やCPEなどの β ラクタマーゼに関する検出フローが詳細に記載されており、日常検査における有用性は高い。確認試験はディスク法や微量液体希釈法などフェノタイプ(表現型)を使用した方法と薬剤耐性遺伝子を検出するジェノタイプ(遺伝子型)を使用した方法とがある。

2) フェノタイプ(表現型)による薬剤耐性菌の検出

日常検査において表現型の確認にはディスク法を使用する機会が多く、特にESBLやmetallo β -lactamase (MBL)などの β ラクタマーゼ産生の確認試験において活用されている。また、発色基質を使用したニトロセフィン法やシカベータテストなどは迅速かつ簡便であり、多くの施設で利用されている。一方で、微量液体希釈法は、ブドウ球菌属におけるClindamicin誘導試験やESBL確認試験などは標準で搭載されている薬剤感受性試験があるが、特にESBL確認試験などでは通常の測定薬剤数に応じて測定用ウェルを多く使用するため、日常で使用されているケースは少ないと思われる。ディスク法を用いたESBL産生菌の検出には、Double Disk Synergy TestやClavulanic acid添加ディスクを使用した方法がある。これらは、Clavulanic acidの存在による阻止円の発育阻止帯や拡大により判定する。また、ESBLおよびAmpCが同時に鑑別可能なディスク(AmpC/ESBL鑑別ディスク:関東化学)も上市されている。カルバペネマーゼ産生菌の検出は、カルバペネマーゼにはAmbler分類でClass A、B、Dに分類される種類があるため、

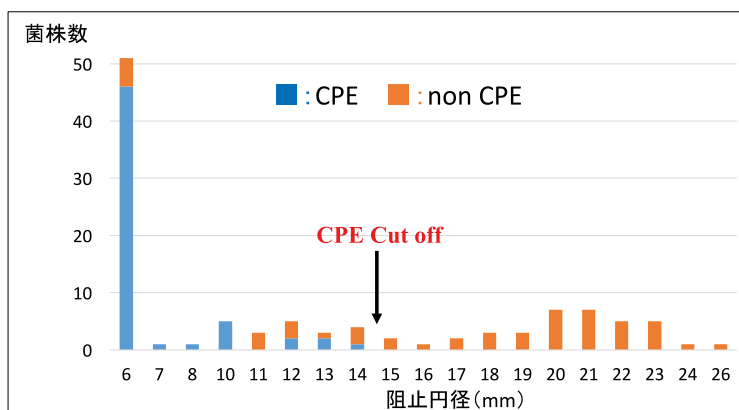


図4 カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlusのFRPM阻止円径カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlusのFRPMの阻止円径を示しているが、15mm以上はCPEが存在しなかった。15mmをCPE検出のCutOff値に設定可能なことを示唆する結果である。Non CPEで15mm以下を示した耐性機序は全てAmpC産生株であった。

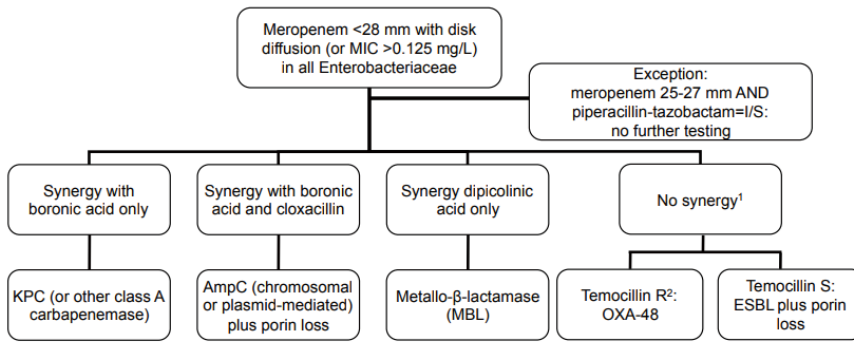


図5 EUCASTにおけるカルバペナーゼ検出フロー

- 1) 何種類かのカルバペナーゼを産生する場合にも、相乗効果が認められない場合がある。(例えば、MBL+KPC) その場合には遺伝子検査が必要。
- 2) テモシリンの高度耐性(MIC : >128μg/mL, Disc : <11mm)はOXA-48の表現型マーカー

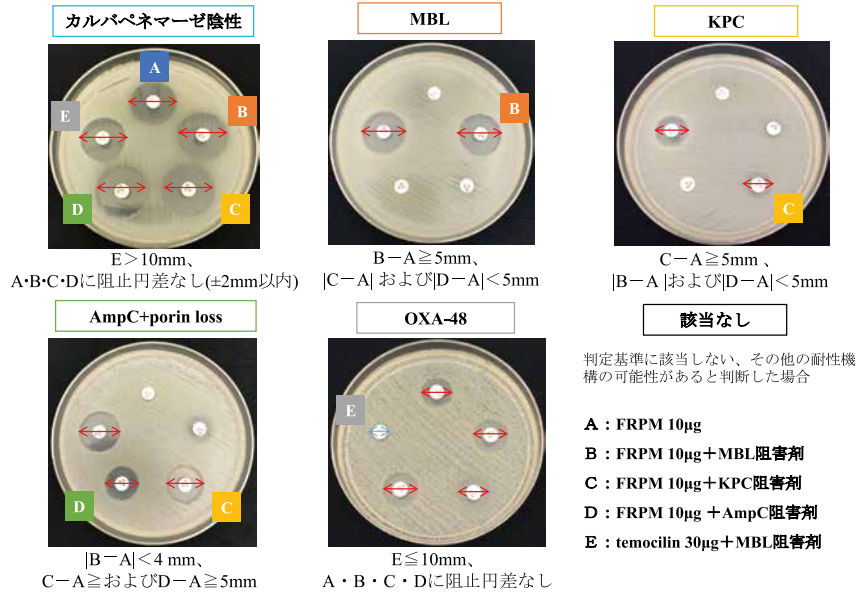
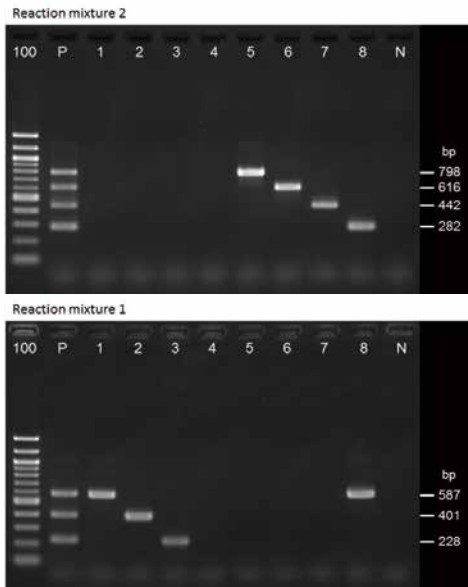


図6 カルバペナーゼ鑑別ディスクPlusにおける各種CREの判定例



電気泳動例と使用した検体
 100: 100 bp DNA Ladder、
 P: ポジティブコントロール (試薬E)、1: IMP-1陽性菌株、2: VIM陽性菌株、3: カルバペナーゼ型GES陽性菌株、4: ESBL型GES陽性菌株、5: KPC陽性菌株、6: NDM陽性菌株、7: OXA-48陽性菌株、8: IMP-6陽性菌株、N: ネガティブコントロール(TE緩衝液)

試薬	検出対象遺伝子	増幅サイズ(bp)
Reaction mixture.1	bla _{IMP-1} group	587
	bla _{VIM} group	401
Reaction mixture.2	bla _{GES} group	228
	bla _{KPC} group	798
	bla _{NDM} group	616
	bla _{OXA-48} group	442
	bla _{IMP-6}	282

検討結果

Type	菌名	耐性遺伝子	Reaction mixture.1	Reaction mixture.2
CPE	<i>E.aerogenes</i>	IMP-1	IMP	negative
	<i>S.marcescens</i>	IMP-6	IMP	IMP-6
	<i>P.rettgeri</i>	IMP-1	IMP	negative
	<i>E.cloacae</i>	VIM-2	VIM	negative
	<i>C.freundii</i>	IMP-1	IMP	negative
	<i>K.oxytoca</i>	IMP-1	IMP	negative
	<i>E.coli</i>	IMP-6	IMP	IMP-6
	<i>K.pneumoniae</i>	IMP-6	IMP	IMP-6
	<i>E.cloacae</i>	IMP-1	IMP	非特異
	<i>K.pneumoniae</i>	IMP-1	IMP	negative
	<i>K.pneumoniae</i>	GES-4	GES	negative
	<i>K.pneumoniae</i>	KPC	negative	KPC
	<i>K.pneumoniae</i>	KPC	negative	KPC
	<i>K.pneumoniae</i>	NDM-1	negative	NDM
<i>K.pneumoniae</i>	NDM-1	negative	NDM	
Non CPE	<i>S.marcescens</i>	SMB-1	negative	negative
	<i>K.pneumoniae</i>	OXA-48	negative	OXA-48
	<i>E.coli</i>	OXA-48	negative	OXA-48
	<i>E.coli</i>	CTX-M-1	negative	negative
	<i>E.coli</i>	CTX-M-2	negative	negative
	<i>K.pneumoniae</i>	Non CPE CRE	negative	非特異
	<i>E.coli</i>	DHA	negative	negative
Non CPE	<i>K.pneumoniae</i>	CIT	negative	negative
	<i>K.pneumoniae</i>	ACC	negative	negative
	<i>E.coli</i>	ACC	非特異	negative

図7 シカジーニクス® カルバペナーゼ遺伝子型検出キット2の電気泳動例と結果

シカジーニクス®カルバペナーゼ遺伝子型検出キット2は、日本で検出されるCPEの遺伝子を検出することが可能で、さらにIMP型の中でもIMP-6を検出できる。当施設にて検討した結果、良好な成績を示した。ただし、当然キットに含まれていない耐性遺伝子は陽性にならないため、表現型の検査も重要である。

同定にはそれぞれ異なる阻害剤を使用しなくてはならない。これらの鑑別表をEUCASTが提示しているが、KPCであればボロン酸で、MBLであればジピコリン酸でそれぞれ阻害がかかるとしている(図5)。日本では、MBL検出にSMAディスク(栄研化学)の使用が高いため、このフローとは使用する阻害剤が若干異なる。また、鑑別にはCloxacillinやTemocillinを使用しなくてはならないため、一般の検査室での実施は困難である。カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlus(関東化学)は、FRPMにMBL阻害剤、KPC阻害剤、AmpC阻害剤がそれぞれ添加されており、さらにTemocillinの測定も可能である。EUCASTのフローに使用されている阻害剤が全て添加されている(図6)。しかし、EUCASTはMEPMに阻害剤を組み合わせしており、本ディスクのFRPMとは異なることを留意する必要がある。

3) ジェノタイプ(遺伝子型)による薬剤耐性菌の検出

遺伝子型による耐性因子の同定は、MRSAであればmecA遺伝子、ESBL産生菌であればCTX-M遺伝子の様にある特定の耐性遺伝子の検出により行う。しかし、遺伝子型の検出は、表現型と違い想定される遺伝子のみを検出になるため、検出漏れが発生してしまう。今やMRSAに関してもmecA以外にも遺伝子が存在するため、それらの場合はMRSAを見逃してしまうことになる。一方で、遺伝子検査は迅速に結果を得ることが出来るため、耐性遺伝子が陽性になれば早期に抗菌薬適正使用や感染対策が可能となるためメリットも大きい。近年、耐性遺伝子の検査も自動化されており、国内外から多くの機器が発売されている。しかし、それら自動機器は高価であり、ランニングコストも通常よりもかかるため、日常検査への導入には時間を費やすと考えられる。従来から耐性遺伝子の検出には、In house PCRにより実施されてきた。サーマルサイクラーと電気泳動装置があれば低価格で検査が行えるのが利点である。近畿地区では、疫学解析用にPCR-based ORF Typing(POT法)を推奨し、これら機器の導入が進み、市中病院においても多くの施設でIn house PCRの実施が可能となった。加えて、それらの施設はESBLやCPEなどの耐性遺伝子の同定をシカジーニクス® ESBL遺伝子型検出キット(関東化学)やシカジーニクス® カルバペネマーゼ遺伝子型検出キット2(関東化学)を使用し遺伝子の同定を試みている(図7)。今まで、大学病院などの大病院でのみ可能であったIn houseによるPCR検査が、市中病院でも実施可能になってきたことは、感染症診断において大きなインパクトを与えている。今後も日常臨床で有効なキットの開発を期待したい。

05 | おわりに

世界的に薬剤耐性菌が問題となる中で、日本においては海外からの薬剤耐性菌の流入を防止するために、積極的なスクリーニングを行わなければならないと考える。一方、国内ではIMP-6型MBLを中心に“ステルス”と呼ばれる株が多く、これらを見逃さない工夫も必要となる。様々な検出方法が研究・開発される中で、自施設に合った方法を取り入れることが重要となってくる。また、地域における薬剤耐性菌の情報を共有することで、抗菌薬適正使用や感染対策がより充実したものになると思われる。

参考文献

- 1) A. Fleming, *Br J Exp Pathol* **10**(3), 226-236 (1929).
- 2) N. Yamashita, Y. Katakawa, H. Tanaka, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **143**, 38-45 (2017).
- 3) A. Kojima, Y. Ishii, K. Ishihara, H. Esaki, T. Asai, C. Oda, Y. Tamura, T. Takahashi, K. Yamaguchi, *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**(8), 3533-3537 (2005).
- 4) P. Morency-Potvin, D. N. Schwartz, R. A. Weinstein, *Clin. Microbiol. Rev.* **30**(1), 381-407 (2017).
- 5) 荒川宜親, 日本化学療法学会雑誌 **63**(2), 187-197 (2015).
- 6) M. S. Arcilla, J. M. van Hattem, M. R. Haverkate, M. C. J. Bootsma, P. J. J. van Genderen, A. Goorhuis, M. P. Grobusch, A. M. O. Lashof, N. Molhoek, C. Schultsz, E. E. Stobberingh, H. A. Verbrugh, M. D. de Jong, D. C. Melles, J. Penders, *Lancet Infect Dis* **17**(1), 78-85 (2017).
- 7) L. Garcia-Álvarez, M. T. G. Holden, H. Lindsay, C. R. Webb, D. F. J. Brown, M. D. Curran, E. Walpole, K. Brooks, D. J. Pickard, C. Teale, J. Parkhill, S. D. Bentley, G. F. Edwards, E. K. Girvan, A. M. Kearns, B. Pichon, R. L. R. Hill, A. R. Larsen, R. L. Skov, S. J. Peacock, D. J. Maskell, M. A. Holmes, *Lancet Infect Dis.* **11**(8), 595-603 (2011).
- 8) K. Becker, S. van Alen, E. A. Idelevich, N. Schleimer, J. Seggewiß, A. Mellmann, U. Kaspar, G. Peters, *Emerging Infect Dis.* **24**(2), 242-248 (2018).
- 9) S. Schwendener, K. Cotting, V. Perreten, *Sci Rep* **7**, 43797 (2017).
- 10) S. Mancini, F. Laurent, T. R. Veloso, M. Giddey, J. Vouillamoz, F. Vandenesch, P. Moreillon, J. M. Entenza, *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**(4), 2435-2438 (2015).
- 11) D. R. Bhatta, L. M. Cavaco, G. Nath, K. Kumar, A. Gaur, S. Gokhale, D. R. Bhatta, *BMC Infect. Dis.* **16**, 199-205 (2016).
- 12) Center for Disease Control and Prevention, "Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings" (2007, <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/isolation-guidelines.pdf>).
- 13) N. Shigemoto, R. Kuwahara, S. Kayama, W. Shimizu, M. Onodera, M. Yokozaki, J. Hisatsune, F. Kato, H. Ohge, M. Sugai, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **72**(1), 109-112 (2012).
- 14) Center for Disease Control and Prevention, *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51**(15), 343 (2002).
- 15) R. Viau, K. M. Frank, M. R. Jacobs, B. Wilson, K. Kaye, C. J. Donskey, F. Perez, A. Endimiani, R. A. Bonomo, *Clin. Microbiol. Rev.* **29**(1), 1-27 (2016).
- 16) 中村竜也, 小林沙織, 大沼健一郎, 楠木まり, 林 伸英, 大路 剛, 時松一成, 三枝 淳, 荒川創一, *感染症誌* **91**(1), 14-19 (2017).
- 17) K. van der Zwaluw, A. de Haan, G. N. Pluister, H. J. Bootsma, A. J. de Neeling, L. M. Schouls, *PLoS ONE* **10**(3), e0123690 (2015). *Infect. Dis.* **72**(1), 109-112 (2012).