

# THE CHEMICAL TIMES

2016 No.1 (通巻239号)

ISSN 0285-2446

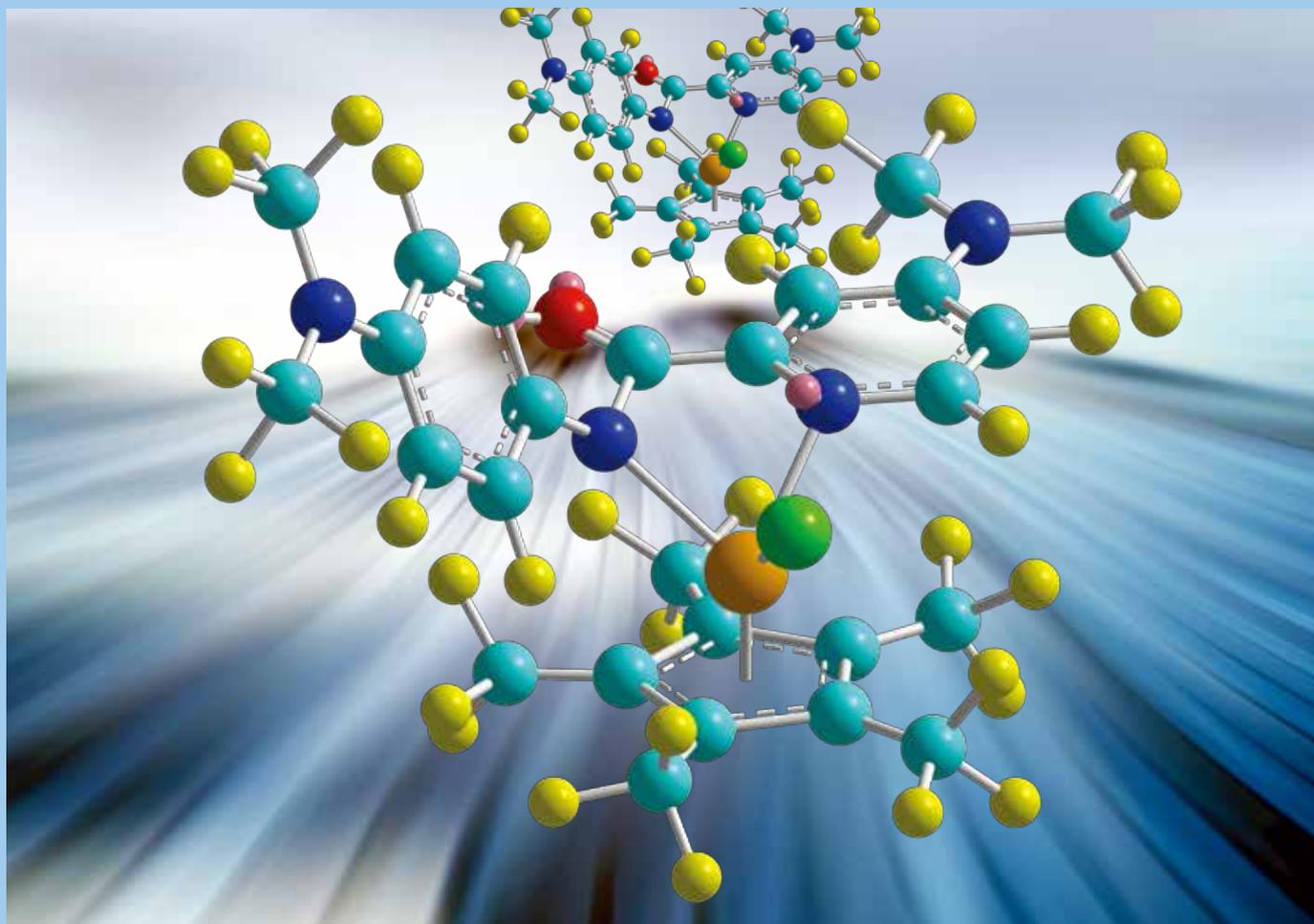
新年を迎えて

野澤 学 01

特集

## 感染症 —薬剤耐性菌—

- 薬剤耐性菌の基礎知識「ESBLおよびカルバペネマーゼ産生菌」感染制御活動— 菅井 基行 02  
鹿山 鎮男
  - 薬剤耐性菌検出のために臨床検査室が実施すべき検査法 — 中村 明子 09  
海住 博之
  - 感染症検査の最前線—迅速な薬剤感受性検査の最新動向を含めて— 大楠 清文 14
  - 医療関連感染と薬剤耐性菌—臨床微生物検査室に求められる感染制御活動— 大塚 喜人 20
- トピックス** 未知微生物をお手軽に分離培養するテクニック — 田中 靖浩 25  
玉木 秀幸



# 新年を迎えて

代表取締役社長 野澤 学



あけましておめでとうございます。  
「THE CHEMICAL TIMES」をご愛読の皆様におかれましては、つつがなく良い新年を迎えられたこととお慶び申し上げます。

昨年秋のノーベル賞は、生理学・医学賞、物理学賞それぞれで日本人が受賞し連日の受賞発表に日本中が歓喜に沸きました。自然科学分野では2年連続であり、同分野の日本人受賞者は合計で21名となりました。この事実は我々日本人が誇りとすべきことであり、科学技術立国として今後の研究開発活動に力と勇気を与えてくれるものと期待しております。

さて、本誌は1950年の創刊以来、今号で239号となりました。「ケミタイ」という愛称で長く親しまれ、ご愛読いただいております皆様は既にお気づきかと存じますが、今号より体裁を大胆に変更しました。意図したのは、読者の皆様に“最新的话题”を“より興味のある内容”で“より判り易く”提供するということです。このため、号毎に特集テーマを定め、統一したテーマ構成でまとめることとしました。今号の特集テーマは「薬剤耐性菌」です。昨年韓国で発生したMERSコロナウイルスによる感染症は記憶に新しいところですが、同様にリスクの高まりが懸念されているのが薬剤耐性菌の問題です。このリスクは我々の日常生活にも大きく関わることから、専門分野以外の方にも興味を持って読んでいただけるのではないのでしょうか。なお、今後の特集としては、「カップリング反応」(240号)、「再生医療」(241号)、「標準物質」(242号)を計画しております。皆様のご期待に応えられましたら幸甚に存じます。

ところで、当社に関わる動向としまして、昨年秋

に岩手工場内に新医薬品工場が完成いたしました。新工場は需要が高まっている医薬品原薬の供給能力向上を図ることを目的としたものですが、BCPへの対応を図るとともに既存の医薬品工場(埼玉県草加市)での余力を確保し、新たな原薬や中間体の開発を加速させることも狙いであります。さらに、自社で開発した革新的な触媒反応を医薬品製造に応用することも進めており、新工場の順調な立ち上げを期待したいところです。



最後になりますが、この新しい「ケミタイ」の表紙を飾っているイラストは、当社で開発した「還元的アミノ化触媒」の分子モデルをアレンジしたものです。この触媒は第1級アミンから第3級アミンをワンポットで簡便に効率良く合成できる優れたものであり、医薬品合成等への応用が期待されています。今後も自社開発品に限らず、新しく開発された優れた試薬や研究成果を意欲的に取り上げ、より充実した内容にして参りたいと思いますので、相も変わらぬ皆様のご指導、ご鞭撻を何卒宜しくお願い申し上げます。

この一年が皆様にとって光輝に満ちた幸多い年でありますように祈念しております。

# 薬剤耐性菌の基礎知識 「ESBLおよびカルバペネマーゼ産生菌」

ESBL - and carbapenemase-producing bacteria

広島大学 院内感染症プロジェクト研究センター

鹿山 鎮男、桑原 隆一、繁本 憲文、木場 由美子、久恒 順三、大毛 宏喜、菅井 基行

Shizuo Kayama, Ryuichi Kuwahara, Norifumi Shigemoto, Yumiko Koba, Junzo Hisatsune, Hiroki Ohge, Motoyuki Sugai  
Project Research Center for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima University



## キーワード

カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(CPE)、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE)、ESBL、ステルス型

## 01 | はじめに

世界的には1980年代からヨーロッパ、続いて米国で基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(Extended Spectrum β-Lactamase: ESBL)産生菌が出現し、増加してきているが、わが国では海外に比べ、近年までESBL産生菌の流行は顕著ではなかった。しかし2000年を過ぎた頃から徐々に増加が見られ、ここ数年はかなり急激な勢いで分離数が増加している。その影に隠れて国内でも密やかにカルバペネムに耐性を示す腸内細菌科細菌が分離され始めている。カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(CPE)は世界的に大問題となっており、CLSI M100-S22やEUCASTの基準で感性を示す株が検査の網をくぐり抜けてしまう点が指摘されている。我が国で分離され始めているステルス型CPEも同様な性質を持つ。

本稿ではグラム陰性菌のβ-ラクタム薬耐性について概説し、我が国で見られるESBLおよびカルバペネマーゼ産生菌について述べる。

## 02 | 腸内細菌科におけるβ-ラクタム薬耐性の機序(概論)

グラム陰性菌には外膜と内膜が存在し、これらに挟まれた部分はペリプラズムと呼ばれる空間を形成する。グラム陰性菌にとって、外膜は自身に抗菌薬が流れ込む際の最初の防御壁となる<sup>1)</sup>。

外膜には、様々なタンパクから形成されるポーリンと呼ばれるチャンネルが存在し、これによって薬剤が菌体内へ流入する。すなわち、β-ラクタム薬が環境中に存在する場合、β-ラクタム薬は菌体表面のポーリンによって形成された親水性チャンネルによって外膜を通過し、菌体内部に取り込まれる。このようにして菌体内に取り込まれたβ-ラクタム薬はペリプラズム内部においてpenicillin-binding proteins (PBPs)と結合し、ペプチドグリカン合成を阻害することで菌体に殺菌的に作用する。このようなβ-ラクタム薬の作用の一連の流れに基づき、β-ラクタム薬に対する耐性機序は以下のように分類できる(図1)。

- 1) β-ラクタム薬を加水分解することができる酵素がペリプラズム中に分泌される。
  - 2) 外膜に存在するポーリン孔の変化または消失により外膜の浸透性が低下し、β-ラクタム薬の菌体内部への流入量が減少する。
  - 3) 排出ポンプにより、β-ラクタム薬が排出される。
- 上記のうち、1)に関しては今回のメインピックスであるため、後の章で詳しく述べることにする。2)と3)に関しては、薬剤が細菌細胞のいわゆる“隔壁”を往来する際の流入量の低下あるいは排出量の増加によって菌体内部の薬剤濃度を減少させることにより、PBPsへの効果を減弱させることになる。

グラム陰性菌の外膜は疎水性バリアーを形成し、外界からの刺激、例えば重金属や消毒薬などから自分の身を守っている。この外膜には親水性のチャンネルを形成するポーリンと呼ばれるタンパクがあり、必要な栄養素をここから取り込むが、同時に抗菌薬も取り込まれる。ポーリンは基質に対する特異性や、

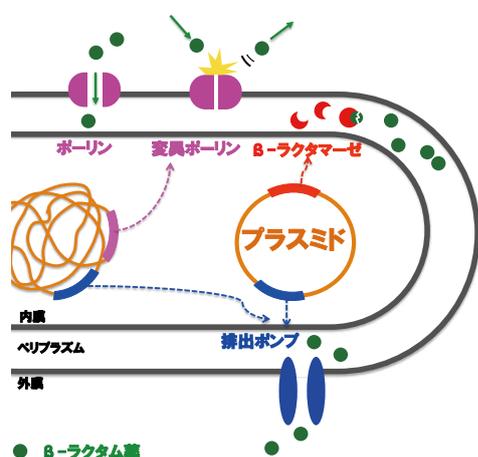


図1.グラム陰性菌のβ-ラクタム薬耐性メカニズム

単量体か三量体かといった構造的な基準などに基づき、いくつかの種類に分類されている<sup>1</sup>。ちなみに、大腸菌では3つの主要な三量体ポーリンOmpF、OmpC、PhoEが知られており、これらについてポーリンの先駆的研究がなされ、そこで得られた情報は現在のポーリンに関する知識の基礎となっている。OmpFとOmpCは陽イオンに親和性があり、PhoEは無機リン酸塩と陰イオンに親和性がある<sup>1</sup>。腸内細菌科では、薬剤を取り込むのはOmpFかOmpCファミリーに属し、これらに変異が導入されることや発現量の変化によって薬剤感受性が変化する。ちなみに、緑膿菌や*Acinetobacter baumannii*などは生来、 $\beta$ -ラクタム薬が効きにくいことが知られているが、これは低い外膜透過性と関係がある<sup>1</sup>。緑膿菌などで認められるこの外膜透過性の低下は、ポーリンの少なさと腸内細菌科細菌のポーリンとの物理化学的な性状の違いから生じている。また、緑膿菌以外の*Citrobacter*、*Enterobacter*、大腸菌や*Klebsiella*などの $\beta$ -ラクタム薬感受性は、OmpCまたはOmpFグループに属する非特異的ポーリンの存在が密接に関係する<sup>1</sup>。

このようなポーリンの変化による薬剤耐性は、以下の4つに分類される。

ポーリンの構造そのものに変化は無いが、発現量が減る場合。発現量に変化は無いが、チャンネルの基質が制限された場合。発現量に変化は無いが、変異によってポーリンの構造が変化してしまった場合。

ポーリンの構造も発現量も変化が無いが、チャンネル阻害剤が存在する場合。

$\beta$ -ラクタム薬耐性と薬剤排出ポンプの関与は1990年代に緑膿菌を用いた基礎研究がさかんに行われていたものの、腸内細菌科細菌でより深い臨床的な議論がされるようになったのはつい最近のことである。腸内細菌科細菌の主要な排出ポンプであるAcrAB-TolCに関しても、より臨床的な点からの研究が進んでいる。例えば、*K. pneumoniae*もAcrAB-TolCシステムを保有しており、異なるクローン間においてもこのシステムは共通して保有されていることが分かった。Phenylalanyl arginyl  $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N)は排出ポンプの阻害剤としてよく知られており、クロラムフェニコール、ナリジクス酸、オフロキサシン、エリスロマイシンなどのMICを低下させることが過去に大腸菌やサルモネラで示されていた。しかし近年になって、クロキサシリンが*K. pneumoniae*臨床分離株においても排出ポンプの基質となることが示され、他の $\beta$ -ラクタム薬、特にセフォキシチン、アモキシシリン、ピペラシリン、セフェ

ピムなどでも同様のことが示された<sup>2</sup>。

この後の章で、 $\beta$ -ラクタム薬を加水分解することができる酵素、 $\beta$ -ラクタマーゼに関して詳しくみていくことにする。

## 03 | 広域 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌とその $\beta$ -ラクタマーゼの分類・特徴

世界的には1980年代からヨーロッパ、続いて米国で基質特異性拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ(Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase: ESBL)産生菌が出現し、増加してきているが、わが国では海外に比べ、近年までESBL産生菌の流行は顕著ではなかった(図2)。しかし2000年を過ぎた頃から徐々に増加が見られ、ここ数年はかなり急激な勢いで分離数が増加している。その影に隠れて国内でも密やかにカルバペネムに耐性を示す腸内細菌科細菌が分離され始めている。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(Carbapenem resistant Enterobacteriaceae: CRE)は我が国では感染症法に基づいた感受性基準に基づいて呼称される(表1)。またカルバペネムを含むほとんどすべての $\beta$ -ラクタム薬を分解するカルバペネマーゼを産生する腸内細菌科細菌をCarbapenemase producing Enterobacteriaceae: CPEと呼んでいる。我が国でもCREの判定基準以下のカルバペネムMICを示すCPEが出現しており、それをステルス型CPEと呼んでいる。

### i) ESBL産生菌

1960年代後半より基質特異性に基づく $\beta$ -ラクタマーゼの分類法がいくつか提案されたが、現在の分類法として最も一般的なものはアミノ酸配列をもとにしたAmblerの分類である。これは、特徴的な配列モチーフをベースとしてA~Dの4種類に分類している。この分類において、クラスAに属する酵素はペニシリン系抗菌薬を、クラスCに属するものはセファロスポリン系抗菌薬を、クラスDに属するものはオキサシリンをそれぞれ効率よく分解する。クラスA、C、Dに属する酵素は活性中心にセリン残基を有しており、セリン型 $\beta$ -ラクタマーゼとして知られている。一方で、クラスBに属する酵素は1分子、あるいは2分子の亜鉛イオンを有することからメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼと名付けられ、カルバペネム系薬剤を含むほぼ全ての $\beta$ -ラクタマーゼを分解することが特徴である。

クラスAにおいて、より広い範囲の薬剤に対して分解活性を示すESBLが多く報告されている。ESBLには厳密な意味での定義が存在しない。しかし、一般的に使用されている定義としては、ESBLはペニシリン、第一世代、第二世代、第三世代のセファロスポリン(セフォタキシム、セフトリアキソン、セフトジジムなど)、アズトレオナムなどのモノバクタムを加水分解するが、セフォキシチンやセフォテタンなどのセファマイシンやカルバペネムを分解せず、クラブラン酸、スルバクタム、タゾバクタムなどに対して阻害されるものをいう。ブッシュらの基質と阻害剤に基づいた機能分類<sup>3</sup>によると、クラスAのESBLはグループ2beに属する。グループ2beの"e"は、基質特異性が拡張したことを示す。これはさらにセフトジジムを効率よく分解するセフトジジマーゼと、セフォタキシムを効率よく分解するセフォタキシマーゼに分けることができる<sup>4</sup>。(表1)セフトジジマーゼとしてTEM、SVH、PER、VEB、TLA-1、GES/IBCなどが存在し、セフォ

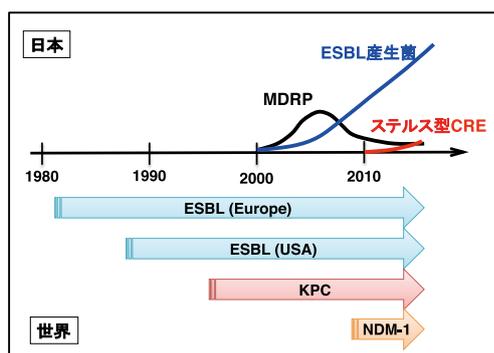


図2. 1980年代以降の世界におけるグラム陰性菌 $\beta$ -ラクタマーゼの潮流と我が国における薬剤耐性菌の出現

タキシマーゼとしてはSFO-1、BES-1、CTX-Mなどが知られている<sup>4</sup>。セフトアジマーゼ型酵素は、アミノ酸変異が生じたことで基質特異性が拡張したタイプであり、このタイプは活性部位のアミノ酸残基の変異が基質特異性に大きく影響していると考えられる<sup>5</sup>。一方で、セフトキシマーゼ型酵素は点変異で生じたタイプとは異なり、基質結合部位の柔軟性が増すことで基質が拡張していると考えられる<sup>5</sup>。

現在、最も世界的に広がっているESBLはCTX-Mである。これらはそもそも、ISEcp1とISCR1という2種類のinsertion sequence (IS) が *Kluyvera* 属の染色体からβ-ラクタマーゼ遺伝子の移動を引き起こしたことに由来するが、これらのISにはえり好みが存在し、ISEcp1はほとんどの種類のbla<sub>CTX-M</sub>を運び一方でISCR1はbla<sub>CTX-M-2</sub>とbla<sub>CTX-M-9</sub>を好んで運ぶ。CTX-M familyとnon-ESBL β-ラクタマーゼには相同性の高い部分がいくつか存在するが、Ser237とArg276はCTX-M familyに特異的であり、これらの残基が他のβ-ラクタマーゼに比べてCTX-M familyがセフトキシマーゼを特異的に分解できることを特徴付けているということもつい最近、明らかにされた<sup>6</sup>。

ii) カルバペネマーゼ産生菌

カルバペネマーゼはAmbler分類で3つのクラスに認められ、世界的にみるとその分布に地域特異性がある(表2)。クラスAカルバペネマーゼとしては米国で見出されたKPCが欧米を中心に広がりを見せている。クラスDカルバペネマーゼとしてはOXA-48やOXA-181がギリシャなど欧州を中心に検出されている。これらの酵素は基質認識や触媒反応に重要なアミノ酸残基の位置が従来のクラスAやD型の酵素とわずかに異なることでカルバペネム分解活性を獲得したと考えられる。一方、クラスBカルバペネマーゼはメタロβ-ラクタマーゼ(MBL)で、その幅広い基質特異性からカルバペネムを含むほぼすべてのβ-ラクタム薬を分解できる。我が国ではIMP型が主流で、NDM型は急速に世界的に拡散しており、大きな懸念となっている。

CPEには国内ですでに市中で分離されるものがある一方で、海外からの帰国者とともに輸入される例も散発的に見られる。私どもはカルバペネマーゼをその由来から大きく二つのグループ、内地型と黒船型に分けている(表3)<sup>7</sup>。内地型とは既に国内に分布している株をいう。一方、黒船型は海外からの持ち込みによるものである。近年のメディカル・ツーリズム活発化の

表1.グラム陰性菌β-ラクタマーゼの分類とESBLの位置付け

Bush-Jacoby-Medeiros group	Ambler class	効率よく分解する基質	特徴	阻害		代表的な酵素
				クラブラン酸	EDTA	
1	C	セファロスポリン	グラム陰性菌の染色体上に認められるが、おそらくプラスミド上に存在する。カルバペネムを除く全てのβ-ラクタムを分解できる。	されない	されない	ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1 (グラム陰性菌由来AmpC)
2a	A	ペニシリン		される	されない	グラム陽性菌由来ペニシリナーゼ
2b	A	ペニシリン、セファロスポリン		される	されない	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be (ESBL)	A	オキシイミノセファロスポリン、モノバクタム	セフトアジマーゼ型酵素。アミノ酸変異が生じたことで基質特異性が拡張したタイプ。	される	されない	TEM, SHV, PER, VEB, TLA-1, GES/IBC
			セフトキシマーゼ型酵素。点変異で生じたタイプとは異なる。			SFO-1, BES-1, CTX-M
2br	A	ペニシリン	阻害剤耐性のTEMなどが含まれる。	(±)	されない	TEM-30
2c	A	ペニシリン、カルベニシリン		される	されない	PSE-1
2d	D	ペニシリン、クロキサシリン	クロキサシリン(オキサシリン)分解酵素であり、クラブラン酸に少くとも阻害を受ける。	(±)	されない	OXA-1, OXA-10
2e	A	セファロスポリン		される	されない	<i>Proteus vulgaris</i> 由来誘導型セファロスポリナーゼ
2f	A	ペニシリン、セファロスポリン、カルバペネム	セリン型カルバペネム分解酵素。	される	されない	Sme-1, KPC-2, IMI-1
3	B	カルバペネム系を含むほぼ全てのβ-ラクタム	メタロβ-ラクタマーゼであり、カルバペネムを含むほぼ全てのβ-ラクタムを分解できるが、モノバクタムは分解できない。	されない	される	IMP-1, NDM-1

Bush K et al. 1995. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39:1211-1233.  
Shah AA et al. 2004. Res Microbiol 155:409-421.

表2.カルバペネマーゼの分類とその基質

Ambler class	β-lactamase	セフェム				カルバペネム
		ペニシリン	セファロスポリン	セファマイシン	キサセフェム	
		1st	2nd	3rd	4th	
A		■				
A	ESBL	■	■			
A	KPC	■	■	■	■	
B	MBL	■	■	■	■	■
C	AmpC	■	■			
D	OXA	■	■	■	■	■

ESBL: Extended spectrum β-lactamase  
KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase  
MBL: Metallo-β-lactamase  
OXA: oxacillinase

表3.我が国で分離された主なカルバペネマーゼ

	種類	Ambler class	ステルス性の有無	産生菌
黒船型	NDM	Class B		<i>E. coli</i>
	IMP-7	Class B		<i>P. aeruginosa</i>
	OXA-48	Class D	ステルス型	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
	OXA-181	Class D	ステルス型	<i>K. pneumoniae</i>
	KPC	Class A	ステルス型	<i>K. pneumoniae</i>
内地型	IMP-1	Class B	ステルス型	<i>Enterobacteriaceae</i>
	IMP-6	Class B	ステルス型	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas</i>
	IMP-11	Class B	ステルス型	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas</i>
	IMP-34	Class B	ステルス型	<i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i>
	IMP-52	Class B	ステルス型	<i>E. coli</i>
	TMB-1	Class B	ステルス型	<i>Acinetobacter</i>
	TMB-2	Class B		<i>Acinetobacter</i>
	SMB-1	Class B		<i>Serratia marcescens</i>
	VIM-2	Class B		<i>P. aeruginosa</i>

影響を受けて、海外で外科治療等を受けた後、帰国後に発症して見つかるケースが増えている。また、カルバペネマーゼを産生するにも関わらず、薬剤感受性検査でカルバペネム感性と判定されてしまうCPEをステルス型CPEと呼んでいる。このタイプのCPEは検査の網をくぐり抜ける可能性があるため、院内感染対策上、重要な耐性菌と位置づけている。

① 内地型

IMP-1, IMP-11産生CPE

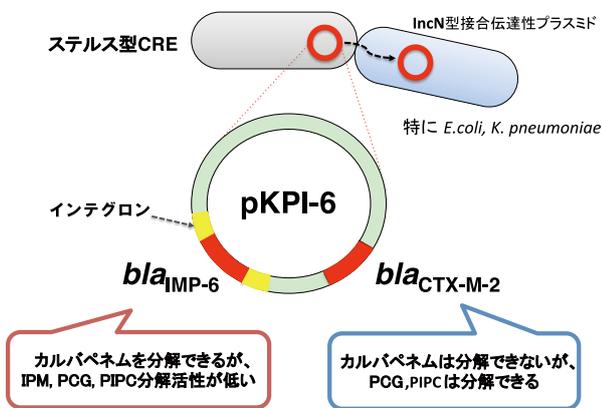
過去の報告ではカルバペネムのMICが高いものが多かったが、中にはMurataniら<sup>9</sup>が報告した*K. pneumoniae*や春日ら<sup>9</sup>が報告した*E. coli*, *Enterobacter*のようにIPMが<1μg/mlないし2μg/mlで、レトロスペクティブに見るとIMP-1産生ステルス型CREも我が国で分離されている。HayakawaらはIMP-1あるいはIMP-11を産生する*E. cloacae*が分離された15症例

について対症例対照研究を報告している。菌株のIPM (67%)、MEPM (80%)のMICが<1 μg/mlであった<sup>10</sup>。

IMP-6産生CPE

広島県内で行っているサーベイランスにおいて、IPMには感受性を示すがMEPMには耐性を示す*Klebsiella pneumoniae*が2009年以降、継続的に検出されている<sup>11</sup>。このような形質を保有する菌の分離は*K. pneumoniae*だけにとどまらず、*E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*など多くの腸内細菌科細菌に相次いで発見されてきた。このような形質をもつ菌をステルス型CPEと名付けた。

このタイプのステルス型CPEが示す特徴的なカルバペネム感受性は、本菌が保有するメタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子 *bla<sub>IMP-6</sub>* によるものである<sup>11</sup>。*bla<sub>IMP-6</sub>*は、*bla<sub>IMP-1</sub>*と一塩基異なることで([A640G])アミノ酸の変異が起こり、酵素活性測定(*k<sub>cat</sub>*/*K<sub>m</sub>*)によると、IPM分解活性はMEPM分解活性の7分の1に低下しているという特徴がある<sup>12</sup>。これが、腸内細菌科細菌がステルス型を示す原因となっている。*bla<sub>IMP-6</sub>*は、伝達性プラスミドであるpKPI-6上のインテグロンに存在している<sup>13</sup> (図3)。pKPI-6はインテグロンに加え、もう一つの可動性因子上に、ESBL遺伝子である*bla<sub>CTX-M-2</sub>*を保有している<sup>13</sup>。*bla<sub>CTX-M-2</sub>*はカルバペネムを分解できないものの、PCG、PIPCの分解は可能である。一方、*bla<sub>IMP-6</sub>*はMEPMを分解することが可能であるが、IPM、PCG、PIPCの分解活性は大きく低下している。つまり、*bla<sub>IMP-6</sub>*と*bla<sub>CTX-M-2</sub>*を同時に保有した菌は、ほぼ全てのβ-ラクタム薬には耐性を示すもののIPMのみに感受性を示すという特殊な表現型を示す(図3、表4)。pKPI-6を保有する株の臨床的な問題点として、カルバペネム系薬の感受性試験をIPM単剤で行った場合はカルバペネム感受性と判断されてしまい、臨床的に治療効果



ほぼすべてのβ-ラクタム薬に耐性だがIPMのみに感受性を示す (IPM 感性 / MEPM 耐性)

図3. *bla<sub>IMP-6</sub>* 保有プラスミドpKPI-6

表4.ステルス型CPEの薬剤感受性 (IMP-6産生株とIMP-34産生株を例に)

	IMP-6産生CRE					IMP-34産生CRE				
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>				
Ampicillin	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Piperacillin	>64	>64	>64	>64	>64	64	32	16	64	16
Cefazolin	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Cefotiam	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Cefotaxime	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	32
Ceftazidime	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Cefozopran	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	8	16	8
Cefmetazole	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
Cefaclor	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Cefpodoxime	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4
Flomoxef	32	32	32	32	32	>32	>32	32	32	32
Aztraonam	>16	>16	>16	>16	>16	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Imipenem	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
Meropenem	>8	>8	>8	>8	>8	8	2	2	4	2
Amoxicillin/clavulanate	16	16	16	16	16	>16	>16	>16	>16	>16
Cefoperazone/Sulbactam	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
Piperacillin/Tazobactam						≤16	≤16	≤16	≤16	≤16
Amikacin	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4
Gentamicin	4	4	4	4	4	4	4	2	2	2
Minocyclin	>8	>8	>8	>8	>8	2	2	4	4	2
Levofloxacin	>4	>4	>4	>4	>4	2	1	1	≤0.5	≤0.5
Fosfomycin	>16	16	16	16	16	>16	16	>16	16	≤4
Sulfamethoxazole/trimethoprim	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	>2	>2	>2

# Susceptibility tests were performed using the MicroScan system panel of (μg/mL) antibiotics (Siemens).

\* Columns indicate MIC profiles of the donor, the transconjugant and the recipient.

のない抗菌薬を投与してしまう危険性があることが挙げられる<sup>11,14</sup>。しかも、薬剤感受性を自動で測定する迅速診断装置の一部の機種では、IPMのみならずMEPM耐性の検出もできないということを報告した<sup>15</sup>が、現在はカードのアップデートやアルゴリズムの改良などの対策が進んでいる<sup>16,17</sup>。

### IMP-34産生CPE

ステルス型CPEの検討を行っている過程で、IMP-6陰性であるにも関わらずステルス型を示す*K. oxytoca*及び*K. pneumoniae*が見出された<sup>18</sup>。これらの株は塩基配列決定の結果、過去に報告がないメタロ-β-ラクタマーゼを保有していることが分かり、IMP-34と名付けた。IMP-34を保有する菌株は、IPM中間耐性と判定されるのが特徴である(表4)。*bla*<sub>IMP-34</sub>は接合伝達にて大腸菌BL21株への伝達が確認されたことから、プラスミド上に存在することが明らかになった。そこで、*bla*<sub>IMP-34</sub>保有プラスミドをpKOI-34と名付け、塩基配列決定を行った結果、pKOI-34は87,343 bp(GC 53%, 106 ORF)のIncL/Mプラスミドであることが判明した。pKOI-34は、IncL/Mプラスミドの祖先とされるpEL60類似の骨格に2個の可動性因子を有しており、前者はヒ素耐性遺伝子群、後者は*bla*<sub>IMP-34</sub>を含んでいた(投稿中)。このIMP-34を保有するインテグロンも接合伝達可能なプラスミド上に存在していることから、拡散する可能性が示唆されている。

表5.2014年改正 感染症法に基づく腸内細菌科細菌のカルバペネム薬耐性基準

検査方法	検査材料
分離・同定による腸内細菌科細菌の検出、かつ、次のいずれかによるカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対する耐性の確認  <b>ア</b> メロペネムのMIC値が2μg/ml以上であること、又はメロペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22mm以下であること <b>イ</b> 次のいずれにも該当することの確認 (ア) イミペネムのMIC値が2μg/ml以上であること、又はイミペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22mm以下であること (イ) セフメタゾールのMIC値が64μg/ml以上であること、又はセフメタゾールの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が12mm以下であること	血液、腹水、胸水、髄液その他の通常無菌的であるべき検体
次のいずれにも該当することの確認  <b>ア</b> 分離・同定による腸内細菌科細菌の検出 <b>イ</b> 次のいずれかによるカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対する耐性の確認 (ア) メロペネムのMIC値が2μg/ml以上であること、又はメロペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22mm以下であること (イ) 次のいずれにも該当することの確認 a イミペネムのMIC値が2μg/ml以上であること、又はイミペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22mm以下であること b セフメタゾールのMIC値が64μg/ml以上であること、又はセフメタゾールの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が12mm以下であること <b>ウ</b> 分離金が感染症の起原因菌と判定されること	喀痰、膿、尿その他の通常無菌的ではない検体

### ② 黒船型

#### KPC産生CPE

KPCはAmbler分類でclass Aに属するセリン-β-ラクタマーゼ(カルバペネマーゼ)で2001年に米国で*K. pneumoniae*の産生例が報告された。国立感染症研究所の報告によれば我が国では2009年に第1例が報告され、2012年までに6例の報告がある。渡航先としてはインド、中国、北米が挙げられている。我が国での報告例は全て*K. pneumoniae*であるが、世界的には他の腸内細菌科、*P. aeruginosa*、*Acinetobacter*からも分離されている。

#### NDM産生CPE

NDM産生菌は2009年にインドからスウェーデンに帰国した患者から分離され、その出自からニューデリー・メタロ-β-ラクタマーゼ(NDM-1)と命名された。同年に我が国でもインドに旅行した患者から最初のNDM-1産生大腸菌が分離されている(獨協医大株)。NDMは亜型がたくさん見つかって来ているがインド・パキスタン・バングラデシュ地域が流行地で世界中への拡がり懸念されている。広島県においてもNDM-1産生大腸菌が分離された<sup>19</sup>。患者はパキスタンにて外科手術を受け、帰国した後に術後感染症で入院中に本菌が分離された。本菌はFOM以外の検討した全ての抗菌剤について高いMICを示した。NDM産生菌としては国内で7例の報告がある。広島株も獨協医大株もプラスミド上に*bla*<sub>NDM-1</sub>を保有していた。広島株ではそれ以外に*bla*<sub>OXA-10</sub>、*bla*<sub>CMY-6</sub>、アミノグリコシド耐性遺伝子として*rmtC*を保有していた。

表6.主なカルバペネム薬感受性基準(CLSI, EUCAST, 感染症法)に基づくIPMの基準と我が国で分離されているIMP-6保有各種腸内細菌科細菌のIPM MIC

MIC	1	2	4	8	16	32 μg/ml
CLSI M100-S22	S	I	R	R	R	R
CLSI M100-S19	S	S	S	I	R	R
EUCAST	S	S	I	R	R	R
SCREEN CUT OFF (EUCAST)						
CRE(5類感染症)		R	R	R	R	R
IMP-6 Kp CRE						
IMP-6 Ko CRE						
IMP-6 Ec CRE						

我が国で出現しているCPEは肺炎桿菌(Kp)、*Klebsiella oxytoca*(Ko)、大腸菌(Ec)他、様々な菌種が見られるが、その多くはIPM MIC<1で現在の基準ではS(感性)と判定され、CREとみなされない。

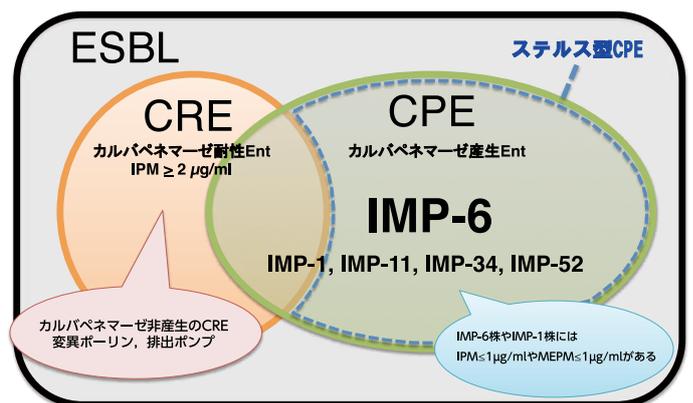


図4.我が国のCRE, CPE, ステルス型CPEの関係性

## OXA-48-like産生CPE

2010年、インドのムンバイにて治療を受けた患者が帰国後、入院時に提出されたカテーテル尿から分離された*K. pneumoniae*がIPM感受性MEPM耐性というステルス型薬剤感受性を示した。SMA diskを用いた確認試験において、MBLは陰性であるとの結果であったことから、*bla*<sub>IMP-6</sub>保有の可能性は否定された。しかし、modified Hodge Test (MHT)は陽性となったことから、MBL以外のカルバペネマーゼ産生が示唆された。次世代シーケンサーMiSeqを用いてドラフト配列を得た結果、*bla*<sub>OXA-48</sub> familyである*bla*<sub>OXA-181</sub>や*bla*<sub>CTX-M-15</sub>を保有していることが判明した<sup>20</sup>。また、解析の結果、*bla*<sub>OXA-181</sub>は*K. pneumoniae*の染色体上に存在することが示された。現在までに報告されている*bla*<sub>OXA-181</sub>はプラスミド上に存在していたが、広島株は染色体上に*bla*<sub>OXA-181</sub>が存在することが示された初めての症例であった<sup>20</sup>。また、*bla*<sub>OXA-181</sub>の上流には、広島株も含めてこれら全ての株に共通してISEcp1が存在することが分かった。塩基配列解析の結果から、反復配列に挟まれた部分がISEcp1によって染色体に組み込まれたと考えられた。

OXA-181は、IPM分解活性のほうがMEPM分解活性よりも約20倍高いことが報告されており、このような酵素活性 ( $k_{cat}/K_m$ )のみで考察するならば、OXA-181を保有する株は、むしろ“IPM耐性MEPM感受性(つまり、今回の臨床分離株が示す表現型と逆)”となってしまうと考えられた。そこで、この臨床分離株がIPM感受性MEPM耐性を示すためには、別のメカニズムが存在する可能性が示唆された。解析の結果、この現象の原因は外膜タンパク質の変異であることが明らかになった<sup>20</sup>。ESBL産生*K. pneumoniae*が保有する外膜タンパク質OmpK35が変異により機能を失い、別の外膜タンパク質OmpK36に、OmpK36Vと呼ばれるフレームシフト変異がある株では、IPM感受性MEPM耐性になることがすでに報告されている。次世代シーケンサーで得た塩基配列解析の結果、私共が解析していた臨床分離株にも同様の変異があることが判明し、この株がIPM感受性MEPM耐性を示すのはOXA-181が原因ではなく、外膜タンパク質の変異のためであることが示された<sup>20</sup>。

## 04 | 国内でのCRE、CPE、ステルス型について

2014年9月19日に感染症法施行規則(省令)が改正され、「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症」が、感染症法五類全数把握疾患に指定された。カルバペネムの耐性基準は表5に示す方法に拠る。表6に米国で用いられているCLSI基準、欧州で用いられているEUCAST基準と合わせて現在のイミペネムの判定基準を一覧にした。一方、西日本を中心に分離されているCPEの大部分がIMP-6産生CPEであるが、そのイミペネムMICはほとんどが $<1 \mu\text{g/ml}$ である。このため現行基準ではその多くがS(感性)と判定されCREとみなされない。国内で分離されるCREとCPEの関係を図4に示した。IMP-6産生CPEの中にはメロペネムに対しても $<2 \mu\text{g/ml}$ のものがある。このようにCREとみなされないCPEをステルス型CPEと呼んでいる。我が国におけるCREあるいはCPEの大規模な疫学データはまだない。JANISの五類全数把握に基づく全国調査検査部門2014年年報(CLSI2012版)の結果が待たれるところであるが、私どもが行った西日本地域でのサーベイランスによるとESBL産生*E. coli*の約1.0%、ESBL産生*K. pneumoniae*の約10%がCPEと考えられる。

検査室においてはスクリーニングの段階で如何にCPEを見出すかが最も重要なポイントになる。感受性検査のスクリーニングでは第3世代セファロスポリン系薬剤(CAZ, CMZ)に耐性を示した場合、あるいはIPMとMEPMのいずれかあるいは両方に対するMICが $1 \mu\text{g/ml}$ 以上の場合はメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生を疑い、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの確認検査を行う。薬剤感受性を自動測定する迅速診断装置はカードのアップデートやアルゴリズムの改良を行っていない場合はステルス型CPEのカルバペネム耐性を検出できないケースがある。自病院の検査室自動測定装置の設定条件、性質を知り、ステルス型CPEの基準株を用いてその薬剤感受性パターンを知っておくこと、検出ができるかどうかを確認することが重要である。

ステルス型CPEは見かけ上カルバペネムに感受性を示すが、試験管内においても菌濃度を増やすと明らかに細菌の増殖が観察される(図5)。このためカルバペネムの治療効果が得られない可能性がある。ステルス型CPEは通常のCPEと同じく、基本的には全ての $\beta$ -ラクタム薬は単剤使用ができないと考えるべきである。

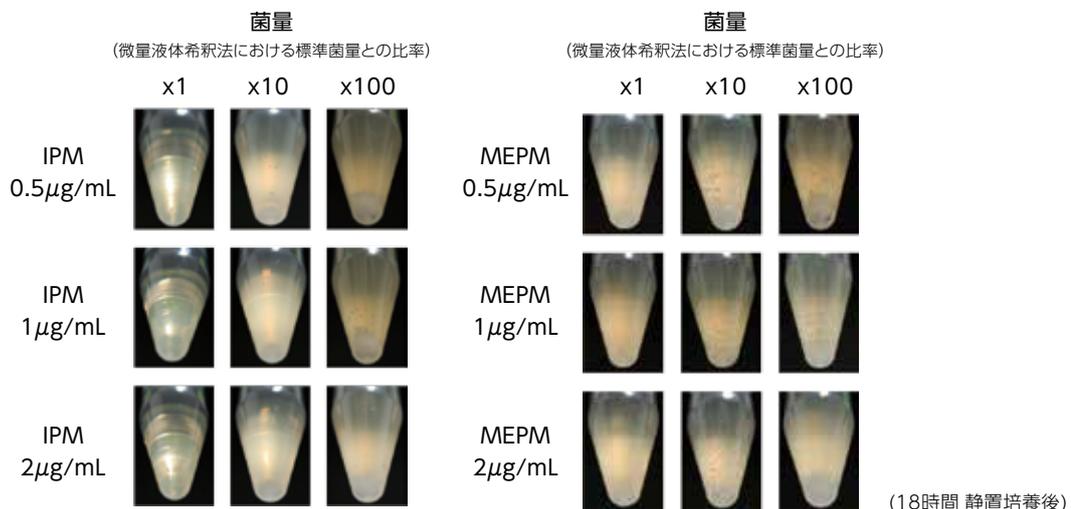


図5.IMP-6保有肺炎桿菌:菌量を増加した菌液にカルバペネムを添加した場合の菌の増殖について

## 05 | おわりに

2000年以降のESBL産生菌の爆発的増加の陰でステルス型CPEが密かに分離され始めている。またメディカル・ツーリズムが盛んになるに従い、患者の国際的移動に伴う耐性菌の移動の頻度も増してきている。いわゆる黒船型のカルバペネマーゼの国内への伝来である。検査室が驚くような多剤耐性菌は比較的早期に検出され、感染拡大予防策も立てやすいが、ステルス型の場合、その水際での侵入防止対策は難しい。内地型あるいは黒船型ステルスCPEを効率よく検出し、最初に患者が訪れる病院でのdetect and protectをいかに実施するか、我々の知恵が試されている。

## 参考文献

1. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):593-656. doi:10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003.
2. Pagès J-M, Lavigne J-P, Leflon-Guibout V, et al. Efflux pump, the masked side of  $\beta$ -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS ONE.* 2009;4(3):e4817. doi:10.1371/journal.pone.0004817.
3. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(6):1211-1233.
4. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. 2004. doi:10.1128/Antimicrob Agents Chemother 48.1.1-14.2004.
5. 井深章子 酵素反応からみた $\beta$ -ラクタマーゼの特徴 臨床と微生物 42巻4号P.17-22
6. Adamski CJ, Cardenas AM, Brown NG, et al. Molecular basis for the catalytic specificity of the CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Biochemistry.* 2015;54(2):447-457. doi:10.1021/bi501195g.
7. 鹿山鎮男, 桑原隆一, 繁本憲文, 木場由美子, 大毛宏喜, 菅井基行 わか<sup>1</sup>国のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 感染症 第45巻第1号P.30-38
8. Muratani T, Kobayashi T, Matsumoto T. Emergence and prevalence of  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to cepheims in Japan. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27(6):491-499. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.03.007.
9. 春日恵理子, 松本竹久, 金井信一郎, 小穴こず枝, 本田孝行, 川上由行: カルバペネム系薬剤に感性を示すIMP-1型Metallo- $\beta$ -lactamase産生腸内細菌. 感染症誌 2010; 84: 569-574.
10. Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, et al. Molecular and epidemiological characterization of IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a large tertiary care hospital in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(6):3441-3450. doi:10.1128/AAC.02652-13.
11. Shigemoto N, Kuwahara R, Kayama S, et al. Emergence in Japan of an imipenem-susceptible, meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla<sub>IMP-6</sub>*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;72(1):109-112. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.019.
12. Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(5):1343-1348. doi:10.1128/AAC.45.5.1343-1348.2001.
13. Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, et al. Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid encoding IMP-6 and CTX-M-2 from emerging carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(2):1356-1359. doi:10.1128/AAC.04759-14.
14. Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, et al. The first case of septicemia caused by imipenem-susceptible, meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Lab Med.* 2013;33(5):383. doi:10.3343/alm.2013.33.5.383.
15. Harino T, Kayama S, Kuwahara R, et al. Meropenem resistance in imipenem-susceptible meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates not detected by rapid automated testing systems. *J Clin Microbiol.* 2013;51(8):2735-2738. doi:10.1128/JCM.02649-12.
16. Koizumi A, Kasahara K, Komatsu Y, et al. Evaluation of the vitek 2 AST-N269 card for detection of meropenem resistance in imipenem-susceptible meropenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2013;51(11):3908-3908. doi:10.1128/JCM.02063-13.
17. 樫山誠也, 奥田立子, 鹿山鎮男 他: Imipenem感受性Meropenem耐性 *Klebsiella pneumoniae* (ISM RK)の検出における改良ライサス迅速法の有効性. 第25回日本臨床微生物学会総会 2014. 演題番号 P-160,315ページ
18. Shigemoto N, Kayama S, Kuwahara R, et al. A novel metallo- $\beta$ -lactamase, IMP-34, in *Klebsiella* isolates with decreased resistance to imipenem. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;76(1):119-121. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.030.
19. 鹿山鎮男, 桑原隆一, 繁本憲文 他.: 西日本において初めて分離された *bla<sub>NDM</sub>*保有大腸菌の性状解析. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会 2012. 演題番号 O2-038, 335ページ-b
20. Kayama S, Koba Y, Shigemoto N, et al. Imipenem-susceptible, meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-181 in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(2):1379-1380. doi:10.1128/AAC.04330-14.

# 薬剤耐性菌検出のために 臨床検査室が実施すべき検査法

The test should be performed in a clinical laboratory  
to detect multidrug-resistant bacteria

三重大学医学部附属病院 中央検査部／医療安全・感染管理部 主任臨床検査技師 **中村 明子**

Akiko Nakamura (Chief Medical Technologist)  
Mie University Hospital Department of Central Laboratory/Patient Safety and Infection Control

三重県立総合医療センター 中央検査部 主査 臨床検査技師 **海住 博之**

Hiroyuki Kaiju (Chief Medical Technologist)  
Mie General Medical Center Department of Central Laboratory



## キーワード

ESBL、AmpC型βラクタマーゼ、カルバペネマーゼ

## 01 | はじめに

βラクタマーゼは、βラクタム系抗菌薬を加水分解する酵素である。本酵素を産生することにより多剤耐性化する腸内細菌科細菌やブドウ糖非発酵菌群などのグラム陰性桿菌が問題視されている。βラクタマーゼには様々な種類があり、基質拡張型βラクタマーゼ(ESBL)、AmpC型βラクタマーゼ(AmpC)、メタロβラクタマーゼ(MBL)がよく知られている。また、日本では少数ながらも、*Klebsiella pneumoniae* caebapenemase (KPC)、ニューデリー型メタロβラクタマーゼ(NDM-1)、OXA型βラクタマーゼの産生株が報告されている。

ESBL、AmpC、MBLをコードする遺伝情報の多くはプラスミド上に存在するため、菌株・菌種を超えて伝達される特性がある。ESBLの場合、米国臨床検査標準委員会(Clinical and Laboratory Standards Institute:CLSI)M100-S25に定められた基準を用いて薬剤感受性を判定する場合、スクリーニング試験および確認試験を実施する必要がないとされている。しかし、院内感染対策の観点からはESBLを検出する意義が高いため、産生が疑われる菌株に対してはスクリーニング試験および確認試験を積極的に実施する必要がある。ESBLとMBLには、CLSIや国立感染症研究所等から提唱された検査法があるが、AmpCの検出については学会発表や論文<sup>1)</sup>による報告に留まり、現状では明確な判定基準が定められていない。また、複数種類のβラクタマーゼを同時に産生している菌株もあるため、微生物検査を担当する検査技師が各βラクタマーゼの特徴お

よびその検出法等について理解しておく必要がある。

本稿では、代表的なβラクタマーゼであるESBL、AmpC、カルバペネマーゼについて概説する。

## 02 | ESBL産生菌について

### i) 概要

ESBLはAmblerの分類でクラスA βラクタマーゼに属する。クラスA βラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)は本来ペニシリン系抗菌薬を分解する加水分解酵素であるが、クラスA βラクタマーゼをコードする遺伝子の突然変異により、通常分解できない第Ⅲ世代セファロスポリン系抗菌薬なども分解できるようになった酵素をESBLという。

CLSIでは*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*K. oxytoca*、*Proteus mirabilis*の4菌種について判定基準が定められている。しかし、実際にはこれらの菌種以外にも多くの菌種(腸内細菌科細菌科)でESBLの産生が確認されている。

わが国で分離されるESBL産生株の90%以上がCTX-M系である。CTX-M系はセフォタキシム(CTX)、セフトリアキソン(CTRX)、セフェピム(CFPM)には高度耐性を示すが、セフトジジム(CAZ)やアズトレオナム(AZT)には見かけ上感性和判定される場合がある。一方、TEM系やSHV系の遺伝子型のESBLの多くは、CAZやAZTに高度耐性を示し、CTX、CTRX、CFPM等に見かけ上感性和判定される場合が多い(表1)。

ESBLはその酵素活性がクラブラン酸(CVA)やスルバクタム

表1.ESBLの薬剤感受性パターン

βラクタマーゼ	Amblerの分類	遺伝子の所在	菌種	抗菌薬の耐性化												
				ABPC	AMPC/CVA	ABPC/SBT	PIPC	CEZ	CMZ	FMOX	CTX	CAZ	CFPM	AZT	MEPM	IPM
ペニシリナーゼ	A	プラスミド	すべての腸内細菌科細菌	R	S	S	R	v	S	S	S	S	S	S	S	S
ESBL(TEM・SHV型)			R	S	S	R	R	S	S	v	R	v	R	S	S	
ESBL(CTX型)			R	S	S	R	R	S	S	R	v	R	v	S	S	

S: 通常はSを示す R: 通常はRを示す v: 産生量依存性にS・I・Rと様々な表現系を示す

(SBT)、タゾバクタム (TAZ) により阻害される (表2)<sup>2)3)4)</sup>。臨床検査室での本酵素の検出には、この性質を利用する試験が多い。

ii) スクリーニング

① CLSIによる基準

CLSI (M100-S25) に定められているESBL産生株のスクリーニング基準を表3に示す。前述のとおり、本基準の適用は *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* の染色体上にAmpCをコードする遺伝子を保有しない4菌種のみ限定されている。しかし、AmpCをコードする遺伝子を保有する腸内細菌科細菌科の菌種であっても、同時にESBLを産生する場合もあるため、上記4菌種以外に対するスクリーニングも必要である。

② その他の方法

抗菌薬を含有したスクリーニング培地が各社から市販されている。酵素基質培地を用いている製品 (図1) もあり、その有用性が報告されている。

iii) 確認試験

① 微量液体希釈法

CLSI (M100-S25) に定められている微量液体希釈法によるESBLの検出基準を表3に示す。本法は自動機器にも広く搭載されており、検出感度・特異度に優れ、信頼性の高い検査法である。用手法試薬としては、E-testの阻害試験用ストリップ (シスメックス・ビオメリュー) が挙げられる。

② ディスク法による阻害試験

CLSI (M100-S25) に定められたディスク法によるESBLの検出基準を表3に示す。本法はディスク拡散法による薬剤感受性試験用のディスクを使用するため、自動機器や耐性菌パネル未導入の施設でも実施しやすい。CVAの添加により阻止円径が5mm以上拡大した場合にESBL産生株と判定する。実際のディスク配置例<sup>5)</sup>と判定例を図2に示す。また、ディスクが予めセットされている試薬としてはAmpC/ESBL鑑別ディスク (関東化学) が挙げられる。

③ その他の方法

阻害試験等のための培養を要しない検査法として、シカベータ (関東化学) が挙げられる。結果パターンによる判定を表4に示す。

03 | AmpC産生菌について

i) 概要

AmpCは、クラスC βラクタマーゼ、セファロスポリナーゼともよばれ、セファロスポリン系抗菌薬を加水分解する酵素である。腸内細菌科細菌科のうち、*Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter freundii* などの菌種や、ブドウ糖非発酵の

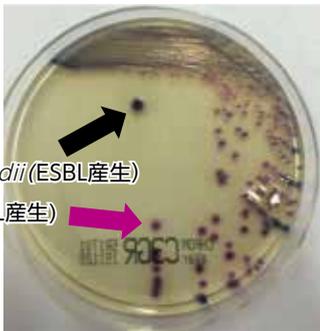


図1. 抗菌薬を含有する酵素基質培地の例 (C3GR培地 関東化学)

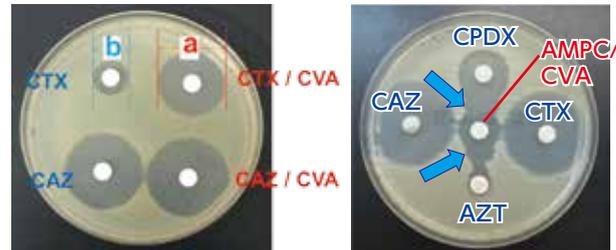


図2. ディスク法によるESBL確認試験  
阻止円径 a - b ≥ 5mm であり、CVAによる阻害試験陽性であるため、ESBL産生株と判定。  
クラバン酸の阻害により阻止円の拡張を認めるため、ESBL産生株と判定。

表2. 各種βラクタマーゼの阻害剤への反応パターン

βラクタマーゼ名	SBT	CVA	MCIPC	BA	SMA	EDTA
ESBL	+	+	-	-	-	-
AmpC	-	-	+	+	-	-
ESBLとAmpCの複合産生	+(a)	+(a)	+(b)	+(b)	-	-
MBL	-	-	-	-	+	+
KPC	-	-	-	+	-	-
OXA	-	±	-	-	-	-
MBLとESBLの複合産生	+(c)	+(c)	-	-	+(d)	+(d)

(a) AmpCの阻害剤 (BAやMIPIC) の存在条件下のみで阻害試験が陽性化することがある  
(b) ESBLの阻害剤 (CVA) の存在条件下のみで阻害試験が陽性化することがある  
(c) MBLの阻害剤 (SMAやEDTA) の存在条件下のみで阻害試験が陽性化することがある  
(d) ESBLの阻害剤 (CVA) の存在条件下のみで阻害試験が陽性化することがある

表4. シカベータによるβラクタマーゼ産生能の確認

	シカベータI	シカベータCVA	シカベータC	シカベータMBL
ESBL	-	+	-	-
AmpC	-	-	+	-
MBL	-	-	-	+

- ; 赤変  
+ ; 黄色もしくはシカベータ I の赤変に比べ弱い

表3. CLSI M100-S25によるESBLの判定基準

スクリーニング基準	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>		<i>P. mirabilis</i>
	ディスク拡散法	阻止円径が以下のいずれかを満たす場合 ・セフポドキシム (CPDX) ≤ 17mm ・セフトラジジム (CAZ) ≤ 22mm ・アズトレオナム (AZT) ≤ 27mm ・セフトラキシン (CTX) ≤ 27mm ・セフトリアキソン (CTRX) ≤ 25mm	阻止円径が以下のいずれかを満たす場合 ・セフポドキシム (CPDX) ≤ 22mm ・セフトラジジム (CAZ) ≤ 22mm ・セフトラキシン (CTX) ≤ 27mm
微量液体希釈法	MIC値 (μg/mL) が以下のいずれかを満たす場合 ・セフポドキシム (CPDX) ≥ 8μg/mL ・セフトラジジム (CAZ) ≥ 2μg/mL ・アズトレオナム (AZT) ≥ 2μg/mL ・セフトラジジム (CAZ) ≥ 2μg/mL ・セフトリアキソン (CTRX) ≥ 2μg/mL	MIC値 (μg/mL) が以下のいずれかを満たす場合 ・セフポドキシム (CPDX) ≥ 2μg/mL ・セフトラジジム (CAZ) ≥ 2μg/mL ・セフトラジジム (CAZ) ≥ 2μg/mL	

確認試験	ディスク拡散法
	以下の抗菌薬の単剤と阻害剤 (CVA) 存在下での阻止円径を比較する。いずれかの薬剤で阻害剤存在下での阻止円径が単剤に比べて5mm以上拡大した場合に確認試験陽性と判定する ・CAZ, CAZ/CVA ・CTX, CTX/CVA
微量液体希釈法	以下の抗菌薬の単剤と阻害剤 (CVA) 混合条件下でのMIC値を比較する。いずれかの薬剤で阻害剤混合条件下でのMIC値が単剤に比べて3管 (8倍) 以上低下した場合に確認試験陽性と判定する ・CAZ, CAZ/CVA ・CTX, CTX/CVA

グラム陰性桿菌はAmpCをコードする遺伝子を染色体上に元来保有している(染色体性AmpC)。通常の状態では、AmpCをコードする遺伝子の転写活性が抑制されているため、その産生量は少ない。しかし、抗菌薬に曝露される等の刺激によりこの酵素の調節遺伝子(*ampR*、*ampD*)に変異が起これると本酵素を過剰に産生するようになり、より広範囲のセフェム系抗菌薬やモノバクタム系抗菌薬を分解できるようになる。またこれとは別に、遺伝子変異により基質が拡張したAmpC型βラクタマーゼが知られている。

AmpC産生菌は、第I・II世代セファロスポリン系抗菌薬やセファマイシン系抗菌薬であるセフメタゾール(CMZ)、およびオキサセフェム系抗菌薬であるフロモキシセフ(FMOX)やラタモキシセフ(LMOX)に対し耐性を示す(表5)。

ESBLなどのクラスA型βラクタマーゼに比べAmpCはβラクタマーゼ阻害剤のうちSBT、TAZ、CVAの影響を受けにくく、ポロン酸(BA)、クロキサシリン(MCIPC)によって酵素活性が阻害される(表2)。臨床検査室での本酵素の検出には、この性質を利用する試験が多い。

ii) スクリーニング

前述のとおり、AmpC産生菌は、第I・II世代セファロスポリン系抗菌薬やCMZ、FMOX、LMOXに対し耐性を示すことが知られているものの、CLSIや感染症法等に明確なスクリーニング基準は定められていない。三重県臨床検査技師会では、暫定的に表6に示すスクリーニング基準を定め<sup>9)</sup>、県内施設における検査法の標準化・検出感度の統一を図っている。

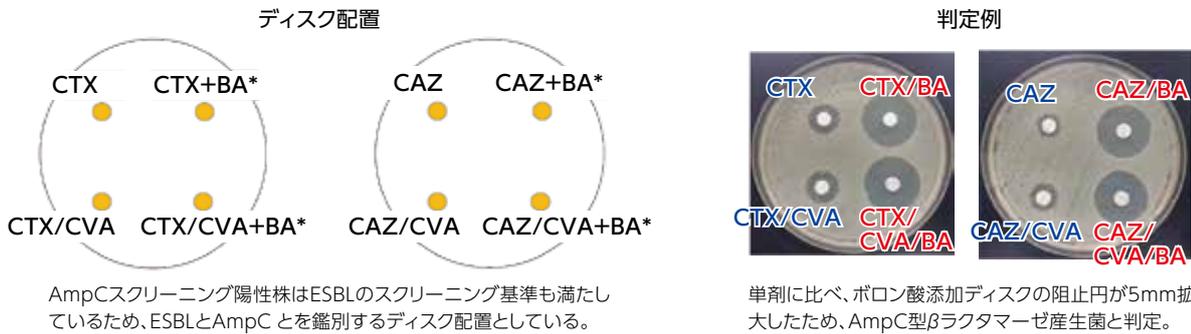


図3.ディスク法によるAmpC確認試験

表5.AmpCの薬剤感受性パターン

βラクタマーゼ	Amblerの分類	遺伝子の所在	菌種	抗菌薬の耐性化												
				ABPC	AMP C /CVA	ABPC /SBT	PIPC	CEZ	CMZ	FMOX	CTX	CAZ	CFPM	AZT	MEPM	IPM
誘導型AmpC	C	染色体	<i>Providencia spp.</i>	R	R	r	v	R	r	r	v	v	s	R	S	S
<i>M. morganii</i>																
<i>C. freundii</i>																
構成型AmpC		プラスミド	<i>E. coli</i>	R	R	v	S	R	v	v	v	v	S	R	S	S
プラスミド性AmpC			すべての腸内細菌科細菌	R	R	R	v	R	R	R	R	R	S	R	S	S

- S: 通常はSを示す
- R: 通常はRを示す
- r: ほとんどの場合がRであるが、産生量依存性にIやRとなる場合がある
- s: ほとんどの場合がSであるが、産生量依存性にIやRとなる場合がある
- v: 産生量依存性にS・I・Rと様々な表現系を示す

表6.腸内細菌科細菌のAmpCおよびカルバペネマーゼ産生スクリーニング基準(暫定)

AmpC	ディスク拡散法	阻止円径が以下のいずれかを満たす場合	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>・セフポドキシム(CPDX) ≤17mm</li> <li>・セフタジジム(CAZ) ≤22mm</li> <li>・アズトレオナム(AZT) ≤27mm</li> <li>・セフォタキシム(CTX) ≤27mm</li> <li>・セフトリアキソン(CTRX) ≤25mm</li> </ul>	+
AmpC	微量液体希釈法	MIC値(μg/mL)が以下のいずれかを満たす場合	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>・セフポドキシム(CPDX) ≥8μg/mL</li> <li>・セフタジジム(CAZ) ≥2μg/mL</li> <li>・アズトレオナム(AZT) ≥2μg/mL</li> <li>・セフタジジム(CAZ) ≥2μg/mL</li> <li>・セフトリアキソン(CTRX) ≥2μg/mL</li> </ul>	+
MBL	ディスク拡散法	阻止円径が以下のいずれかを満たす場合	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>・セフポドキシム(CPDX) ≤17mm</li> <li>・セフタジジム(CAZ) ≤22mm</li> <li>・アズトレオナム(AZT) ≤27mm</li> <li>・セフォタキシム(CTX) ≤27mm</li> <li>・セフトリアキソン(CTRX) ≤25mm</li> </ul>	+
MBL	微量液体希釈法	MIC値(μg/mL)が以下のいずれかを満たす場合	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>・セフポドキシム(CPDX) ≥8μg/mL</li> <li>・セフタジジム(CAZ) ≥2μg/mL</li> <li>・アズトレオナム(AZT) ≥2μg/mL</li> <li>・セフタジジム(CAZ) ≥2μg/mL</li> <li>・セフトリアキソン(CTRX) ≥2μg/mL</li> </ul>	+

また、各社から販売されている抗菌薬を含有したスクリーニング培地の有用性も報告されている。

### iii) 確認試験

#### ① ディスク法によるDDST・阻害試験

スクリーニング基準と同様に明確に定められた判定基準がないため、三重県臨床検査技師会では暫定的な判定基準を作成している<sup>5)</sup>。MCIPCを用いたダブルディスクシナジーテスト(DDST)、BAを用いた阻害試験を実施し<sup>6)7)</sup>、阻害剤の影響により阻止円径が5mm以上拡大した場合にAmpC産生株と判定する。BAはAmpCだけでなくKPC型カルバペネマーゼの阻害剤でもあるため、結果の解釈には注意が必要である。実際のディスク配置例と判定例を図3に示す。また、ディスクが予めセットされている試薬としてはAmpC/ESBL鑑別ディスクが挙げられる。

② 阻害試験等のための培養を要しない検査法として、シカペータが挙げられる。判定例を表4に示す。

## 04 | カルバペネマーゼ産生菌について

### i) 概要

カルバペネマーゼは、セファロスポリン系抗菌薬やカルバペネム系抗菌薬を含むすべてのβラクタム系抗菌薬を加水分解する酵素である。そのため本酵素を産生する細菌を起炎菌とする感染症は治療に難渋することが多い。本酵素をコードする遺

伝子は、プラスミド上にあることが多く、菌株や菌種を超えて伝達される。また、本酵素を産生する菌株はβラクタム系以外の抗菌薬への耐性遺伝子を併せ持つことも多く、多剤耐性を示すことがある。そのため、医療関連感染対策の面からも特に注意が必要である。

#### ① クラスB カルバペネマーゼ

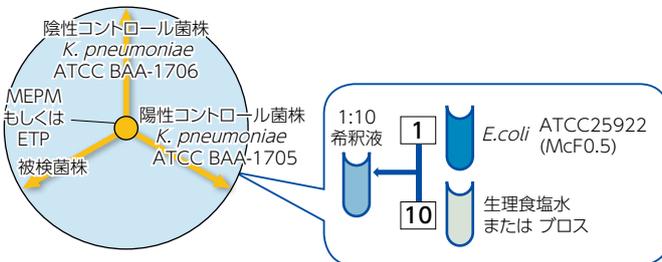
クラスB カルバペネマーゼは活性中心に亜鉛が存在するため、メタロβラクタマーゼ(MBL)とも呼ばれ、染色体性とプラスミド性のMBLがある。*Stenotrophomonas maltophilia*は染色体性にMBLを産生しカルバペネムに元来耐性を示すことが知られている。わが国で分離頻度が高いMBLの遺伝子型はプラスミド性のIMP型であり、近年、ステルス型と称されるIMP-6型のMBLを産生する腸内細菌科細菌が増加傾向にある。

#### ② クラスA カルバペネマーゼ

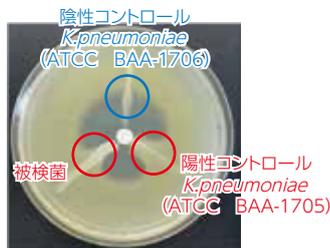
クラスAに属する、KPC型カルバペネマーゼは、1996年に米国の医療機関で*K. pneumoniae*から初めて確認された。その後、米国および欧州を中心に、世界的に蔓延している。

#### ③ クラスD カルバペネマーゼ

OXA型βラクタマーゼはクラスDに属し、現在100を超えるTypeが報告されている。オキサシリナーゼとも呼ばれ、主にオキサシリン、メチシリンを加水分解する酵素である。元来カルバペネム系抗菌薬を分解する性質は保有していなかったが、近年*Acinetobacter baumannii*や*K. pneumoniae*からOXA型のカルバペネマーゼ検出例が報告されている。OXA型カルバペネマーゼは、クラブラン



- 1) *E. coli* ATCC25922のMcF0.5菌液を調製
- 2) 調製した菌液1に対し、生理食塩水又はブロス10を加え、11倍の希釈液を作る・・・A
- 3) Aの菌液をミュラーヒントン培地へ塗布する
- 4) MEPMもしくはエルタペネム(ETP)ディスクを培地の中心に置く。
- 5) 白金耳又は綿棒で被検菌株、陽性コントロール菌株、陰性コントロール菌株をディスクの端から外側へまっすぐ塗布する。



MEPMに対する大腸菌阻止円と被検菌が交差する箇所が矢じり状となっている。MHT陽性であり、カルバペネマーゼ産生と判定。

図4.MHTの実施方法および判定例

表7.MBL産生腸内細菌科細菌のMIC値

菌株番号	菌名	ABPC	PIPC	CEZ	CCL	CTM	CTX	CAZ	CFDN	CPR	CZOP	CMZ	IPM/CS	MEPM
1	<i>K. pneumoniae</i>	>16.0	16.0	>16.0	>16.0	>16.0	>32.0	>16.0	>2.0	≤8.0	>16.0	>32.0	2.0	>8.0
2	<i>E. coli</i>	>16.0	>64.0	>16.0	>16.0	>16.0	>32.0	16.0	>2.0	>16.0	>16.0	>32.0	≤0.5	8.0
3	<i>Enterobacter sp.</i>	>16.0	>64.0	>16.0	>16.0	>16.0	>32.0	>16.0	>2.0	>16.0	>16.0	>32.0	>8.0	>8.0
4	<i>E. cloacae</i>	>16.0	>64.0	>16.0	>16.0	>16.0	>32.0	>16.0	>2.0	>16.0	>16.0	>32.0	>8.0	>8.0
5	<i>E. coli</i>	>16.0	>64.0	>16.0	>16.0	>16.0	>32.0	>16.0	>2.0	>16.0	>16.0	>32.0	>8.0	>8.0
6	<i>E. coli</i>	>16.0	>64.0	>16.0	>16.0	>16.0	>32.0	>16.0	>2.0	≤8.0	>16.0	>32.0	≤0.5	≤0.5
7	<i>E. coli</i>	>16.0	>64.0	>16.0	>16.0	>16.0	>32.0	16.0	>2.0	>16.0	≤2.0	16.0	≤0.5	≤0.5
8	<i>E. coli</i>	>16.0	>64.0	>16.0	>16.0	>16.0	≤8.0	8.0	>2.0	>16.0	>16.0	>32.0	2.0	1.0

三重大学病院(2013.1~12)

感染症法上のCRE届出基準

- 1) MEPMのMIC値が2μg/mL以上である場合
- 2) IPMのMIC値が2μg/mL以上かつCMZのMIC値が64μg/mLである場合

酸やEDTAによる阻害試験の検出感度が低く、modified Hodge test (MHT)の有用性も確立されていないため、現在のところは遺伝子検査に頼らざるを得ない。

## ii) スクリーニング

感染症法上、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の判定基準はあるものの、現時点では腸内細菌科細菌のカルバペネマーゼ産生に関する明確な基準が示されていない。カルバペネマーゼ産生株は必ずしもIPM やMEPMに試験管内で耐性を示すとは限らず、MBL産生株に対するMIC値がIPM・MEPM共に $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ を示す株の報告例<sup>9)</sup>もある(表7)。そのためカルバペネム系抗菌薬のみでスクリーニングを行うと、本酵素の産生を見逃す可能性がある。

ブドウ糖非発酵菌では、第3世代セファロスポリン系抗菌薬であるCAZやS/CにもしくはRを示した場合に、カルバペネマーゼ産生の可能性があるため、確認試験を実施する必要がある。

## iii) 確認試験

### ① ホッジ試験変法(modified Hodge test:MHT)

腸内細菌科細菌のカルバペネマーゼ産生能を判別する試験であるホッジ試験変法の実施方法と判定例を図4に示す。本検査法の感度は90%以上とされ、KPCや大部分のMBLは検出できるものの、OXA型やその他の一部のカルバペネマーゼは検出できないため、結果の解釈には注意が必要である。

### ② ディスク法によるDDST・阻害試験

MBLに対してはメルカプト酢酸ナトリウム(SMA)を用いたDDSTおよび、(エチレンジアミン4酢酸)EDTAを用いた阻害試験が用いられる。腸内細菌科細菌に対してDDSTを実施する場合、SMAと抗菌薬ディスク間の距離を規定の20mmよりも近づけたほうが判定しやすい場合がある(図5)<sup>5)</sup>。また、EDTAはMBLに直接作用するのではなく、培地に含まれる亜鉛をキレートして除去することにより、酵素反応に亜鉛を必要とするMBLの活性を間接的に低下させており、厳密な意味では、阻害剤ではない。さらに、EDTAは、亜鉛だけでなく、細菌の生育に不可欠な、他の二価の金属イオンも同様に吸着除去する能力を持つため、EDTAの存在下では、細菌の生育が非特異的に阻害される現象が見られることがある(例えば、*Acinetobacter*属や*E. coli*などでは、発育阻止帯が出現する株がある)ため、結果の判定にあつ

ては注意が必要である<sup>9)</sup>。

KPCに対してはBAを用いた阻害試験が実施される。BAはAmpCの阻害剤でもあるため、本試験単独ではなく、他の試験(MHT等)と組み合わせて結果を判定することが必要である。

- ③ 阻害試験等のための培養を要しない検査法として、CarbaNP試験(自家調製試薬)やシカベータが挙げられる。CarbaNP試験は複数種の $\beta$ ラクタマーゼを産生する菌株に対しても実施可能であり、市販試薬の発売が待たれる。

## 05 | おわりに

厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(JANIS)の報告<sup>10)</sup>によると、近年、わが国でもグラム陰性の多剤耐性菌の検出数が増加し、治療や感染対策に難渋する場面も多く見られるようになった。細菌の耐性獲得と新規抗菌薬および検査法の開発は「いたちごっこ」であり、検査に要する知識も次々と更新されている。我々微生物検査を担当する検査技師は、耐性菌に関する確かな知識と正しい検査技術を会得し、感染制御の基となる正確な検査結果を提供していく必要がある。

### 参考文献

1. D. L. Maraskolhe, V. S. Deotale, D. K. Mendiratta, P. Narang, *J. Clin. Diagn. Res.* **8**(6), DC05-DC08 (2014).
2. 小栗豊子編, 臨床微生物検査ハンドブック第4版(三輪書店, 東京, 2011).
3. 日本臨床微生物学会, 多剤耐性菌検査の手引き, <http://www.jscm.org/tazaitaisei/54.html> (参照2015-10-5).
4. 中村文子, 近藤成美, 臨床検査ひとくちメモNo.205, モダンメディア **56**(10), 250-256 (2010).
5. 三重県臨床検査精度管理協議会標準化委員会, 三重県臨床検査技師会微生物講習会検査研究班編, 腸内細菌科の $\beta$ ラクタマーゼ検査法(三重県臨床検査技師会, 三重, 2014).
6. T. Yagi, J. Wachino, H. Kurokawa, S. Suzuki, K. Yamane, Y. Doi, N. Shibata, H. Kato, K. Shibayama, Y. Arakawa, *J. Clin. Microbiol.* **43**(6), 2551-2558 (2005).
7. "Clinical Impact and Laboratory Detection of Newer  $\beta$ -Lactamases," ASM2012 Workshop-01 (ASM, San Francisco, 2012-06-16/19).
8. 若林真衣, 安田和成, 戸松絵梨, 中澤恵子, 中村明子, 田辺正樹, 日本臨床微生物学雑誌 **25**(Suppl.1), P330 (2015).
9. 薬剤耐性菌研究会, 耐性菌Q&A, <http://yakutai.dept.med.gunma-u.ac.jp/society/QandA.html> (参照2015-10-5)
10. 筒井敦子, 鈴木里和, 山根一和, 山岸拓也, 荒川宜親, *IASR*, **32**(1), 3-4 (2011).

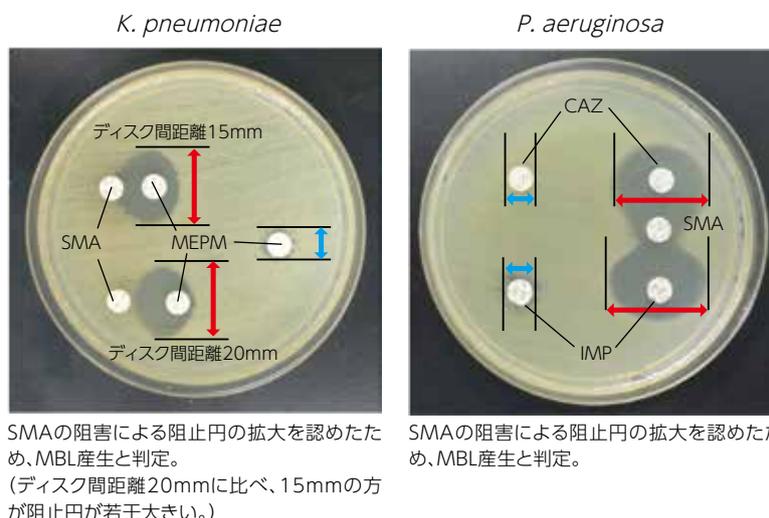


図5.SMAによるDDSTを用いたMBLの確認試験

# 感染症検査の最前線

## —迅速な薬剤感受性検査の最新動向を含めて—

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

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



#### キーワード

薬剤感受性検査, 遺伝子検査, 質量分析法

## 01 | はじめに

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

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

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

## 02 | 全自動遺伝子検査システム

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

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

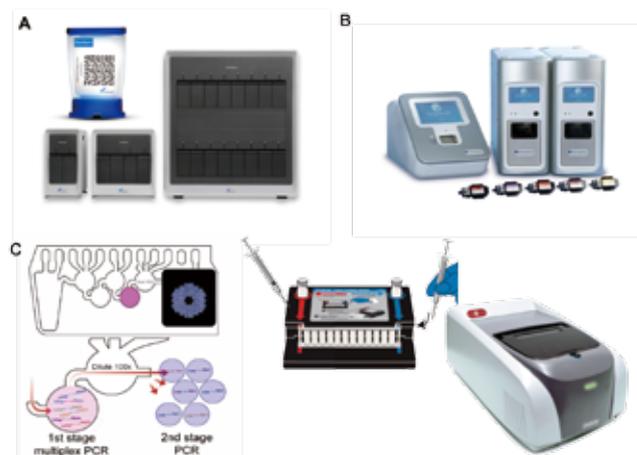


図1.次世代型の遺伝子検査システム

### GenXpert™システム (米国Cepheid社)

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

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

標識に金ナノ微粒子を用いてシグナル増幅した後、各プロ

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

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

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

### FilmArray®システム(米国Bio Fire社)

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

## 03 | POCT型の全自動遺伝子検査

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



図2 POCT型の遺伝子検査システム

A: GeneXpert Omni (Cepheid社)

B: Cobas Liat (Roche社)

C: Alere I (Alere社)

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

## 04 | 質量分析法による微生物の同定と費用対効果

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

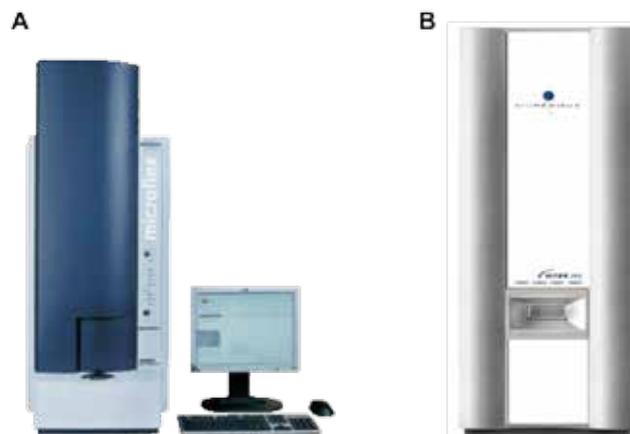


図3 MALDI-TOF MSを用いた微生物同定システム

A: MALDI Biotyper(ブルカー・ダルトニクス社)

B: VITEK MS(シスメックス・ビオメリュー社)

## MALDI-TOF MSによる微生物同定の基本原理

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

## MALDI-TOF MSシステムによる微生物同定の実際

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

## MALDI-TOF MSシステムの適用

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

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

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

次にはおそらく臨床検体から直接に菌種の同定ができないかとの期待が大きく膨らむであろう。しかし、現在のシステムでは10<sup>6</sup>個くらいの菌量を必要とするため、敗血症の診断に血液から直接に菌種の同定は行うことは困難である。一方、感染時の菌量が多い尿や髄液では検体直接の同定が可能との報告<sup>3)</sup>がある。

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

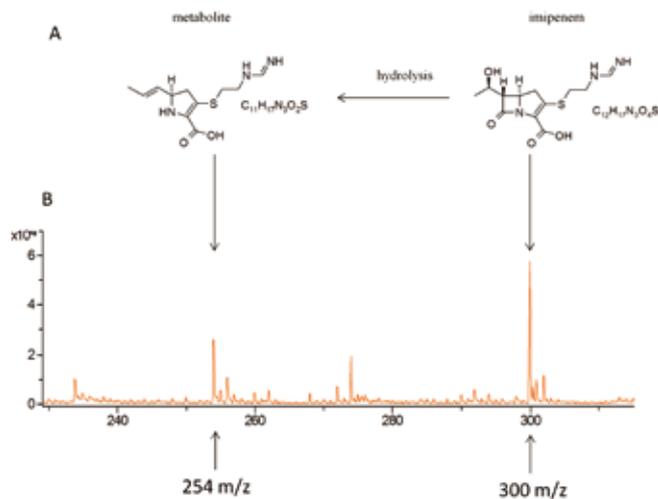


図4 imipenemの分解によるマススペクトルの変化<sup>6)</sup>

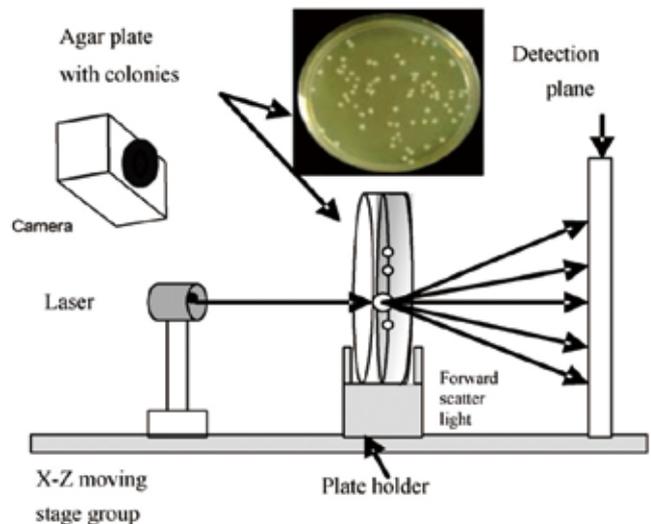


図6 BARDOTの原理<sup>10)</sup>

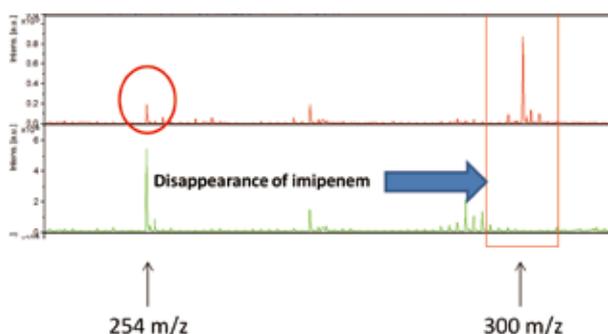


図5 imipenem感受性もしくは耐性の*A. baumannii*のマススペクトル<sup>6)</sup>  
(上段は感受性株、下段は耐性株)

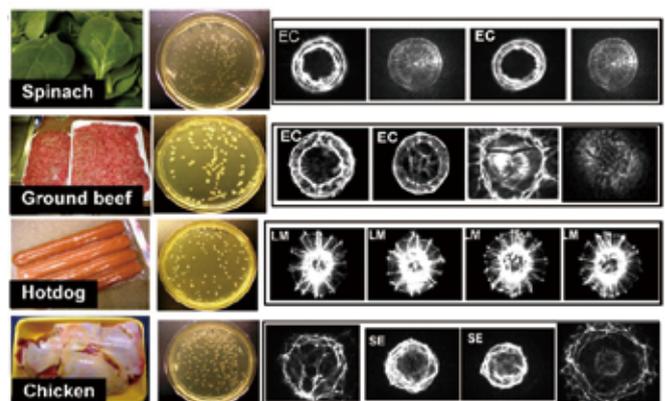


図7 光散乱法による各種食材の培養集落から直接の菌種同定<sup>10)</sup>

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

費用対効果「マルディノミクス」

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

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

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

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

05 | 光散乱法による 集落から直接の菌種/血清型の同定

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

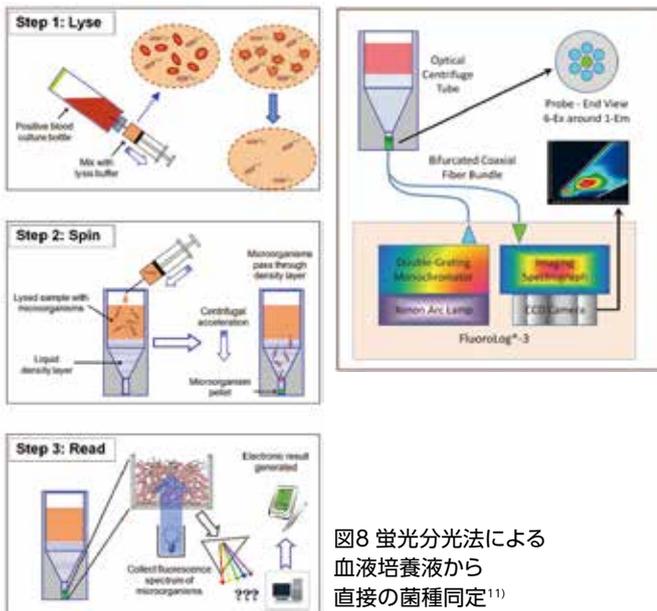


図8 蛍光分光法による血液培養液から直接の菌種同定<sup>11)</sup>

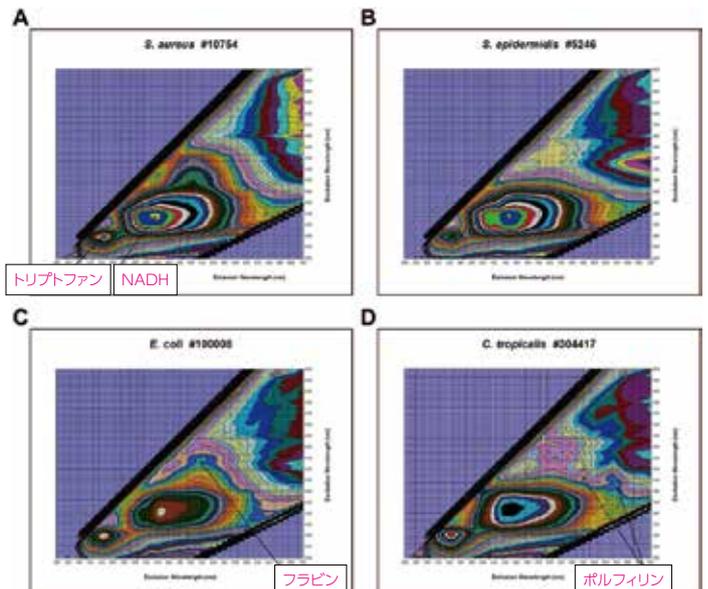


図9 Excitation-Emission Matrices (EEMs) 励起・蛍光マトリックス<sup>11)</sup>

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

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

表3 迅速な薬剤感受性検査の最新技術

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

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

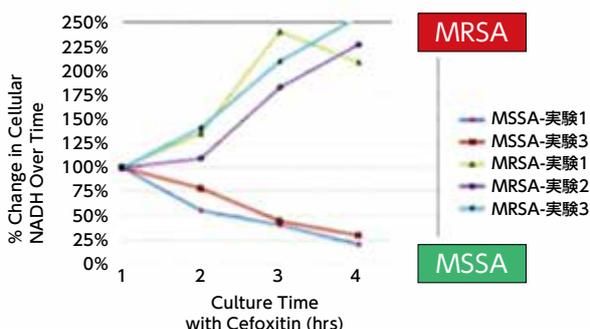


図10 蛍光分光法による薬剤感受性試験

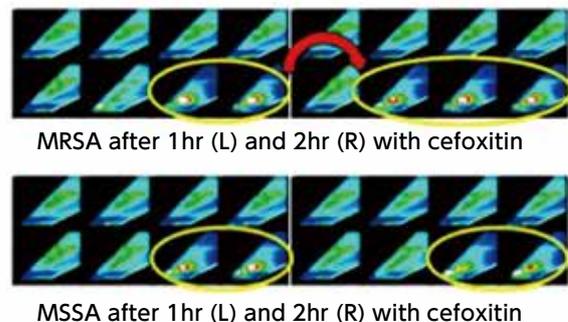
Dr. Humphries, Rapid Phenotypic Susceptibility Testing of Bacteria  
Antimicrobial Susceptibility Testing Update: Clinical and Laboratory Impact, 2015 ICAAC

## 07 | 迅速な薬剤感受性検査の最新動向

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

## 08 | 分子疫学的な解析法の新潮流

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



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

シーケンス解析で注目すべきは、生物発光を応用したパイロシーケンス法<sup>14)</sup>の実用化である。この方法はPCR反応産物を加工することなく、そのままシーケンスできるので、大幅な省力化と自動化が特徴である。既にこの原理は第二世代シーケンサーにも応用されており、半日で数百メガ塩基を解読できる状況となっている。アウトブレイク時に次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析(Whole-genome sequencing)による型別を実施した事例が、結核菌<sup>15)</sup>、MRSA<sup>16)</sup>、ノロウイルス<sup>17)</sup>などの病原体で報告されている。

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

## 09 | おわりに

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

## 文献

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

# 医療関連感染と薬剤耐性菌 —臨床微生物検査室に求められる感染制御活動—

Healthcare-associated infection and drug resistant bacteria:  
Activity of infection control expected in the clinical microbiology laboratories

亀田メディカルセンター 臨床検査管理部 部長 **大塚 喜人**  
Yoshihito Otsuka, PhD. (Director)  
Department of Laboratory Medicine, Kameda Medicalcenter



## キーワード

ICT、薬剤耐性菌、微生物検査

## 01 | はじめに

医療の高度化・多様化にともない、医療施設内には様々な職種のスタッフが勤務し、その専門性は年々高まってきている。一方で、従来の縦割り組織では各々の専門性を活用することができないばかりか、非効率性が認められている。1990年代よりわが国でも一般的にチーム医療が行われるようになった。近年では、病院内で横断的に活動する医療チームとしてNST(Nutrition Support Team:栄養サポートチーム)、褥瘡ケアチーム、緩和ケアチーム、救命救急チーム、そしてICT(Infection Control Team:感染制御チーム)がある。

筆者がICTという言葉を目にしたのは、前職である社会保険中央総合病院(現:東京山手メディカルセンター)に在職中の1990年代中頃であった。当時、微生物検査担当技師として中堅技師になろうとしていた頃で、感染症の検査技術、知識を高めるためには医師、看護師、薬剤師、放射線技師など多くの方達とのコミュニケーションをとることが必要であった。検査技術・知識を高め、感染症の検査診断、診療の補助的役割を果たすなかで微生物検査担当技師の感染制御活動への参画が必要と考えはじめICTを発足した。本稿では、当時からの様々な職種の方達との連携、亀田メディカルセンターの概要とICTの立ち上げ、新たなICTのあり方、微生物検査室の役割などについて概説したい。

## 02 | 各職種との連携

感染制御はチームによって成り立っていることは周知の事実である。臨床検査技師が他職種とどのような連携をとっていけば、チームの組織力を向上させることができるのか、各々の連携について考えてみたい。

### 一般臨床医との連携

医療関連感染に対するアプローチの方法には、予防、監視、対策といった考え方がある。臨床検査技師(Infection Control

Microbiological Technologist; ICMTが望ましい)が最も関わるのは監視の部分が重要で、医療関連感染を一般臨床医と連携を取りながらいち早く察知し、感染の拡大を未然に防ぐことが求められる。

わが国の医療施設では、まだまだ感染症専門医が不足しているのが現状である。したがって、病院内発症の感染症にしても、市中発症にしても、一般臨床医がその治療にあたることになる。その感染症の起炎病原体が感染拡大の可能性がある場合には、如何に素早く診断・治療を成功させるかということは医学的にも重要であるが、感染管理上も重要であるといえる。感染症の診断・治療を行う際に、臨床検査技師は医師の臨床診断の限界、医師は臨床検査の限界を認識し、お互いに過剰評価をしてはならない。どちらか一方の判断を鵜呑みにすると誤った選択をしかねない。常に得られた臨床検査結果が臨床診断と矛盾がないかどうか、下された臨床診断と臨床検査技師が出す結果に矛盾がないかどうか検証しながら進め、必要に応じて追加検査を実施することが重要である。

### ICTに所属するICDとの連携

ここでのICDは病院内で感染症を発症した患者の担当医ではないことを前提に紹介する。一般病院でのICDは感染症科として感染症を中心に診療している訳ではなく、様々な診療科に所属し、兼務しているのが現状である。多忙な日常診療のなかで、医療関連感染のアウトブレイクを疑う症例を察知した場合、ICDが診療を中断してまで調査の中心になることは考えにくい。そのような状況下では、臨床微生物学の専門家であるICMTが対応するのが望ましく、臨床微生物学、感染症学、感染管理学などの病院感染管理の基礎を学んだ臨床検査技師が、初動捜査を行うことはとても有効と考えている。

例えば、多剤耐性菌やインフルエンザウィルス、ノロウィルスなどの感染拡大を防止する目的で、入院患者から注意すべき病原体が検出・推定された際には、当該病棟に直ぐに訪問して、同室患者もしくは隣室患者などの免疫状態、ワクチン接種歴、感染徴候の確認などの調査をリアルタイムに行うことが重要である。インフルエンザウィルスであれば、年齢、性別、基礎疾患、免疫状態、体温、ワクチン接種歴などを即座に調査して、発症者は

コホート管理として4人部屋などに収容するよう病棟師長やリクナースへ依頼することが有効と考えている。

### ICTに所属する薬剤師との連携

医療関連感染対策の発端は、MRSAの出現とその院内感染による死亡例が報告されたことから始まった。その後も、多剤耐性菌は姿形を変えて出現しつづけている。これらの耐性菌感染症に対する治療はもちろんであるが、そのほかの細菌感染症の治療、耐性菌出現防止策としての抗菌薬適正使用は必須である。

まず取り掛らなければならないことは、「とりあえず広域抗菌剤治療」による治療開始ではなく、「とりあえず適切な抗菌剤選択のための検査検体採取」を実施し、微生物検査担当技師によるグラム染色をはじめとした各種染色法によって起炎病原体の推定を行うことである。そして、推定病原体に対して効果の期待できる抗菌剤を最大限に効果が発揮できるよう投与設計を薬剤師とともに行うことで治療効果を上げることである。

### ICTに所属するICNとの連携

ICMTをはじめとした、ICTの臨床検査技師がもっとも多く連携をとるのは看護師である。医師、薬剤師との連携では医療関連感染症の発端となる感染症の監視という視点からの連携を紹介したが、看護師との連携では監視はもちろんであるが、予防、対策、全ての視点での連携が必要となる。

具体的には耐性菌サーベイランス、感染症動向サーベイランス、手術部位感染サーベイランス、カテーテル関連血流感染サーベイランスなど各種サーベイランスでの連携である。ICTラウンドでは感染患者の背景をはじめとした詳細な情報は看護師が把握していることから、対策の視点では看護師が中心と

なって進めることが多いため、臨床検査技師はむしろサポートすることが多いと考える。

病院内でのこれら感染対策を充実させればさせるほど業務量が増加する。連携してゆこうでお互いの業務量を認識し、仕事を押し付け合うのではなく、カバーし合うことが重要である。

## 03 | 新たなICTのあり方

新たなICTのあり方として、筆者が勤務する亀田メディカルセンターでの事例を紹介したい。

### 亀田メディカルセンターの概要

亀田メディカルセンターは、東京都のお隣千葉県房総半島の南に位置する鴨川市に、医療法人鉄蕉会の亀田総合病院(図1)を中心とした、亀田クリニック、亀田リハビリテーション病院の3つの医療サービス施設の総称である。千葉県南部の基幹病院としての役割を担う当センターは半径約30~50Kmにおよぶ医療圏(図2)をもち、診療科目34科(亀田クリニックは31科)、1日の平均外来患者数3,000名超、千葉県内のみならず国内の様々な地域、また海外からも患者が来院される。亀田メディカルセンターは、一般の外来患者から急性期の高度医療までを担い、また急性期の治療を終えた回復期リハビリも受けられるよう施設が整っている。

亀田総合病院は基幹災害医療センター指定、感染防止対策加算1の届出など様々な施設基準を満たしていると共に、充実した集中治療部門(ICU、CCU、ECU、HCU、NICU)によって急性期高度医療の提供に力を注いでいる。



図1. 亀田メディカルセンターの外観



図2. 亀田メディカルセンターの医療圏

当センターでは、診療部門を含めた医療サービス全般にわたるISO9001認証、また本邦で初めてJoint Commission International (JCI)\*認証を受けて、医療における安全と質の向上に全てのスタッフが全力で取り組んでいる。

※JCI(Joint Commission International)

患者安全と医療の質の改善を目指す米国「JCAHO (Joint Commission on Accreditation of Health Organization)」の考え方を、世界中の医療施設に広めることを目的に1994年に創設された認定機関であり、医療施設の評価・認定を実施している。

### 亀田メディカルセンターICTの発足と新たなICTのあり方

さて、2007年1月に筆者が着任した当初、亀田メディカルセンターでは診療部としての総合診療・感染症科と、感染管理室が設置されており、各々が診療と感染管理を実施していた。意思決定機関としては、院内感染管理委員会が設置されていたが、ICTは存在していなかった。その理由として、感染症科と感染管理室が機能していれば、多剤耐性菌コントロール、抗菌薬適正使用やアウトブレイクコントロールも可能であるという考えであった。

しかし、筆者としては、一部の組織内で監視・状況把握など感染の管理を実施することは可能であるが、感染の制御は一部の組織だけで実施できるものではないと考えていた。そこで、

2009年にICTを発足させ、当初は一般的なICTとして感染症科医師(ICD:infection control doctor)、臨床検査技師(ICMT; infection control microbiological technologist)、看護師(ICN; infection control nurse)、薬剤師(BCICPS:board certified infection control pharmacy specialist)、そして施設管理課などで、週1回の環境ラウンドを中心として活動を開始した。その後、改善を繰り返し、現在はメンバー構成が大きく変わり、他施設と比してユニークな構成となっている。

すなわち、ICTメンバーは3つの組織から構成されている。いわゆる従来のICTは「シニアメンバー」として固定され、「リンクナースメンバー」として病棟看護師を中心として看護部内に限定したメンバー、もう一つは1年サイクルで更新される「活動メンバー」がいる。これら全体をICTとして一つのチームに位置付けている(図3)。

シニアメンバーは従来のICTメンバーである医師、臨床検査技師、看護師、薬剤師で構成され、そのメンバーは亀田メディカルセンター内の地域感染症疫学・予防センター(旧感染管理室)の専従または専任として配属されている。そのなかで、地域への感染症情報の発信、院内への「ニュースレター@ICT」(図4)の発行を行ない、週1回の耐性菌ラウンドなども実施している。一方、活動メンバーは院内の各部署より選出された臨床検査技師、放射線技師、歯科衛生士、薬剤師、視能訓練士、臨床工学技士、理学療法士、事務員などから構成されている。この活動メンバーは、活動の主眼を教育においており、感染管理の眼を養っ

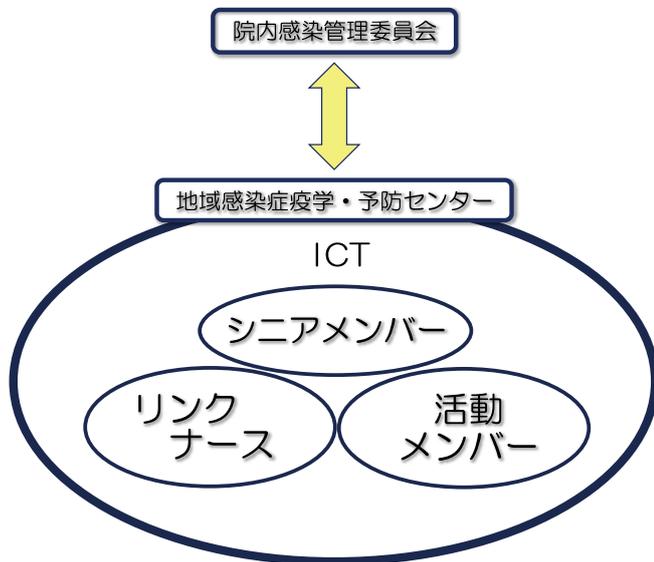


図3.組織の概要

## ニュースレター@ICT 11月号

発行：2015年11月14日 地域感染症疫学・予防センター

### インフルエンザの流行前に備えよう！

院内でインフルエンザの流行を起さない為、病棟におけるインフルエンザ対策について確認しましょう。

#### 【インフルエンザの患者が入院した時の感染対策】

1. 感染予防策：標準予防策＋飛沫予防策＋接触予防策
2. 表示：接触予防策1、飛沫予防策
3. 病室：原則、個室で管理する
4. 個人防護具：手袋・ガウン・サージカルマスク
5. 患者の指導：咳エチケット、手指衛生
6. 感染予防策を実施する期間：症状が出現してから5日あるいは解熱後2日間
7. 感染予防策終了時に行うこと：ベッド周囲の清掃、カーテンの交換
8. 報告：インフルエンザの患者及びインフルエンザ疑いの患者が入院したら、地域感染症疫学・予防センター（内線：3395）へ連絡する。

#### 【確認！普段から実践する感染対策】

正しい感染対策の実践は、感染症から自分自身を守ります

- ・口腔・気管内を吸引する時の個人防護具
- ①シールド付きマスク
- ②手袋
- ③エプロンの装着
- ④脱着後、個人防護具を脱いだ後は、手指衛生の実施



図4.ニュースレター@ICT

て育てていくための制度としている。活動メンバーの主な活動(図5)は、研修の実施で感染管理の基礎知識である手指衛生や標準予防策などの研修から始まり、さらにステップアップした内容へ進めていく。様々な研修を実施(図6)するなかで、自部署の問題点を自ら見つけ出し、課題を検討し、解決する能力を養うことに重点を置いたものになっている。そのほか、耐性菌ラウンドとして、耐性菌が検出された患者のレポートを作成し、感染経路別予防策がベッドサイドで実施できる状況にあるか確認を行う。また、環境整備ラウンドは月1回行ない、活動メンバーは研修で学んだことが実際の現場で実践されているかを確認する。一定のスキル、知識を身につけた活動メンバーは、一般スタッフの教育を行うために資料の作成や勉強会を開催している。

活動メンバーはこのような経験を通じて、感染対策実施者としての自信と実力を身につけ、現場に戻っていく。この制度を継続していくことで、数年をかけて院内すべての部署に感染管理の眼が光ることになり、それを目指して活動している。

## 04 | 感染症・遺伝子検査室 (微生物検査室)の役割

ICT活動への参加はもちろんであるが、日々感染症診療と対策にも関わっている。例えば入院患者から耐性菌が検出された場合、担当医師だけではなく入院病棟の担当看護師もしくはそのリーダー、地域感染症疫学・予防センターへの連絡を行っている。また、電子カルテ上の病床配置図に必要な経路別感染対策法を入力し、病棟に出入りする看護師をはじめとした理学療法士、放射線技師、臨床検査技師、薬剤師など他職種との情報共有が行えるようにしている。

耐性菌検出患者の情報は、週ごとにリストを作成しICT活動としての耐性菌ラウンドに使用している。また、図7のように3ヶ月ごとに抗菌薬感受性率表(アンチバイオグラム)を作成、更新し、電子カルテ上から閲覧可能にして日常診療に役立つようにしている。

検査室で監視対象としている微生物は、多剤耐性菌としてはMRSA、多剤耐性緑膿菌(multiple-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*:MDRP)、多剤耐性アシネトバク

目的	多職種で連携し、病院内の感染症の予防と早期発見・対策を行う
目標	自部署の課題を設定し、解決することが出来るようになる
活動の主眼	現場の感染対策の知識や実務に関する質向上のためのスタッフ教育
メンバー	シニアメンバー:医師、薬剤師、検査技師、看護師(ICN) 活動メンバー:病院経験3年程度の若手スタッフ 画像センター(放射線技師)、眼科(眼科技師)、歯科センター(歯科衛生士)、リハビリ室(作業療法士)
活動内容	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.定期的な勉強会:月2回程度(15~30分) <ul style="list-style-type: none"> <li>・活動に必要な知識を身につける</li> <li>・活動メンバーによるミニレクチャー作成と実施</li> </ul> </li> <li>2.耐性菌ラウンド:毎週 <ul style="list-style-type: none"> <li>・耐性菌検出レポートを作成し、ベッドサイドを確認する</li> <li>・作成レポートとチェックリストを病棟にフィードバックする</li> </ul> </li> <li>3.環境整備のラウンド:月1回、対象部署を決めて実施 <ul style="list-style-type: none"> <li>・ラウンド後にレポートを作成し、フィードバックする</li> </ul> </li> <li>4.自部署の課題の検討 <ul style="list-style-type: none"> <li>・課題を見つけ解決策を立案する</li> <li>・対策を施行し評価する</li> </ul> </li> </ol>

図5.リスクアセスメントに基づくICT活動



図6.研修実施例として血液培養採取指導

# 05 | おわりに

ター (multiple-drug-resistant *Acinetobacter*:MDRA) であり、図8はMDRPとイミペネム耐性緑膿菌の検出状況をトレンドで示したグラフである。同じようにMRSAも毎月提示している。そのほか耐性菌としてカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (Carbapenem-resistant enterobacteriaceae:CRE)、基質特異性拡張型βラクタマーゼ (Extended Spectrum beta(β) Lactamase:ESBL)、AmpC過剰産生株をサーベイランス対象にて集計している。またCDトキシソ陽性患者情報も集計し要事対策を組んでいる。

感染症・遺伝子検査室内では、定期としては年に2回感染管理の勉強会 (臨床検査部全体) を実施し、何かエピソードが発生した場合は、その都度情報共有と勉強会を開催している。亀田メディカルセンターでは臨床検査技師が病棟に採血に行く機会が多いため、その内容は手指衛生のタイミングや感染予防策の方法などを中心に行い、臨床検査技師が医療関連感染を拡大させないように取り組んでいる。

医療関連感染対策は私たち医療従事者にとって永遠に続くであろう課題である。当初はMRSAだけであったのが、MDRP、MDRA、ESBLと次々に耐性菌が出現してくる。ICTメンバーをはじめ医療従事者は、これに対する感染対策上の「立案」→「実行」→「評価」→「改善」を繰り返して行かなければならない。

ICMTをはじめとした微生物検査技師は、耐性菌検出時や病院内外でのアウトブレイク発生時に、最初に察知できる職種である。病院内・地域でいち早く情報共有ができ、対策がとれるように進めるべきであろう。また、感染管理の重要性を臨床検査部の各スタッフに認識してもらうために、検査室内でも定期的な勉強会を実施していくことも重要なことと考えている。

グラム陰性桿菌 ( )内は菌株数	ABPC	PIPC	CEZ	CTM	CTRX	CAZ	CFPM	CMZ	MEP M	AZT	SBT/ ABPC	TAZ/ PIPC	GM	TOB	AMK	MINO	LVFX	CPFX	ST
<i>E.coli</i> (631)	56	68	81	87	87	88	88	100	100	88	68	86	93		100			77	79
<i>Cit.freundii</i> (43)		81			89	79	100		100	81		84	100		98			100	95
<i>K.pneumoniae</i> (265)		82	93	94	93	94	97	97	100	94	84	93	97		100			96	88
<i>K.oxytoca</i> (166)		58	48	94	86	94	94	100	100	94	78	93	100		100			100	98
<i>Ent.aerogenes</i> (80)		48			75	60	78		100	68		59	100		100			78	79
<i>Ent.cloacae</i> (59)		68			67	71	95		100	71		68	100		100			97	92
<i>Serr.marcescens</i> (37)		89			91	92	100	92	100	92		92	100		100			97	97
<i>Prot.mirabilis</i> (36)	83	97	94	94	97	97	97	100	100	97	94	97	94		100			92	86
<i>Prot.vulgaris</i> (13)		100			100	100	100	100	100	100		100	100		100			100	92
<i>Morg.morganii</i> (19)		79			100	100	100	100	100	100		100	100		100			100	95
<i>Acin.baumannii</i> (9)		89			88	100	100		100		100		100		100			100	100
<i>Ps.aeruginosa</i> (251)		93				90	92		93	79		94	100	99	100			96	
<i>Sten.maltophilia</i> (33)																100	88		97

図7.アンチバイオグラム

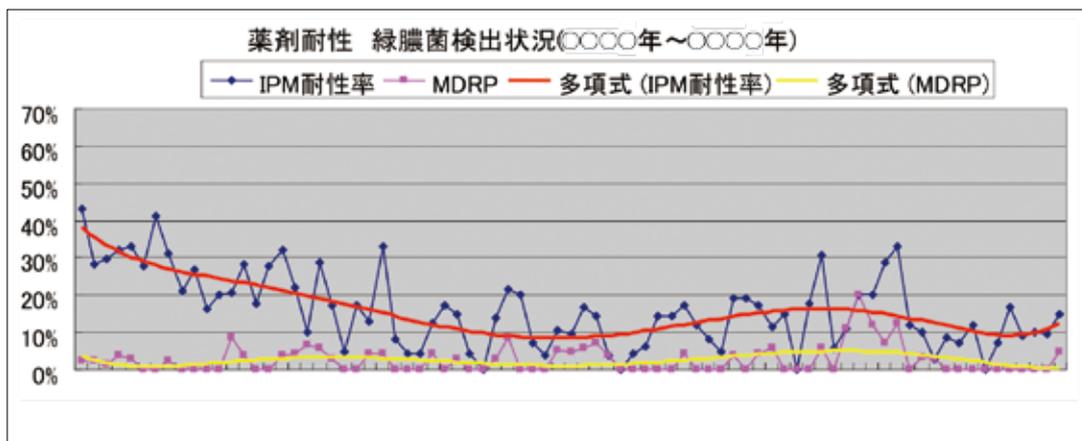


図8.薬剤耐性緑膿菌検出状況

# 未知微生物をお手軽に分離培養するテクニック

Techniques for isolating yet-to-be cultured microbes without vigorous efforts

山梨大学 生命環境学部 環境科学科 助教 **田中 靖浩**

Yasuhiro Tanaka (Assistant Professor)

Department of Environmental Sciences, Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Yamanashi,

産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 主任研究員 **玉木 秀幸**

Hideyuki Tamaki (Senior Scientist)

Bioproduction Research Institution, The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology



## キーワード

未知微生物、難培養性微生物、分離培養法

### 1 はじめに

地球上にはどれくらいの種類の微生物(本稿では微生物の中でも特に細菌に焦点をあてて話を進めることをあらかじめご了承ください)が生息しているかご存じだろうか?その答えとして誰も正確な数字を挙げることはできないだろう。しかし、現在の主流となっている小サブユニットリボソームRNA遺伝子(16S rRNA遺伝子)に基づく分子生物学的手法による解析では、土壌1gあたりに100万種オーダーで存在するとの報告もあることから<sup>1)</sup>、地球全体だと少なく見積もっても1000万種はいるであろうと筆者らは考えている。では、我々人類はこれまでにどれくらいの種類の微生物を培養できたのだろうか。

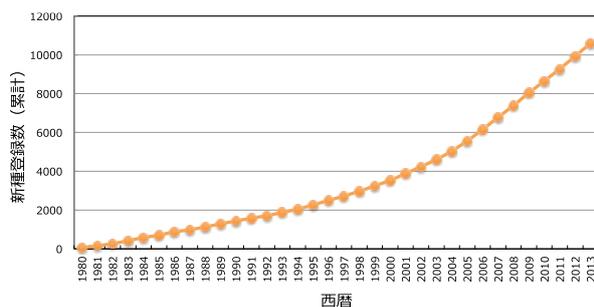


図1. 新種細菌の登録数

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN, <http://www.bacterio.cict.fr/>)のデータを用いて作成

図1には1980年から2013年までの新種細菌の登録数の変遷を示しているが、きれいな右肩上がりのチャートで順調に増え続けており、2013年の段階では合計で約10000種が正式に学名登録されている。仮に上記の“地球上に生息する微生物が1000万種”を基準に考えるとわずか0.1%程度にすぎないのである。これはすなわち、地球上にはまだ数多くの未知微生物が分離培養されずにとり残されていることを示している。

このような未知微生物の中には有益な機能を有するものも多く含まれると推察されることから、“未開の生物資源”として大いに期待されている。しかし、その多くは一般的な方法では分離培養が困難な難培養性微生物であることが知られている<sup>2,3)</sup>。そのため、これまでに数多くの研究者がこの難培養性微生物を分離培養すべくさまざまな手法の開発に挑んできた<sup>4-15)</sup>。本稿ではその中でも特殊な器具や高価な機器を使わず、どこの研究室でもすぐに試すことのできる“お手軽な手法”に絞って以下に紹介する。

### 2 古典的微生物培養法にちょっとした工夫を加える

ここでいう古典的微生物培養法とは、平板培地に環境試料(の希釈物)を接種し、これを適当な温度で培養する方法のことを指すが、この方法にちょっとした工夫を加えることで、さまざまな未知微生物の分離培養が可能となっている。

#### 2.1 栄養濃度の薄い培地を用いる

この方法は微生物の分離培養に用いる平板培地中の有機物濃度を低く設定するというものである。教科書にも載っている方法なので、あえてここで書く必要はないかもしれないが、いまだに学会などで、環境試料からの微生物分離培地としてLB培地や標準寒天培地を用いたケースが多く見られることから、意外とまだ知らない研究者もいるかもしれないと思い紹介する次第である。このように書くとLB培地や標準寒天培地が微生物の培地としてダメな印象を与えてしまうが、そうではない。これらの培地は大腸菌や*Pseudomonas*属細菌といった一般的によく知られた易培養性の従属栄養細菌の培養には優れてはいるのだが、環境試料から未知の微生物を分離する、という目的には適さないという意味である。その理

由の一つとしては、これらの培地には、自然環境中ではおおよそありえない高濃度の有機物が含まれているため、多くの微生物が生育する上で強いストレスとなる(具体的には高濃度の有機物代謝によって生成する活性酸素による細胞損傷と考えられている)ことが挙げられる<sup>16)</sup>。

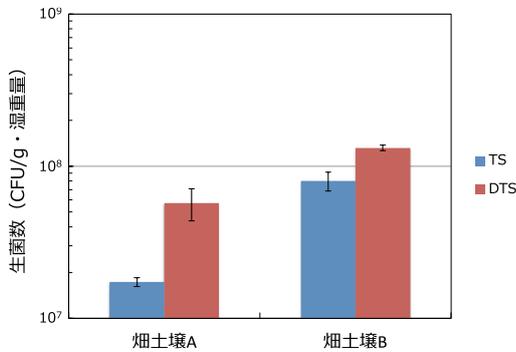


図2. 栄養濃度が異なる2種の平板培地における生菌数の比較

図2は筆者らが土壌中に生息する2種の微生物をターゲットとし、トリプチケースソイ(TS)培地とTS培地を100倍希釈した培地(DTS培地)をベースとした寒天平板培地によって培養した結果であるが、いずれの土壌においてもDTS培地の方でTS培地よりも高いCFU値が得られていることが分かる。このような事実をもとに、一般的によく用いられる完全培地を希釈することで、系統的に新規な微生物(未知微生物)の分離培養に成功した例がいくつか報告されている。例えば、Janssenらは市販のNutrient Brothを100倍希釈した培地を用いることで難培養性細菌群として知られるVerrucomicrobia門、Acidobacteria門に属する新規微生物の分離培養に成功している<sup>5)</sup>。

なお、薄い培地を用いた場合は濃い培地よりも全体的に微生物のコロニー形成速度は遅めとなる。特に難培養性微生物の多くは生育が遅いものがほとんどであることから培養時間については長めに設定するのが望ましいことを付け加えておく。ちなみに、筆者らの研究室では最低でも2~4週間の培養期間を設けるようにしている。

## 2.2 平板培地のゲル化剤を変える

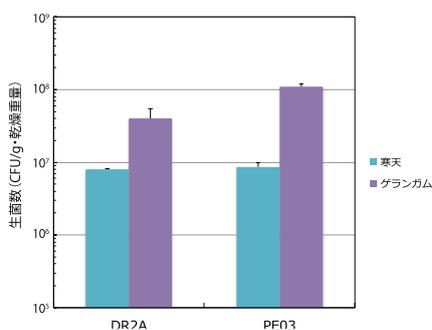


図3. 寒天およびグランガム平板培地における生菌数の比較 (Tamaki et al., 2005を一部改変)

ロベルト・コッホ以来、微生物の分離培養には平板培地の使用が不可欠となっているが、多くの微生物学者の頭の中

には「平板培地=寒天平板培地」という関係が構築されているといっても過言ではないと思う。しかし、ここ10年余で平板培地の作製にあたってゲル化剤として寒天以外のものを使うことで、これまで難培養とされた未知微生物を取得できる可能性を示す研究成果が得られている<sup>11, 12)</sup>。

図3には、霞ヶ浦の底泥試料を分離源とし、ゲル化剤として寒天とグランガムを用いて作製した平板培地(DR2AおよびPE03という組成が異なる2種の培地<sup>12)</sup>)を用いて培養した時に得られたCFU値を示しているが、DR2A培地、PE03培地のいずれにおいてもグランガム平板培地で寒天平板培地の約10倍の値が得られていることが分かる。また、PE03培地をベースとした二つの平板培地において出現したコロニーをランダムに30個選択し、16S rRNA遺伝子に基づく系統解析に供したところ、寒天平板培地では系統的に新規な微生物が占める割合が30%であったのに対し、グランガム平板培地ではその倍以上の63%を占めるとの結果が得られた(図4)。

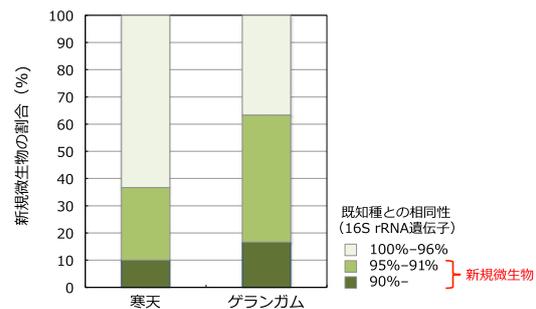


図4. 寒天およびグランガム平板培地における新規微生物の取得率 (Tamaki et al., 2005を一部改変)

さらに、その後の研究で別の底泥サンプルにおいても上記と同様にグランガム平板培地を用いることで、高頻度で系統的に新規な微生物が取得できることが示されるとともに(この場合は取得微生物の46%が系統的に新規であった)、当該新規微生物の44%がグランガム平板培地では生育するものの、寒天平板培地では生育しない菌株であることが明らかとなった<sup>11)</sup>。すなわち、これらの結果から平板培地のゲル化剤として寒天を用いることが難培養性微生物の分離培養の妨げとなっていた可能性が示されたわけである。

では、なぜ、寒天を用いると本来は分離培養できるはずの微生物を得ることができないのであろう?その答えとしては今のところ2つの理由が考えられている。1つめの理由は寒天中に微生物のコロニー形成阻害物質(生育阻害物質)が含まれていることである。これは原らによって明らかにされたことであるが<sup>17)</sup>、寒天中にほんのわずかに含まれる5-ヒドロキシメチルフラン-2-カルボン酸とフラン-2-カルボン酸が細菌のコロニー形成に参与するスウォーミング(運動性)を阻害するとのことで、特に生育の遅い細菌に関

してはこの影響を大きく受け、肉眼で確認できるコロニー形成に至らないケースがあるようである。未知微生物の多くは生育が遅いと考えられることから、おそらくはこれらの物質の影響を受けているのであろう。次に、2つめの理由であるが、寒天平板培地の調製方法に問題があるというものである。具体的には、通常、寒天平板培地を作製する時は液体培地に寒天を加え、オートクレーブ滅菌にかけるが、実はこれが諸悪の根源となる場合があるのである。一般的に微生物の分離培養に用いる多くの培地には緩衝能を持たせるためにリン酸塩を加えるが、このリン酸の存在下で寒天をオートクレーブ処理すると培地中に過酸化水素が生成し(10mMのリン酸添加で約15 $\mu$ Mの過酸化水素が生成)、これによって微生物の生育が阻害されるというわけである<sup>13)</sup>。実際、リン酸塩と寒天を別々にオートクレーブして作製した平板培地を用いて土壌、底泥、河川水の3種の環境試料中の微生物を培養すると、いずれの試料においても通常の方法で作製した寒天平板培地よりも培養率が向上し、多くの新規微生物が分離培養できたとの結果が得られている<sup>13)</sup>。

### 2.3 共生微生物のチカラを借りる

環境中に分布する微生物の多くは他の生物と共生して生活している。微生物が共生関係を持つ相手としては動物、植物がすぐにイメージできるものの、微生物同士の間にも成り立っていることは意外と思いつかないだろう。しかし、ここ数十年間で微生物間の相互作用に関する研究が盛んに行われ、彼らが自身あるいは多種の微生物と様々な化学物質を介して情報のやりとりをしていることが明らかとなってきた。例えば、*Vibrio fischeri*(発光細菌)の発光や*Pseudomonas aeruginosa*(緑膿菌)のバイオフィルム形成に関わる遺伝子はシグナル物質であるN-アシル化ホモセリンラクトン類(N-Acyl homoserine lactones; AHLs)によって<sup>18, 19)</sup>、また*Streptococcus mutans*(ミュータンス菌)のバイオフィルム形成に関わる遺伝子は特殊なオリゴペプチドによって制御される<sup>20)</sup>等である。このようなシグナル物質の中には微生物の生育に関与するものも存在すると考えられており、これがすなわち微生物同士の共生と言えるのである。このような背景から、微生物分離用の平板培地に代表的なシグナル物質のAHLsを添加することで、環境水からの微生物の培養率が向上したケース<sup>21)</sup>や難培養性細菌群の一つである*Acidobacteria*門細菌の取得率がアップする等の報告がなされている<sup>10)</sup>。ただ、AHLsにしてもオリゴペプチドにしてもさまざまな種類があり、個々の細菌種によって感知される物質が異なる場合が多い。従って、特定のシグナル物質を培地に添加するだけでは取得される難培養性微生物の種類が限定される可能性がある。さらに、これらのシグナル物質の多くは市販されていないことから、“ちょっと試してみよう”といった

感じで気軽に研究を始めることはできない(一部のAHLsは市販されているが非常に高価である)。そこで、我々の研究グループでは様々なシグナル物質を含むものとして、培養可能な微生物の“培養スープ”を代替品として使っている。“培養スープ”とは、具体的には土壌や環境水、活性汚泥など、微生物分離源となる環境試料あるいはすでに培養された微生物を液体培地に接種して培養後、遠心分離することで得られる培養上清のことで、これを適量添加した培地(筆者らの研究室では10%に設定している)を微生物分離用培地とするのである。この手法を用いることで我々はこれまでに通常の平板培地では生育が極めて遅く、分離培養が困難な新属新種細菌のAST4株(*Catellibacterium nectarophilum*として新学名登録)の取得に成功している<sup>15)</sup>。

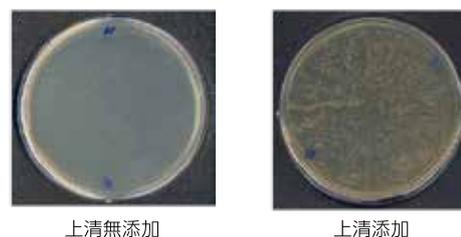


図5. 複合微生物培養上清添加および無添加培地におけるAST4株の生育

図5にはこの細菌の分離源である活性汚泥を接種し培養することで得られた“複合微生物”の培養液上清を添加した培地と、無添加の培地における当該菌株の生育を示しているが、上清の添加によってAST4株の生育が著しく促進されていることがお分かりいただけるであろう。後に、このAST4株の生育を促進する微生物の特定を行ったところ、同じ分離源(活性汚泥)中に生息していた*Sphingomonas*属細菌(GF9株)であることが分かったのであるが<sup>22)</sup>、このGF9株の培養上清を添加した培地を用いることで、さらに別の活性汚泥サンプルからも新たな難培養性の細菌で*Leucobacter*属の新種と考えられるASN212株の取得に成功している<sup>23)</sup>。このように、“培養スープ”を用いる方法はどの研究室でもすぐに試すことのできる方法であるが、我々のように運良くGF9株と同様に難培養性細菌の生育を促進する因子を生産する微生物を取得できたならば、これを利用することにより、様々なサンプルをターゲットとして芽づる式に難培養性の未知微生物を取得できるかもしれない。

## 3

### 微生物分離源として用いる試料の選択

未知微生物を取得する手段として、微生物の培養法を工夫するだけではなく、微生物の分離源をうまく選択する方

法もある。具体例をいくつか挙げると、深海、地熱地帯、南極といった普通ではない環境のサンプルをターゲットにするということである。なぜなら、このようなサンプルには特殊な微生物が存在していると考えられるからである。また、これらのサンプルは入手が容易ではないことから、研究材料(微生物分離源)として使っている研究者に限られるため、多くの新規微生物が手付かずで“未発掘”のまま残されている可能性が高いともいえるだろう。しかし、本稿の主旨が「どこの研究室でもすぐに試すことのできる方法を紹介する」であることを鑑みると、これらのサンプルを使えば良いと紹介するのは少々ピントはずれとなってしまう。そこで、筆者らが読者の皆さんにおすすしたいのは、上記のような特殊環境サンプルが新規微生物の分離に有効であるとされる2つめの理由、すなわち、「研究材料(微生物分離源)として使っている研究者に限られる」に該当し、入手が容易なサンプルを探すと戦略である。とはいえ、なかなかそういったサンプルを見つけ出すのは難しいかもしれないが、サンプル選定のコツとして、一見、あまりにも平凡すぎて面白みがなく、誰も研究対象にしていないような環境試料に目をつけると良いかもしれない。実際に、我々もこのような観点から、池や湖、河川などに生息している水生植物に着目し、運良く(?)系統的に新規な微生物の取得に成功している<sup>24, 25)</sup>。水生植物は古くから富栄養化した水環境の浄化等に関する研究に用いられており<sup>26, 27)</sup>、最近では根圏微生物との相互作用によって難分解性の有機化学物質を分解する能力も有することが明らかとなってきている<sup>28, 29)</sup>。従って、研究材料としてあまり使われておらず面白くないというわけではなかったのだが、意外にも水生植物の根や葉、莖にどのような微生物が生息しているかに関する知見はほとんど無い状態であった。そこで、我々はまず水生植物の根をターゲットとして、どのような微生物が分離されるかについて検討した。対象とした水生植物サンプルは浮遊性水生植物のウキクサ、抽水植物のヨシ、ミソハギであるが、以下にそれぞれの植物ごとどのような新規微生物が分離されたかについて述べることにする。

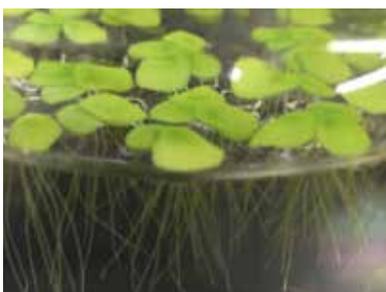


図6. 浮遊性水生植物のウキクサ

### 3-1. ウキクサからのVerrucomicrobia門細菌の分離<sup>24)</sup>

ウキクサ(図6)は池、沼、湖、河川等に広く分布する浮

遊性の水生植物であるが、初夏から夏にかけて水田一面に“緑の絨毯”のごとく繁茂している風景をご覧になった方もおられるであろう。では、このウキクサの根からはどのような微生物が分離されるのだろうか?DTS平板培地を用いて分離した80株は16S rRNA遺伝子のパターン解析(RFLP解析;Restriction Fragment Length Polymorphism解析)により20グループに分けられた。

表1. ウキクサ根由来微生物と既知菌種の16S rRNA遺伝子の比較 (Matsuzawa et al. 2010を改変)

RFLPグループ	菌株数	既知菌種	相同性 (%)	分類群 (門または綱)*
1	11	<i>Haloferula rosea</i>	84	Verrucomicrobia
2	3	<i>Sphingomonas wittichii</i>	99	Alphaproteobacteria
3	20	<i>Zoogloea oryzae</i>	99	Betaproteobacteria
4	3	<i>Zoogloea caeni</i>	99	Betaproteobacteria
5	1	<i>Methyloversatilis universalis</i>	99	Betaproteobacteria
6	1	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	98	Betaproteobacteria
7	12	<i>Methylobium aquaticum</i>	97	Betaproteobacteria
8	5	<i>Methylobium aquaticum</i>	97	Betaproteobacteria
9	1	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	87	Verrucomicrobia
10	1	<i>Devosia insulae</i>	97	Alphaproteobacteria
11	1	<i>Algoriphagus manitolivorans</i>	86	Bacteroidetes
12	1	<i>Runella zea</i>	97	Bacteroidetes
13	3	<i>Niastella koreensis</i>	95	Bacteroidetes
14	1	<i>Rhodoplanes elegans</i>	88	Alphaproteobacteria
15	5	<i>Mesorhizobium chacoense</i>	98	Alphaproteobacteria
16	5	<i>Opitutus terrae</i>	95	Verrucomicrobia
17	2	<i>Opitutus terrae</i>	93	Verrucomicrobia
18	2	<i>Asticacaulis excentricus</i>	99	Alphaproteobacteria
19	1	<i>Blastomonas ursincola</i>	100	Alphaproteobacteria
20	1	<i>Lacibacter cauensis</i>	99	Bacteroidetes

太字は既知菌種の16S rRNA遺伝子との相同性が95%以下のもの(新規微生物)

\*Proteobacteria門は網レベルで表記

表1には各グループの既知菌種との16S rRNA遺伝子の比較を示しているが、このうちの7グループ、すなわち分離株全体の31%を占める25菌株が系統的に新規な微生物であった(16S rRNA遺伝子の相同性が既知菌株由来のもの95%以下の菌株を新規微生物としている)。一方、我々が他の研究で4種の畑土壌をターゲットとして同様に微生物の分離を行ったケースでは、新規微生物の取得率が0~10%であったことを考慮すると、ウキクサ根からは非常に高頻度で新規微生物を得ることができたといえるであろう。さらに特筆すべきは、それらのうち4グループは難培養性の細菌群の一つであるVerrucomicrobia門に属していたことである。本稿においてVerrucomicrobia門細菌が難培養であることは何回か記述してきたが、その根拠の

一つとして、この細菌群は土壌等の様々な環境中で比較的高いポピュレーションで存在しているにもかかわらず、その分離頻度は1%程度との報告もあり<sup>8)</sup>、極めて分離頻度が低いことが挙げられる。ところが、上述のウキクサ根のケースにおいては、分離した80株のうちの実に24%(19株)が *Verrucomicrobia* 門に属していた。これは、一つの環境試料からの *Verrucomicrobia* 門細菌の取得率という点でチャンピオンデータであることは言うまでもなく、新規微生物分離源としてのウキクサ根のポテンシャルの高さを示すものであるといえよう。



図7. 抽水植物のミノハギとヨシ

### 3-2. ミノハギ、ヨシからの新規微生物の分離<sup>25)</sup>

上述のウキクサの結果を受けて、筆者たちは「水生植物の根はひょっとしたら新規微生物の宝庫なのかもしれない」と考え、今度は抽水性の水生植物で、川縁などの湿地を好んで生息しているミノハギとヨシ(図7)の根をターゲットとして微生物の分離を試みた。

それぞれの植物根から40株ずつを分離し、それらの系統解析を16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づいて行ったところ、ミノハギ由来の菌株の35%、ヨシ由来の菌株の28%が系統的に新規な微生物であり、これらの水生植物の根からもウキクサ根と同様に高頻度で新規微生物を取得可能であることが示された。また、さらに、ヨシ根から分離された菌株の中には極めて新規性の高い微生物が含まれていた。すなわち、それまでは遺伝子レベルでしか存在が明らかにされていなかった細菌群の一つである門レベルの未培養系統群Candidate division OP10に属する菌株(YO-36株)が取得されるという驚くべき結果を得たのである(図8)。

といっても、これがどれだけすごいことなのか、今一つ“ピン”とこない方もおられるかと思うので少し説明すると、生物の階層分類は上から「界」、「門」、「綱」、「目」、「科」、「属」、「種」の順となる。細菌の場合は「界」が存在しないため「門」が最上位となるのだが、Candidate division OP10はまさしくその「門」の階層に該当する分類群なのである。本稿の執筆段階で細菌には30門が存在するが、これが意味するところは、150年近くの長い微生物分離に関する研究の歴史の中で、門レベルで新しい細菌を分離することに成功した例は全世界で30しかないということであり、新門細菌の分離に遭遇することはとても珍しく、また非常にラッキーである、ということがお分かりいただけるだろうか。いずれにせよ、この新門細菌も含めてヨシ、ミノハギからもウキクサと同様に高頻度で系統的に新規な微生物が分離されたということは、水生植物が全般的に新規微生物分離源として大いに期待できることを示すものであ

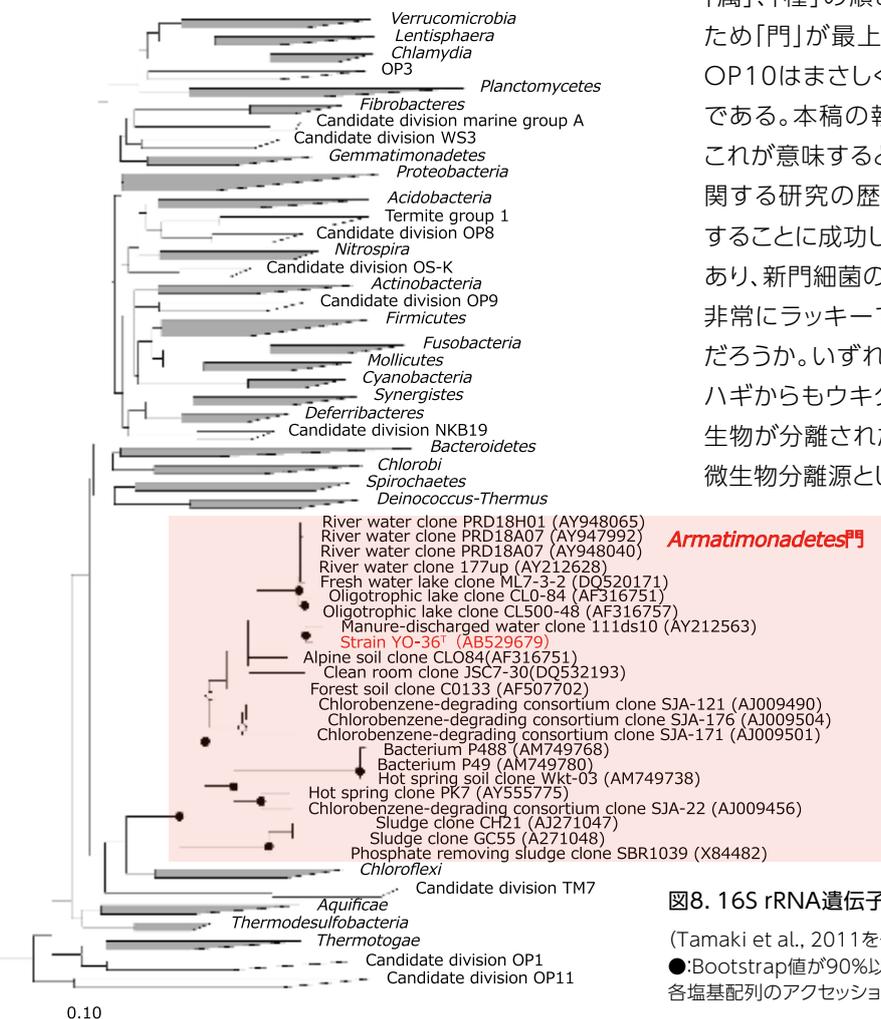


図8. 16S rRNA遺伝子に基づくYO-36株の分子進化系統樹

(Tamaki et al., 2011を一部改変)

●: Bootstrap値が90%以上, ○: Bootstrap値が80%以上  
各塩基配列のアクセッションナンバーは括弧内に記載

り、今後さらに多くの水生植物をターゲットとして網羅的な微生物分離を進めることで31番目、32番目といった次なる新門細菌の分離につながるのではないかと筆者たちは日々妄想しているところである(一生のうちに何度も新門細菌の分離をしようというのは少々烏滸がましいか...)。なお、我々が分離に成功したヨシ根由来の上記菌株は2011年に28番目の新門細菌*Armatimonadetes*(属種名は*Armatimonas rosea*)として国際委員会により正式に認定されている<sup>30)</sup>。

#### 4 おわりに

以上、本稿では“どこの研究室でもすぐに試すことのできる未知微生物の分離培養法”として微生物の分離培地と分離源にそれぞれ工夫加える方法を紹介してきた。もちろん、それぞれの方法を個別に用いるだけでもそれなりの効果が期待できるが、できれば複数の方法を組合せて試していただくと、より効率良く新規な微生物を取得できるかもしれない。実際、すでにお気づきの読者もおられるかと思うが、上述の水生植物からの微生物分離では当然のごとく“薄い培地”を使用している。これは分離培地とサンプルの選定の工夫の両方を組合せた結果であるが、例えば、“濃い培地”を用いた場合にヨシの根から新門細菌が分離できたか?と聞かれれば答えは“ノー”である。

最後に、本稿で紹介した方法を使うかどうかは別として、もし、何らかの研究の過程で新規微生物が取得されたならば、一つだけお願いしたいことがある。それは、取得した微生物の命名についてである。ごく稀にはあるが、いろいろと論文を見ていると、分離した微生物に勝手に属種名を付けて論文中に記載し、かつその名前でも16S rRNA遺伝子などの遺伝子情報をDDBJやEMBLといったデータベースに登録していることがある(場合によっては遺伝子情報だけのときもある)。もちろん、微生物の命名権は分離した研究者が持つものなので、名前をつけるのは構わない。しかし、その名前を正式名称として論文やデータベースに記載するには、必ず国際原核生物分類命名委員会による国際細菌命名規約に沿った上、International Journal of Evolutionary Microbiology誌等の学術誌にその細菌の性状を記載して提案・受理された後でないといふダメなのである。これを守っていただかないと、正式な名前ではない、いわゆる“芸名”みたいなものが本名として誤解され、他の論文にも記載されるという過ちの連鎖が生じるかもしれないのである。この点を念頭に置いて頂き、少し学名の記載や使用方法にも配慮頂きながら、研究をお進めいただければ幸いである。なお、細菌の命名方法については森らによる分かりやすい総説があるので<sup>31)</sup>、こちらを参照されたい。

#### 参考文献

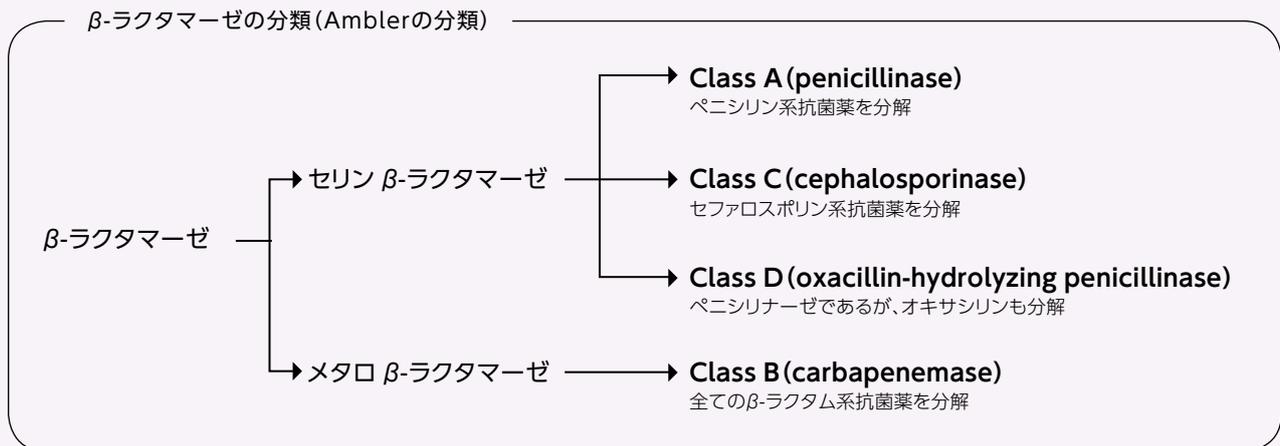
- 1) J. Gans, M. Wolinsky, J. Dunbar, *Science*, **309**(5739), 1387–1390 (2005).
- 2) R. I. Amann, W. Ludwig, K. H. Scheleifer, *Microbiol. Rev.* **59**(1), 143–169 (1995).
- 3) M. S. Rappé, S. J. Giovannoni, *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 369–394 (2003).
- 4) I. F. George, M. Hartmann, M. R. Liles, S. N. Agathos, *Appl. Environ. Microbiol.* **77**(22), 8184–8188 (2011).
- 5) P. H. Janssen, P. S. Yates, B. E. Grinton, P. M. Taylor, M. Sait, *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(5), 2391–2396 (2002).
- 6) T. Kaerberlein, K. Lewis, S. S. Epstein, *Science*, **296**(5570), 1127–1129 (2002).
- 7) A. Manome, H. Zhang, Y. Tani, T. Katsuragi, R. Kurane, T. Tsuchida, *FEMS Microbiol. Lett.* **197**(1), 29–33 (2001).
- 8) P. Sangwan, S. Kovac, K. E. Davis, M. Sait, P. H. Janssen, *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(12), 8402–8410 (2005).
- 9) G. Steinert, S. Whitfield, M. W. Taylor, C. Thoms, P. J. Schupp, *Mar. Biotechnol.* **16**(5), 594–603 (2014).
- 10) B. S. Stevenson, S. A. Eichorst, J. T. Wertz, T. M. Schmidt, J. A. Breznak, *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(8), 4748–4755 (2004).
- 11) H. Tamaki, S. Hanada, Y. Sekiguchi, Y. Tanaka, Y. Kamagata, *Environ. Microbiol.* **11**(7), 1827–1834 (2009).
- 12) H. Tamaki, Y. Sekiguchi, S. Hanada, K. Nakamura, N. Nomura, M. Matsumura, Y. Kamagata, *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(4), 2162–2169 (2005).
- 13) T. Tanaka, K. Kawasaki, S. Daimon, W. Kitagawa, K. Yamamoto, H. Tamaki, M. Tanaka, C. H. Nakatsu, Y. Kamagata, *Appl. Environ. Microbiol.* **80**(24), 7659–7666 (2014).
- 14) Y. Tanaka, Y. Benno, *Microbiol. Immunol.* **59**(2), 63–70 (2015).
- 15) Y. Tanaka, S. Hanada, A. Manome, T. Tsuchida, R. Kurane, K. Nakamura, Y. Kamagata, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**(3), 955–959 (2004).
- 16) S. F. Bloomfield, G. S. A. B. Stewart, C. E. R. Dodd, I. R. Booth, E. G. M. Power, *Microbiology*, **144**(1), 1–3 (1998).
- 17) S. Hara, R. Isoda, T. Tahvanainen, Y. Hashidoko, *PLoS One*, **7**(7), e41142 (2012).
- 18) A. L. Schaefer, B. L. Hanzelka, A. Eberhard, E. P. Greenberg, *J. Bacteriol.* **178**(10), 2897–2901 (1996).
- 19) R. S. Smith, B. H. Iglewski, *Curr. Opin. Microbiol.* **6**(1), 56–60 (2003).
- 20) K. Zhang, M. Ou, W. Wang, J. Ling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**(4), 933–938 (2009).
- 21) I. Bussmann, B. Philipp, B. Schink, *J. Microbiol. Methods*, **47**(1), 41–50 (2001).
- 22) Y. Tanaka, S. Hanada, H. Tamaki, K. Nakamura, Y. Kamagata, *Microbes Environ.* **20**(2), 110–116 (2005).
- 23) M. N. I. Bhuiyan, R. Takai, S. Mitsuhashi, K. Shigetomi, Y. Tanaka, Y. Kamagata, M. Ubukata, *J. Antibiot.*, in press (available at <http://www.nature.com/ja/journal/vaop/ncurrent/abs/ja201587a>).
- 24) H. Matsuzawa, Y. Tanaka, H. Tamaki, Y. Kamagata, K. Mori, *Microbes Environ.* **25**(4), 302–308 (2010).
- 25) Y. Tanaka, H. Tamaki, H. Matsuzawa, M. Nigaya, K. Mori, Y. Kamagata, *Microbes Environ.* **27**(2), 149–157 (2012).
- 26) R. M. Gersberg, B. V. Elkins, S. R. Lyon, C. R. Goldman, *Water Res.* **20**(3), 363–368 (1986).
- 27) K. R. Reddy, W. F. De Busk, *J. Environ. Qual.* **14**(4), 459–462 (1985).
- 28) R. A. Kristanti, T. Toyama, T. Hadibarata, Y. Tanaka, K. Mori, *RSC Adv.* **4**, 1616–1621 (2014).
- 29) T. Toyama, T. Ojima, Y. Tanaka, K. Mori, M. Morikawa, *Water Sci. Technol.* **68**(3), 522–529 (2013).
- 30) H. Tamaki, Y. Tanaka, H. Matsuzawa, M. Muramatsu, X. Y. Meng, S. Hanada, K. Mori, Y. Kamagata, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**(6), 1442–1447 (2011).
- 31) 森浩二, 中川恭好. 日本生物工学会誌, **89**(6), 336–339 (2011).



## キーワード解説

### β-ラクタマーゼ

ペニシリン実用化から60年余りで様々な耐性メカニズムによる薬剤耐性菌が出現し、社会的な問題となっている。β-ラクタマーゼは、ペニシリンなどβ-ラクタム系抗菌薬のβ-ラクタム環のペプチド結合を加水分解する酵素で、β-ラクタマーゼ産生菌(グラム陰性桿菌の薬剤耐性の主な原因)による薬剤耐性がクローズアップされている。酵素の種類からClass A~Dに分類されている(Amblerの分類)。また、プラスミドといわれる遺伝子上に耐性遺伝子が存在する場合は、様々な菌種に耐性遺伝子が伝播する可能性があり、医療機関における監視は重要課題である。



### AmpC型β-ラクタマーゼ

Amblerの分類ではClass Cに属し、産生量が増大するにしたがって第三世代セファロスポリン系抗菌薬まで分解する性質を持つ。β-ラクタマーゼの分類には、種々の阻害剤に対する感受性を利用する方法があり、AmpCはCVA(クラブラン酸)には阻害されず、ボロン酸やクロキサシリンなどの阻害剤によって酵素活性が阻害される特徴をもつ。

### ESBL (基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ)

Amblerの分類でClass Aに属し、構造遺伝子のアミノ酸変異により本来ペニシリンしか分解できなかった基質が第三世代セファロスポリンやモノバクタムにまで拡張したものの。CVAIによって酵素活性が阻害される特徴を持つ。

### Carbapenemase (カルバペネマーゼ)

ほぼ全てのβ-ラクタム系抗菌薬に高度耐性化を示し、CVA、SBT(スルバクタム)やTAZ(タズバクタム)といったβ-ラクタマーゼ阻害剤で阻害されない性質をもつ。日本では、Amblerの分類でClass Bに属すMetallo β-lactamase (MBLと略される)が流行しており、有効な抗菌薬がほとんどなくなることから治療に難渋することが問題視されている。

※無断転載および複製を禁じます。