

院内感染対策に有用な PCR-based ORF Typing法 (POT法) の原理

Principles of PCR-based ORF Typing – useful tool
for nosocomial infection control.

藤田医科大学医学部微生物学講座 准教授 鈴木 匡弘

Masahiro Suzuki (Associate Professor)

Fujita Health University, School of Medicine, Department of Microbiology



キーワード

薬剤耐性菌、分子疫学解析、POT法

01 | はじめに

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) などの薬剤耐性菌は、院内感染の原因菌として感染管理の対象となって久しい。院内アウトブレイクは患者の利益を損ねるだけでなく、医療機関の費用負担も膨らませるため、なるべくなら避けて通りたい事故である。一方で、完全に院内アウトブレイクをなくすことは困難とみられ、次善の策としてアウトブレイクを早期に発見し、拡大を最小限に止めることが現実的な選択となる。

病院内での水平伝播の解析は薬剤耐性菌が指標となることが多い。これは多くの病原菌が抗菌薬に感受性であるため、薬剤耐性菌を指標としやすいことによると考えられる。ところが、MRSAや基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌などは、すでに広く蔓延しており、日常的に検出される。検出数の多い耐性菌については病院内で伝播したのか、外部からの持ち込みなのか明確でないことも多い。その一方、多剤耐性アシネトバクター属菌 (MDRA) やカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) のように検出例が限定され、適切に制御することで今後の蔓延を防ぎ得るものもある。検出頻度が低い耐性菌の場合、検出数が増えること自体が院内伝播を疑うに十分であるが、その一方対策を行うためにより明確な証拠を求められることもある。

アウトブレイクの発生源が明確に認識されていない状況では感染対策が後手に回る可能性が憂慮されるが、分子疫学解析によって分離株の遺伝子型が同一か否かを調査することで明瞭になることが多い。アウトブレイクした株は同一遺伝子型となるため、水平伝播した範囲を明確に特定できる。従来、分子疫学解析ではパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を用いることが多かったが、時間とコストがかかること、結果の読み取りや説明が難しいことなどから広く用いるにはハードルが高かった。ところが、PFGEの欠点の多くを克服したPCR-based ORF Typing法 (POT法) の登場によって、細菌検査室で容易に分子疫学解析することも可能になってきた¹⁾。ここでは簡易なタイピング法であるPOT法の原理とPOT法によって得られる遺伝子型の特徴について解説する。

02 | 分子疫学解析

分子疫学解析は各菌株の遺伝子等の違いを利用して分離株を分類し、疫学調査に利用する解析手法である。個々の遺伝子に注目して分類していくアプローチもあるが、ここでは染色体全体の遺伝子型のタイピング法について紹介する。染色体の遺伝子型を決めることで分離菌がどのようなクローンであるか、複数分離株が存在する場合に同一株か否かを調査することができる。染色体のタイピングでは目的に応じて株レベルまで細分したり、近縁な遺伝子型をまとめたクローンレベルで分類したりする。

染色体の遺伝子型を決める方法として1990年頃からPFGEが利用されてきた²⁾。PFGEは染色体DNAの制限酵素切断パターンを電気泳動によって可視化するが、株レベルの菌株識別能を誇るタイピング法としては長らくほぼ唯一の方法であった。MRSA USA300³⁾や*Clostridioides difficile* NAP1 (PCR-ribotypeでは027)⁴⁾のようにPFGEパターンの多様性に乏しい一部のグループに属する菌では、PFGEによってクローンを決める場合もある。しかし、PFGEは専用の特殊な電気泳動装置が必要であること、少なくとも3日と時間がかかること、結果の解釈やデータベース化が難しいことなど、使いにくい面もある。さらに、電気泳動パターンとして得られる結果を客観的に判断することが求められるため、結果の解釈を行えるようになるまでにはある程度の経験が必要である。

PFGEよりも客観的に菌株の分類が可能な方法として、MultiLocus Sequence Typing法 (MLST) が挙げられる。MLSTでは通常7カ所のハウスキーピング遺伝子の塩基配列決定を行い、その多型性を利用して分類を行う。各遺伝子座の塩基配列多型とその組み合わせはインターネット上のデータベースに登録されており、各遺伝子型は番号で記載される。その遺伝子型はSequence Type (ST) と呼ばれ、分離株の配列データをMLSTデータベースに問い合わせることでST番号が得られる。登録された順に番号が振られているため、ST番号を見ただけでは近縁関係はわからず、データベース上の各領域の番号を調べる必要がある。多くの場合MLST解析の菌株識別能

力は高くはなく、例えば院内感染疑い時の同一株を決めるには不十分であることが多い。その一方、シーケンススペースの解析であることからデータの共有が容易であること、菌株識別能力が高すぎないことから、世界的な流行クローンを調査するのに有効な手法である。

他にもrep-PCRやMultiLocus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVAあるいはVNTR)、PCR-Ribotypingなどいくつかのタイピング法が開発され、菌種によっては標準法として用いられている。また、近年は全ゲノム解析が容易となったため、全ゲノムデータを利用してタイピングする方法も工夫されているが⁵⁾、ここでは割愛する。

大きな流れとしては全ゲノム解析に向かっているように見えるが、全ゲノム解析も含め、どの方法も一長一短があるので、目的に応じて使い分ける必要がある。

03 | PCR-based ORF Typing法 (POT法)

POT法は院内感染疑い時に迅速に菌の遺伝子型を決め、院内感染対策に利用することを想定して開発されたタイピング法である。従来PFGEを必要とした検査を短時間かつ容易に、細菌検査室でも実施可能となるよう目指して設計してある。

POT法はその名が示すようにPCRによる菌のタイピング法である。従来PCRによるゲノムのタイピングには特異性の低いプライマーのアニーリング(ランダムプライム)を利用することが多く、結果の再現性や読み取りに難があったが、POT法は検出遺伝子を固定することで再現性と結果の読み取りを容易としている。更に、複数の遺伝子を同時増幅可能なマルチプレックスPCRを採用しているため、従来からのエンドポイントPCRに必要な実施時間に相当する半日程度で結果が得られる。

POT法は汎用されるタイピング法に比して人為的に設計された方法であるため、特定の菌種・クローンに特化しているが、その分、実用性が高い方法である。POT法では解析対象を臨床分離される菌に特化させることで、臨床現場へわかりやすいデータを迅速に提供するために必要十分な菌株識別能力を発揮するよう設計してある。また、操作を覚えやすいよう、シカジーニクス® 分子疫学解析POTキットシリーズ(関東化学株式会社)の作業手順は統一されている(図1)。

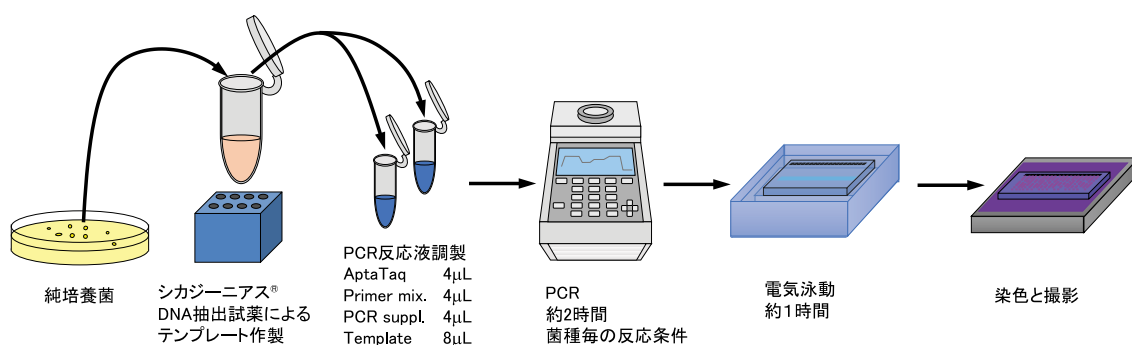


図1 シカジーニクス® 分子疫学解析POTキットシリーズのワークフロー

シカジーニクス® 分子疫学解析POTキットシリーズの手順は熱抽出によるテンプレート作製、PCR反応液の調製、PCR、電気泳動、インターカレーター(エチジウムブロミド等)による染色と撮影からなる。PCR反応液の調製はAptaTaq DNA polymerase、Primer mixture、PCR supplementを各4μL混合し、テンプレートDNAを8μL添加する。これを2種類のPrimer mixtureそれぞれに作成する。PCR反応条件は菌種毎に異なる。電気泳動はアガロースを用いる場合4%濃度の高解像度のものを用いる。

PFGEとの比較では短時間で結果が得られる、結果を数値として表記できる、判断基準が明確である、必要とする機器のコストが低いといったメリットがある。その一方、菌種毎にキットを準備する必要がある、対象菌あるいは対象クローン以外は菌株識別能力が低い、あるいは実施できないといった欠点もある。

04 | POT法の原理

POT法では菌株毎に保有状態の異なる遺伝子の読み枠(Open Reading Frame; ORF)を複数(約20個)PCRで検出し、その検出パターンによって遺伝子型を決めている。POT法における検出対象のORFは、対象菌種の全ゲノム配列を複数株で相互比較し、臨床分離株における保有状態調査を経て決定している。ゲノムを比較するとほとんどの菌種で①「MLSTと関連のある保有パターン」を示すORF群と、②「同一ST型内において多様な保有パターン」を示すORF群がみられる。最初に設計された黄色ブドウ球菌用のPOT法では②のORFは主にプロファージ内に存在したため、Phage ORF typingとして発表したが⁶⁾、後に菌種によって検出対象のORFがプロファージとは限らなくなったため、PCR-based ORF Typing法に名称変更した。

現在利用可能な5菌種のPOT法全てが①と②のORFを組み合わせ、約20個を検出している。菌種によって、MLSTレベルで多様なクローンが検出される菌(緑膿菌、*C. difficile*)と特定の流行クローンが多数検出される菌(MRSA、ESBL産生大腸菌、*Acinetobacter baumannii*)とに分かれるため、前者においては①のORFが、後者においては②のORFが菌株識別能を実現するための中心的な役割を果たしている。それに伴い菌株識別能力も前者はMLST程度であるのに対し、後者はPFGEと同等あるいはPFGEに近いものとなる。どちらの場合もSimpson's indexは0.97~0.98程度である。なお、Simpson's indexは関連のない2株をタイピングしたときに異なる株としてタイピングされる確率を示している。すなわちSimpson's index 0.97の場合、異なる菌株が同一と判定される確率が3%あることを示している。Simpson's indexを算出するウェブサービスがあり(<http://www.comparingpartitions.info/?link=Home>)、容易に計算可能である。ただし、Simpson's indexの計算には関連性のない菌株を用いる必要

があるので、アウトブレイク由来の株を用いて計算してはいけません。

ORFの検出系としては複数遺伝子を同時増幅可能なPCR技術であるマルチプレックスPCRを採用している。増幅産物のサイズはおよそ80bp~600bpの間であり、4%アガロースゲルで分離・解析が可能である。また、PCRにはサーマルサイクラーを使用するが、現在様々なメーカーから発売されている複数の機種が存在する。POT法のPCRでは多くのサーマルサイクラーで同等の結果が得られるが、一部機種では反応温度を調整する必要がある。温度上昇及び降下が緩やかな機種の方が増幅は良好な傾向にあり、高速タイプのサーマルサイクラーで増幅が悪い場合は温度変化を緩やかに設定することで改善する場合がある。

POT法による菌株の解析結果である遺伝子型(POT型)は、POT1-POT2(-POT3)からなる数値(POT値)の組み合わせで記載される。POT1~POT3の数値はそれぞれの検出対象ORFの有無を1, 0に置き換えることで二進法の数値とし、それを十進法に変換することによって得られる。シカジーニクス®分子疫学解析POTキット(関東化学株式会社)の取扱説明書に記載してある係数は 2^n からなる数値で、二進法で得られたそれぞれの数値を十進法へ変換するための定法である。従って、POT型の数値は検出ORFパターンそのもので、POT型からORFの検出パターンを復元することができる。例えば、APIの細菌同定キットにおける数値化を拡張したものと考えると、理解しやすい。十進法に変換するときに係数“1”に係る部分が+の場合だけ奇数となるため、耐性遺伝子などをこの部分に割り当て、特定の遺伝子の存在がわかりやすいように設計してある菌種もある。また、各POT値計算のセットの中で最も大きい係数も固有の数値で、この係数以上であれば最も大きい係数が係る遺伝子が陽性であることがわかる(図2)。例えば、緑膿菌用のPOT法の場合POT2が奇数ならば bla_{IMP} 陽性、64以上ならば bla_{VIM} 陽性である。

バンド パターン	1/0 置換	係数	
—	+ → 1	$64 (2^6)$	$= 64$
—	+ → 1	$32 (2^5)$	$= 32$
	- → 0	$16 (2^4)$	$= 0$
—	+ → 1	$8 (2^3)$	$= 8$
	- → 0	$4 (2^2)$	$= 0$
	- → 0	$2 (2^1)$	$= 0$
—	+ → 1	$1 (2^0)$	$= 1$
			+
			105

図2 バンドパターンからPOT型への変換

バンドの有無を有→1、無→0に変換し、 2^n からなる係数をかけ、和を計算することでPOT値を算出する(この例では105)。係数1のバンドが+の場合のみ奇数となり(青枠部分)、最大の係数のバンドが+の場合のみPOT値は最大の係数より大きくなる(赤枠部分)。これは緑枠部分の係数を全て足しても最大の係数(この例では64)より小さい数(この例では63)にしかならないためである。この性質を利用し、緑膿菌用や大腸菌用のPOTキットではPOT2あるいはPOT3の値から耐性遺伝子などの存在が容易に判定できる。

05 | 黄色ブドウ球菌用POT法 (SA POT法)

MRSAは特定のクローンが流行する細菌である。また、国・地域によって優勢なクローンが異なり、時間経過と共に優勢クローンが変化する現象も観察される。黄色ブドウ球菌用のPOTキットは2010年に発売されたため、当時圧倒的に優勢であったNew York / Japan clone (Ny/Jp clone, ST5, SCCmec type II)を主なターゲットとして設計されている。現在はNy/Jp cloneの比率が低下し、若干菌株識別能が低下する傾向が見られる。特にPOT型106-137-80や106-183-37の菌株は日本での検出頻度が高く、無関係な菌株が同一POT型となることもしばしば起き、結果の判断に迷うことが考えられる。しかし、これらの菌株の比率が日常的な状態から極端に高くなった場合、水平伝播を疑った方が良い。POT型106-137-80や106-183-37など、POT法で識別困難なクローンはPFGEパターンのバリエーションも低い傾向にあり、菌株レベルでの解析が難しい菌株と考えられる。また、増加傾向が見られるUSA300(多くの場合POT型は106-77-113)もPFGEパターンのバリエーションに乏しいクローンであり、POT法による菌株レベルでの識別も難しい。今後このようなバリエーションに乏しいクローンがどのような経過をとるのか注視していく必要がある。

SA POT法ではPOT1を構成する検出ORFとして、SCCmec由来のものが5個とST型依存のものが2個含まれる⁷⁾。SCCmecのtype IIとtype IVについてはPOT法で決めることができ、他については推定となる(図3)。SCCmecとST型依存ORFの組み合わせで、Ny/Jp cloneはほぼ正確に推定可能で、POT1値は93となる。近年増加したPOT1値が106の株はSCCmec type IVでST型はST8またはST1及びそれらの多様体である。

SA POT法の菌株識別能力は主としてPOT2とPOT3の検出パターンによって確保されている。両者の検出ORFの大部分は黄色ブドウ球菌に溶原化したプロファージである⁵⁾。Ny/Jp cloneではSimpson's indexは0.99と極めて高い菌株識別能力を示すが、市中感染型クローンが増えた現在では多少低下していると予想される。

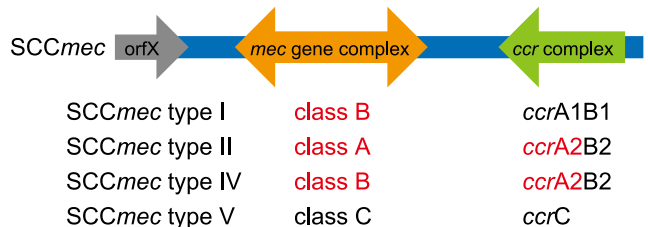


図3 SCCmec構造の概要(黄色ブドウ球菌)

SCCmecはmec gene complexのクラスとcassette chromosome recombinase (ccr)の型の組み合わせでタイプが決まる。SA POT法にはmec gene complex class AおよびB、ccrA2が含まれるため、SCCmec type IIとSCCmec type IVは決まる。

06 | 大腸菌用POT法 (EC POT法)

大腸菌は極めて多様な遺伝子型の菌株が存在するが、EC POT法は主にST131のESBL産生大腸菌をターゲットとして設計されている。様々なST型に分類されるESBL産生大腸菌が存在するが、病院で検出される菌株の多くはST131に分類されるクローンである。POT1の値が49となる株がST131に該当し、十分な菌株識別能力が得られるよう設計されている。実際にはnon-ST131のESBL産生大腸菌に対してもST131と同等の菌株識別能力が得られる。これは、non-ST131のESBL産生大腸菌には多様なクローンが存在することから、そもそもORFの保有パターンの違いも大きいことによる。その一方、POT法が不向きな大腸菌も存在し、例えば腸管出血性大腸菌に対しては極めて限定的な識別能力しかない。

EC POT法におけるPOT2とPOT3を構成する検出ORFは、前述のとおり特にST131の分離株で菌株識別能力が高くなるよう設計されている。ST131の分離株においては、PFGEを画像解析しバンドパターンの相似度を示す指標であるDice coefficientを計算した場合の相同性90%程度に相当する菌株識別能力がある。Simpson's indexは約0.97である。加えてPOT2にはESBL遺伝子であるCTX-M-2及びCTX-M-1、POT3にはCTX-M-9の各CTX-Mグループの検出プライマーが含まれている。これらの遺伝子を保有する株は、それぞれPOT2の値が128以上及び奇数、POT3の値が奇数となる。

07 | 緑膿菌用POT法 (PA POT法)

緑膿菌はカルバペネム耐性菌だけを取り上げても、極めて多様なクローンが検出される。メタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌の場合クローナルな流行が見られることもあるが、多くの場合分離されるクローンには多様性がある。緑膿菌のPOT法はPOT1によってMLST程度の菌株識別能力を確保しており、POT1が菌株識別の主要な部分を担っている⁹⁾。POT1の値はST型とある程度相関する。しかしPOT1の値は1024 (2¹⁰)未満なので、多様性の高い緑膿菌のST型を網羅するには不十分である。そのため、同一POT1値を持つグループでも、MLSTレベルで異なるクローンが混在することは避けられない。

PA POT法におけるPOT2はプロファージのORFを中心に検出し、菌株識別能力向上に寄与している。設計当初、メタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌として多く検出されていたST235 (POT1の値は207となる)における性能向上を目指したが、ST235以外のクローンでも菌株識別能力に寄与する。POT2-4はインテグロンに関連する遺伝子で、プラスミドに乗っていることがあり、脱落が観察されたことがある。またPOT2にはbla_{IMP}とbla_{VIM}の検出プライマーが含まれており、これらの遺伝子を保有する株は、それぞれPOT2の値は奇数、64以上となる。

PA POT法のSimpson's indexは0.98である。緑膿菌は同一クローンが長期間優勢になることは少ないようで、実用上問題の無い菌株識別能力が維持されていると考えられる。

08 | Clostridioides difficile用POT法 (CD POT法)

CD POT法も他の菌種のPOT法と同様に2反応系で試験する(図4)。*C. difficile*は多様なクローンが分離されるが、その一方でPCR-Ribotypingにより決定されるグループであるPCR-ribotype 014や018など、分離頻度が高いクローンも存在する。PCR-ribotypeとMLSTにはある程度の相関が見られ、分離頻度の高いPCR-ribotype 014の多くの株はST2、018の多くの株はST17に相当する。CD POT法ではPOT1でST型と相関の高いタイピングを行い、POT2で菌株識別能力の補完を行っているが、菌株識別能力の向上は限定的である。少数の解析結果によるデータではあるが、ST2の株はPOT1=485、ST17の株はPOT1=691、ST81の株はPOT1=700となった。また、POT2はPOT1の値が同じ株を細分類する機能に加え、toxin A、toxin B、binary toxinの検出プライマーを含んでおり、toxin陽性の株はPOT2の値が奇数となる。なお、toxin Aおよびbinary toxinについてはPOT2の値から即座に判断することは難しい。POT法に含まれるtoxin AおよびBプライマーはそれぞれ陽性の場合に増幅産物が得られる。暫定値としてCD POT法のSimpson's indexは約0.97となった。分離頻度が高いST型の場合、POT法によるタイピング結果も同一POT型となる可能性が高くなると予想されるため、慎重な判断が必要になると予測される。

なお、*Clostridioides difficile*は、かつて*Clostridium difficile*と記載されていたが、2016年に分類が変更された⁹⁾。

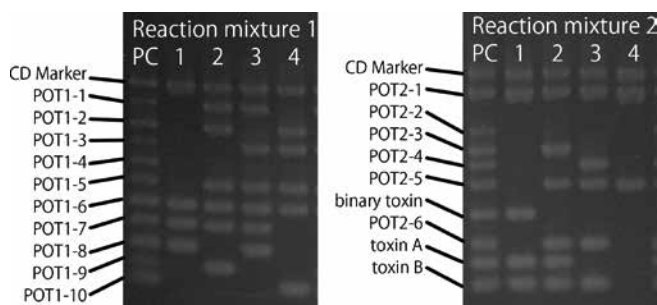


図4 CD POT法における電気泳動イメージ

CD POT法は11-plex PCRと10-plex PCRの2反応系で構成される。POT1の値はMLSTとの相関が高く、POT2は同一ST型内での菌株識別能力の向上に寄与すると共に、toxin A、B及びbinary toxinの検出プライマーを含んでいる。

09 | アシネトバクター属菌用POT法 (AC POT法)

AC POT法は他のPOT法とはやや趣を異にしている。アシネトバクター属菌は菌種同定が難しいことから、*A. calcoaceticus* - *baumannii* complexのうち、臨床分離例の多い*A. baumannii*、*A. nosocomialis*、*A. pittii*、*Acinetobacter species close to A. nosocomialis* (*A. seifertii*に相当すると考えられる)の各菌種のマーカーが加えられている。これらのうち*A. pittii*マーカーの感度が低く、*rpoB*配列によって*A. pittii*と同定された分離菌が*A. pittii*マーカー陰性となることが時々見られる。また、POT1では国際流行クローンの同定を主な目的として検出ORFを決めている。POT1

の値が122であれば、international clone II (IC II)、69であればinternational clone I (IC I)と推定される¹⁰⁾。POT1の値が8になる株が多く見られるが、多様なST型の株が混在しており、この場合ST型を推定することはできない。*A. baumannii*ではない。*A. calcoaceticus* - *baumannii* complexの分離菌でもPOT1の値は得られるが、ST型との関係は不明である。

AC POT法においてもPOT2及びPOT3の値で菌株レベルの識別を行う。但し、菌株レベルの識別はIC IおよびIC IIの場合のみ実施可能で、その他の場合はバンドが少ない、あるいは検出されず、菌株識別に全く寄与しないことが多い。菌株識別能力はPFGEを画像解析しDice coefficientを計算した場合の相同性90%程度であるが、Simpson's indexは0.94と低い。その一方で同一アウトブレイク事例由来株でも、アウトブレイクを構成する菌の主要なPOT型からORF1個違いのPOT型の株がしばしば見つかる。そのためアシネトバクター属菌用POT法では例外的にORF1個違いのPOT型についても同一株である可能性を考慮する必要がある。

10 | POT法による遺伝子型の判定

POT法では同一POT型となった場合のみ同一菌株と判定する(アシネトバクター属菌用POT法を除く)。ORFが1個違う場合の近縁関係については考慮しない。これはPOT法で検出しているORFがファージなどに由来することに起因し、例えば別のファージが溶原化した場合など、一つの変化でORFが1個だけ変わる可能性を説明できないことによる。アウトブレイクを疑う集団の中で同一POT型の株が見られた場合、同一菌株である疑いが濃厚となる。患者や医療従事者の情報など、他の疫学情報を加味して総合的に判断する。また、関連のない株が同一POT型となる可能性があることも考慮する必要がある。特にMRSAの106-137-80のようにしばしば検出されるPOT型の場合は特に注意が必要である。対策としてはアウトブレイクの発生が疑われない時期の菌株について、あらかじめPOT型を調査しておき、平常時の参考データとすることも一法と考えられる。

分離菌の遺伝子型情報は院内感染の発見と制御に大変有益なデータであるが、特定のPOT型が多い場合など限界もある。アウトブレイクの判定には患者情報や医療従事者の情報など疫学情報を加味し、総合的に判断することが重要である。

11 | POT法を実施する際の注意点

POT法は純粋培養菌を用いて試験する。コンタミネーションしている菌の菌種が対象菌種と異なる場合、PCRの増幅が悪くなることなどの影響に留まると予想される。しかし、同一菌種の異なる株が混在した場合、2菌株が合わさった結果が出てくるため、判定できない。最もやっかいなのは混在していることに気づくことが困難ということである。

POT法を実施する際に失敗が多いポイントとしてテンプレート作製が挙げられる。慣れないうちは菌の懸濁濃度が高くなりすぎる傾向が見受けられる。抽出液がうっすら濁る程度で菌量

は十分である。

また、PCR産物のコンタミネーションも発生することがある。PCR反応液を調製する場所と電気泳動する場所は分ける必要があり、それぞれで使用する器具(ピペット、チップ等)も分ける必要がある。特に電気泳動に使用するピペットでPCR反応液を調製してはいけない。

POT法を実施した際に増幅バンドが全く見られないことがある。その場合、コロニーを拾い直し、テンプレート作製から再試験するが、それでもバンドが増幅されない場合は菌種同定の結果を疑う必要がある。

12 | 今後の課題

注目度の高い薬剤耐性菌としてCREが挙げられる。CRE解析の難しさとして菌種が多いこととプラスミド伝播が挙げられる。POT法は各菌の性質に合わせて設計されるため、菌種毎にキットを準備する必要があり、対象菌種拡大を急ぐ必要がある。また、プラスミドの伝播により複数菌種から構成されるアウトブレイクが発生する¹¹⁾。このような事例ではプラスミドの解析を必要とするが、コストが高くつくことや解析手法が発展途上であることから、染色体の解析を行うことによって必要な情報が得られる従来の耐性菌と比べ、分子疫学データを提示することが現状では難しい。プラスミド解析の簡易化は今後の重要な課題である。

もう一つ課題としてあげる必要がある現象として、クローンシフトがある。MRSAではすでに開発時とは異なるクローンが主要なものの一つとして置き換わりつつある¹²⁾。特定のクローンがターゲットとなっているPOT法(黄色ブドウ球菌用、大腸菌用、アシネトバクター属菌用)では今後の流行クローン変化が菌株識別能に大きく影響する可能性がある。流行クローンの変化を注視していきたい。

また、POT法は高度なマルチプレックスPCRを用いているため、その結果の再現性を担保することは重要な課題である。現在1年に1回メーカーズサーベイが行われているが、第三者による外部制度管理評価も必要になってくると予想される。

13 | まとめ

POT法によって分子疫学解析が容易になり、病院内でデータをとることも増えてきた。分子疫学データは感染制御のための強力なエビデンスとなり、上手に活用することで納得のいくアウトブレイク対策がとれる。その一方、分子疫学データに頼りすぎると、本来関連のない分離菌に対して過剰な対応をとったり、あるいは分子疫学解析結果を待ち対応が遅れたりするなど、悪い面が出ることもある。分子疫学解析の特徴を踏まえ、賢く利用してもらいたい。

表1 各種POTキットの特徴のまとめ

		黄色ブドウ球菌用 (SA POT)	緑膿菌用 (PA POT)	アシネトバクテリウム属菌用 (AC POT)	大腸菌用 (EC POT)	C. ディフィシル用 (CD POT)
対象菌種		黄色ブドウ球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	緑膿菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	アシネトバクテリウム属菌 (<i>A. baumannii</i> , <i>A. pittii</i> , <i>A. nosocomialis</i> , <i>Acinetobacter</i> species close to <i>A. nosocomialis</i> の4 菌種)	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)	C. ディフィシル (<i>Clostridioides difficile</i>)
それぞれのPOT法で可能なこと		・菌株の識別 ・MRSAクローンのCC型、SCCmec型の推定	・菌株の識別 ・ST型の推定 ・薬剤耐性遺伝子 (VIM, IMP) の保有状況の確認	・アシネトバクテリウム属菌の菌種の識別 ・ <i>A. baumannii</i> の菌株識別とST型、国際流行クローンの識別	・菌株の識別 ・ST型(特にST131型)の推定 ・薬剤耐性遺伝子 (CTX-M-1,2,9の各グループ)の保有状況の確認	・菌株の識別 ・クローン同定 ・毒素遺伝子 (toxinA, B, binary toxin)の保有状況の確認
バンドの本数	Reaction Mixture 1	12	10	12	12	11
	Reaction Mixture 2	12	9	13	12	10
PCR増幅部位		・ポジティブコントロール ・SCCmec関連遺伝子 ・主にプロフェージを構成する遺伝子のORF	・ポジティブコントロール ・メタロβラクタマーゼ遺伝子 (VIM, IMP) ・主にゲノム全体の遺伝的バックグラウンドを反映する部分 (Genomic Islet)	・各菌種のポジティブコントロール ・ゲノム全体の遺伝的バックグラウンドを反映する部分 (Genomic Islet) ・ <i>A. baumannii</i> IC I, IC IIの菌株識別用として、Genomic Island	・ポジティブコントロール ・ESBL遺伝子 (CTX-M-1,2,9) ・ゲノム全体の遺伝的バックグラウンドを反映する部分 (Genomic Islet) ・菌株識別用として、Genomic Island	・ポジティブコントロール ・毒素遺伝子 (toxinA, B, binary toxin) ・主にゲノム全体の遺伝的バックグラウンドを反映する部分 (Genomic Islet)
検出しているORFの役割	POT1	ST型のうち近縁なものをまとめたclonal complex (CC)型と、SCCmec型の推定	菌株の識別、ST型の推定	菌種、菌株の識別	菌株の識別、ST型の推定	菌株の識別、PCR-Ribotype、ST型の推定
	POT2	菌株の識別	薬剤耐性遺伝子の有無と菌株の識別	菌株の識別 (<i>A. baumannii</i> のみ)	薬剤耐性遺伝子の有無と菌株の識別	毒素遺伝子の有無と菌株の識別
	POT3	菌株の識別	—	菌株の識別 (<i>A. baumannii</i> のみ)	薬剤耐性遺伝子の有無と菌株の識別	—
POT値から得られる情報		・MRSAの場合、POT1の値の合計は64以上 ・MSSAのPOT1の値は30以下の偶数で、多くの場合0,2,4,または6	・メタロβラクタマーゼ産生株の場合、POT2の値の合計は64以上または奇数	・POT値1が1000未満であれば <i>A. baumannii</i> 、1000以上2000未満であれば <i>A. pittii</i> 、2000以上3000未満であれば <i>A. nosocomialis</i> 、3000以上4000未満であれば <i>A. sp. close to A. nosocomialis</i> 、4000以上であればアシネトバクテリウム属菌であるが菌種は不明	・POT1の値が49であれば、ESBL産生大腸菌で多く分離されるST131型 ・POT2の値が奇数であればCTX-M-1 group、128 以上であればCTX-M-2 group、POT3の値が奇数であればCTX-M-9 groupの各ESBL 遺伝子を保有	・POT2が奇数であれば、毒素産生型
識別能		PFGEと同等	MLSTと同等	特に <i>A. baumannii</i> のIC I, IC IIにおいて、PFGE程度	特にESBL産生大腸菌において、PFGEと同等	PCR-Ribotypingと同等(以上)

参考文献

- 鈴木匡弘, THE CHEMICAL TIMES **221**(3), 16-21 (2011).
- S. Ichiyama, M. Ohta, K. Shimokata, N. Kato, J. Takeuchi, *J. Clin. Microbiol.* **29**(12), 2690-2695 (1991).
- L. K. McDougal, C. D. Steward, G. E. Killgore, J. M. Chaitram, S. K. McAllister, F. C. Tenover, *J. Clin. Microbiol.* **41**(11), 5113-5112 (2003).
- C. A. Huber, N. F. Foster, T. V. Riley, D. L. Paterson, *J. Clin. Microbiol.* **51**(9), 2810-2814 (2013).
- S. Quainoo, J. P. M. Coolen, S. A. F. T. van Hijum, M. A. Huynen, W. J. G. Melchers, W. van Schaik, H. F. L. Wertheim, *Clin. Microbiol. Rev.* **30**(4), 1015-1063 (2017).
- M. Suzuki, Y. Tawada, M. Kato, H. Hori, N. Mamiya, Y. Hayashi, M. Nakano, R. Fukushima, A. Katai, T. Tanaka, M. Hata, M. Matsumoto, M. Takahashi, K. Sakae, *J. Appl. Microbiol.* **101**(4), 938-947 (2006).
- M. Suzuki, M. Matsumoto, M. Takahashi, Y. Hayakawa, H. Minagawa, *J. Appl. Microbiol.* **107**(4), 1367-1374 (2009).
- M. Suzuki, K. Yamada, M. Aoki, E. Hosoba, M. Matsumoto, H. Baba, Y. Iinuma, *J. Appl. Microbiol.* **120**(2), 487-497 (2016).
- P. A. Lawson, D. M. Citron, K. L. Tyrrell, S. M. Finegold, *Anaerobe* **40**, 95-99 (2016).
- M. Suzuki, E. Hosoba, M. Matsui, Y. Arakawa, *J. Clin. Microbiol.* **52**(8), 2925-2932 (2014).
- 安部朋子, 永田由美, 松井真理, 青木知信, 柴山恵吾, 塚塚剛史, 山下明史, 堀内寿志, 山口佳子, 渡邊真理, 大隈英子, 黒田誠, 鈴木里和, 日本臨床微生物学雑誌 **27**(3), 158-167 (2017).
- S. Osaka, K. Okuzumi, S. Koide, K. Tamai, T. Sato, K. Tanimoto, H. Tomita, M. Suzuki, Y. Nagano, K. Shibayama, Y. Arakawa, N. Nagano, *J. Med. Microbiol.* **67**(3), 392-399 (2018).