

POT news

Vol.1

vol.1 トピックス

☒ 新製品情報 - 1 ☒ POT法に関する学術情報 - 1 ☒ 発刊特別企画 POTキット開発秘話インタビュー - 2,3 ☒ POT研究紹介 - 4

藤田医科大学の鈴木匡弘先生が開発されたPCR-based ORF Typing (POT)法は、全国の臨床現場の医療関連対策だけでなく、様々な論文発表・学会発表等の研究にも使用頂いております。この度、皆様にPOT法に関する最新のトピックスをお届けし、よりPOT法をご活用いただくため、「POT news」を不定期で配信することとなりました。

※ シカジーニース® 分子疫学解析POTキットシリーズは、POT法の技術を元に開発された製品です。

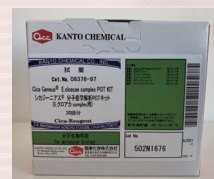
☒ 新製品情報

E. クロアカ complex用

2023年3月1日に、「シカジーニース® 分子疫学解析POTキット (E. クロアカ complex用)」を発売します。
E. cloacae complex(ECC)は*E. cloacae* の近縁の菌種の総称であり、その中の一部はカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌(CPE)としても問題になっております。本キットはECCの中でも分離頻度が高い*E. hormaechei*においてST型推定が可能であり、MLST法と同程度以上の菌株識別能力を有します。その他にも主要菌種 (*E. hormaechei*, *E. asburiae*の一部) の菌種推定、一部の*E. asburiae*の簡易的なST型推定、IMP-1グループ遺伝子の検出が可能です。
※本製品は藤田医科大学と関東化学株式会社が共同開発した*Enterobacter cloacae* complexの遺伝子解析技術 (2023年2月特許出願中) をもとに開発されました。

関東化学(株) 製品HP

https://products.kanto.co.jp/web/index.cgi?c=t_product_table&pk=1030 →



☒ POT法に関する学術情報

C. ディフィシル用

2022年9月26日に一般社団法人 日本環境感染学会より発行された「*Clostridioides difficile* 感染対策ガイド」に、*C. difficile* の主要なタイピング手法の一種としてPOT法が掲載されました。

一般社団法人 日本環境感染学会「*Clostridioides difficile* 感染対策ガイド」

http://www.kankyokansen.org/modules/news/index.php?content_id=473 →



コラム

POT法の正式名称について

POT法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PCRで検出し、その検出パターンによって遺伝子型を決定しています。最初に設計された黄色ブドウ球菌用のPOT法では、検出対象となるORFは主にプロファージ内に存在したため、「Phage ORF typing」として発表されました。後に菌種によって検出対象のORFがプロファージ内に存在するとは限らなくなったため、より広義な「PCR-based ORF Typing」に名称変更されました。

✓ 発刊特別企画 POTキット開発秘話インタビュー

2010年のシカジーニアス® 分子疫学解析POTキット（黄色ブドウ球菌用）の発売から13年が経ち、院内感染対策の一環として多くの施設でご活用いただいております。「自分がPOTキットを導入した」という先生もいれば「配属された時からPOTキットがあった」という先生もいらっしゃるのではないのでしょうか？本コーナーではPOT法の開発者である藤田医科大学の鈴木匡弘先生に、開発の経緯や裏話をお伺いしました。



POT法開発者

藤田医科大学 医学部 微生物学講座
鈴木 匡弘 先生

－鈴木先生は元々どういった研究をされていたのでしょうか？

当時はPFGE※1を用いた研究をしていました。衛生研究所※2は食中毒等のアウトブレイクの解析が必要で、PFGEは当時主流な方法でした。衛生研究所で扱う菌はO157のような食中毒菌が多かったのですが、某医療機関と共同研究を行っており、その縁でMRSAのタイピングを依頼されました。これをPFGEでかけたが、面倒なので何とかしたいと。そのころはPFGEが面倒というのは世界中の流れで、(PFGEの代替となるタイピングの方法として)なんとかPCRに置き換えたいと考えていると、丁度黄色ブドウ球菌のゲノムの情報が公開された。当時、全ゲノム解析は非常に高度な研究だったので、順天堂大学からMRSAが3株だけ。これを元にして、(ゲノム情報の違いから3株をPCRで識別可能かどうかを調べるために)まずは違うところを探してみましょうと。

※1 パルスフィールドゲル電気泳動法。菌株の全ゲノム DNA を制限酵素で切断し、その電気泳動バンドパターンを利用して、遺伝子型を決める分子疫学解析法。

※2 鈴木先生は当時、愛知県衛生研究所にご所属。

－ゲノム情報の違いを利用して特定の遺伝子をPCRし、その増幅結果からタイピングを行うというPOT法のアイデアはどのようなきっかけで誕生したのでしょうか？

きっかけは些細なことで、毒素などを検出すると株によってばらつきがあるだろうとの視点で最初から比較をされていて、(3株についても保有遺伝子の違いが)実際にあった。PCRベースでタイピングをするとき、何を増幅しているかがはっきりしないと結果が安定しない。であれば、特定の遺伝子があるかないかだけで見る。当時も今も、主流の考え方ではなかったです。

－開発時に特に苦労したことは何でしょうか？

苦労したのはゲノムの比較です。今は色々ツールがあるしプログラムも組めますが、当時はそうではありませんでした。2.8Mbのゲノムをどう比較するのかが大問題で、なかなか簡単には比較できない。最初にやったのはアノテーション※3されたアミノ酸配列の先頭5～6文字を取ってくると、それだけで(同じ)ORF※4が特定できた。これをA4一枚の紙にカラーマークを作って印刷して、目視で比較しました。目視と言ってもMRSAの遺伝子は2,800個しかなく、意外とORFだけで見るとA4一枚に収まるのです。菌株も3株しかなく、2株はNY/Japanクローン、1株は古典的なアメリカの市中感染型MRSA。今はもっと効率的に開発できますが、実は全ゲノムが3株あれば開発できるということなのです。遺伝子配列のバラエティの違うことが分かっている3株であれば大丈夫ですね。偶然、公知になっている3株が丁度よくばらけていた。とはいえNY/Japanが2株なので、POTキットの解析能力は国内に寄る形になります。

※3 ゲノム配列から特定の領域が遺伝子か、非コード領域なのか等の注釈を付けること。

※4 Open Reading Frame の略。タンパク質に翻訳される可能性がある遺伝子の読み枠。

ー鈴木先生と関東化学との出会い、POT法キット化までの経緯はどのようなものだったのでしょうか？

当時は論文法として発表していたのですが、興味を持って下さった研究者は少なかったです。その頃に、偶然、関東化学さんと面識を持ち、論文法をキット化できませんかと相談しました。もう20年くらい前ですね。そこから今の製品の形へは3~4年かかっています。いくつか製品化するために改良をしました。当時の論文法では4プレックスだったので、これを2プレックスにして、ポジコンも必要だと。(当時は検査室でPCRが主流な方法ではなかったため、)現場の意見を取り入れてこういうキットにしたいと。技師さんがどういう条件なら現場でPCRができるか調査しました。反応ボリュームが小さいのはダメだとか。

ーそうしてまずは黄色ブドウ球菌用が出来たわけですが、その時点で他の菌用のPOTキットは想定されていたのでしょうか？

全くしていませんでした。とにかくまずはMRSA用として作ろうと。どの程度使われるかも未知数でしたし。発売時には既に論文法で中村先生(現 京都橋大学)が実施してくれていたもので、それが助かりました。その後少しずつ話題になってきて、他の菌種の開発にも繋がるわけです。

ー今や国内のタイピングではPOT法が最も使われている方法ですが、広がってきたと感じるターニングポイントがありましたでしょうか？

基本的には説明をしなくても良くなったということですね。今は(学会発表等の)イントロに「POT法とは」を入れない。あとは関西POT研究会ですね。3~4回目からはかなり応用的な発表が増えました。また、国立感染症研究所の病原体検出マニュアルにPOT法が掲載されたことも大きいです。

ー菌種もある程度揃いましたが、POT法を次にどうしていくか考えはありますでしょうか？

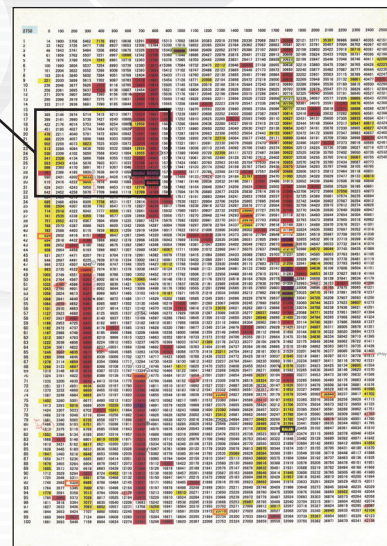
本当は自動化が良いのですけどね。ある程度軌道に乗ったら(自動機等の)装置に載せないといけませんねとは関東化学さんとも話をしていました。ただ、装置になると導入に高額な初期投資がかかるので、安く簡単にというPOT法の良さが消えちゃうねと。不幸中の幸いにコロナ禍で(医療機関に)装置が山のように入ったので、やれるとしたらどこかの装置にPOTをアプリケーションとして入れて、初期投資なく検査しやすくするのが合理的ですね。

ー最後にPOTキットを使っているユーザー様へ一言お願いします

上手く利用して感染制御に役立てていただければ幸いです。

ーメーカーとしてもチーム医療の一環としてこのキットを提供しているので、同じ目線で院内感染対策に継続的に寄与していきたいと思います。本日はありがとうございました。

385	2146	3974	5714	7415	9213	10871	12523	13947
399	2161	3990	5730	7427	9240	10888	12546	13959
422	2176	4014	5753	7440	9254	10908	12558	13972
451	2195	4027	5774	7454	9272	10929	12573	13985
478	2211	4040	5791	7472	9284	10942	12591	13997
488	2229	4057	5808	7488	9303	10958	12603	14008
502	2259	4073	5823	7525	9320	10973	12614	14038
513	2289	4084	5838	7550	9332	10984	12628	14053
530	2309	4102	5850	7568	9343	11004	12655	14074
541	2328	4134	5866	7589	9355	11022	12681	14093
553	2343	4154	5878	7603	9371	11033	12708	14115
566	2360	4170	5891	7617	9397	11046	12723	14127
581	2386	4185	5905	7636	9410	11059	12743	14155
590	2401	4202	5933	7649	9428	11075	12762	14185
615	2416	4222	5945	7678	9440	11088	12767	14193
629	2431	4243	5958	7696	9453	11103	12778	14187
642	2452	4258	5970	7709	9468	11118	12789	14199
664	2469	4278	5983	7722	9515	11134	12800	14211



鈴木先生がPOT法設計のための使用されていた実際の資料

当時は目視でORFの比較をされていました。直筆のチェックやメモ書きなど、当時のご苦労が伝わってきます。

POT研究紹介 ①

POTサーベイランスの取り組みについて – 大阪公立大学 感染制御部 中家 清隆 先生

現在、日本を含めて世界中で薬剤耐性菌による院内感染が問題となっていますが、病院で院内伝播を検出するために薬剤耐性菌検出サーベイランスが実施されています。市中からの持込と院内伝播の判定例として入院後48時間以内に新規MRSA（Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*）が検出された場合を「持ち込み例」と判定し、それ以外の分離株を院内伝播の可能性のある症例と判定し、病院内で定めた基準を満たした場合に院内感染対策の強化を行っていることが多いと考えます。しかし、多くの医療機関では、すべての入院患者に対して入院時に保菌検査を実施していないため、MRSAの院内伝播を正確に判定できていない可能性があります。

院内でのMRSA症例においてPOT法を使用することにより正確に院内伝播判定をすることが可能となり、検出数が多い根拠のみで院内感染対策強化を行う必要がなく、効率的な院内感染対策強化を実施することが可能となります。しかし、POT法に関するいくつかの報告では、市中蔓延株の存在が示唆されています。市中蔓延株の存在はPOT法を活用した院内伝播判定において、偶然同一POT型が検出される可能性が高くなり、誤って院内伝播と判定されてしまう可能性があります。また、市中蔓延株は地域によって特異的な特徴を持つ可能性があるため、地域での検出状況の調査が必要となります。そこで、我々は市中のMRSAにおける地域ごとのPOT型検出状況を調査することにより、各地域でのPOT法を用いた院内感染対策に寄与できると考え、MRSAにおけるPOTサーベイランスを2019年より開始し、2022年よりWEB上での集計データのフィードバックを実施しています（図1,2）。今後、地域を拡大して協力施設を募り、より多くの地域で感染対策に役立つデータを提供していきたいと考えています。

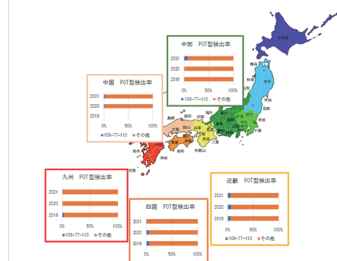
外来または、入院で持ち込み判定されているMRSAのPOT法による解析を実施されているご施設で、本サーベイランスに参加をご希望頂ける方は、中家（nakaie@omu.ac.jp）までご連絡ください。

POTサーベイランス還元情報

POT型別検出率

検出POT値 → 106-77-113

検索したい
POT型を入力



年 検索POT型の検出数 検索POT型以外の検出数

年	106-77-113	その他	計	106-77-113(%)
近畿	2019	10	173	5.5%
近畿	2020	21	286	6.8%
近畿	2021	21	366	5.4%

地域	77-113	その他	計	検索POT型の割合%
中国	2019	0	0	
中国	2020	4	192	
中国	2021	6	154	8.8%

年	106-77-113	その他	計	106-77-113(%)
四国	2019	4	69	6.0%
四国	2020	4	77	4.9%
四国	2021	1	57	1.7%

年	106-77-113	その他	計	106-77-113(%)
九州	2019	2	42	4.5%
九州	2020	0	30	0
九州	2021	0	23	0

年	106-77-113	その他	計	106-77-113(%)
中部	2019	0	5	0
中部	2020	0	14	0
中部	2021	1	13	7.1%

図1 POTサーベイランス還元情報の例

検索したいPOT値を入力することで、各地域の検出率の情報が確認できます

図2 大阪公立大学大学院 医療研究科 臨床感染制御学のHP
HP内のPOTサーベイランスタブをクリックすることで、サーベイランスの情報の閲覧が可能です。閲覧には上記二次元バーコードより必要事項をご入力頂き、パスワードの取得をお願いします。


関東化学株式会社
 試薬事業本部 試薬部

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

TEL : 03-6214-1090

HP : <https://www.kanto.co.jp>

Vol.1 20230320
 EA230304