

THE CHEMICAL TIMES

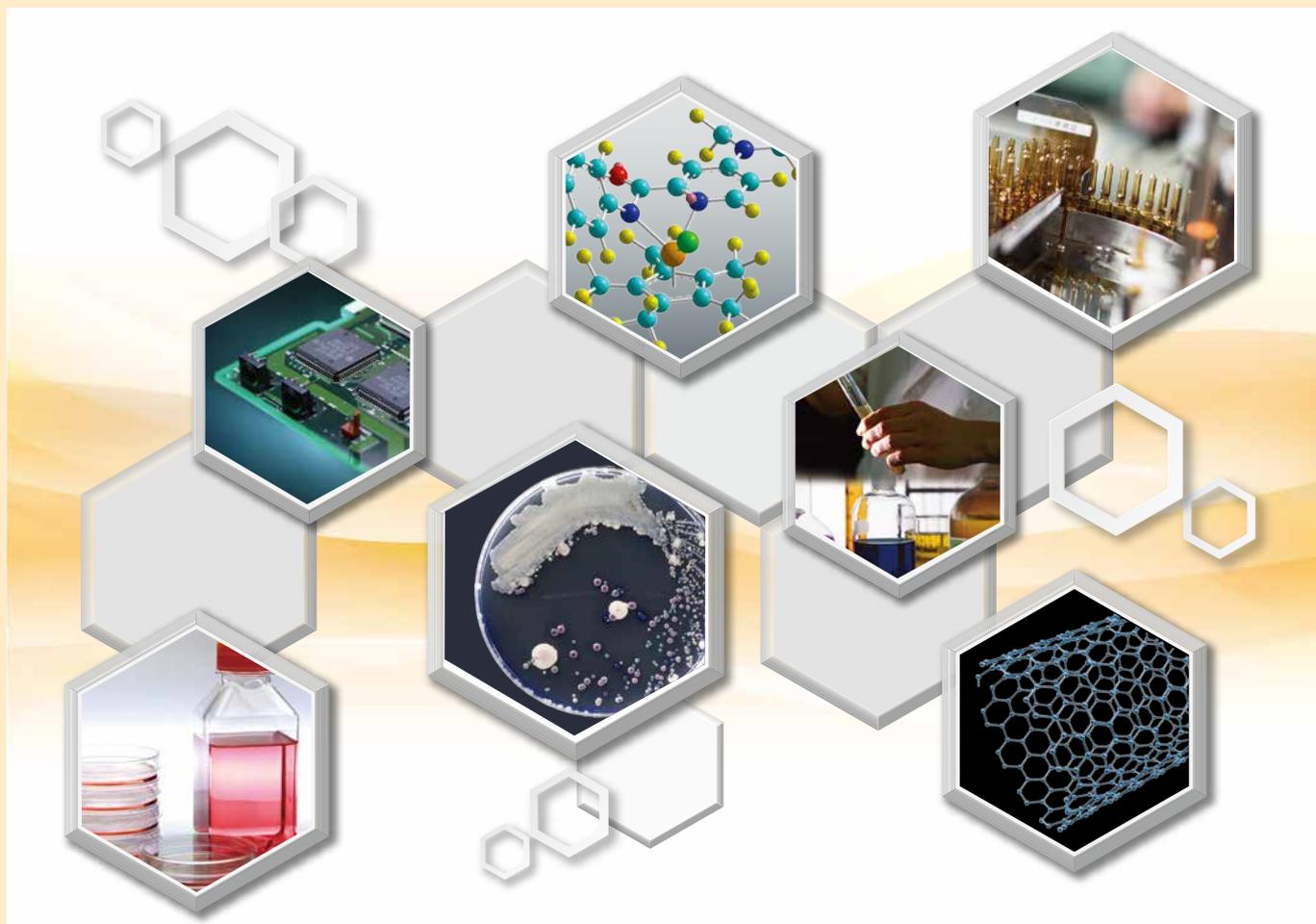
2018 No.4 (通巻250号)

ISSN 0285-2446

特集

感染制御 —薬剤耐性 (AMR)—

- ワンヘルスアプローチに基づく感染制御の重要性 _____ 石井 良和 **02**
- AMR対策に役立つ微生物検査法 _____ 中村 竜也 **07**
～AMRのスクリーニングおよび同定～
- 院内感染対策に有用なPCR-based ORF Typing法 (POT法)の原理 _____ 鈴木 匡弘 **13**
- 当院における医療関連感染対策・抗菌薬適正使用対策について _____ 中家 清隆 **19**
～POT法を活用した対策を含めて～ 掛屋 弘
- ファージセラピーの臨床応用と世界の動向 -パターンソン症例から _____ 藤木 純平、樋口 豪紀 **25**
岩野 英知



ワンヘルスアプローチに基づく 感染制御の重要性

Importance of Infection Control Based on One Health Approach

東邦大学医学部微生物・感染症学講座 教授 石井 良和

Yoshikazu Ishii (Professor)

Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine



キーワード

one health approach, antibiotic resistance, infection control

01 | AMRアクションプラン

抗菌性物質の適切とは言えない使用が一因となり、世界的に薬剤耐性菌の増加が問題となっている。一方で、新規抗菌薬の開発は減少傾向であり、耐性菌による感染症に対する治療薬が枯渇しつつある。2015年5月の世界保健総会で、薬剤耐性 (AMR) に関するグローバル・アクションプランが採択され、加盟各国は2年以内に薬剤耐性に関するナショナル・アクションプランを策定することになった。我が国は、内閣府の「国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議」が、2016年4月にAMRアクションプランを公表した (<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf>)。このアクションプランは、ワンヘルスアプローチの視点に立ち、2016年から2020年までに、我が国の関係省庁、関係機関等が連携してヒト、動物の垣根を越えて取り組むべき対策がまとめられている。具体的には、薬剤耐性対策を推進するため、①普及啓発・教育、②動向調査・監視、③感染予防・管理、④抗微生物剤の適正使用、⑤研究開発・創薬、⑥国際協力の6つの分野に関する目標 (大項目) が設定された。さらに、目標を実現するための戦略 (中項目) 及び戦略を実行するための具体的な取組 (小項目) が設定されている。

日本のAMRアクションプランには数値目標が示されている。しかし筆者は、重要なのは掲げられた数値の達成ではなく、アクションプランを推進することによって、耐性菌の検出頻度を下げ、入手可能な抗菌薬の効力を維持することと、新規抗菌薬の開発がしやすい環境を整備することにあると考えている。

02 | これまでの感染制御の限界

これまで耐性菌は病院内で蔓延するもので、市中の健常人からは検出されないと考えられてきた。院内感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (HA-MRSA) や多剤耐性緑膿菌 (MDRP)、

多剤耐性アシネトバクター属菌 (MDRA) は、フィットネスコストが高く、抗菌薬の選択圧がある病院という特殊な環境下で優位菌となると考えられている¹⁾。したがって、抗菌薬を必要な場合に、適正に使用すれば、これらの耐性菌の分離頻度は減少すると考えられる。我が国におけるMDRPとMDRAの分離頻度は、諸外国と比較すると極めて低く、これまでの感染制御がこれらの耐性菌の制御に奏効していることが理解できる。

臨床材料から分離される緑膿菌のカルバペネム系薬、第三世代セファロスポリン系薬およびフルオロキノロン系薬に対する耐性菌の占める割合は2000年以降減少し続けているが、大腸菌の第三世代セファロスポリン系薬およびフルオロキノロン系薬に対する耐性菌の割合は上昇し続けている。MRSAが黄色ブドウ球菌に占める割合に減少傾向がみられたが、その減少傾向が鈍り、施設によっては再び上昇する傾向が認められている。これらの耐性菌に現行の感染制御が効果を示していないと考えられる。MRSAやESBL産生菌、フルオロキノロン耐性大腸菌などは市中で生活する健常人からも分離されており、市中から病院内への流入が分離頻度の上昇の一因であることが示唆されている。このような耐性菌の分離頻度を低下させるためには、これまでの感染制御だけでは不十分である。

03 | AMRアクションプランを踏まえた 感染制御

1) 市中で拡散する耐性菌

市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (CA-MRSA)

MRSAは、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌が有するペニシリン結合タンパク質 (penicillin-binding proteins: PBPs) と呼ばれる細胞壁合成酵素群に加えて、メチシリンに親和性が低い、PBP2'やPBP2a、MecAと呼ばれる、PBPを有することにより、βラクタマーゼに安定なメチシリンに耐性を示す。前述のようにMRSAのフィットネスコストは高く、メチシリン感受性株とは違い、市中では蔓延しなかった²⁾。

1981年に米国から市中で感染を起こすMRSAが報告されてからCA-MRSAという言葉が使われるようになった³⁾。1999年に

米国からCA-MRSAによる小児の肺炎および敗血症による4死亡例が報告された⁴⁾。

HA-MRSA感染のリスク因子として、入院あるいは手術、長期療養型施設への長期入所、血液透析、カテーテルなどの医療デバイスの留置が上げられる。一方で、CA-MRSAのリスク因子として、抗菌薬使用、糖尿病やアトピー性皮膚炎などの基礎疾患に加えて、集団生活(学校、幼稚園、託児所、軍隊、刑務所、運動競技チーム)や男性同性愛者、感染者のいる家族など皮膚の接触が起こりやすい環境が挙げられる。

CA-MRSAとそれまでの院内感染型MRSA (HA-MRSA)との違いを表1に纏めた。すなわち、HA-MRSAは、主要なメチシリン耐性領域型がSCCmec type IIであること、多剤耐性であること、保有する病原因子が少ないことが特徴である。一方で、CA-MRSAは、主要なSCCmecがtype IVであること、フルオロキノロン系薬やクリンダマイシン、カルバペネム系薬感受性株が多いこと、保有する病原因子が多いことが特徴とされていた。しかし、CA-MRSAの多剤耐性化は徐々に進行しており、フルオロキノロン系薬やクリンダマイシンに耐性を示す株が増加している。

CA-MRSAの中でも伝播力が強く且つ壊死性肺炎や菌血症などの重篤な感染症を発症することから、米国で流行しているUSA300 と呼ばれる特定起源のクローン株が注目された。USA300はPanton-Valentine leukocidin (PVL)と呼ばれる白血球破壊毒素やアルギニン分解酵素などを産生して、病原性を発揮すると考えられている。日本では小児の“とびひ”から高率にCA-MRSAが分離されることが報告されているが、多くがPVL陰性であり、USA300株の分離頻度は高くない⁵⁻⁷⁾。

ESBL産生菌

各クラスに属する主要なβラクタマーゼの名称とその特徴を表2に示した。基質特異性拡張型βラクタマーゼ (Extended-spectrum beta-lactamase: ESBL)は、1983年にDr. H. Knotheらが肺炎桿菌および*Serratia marcescens*が有する伝達性のセフトキシム、セフォキシチン、セファマンドールおよびセフトキシムに対する耐性因子として報告された⁸⁾。その後、本酵素はSHV-1と1アミノ酸残基のみ異なることが明らかとなった。当初、多くのTEM-1、TEM-2およびSHV-1の変異酵素が報告された。これらのESBLの多くはセフトキシムと比較してセフトジジムを効率よく加水分解するという特徴を有し、本酵素産生菌の多くが病院内で分離される肺炎桿菌であった⁹⁾。

2000年を境に、世界的に拡散したESBLの種類と産生菌種に大きな変化があった。すなわち、これまでESBLの主要酵素だったTEM-型やSHV-型のβラクタマーゼに代わり、CTX-M-型が主流となった¹⁰⁾。そして、ESBLの産生菌種がこれまでの肺炎桿菌から大腸菌に変化した。さらに、CTX-M-型ESBL産生大腸菌による感染症は、入院中の患者のみならず市中で生活する健康人にも見られるようになった。ESBL産生菌もMRSAと同様、市中から院内に持ち込まれる病原体である。CTX-M-型のβラクタマーゼは、セフトキシムを効率よく分解することが特徴である。今では、CTX-M-型酵素は*Kluyvera*属菌の染色体上に有するβラクタマーゼがその起源であることが明らかとなっている¹¹⁾。この型のESBL産生菌は、1988年に抗菌薬治験中の犬から分離された。

表1 主要な院内感染型MRSAと市中感染型MRSAの特徴

	院内型	市中型
SCCmec型別	I, II, III	IV, V
MultiLocus Sequence Typingによる型別	ST5 (New York/Japan クローン)	ST1 (USA400 クローン)
	ST247 (Iberian クローン)	ST8 (USA300 クローン)
	ST239 (Brazilian, Hungarian クローン)	ST30 (Global クローン)
		ST80 (European クローン)
		ST59 (Taiwan クローン)
病原因子	toxic shock syndrome toxin-1	Panton-Valentine leukocidin
		表皮剥離毒素
抗菌薬感受性	多剤耐性	多くの抗菌薬に感性

表2 主要なβラクタマーゼの分類と特徴⁹⁾

分類法		別名	阻害の有無		分類基準	代表的酵素
Bush-Jacoby	Ambler		βラクタマーゼ 阻害剤	キレート剤		
1	C	セファロスポリナーゼ	無	無	ベンジルペニシリンと比較してセファロスポリン系薬を良く加水分解、セファマイシン系薬も加水分解	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
2a	A	ペニシリナーゼ(グラム陽性菌)	有	無	セファロスポリン系薬と比較してベンジルペニシリンを良く加水分解	PC1
2b	A	ペニシリナーゼ(グラム陰性菌)	有	無	ベンジルペニシリンとセファロスポリン系薬を同程度加水分解	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	基質特異性拡張型βラクタマーゼ	有	無	オキシイミノβラクタム系薬を加水分解(ESBL)	TEM-3, DHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2d	D	オキサリナーゼ	不定	無	クロキサリリンまたはオキサリリンを加水分解	OXA-1, OXA-10
2de	D	基質特異性拡張型βラクタマーゼ	不定	無	クロキサリリンまたはオキサリリンを加水分解し、オキシイミノβラクタム系薬を加水分解	OXA-11, OXA-15
2df	D	クラスDカルバペネマーゼ	不定	無	クロキサリリンまたはオキサリリンを加水分解し、カルバペネム系薬を加水分解	OXA-23, OXA-48
2f	A	クラスAカルバペネマーゼ	不定	無	カルバペネム系薬、オキシイミノβラクタム系薬、セファマイシン系薬を加水分解	KPC-2, IMI-1, Sme-1
3a	B	クラスBカルバペネマーゼ メタロβ-ラクタマーゼ	無	有	カルバペネム系薬を含む広範なスペクトルを有するが、アズトレオナムは加水分解しない	IMP-1, VIM-1, CcrA, NDM-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1

不定：酵素により反応が異なる

オキシイミノβラクタム系薬：セフトキシム、セフトジジム、セフトリアキソン、セフェピム、アズトレオナム

βラクタマーゼ阻害剤：クラバン酸、スルバクタム、タジバクタム

ESBL産生大腸菌とフルオロキノロン耐性大腸菌

2000年以降、臨床材料から分離される大腸菌に占めるフルオロキノロン耐性大腸菌の割合は年々増加し、現在では臨床材料から分離される大腸菌に占めるフルオロキノロン耐性大腸菌の頻度は25%~30%程度に達している。このような状況下、フルオロキノロン系薬は大腸菌による感染症の治療薬として選択することは適切ではない。

2000年以降、フルオロキノロン耐性大腸菌は、ESBL産生大腸菌と同様に増加の傾向が認められる。また、ESBL産生大腸菌は有意差をもって非産生菌と比較してフルオロキノロン系薬耐性菌が多い。耐性機序が異なる両系統の抗菌薬に耐性を示す大腸菌が増加している理由は良く分からなかった。但し、これらの大腸菌は、O抗原が25、H抗原が4、MultiLocus Sequence Typing (MLST)によるDNA解析により、Sequence Type (ST)131に分類されたという共通の特徴を有したが、Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)によるバンドパターンは異なっていた。抗原型とMLST型が共通していたことから、共通の起源株に由来する可能性が示唆されていた。Dr. J. R. Johnsonらは1960年代からの大腸菌保存株を用いて遺伝解析を実施した。その結果、ST131は2000年より前から分離されていたが、2000年以降に分離された菌株の線毛のタイプが異なることを明らかにした¹²⁾。これらの菌株は、尿路への付着性に重要とされるI型の線毛を有し、線毛がFimH30と言われる特定の型であり、フルオロキノロン耐性であることが明らかとなった。さらに、その後の解析からFimH30_{RS}という特定のFimH30株がESBLを産生することが示され、その発生過程も明らかにされている。この中で、FimH30株の出現にフルオロキノロン系薬の選択圧が関与した可能性が指摘されている。病原性と耐性を同時に示す菌株の選択に抗菌薬が関与する可能性があることは興味深いとともに、抗菌薬の適正使用の重要性を改めて認識させられる結果である。

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)

およびカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE)

カルバペネム耐性因子のうち最も薬剤感受性を低下に関与するのが、カルバペネム系薬分解酵素である、カルバペネマーゼである。1994年にDr. E. Osanoによって*Serratia marcescens*から見出されたIMP-型酵素がclass Bに属するメタロβラクタマーゼ (metallo-β-lactamase: MBL)に関する最初の報告である¹³⁾。

2001年にclass Aに属するカルバペネマーゼであるKPC-型酵素が報告された。本酵素産生株の多くは肺炎桿菌であり、当初は米国ニューヨークを中心に拡散したのちに全米、米国からイスラエルを経由してヨーロッパ、中国、そして世界中に拡散した¹⁴⁾。2004年以降、欧州や北アフリカ、トルコ、インドではclass Dに属するカルバペネマーゼであるOXA-48およびその類縁酵素を産生する腸内細菌科細菌の分離頻度が上昇している¹⁵⁾。そして、2009年、腸内細菌科細菌が産生するMBLであるNDM-1が報告され、世界的な拡散が確認されている¹⁶⁾。日本における主要なカルバペネマーゼは、IMP-型であり、諸外国で検出されるカルバペネマーゼを産生する菌株による感染症は散発的に見られるに過ぎない。しかし、2018年に福島県で確認されたKPC-型酵素産生株によるアウトブレイクを見ると、海外型のCPEが市中で拡散している可能性が否定できないため注

視しなければならない。

本邦で分離されるCPEが産生する主要な酵素は、先に述べたIMP-1あるいはIMP-6である。IMP-6産生腸内細菌科細菌は三重県および近畿地区から中国地区で多く分離されている。一方、IMP-1産生腸内細菌科細菌は前述の地域を除く全国から分離されている。このCPEが産生する酵素型の地域特性認められるがその理由は不明である¹⁷⁾。また、カルバペネム系薬の中にも薬剤によってCPEの検出感度が異なることにも注意が必要である。また、2016年度の厚生労働省院感染対策サーベイランス事業(<https://janis.mhlw.go.jp/>)で纏められたイミペネムあるいはメロペネムに耐性を示す腸内細菌科細菌の内訳を表3に示した(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/cre-m/cre-idwrs/7393-cre-20170613.html>)。数値にはカルバペネマーゼを産生しないカルバペネム耐性株が多く含まれている。

表3 2016年に感染症法に基づいて届け出がなされたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の内訳 (重複を含む)

菌種名	総数	割合 (%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	480	31.3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	470	30.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	180	11.7
<i>Escherichia coli</i>	150	9.8
<i>Serratia marcescens</i>	60	3.9
<i>Citrobacter freundii</i>	44	2.9
<i>Klebsiella oxytoca</i>	26	1.7
<i>Citrobacter koseri</i>	10	0.7
<i>Morganella morganii</i>	9	0.6
<i>Enterobacter asoburiae</i>	8	0.5
<i>Proteus mirabilis</i>	7	0.5
<i>Citrobacter braakii</i>	7	0.5
<i>Providencia rettgeri</i>	6	0.4
<i>Enterobacter intermedium</i>	3	0.2
<i>Providencia stuartii</i>	3	0.2
その他	71	5.1

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/cre-m/cre-idwrs/7393-cre-20170613.html>を引用改変

2)ワンヘルスアプローチ

環境

スウェーデン在住のインド人が、インドから帰国して医療行為を受けた時にカルバペネム系薬耐性肺炎桿菌が分離された。のちに英国の研究者らがこの菌株の耐性機序を解析して、MBLの一つであるNDM-1が発見された¹⁶⁾。その後、英国の研究者らはインドで上下水を採取して解析したところ、NDM-1を産生する赤痢菌やビブリオ属菌を含む多菌種が分離されたことを報告した。このことから、NDM-1産生菌あるいはNDM-1をコードする遺伝子は、インドでは環境中に拡散していることが明らかとなった¹⁸⁾。さらに、シンガポールの病院排水からはNDM-1産生菌やIMP-1産生菌が検出されており、病院が市中を汚染している可能性も指摘されている (TH Koh, personal communication)。また、NDM-1産生サルモネラ属菌が、ドイツの野生のトビから分離されたことが報告されている¹⁹⁾。さらに、NDM-1とは異なるカルバペネマーゼである、VIM-1とVIM-4産生ビブリオ属菌がフランスで野生のカモメから、VIM-4産生サルモネラ属菌と腸内細菌科細菌がオーストラリ

アに棲息する野生のカモメから高率に分離されたことが報告されている^{20, 21)}。

ESBL産生菌は野生のカモメやマガモ、ワシ、トビ、コンドル、チュウヒ、ノスリ、フクロウ、カラスなどの家禽類をはじめ、イノシシ、鹿、キツネなどからも分離されている。これらは米国をはじめ、ポルトガルやフランス、ドイツ、ベルギー、ポーランド、チェコ、セネガル、スウェーデン、ロシア、ゴビ砂漠などの地域から報告されており、広範囲に環境が汚染されている可能性が示唆されている²²⁾。これらの野生動物は、ヒトと住環境が重なっていることも否定できないことから、ESBL産生菌は今後もヒトと野生動物間で相互に影響する可能性があると考えられる²³⁾。

通常、MRSAはMecAと呼ばれる通常のMSSAには見られないPBPを産生することを述べたが、それとは異なる、MecCと命名されたPBP(別名:PBP2A(LGA))を産生する菌株が分離されている。当初、このMecC産生株は牛や羊などの家畜からも分離されることからLivestock-associated MRSA (LA-MRSA)に分類されているが、野ウサギやカワウソなどの野生動物から分離されている²⁴⁾。MecC陽性黄色ブドウ球菌は、牛や羊の畜産農家における感染事例も報告されており、注視すべき耐性菌の一つと考えている。

農・畜・水産

わが国でも家畜の腸管内に耐性菌が保菌されていることは良く知られていた。特に、ブロイラーの腸管内には高率にESBLやAmpC産生腸内細菌科細菌が保菌されている²⁵⁾。その理由として、孵卵場で卵内に接種されていたワクチンに添加されていた広域セファロスポリン系薬が影響を与えている可能性がある。したがってそれを中止することにより鶏肉への耐性菌の混入のみならず、ヒトからの分離頻度も低下する可能性が指摘された²⁶⁾。日本でもこの卵内接種が行われていたが、2012年3月に業界団体が自主的に接種時の抗菌薬の添加を中止したところ、腸管内に保菌するESBLの頻度が有意に低下したことが報告されている²⁷⁾。しかし、筆者はヒトと鶏あるいは鶏肉から分離される大腸菌の遺伝子型とESBLの型が異なることから、鶏肉を汚染する耐性菌がヒトの健康に与えるリスクはゼロではないものの、それほど高くないと考えている。

豚や牛の腸管内や魚の生息環境や搬送用水などからESBL産生菌などの耐性菌が分離されることも報告されている。したがって、私たちは身の回りの多くの食品などが耐性菌の汚染を受けている可能性があることを認識すべきである^{28, 29)}。

中国では、豚および鶏から多様なNDM-型カルバペナーゼ産生肺炎桿菌が分離されている。この報告の中で豚由来のNDM-型酵素産生肺炎桿菌がプラスミド性コリスチン耐性因子として注目されてる*mcr-8*を保有していたと記載されており、今後の動向が注目される³⁰⁾。

2011年から2012年にドイツの養鶏農家で分離された大腸菌とサルモネラ属菌を調べたところ、複数のVIM-1産生株が含まれていたことが報告された³¹⁾。米国から豚の分娩用の部屋の環境からカルバペナーゼ産生腸内細菌科細菌が分離されたことが報告されている³²⁾。さらに、オランダの報告を見ると、オランダの環境水、と殺された豚、ブロイラー、子牛、輸入された観賞魚用水(インドネシア、イスラエル、シンガポール、タイ産)などから*bla*_{oxA-48-like}陽性*Shewanella*属菌が分離されている³³⁾。このことは、カルバペナーゼをコードする遺伝子は環境

を介して、既に拡散している可能性を示唆している。

伴侶動物

輸入観賞魚の水からカルバペナーゼをコードする遺伝子が検出されたことから、伴侶動物も耐性菌の汚染を受けていることは容易に想像できる。Dr. S. Abrahamらはカルバペナーゼ産生菌が伴侶動物を介して拡散する危険性について指摘している³⁴⁾。International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID)は、ネコのブドウ球菌による細菌性毛包炎に対する診断・治療ガイドラインを出している。動物のブドウ球菌がヒトの健康のリスクになる可能性は高いとは言えないが、彼らは伴侶動物の感染症に対する適切な診断と治療は、動物およびヒトの健康に影響を及ぼす多剤耐性細菌の選択を減少させると述べている³⁵⁾。

わが国でもイヌおよびネコから*bla*_{IMP-1}陽性*Acinetobacter*属菌が分離された報告がある³⁶⁾。さらに、2003年から2015年の間、我が国の15都道府県の動物病院を受診したイヌあるいはネコから分離された60株の*Enterobacter*属菌の解析をしたところ、30%以上の菌株がセフトラジジムに、40%以上の菌株がシプロフロキサシンにそれぞれ耐性を示していた。そして、MLSTによる解析から、それらの耐性株は特定のST型の菌株であることが明らかとなった。今後、これら動物由来株とヒト由来の遺伝的関連性を明らかにすることが必要であると考えられる³⁷⁾。

伴侶動物はその所有者と密接に接触することから、新たな伝染経路となる可能性がある。今後は、家畜のみならず、伴侶動物に対するサーベイランスプログラムが必要になると思われる。Dr. L. H. Wielerらはヒト医療や獣畜水産関係の専門家を含む学際的アプローチにより、伴侶動物の所有者と伴侶動物に対する現実的で信頼性の高い調査手段を検討するべきと指摘している。さらに、彼らは基本的な衛生対策、伴侶動物における抗菌薬の適正使用が重要であると述べている³⁸⁾。

04 | 終わりに

上述のようにMRSAやESBL産生菌、カルバペナーゼ産生腸内細菌科細菌などは健康人のみならず、伴侶動物や家畜、環境からも分離されている³⁹⁾。

私たちの教室では、国内のヒトから分離された多数の耐性菌を保有している。また、これまで私たちは、動物や食品、環境などから分離した耐性菌を保有する施設との共同研究を積極的に推進してきた^{25, 36, 40-47)}。これらの研究を通じて、耐性菌による感染症を制御するためには、これまでの感染対策だけでは不十分であることを痛感している。前項で述べたように、今後、耐性菌を含む感染症に関しては、ヒト、家畜、伴侶動物、水産、環境を含めた生態系全体の問題としてとらえた学際的視点に立脚したワンヘルスアプローチによる取組が必要である。

参考文献

- 1) P. Durão, R. Balbontín, I. Gordo, *Trends Microbiol.* **26**(8), 677-691 (2018).
- 2) M. Otto, *Int. J. Med. Microbiol.* **303**(6-7), 324-330 (2013).
- 3) Center for Disease Control and Prevention, *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **30**(16), 185-187 (1981).
- 4) Center for Disease Control and Prevention, *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **48**(32), 707-710 (1999).
- 5) Y. Miura, T. Yamaguchi, I. Nakamura, S. Koyama, K. Tamai, T. Okanda, T. Matsumoto, *Microb. Drug Resist.* **24**(1), 70-75 (2018).
- 6) T. Yamaguchi, S. Okamura, Y. Miura, S. Koyama, H. Yanagisawa, T. Matsumoto, *Microb. Drug Resist.* **21**(4), 441-447 (2015).
- 7) T. Yamaguchi, Y. Yokota, J. Terajima, T. Hayashi, M. Aepfelbacher, M. Ohara, H. Komatsuzawa, H. Watanabe, M. Sugai, *J. Infect. Dis.* **185**(10), 1511-1516 (2002).
- 8) H. Knothe, P. Shah, V. Krcmery, M. Antal, S. Mitsushashi, *Infection* **11**(6), 315-317 (1983).
- 9) K. Bush, *J. Infect. Chemother.* **19**(4), 549-559 (2013).
- 10) D. M. Livermore, R. Canton, M. Gniadkowski, P. Nordmann, G. M. Rossolini, G. Arlet, J. Ayala, T. M. Coque, I. Kern-Zdanowicz, F. Luzzaro, L. Poirel, N. Woodford, *J. Antimicrob. Chemother.* **59**(2), 165-174 (2007).
- 11) R. Cantón, J. M. González-Alba, J. C. Galán, *Front Microbiol* **3**, 110 (2012).
- 12) J. R. Johnson, V. Tchesnokova, B. Johnston, C. Clabots, P. L. Roberts, M. Billig, K. Riddell, P. Rogers, X. Qin, S. Butler-Wu, L. B. Price, M. Aziz, M. -H. Nicolas-Chanoine, C. DebRoy, A. Robicsek, G. Hansen, C. Urban, J. Platell, D. J. Trott, G. Zhanel, S. J. Weissman, B. T. Cookson, F. C. Fang, A. P. Limaye, D. Scholes, S. Chattopadhyay, D. C. Hooper, E. V. Sokurenko, *J. Infect. Dis.* **207**(6), 919-928 (2013).
- 13) E. Osano, Y. Arakawa, R. Wacharotayankun, M. Ohta, T. Horii, H. Ito, F. Yoshimura, N. Kato, *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**(1), 71-78 (1994).
- 14) A. M. Porreca, K. V. Sullivan, J. C. Gallagher, *Curr Infect Dis Rep* **20**(6), 13 (2018).
- 15) A. Mairi, A. Pantel, A. Sotto, J. -P. Lavigne, A. Touati, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **37**(4), 587-604 (2018).
- 16) D. Yong, M. A. Toleman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee, T. R. Walsh, *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**(12), 5046-5054 (2009).
- 17) Y. Ohno, A. Nakamura, E. Hashimoto, H. Matsutani, N. Abe, S. Fukuda, K. Hisashi, M. Komatsu, F. Nakamura, *J. Infect. Chemother.* **23**(4), 224-229 (2017).
- 18) T. R. Walsh, J. Weeks, D. M. Livermore, M. A. Toleman, *Lancet Infect Dis* **11**(5), 355-362 (2011).
- 19) J. Fischer, S. Schmoger, S. Jahn, R. Helmuth, B. Guerra, *J. Antimicrob. Chemother.* **68**(12), 2954-2956 (2013).
- 20) S. Aberkane, F. Compain, O. Barraud, A. -S. Ouédraogo, N. Bouzinbi, M. Vittecoq, H. Jean-Pierre, D. Decré, S. Godreuil, *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**(10), 6594-6596 (2015).
- 21) M. Dolejska, M. Masarikova, H. Dobiasova, I. Jamborova, R. Karpiskova, M. Havlicek, N. Carlile, D. Priddel, A. Cizek, I. Literak, *J. Antimicrob. Chemother.* **71**(1), 63-70 (2016).
- 22) S. Guenther, C. Ewers, L. H. Wieler, *Front Microbiol* **2**, 246 (2011).
- 23) I. Jamborova, B. D. Johnston, I. Papousek, K. Kachlikova, L. Micekova, C. Clabots, A. Skalova, K. Chudejova, M. Dolejska, I. Literak, J. R. Johnson, *Antimicrob. Agents Chemother.* in press (doi: 10.1128/AAC.00519-18).
- 24) G. K. Paterson, E. M. Harrison, M. A. Holmes, *Trends Microbiol.* **22**(1), 42-47 (2014).
- 25) 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).
- 26) L. Dutil, R. J. Irwin, R. Finley, L. K. Ng, B. P. Avery, P. Boerlin, A. -M. Bourgault, L. Cole, D. Daignault, A. Desruisseau, W. Demczuk, L. Hoang, G. B. Horsman, J. Ismail, F. B. Jamieson, A. Maki, A. Pacagnella, D. R. Pillai, *Emerging Infect. Dis.* **16**(1), 48-54 (2010).
- 27) M. Hiki, M. Kawanishi, H. Abo, A. Kojima, R. Koike, S. Hamamoto, T. Asai, *Foodborne Pathog. Dis.* **12**(7), 639-643 (2015).
- 28) A. Kojima, T. Asai, K. Ishihara, A. Morioka, K. Akimoto, Y. Sugimoto, T. Sato, Y. Tamura, T. Takahashi, *J. Vet. Med. Sci.* **71**(10), 1301-1308 (2009).
- 29) R. Schrijver, M. Stijntjes, J. Rodríguez-Baño, E. Tacconelli, N. B. Rajendran, A. Voss, *Clin. Microbiol. Infect.* **24**(6), 577-590 (2018).
- 30) X. Wang, Y. Wang, Y. Zhou, J. Li, W. Yin, S. Wang, S. Zhang, J. Shen, Z. Shen, Y. Wang, *Emerg Microbes Infect* **7**(1), 122 (2018).
- 31) N. Roschanski, J. Fischer, L. Falgenhauer, M. Pietsch, S. Guenther, L. Kreienbrock, T. Chakraborty, Y. Pfeifer, B. Guerra, U. H. Roesler, *Front Microbiol* **9**, 538 (2018).
- 32) D. F. Mollenkopf, J. W. Stull, D. A. Mathys, A. S. Bowman, S. M. Feicht, S. V. Grooters, J. B. Daniels, T. E. Wittum, *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**(2), e01298-16 (2017).
- 33) D. Ceccarelli, A. van Essen-Zandbergen, K. T. Veldman, N. Tafro, O. Haenen, D. J. Mevius, *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**(2), e01013-16 (2017).
- 34) S. Abraham, H. S. Wong, J. Turnidge, J. R. Johnson, D. J. Trott, *J. Antimicrob. Chemother.* **69**(5), 1155-1157 (2014).
- 35) A. Hillier, D. H. Lloyd, J. S. Weese, J. M. Blondeau, D. Boothe, E. Breitschwerdt, L. Guardabassi, M. G. Papich, S. Rankin, J. D. Turnidge, J. E. Sykes, *Vet. Dermatol.* **25**(3), 163-e43 (2014).
- 36) Y. Kimura, T. Miyamoto, K. Aoki, Y. Ishii, K. Harada, M. Watarai, S. Hatoya, *J. Infect. Chemother.* **23**(9), 655-657 (2017).
- 37) K. Harada, T. Shimizu, Y. Mukai, K. Kuwajima, T. Sato, A. Kajino, M. Usui, Y. Tamura, Y. Kimura, T. Miyamoto, Y. Tsuyuki, A. Ohki, Y. Kataoka, *PLoS ONE* **12**(3), e0174178 (2017).
- 38) L. H. Wieler, C. Ewers, S. Guenther, B. Walther, A. Lübke-Becker, *Int. J. Med. Microbiol.* **301**(8), 635-641 (2011).
- 39) R. Köck, I. Daniels-Haardt, K. Becker, A. Mellmann, A. W. Friedrich, D. Mevius, S. Schwarz, A. Jurke, *Clin. Microbiol. Infect.* in press (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X18303392>).
- 40) T. Ohishi, K. Aoki, Y. Ishii, M. Usui, Y. Tamura, M. Kawanishi, K. Ohnishi, K. Tateda, *J. Infect. Chemother.* **23**(3), 165-172 (2017).
- 41) Y. Ishii, K. Aoki, K. Tateda, H. Kiyota, *J. Infect. Chemother.* **23**(9), 583-586 (2017).
- 42) R. K. Shanmugakani, Y. Akeda, N. Yamamoto, N. Sakamoto, H. Hagiya, H. Yoshida, D. Takeuchi, Y. Sugawara, T. Kodera, M. Kawase, W. Laolerd, N. Chaihongsa, P. Santanirand, Y. Ishii, S. Hamada, K. Tomono, *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**(6), e00067-17 (2017).
- 43) H. Hagiya, K. Aoki, Y. Akeda, N. Sakamoto, N. Yamamoto, H. Yoshida, I. Nishi, Y. Ishii, K. Tomono, *Infection* **45**(2), 221-225 (2017).
- 44) N. Yamamoto, S. Hamaguchi, Y. Akeda, P. Santanirand, A. Kerdsin, M. Seki, Y. Ishii, W. Paveenkittiporn, R. A. Bonomo, K. Oishi, K. Malathum, K. Tomono, *PLoS ONE* **10**(7), e0133204 (2015).
- 45) Y. Mano, T. Saga, Y. Ishii, A. Yoshizumi, R. A. Bonomo, K. Yamaguchi, K. Tateda, *BMC Microbiol.* **15**, 41 (2015).
- 46) K. Yaita, K. Aoki, T. Suzuki, K. Nakaharai, Y. Yoshimura, S. Harada, Y. Ishii, N. Tachikawa, *PLoS ONE* **9**(5), e98000 (2014).
- 47) A. Haque, A. Yoshizumi, T. Saga, Y. Ishii, K. Tateda, *J. Infect. Chemother.* **20**(11), 735-737 (2014).

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

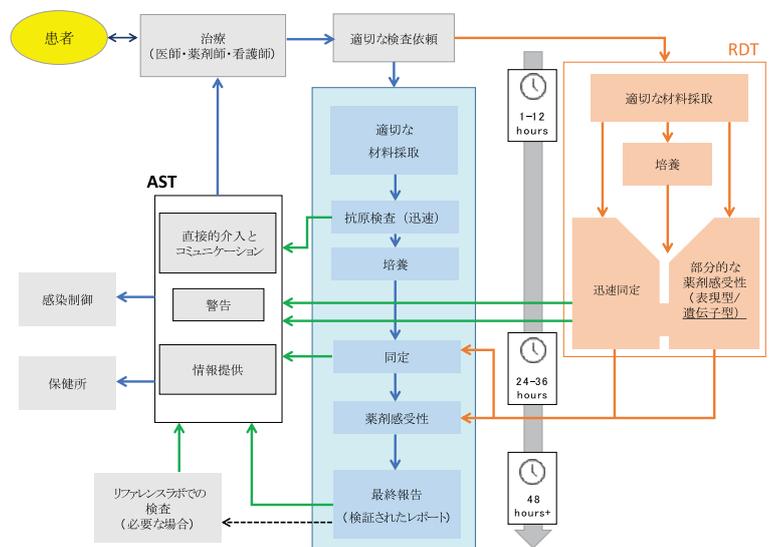
1929年にフレミングによりペニシリウムが産生する黄色ブドウ球菌の発育を阻止する物質すなわちペニシリンが発見され¹⁾、抗菌薬の開発の歴史がスタートした。一方で、ペニシリンの発見以降、様々な抗菌薬が世に登場してきたが、ほとんどの抗菌薬において耐性を獲得した菌が検出されている。しかし、新規抗菌薬の開発は困難を極め、2010年以降に新たに市販された抗菌薬は10薬剤に満たない。それゆえに、早期に耐性菌を検出し拡散を防止することが、抗菌薬適正使用も含めた感染制御において重要である。

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りと考える。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考えられる。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

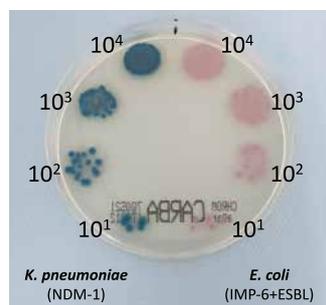


図3 クロモアガー mSuper CARBA 上のコロニーと他の選択培地との比較
クロモアガー mSuper CARBA培地は、大腸菌であればピンク色のコロニーを、それ以外は青色を呈する。菌量が少なくても比較的検出感度が高い選択培地である。また、他の選択培地と比較しても、遺伝子型の種類にかかわらず発育することがわかる。

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ケースが多く、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、

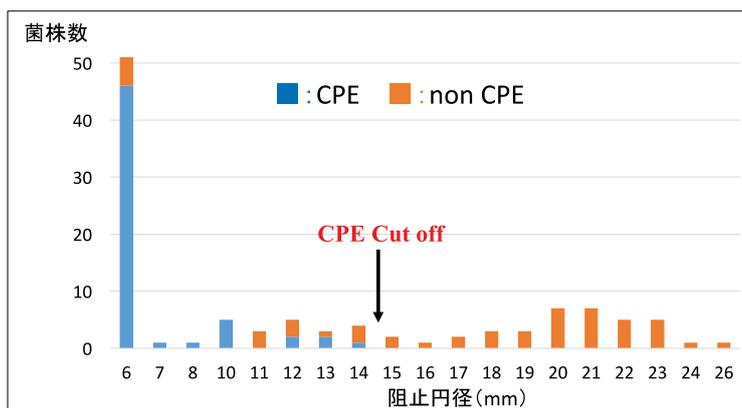
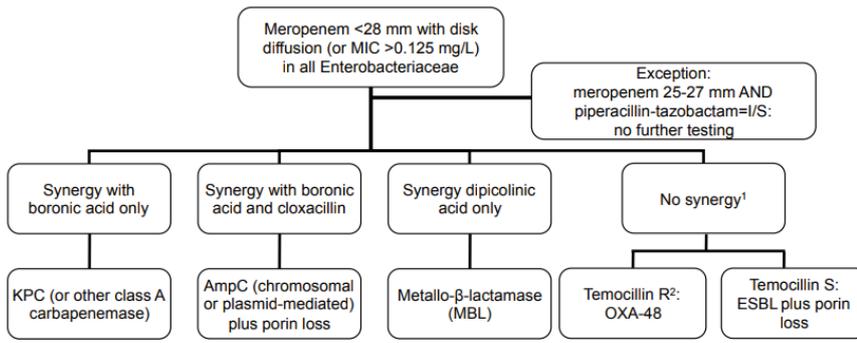


図4 カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlusのFRPM阻止円径カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlusのFRPMの阻止円径を示しているが、15mm以上はCPEが存在しなかった。15mmをCPE検出のCutOff値に設定可能なことを示唆する結果である。Non CPEで15mm以下を示した耐性機序は全てAmpC産生株であった。



- 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 : >128 μ g/mL, Disc : <11mm)はOXA-48の表現型マーカー

図5 EUCASTにおけるカルバペナーゼ検出フロー

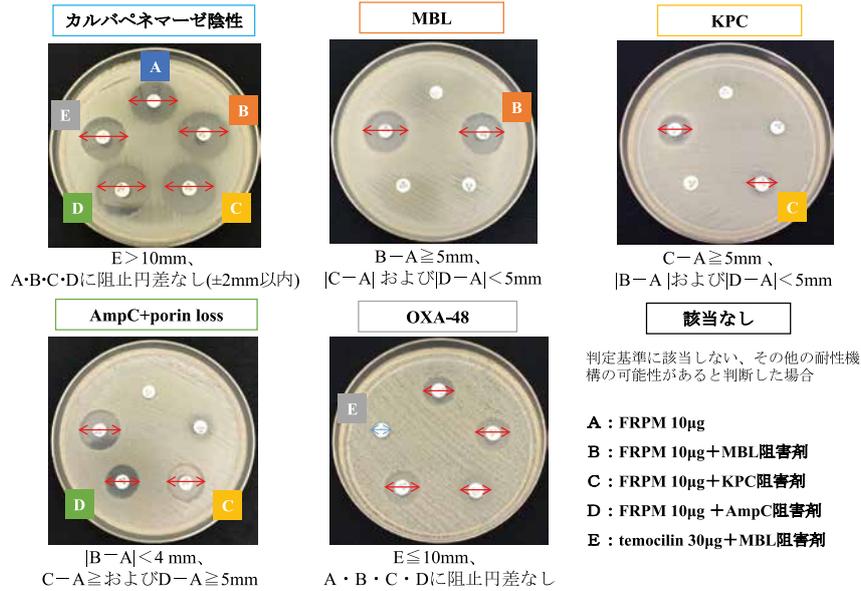
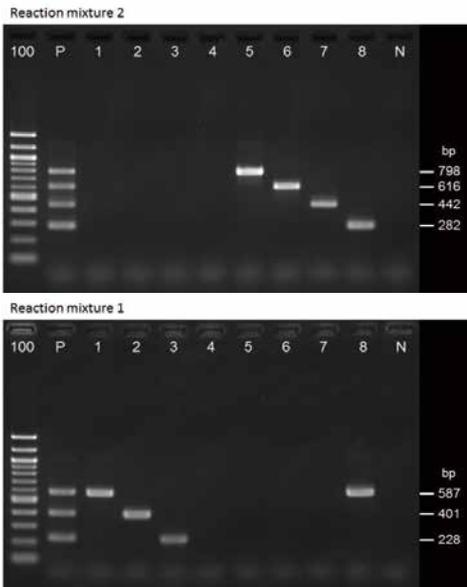


図6 カルバペナーゼ鑑別ディスクPlusにおける各種CREの判定例



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
K.pneumoniae	<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).

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)。

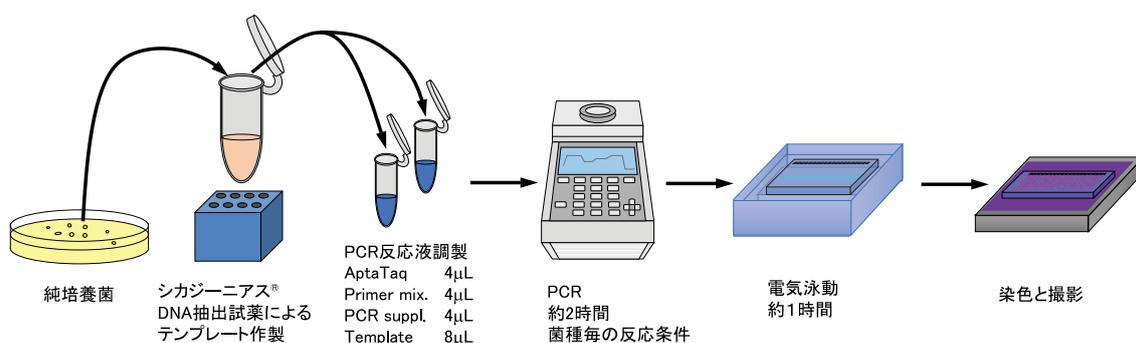


図1 シカジーニクス® 分子疫学解析POTキットシリーズのワークフロー

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、インターカラーター(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が菌株識別能力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ない。

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。

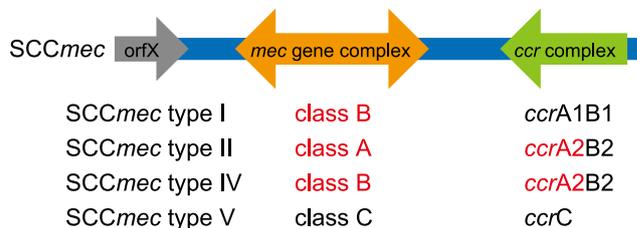


図3 SCCmec構造の概要(黄色ブドウ球菌)

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⁸⁾。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⁾。

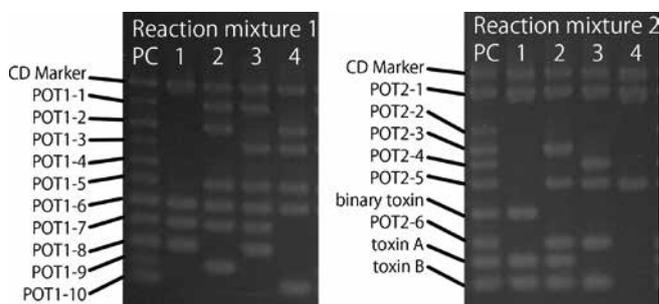


図4 CD POT法における電気泳動イメージ

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 Island)	・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 Island) ・ <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 Island) ・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 Island)
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).

当院における医療関連感染対策・抗菌薬適正使用対策について～POT法を活用した対策を含めて～

Approach of the Antimicrobial Stewardship and infection control at Our Hospital
 ~Approach of infection control by Molecular Epidemiological Analysis using POT methods~

大阪市立大学医学部附属病院 感染制御部 主査／大阪市立大学大学院医学研究科 臨床感染制御学 中家 清隆
 Kiyotaka Nakaie (Section Head)

Department of Infection Control, Osaka City University Hospital / Infection Control Science, Graduate School of Medicine, Osaka City University

大阪市立大学医学部附属病院 感染制御部 部長／大阪市立大学大学院医学研究科 臨床感染制御学 教授 掛屋 弘
 Hiroshi Kakeya (Department manager / Professor)

Department of Infection Control, Osaka City University Hospital / Infection Control Science, Graduate School of Medicine, Osaka City University

キーワード 医療関連感染対策、抗菌薬適正使用対策、PCR-based Open Reading Flame typing (POT) 法

01 はじめに

現在、日本を含めて世界中で薬剤耐性 (Antimicrobial Resistance:AMR) を獲得した細菌の増加が問題となっている。多くの薬剤耐性菌は健康人にとっては害の少ない細菌であるが、免疫の低下している患者には重篤な感染症を引き起こす可能性がある。また、薬剤耐性菌は医療施設でアウトブレイクを引き起こして社会問題となるだけでなく、グローバル化に伴い、海外の超多剤薬剤耐性菌が日本に持ち込まれる例が多数報告されている。さらに薬剤耐性菌は医療環境のみならず、市中や畜産分野でも検出されており、One healthでの対策が求められている。現在の状態のまま、何も対策を実施しなければ2050年には癌による死亡者数を越えるという試算もされ、¹⁾警鐘が鳴らされているが、その対策として、2015年の世界保健機関総会では薬剤耐性 (AMR) に関するグローバル・アクション・プランが採択された。我が国においても2016年に薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランが取りまとめられ²⁾、①普及啓発・教育 ② 動向調査・監視 ③ 感染予防・管理 ④ 抗微生物剤

表1 薬剤耐性 (AMR) に関するグローバル・アクション・プラン6つの分野に関する目標

分野	目標
1 普及啓発・教育	国民の薬剤耐性に関する知識や理解を深め、専門職等への教育・研修を推進する
2 動向調査・監視	薬剤耐性及び抗微生物剤の使用量を継続的に監視し、薬剤耐性の変化や拡大の予兆を適確に把握する
3 感染予防・管理	適切な感染予防・管理の実践により、薬剤耐性微生物の拡大を阻止する
4 抗微生物剤の適正使用	医療、畜水産等の分野における抗微生物剤の適正な使用を推進する
5 研究開発・創薬	薬剤耐性の研究や、薬剤耐性微生物に対する予防・診断・治療手段を確保するための研究開発を推進する
6 国際協力	国際的視野で多分野と協働し、薬剤耐性対策を推進する

薬剤耐性 (AMR) アクションプラン(本体), <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkouyoku/0000120769.pdf>

の適正使用 ⑤ 研究開発・創薬 ⑥ 国際協力の6つの分野に関する目標が設定されている(表1)。

その中で薬剤耐性菌に関する成果目標として、2020年までに肺炎球菌のペニシリン耐性率や黄色ブドウ球菌(MRSA) のメチシリン耐性率、大腸菌のフルオロキノロン耐性率をそれぞれ、15%以下、20%以下、25%以下に低下させる成果指標が作成されている。また、抗菌薬の使用量に関しても、2013年水準の3分の2に減少させる目標も立てられている(表2)。中には目標達成が厳しい項目も含まれているが、各施設において薬剤耐性菌に対する取り組みを実施することが求められている。当院においても、15年前より組織として医療関連感染対策に取り組んできた。その中で分離菌の分子疫学解析を取り入れることで、更に感染対策を充実させることができた。本稿では、PCR-based Open Reading Flame Typing (POT) 法を活用した感染対策を含め、当院の感染対策および抗菌薬適正使用活動を概説する。

表2 薬剤耐性 (AMR) に関するグローバル・アクション・プラン成果目標

ヒトに関して	
1	2020年の肺炎球菌のペニシリン耐性率を15%以下に低下させる。
2	// 黄色ブドウ球菌のメチシリン耐性率を20%以下に低下させる。
3	// 大腸菌のフルオロキノロン耐性率を25%以下に低下させる。
4	// 緑膿菌のカルバペネム(イミペネム)耐性率を10%以下に低下させる。
5	// 大腸菌及び肺炎桿菌のカルバペネム耐性率0.2%以下を維持する。
6	2020年の人口千人あたりの一日抗菌薬使用量を2013年の水準の3分の2に減少させる。
7	// 経口セファロスポリン系薬、フルオロキノロン系薬、マクロライド系薬の人口千人あたりの一日使用量を2013年の水準から50%削減する。
8	// 人口千人あたりの一日静注抗菌薬使用量を2013年の水準から20%削減する。

薬剤耐性 (AMR) アクションプラン(本体), <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkouyoku/0000120769.pdf>

02 | 当院における医療関連感染対策の変遷

当院における最初の医療関連感染対策組織は、2002年に発足したInfection Control Team (ICT)である。当時は主に看護師と臨床検査技師で2週間に一度ミーティングを実施し、微生物検査情報や抗MRSA抗菌薬の使用状況報告を実施していた程度であった。

組織の体制強化としては、2003年に当院での一人目の感染管理認定看護師が誕生し、その後、2007年、2013年にも資格習得者が増え、現場での感染対策の充実に貢献している。2013年には、医師2名、看護師2名(専従)、薬剤師1名(専任)、臨床検査技師1名(専任)の体制で感染制御部が発足したが、翌年、臨床検査技師も専従化されたことにより、豊富な微生物検査データを解析して感染対策に応用できるようになった。

抗菌薬適正使用に関する取り組みとして、2004年に抗MRSA抗菌薬、2011年にはカルバペネム系抗菌薬の抗菌薬届け出を開始した。また、2006年に抗菌薬適正使用ガイドラインを作成し、都度改訂を加えている。さらに、2013年に広域抗菌薬投与例に対する介入や、抗菌薬適正使用ラウンドを開始した。

分子疫学解析については、アウトブレイクを強く疑う事例の場合、外部委託検査でパルスフィールドゲル電気泳動法(Pulse Field Gel Electrophoresis; PFGE)による分子疫学解析を実施していたが、2004年より院内実施に変更した。一方で、PFGE法は、相当な労力と費用がかかるため、2010年よりPOT法³⁾による分子疫学解析を導入した。また2011年より新規MRSA症例の院内伝播か持込かの検討を開始し、アウトブレイク基準についてはPOT法の結果を考慮した基準に変更した。さらに2014年には、臨床検査技師が専従化されたことにより、新規検出MRSA全例に対してPOT法による分子疫学解析を実施することができるようになった。

院内のシステムについては、2007年に病院システムの電子カルテ化によって抗菌薬の届出を電子カルテ上で運用できるようになり、同時に新たな感染制御システムを構築して、感染対策を充実することができた。

03 | 現在の医療関連感染対策運用について

医療関連感染対策の基本は、薬剤耐性菌をつくらないことと、伝播させないことである。薬剤耐性菌をつくらないためには抗菌薬適正使用の推進、伝播させないためには標準予防策や経路別予防策の遵守に加え、伝播の早期発見が重要である。

当院で実施している医療関連感染対策および抗菌薬適正使用対策を頻度別(毎日、毎週、毎月、毎年)に示す。(表3)

毎日実施

朝カンファレンス

毎朝、医師・看護師・薬剤師・臨床検査技師の感染制御部メンバーで、前日の新規血液培養陽性症例、新規耐性菌検出症例(MRSA、MRCNS(メチシリン耐性コアグラウゼ陰性ブドウ球菌)、ESBL(基質特異性拡張型βラクタマーゼ)産生菌、CRE(カ

表3 実施頻度別医療関連感染対策および抗菌薬適正使用対策

実施頻度	内容	区分	
毎日	耐性菌検出報告	感染対策	
	血液培養検出報告	感染対策	抗菌薬適正使用
	広域抗菌薬投与報告		抗菌薬適正使用
	病棟への耐性菌等検出報告、対策確認	感染対策	
毎週	耐性菌検出報告	感染対策	
	血液培養検出報告	感染対策	抗菌薬適正使用
	無菌材料検出報告	感染対策	抗菌薬適正使用
	分子疫学解析(POT法)報告	感染対策	
	アウトブレイクアラート報告	感染対策	
	CD、インフルエンザ、ノロウイルス検出報告	感染対策	
	環境ラウンド	感染対策	
	抗MRSA薬TDM実施報告		抗菌薬適正使用
	血液培養陽性症例 投与抗菌薬ラウンド		抗菌薬適正使用
	長期投与抗菌薬ラウンド		抗菌薬適正使用
毎月	耐性菌検出報告	感染対策	
	血液培養検出報告	感染対策	抗菌薬適正使用
	ICTニュース発行	感染対策	抗菌薬適正使用
	抗菌薬使用状況報告		抗菌薬適正使用
毎年	耐性菌検出年集計報告	感染対策	
	手指消毒薬使用量年集計報告	感染対策	
	アンチバイオグラム作成		抗菌薬適正使用
	抗菌薬使用量年集計報告		抗菌薬適正使用

ルバペネム耐性腸内細菌科細菌)、VRE(バンコマイシン耐性腸球菌)、MDRP(多剤耐性緑膿菌)、2剤耐性緑膿菌、MDRA(多剤耐性アシネトバクター)、2剤耐性アシネトバクター、BLNAR(βラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性)インフルエンザ菌、PRSP(ペニシリン耐性肺炎球菌)など)、広域抗菌薬等(カルバペネム系抗菌薬、第四世代セフェム系抗菌薬、広域ペニシリン系抗菌薬、ニューキノロン系抗菌薬、抗MRSA抗菌薬、抗真菌薬)の新規投与症例を報告している。血液培養陽性症例については、菌名確定例に加えて、菌名が未確定でグラム染色結果のみが判明している途中段階でも報告している。また、耐性菌用スクリーニング培地の発育状況などの情報もこの場で共有している。

血液培養の結果報告については、当院の微生物検査室および、感染症内科医は365日体制で運用している。以前は微生物検査室から主治医や担当医、病棟に連絡をしていたが、2018年より微生物検査室から感染症内科医に連絡体制を変更した。その理由は、報告を受けた感染症内科医が投与されている抗菌薬や検査結果などを確認後、担当医に連絡することで、より迅速に的確な感染症治療を実現するためである。

また、連日(土日分は週明けの月曜日)、感染症内科による届出抗菌薬の管理を行っている。毎朝のカンファレンス終了後、感染症内科医によって、広域抗菌薬等の新規投与症例の抗菌薬の使用理由や培養実施の有無などの確認を行い、必要に応じて培養実施依頼や薬物血中濃度測定依頼などの記載を、簡易な選択により電子カルテに入力できるようにシステムを構築した。(図1)また、血液培養陽性症例についても、同様に抗菌薬投与状況や検査データの確認を行っている。

病棟への耐性菌検出報告・対策確認

感染対策が必要な耐性菌等(MRSA、CRE、MDRP、MDRA、VRE、CD(*Clostridioides difficile*)など)が検出された場合には、看護師と臨床検査技師の複数職種で病棟に訪問して直接報告している。我々は感染対策の実施状況を確認して、必要に

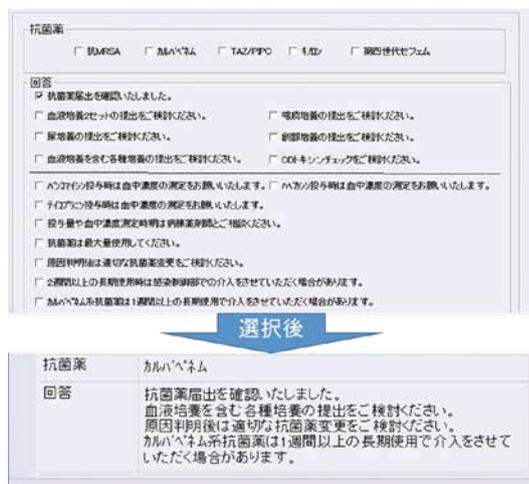


図1 広域抗菌薬新規投与時のカルテ記載入力画面

応じた経路別予防策の実施や個室管理を依頼する。また当院では必要な感染対策に応じて、標準予防策、接触予防策、飛沫予防策、空気予防策の感染対策表示をすべての病室入り口に提示するルールとしている。さらに、リスクに応じて接触予防策表示を通常レベルと高レベルの2段階に設定し、CRE(CPE(カルバペナーゼ産生腸内細菌科細菌))、メタロβラクタマーゼ産生菌、MDRP、MDRA、VREなど高度耐性菌は、高レベルの感染対策を実施する対象として通常の耐性菌(MRSAやCDIなど)と区別している。高レベルの感染対策を実施することの意識付けとして、通常の接触予防策とは異なる色のガウンを着用することにより、周囲スタッフに対しても高度耐性菌に対応していることが分かるように工夫している。(図2)



図2 標準予防策・経路別予防策病室表示

毎週実施

耐性菌等の検出報告

MRSAやESBL、MDRP、MDRA、CREなどの耐性菌については4週間の病棟別の検出状況を報告している。その他、血液培養陽性報告、無菌材料陽性報告、CDやインフルエンザ、ノロウイルスなどの簡易同定検査の陽性報告、POT法による分子疫学解析報告を行っている。集計期間は過去4週間分の集計を行っている。

当院のMRSAのアウトブレイク基準を表4に示す。当院では、アウトブレイク基準を2段階に設定している。持ち込み以外の症例においてPOT法による分子疫学解析で病棟内一致が1例でも検出されればレベル1のアラートとして、標準予防策および接触感染予防策の遵守、環境整備などの感染対策を強化する。さらに複数伝播が確認される場合には、レベル2のアラート

として、手指衛生の直接観察を実施、ベストプラクティスの作成および、遵守状況の確認、必要に応じて環境検査や保菌検査も実施する。また、病棟スタッフ間で意識を高め、危険な状況であることをスタッフで共有認識するために、レベル1、レベル2の院内伝播アラート表示を該当病棟のナースステーションなどに表示している。(図3)

表4 当院のMRSAアウトブレイク基準と対策

対象菌	MRSA
疫学解析	全例POT実施
第一疑アウトブレイク条件	POT法にて同一病棟で同一株が2名以上/4週(持ち込み例を除く)
アウトブレイク疑い時実施内容	・該当部署へ連絡 ・スタンダードプリコーションの遵守と接触予防策の実施の強化 ・環境整備
第二疑アウトブレイク条件	対策実施後に複数名の拡大を認めた場合
アウトブレイク拡大時実施内容	・原因究明のコンサルティング(環境調査・保菌調査(鼻腔・手)・検出患者の要因分析など) ・原因の除去(環境改善・保菌者へのパフトロバン塗布・保菌者の除菌確認など) ・手指衛生直接観察 ・ベストプラクティス作成と遵守状況確認
アウトブレイク解除条件	新規検出(持ち込み例を除く)を4週認めない



図3 院内伝播アラート表示

MRSAについては、POT法による分子疫学解析を定期的実施する以前は、検出数や検出状況によって伝播リスクの判定をしていたが、現在は毎週新規検出MRSA症例に対して全例POT法による分子疫学解析を実施している。しかし、地域の伝播株の存在などの理由から、POT番号が一致した症例すべてが院内伝播とは限らないため、過去の判定方法とPOT法を組み合わせた、独自の院内伝播indexでのリスク判定評価している。(表5)

表5 院内伝播index判定表

入院後経過日数		
基準	考え方	点数
48時間以上	長時間のため院内伝播の可能性は高い	2
48時間以内	短時間のため院内伝播の可能性が低い	0

POT法による分子疫学解析結果		
基準	考え方	点数
同一病棟一致(短期間:2ヶ月)	同一病棟で短期間に検出があるため院内伝播の可能性は高い	3
同一病棟一致(長期間:2ヶ月以上)	同一病棟で一致したため院内伝播の可能性はある	2
別病棟一致(短期間:2ヶ月)	別病棟ではあるが短期間に検出があるため院内伝播の可能性はある	2
別病棟一致(長期間:2ヶ月以上)	別病棟であり、期間があいているため院内伝播の可能性はあるが判定は困難	1
一致無し	院内伝播の可能性は低い	0

微生物検査結果		
基準	考え方	点数
同系材料で初回陰性で二回目以降の検査で検出	院内伝播の可能性が高い	2
入院後に形成された創部などの材料からの検出	院内伝播の可能性が高い	2
初回検査で検出	持ち込みか院内伝播かの判定は困難	1
過去保菌されていて、陰性化されていない	持ち込みの可能性が高い	0

以前の伝播リスク判定方法では、入院後経過時間が48時間以上では伝播した可能性が高い(2点)と判定し、入院後に同系統の材料が陰性と確認されている例で陽性転化した場合や、手術創部など入院前に存在しなかった部位や材料からの検出がある場合は伝播の可能性が高い(2点)と判定していた。現在は以前の判定基準に加え、POT法の結果を反映している。同一病棟から同一POT番号の検出が短期間(2ヶ月以内)にあった場合、最も伝播の可能性が高い(3点)と判定し、2ヶ月以上の期間があいた同一病棟からの検出、別の診療科や病棟からの2ヶ月

以内の同一POT番号の検出がある場合にも、伝播の可能性が高い(2点)と判定している。

環境ラウンド

病棟ラウンドの目的は、院内環境の標準化である。感染制御部スタッフは、感染対策マネージャー(リンクナース・リンクドクター)とともに、定期的に病棟および、外来、検査室、内視鏡室、手術室などの環境について、チェックリストを使用してラウンドしている(表6)。1週間以内に報告書をフィードバックし、2週間後に問題点が改善できているかの確認ラウンドを実施している。チェック項目内容は毎年一部を更新して、新たなチェックポイントを確認するようにしている。また定期ラウンド以外にも月別のテーマを決め、全病棟のラウンドを実施している。

表6 環境ラウンドチェックリスト

1. 環境整備について(状況確認)		
環境整備	点滴調製台 点滴調製台に手指消毒薬が設置され、適切に使用されているか 点滴調製台はエアコンの吹き出し口の下ではないか 点滴作成エリアは整理整頓され、清潔が保たれているか 1日使用回数=(使用量÷手指消毒薬1回使用量)÷開封から経過した日数 消毒用クロスは日付け管理され、蓋が閉まった状態で保管されているか	
	詰所内 汚物室 水回り(シンク等)に防護具や洗浄・消毒済み器材を保管していないか 汚物処理室は整理整頓され、清潔が保たれているか 水回り(シンクや汚物槽等)に防護具や洗浄・消毒済み器材を保管していないか 検体の保管場所は、周囲の器材などを汚染しないようエリアが区別されているか 評価日当日の自動蓄尿器使用患者数は何名か(自動蓄尿器が設置されている部署されている部署のみ確認)	
消毒	血液培養採取や中心静脈カテーテル挿入時の皮膚消毒は、1%ヘキサグアルアルコールを使用しているか	
針刺し事故	針捨て容器にリキャップした針を捨てていないか 使用していない針捨て容器は、蓋が閉まった状態で保管されているか	
2. 感染対策の知識・技術について(質問・技術を確認)		
手指消毒	知識 患者接触前後は、必ず手指消毒をしていますか	
	技術	腕時計・指輪をはずしているか
		指先から行っているか
		手のひらはできているか
		指の間はできているか
		手の甲はできているか
		親指は包み込むようにできているか
		手首までできているか
手全体が消毒できる適量をとっているか		
15秒以上かけて行っているか		
防護具	防護具(手袋・エプロン・マスク)を着用する順番が言えるか	
	防護具(手袋・エプロン・マスク)を外す順番が言えるか	
	防護具(手袋・エプロン・マスク)が正しく着用できるか	
	防護具(手袋・エプロン・マスク)が正しく外すことができるか	
針刺し事故	針刺し・血液曝露事故発生時の対応(流水で洗浄、上司に報告、中検で検査、届出)がどこに記載されているか示してください	
	安全装置付き翼状針で採血する場合の手順(開封～抜針まで)を実践してください	
医療廃棄物	針刺し・切創事故発生時は、感染症の有無にかかわらず、すべて報告していますか	
	鋭利物は、何色のバイオハザードマークに廃棄しますか?	
	血液・体液そのものや組織など液体は、何色のバイオハザードマークに廃棄しますか?	
マニュアル	感染症がある場合で、血液・体液汚染したガーゼは、何色のバイオハザードマークに廃棄しますか?	
	感染防止対策マニュアルの保管場所を知っているか 職員にインフルエンザが発生した時の対応マニュアルの場所を知っているか 感染防止対策の指針の場所を知っているか	

抗菌薬適正使用ラウンド

2014年より医師、看護師、薬剤師、臨床検査技師で毎週抗菌薬適正使用ラウンドを実施している。抗菌薬長期投与例(2週間以上使用、第四世代セフェム、広域ペニシリン、カルバペネム系抗菌薬などの広域抗菌薬の場合は1週間以上の使用を対象とする)(表7)および、血液培養陽性症例に対し、抗菌薬の種類、用量、期間等が適切であるかを判定し、不適切な使用方法の場合、担当医に変更を提案している。

POT法による分子疫学解析の実施

当院では、2010年にPFGE法に代わり、POT法を導入した。PFGEは実施に4日程度を要し、日常業務として実施することは困難であるが、POT法はPFGE法と同等の精度で短時間(4時間程度)に実施可能な検査法である。

POT法導入当初はアウトブレイク疑い時にのみに実施していたが、2014年以降は新規検出全株に対してPOT法による解析を実施している。更に感染対策を充実させるために、2015年からMRSAのPOT法解析頻度を毎月実施から毎週実施に変更した。実施頻度を上げることにより、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)に占めるMRSA率(MRSA検出患者数/*S. aureus*検出患者数)(図4)および、病棟内伝播率(病棟内で同一POT番号検出数(2症例目以降)÷入院新規MRSA患者数)(図5)の有意な院内伝播数の減少が確認された⁴⁾。そのため、現在も毎週実施を継続している。当院でのPOT法実施頻度は、MRSAは毎週実施、ESBL大腸菌は毎月実施、多剤耐性および二剤耐性緑膿菌は毎月実施、多剤耐性および二剤耐性アシネトバクターは、ほとんど検出されないため、検出時に随時実施している。施設によって耐性菌の検出頻度は異なるため、POT法実施頻度はそれぞれの施設の耐性菌検出状況により設定することが望ましいと考える。

表7 抗菌薬長期投与リスト

区分	No	患者ID	患者名	性別	年齢	病棟	診療科	薬品名	開始日	日数	回数
★	1	〇〇〇 〇〇 〇〇	女	43才	〇病棟	〇科	アシクロビン点滴静注用250mg/10mL	〇〇年〇月〇日	20	20	
★	2	〇〇〇 〇〇 〇〇	男	82才	〇病棟	〇科	ザイボックス注射液600mg	〇〇年〇月〇日	18	47	
★	3	〇〇〇 〇〇 〇〇	男	71才	〇病棟	〇科	バンコマイシン塩酸塩点滴静注用0.5g	〇〇年〇月〇日	18	44	
★	4	〇〇〇 〇〇 〇〇	女	61才	〇病棟	〇科	点滴静注用ホスカビル注24mg/mL 250mL	〇〇年〇月〇日	15	15	
★	5	〇〇〇 〇〇 〇〇	男	60才	〇病棟	〇科	バンコマイシン塩酸塩点滴静注用0.5g	〇〇年〇月〇日	14	37	
	6	〇〇〇 〇〇 〇〇	男	77才	〇病棟	〇科	ユナシン-S静注用 1.5g	〇〇年〇月〇日	13	41	
▲	7	〇〇〇 〇〇 〇〇	男	77才	〇病棟	〇科	バンコマイシン塩酸塩点滴静注用0.5g	〇〇年〇月〇日	13	14	
▲	8	〇〇〇 〇〇 〇〇	男	60才	〇病棟	〇科	ゾシン静注用4.5g	〇〇年〇月〇日	13	39	
▲	9	〇〇〇 〇〇 〇〇	女	58才	〇病棟	〇科	メロペン点滴用バイアル0.5g	〇〇年〇月〇日	12	25	
▲	10	〇〇〇 〇〇 〇〇	男	63才	〇病棟	〇科	メロペン点滴用バイアル0.5g	〇〇年〇月〇日	12	39	

★2週間以上投与 ▲カルバペネム系

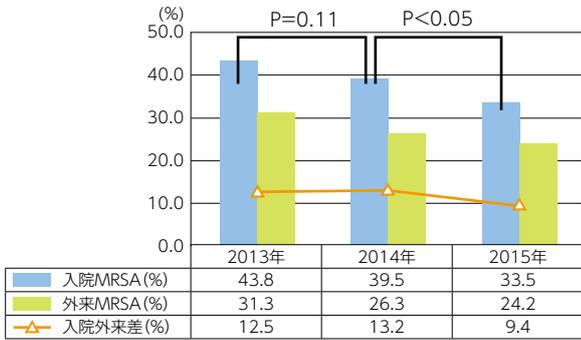


図4 入院・外来別MRSA率の推移
MRSA率:MRSA検出患者数/ S. aureus検出患者数×100 (%)
J Infect Chemother. 2016 Nov;22(11):733-737.

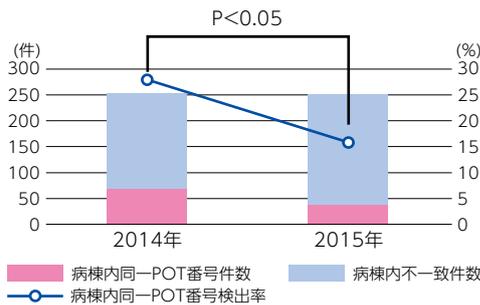


図5 病棟内同一POT番号検出率の推移
同一POT番号検出率:病棟内で同一POT番号検出数(2症例目以降)
/入院新規MRSA患者数×100 (%)
4) J Infect Chemother. 2016 Nov;22(11):733-737.

POT法による分子疫学解析結果のフィードバック

POT法を実施する上で、結果のフィードバックが重要である。当院では、POT法の結果が一致していなくても定期的に結果を病棟および、診療科にフィードバックしている。MRSAを含むブドウ球菌は、乾燥表面で最長で7ヶ月も生存するとされているため、過去一年以内に同一病棟または、同一診療科より同一POT番号の検出があった場合、一致した過去の症例を現場にフィードバックしている(図6)。MRSAのPOT法は毎週実施して、現場にフィードバックすることにより、迅速に感染対策を実施することが可能となり、現場スタッフにしか気付けない、院内伝播要因を見つけられる場合もある。

毎月実施

ICTニュース発行

ICTニュースは毎月発行しており、トピックス、季節性の感染対策、感染対策に関する年集計、血液培養検査集計、針刺し事故件数などを掲載している。(図7)血液培養集計の掲載は2013年から開始しており、診療科別複数セット採取率、診療科別検査提出患者数を掲載していた。過去の複数セット採取率は約40%と低かったが、監視効果や抗菌薬適正使用対策実施により徐々に上昇し、現在では90%を超えている。複数セット採取率は一定の成果が得られたため、現在は広域抗菌薬(第四世代セフェム、広域ペニシリン、カルバペネム系抗菌薬)使用時の血液培養採取率を診療科別にフィードバックすることにより、適切なタイミングでの血液培養検査実施を促している。



図7 ICTニュース(左:血液培養複数セット率、右:広域抗菌薬投与時培養実施率)

毎年実施

アンチバイオグラム

アンチバイオグラム(薬剤感受性率)は施設の状況を反映させた経験的治療(empiric therapy)を行う上で重要なデータである。当院では1年分のデータのアンチバイオグラム(図8)を毎年更新している。グラム陰性桿菌、グラム陽性球菌(ブドウ状)、グラム陽性球菌(連鎖状)など、グラム染色結果別、入院外来別、材料種別、菌種別に集計している。同一菌種でも、一部の菌種では入院外来や材料種別によって薬剤感受性率が異なるため細分化している。しかし、細分化しすぎると件数が少なくなり、データの信憑性が低くなるのが危惧され、一年間の集計期間中に10株以上ある菌種を表示しているが、30株未満のデータは参考値として報告している。施設によっては検出数が異なるため、集計期間や更新頻度、分類方法は各施設で設定することが望ましい。

グラム陰性桿菌(腸内細菌+ブドウ糖非発酵菌)

		0~20%																				20~40%																				40%~60%																				60~80%																				80%~100%																			
材料	入外	菌名	株数	ABPC	PIPC	SBT/ABPC	TAZ/PIPC	CEZ	CTM	CTX	CAZ	CMZ	CCL	FMOX	CTRX	CFPM	CZOP	CFPM-PI	SBT/CPZ	AMK	TOB	GM	MINO	CPFX	LVFX	IPM	MEPM	DRPM	AZT	ST	FOM	CL																																																																					
血液	入院	<i>Escherichia coli</i>	50/146	54.0	56.0	64.0	100.0	76.0	78.0	78.0	84.0	98.0	76.0	98.0	78.0	80.0		100.0	96.0	100.0		84.0	94.0		70.0	100.0	100.0		80.0	84.0	90.0																																																																						
血液	入院	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21/146	9.5	61.9	90.5	95.2	95.2	95.2	95.2	95.2	100.0	95.2	100.0	95.2	95.2		100.0	100.0	100.0		95.2	90.5		100.0	100.0	100.0		95.2	85.7	52.4																																																																						
血液	入院	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14/146		85.7						85.7					85.7	85.7		85.7	100.0	100.0	92.9		92.9	92.9	78.6	100.0	100.0	85.7		14.3	100.0																																																																					
血液	入院	<i>Enterobacter cloacae</i>	12/146	8.3	50.0	25.0	66.7	8.3	16.7	41.7	58.3	8.3	8.3	25.0	25.0	100.0		100.0	75.0	100.0	100.0	100.0	91.7		100.0	91.7	91.7		58.3	91.7	16.7																																																																						
呼吸器	入院	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	151/554		91.4		92.1				91.4					91.4	95.4		88.7	98.0	100.0	92.7		94.0	88.1	82.8	88.1	92.1	87.4		10.6	100.0																																																																					
呼吸器	入院	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	63/554	0.0	50.8	71.4	90.5	79.4	81.0	81.0	84.1	95.2	79.4	98.4	81.0	82.5		100.0	87.3	98.4		87.3	79.4		93.7	98.4	96.8		82.5	82.5	39.7																																																																						
呼吸器	入院	<i>Enterobacter cloacae</i>	54/554	9.3	75.9	22.2	85.2	0.0	14.8	70.4	68.5	5.6	0.0	18.5	70.4	98.1		100.0	87.0	100.0		96.3	94.4		98.1	100.0	100.0		75.9	96.3	24.1																																																																						
呼吸器	入院	<i>Stenotrophomonas (X.) maltophilia</i>	54/554								38.9						3.7					100.0			90.7					100.0																																																																							
呼吸器	入院	<i>Acinetobacter sp</i>	45/554		77.8						88.9						93.3	95.6		93.3	95.6	95.6	95.6	100.0	93.3	93.3	0.0	97.8	100.0		95.6	100.0																																																																					
呼吸器	入院	<i>Escherichia coli</i>	40/554	50.0	55.0	52.5	97.5	77.5	80.0	77.5	87.5	97.5	72.5	97.5	82.5	82.5		100.0	92.5	97.5		85.0	90.0		52.5	100.0	100.0		82.5	80.0	95.0																																																																						
呼吸器	入院	<i>Serratia marcescens</i>	40/554	12.5	90.0	10.0	100.0	0.0	7.5		97.5	95.0	0.0	87.5	90.0	100.0		100.0	100.0	100.0		100.0	97.5		97.5	100.0	100.0		95.0	100.0	32.5																																																																						
呼吸器	入院	<i>Klebsiella oxytoca</i>	24/554	0.0	62.5	66.7	95.8	62.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.8	100.0		100.0	95.8	100.0		95.8	95.8		91.7	100.0	100.0		95.8	95.8	33.3																																																																						
呼吸器	入院	<i>Enterobacter aerogenes</i>	17/554	11.8	82.4	58.8	100.0	11.8	35.3	76.5	88.2	11.8	5.9	29.4	82.4	100.0		100.0	100.0	100.0		100.0	94.1		100.0	100.0	100.0		82.4	100.0	47.1																																																																						
呼吸器	入院	<i>Pseudomonas spp.</i>	13/554		92.3		100.0				100.0					100.0	100.0		100.0	100.0		100.0	92.3		100.0	100.0	92.3		46.2	38.5																																																																							
呼吸器	入院	<i>Citrobacter freundii</i>	11/554	9.1	63.6	45.5	100.0	9.1	27.3	63.6	63.6	45.5	9.1	54.5	54.5	100.0		100.0	100.0	100.0		100.0	100.0		100.0	100.0	100.0		63.6	100.0	90.9																																																																						
呼吸器	外来	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19/47		100.0		100.0				100.0					94.7	94.7		100.0	100.0	100.0	94.7		89.5	94.7	78.9	94.7	89.5	94.7		26.3	100.0																																																																					

図8 当院におけるアンチバイオグラム例

2017年アンチバイオグラム

期間:2017年1月~12月 重複処理:同一患者の場合初回検出を集計
対象:10株以上のものを表示対象とした
(30株未満のものは少数のため参考とさせていただきます、分母は材料・入院外来・菌形態が同一のものです)

04 | 医療関連感染対策効果判定について

医療関連感染対策のさらなる改善には、定期的な評価を行い、PDCA(Plan-Do-Check-Act)サイクルを回していくことが重要である。当院では感染対策の評価項目として、黄色ブドウ球菌に占めるMRSA率、病棟内伝播率および医療経済対効果などを挙げ、評価を行っている。感染対策の改善指標の一つである黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)に占めるMRSA率(計算式:MRSA検出患者数/*S. aureus*検出患者数×100)(図4)の低下を目標としている。

入院時のスクリーニングが全例に実施されていない場合は、検出されたMRSAは持ち込みか、院内伝播かの判定が難しい。POT法導入前は、新規検出数の入院後48時間以降の検出数をモニタリングしていたが、入院時検査をすべて実施しているとは限らず、持ち込みと院内伝播の判定を正確に評価できていなかった。現在はPOT法の結果を利用した、病棟内伝播率(計算式:同一病棟内で6ヶ月以内の同一POT番号検出数(2症例目以降)/入院新規MRSA患者数×100)で評価している(図5)。2017年の当院における、外来又は、入院後48時間以内の持ち込みと判定された新規MRSA検出を表8に示す。持込判定にも関わらず、POT型:106-137-80株は年間30例超も検出され、地域蔓延株の存在を示唆している⁵⁾。病棟内伝播率においても、このような地域蔓延株の影響を受けている可能性もある。

表8 2017年 MRSA持込・外来検出 POT-No別検出件数(3例以上検出)

POT-No	件数	POT-No	件数
106-137-80	31	106-9-2	5
93-189-111	12	108-8-2	4
106-9-80	6	93-191-103	3
106-183-37	6	93-189-125	3

感染対策の医療経済効果については、不必要な支出を抑制できることを示し、増員や設備投資をしても費用対効果があることを明らかにすることが重要である。MRSA感染症例では、医療費が余分に必要となる報告もある⁶⁾。当院で実施した感染対策の改善事例として、POT法の実施頻度を1ヶ月から1週間に変更した前後(2014年と2015年)の病棟内伝播例のDPC区分別の症例数を比較したところ(表9)、MRSA感染症群においてⅢ超入院期間症例数は13例から4例に9例減少したことから、POT法による解析の医療経済的効果が示唆される。

表9 2014年-2015年 病棟内伝播におけるDPC区分別症例数

		2014年	2015年
患者数		70名	40名
DPC区分	I入院期間	5 (7%)	0 (0%)
	II入院期間	18 (26%)	10 (25%)
	Ⅲ入院期間	20 (29%)	16 (40%)
	Ⅲ超入院期間	17 (24%)	8 (20%)
	他DPC外等	10 (14%)	6 (15%)

05 | 地域連携について

当院は感染防止対策加算に係る届出を行っている6施設と連携している。年に4回院内感染対策に関するカンファレンスを実施し、その中で各施設からの耐性菌検出数を定期的に集計してモニタリングしている。また、施設の状況にあわせたアウトブレイク基準の作成や、臨床検査業務における感染対策ガイドラ

インの作成などにも取り組んでいる。さらなる充実のために、連携施設のスタッフに当院の環境ラウンドや抗菌薬適正ラウンドに参加してもらい、自施設での対策に活用してもらっている。さらに、当院スタッフも連携施設に出向き、環境ラウンドや研修を実施することにより、連携施設全体での感染対策強化につながることを期待している。

06 | 最後に

当院の感染対策の内容を概説した。POT法での分子疫学解析は、他施設でも有用性が報告されている⁷⁾⁸⁾⁹⁾。POT法の導入は院内伝播を可視化させ、感染対策の最も大きな分岐点になったと考える。さらに分析結果をリアルタイムに現場に提示することで現場も納得して感染対策強化を実施できている。また、正確な情報伝達は現場のスタッフの対策に問題が無いということを示すことにも有用である。例えば、短期間に複数件数の耐性菌が同一病棟で検出された場合でも、POT法で関連性を否定できれば、現状の対策が正しく実施されていることが証明でき、不必要な感染対策の強化を実施する必要がなくなる。不必要な対策強化は多くの労力を要し、本当に必要な場面での感染対策の遵守率が低下をもたらす可能性もある。現在では現場に耐性菌の報告をした際に、スタッフから「この株のPOT法の結果はいつ出るのですか?」と聞かれるほど、POT法は当院の感染対策に必要な不可欠な存在になっている。

一方、これまで様々な感染対策を講じてきたが、院内伝播は無くなっていない状況である。患者は、「院内伝播が起こらないこと」を当然期待しているであろう。すべての院内伝播を無くすることは容易ではないが、感染制御部と現場スタッフで協力しながら、「院内伝播は起こらないことが当然である」という状況を目指していきたい。

本成果は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業(課題番号JP18fk0108052)の支援により得られました。

参考文献

- 1) J. O'Neill, "Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for health and wealth of nations" (HK Government & The Wellcome Trust, 2014); https://amr-review.org/sites/default/files/AMR_Review_Paper_-_Tackling_a_crisis_for_the_health_and_wealth_of_nations_1.pdf (参照2018-08-07).
- 2) 厚生労働省, 薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン, <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf> (参照2018-07-19).
- 3) 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).
- 4) K. Nakaie, K. Yamada, K. Park, Y. Nakamura, Y. Okada, A. Fujita, H. Fujimoto, Y. Kaneko, H. Takeya, *J. Infect. Chemother.* **22**(11), 733-737(2016).
- 5) 小川将史, 奥田和之, 笠井香里, 阿部瑛紀子, 東良子, 香田祐樹, 角坂芳彦, 葛幸治, *医学検査* **65**(4), 387-391(2016).
- 6) 小林寛伊, 松村千夏, *日本環境感染学会誌* **25**(2), 111-112(2010).
- 7) 野口恵子, 満田正樹, 山崎勝利, 太田岳志, 太田かおり, 山本基, 辰田仁美, *日本環境感染学会誌* **30**(4), 257-261(2015).
- 8) 森山英彦, 松田親史, 柴田宏, 西村信弘, 廣瀬昌博, 長井篤, *感染症学雑誌* **86**(2), 115-120(2012).
- 9) 宮本敦史, 浅岡忠史, 山岡雄祐, 原田百合奈, 田中希世, 原口直紹, 山本和義, 三宅正和, 西川和宏, 池田正孝, 平尾素宏, 中森正二, 関本貢嗣, *日本外科感染症学会雑誌* **11**(2), 121-125(2014).

ファージセラピーの臨床応用と世界の動向 -パターンソン症例から

Clinical application of the bacteriophage therapy and world trend - patterson's case

酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 獣医生化学ユニット 助教 **藤木 純平**

Jumpei Fujiki (Assistant Professor)

Laboratory of Veterinary Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 獣医衛生学ユニット 教授 **樋口 豪紀**

Hidetoshi Higuchi (Professor)

Laboratory of Veterinary Hygiene, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 獣医生化学ユニット 教授 **岩野 英知**

Hidetomo Iwano (Professor)

Laboratory of Veterinary Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University



キーワード

ファージセラピー、AMR、多剤耐性菌、アシネトバクター、パターンソン症例

01 | はじめに

現在、抗生物質の効かない細菌である薬剤耐性菌が世界中で問題になっている。1928年に世界最初の抗生物質であるペニシリンが発見された後1945年に臨床応用され、一度は感染症との戦いは終わったと宣言された。しかし、現代に至るまで抗生物質と多剤耐性菌との「いたちごっこ」が続いており、その状況に人の方が疲弊してしまっている。近年、多剤耐性菌の制御に対して、バクテリオファージ(ファージ)を使用したファージセラピーが注目を浴びている。ファージは細菌を攻撃するが、人体に無害なウイルスである。自然界は多種多様なファージにあふれ、その数は細菌の10倍以上の 10^{32} とも見積もられており、それぞれの細菌に特異的なファージが存在する。生物の腸管にさえ、宿主細菌が存在すれば、それに適応するファージが存在している。ファージは、宿主細菌膜上のレセプター分子を認識し、自身の頭部に格納しているウイルスゲノムを細菌内に送り込み、細菌の持つシステムを利用して娘ファージを大量に作り出し、膜を破壊する溶菌酵素(エンドライシン)によりペプチドグリカン破壊することで細菌は死滅する(図1)。感染サイクルは早いもので30分くらいであり、宿主1個体から100~200の娘ファージが誕生する¹⁻³⁾。ファージは、ペニシリンの発見より13年前の1915年にトゥオートによって発見され、1917年のデレルによる溶菌作用の発見以来、ファージセラピーとして東欧諸国で活発に研究、臨床応用が展開されている。今日、ロシア、ジョージア、ポーランドでのみファージは製剤化⁴⁾されており、盛んに感染症治療への開発が行われている。また、これらの国では現在でも、重大な毒性や副作用無しに⁵⁾ ファージが実際にヒトに対して応用されている。

本稿では、ヒト医療におけるファージセラピーの応用として、

米国での実施例で話題となっているパターンソン症例をNIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases)、FDA主催のワークショップや国際学会における本症例報告の内容も含めて包括的に解説し、ファージセラピーの海外の動向について紹介することでその可能性について論じたい。

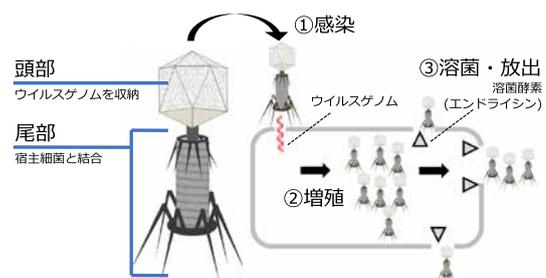


図1 ファージの構造と感染サイクル

02 | ヒト医療におけるファージセラピーの応用; パターンソン症例とは

2016年3月、トム・パターンソン氏は、ファージの全身投与によって、米国で初めてのファージセラピー成功症例として知られることとなった。現在、臨床医学領域において広く知られるパターンソン症例である。

抗生物質に代表される抗菌薬の使用が薬剤耐性菌の出現と蔓延を引き起こしている今日、英国政府によるロード・オニールらの報告⁶⁾によると、“2050年には、薬剤耐性菌によって年間1000万人以上の人々が命を落とし、がんよりも大きなりスクとなる”と警鐘が鳴らされている。これらの薬剤耐性菌問題が顕在化した背景を受けて、欧米諸国は、その切り札としてファージ

に着目しており、ファージセラピーに対する期待は格段に高まっていると考えられる。特に米国では、2015年7月にNIAID主催の「Bacteriophage Therapy: An Alternative Strategy to Combat Drug Resistance (ファージセラピー: 薬剤耐性制圧のための代替策)」が開催され、さらに2017年7月にはFDAとの共催ワークショップとなり「Bacteriophage Therapy: Scientific and Regulatory Issues (ファージセラピー: 科学的小および行政上の課題)」が開催され、ファージの薬事承認ルートについても議論されるに至った。この様に、米国が国をあげてファージセラピーの実用化を検討していることが伺われる。これらの背景のなか、永らく抗菌戦略を抗生物質に頼ってきた米国において、パターンソン症例におけるファージセラピーの成功は大きなセンセーションを持って迎えられた。

これまでにパターンソン症例は「Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection」として国際学術雑誌であるAntimicrobial Agents and Chemotherapyに掲載された⁷⁾ほか、実際にファージセラピーを担当したUCSD (University California San Diego) のPress releases (<http://health.ucsd.edu/news/releases>) から概要を閲覧することが可能である。

Frankfurt Goethe University)へ移送された。翌12月4日から抗生物質による治療が開始され、イミペネム、テイコプラニン、およびカスポファンギンが投与された。また、細菌培養検査の結果、*Candida glabrata*と*Acinetobacter baumannii*が検出された。特に、*A. baumannii*は、コリスチン、チゲサイクリン、メロペネム以外全ての抗生物質に対して耐性を示した。12月6日、テイコプラニンをチゲサイクリンに切り替え治療を継続したが、12月10日の細菌培養検査でも依然として*C. glabrata*と*A. baumannii*が検出された。細菌培養検査の結果を受けて、イミペネムを高容量メロペネムに切り替え、さらにコリスチンを投与したが、容態の回復が認められず、2015年12月12日に航空搬送でUCSDへ移送され入院するに至った(図2B)。

UCSD搬送後には、既に*A. baumannii*がメロペネム耐性を獲得していた。また、2016年1月にかけて、臍臓における膿胞の形成が認められたことからドレーンが設置された。さらに、この期間において*A. baumannii*がコリスチンを含む全ての抗生物質に対する耐性を獲得していることが確認された。2016年1月以降、ICUにおける治療が継続されたが、腹水から*Candida glabrata* および多剤耐性*A. baumannii* が依然として認められ、2016年3月中旬には設置された5つ全てのドレーンから多剤耐性*A. baumannii* が確認された。さらに、肝機能、腎機能の悪化も認められ、全身状態は悪化の一途を辿った(図2C)。

03 | パターンソン症例; 発症と抗生物質による治療

2015年晩秋、エジプト。旅行中であったパターンソン氏は、カイロからルクソールに向かう船便に乗船していた。2015年11月28日、背中に急激な痛みを覚え、船医を受診した結果、糖尿病を患っていることから急性膵炎を疑われ、早急に病院を受診する様に推奨された。また、この時点でゲンタマイシンの投与を受けた。ルクソールの病院を受診した結果、急性膵炎と診断され、ICUにおいてインスリン、および第四世代セファロスポリンによる治療を受けた(図2A)。2015年12月3日、ルクソールにおいて容態の回復が認められなかったパターンソン氏は、航空搬送によってドイツのゲーテ大学病院(University Hospital

04 | パターンソン症例; ファージセラピーの契機と準備

パターンソン症例におけるファージセラピーの契機は、アカデミアでもメディカルからでも無く、夫を思うパターンソン夫人の電話から始まった。「PubMed(生命科学に関する論文、刊行物を無料検索することが可能な検索エンジン)でアシネトバクターに関する記事を検索していたのだけれど、この記事はどうかしら?」

パターンソン夫人が見出した「記事」とは、「Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*」の題名で2014年8月にPLoS Oneに掲載された論文⁸⁾であった。この論文は、ベルギーの

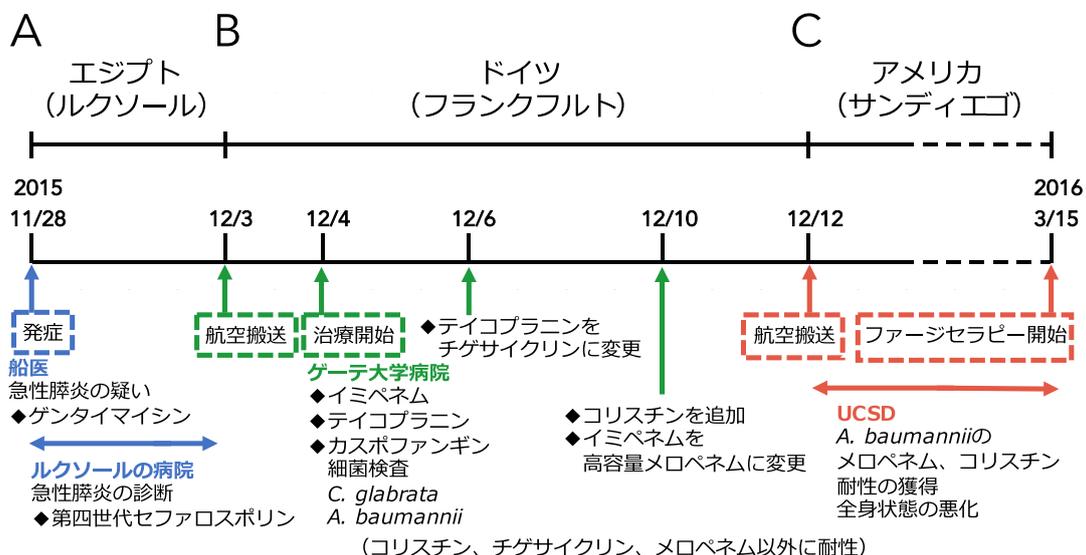


図2 パターンソン症例: 発症から抗生物質による治療

チームによって実施された、主に*in vitro*における研究成果の報告であり、*A. baumannii*臨床分離株に対して溶菌活性を示すファージが報告され、ファージのアシネトバクテリア感染症に対する応用の可能性について言及されていた。パターンソン氏の治療を担当したUCSD医学部感染症部門ロバート・チップ・スクリー教授は、夫人に対して「現状の抗生物質療法で回復が見られていない以上、実施してみることも良さそうですね」と答えたが、内心は「多剤耐性*A. baumannii*に効くファージを時間内に探し出すことは困難を極めるであろう」、そして「ファージを臨床的に使用するためにあたってどれ程の書類の山が待ち受けているのだろうか」と感じていたことを後々語っている。

スクリー教授が感じ取っていた様に、パターンソン症例においてファージを臨床的に使用するためには、越えなければならないハードルが大きく分けて2つ存在したと言える。1つ目は、症例に適合した(1)多剤耐性*A. baumannii*に対するファージの選抜、そして2つ目に、(2)ファージセラピー実施に係る行政的な承認、である。

(1)多剤耐性*A. baumannii*に対するファージの選抜

細菌はファージに対して耐性を示すことが知られている(ファージ耐性)が、ファージセラピーにおけるファージ耐性の回避手段として、ファージのカクテル化が有効^{9, 10)}である。ファージカクテルの運用方法は、広範囲な溶菌スペクトルが期待できる既知のファージを事前にカクテル化しておく固定型カクテル(Fixed cocktail)と、感染症の原因菌に合わせて都度調製する個別型カクテル(Personalized cocktail)に大別される。固定型カクテルは広い市場に向けて製剤化を実施する際には現実的な選択肢であると考えられる。また、個別型カクテルは、患者ごとにファージカクテルを調製することから、オーダーメイド型の治療展開が期待される。さらに、対象とする菌種が同一であっても株レベルでファージに対する感受性は異なる場合があることから、より効果的なカクテル化を実施することが可能である。一方で、個別型カクテルにおける、有効なファージの効率的な選抜方法や薬事上の認可システムの構築は課題であると考えられる。個別型カクテルの調製に際し、ファージを効率的に選抜するシステムとして、ファージライブラリーの構築が挙げられる。ファージライブラリーとは、特定の菌種に対して溶菌活性を示す複数種のファージから構成され、原因菌に対してハイスループットなスクリーニングを実施することで効果的なファージを短時間で選抜出来るシステムである。ファージライブラリーはパターンソン症例においても*A. baumannii*に対するファージの選抜において迅速なファージカクテルの構築に機能した。

パターンソン症例では、前述したベルギーのチームによって報告された*A. baumannii*に対するファージが当初注目された。スクリー教授らはパターンソン夫人の提案を受け、早速、論文の著者が所属するクイーン・アストリッド・陸軍病院(ベルギーブリュッセル)にコンタクトをとった。その結果、「私たちは、中東由来*A. baumannii*に溶菌活性を示す幾つかのファージを有しており、実際にベルギー軍兵士の火傷に対して使用した実績がある。是非、力になりたい。」という返答を得た。また、それら*A. baumannii*に対するファージは、Texas A&M大学のヤング教授の研究室に保管されていることが連絡された(Texas A&M大学はCenter for Phage Technology; CPT と呼ばれる研

究施設を有しており、ヤング教授は同施設のセンター長を務める。パターンソン症例において、CPTは同施設のファージライブラリー、経験、技術をいかんなく発揮し、本症例の成功に大きく寄与することとなる)。スクリー教授らはパターンソン氏から分離された*A. baumannii* TP1株(表1)をTexas A&M CPTへ送付し、37種類のファージ(ベルギーのチームによって報告されたファージを含む)からなるアシネトバクテリアファージライブラリーを用いてTP1に対する溶菌活性が評価された。その結果、期待に反してベルギーのチームによって報告されたファージはTP1に対して溶菌活性を示さないことが明らかになった。一方で、37種類のファージのうち、AC4と名付けられた1種類のファージのみが溶菌活性を示した。AC4は、ファージの製剤化を目指すAmpliPhi Biosciences Corporationが分離したファージである。しかしながら、1種類のファージのみではファージカクテルを構築することは不可能であることから、TP1に有効なファージをさらに見出すため、CPTにおいて即時利用可能な環境由来サンプル100種類を用いて続くスクリーニングが実施された。その結果、TP1に対して溶菌活性を示す新たな3種類のファージが選抜された(図3)。

表1 パターンソン氏から分離された*A. baumannii*

<i>A. baumannii</i> 株名	分離日	由来	in vitroにおけるファージによる増殖抑制効果				
			CPTカクテル	NMRCカクテル	AB-Navy71	AbTP3Φ1	NMRCカクテル
TP1	2016年3月10日	薛ドレナージ	中	強	強	—	—
TP2	2016年3月21日	薛ドレナージ	弱	中	弱	—	—
TP3	2016年3月23日	薛ドレナージ	無	弱	弱	強	強

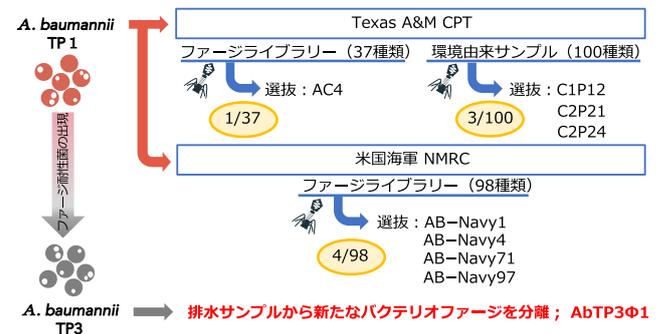


図3 パターンソン症例:ファージライブラリーを用いたファージの選抜とカクテルの構築

また、パターンソン症例における個別型ファージカクテルの選定では、米国海軍のNMRC(Naval Medical Research Center)が有するアシネトバクテリアファージライブラリーも用いられた。NMRCでは、98種類のファージからなるアシネトバクテリアファージライブラリーを有しており、TP1を用いたスクリーニングの結果、4種類のファージが選抜された(図3)。上記8種類のファージを用いて、Texas A&M CPT由来ファージカクテル(CPTカクテル)、およびNMRC由来ファージカクテル(NMRCカクテル)が調製された(表2)。

表2 パターンソン症例に使用されたファージとカクテル

カクテル名	構成ファージ	溶菌活性を有する分離株	分離元	由来	平均エンドトキシン量
CPTカクテル	AC4	TP1	Texas A&M大学	環境由来サンプル	2.4 × 10 ³ (EU/mL)
	C1P12	TP1	Texas A&M大学	環境由来サンプル	
	C2P21	TP1	Texas A&M大学	環境由来サンプル	
	C2P24	TP1	Texas A&M大学	環境由来サンプル	
NMRCカクテル	AB-Navy1	TP1	AmpliPhi Co.	排水	5.89 × 10 ³ (EU/mL)
	AB-Navy4	TP1	米国海軍 NMRC	排水	
	AB-Navy71	TP1	米国海軍 NMRC	排水	
	AB-Navy97	TP1	米国海軍 NMRC	排水	
	AbTP3Φ1	TP1, TP2, TP3	米国海軍 NMRC	排水	
NMRCカクテル2	AB-Navy71	TP1	米国海軍 NMRC	排水	1.64 × 10 ³ (EU/mL)

(2) ファージセラピー実施に係る行政的な承認

2016年3月1日、スクリー教授らは、FDAに対してファージセラピー実施に係る初めての打診を実施した。FDAの一部門であるCBER(Center for Biologics Evaluation and Research)のメンバーを中心とした専門家による議論を経た同年3月4日、FDAは、使用するファージカクテルにおけるエンドトキシンレベル、および無菌性の確認が済んでいればファージを臨床的に使用して良い旨の答申を行った。一方で、エンドトキシンレベルの測定などを介したデータの取得は、パターンソンの治療の遅延を招く可能性があることから、ファージカクテルの使用のタイミングは、スクリー教授の臨床的・科学的な判断に委ねられ、上記のCMCデータの提出は治療開始後になっても構わないことが申し加えられた。これにより、ファージのeIND (emergency Investigational New Drug)としての使用が事実上認可された(図4)。

eINDとは、非常用治験薬を指し、未承認の薬剤であっても実験室レベルのデータを基に、緊急時に使用可能とするシステムである。日本の薬機法には、eINDに相当するシステムは無く、米国における本制度の存在はパターンソン症例におけるファージの使用を後押ししたと言える。また、パターンソン症例では、対象となる細菌が同一であれば、使用するファージが変更される場合でも同一のeINDとして取り扱うことがFDAから示された。

2016年3月12日、ヤング教授から発送されたCPTカクテルがUCSDに到着し、3月14日に予定されたエンドトキシンレベルの確認が済み次第、ファージセラピーを開始する計画が立案された。また、NMRCカクテルは3月15日にUCSDに到着し、同様にエンドトキシンレベルの確認が行われた。従って、TP1の分離から僅か5日間のうちに個別型ファージカクテルがUCSDに到着したこととなり、ファージライブラリーが極めて迅速なファージカクテルの構築に寄与したと考えられる。また、それぞれのカクテルに含まれていたエンドトキシンレベルを表2に示す。FDAが推奨するエンドトキシンレベルは、静脈内投与の場合5.0 EU/kg of body weight/hrであることから、標記の基準に達する様にファージカクテルは乳酸リンゲル液で希釈された。

05 | パターソン症例; ファージセラピー

2016年3月15日、CPTカクテルが経皮カテーテルを介して腹腔に投与され、ファージセラピーが開始された。しかしながら、投与後36時間を経過しても、臨床兆候に変化は無く、依然として昏睡状態が続いた。ファージセラピーの応答性から鑑みてもパターンソン氏の*A. baumannii*の感染は腹腔を超えてさらに広い範囲に浸潤している可能性があったことから、3月17日にCPTカクテルの腹腔への投与に加えて、NMRCカクテルの静脈内投与が実施された。CPTカクテルは3月15日～3月19日までの期間で6時間から12時間の間隔で投与された。また、NMRCカクテルは3月17日の初回投与12時間後に2回目の投与が実施され、その後の2日間は2時間毎に投与が実施された。3月19日には意識が回復し、ベッドサイドに立つ家族を認識できるまでに回復が認められた。しかしながら、3月20日未明にかけて血圧の低下が認められ、パターンソン氏に対する昇圧剤の要求量が増加したことから、一時的にファージセラピーは中断された。CPTカクテルの腹腔への投与は3月21日から再開され、NMRCカクテルの静脈内投与は3月23日から再開された。再開後はいずれのカクテルも6時間から8時間の間隔で投与が行われた(図4)。

ファージセラピー実施過程において、使用されたファージの継続的な効果を検証するため、ファージ投与後の3月21日、3月23日にパターンソン氏から分離された*A. baumannii* TP2、およびTP3株(表1)を用いて、CPTカクテル、NMRCカクテルの*in vitro*における溶菌活性が評価された。その結果、いずれのカクテルも試験管内においてTP3に対して効果的な溶菌活性が認められず、*A. baumannii*のファージ耐性の獲得が考えられた。そこで、TP3を用いた新たなファージの選抜が試みられ、TP3に対して有効なファージが排水中(一般的にファージは細菌が繁殖する環境に存在すると考えられるため、生活排水、農場排水や湖沼、河川由来の細菌を含む水などをサンプルとして分離が実施される¹¹⁻¹⁴)から新たに分離された(図3)。TP3に対して有効なファージ(AbTP3Φ1)は、TP1およびTP2にも溶菌活性を示し、さらに、NMRCカクテルを構成するAB-Navy71との相

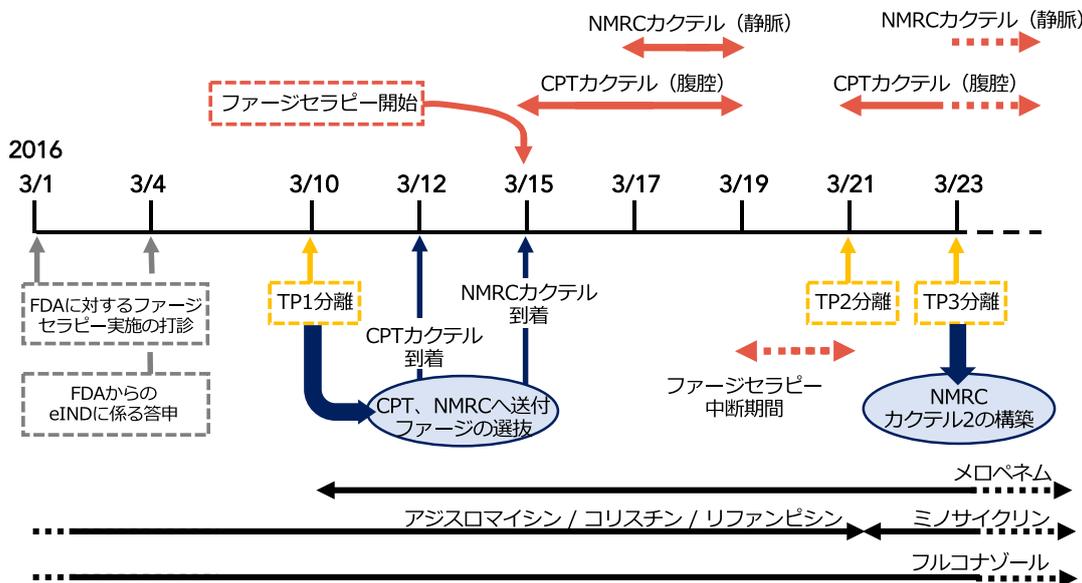


図4 パターソン症例:ファージセラピーの実施

乗作用を示したことから、上記の2種類のファージが新たなカクテル(NMRCカクテル2)として用いられた(表2)。また、ファージセラピー実施期間を通して、ミノサイクリンやメロペナムなどの抗生物質が併用されており(図4)、ミノサイクリン単独、あるいはNMRCカクテル単独に比べて、両者の併用は*in vitro*におけるTP3の増殖を強く抑制したことから、ファージと抗生物質の相乗的な作用が示唆された。また、ファージ投与後の血中ファージ動態を把握するため、血漿中ファージ力価(pfu/mL)を測定した結果、表3に示したように6時間でファージ力価は検出限界以下になることが示された。また、*in vitro*におけるファージの溶菌活性試験において、NMRCカクテルを被験血漿(ファージセラピーを終えて90日後の血漿サンプル)で懸濁した場合には、生理食塩水で懸濁した場合に比べて、ファージ力価はより速く減少したことから、ファージの中和がファージ力価を減少させる一要因であることが示唆された。

表3 ファージカクテル静脈内投与後の血漿中ファージ力価

NMRCカクテル2 : 5.0×10^9 pfu (静脈)	
投与後時間	血漿中ファージ力価 (pfu/mL)
5 min	1.8×10^4
30 min	4.4×10^3
60 min	3.3×10^2
180 min	20
360 min	検出限界以下

ファージセラピーが継続された2016年5月初旬、パターンソン氏への抗生物質の投与が取り止められた。さらに、6月6日にはパターンソン氏の身体から*A. baumannii*が消失したことが認められ、2016年8月12日、パターンソン氏は無事に退院するに至った。それぞれのカクテルを用いたファージセラピーの実施期間は総計で59日間であった。昏睡状態にまで悪化した容態から意識を取り戻し退院するまでの過程は、ファージセラピーが薬剤耐性菌に対する強力な切り札であることを示すには充分であったと考えられる。また、パターンソン症例に見られたファージ耐性菌の出現に対する新規ファージ分離の背景には、ファージが細菌と共に長い年月をかけてお互いに進化を繰り返してきた共進化の歴史が想定される。共進化の過程¹⁵⁾では、両者が共に絶滅することなく絶妙なバランスを保って共存関係を築きあげてきたと考えられることから、自然環境におけるファージの生存戦略を臨床的に応用することが(免疫における抗体の多様性の様に)ファージ耐性菌への柔軟性を産み出すとも言えるだろう。

2018年5月現在、パターンソン症例の成功を受けたUCSDでは、さらに5例の患者に対してファージセラピーが実施されている(*A. baumannii*:1例、*P. aeruginosa*:3例、*S. aureus*:1例)。

06 | 臨床応用を目指したファージ製剤の開発

米国では既に、Intralix社がリステリア食中毒に対する予防策として、リステリアに対するファージを用いたファージスプレーを実用化しており、食肉の出荷時に表面にスプレーすることで食品添加物として認可を受けている。一方で、臨床応用を目指したファージ製剤も欧米諸国で開発が急激に進んでおり、

フランスではEUの承認要件に準ずる熱傷用ファージカクテル製剤(PhagoBurn)の開発が進んでいる。また、2016年1月にフランスでファージセラピーに係る科学委員会が組織され、2017年2月~3月にかけて、Compassionate use(実験的使用)として多剤耐性*P. aeruginosa*、および多剤耐性*S. aureus*などを含む感染症2例に対してファージセラピーが実施された。また、パターンソン症例でも大きな役割を果たしたAmpliPhi Biosciences Corporationは、ブドウ球菌用ファージカクテル製剤、および緑膿菌用ファージカクテル製剤の開発を進めており、特にブドウ球菌用ファージカクテル製剤は臨床試験(フェーズ2)の段階にある。日本においてファージセラピーの臨床的な実施例や製剤化は未だ無い状況であるが、世界の動向は“薬剤耐性対策の切り札としてのファージセラピー”という大きな潮流の中に在ると言えるのではないだろうか。

07 | 当研究室における取り組み

2007年、我々はファージセラピーの研究をスタートさせた。当時、日本でもファージセラピーの研究を先駆けて行っていた丹治先生(東工大)に手ほどきを習うところからスタートさせた。我々は、酪農学園大学という文字通り産業動物の獣医学を旗印に掲げている生化学の研究室であるため、まず手がけたのは、ウシ乳房炎である。黄色ブドウ球菌(*S. aureus* (SA))は、ウシの乳房炎の主因菌であり、治療困難なことが多く甚大な被害をもたらすため問題となっている。SAに対するファージを排水中から分離、精製し¹¹⁾、ウシの乳房炎から分離した様々なSA(93株)、さらにヒト由来MRSA(6株)に対しても高い溶菌活性を示すこと、さらに乳房炎モデルマウスにおいても効果的な溶菌作用が得られることを報告し¹⁶⁾、本ファージの特許も取得した(特許第5720045号)。また、ウマの緑膿菌(*P. aeruginosa*)性の角膜炎に対するファージセラピーの効果も検証し、その実用的な使用方法についても報告した^{9, 12, 13)}。このウマ角膜炎のデータは、獣医学術学会賞(獣医師会)を受賞した。

また、ファージの溶菌システムを使った治療法としてファージ由来溶菌酵素(エンドライシン、図1)の開発も手がけている¹⁷⁾。エンドライシンは、細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカンターゲットとしており、細菌の外からエンドライシンを添加するだけでペプチドグリカンが破壊され、細菌は急速に破裂する。我々が単離・精製したエンドライシンの*in vitro*におけるSAに対する溶菌活性を図5に示す。

この酵素は、薬剤耐性菌に対して急速な溶菌活性を示す¹⁷⁾ことも去ることながら、細菌が極めて耐性化しにくく^{18, 19)}、抗生物質との併用効果やバイオフィームへの適用効果^{20, 21)}、あるいは遺伝子工学的な改変を通じた容易な機能修飾²²⁾が可能であることからファージ同様に近年注目を集めている。さらに、エンドライシンは、ファージとは異なり感染を伴った複製を必要としないため、増殖を停止した状態の休眠細菌(パーシスター)にまで効果的²³⁾であることが報告されている。このように、ファージの感染システムを解析しセラピーとしてうまく利用することで、ファージそのもの、そしてファージ由来分子を、薬剤耐性化の進む細菌に対して持続的に使用できる特効薬として応用することが期待できる。

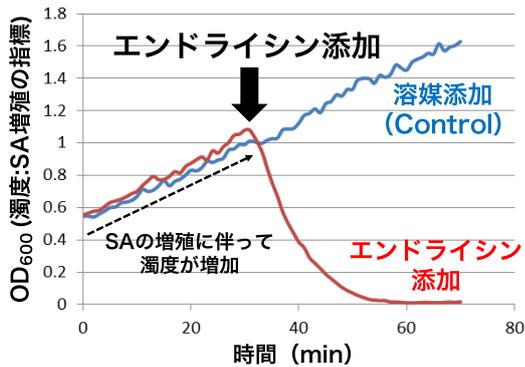


図5 エンドライシン添加による急速な溶菌作用

現在、日本はファージセラピーを行える状況にはなく、製品認可も未だない。近い将来、どのように臨床現場にこの方法を応用して行くべきか、企業、医療、国と協議しながらなるべく早い応用に至るよう努力を重ねている。当研究室では、多くの方々と共に本分野の研究を進め、世界から遅れている日本のファージセラピーの応用を推進していきたい。

08 | おわりに

AMR(薬剤耐性)に対する様々な警鐘により、その理解は高まってきている。しかし、人や特定の動物のみで個々にAMRの対策を行うだけでは対策として不十分である。近年、「One World-One Health」という概念が叫ばれている。地球上のあらゆるものが相互に関係している以上、その一つ一つを正常化していくことが大切であるとする考え方である。感染症のコントロール、AMR対策の場合も同様で、人・動物・環境を広くとらえたOne HealthアプローチがAMR対策には必要である。ファージセラピーは、人・動物・環境、全てに対応出来る可能性のある対策であり、その効果的な適用法を探っていく必要があると我々は考えている。

46億年前に地球が誕生し、細菌はおよそ38億年前に誕生したと言われる。そしてその後にはウイルス(ファージ)も誕生したと考えると、およそ30億年以上の間、細菌とファージはお互いに共進化を遂げ、あらゆる環境において選択され、両者共に生き残ってきた。人が抗生物質を発見しておよそ90年、多くの英知と資金をかけて開発しても、ファージが進化の過程で培ってきたシステムには及ばないであろう。我々は、ファージと細菌のシステムを詳細に研究し、そしてファージの多様性を持ったシステムをうまく利用して病原細菌と戦っていくべきである。ファージセラピーは、抗菌剤にとって変わるものではなく、人にとって新しい武器として、時には両者を同時に使い、また、特にファ-

ージの場合は、病気になる以前の予防的な使用にも大きな力を発揮するものと考えている。なぜなら、ファージの耐性菌が出てきても、環境中には必ずそれに対するファージがすでに存在しているからである。我々は、細菌とファージの進化の歴史を紐解きながら、その中からAMR対策も見いだしていくべきである。また、AMR対策を推進する上で、エンドライシンには既存の抗菌戦略やファージセラピーを補完するフレキシブルツールとしての有用性が期待される。

細菌との戦いは、終わりのない戦いである。我々は、その戦いに疲弊することなく戦い続ける必要がある。本記事を執筆中に、パターンソン症例で中心的役割を果たしたUCSDがInnovative Phage Applications and Therapeutics (IPATH) を設立するというプレスリリースが報告された(https://medschool.ucsd.edu/som/medicine/divisions/infectious-diseases/research/center-innovative-phage-applications-and-therapeutics/news-events/Documents/2018_06_21-IPATH.pdf)。いよいよアメリカにおいてファージセラピーの臨床応用が本格化するということであろう。ファージのシステムは、我々にとって切り札となる武器となる可能性があり、様々な知恵と研究により、ファージセラピーを応用して行くべきである。

参考文献

- 1) J. Doss, K. Culbertson, D. Hahn, J. Camacho, N. Barekzi, *Viruses* **9**(3), 50(2017).
- 2) H. H. Kashani, M. Schmelcher, H. Sabzalipoor, E. S. Hosseini, R. Moniri, *Clin. Microbiol. Rev.* **31**(1), e00071-17(2018).
- 3) 岩野英知, 丹治保典, 松崎茂展, 内山淳平, 藤木純平, 乗松真理, 田村 豊, 動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会会報 **17**, 3-33(2018).
- 4) S. Reardon, *Nature* **510**(7503), 15-16(2014).
- 5) A. Górski, E. Jończyk-Matysiak, R. Międzybrodzki, B. Weber-Dąbrowska, M. Łusiak-Szelachowska, N. Bagińska, J. Borysowski, M. B. Łobocka, A. Węgrzyn, G. Węgrzyn, *Front Med (Lausanne)* **5**, 146(2018).
- 6) J. O'Neill, "Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for health and wealth of nations" (HK Government & The Wellcome Trust, 2014; https://amr-review.org/sites/default/files/AMR_Review_Paper_-_Tackling_a_crisis_for_the_health_and_wealth_of_nations_1.pdf) (参照 2018-08-07).
- 7) R. T. Schooley, B. Biswas, J. J. Gill, A. Hernandez-Morales, J. Lancaster, L. Lessor, J. J. Barr, S. L. Reed, F. Rohwer, S. Benler, A. M. Segall, R. Taplitz, D. M. Smith, K. Kerr, M. Kumaraswamy, V. Nizet, L. Lin, M. D. McCauley, S. A. Strathdee, C. A. Benson, R. K. Pope, B. M. Leroux, A. C. Picel, A. J. Mateczun, K. E. Cilwa, J. M. Regeimbal, L. A. Estrella, D. M. Wolfe, M. S. Henry, J. Quinones, S. Salka, K. A. Bishop-Lilly, R. Young, T. Hamilton, *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**(10), e00954-17(2017).
- 8) M. Merabishvili, Dieter Vandenheuvel, A. M. Kropinski, J. Mast, D. D. Vos, G. Verbeken, J.-P. Noben, R. Lavigne, M. Vaneechoutte, J.-P. Pirnay, *PLoS One* **9**(8), e104853(2014).
- 9) T. Furusawa, H. Iwano, Y. Hiyashimizu, K. Matsubara, H. Higuchi, H. Nagahata, H. Niwa, Y. Katayama, Y. Kinoshita, K. Hagiwara, T. Iwasaki, Y. Tanji, H. Yokota, Y. Tamura, *Appl. Environ. Microbiol.* **82**(17), 5332-5339(2016).
- 10) Y. Tanji, T. Shimada, M. Yoichi, K. Miyanaga, K. Hori, H. Unno *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**(2), 270-274(2004).
- 11) A. J. Synnott, Y. Kuang, M. Kurimoto, K. Yamamichi, H. Iwano, Y. Tanji, *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(13), 4483-4490(2009).
- 12) T. Furusawa, H. Iwano, H. Higuchi, H. Yokota, M. Usui, T. Iwasaki, Y. Tamura, *J. Vet. Med. Sci.* **78**(6), 1035-1038(2016).
- 13) T. Furusawa, H. Iwano, H. Higuchi, M. Usui, F. Maruyama, I. Nakagawa, H. Yokota, Y. Tamura, *Genome Announc* **4**(3), e00041-16(2016).
- 14) J. Uchiyama, M. Suzuki, K. Nishifuji, S. Kato, R. Miyata, T. Nasukawa, K. Yamaguchi, I. Takemura-Uchiyama, T. Ujihara, H. Shimakura, H. Murakami, N. Okamoto, Y. Sakaguchi, K. Shibayama, M. Sakaguchi, S. Matsuzaki, *Appl. Environ. Microbiol.* **82**(15), 4482-4491(2016).
- 15) K. Mizoguchi, M. Morita, C. R. Fischer, M. Yoichi, Y. Tanji, H. Unno, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(1), 170-176(2003).
- 16) H. Iwano, Y. Inoue, T. Takasago, H. Kobayashi, T. Furusawa, K. Taniguchi, J. Fujiki, H. Yokota, M. Usui, Y. Tanji, K. Hagiwara, H. Higuchi, Y. Tamura, *Biology (Basel)* **7**(1), 8(2018) doi:10.3390/biology7010008.
- 17) J. Fujiki, T. Nakamura, T. Furusawa, H. Ohno, H. Takahashi, J. Kitana, M. Usui, H. Higuchi, Y. Tanji, Y. Tamura, H. Iwano, *Pharmaceuticals (Basel)* **11**(1), 25(2018).
- 18) J. M. Loeffler, D. Nelson, V. A. Fischetti, *Science* **294**(5549), 2170-2172(2001).
- 19) L. Zhang, D. Li, X. Li, L. Hu, M. Cheng, F. Xia, P. Gong, B. Wang, J. Ge, H. Zhang, R. Cai, Y. Wang, C. Sun, X. Feng, L. Lei, W. Han, J. Gu, *Sci Rep* **6**, 29344(2016).
- 20) S. Nair, N. Poonacha, S. Desai, D. Hiremath, D. Tuppad, T. Mohan, R. Chikkamadaiah, M. Durgaiyah, S. Kumar, S. Channabasappa, A. Vipra, U. Sharma, *J. Med. Microbiol.* **67**(3), 296-307(2018).
- 21) A. Daniel, C. Euler, M. Collin, P. Chahales, K. J. Gorelick, V. A. Fischetti, *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**(4), 1603-1612(2010).
- 22) Y. Briers, M. Walmagh, V. V. Puyenbroeck, A. Cornelissen, W. Cenens, A. Aertsen, H. Oliveira, J. Azeredo, G. Verween, J.-P. Pirnay, S. Miller, G. Volckaert, R. Lavigne, *MBio* **5**(4), e01379-14(2014).
- 23) R. Schuch, B. K. Khan, A. Raz, J. A. Rotolo, M. Wittekind, *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**(7), e02666-16(2017).



キーワード解説

薬剤耐性菌

感染症治療に用いられる抗菌薬に耐性を持つ細菌のこと。薬剤耐性菌による感染症は使用できる抗菌薬に限られるため、治療が困難となる。そのため、薬剤耐性菌を上げない対策と、発生させない対策をとる必要がある。薬剤耐性菌は抗菌薬の不適切な使用により出現しやすくなるため、抗菌薬の適正使用が求められている。また、薬剤耐性菌は家畜や環境中からも検出されているため、薬剤耐性菌対策は様々な分野が取り組むべき課題である。

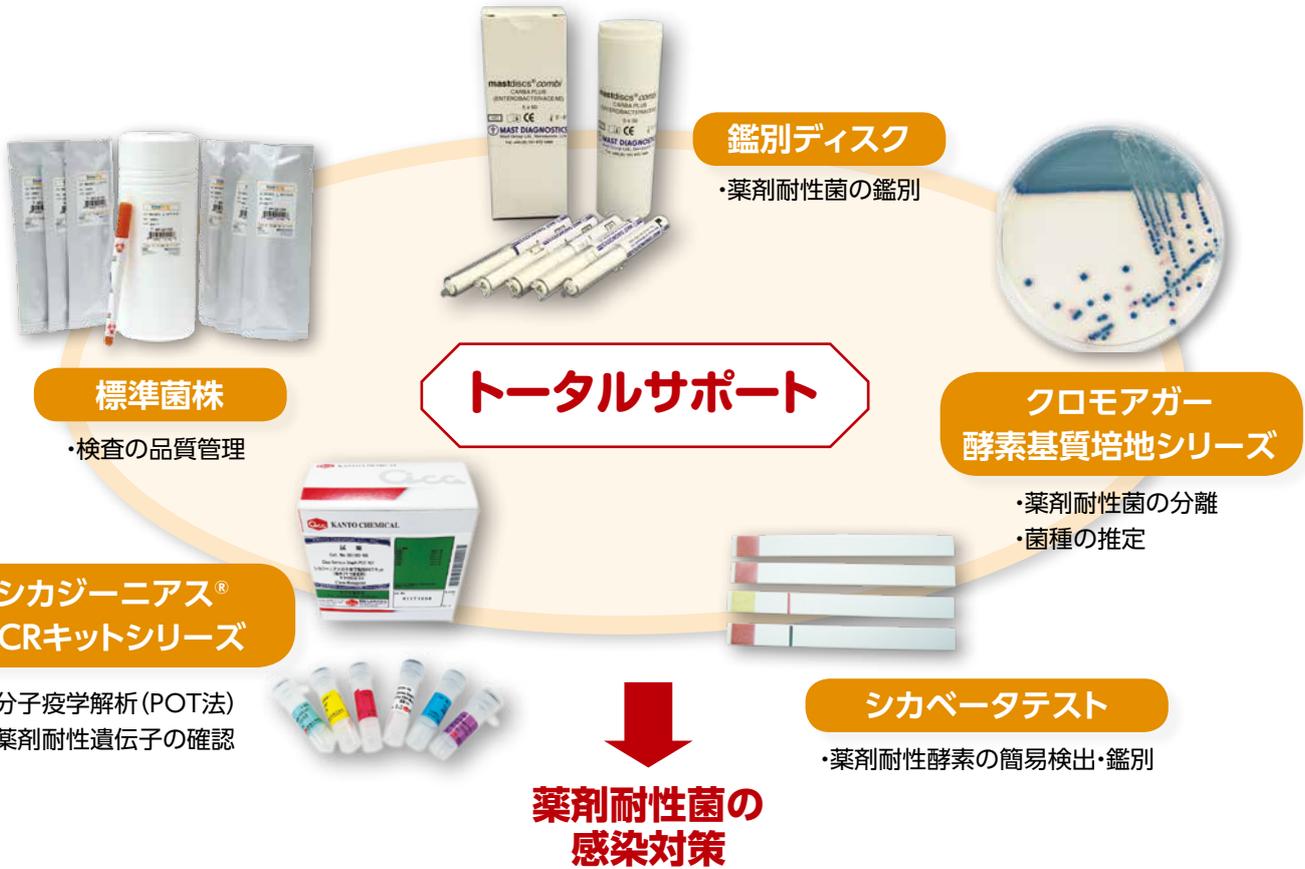
ジェノタイプ・フェノタイプ

ジェノタイプは生物が持つ遺伝子の塩基配列の違い、フェノタイプは遺伝子に基づいて現れる形質のこと。細菌の薬剤耐性は薬剤感受性試験を行いフェノタイプで判定するが、耐性機構の詳細な情報は得られず、迅速性に欠ける。ジェノタイプを調べる遺伝子検査は短時間で結果を得られるが、遺伝子の変異や発現状況によってはフェノタイプと一致しない場合がある。そのため、薬剤耐性菌の判定には2つの検査を組み合わせることが有効である。

POT法

菌株間で保有状態が異なる遺伝子の読み取り枠(Open Reading Frame: ORF)をマルチプレックスPCRで検出し、その保有パターンを数値化して菌株をタイピングする手法。菌株識別や流行株の推定が可能であり、院内感染の感染制御に有用である。当初は細菌ゲノムに組み込まれたファージ(細菌に感染するウイルス)由来のORFを検出対象としたため、Phage ORF Typingと名付けられたが、その後、ファージ以外のORFも検出対象に加わったため、PCR-based ORF Typingに変更された。

関東化学の薬剤耐性菌関連試薬



※無断転載および複製を禁じます。