

Table 2 Difference of characteristics of serotype 1 and high virus titer between chronic hepatitis C patients and living donor liver transplantation patients

Characteristics	ST1H-CHC (n = 42)	ST1H-LDLT (n = 15)	P-value
Age (years)	58.5 ± 10.8	58.8 ± 4.78	NS
Sex (male : female)	22:20	6:9	NS
Height (m)	1.60 ± 0.10	1.566 ± 0.081	NS
Bodyweight (kg)	61.8 ± 12.1	53.8 ± 7.69	0.02
Body mass index	24.0 ± 2.78	21.9 ± 2.37	0.012
PEG IFN dose (µg)	81.4 ± 19.5	73.3 ± 34.2	0.052
PEG IFN/BW	1.33 ± 0.269	1.39 ± 0.711	NS
Ribavirin dose (mg)	642.8 ± 150.0	520 ± 101.4	0.011
Ribavirin/BW	10.5 ± 2.13	9.80 ± 2.08	NS
HCV cAg (fmol/L)	6969 ± 5281	24674 ± 20856	0.003
WBC (/µL)	5019.0 ± 1294	6033.8 ± 2479	NS
RBC (10 ⁴ /µL)	444 ± 40.1	351 ± 58.6	< 0.0001
Hemoglobin (g/dL)	13.9 ± 1.10	10.8 ± 1.88	< 0.0001
Platelet (10 ⁴ /µL)	16.7 ± 4.68	18.9 ± 10.8	NS
AST (U/L)	62.1 ± 31.6	64.2 ± 38.5	NS
ALT (U/L)	84.5 ± 51.8	88.0 ± 58.6	NS
γ-GTP (U/L)	64.0 ± 61.7	113.6 ± 83.1	0.036
Ferritin (ng/dL)	206 ± 164.8	204.5 ± 188.4	NS
TC (mg/dL)	172.6 ± 25.7	165.3 ± 39.2	NS
TG (mg/dL)	108.2 ± 52.2	122.9 ± 46.4	NS
HDL (mg/dL)	46.5 ± 11.9	45.4 ± 14.8	NS
LDL (mg/dL)	97.7 ± 25.4	88.6 ± 27.8	NS
FFA (mEq/L)	0.514 ± 0.251	0.693 ± 0.310	0.049
FPG (mg/dL)	92.4 ± 16.4	123.7 ± 58.6	NS
Insulin (mIU/L)	9.06 ± 5.5	8.34 ± 5.16	NS
HOMA-IR	2.07 ± 1.31	1.86 ± 1.38	NS
HOMA-b	128.0 ± 76.2	95.7 ± 86.5	NS
Fibrosis	1.92 ± 1.19	0.933 ± 0.799	0.008
Activity	1.08 ± 0.474	1.33 ± 0.488	0.098

Data are shown as the means ± standard deviation and values, with statistical analysis calculated by Mann–Whitney *U*-test for means and Pearson's χ^2 -test for values.

Normal values in laboratory tests are same as in Table 1.

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CHC, chronic hepatitis C; FFA, free fatty acid; FPG, fasting plasma glucose; HCV cAg, hepatitis C virus core antigen; HDL, high density lipoprotein; HOMA, homeostasis model assessment; LDL, low density lipoprotein; LDLT, living donor liver transplantation; PEG IFN, pegylated interferon; RBC, red blood cell count; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; WBC, white blood cell count.

cell, γ -GTP, FFA and liver fibrosis in the pretreatment clinical characteristics were different in both groups (Tables 1,2). The VR rate of the CHC group was superior to that of the LDLT group, and the SVR by per-protocol analysis was also similar in result to the VR (Table 3). The viral disappearance rate of the CHC group was superior to the LDLT group, regardless of the HCV serotype (Fig. 1). The HCV cAg titer under the treatment in the LDLT group was more than that of the CHC group from D0 to W12 (Figs 2a,3a) and the HCV cAg decrease rate of the LDLT group at the D1 was less than that of the CHC group (Figs 2b,3b). We showed that the reinfected

HCV to the graft liver was more refractory than the non-transplanted CHC. The PEG IFN and ribavirin dose per BW was an equal dose in both groups. However, it was difficult to determine the pretreatment predictive factors for the LDLT cases, because only one case showed SVR in the LDLT group. Thus, we considered that the difference of the pretreatment clinical characteristics in both groups might be related to the refractory HCV infection.

The pretreated HCV cAg titer is known to be the principal factor for IFN resistance. For CHC and LDLT patients, a high HCV-RNA titer in the pretreatment sera

Table 3 Result of pegylated interferon- α -2b plus ribavirin therapy

A. All cases			
Term	All-CHC	All-LDLT	P-value
Viral response 4 weeks	40/60 (67%)	5/12 (42%)	NS
Viral response 8 weeks	47/55 (85%)	6/12 (50%)	0.011
Viral response 12 weeks	43/48 (90%)	6/12 (50%)	0.003
Sustained viral response: ITT	20/42 (45%)	2/12 (20%)	0.054
Sustained viral response: PP	20/28 (80%)	2/9 (22%)	0.008
B. Serotype 1 and high virus titer cases			
Term	ST1H-CHC	ST1H-LDLT	P-value
Viral response 4 weeks	24/40 (67%)	5/11 (45%)	NS
Viral response 8 weeks	30/36 (83%)	5/11 (45%)	0.012
Viral response 12 weeks	25/29 (86%)	5/11 (45%)	0.008
Sustained viral response: ITT	8/27 (30%)	1/11 (8%)	NS
Sustained viral response: PP	8/15 (53%)	1/9 (11%)	0.029
Non-virological response: ITT	11/27 (41%)	5/11 (45%)	NS
Non-virological response: PP	4/15 (27%)	4/9 (44%)	NS

Data are shown as relevant numbers/target case numbers (percentage of relevant numbers) with statistical analysis using Pearson's χ^2 -test for numbers.

CHC, chronic hepatitis C; ITT, intention to treatment analysis; LDLT, living donor liver transplantation; PP, per-protocol analysis.

is associated with non-responder status for IFN treatment.^{7,17} In the LDLT condition, the HCV-RNA titer was rapidly increased after immediately decreasing at transplant and the viral load after several weeks post-LDLT exceeded the value of pre-LDLT.¹⁸ The HCV-RNA titer increased rapidly in patients receiving corticosteroids as part of the immunosuppressant regimen.^{18,19} We have speculated that the massive amount of HCV, caused by immunosuppressant therapy after the LDLT, was part of the reason for the IFN refractory status. However, comparisons with the pretreated HCV cAg matched groups (Fig. 3) showed the existence of an important factor other than the pretreatment viral load. It will, therefore, be necessary to analyze this problem by evaluating many factors, for example immunosuppressants¹⁰ and regeneration, in the future.

A high level of γ -GTP was also known to be an important factor for IFN treatment.^{7,17} Usually, high levels of γ -GTP and FFA have been linked to insulin resistance.^{20,21} Therefore, insulin resistance in the liver is assumed in the condition of IFN resistance. However, the LDLT group had the normal range of HOMA-IR,¹⁶ which was lower than that of the CHC group (Tables 1,2). The HCV infection after liver transplantation is associated with insulin resistance.²² Immunosuppressants, especially corticosteroids, induced insulin resistance.²³ In the present study, the LDLT group had a disturbance of insulin secretion

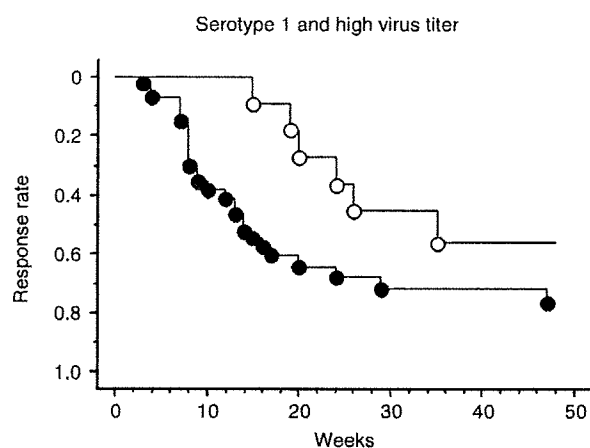
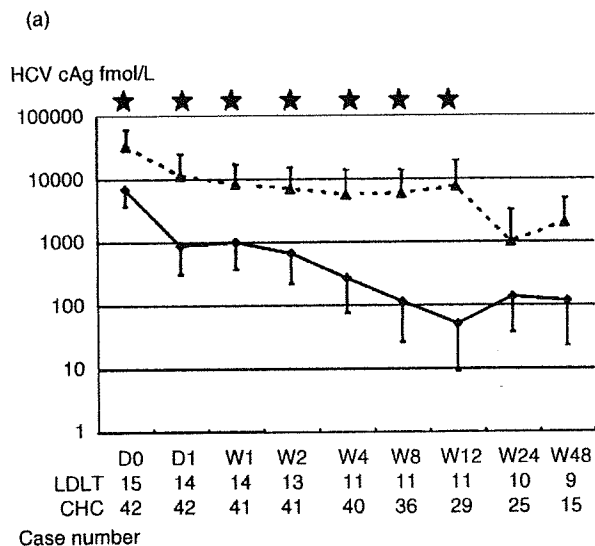


Figure 1 The difference in the hepatitis C ribonucleic acid (HCV-RNA) disappearance rate between the chronic hepatitis C (CHC) group and living donated liver transplantation (LDLT) group during 48 weeks of treatment. HCV-RNA was evaluated by the qualitative PCR method. The disappearance rate was calculated as follows: serum HCV-RNA disappearance case number/all cases in indicated time. The statistical analysis was carried out using the Kaplan–Meier method with the Wilcoxon assay. ST1H group was plotted as the HCV-RNA disappearance line between the white circle of the LDLT group and the black circle of the CHC group. In all cases and the ST1H group, the disappearance rate was statistically significant between the CHC group and the LDLT group ($P < 0.05$).



(b)

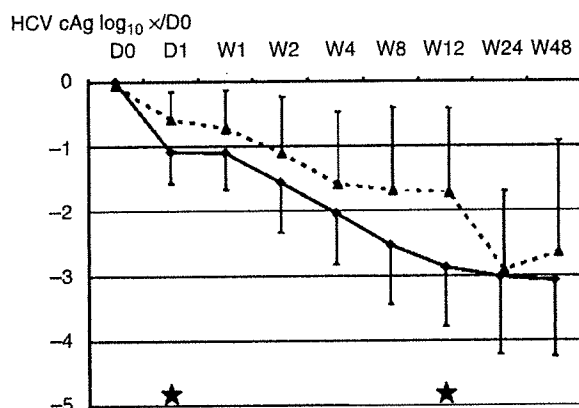
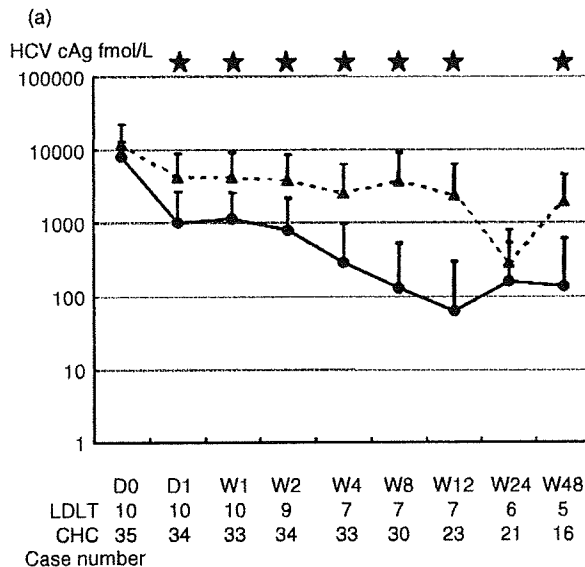


Figure 2 Comparison of viral kinetics between the SG1H-chronic hepatitis C (CHC) group and the SG1H-living donor liver transplantation (LDLT) group during the 48 weeks of treatment. (a) The hepatitis C virus core antigen (HCV cAg) load and (b) reduction rates were plotted by a straight line (SG1H-CHC group), and dotted line (SG1H-LDLT group). The error bar represented the standard deviation. On the y-axis, D0 is pretreatment, D1 and WX is time post-treatment day 1 and week X, respectively. The reduction rate was calculated as follows: \log_{10} HCV cAg load in indicated time/in D0. HCV cAg titer at the indicated time between SG1H-CHC and SG1H-LDLT were compared. The asterisk mark indicates a significant difference, $P < 0.05$, calculated by Mann-Whitney *U*-test.



(b)

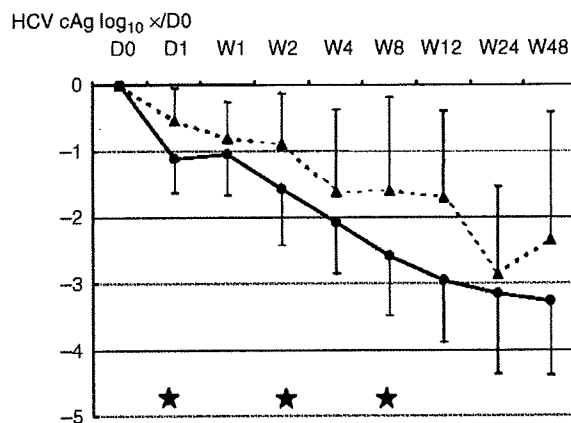


Figure 3 Comparison of viral kinetics between matched pre-treatment hepatitis C virus core antigen (HCV cAg) ST1H-chronic hepatitis C (CHC) group and ST1H-living donor liver transplantation (LDLT) group during 48 weeks of treatment. (a) HCV cAg load and (b) reduction rate were plotted by a straight line (matched SG1H-CHC group) and dotted line (matched SG1H-LDLT group). The error bar represents the standard deviation. The asterisk mark is the significant difference, $P < 0.05$, calculated by Mann-Whitney *U*-test.

rather than insulin resistance and high levels of FPG might be caused by the disturbance of insulin secretion. Therefore, further study is necessary to clarify the relationship between the glucose metabolism and the IFN resistance in LDLT patients. The levels of γ -GTP rise at cholestatic conditions. It was reported that the presence

of a cholestatic profile is associated with an adverse response to IFN treatment in LT.⁷ A cholestatic profile provoked the TH2-like lymphocyte response.¹⁹ The authors have previously reported that IL-10, representative of TH2 cytokine, inhibits IFN signaling through an inducible suppressor of cytokine signaling.²⁴ The high levels of FFA were induced by a catabolic state, such as cirrhosis, and were not fully recovered after LDLT. As a result, the levels of FFA reflected a continuous catabolic state at the beginning of IFN treatment. FFA can induce oxidative stress in various cells,^{25,26} and inhibit the IFN induced antiviral gene induction through the inactivation of Jak-1 and Tyk-2.²⁷ Therefore, we are speculating that high levels of γ -GTP and FFA in the LDLT group have the ability to inhibit IFN signaling as much as in the CHC patients.

We are paying attention to the viral decline of D1/D0 (Figs 2b,3b). The decreased rate of D1 is named as the first phase of HCV decline and is the predictor of SVR.^{28,29} The first phase influenced the second phase, which is the decline of HCV after D2.²⁸ The IFN induced antiviral gene products were considered to be very important for antiviral activity.¹¹ The expressions of the IFN stimulating genes (ISG) were associated with the early phase of the decline¹¹ and it was reported that the lack of ISG caused early liver fibrosis in the LT patients with HCV.³⁰ In the LDLT group, the reduced HCV cAg decreased the rate of D1 and this might be part of the cause of being refractory to IFN. We speculate that an IFN signaling disturbance, related to high levels of γ -GTP and FFA, might have triggered the adverse effect to the HCV cAg decreased rate of D1.

In summary, it became clear that the viral response and SVR is worse in the LDLT group. The first phase of viral decay, the decreased rate of D1/D0, also declined in the LDLT group. High levels of γ -GTP and FFA in the pretreatment sera might also be related to IFN-signaling damage in hepatocytes. At the initiation of pre-emptive therapy, HCV had also been increasing in the graft liver and the catabolic status of energy did not recover for the relatively small size of the graft liver. When beginning treatment for an HCV infection after LT, we should carefully take into account the timing of IFN initiation, in addition to the types of immunosuppressants used.

REFERENCES

- Perz JE, Armstrong GL, Farrington LA *et al.* The contributions of hepatitis b virus and hepatitis c virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45: 529-38.
- Forman LM, Lewis JD, Berlin JA *et al.* The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122: 889-96.
- Berenguer M, Prieto M, San Juan F *et al.* Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* 2002; 36: 202-10.
- Berenguer M, Ferrell L, Watson J *et al.* HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol* 2000; 32: 673-84.
- Carrion JA, Navasa M, Garcia-Retortillo M *et al.* Efficacy of antiviral therapy on hepatitis C recurrence after liver transplantation: a randomized controlled study. *Gastroenterology* 2007; 132: 1746-56.
- Davis GL, Wong JB, McHutchison JG *et al.* Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 645-52.
- Fernandez I, Meneu JC, Colina F *et al.* Clinical and histological efficacy of pegylated interferon and ribavirin therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 1805-12.
- Hu X, Li WP, Meng C *et al.* Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *J Immunol* 2003; 170: 4833-9.
- Boor PP, Metselaar HJ, Mancham S *et al.* Prednisolone suppresses the function and promotes apoptosis of plasmacytoid dendritic cells. *Am J Transpl* 2006; 6: 2332-41.
- Hirano K, Ichikawa T, Nakao K *et al.* Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporine A, on interferon induced anti-viral protein in human hepatocyte cell. *Liver Transpl* 2008; 14: 295-301.
- Feld JJ, Nanda S, Huang Y *et al.* Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology* 2007; 46: 1548-63.
- Neumann AU, Lam NP, Dahari H *et al.* Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998; 282: 103-7.
- Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH *et al.* Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19: 1513-20.
- Tanaka T, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K *et al.* Significance of specific antibody assay for genotyping of hepatitis C virus. *Hepatology* 1994; 19: 1347-53.
- Gonzalez V, Padilla E, Diago M *et al.* Clinical usefulness of total hepatitis C virus core antigen quantification to monitor the response to treatment with peginterferon alpha-2a plus ribavirin*. *J Viral Hepat* 2005; 12: 481-7.
- Taura N, Ichikawa T, Hamasaki K *et al.* Association between liver fibrosis and insulin sensitivity in chronic hepatitis C patients. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2752-9.
- Taliani G, Gemignani G, Ferrari C *et al.* Pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin in the retreatment of interferon-ribavirin nonresponder patients. *Gastroenterology* 2006; 130: 1098-106.

- 18 Garcia-Retortillo M, Forns X, Feliu A *et al.* Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35: 680–7.
- 19 McCaughan GW, Zekry A. Mechanisms of HCV reinfection and allograft damage after liver transplantation. *J Hepatol* 2004; 40: 368–74.
- 20 Mook S, Halkes CJ C, Bilecen S *et al.* In vivo regulation of plasma free fatty acids in insulin resistance. *Metabolism* 2004; 53: 1197–201.
- 21 Kronenberger B, Herrmann E, Micol F *et al.* Viral kinetics during antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C and persistently normal ALT levels. *Hepatology* 2004; 40: 1442–9.
- 22 Delgado-Borrego A, Casson D, Schoenfeld D *et al.* Hepatitis C virus is independently associated with increased insulin resistance after liver transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 703–10.
- 23 Bloom RD, Lake JR. Emerging issues in hepatitis C virus-positive liver and kidney transplant recipients. *Am J Transpl* 2006; 6: 2232–7.
- 24 Ichikawa T, Nakao K, Nakata K *et al.* Involvement of IL-1beta and IL-10 in IFN-alpha-mediated antiviral gene induction in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 414–22.
- 25 Oprescu AI, Bikopoulos G, Naassan A *et al.* Free fatty acid-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress in vitro and in vivo. *Diabetes* 2007; 56: 2927–37.
- 26 Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S *et al.* Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 2003; 52: 2882–7.
- 27 Di Bona D, Cippitelli M, Fionda C *et al.* Oxidative stress inhibits IFN-alpha-induced antiviral gene expression by blocking the JAK-STAT pathway. *J Hepatol* 2006; 45: 271–9.
- 28 Layden JE, Layden TJ, Reddy KR *et al.* First phase viral kinetic parameters as predictors of treatment response and their influence on the second phase viral decline. *J Viral Hepat* 2002; 9: 340–5.
- 29 Boulestin A, Kamar N, Sandres-Saune K *et al.* Twenty-four hour kinetics of hepatitis C virus and antiviral effect of alpha-interferon. *J Med Virol* 2006; 78: 365–71.
- 30 Smith MW, Walters KA, Korth MJ *et al.* Gene expression patterns that correlate with hepatitis C and early progression to fibrosis in liver transplant recipients. *Gastroenterology* 2006; 130: 179–87.

Sequence-Based *spa* Typing as a Rapid Screening Method for the Areal and Nosocomial Outbreaks of MRSA

Munetoshi Narukawa,¹ Akira Yasuoka,¹ Ryougo Note² and Hisashi Funada¹

¹Department of Clinical infectious diseases, University of Toyama, Toyama, Japan

²Department of Clinical Laboratory, Toyama University Hospital, Toyama, Japan

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is the leading cause of nosocomial infection and MRSA outbreaks have become a major problem. Therefore, the rapid and accurate typing of MRSA isolates is important for epidemiological surveys and nosocomial infection control. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is considered as the gold standard technique for MRSA typing, because of its high discriminatory power, but its procedure is rather complicated and time-consuming. The *spa* gene encodes a cell wall component of *Staphylococcus aureus* protein A, and exhibits polymorphism. Sequencing the *spa* gene is expected superior to PFGE in speed and data interpretation. In the present study, we evaluated whether *spa* typing of MRSA is useful for nosocomial outbreak analysis and epidemiological investigations. We analyzed 19 nosocomial outbreak isolates from 4 separate hospitals and 26 isolates from outpatients of Toyama University Hospital. Either PFGE or *spa* typing revealed a single nosocomial strain that appears unique to each hospital. Indeed, *spa* typing confirmed the four different strains, but PFGE demonstrated only 3 strains. With the total 45 isolates, PFGE showed 16 different patterns and *spa* typing showed 12 patterns. Moreover, we were able to analyze the *spa* gene in about 2 days, from sampling to obtaining the results, whereas it took about 7 days with PFGE. In conclusion, sequence-based *spa* typing shows comparable sensitivities to PFGE, and is a rapid and easy handling method. The sequence-based *spa* typing can be used as the rapid screening test when MRSA outbreak is suspected in areas and hospitals.

PFGE; MRSA outbreak; *spa* typing; single polymorphic locus sequence-based typing method; rapid analysis.

Tohoku J. Exp. Med., 2009, 218 (3), 207-215. © 2009 Tohoku University Medical Press

Since methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was initially identified in the early 1960s, it has gradually spread widely, becoming a major issue in medical practice from the late 1970s (Cafferkey et al. 1985). It is now prevalent worldwide, and has become one of the most important pathogens of nosocomial infection. In Japan, MRSA became problematic in medical facilities throughout the country in the late 1980s, but the estimated isolation rate at that time was still low, about 10% (Tomizawa and Sato 1988). However, according to the data in 2006, 63% of *Staphylococcus aureus* strains isolated from blood samples were reported as MRSA (Japanese Nosocomial Infection Surveillance: test section data 2006). MRSA patients accounted for 91.7% of those infected with drug-resistant bacteria in 2006; MRSA remains a major pathogenic organism in nosocomial infection and causes problems (Japanese Nosocomial Infection Surveillance: all inpatient data 2006).

When an outbreak of MRSA is suspected, MRSA typing is essential to elucidate the origin of the pathogen and simplify epidemiological surveys (Macfarlane et al. 1999; Gialluly et al. 2003). Currently, pulsed-field gel electropho-

resis (PFGE) is most frequently used. Processing without DNA fragmentation facilitates highly sensitive polymorphism analysis, a very important tool for outbreak surveys in hospitals. However, its procedures are too complicated and time consuming to allow quick countermeasures, and, in many cases, the outbreaks are likely to be under control by the time the results are made available. Data analyses were previously hampered by their lack of reproducibility and data sharing among institutions (Heijne and Uhlen 1987; Brigido et al. 1991; Belkum et al. 1998) and, therefore, their availability in relatively small-scale surveys was limited (Chung et al. 2000; Cookson et al. 2007). However, at present, advances in standardized electrophoretic conditions and the development of analysis software have made them available for multicenter studies (Chung et al. 2000; Oliveira et al. 2001; Duck et al. 2003; Cookson et al. 2007).

Typing by gene sequencing has recently markedly advanced, enabling analysis within a short time. The *spa* gene encodes a cell wall component of *S. aureus*, protein A. The X region, a polymorphic region of the *spa* gene, is located immediately upstream of a region that encodes the

Received December 5, 2008; revision accepted for publication May 19, 2009. doi: 10.1620/tjem.218.207

Correspondence: Munetoshi Narukawa, Department of Clinical infectious diseases, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama-shi, Toyama 930-0194, Japan.

e-mail: naru-tym@umin.ac.jp

cell wall-binding sequence at the C-terminal (Guss et al. 1984; Uhlen et al. 1984; Schneewind et al. 1992) and consists of a variable number of 21-bp to 27-bp repeats or point mutations (Guss et al. 1984; Uhlen et al. 1984; Frénay et al. 1996; Shopsin et al. 1999). Sequencing of this region is called *spa* typing (Frénay et al. 1996) and is superior to PFGE in terms of speed, workflow capacity, ease of interpretation, and comparison between laboratories (Wernitz et al. 2005; Ruppitsch et al. 2006; Hallin et al. 2007). An epidemiological survey using *spa* typing has studied, and its utility has been reported in a few papers (Shopsin et al. 1999; Tang et al. 2000; Koreen et al. 2004). We examined the following in outbreak cases of Toyama, Japan: (1) Correlation between the results of PFGE analysis and those of *spa* typing, (2) usefulness of *spa* typing as an epidemiological survey on outbreak cases, and (3) utility of *spa* typing as an analytical method of strain spreading in our area.

Materials and Methods

Samples

Forty-five clinical MRSA strains isolated at Toyama University Hospital (TUH) and 3 acute care hospitals in Toyama Prefecture were investigated. Twenty-six clinical strains isolated from outpatients at TUH between January 2006 and October 2007 were used. Nineteen nosocomial outbreak strains isolated at 3 acute care hospitals and TUH were used: 6 outbreak strains isolated at Hospitals A in 2000, 3 at B in 2001, 3 at C in 2002, and 7 at TUH in 2002.

Polymerase chain reaction (PCR)

Single colonies of MRSA strains grown on Mueller-Hinton agar medium were individually cultured in 3 ml of brain-heart infusion broth at 37°C for 12 hours. The culture fluid was centrifuged at 6,000 g for 2 min. The bacterial pellet was collected and combined with 3 µl of proteinase K (20 mg/ml) and 100 µl of lysis buffer, and incubated in an aluminum bath at 60°C for 60 min and then 95°C for 15 min. After cooling at room temperature, the sample was combined and mixed with 600 µl of phenol/chloroform, and centrifuged at 9,200 g for 2 min. The supernatant was transferred into a new Eppendorf tube, combined and mixed with 600 µl of phenol, and centrifuged at 9,200 g for 2 min. The supernatant was transferred into a new Eppendorf tube, combined and gently mixed with 1/9 volumes of pH 5.2 sodium acetate and 2 volumes of 99.5% ethanol, and precipitated at -20°C overnight. After centrifugation at 18,000 g for 15 min, the supernatant was discarded. The precipitate was washed with 70% ethanol and centrifuged at 9,200 g for 2 min. After removal of the supernatant, the precipitate was completely dried, and dissolved in 50 µl of TE buffer as template DNA. Primers for the *spa* gene were prepared referring to Shopsin et al.'s report (1999), but the resolution was insufficient, such as multiple nonspecific bands appeared. Thus, we designed original primers based on the sequence of GeneBank No. J01786, and *spa*-1 (GTA ACG GCT TCA TCC AAA GC) and *spa*-2 (CAA GTT CTT GAC CAG GTT TGA) were used for the latter investigation (F888 → R1547).

The composition of the reaction solution was: DNA template, 50 ng; Taq polymerase, 2.5 U (TaKaRa Ex Taq™, Takara, Shiga, Japan); 10X Ex Taq Buffer, 5 µl (20 mM Tris-HCl [pH 8.3], 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂); dNTP Mixture (2.5 mM each), 5 µl; Primer *Spa*1, 1.0 µM (final conc.); Primer *Spa*2, 1.0 µM (final conc.), and the

volume was adjusted to 50 µl with distilled water. PCR was performed using a thermal cycler (Gene Amp PCR system 9700, Applied Biosystems, CA, USA) under the following reaction conditions: pre-denaturation at 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 58°C for 30 seconds, and 72°C for 45 seconds, and then postextension at 72°C for 7 min. The PCR products were subjected to 3% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and single bands were confirmed by UV irradiation.

DNA sequence

The PCR products were purified using a QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), and subjected to cycle sequence reaction using a BigDye® Terminator Ver. 3 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The reaction solution consisted of 5 µl of purified DNA, 1 µl of *spa*-1 or *spa*-2 (1.6 pmol/µl), and 4 µl of Ready Reaction mix, in a total volume of 10 µl. The reaction conditions were 25 cycles of 96°C for 10 seconds, 50°C for 5 seconds, and 60°C for 4 min. For the primers, *spa*-1 and *spa*-2 used for PCR were employed for both the forward and reverse directions. After the completion of the cycle sequence reaction, the reaction solution was purified using a DyeEx™ 2.0 Spin Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), combined with 30 µl of 95% ethanol and 5 µl of 3 M acetic acid, stirred at room temperature for 15 min, and centrifuged at 18,000 g for 15 min. The supernatant was removed, and the precipitate was washed with 50 µl of 80% ethanol. After removal of the supernatant by pipetting, the precipitate was dried at room temperature for 15 min. The precipitate was dissolved with 2 µl of loading buffer, heated at 96°C for 5 min, and subjected to gene analysis using ABI PRISM377 (Applied Biosystems). Consistency of the sequence data in the forward and reverse directions was confirmed in each strain using gene analysis software, GENETYX® Ver. 7 (GENETYX, Tokyo, Japan), and then homology was analyzed.

PFGE

Single colonies of MRSA strains grown on Mueller-Hinton agar medium were individually cultured in 3 ml of brain-heart infusion broth at 37°C for 18 hours, and bacteria were collected by centrifugation (13,200 g). The precipitates were embedded in agarose blocks using a Gene Path Group I Reagent kit (BIO-RAD, CA, Hercules, USA) following the attached instructions, the bacteria were lysed with lysozyme/lysostaphin and treated with proteinase K. The DNA was cut with 25 U of the restriction enzyme *Sma*I (BIO-RAD), and electrophoresed at 170 V for 20 hours at 14°C with a pulse time of 5-28 seconds using the GenePath™ system (BIO-RAD). After electrophoresis, the agarose gel was stained with ethidium bromide. The image acquired under UV irradiation was analyzed. The PFGE patterns are often evaluated visually based on the criteria proposed by Tenover et al. (1995); however, we used Finger printing™ II computer software (BIO-RAD) for a more accurate identification.

Results

PFGE

The results from PFGE analysis of a total of 12 outbreak strains obtained from 3 acute care hospitals, A, B, and C, demonstrated one identical type for each hospital and, therefore, they were determined as outbreak strains. The analytical results of 7 outbreak strains in TUH demonstrated one identical pattern, except for the No. 3 strain; the No. 3 strain

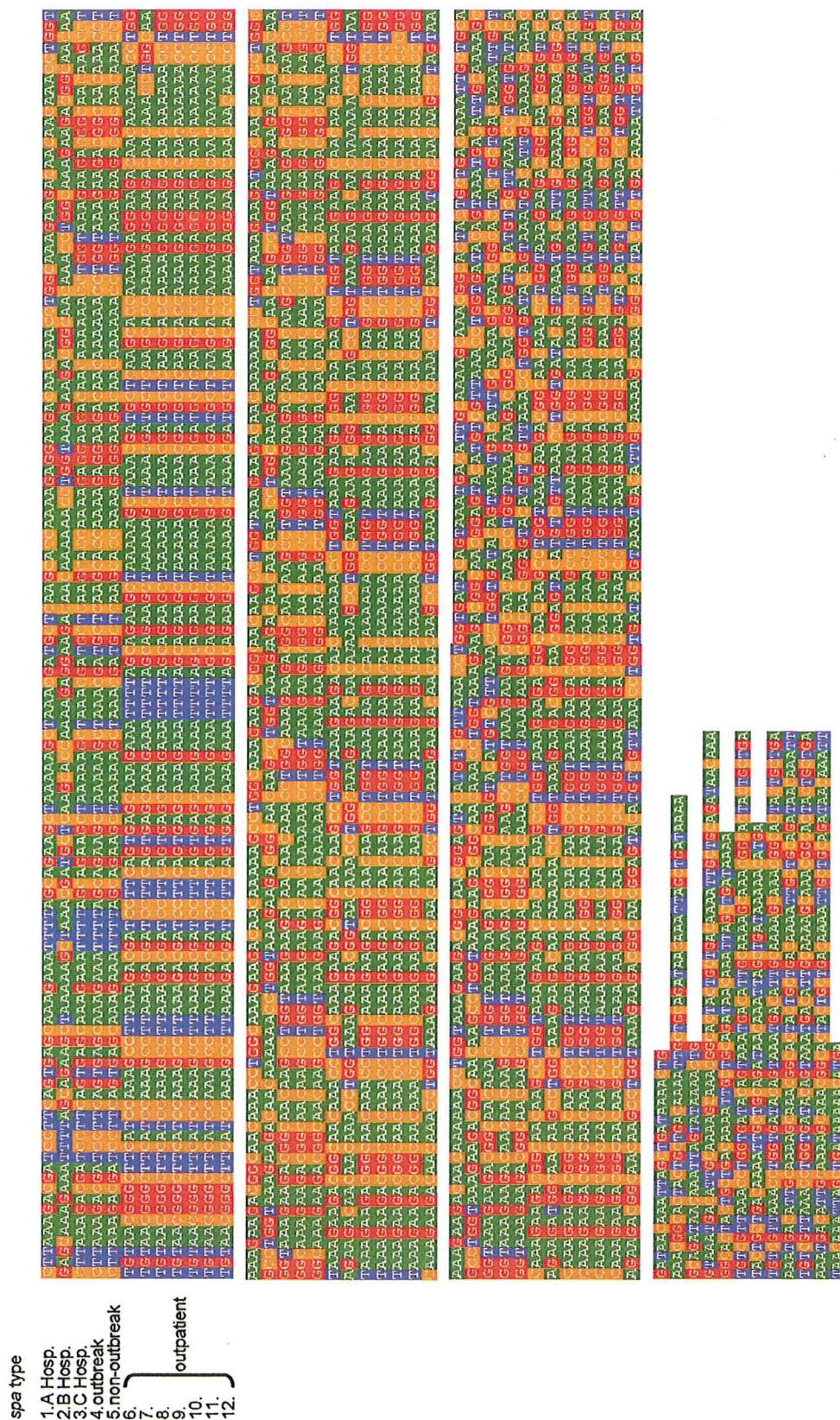


Fig. 1. Sequence patterns obtained by spa typing of the isolates from the outpatient clinic of hospitals A, B, C and Toyama University Hospital (TUH). The respective isolates of hospitals A, B, and C showed one identical sequence each, but the sequences were different among the hospitals. As for TUH, the outbreak and non-outbreak strains could be distinguished. Comparison of the outbreak strains among hospitals A, B, C and TUH also showed different sequences among all of them, and the hospital isolates were classified into 5 types. The isolates from the outpatient of TUH were classified into 7 types by the sequences from spa typing, and none of these sequences was identical with sequences of hospital outbreak strains. A total of 45 strains, the nosocomial outbreak strains and isolates from outpatients, were classified into 12 types.

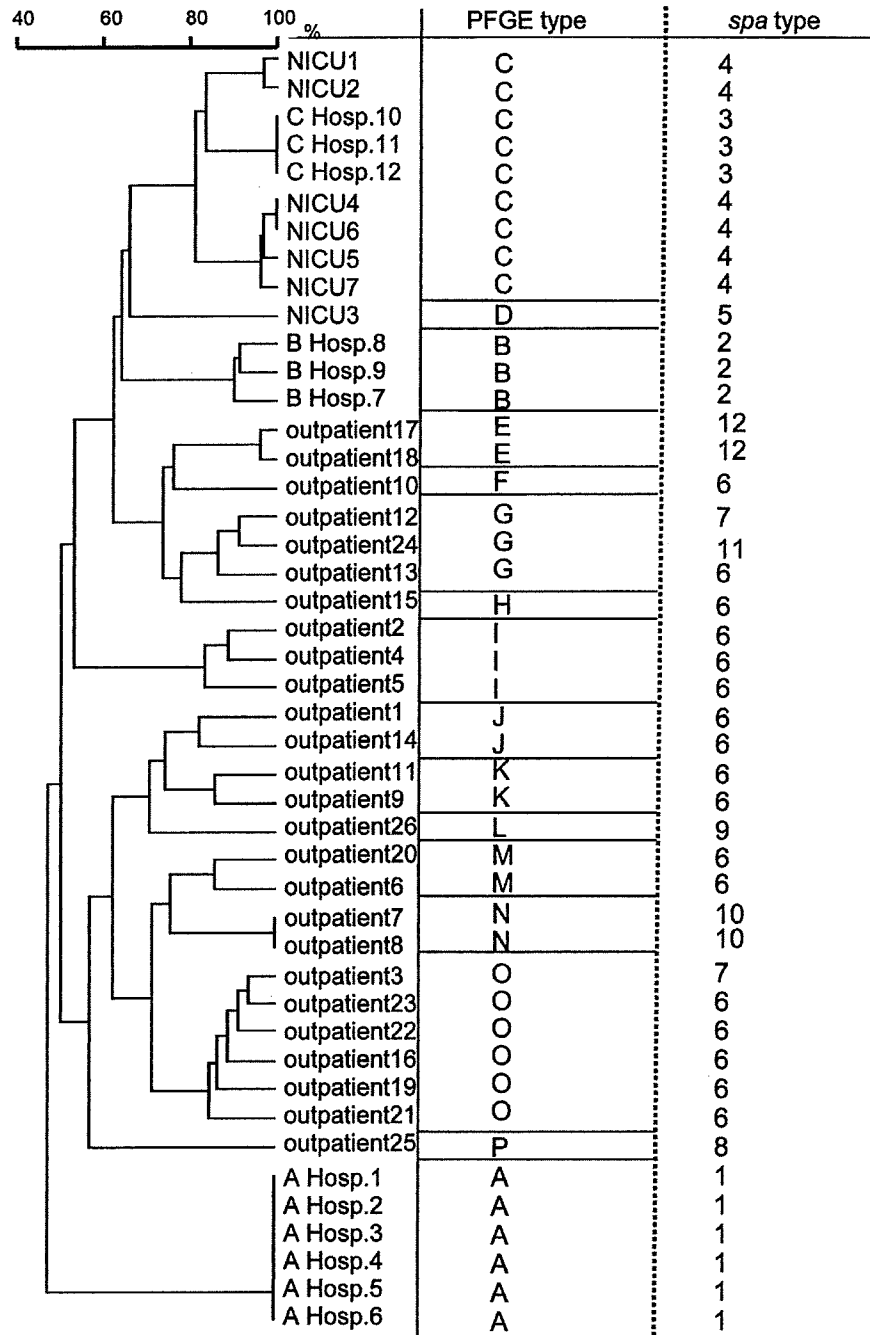


Fig. 2. Summary of comparison between the results of PFGE and sequencing

The 45 clinical isolates were classified into 16 types by PFGE and 12 types by *spa* typing. The analytical results of outbreak strains from hospitals A, B, C and TUH were consistent between PFGE and *spa* typing; the outbreak strains identified by PFGE were also identified as outbreak strains by *spa* typing. In addition, in the outbreak cases of TUH, *spa* typing, like PFGE, allowed the distinction between outbreak and non-outbreak strains. The outbreak strains of hospital C and those of TUH were of the same pattern in PFGE, but showed different sequences in *spa* typing. Some strains from the outpatient were of different types in PFGE, but showed one identical sequence pattern in *spa* typing. They showed one identical sequence in *spa* sequencing, but different patterns in PFGE.

was determined to be a non-outbreak strain and the others as outbreak strains. In fact, the No. 3 strain had been detected before the outbreak and, therefore, can be differentiated from the outbreak strain. Comparisons among hospitals A, B, C and TUH demonstrated different types among hospitals A, B, and C, but the outbreak strains were of one identical type between hospital C and TUH. The hospital isolates were classified into 4 types by PFGE. With the analytical results of 26 isolates from the outpatients of TUH, they were classified into 12 patterns by PFGE. O type was the most common (6 strains), followed by G and I types (3 strains each). As a result of analysis, 45 clinical isolates were classified into 16 patterns (Fig. 2).

spa typing

spa typing of the isolates from hospitals A, B, and C demonstrated one identical sequence for each hospital, but the sequences were different among the hospitals; we obtained the same results as those using PFGE. The outbreak isolates in TUH showed one identical sequence, except for the No. 3 strain; *spa* typing allowed the distinction between non-outbreak and outbreak strains, as did PFGE. Comparisons among hospitals A, B, C and TUH also showed different sequences; all outbreak strains were of different types.

The hospital isolates were classified into 5 types based on *spa* typing. The 26 strains from the outpatient of TUH were classified into 7 types according to their sequences obtained by *spa* typing. A sequence comparison between the hospital isolates and those from the outpatient of these 4 hospitals is shown in Fig. 1. The hospital isolates and those from the outpatients were of different types, and the 45 clinical isolates were classified into 12 types.

A comparison of the results between PFGE and *spa* typing is shown in Fig. 2. The analysis of outbreak isolates obtained in the hospitals yielded consistent results between PFGE and *spa* typing; the outbreak strains identified by PFGE could also be identified as outbreak strains by *spa* typing, since they showed the same sequences. In the outbreak cases in TUH, *spa* typing also allowed the distinction between outbreak and non-outbreak strains. The outbreak strains of hospital C and TUH showed one identical pattern in PFGE, but were indicated different sequences in *spa* typing. Thus, *spa* typing showed an identification capability comparable with that of PFGE in outbreak cases. On the other hand, some isolates from the outpatients showed one identical sequence in *spa* typing, although they were of different types in PFGE. That is, in some strains, the results of *spa* typing were not correlated with those of PFGE, and so precluded their distinction.

Discussion

The rapid and accurate typing of isolates of nosocomial infection plays a central role in epidemiological surveys and nosocomial infection control. PFGE, the technique most commonly used for epidemiological surveys today, is char-

acterized by two innovative technologies. Firstly, the entire DNA extraction procedure is performed in agarose-embedded bacterial cells, which prevents the fragmentation of DNA and allows the recovery of macromolecular DNA. Secondly, this macromolecular DNA is electrophoresed in agarose for electrophoresis by alternately changing the electric field using a specific apparatus. These techniques enable polymorphism analysis of macromolecular DNA treated with specific restriction enzymes. PFGE has shown marked identifying capabilities and is considered a "gold standard" in epidemiological surveys such as microepidemiological (local or short term) and macroepidemiological (national, continental, or long term) surveys (Macfarlane et al. 1999; McDougal et al. 2003; Murchan et al. 2003; Sousa et al. 2006; Hallin et al. 2007). However, its procedures are complicated due to time-consuming electrophoresis (about 20 hours), taking about 7 days from the start of culture until the results are obtained. In nosocomial outbreak cases, outbreaks are likely to be under control by the time the results are made available and, therefore, PFGE rather serves as a retrospective genetic confirmation. On the other hand, recent marked progress in sequencing techniques has facilitated faster analysis. The *spa* typing conducted herein is a single polymorphic locus sequence-based typing method, and is reportedly superior to PFGE in terms of speed, reproducibility, and convenience of technique (Murchan et al. 2003; Wernitz et al. 2005; Ruppitsch et al. 2006; Sousa et al. 2006; Hallin et al. 2007). Data analysis, like other gel-based typing systems, provides a subjective interpretation of PFGE results (Tenover et al. 1994) and, therefore, poses a problem regarding data standardization among different institutions (Heijne and Uhlen 1987; Brigido et al. 1991; Belkum et al. 1998). The standardization of data has recently been attempted through the development of an analysis system, and multicenter studies have been conducted (Chung et al. 2000; Oliveira et al. 2001; Duck et al. 2003; Cookson et al. 2007), but database construction remains difficult.

spa typing, like PFGE, can be used for both local and global epidemiological surveys (Koreen et al. 2004; Hallin et al. 2007), but is reportedly inferior to PFGE in terms of identification capability (Shopsin et al. 1999). On the other hand, long-term macroepidemiological studies have reported that *spa* typing shows identifying capabilities comparable with those of PFGE (Strommenger et al. 2006; Hallin et al. 2007). Rapid sequencing has facilitated a rapid response to outbreaks. Several epidemiological surveys employing the direct DNA comparison method have been reported (Shopsin et al. 1999; Tang et al. 2000). On *spa* gene analysis in this study, the *spa* gene sequences of outbreak strains were identical within individual hospitals, but differed among hospitals. In isolates from TUH, a non-outbreak strain could be differentiated, and the findings were comparable to those of PFGE (Fig. 2). Isolates from outpatients were classified into 12 types by PFGE, but only 7 types by *spa* gene sequencing, showing that PFGE was superior in terms of

discrimination. The overall results revealed 16 types classified by PFGE and 12 types classified by *spa* typing; also, in this study, as in other reports, PFGE showed a higher identification capability than sequencing. A comparison of the results between *spa* typing and PFGE analysis demonstrated that strains yielding different sequencing results could be determined as epidemiologically different strains, but strains with the same sequence could not be determined as the same one. Thus, it was suggested that the use of *spa* typing could not accurately demonstrate evidence of an outbreak, but was considered to be useful for the first screening in view of its speed and convenience. Hospitals A, B, C and TUH are located 10-30 km away from one another. The analysis of outbreak strains showed the same PFGE type between hospital C and TUH, but indicated different patterns in *spa* typing and thus allowed identification, suggesting the applicability of *spa* typing not only in outbreak cases in hospitals but also in epidemiological surveys in our area.

Multilocus sequence typing (MLST) to analyze 7 housekeeping genes is available as another sequencing-based analytical method. However, its usefulness as a countermeasure against nosocomial infections has not been established due to the small number of mutations and low identification capability (Gomes et al. 2005; Sousa et al. 2006). This technique is used in long-term international epidemiological surveys as a gold standard of "population analysis." The PFGE test is hampered by database construction of the results from a wide-ranging survey, but is suitable for epidemiological surveys of regional epidemic strains. *spa* typing, as we examined herein, is useful for screening in cases that require rapid countermeasures. Thus, the proper use of appropriate methods facilitates effective epidemiological surveys.

References

- Belkum, A., Leeuwen, W., Kaufmann, M.E., Cookson, B., Forey, F., Etienne, J., Goering, R., Tenover, F., Steward, C., O'Brien, F., Grubb, W., Tassios, P., Legakis, N., Morvan, A., Solh, N.E., Ryck, R., Struelens, M., Salmenlinna, S., Varkila, J.V., Kooistra, M., Talens, A., Witte, W. & Verbrugh, H. (1998) Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 1653-1659.
- Brigido, M.M., Barardi, C.R., Bonjardin, C.A., Santos, C.L., Junqueira, M.L. & Brentani, R.R. (1991) Nucleotide sequence of a variant protein A of *Staphylococcus aureus* suggests molecular heterogeneity among strains. *J. Basic Microbiol.*, **31**, 337-345.
- Cafferkey, M.T., Hone, R., Coleman, D., Pomeroy, H., McGrath, B., Ruddy, R. & Keane, C.T. (1985) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Dublin 1971-84. *Lancet*, **2**, 705-708.
- Cookson, B.D., Robinson, D.A., Monk, A.B., Murchan, S., Deplano, A., Ryck, R., Struelens, M.J., Scheel, C., Fussing, V., Salmenlinna, S., Varkila J.V., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N.J., Leeuwen, W., Belkum, A., Vindel, A., Garaizar, J., Haeggman, S., Liljequist, O.B., Ransjo, U., Premru, M.M., Hryniewicz, W., Rossney, A., Connell, O.B., Short, B.D., Thomas, J., Hanlon, O.S. & Enright, M.C. (2007) Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 1830-1837.
- Chung, M., Lencastre, H., Matthews, P., Tomasz, A., Adamsson, I., Sousa, M.A., Camou, T., Cocuzza, C., Corso, A., Couto, I., Dominguez, A., Gniadkowski, M., Goering, R., Gomes, A., Kikuchi, K., Marchese, A., Mato, R., Melter, O., Oliveira, D., Palacio, R., Leao, R., Sanches, I.S., Song, J.H., Tassios, P.T. & Villari, P. (2000) Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb. Drug Resist.*, **6**, 189-198.
- Duck, W.M., Steward, C.D., Banerjee, S.N., McGowan, J.E. & Tenover, F.C. (2003) Optimization of computer software settings improves accuracy of pulsed-field gel electrophoresis macrorestriction fragment pattern analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 3035-3042.
- Frénay, H.M.E., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., van Leeuwen, W.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Verhoof, J. & Mooi, F.R. (1996) Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **15**, 60-64.
- Gialluly, C., Loulergue, J., Bruant, G., Mereghetti, L., Massuard, S., Mee, N., Audurier, A. & Quentin, R. (2003) Identification of new phages to type *Staphylococcus aureus* strains and comparison with a genotypic method. *J. Hosp. Infect.*, **55**, 61-67.
- Gomes, A.R., Vinga, S., Zavolan, M. & Lencastre, H. (2005) Analysis of the Genetic Variability of Virulence-Related Loci in Epidemic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 366-379.
- Guss, B., Uhlen, M., Nilsson, B., Lindberg, M., Sjoquist, J. & Sjobahl, J. (1984) Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *Eur. J. Biochem.*, **138**, 413-420.
- Hallin, M., Deplano, A., Denis, O., Mendonca, R., Ryck, R. & Struelens, M.J. (2007) Validation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and *spa* Typing for Long-Term, Nationwide Epidemiological Surveillance Studies of *Staphylococcus aureus* Infections. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 127-133.
- Heijne, G. & Uhlen, M. (1987) Homology to region X from staphylococcal protein A is not unique to cell surface proteins. *J. Theor. Biol.*, **127**, 373-376.
- Japanese Nosocomial Infection Surveillance (JANIS) test section http://www.nih-janis.jp/report/season/nenpou/2006/ken_note.html
- Japanese Nosocomial Infection Surveillance (JANIS) all inpatient section <http://www.nih-janis.jp/report/season/nenpou/2006/zen01.html#H2>
- Koreen, L., Ramaswamy, S.V., Graviss, E.A., Naidich, S., Musser, J.M. & Kreiswirth, B.N. (2004) *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 792-799.
- Macfarlane, L., Walker, J., Borrow, R., Oppenheim, B.A. & Fox, A.J. (1999) Improved recognition of MRSA case clusters by the application of molecular subtyping using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Hosp. Infect.*, **41**, 29-37.
- McDougal, L.K., Steward, C.D., Killgore, G.E., Chaitram, J.M., McAllister, S.K. & Tenover, F.C. (2003) Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5113-5120.
- Murchan, S., Kaufmann, M.E., Deplano, A., Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C.E., Fussing, V., Salmenlinna, S., Varkila, J.V., Solh, N.E., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N., Leeuwen, W., Belkum, A., Vindel, A., Laconcha, I., Garaizar, J., Haeggman, S., Liljequist, B.O., Ransjo, U., Coombes, G. & Cookson, B. (2003) Harmonization of pulsed-field gel electro-

- phoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1574-1585.
- Oliveira, D.C., Tomasz, A. & Lencastre, H. (2001) The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements. *Microb. Drug Resist.*, **7**, 349-361.
- Ruppitsch, W., Indra, A., Stoger, A., Mayer, B., Stadlbauer, S., Wewalka, G. & Allerberger, F. (2006) Classifying spa Types in Complexes Improves Interpretation of Typing Results for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 2442-2448.
- Schneewind, O., Model, P. & Fischetti, V.A. (1992) Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell*, **70**, 267-281.
- Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S.O., Smith, D.H., Waddington, M., Dodge, D.E., Bost, D.A., Riehman, M., Naidich, S. & Kreiswirth, B.N. (1999) Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3556-3563.
- Sousa, M.A., Boye, K., Lencastre, B.H., Deplano, A., Enright, M.C., Etienne, J., Friedrich, A., Harmsen, D., Holmes, A., Huijsdens, X.W., Kearns, A.M., Mellmann, A., Meugnier, H., Rasheed, J.K., Spalburg, E., Strommenger, B., Struelens, M.J., Tenover, F.C., Thomas, J., Vogel, U., Westh, H., Xu, J. & Witte, W. (2006) High Interlaboratory Reproducibility of DNA Sequence-Based Typing of Bacteria in a Multicenter Study. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 619-621.
- Strommenger, B., Kettlitz, C., Weniger, T., Harmsen, D., Friedrich, A.W. & Witte, W. (2006) Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 2533-2540.
- Tang, Y.W., Waddington, M.G., Smith, D.H., Manahan, J.M., Kohner, P.C., Highsmith, L.M., Li, H., Cockerill, F.R., Thompson, R.L., Montgomery, S.O. & Persing, D.H. (2000) Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1347-1351.
- Tenover, F.C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Hebert, G.A., Hill, B., Hollis, R., Jarvis, W.R., Kreiswirth, B., Eisner, W., Maslow, J., McDougal, L.K., Miller, J.M., Mulligan, M. & Pfaller, M.A. (1994) Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 407-415.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. & Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction pattern produced by pulse-field gel electrophoresis criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2233-2239.
- Tomizawa, K. & Sato, S. (1988) An analysis of incidents of *Staphylococcus* in Kashima Rosai Hospital. *Jpn. J. Antibiot.*, **41**, 494-504.
- Uhlen, M., Guss, B., Nilsson, B., Gatenbeck, S., Philipson, L. & Lindberg, M. (1984) Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J. Biol. Chem.*, **259**, 1695-1702.
- Wernitz, M.H., Swidsinski, S., Weist, K., Sohr, D., Witte, W., Franke, K.P., Roloff, D., Ruden, H. & Veit, S.K. (2005) Effectiveness of a hospital-wide selective screening programme for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriers at hospital admission to prevent hospital-acquired MRSA infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, **11**, 457-465.

2. 環境や食事の管理

栗原 慎太郎^{*1)} 安岡 彰^{*2)}

造血器腫瘍に対する感染対策には、疾患の特異性に由来する特別な防護環境などの対策と、すべての疾患に共通の標準予防策などの対策の両方を適切に使い分けの必要がある。環境や食事の管理は同様に、造血器腫瘍の治療に際して特別に追加すべき対策であり、注意を要するが、すべての患者に同様の対策を実施することはできない。対策の実施が必要となる患者の免疫状態を適切に判断することが第一である。感染対策としては、標準予防策と感染経路別予防策を実施することがすべてに共通の対策であるが、造血器腫瘍の治療に際しては、対策の内容だけでなく、その実施率が重要である。

Key Words: 防護環境/アスベルギルス症/HACCP

基本となる標準予防策にも言及する。

I はじめに

感染対策に対して我々が現在持っている手段は、常に最新の情報ではない。それは、①新しいエビデンスが創出される、②医療の発達により対象となる患者群が変化する、③ガイドラインには、十分なエビデンスがなければ記載されないことによる。造血器腫瘍の領域においても同様であり、たとえば、造血幹細胞移植における感染対策に対しては、いわゆる「ミニ移植」の増加は免疫低下宿主の分布を変化させ、10年前のガイドラインを適用するときには注意が必要である。

しかし、当然これらの問題は認識されており、ひとつは、継続的な質改善の取り組みをすべての領域で行い、解決を図ることが重要とされている。もうひとつの解決策として示されたものが標準予防策であり、これを基にした感染経路別予防策である。標準予防策は、対象となる患者群すべてに定義することで対象の変化に対応した。本稿では、環境や食事の管理が中心であるが、

II 標準予防策

1996年、米国疾病対策センター(CDC)が、標準予防策のためのガイドラインを発表した。ガイドラインには、現在の感染対策の基本となる概念が提唱されている。その概念とは、すべての患者を対象とする標準予防策と、感染症の原因微生物が同定あるいは推定される場合に、標準予防策に追加して実施する感染経路別予防策の2段階構成になっていることである。

2007年、前回のガイドラインの策定後に発生した重症呼吸器症候群(SARS)ウイルス感染症に対する知見の集積や、薬剤耐性菌の増加などに関するエビデンスの集積を受けて、標準予防策のガイドラインが改定された¹⁾。改定後も2段階構成は維持されたが、標準予防策に関していくつもの追加がなされている。表1に追加された対策の主な点を記載している。

造血器腫瘍に罹患する患者は、一般に免疫低下宿主として理解される。しかし、特別な感染対策

表1 隔離予防策のためのガイドライン

対象	病院から医療関連施設へ拡大
標準予防策	呼吸器衛生/咳エチケットの追加 安全な注射手技 腰椎穿刺時のサージカルマスクの使用
感染経路別予防策	接触・飛沫予防策患者の入室時に個人防護具(PPE)を着用 PPEの確実な着脱
環境	空気感染の集団発生時における代用隔離個室の整備 高リスク期の同種造血幹細胞移植患者に対する防護環境の設置 (CDC隔離予防策のためのガイドライン改定点より抜粋)

表2 呼吸器衛生/咳エチケットの具体的内容

- ・呼吸器症状のある患者に、何らかの方法で、くしゃみ、咳などをすする際には、口・鼻を覆うことを指示する。
- ・くしゃみや鼻をかむ場合には、使い捨てできているティッシュなどを用いてノックアップ式の廃棄容器に捨てる。
- ・呼吸器からの分泌物で手指が汚染された場合には、手指衛生を実施する。
- ・可能な限り、サージカルマスクを症状のある患者が装着する。
- ・症状のある患者は、他の患者と1m以上間隔をあける。

(文獻1より改変)

を追加することが重要なのではなく、問題は、対策の達成率や徹底にある。以下に、基本的な対策と今回新たに追加された対策について記載する。

1. 手指衛生

すべての感染対策の基本であり、新たに患者に触れる前にはすべて実施することが求められる。また、同一の患者であっても、異なる部位への接触では実施することが求められる。手指衛生には、目に見える汚れがある場合や一部の腸管感染症において、流水と石鹸による手洗いをを行うが、基本的には、アルコール含有の手指衛生剤を使用する。ここでも重要な点は、手洗いの方法を厳密に実施することよりも、どれだけ多く行ったかである。

2. 個人防護具(PPE)

基本は、手袋、ガウンとマスクの使用である。汗以外の患者の体液に触れる可能性がある場合には、個人防護具(PPE)の使用が必要となる。推定される汚染の拡がりや体液の種類によって、防護具を選定する。注意すべきことは、正しい装着方法と正しい脱ぎ方である。防護具を使用しても、廃棄が終了するまでの課程で、手指などが汚染する可能性が高く、廃棄後には手指衛生を行う必要がある。

3. 呼吸器衛生/咳エチケット

SARSウイルスの伝播に関する研究から、診察を受ける前の段階ですでに伝播していることが示され、また、サージカルマスクの感染防御に関する有用性が示されている。咳エチケットの具体的

CDC (米国疾病対策センター)

PPE (個人防護具)

SARS (重症呼吸器症候群)

特集 ● 造血器腫瘍の治療における感染症対策

な内容は表2の通りである。呼吸器症状のある患者に、できるだけ早期に対策を実施することが必要で、施設の入力口から対策がとられていることが望ましい。咳エチケットの実施において留意する点は、医療施設の側が、患者に対策を促す、手指衛生の場を提供する、廃棄容器などの物品を用意することで、対策の適切な実施を図ることが基本であることにある。

4. 安全な注射処置

そもそも、安全な注射処置が新たに追加された背景には、血液腫瘍科におけるアウトブレイク事例が要因のひとつとなっている。注射に関するアウトブレイクの解析からは、調査された薬液の回数、複数患者での使用(例:へパリン生食)、複数の患者に同一の針あるいは注射器の使用、汚染されたスペースでの薬剤調整などが原因として認められている。注射器・針の単回使用は当然であるが、複数の患者に薬剤を投与する場合は、できる限り単回使用のバイアルを用いることが望ましい。また、薬液の調整を行うスペースはもともと清潔でなくてはならず、環境の汚染が危惧される行為はすべて避けなければならない。

5. 腰椎穿刺時の感染対策

造血器腫瘍の治療の中でも、中枢神経への浸潤に対して、抗がん剤の髄注などが実施されるが、実施する際には注意しなければならない。腰椎穿刺によって、口腔内細菌が髄液中に移行した事例が複数報告されている。なかでも、髄液内、髄液周囲に薬液を注入する場合にはリスクが高くなる。これらの行為の実施時には、必ずサージカルマスクを使用することが必要である。

III 感染経路別予防策(アスペルギルス症対策を中心に)

病原微生物の種類が、確定診断あるいは推定される場合には、標準予防策に加えて、感染経路別予防策を追加するが、造血器腫瘍はさまざまな感染原因微生物に対して感受性が高まることから、一般細菌に加えて、真菌、原虫などへも対策が必要である。なかでも、アスペルギルス属に対する感染対策は、予後に直結する重要な要因である。表3に侵襲性アスペルギルス症と基礎疾患の関係を示している²⁾。造血器腫瘍は他の免疫低下因子と比較しても、アスペルギルス属の胞子は、後述する

表3 侵襲性アスペルギルス症と基礎疾患

Patient group	Number of patients	Invasive aspergillosis risk estimates	Expected number	
			invasive aspergillosis	aspergillosis
AlloBMTx	793	10%	79	
Solid organ Tx	2,953	1.90%	56	
Leukaemia	16,269	6%	976	
Solid tumour	28,955	2%	579	
Advanced cancer	131,678	1.50%	1,975	
ICU	210,130	0.20%	420	
Burns	378	1.90%	7	
Renal dialysis	24,536	0.02%	5	
HIV/AIDS	661	4%	26	

侵襲性アスペルギルス症と基礎疾患の関係を示す。

(文庫2より)

防護環境内でさえ有意に疾患を惹起するとされている。1 cfu/m³を超えて存在するとの報告も多い。特別な対策をとらない場合には、屋内、屋外を問わず多くの胞子が存在し、1日当たり、少なくとも数百の胞子を吸入することになる。但し、現在までの報告からは、湿気の高い環境や粉塵の量が増加するなど、吸入するアスペルギルスの胞子が増大するほど、疾患のリスクが高まること示されており、表3に示したようなリスク因子を有する場合には、胞子に対して特別な対策が講じられるべきである。

造血幹細胞移植後の急性GVHD(移植片対宿主病)のリスクがある場合や、遅延する好中球減少を認める時期には、できる限り防護環境から出ることを避けるべきである。また、工事現場周囲のような粉塵が多く認められる環境には、近づくべきではない。検査など外へ出ることが必要な場合には、N95規格以上のマスクを装着すべきである。但し、N95マスクを正しく着用することが条件であり、使用に当たってはフィットテストなどを行って、もつとも適したマスクを選定し、正しく装着する方法を患者に教育しなければならない。これらは急性期に限らず、曝露量が多いと考えられる場合には、少なくとも移植後6カ月は考慮すべき対策である。

IV 同種造血幹細胞移植患者に対する防護環境

1. 防護環境へ入室する対象

同種造血幹細胞移植患者で、好中球減少が遅延する、急性のGVHDのリスクがある時期には、特にアスペルギルス症に対する予防のため、以下に記載するような防護環境下に入院させることが必要である。造血幹細胞移植であっても、GVHDのリスクがない自家移植などの場合には、防護環境へ入室させることが有効であることを示すデータはない。また、「ミニ移植」などの治療にともなう免疫低下への対応も定まっていない。

防護環境への入室に際しては、それぞれの病院のアスペルギルス症の発生頻度、工事などによる粉塵の飛散状況と患者の免疫状態を勘案し、アスペルギルス症に対するリスクが高い場合には入室を考慮する。

2. 適切な防護環境³⁾

図1に陽圧防護環境の例を示している。防護環境の工学的な管理としては、図1に示した設備とともに、気圧計や視覚的な監視(スモークチューブなど)を用いて、毎日、空気を監視して記録すること、緊急時の予備換気装置を備えること、可能であれば、前室を設けることなどが求められている。

3. 防護環境の管理

工学的な構造が適切であっても、感染を制御するには不十分であり、日常的な管理と適切な感染予防策の実施が望まれる。これらには、消菌や備品の管理が含まれる。

清掃に際しては、基本は湿式清掃である。用いる消毒/洗剤は、EPA(米国環境保護局)承認と同等の基準を満たした医療用のものが必要である。但し、水平表面は毎日清掃を行う必要があるが、壁などの垂直な環境表面は、明らかな汚染がある時に清掃を行うほかには報告はない。また、エアコンディショナー、火災報知機などの埃が蓄積しやすい場所については、定期的な清掃を行う必要がある。一般に、集塵に際しては、塵埃を散らすような方法は用いず、掃除機による清掃が必須な場合には、排気部にHEPA (high efficiency particulate air) フィルターを有するものを用いる。

室内の物品については、カーペットを敷くことは、真菌感染症の頻度を増加させることが知られており、用いてはならない。そのほか、布張りの家具など汚染を除去しにくい物品は使用しない。また、ドライラワーを含めて植物類は、細菌・真菌による感染を増加させることが知られており、持ち込んでほならないことを、患者にも周知させ

EPA (米国環境保護局)

GVHD (移植片対宿主病)

HEPA (high efficiency particulate air)

特集 ● 造血器腫瘍の治療における感染症対策

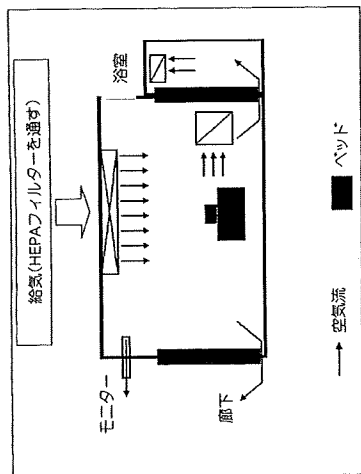


図1 空気感染を防御するための陽圧防護環境の例

- ・圧格差 2.5 - 8Pa (できれば8Pa)。
- ・部屋を密閉し、リークを少なくする。
- ・換気が12回/時間以上とする。

※ HEPA : high efficiency particulate air (文献3より改変)

表4 HACCPの7原則

1	危害要因分析
2	CCP (重要管理点) の決定
3	許容限界の決定
4	モニタリング
5	改善の取り組み
6	検証
7	記録

※ HACCP : Hazard Analysis and Critical Control Point (筆者作成)

V 食事の管理

飲水や食事は、一般細菌、ウイルス、真菌、原虫など微生物の侵入門戸として重要な因子である。一般に、非加熱の食品や十分に管理されたことが保障されない水には、感染のリスクがともなうため、患者指導にも注意を払わなければならない。病室などの医療関連施設での管理方法は、必ずしも免疫低下宿主に特化した対策ではなく、微生物による汚染を避けるべく実施されるものでなく、はならない。造血器腫瘍の患者に対する食事も同様に、以下に示すような管理方法が徹底されていることが、以下に示すような管理方法が徹底されている。難な生の野菜や果物を、免疫抑制剤を使用している期間など、リスクが高いと考えられる時期は取り除くことが追加されるのみである。

1. HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point)

わが国では、食品安全基本法、食品衛生法、総合衛生管理製造過程承認制度、食品の製造過程の管理の高度化に関する臨時措置法(HACCP [Hazard Analysis and Critical Control Point] 手法支援法)などによって、HACCP法を用いた衛生管理が求められるとともに、推奨されている。

HACCPとは、食品の安全を確保するための系

HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point)

はならない。肉などの加熱に際しては、内部温度が66℃以上でなければならぬ。これらの警告に対して、適切な調理がなされているが管理することが重要である。

2. 食品取り扱い時の感染対策

食中毒の発生原因としては、食品そのものの汚染、食品を取り扱う場合に、手指の汚染を認める、加熱前の食品の汚染が、まな板等の器具を汚染し、他の食材へ汚染が拡大することなどが原因となる。

造血器腫瘍の患者では、日和見感染の原因となるような病原微生物であつてもリスクがあり、対策の徹底が望まれる。食品そのものの汚染については、HACCPの中で管理を徹底する。手指や器具を介した感染拡大においても、危害要因として管理することも可能である。しかし、危害要因として認識されない場合には、感染させる原因となりやすいので注意が必要である。

手指を介した感染には、標準予防策を実施する必要がある、徹底が望まれる。また、器具を介した感染では、食品ごとに取り扱う場所を分けるか、あるいは、ひとつの食材を使用後は、適切な消毒を実施することが必要である。

3. 食べ残しの保存について

食べ残しを保存する場合には、取り扱う前後に適切な手指衛生が必要である。保存が必要な場合には、できるだけ早期に冷蔵し、2時間以上、室温で保存したものは廃棄すべきである。保存して



わが病院の感染対策

東京通信病院院長 木村 哲 編

B 5 判 304 頁 定価 4,515 円 (本体 4,300 円 + 税 5 %) 送料実費 ISBN4-7532-2229-2 C3047

株式会社 医薬ジャーナル社 <http://www.iyaku-j.com/> 編集・雑誌パツナンバー検索・ご注文などはインターネットホームページから便利です。
〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・TEL: 06-6202-5295 (編集部) 06-6202-5295 (編集部) FAX: 06-6202-5295 (編集部) 06-6202-5295 (編集部) 〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TEL: 03-3263-8369 (編集部) 03-3263-8369 (編集部) FAX: 03-3263-8369 (編集部) 03-3263-8369 (編集部)

特集/上手な抗真菌薬の使い方

抗真菌薬の使い方

栗原慎太郎 安岡彰

はじめに

真菌症は、皮膚から深部臓器まで感染部位が多岐にわたり、中でも深部臓器の感染は、免疫低下宿主に発生することが多く、予後が悪い。これら深在性真菌症の予後を改善すべく、各国でガイドラインが出されており、日本でも2007年すでに改訂されている¹⁾。真菌症は一般細菌による感染症と比較しても地域特異性が高く、国や地域の風土に合った診療が重要であり、各国のガイドラインが尊重される。

抗真菌薬の使用において留意すべき点とは、①真菌感染症のハイリスク群、②診断、③原因真菌の同定あるいは推定、④適切な用量設計などが主な点である。原則として、宿主の免疫状態の回復を図ることが第一であることは言うまでもない。

抗真菌薬を上手に使うということは、真菌感染症に使用すること、推定される原因真菌をできるだけ絞り込むことに他ならない。しかし真菌感染症、特に深在性真菌症に罹患する患者群は多くの

リスク因子を抱えており、診断に至る検査を実施できないことも多い。この場合には臨床情報やリスク因子そのものから推定し、必要な症例にできるだけ早く十分な量の抗真菌薬を使用する必要がある。

I. ホスト因子とリスク因子

深在性真菌症の診断に際しては、患者背景に注意することが重要である。わが国の場合、クリプトコックス症を除いては、基礎疾患を認める場合がほとんどである。しかし患者背景には、患者がもともと持っているホスト因子とこれに加えて各種疾患の進展や治療などの過程に伴って付随するリスク因子が存在する。ホスト因子とリスク因子が相加的に作用して深在性真菌症を発症することが多く、また同時に治療が遅れることにより予後不良な集団となる。

表1, 2にホスト因子とリスク因子を示す²⁾。

表 1 深在性真菌症のホスト因子

ホ ス ト 因 子
10日を越えて継続する500/mm ² 未満の好中球減少
同種幹細胞移植
ステロイドをプレドニゾン換算で、0.3mg/kg/day以上を3週間以上使用
過去90日以内の細胞性免疫抑制薬の投与
先天性の重度免疫不全
高齢(70~75歳以上)
白血病
悪性腫瘍
糖尿病

表 2 深在性真菌症のリスク因子

リ ス ク 因 子
JCS 3桁以上
熱傷 バーンインデックス15以上
多発外傷 Injury Severity Score (ISS) 10以上
APACHE II 10以上
心血管術後
腸管粘膜損傷
長期の人工呼吸管理
長期のICU滞在
非生体デバイスの挿入
臓器移植
敗血症
低栄養
抗菌薬の多種あるいは長期投与

長崎大学病院感染制御教育センター

表 3 深在性真菌症血清診断一覧

測定対象	β-D-グルカン			カンジダマンナン		グルクロノキシロマンナン		ガラクトマンナン
	MK法	ワコー法	マルハ法	ユニメディ® カンジダ	プラテリア カンジダ Ag	セロダイレク ト® 栄研クリ プトコックス	パステレック ス® クリプト プラス	プラテリアア スペルギルス
測定原理	カイネティック 比色法	カイネティック 比濁法	エンドポイント 比色法	ELISA	ELISA	ラテックス 凝集法	ラテックス 凝集法	ELISA
カットオフ値	20pg/mL	11pg/mL	11pg/mL	0.05ng/mL	0.5ng/mL	凝集	凝集	カットオフ インデックス 0.5
感度	◎	△	△	○	△	◎	◎	○
特異度	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	○

深在性真菌症の診断・治療に際しては、常にこれらの因子を念頭に置き、早期より適切な検査を実施し、診断に努めるほか、疑われる場合には早期より治療を開始することを考慮すべきである。

Ⅱ. 深在性真菌症の診断と補助診断法

深在性真菌症の診断には原因真菌の病変局所からの真菌学的、病理組織学的証明が必要であり、原因真菌の同定は治療方針の決定に非常に重要であり、培養がゴールドスタンダードであることには違いはない。日常診療において、薬剤感受性は現在のところ培養によってのみ測定可能であり、分離頻度が比較的低い真菌の感染症では培養検査によってのみ診断が可能である。しかし陽性率は決して高くなく、培養検査は数日から菌種によっては数週間かかる。一般に宿主の状態から侵襲的な検査が施行困難であることが多く、一方で治療開始の遅れは予後に大きく影響することから、患者背景を考慮し、臨床徴候と補助診断法の活用により診断と治療の判断を迫られることが多い。ただしどのような場合でも原因菌を少なくとも推定するよう試みることが重要である。

以下に示す診断法は、補助診断法として用いられるものである。これらはゴールドスタンダードとしての培養検査が実施できないかあるいは検出率が低い点を補完する目的で使用するが、臨床背景から真菌症を疑って、積極的に検査を実施しなければ代替となる診断プロセスが限られていることも深在性真菌症の特徴である。

1. 画像診断

深在性真菌症の一部では画像診断が有用である。

特にアスペルギルス症は特徴的な画像所見を呈することがある。肺アスペルギローマでは壁の厚い空洞や嚢胞の内部に円形の腫瘍状陰影として菌球 (fungus ball) を認め、菌球と空洞の間に見られる三日月状の空間は meniscus sign などと呼ばれ特徴的である。ただし、アスペルギローマ形成過程では必ずしも特徴的な所見を呈するわけではない。

侵襲性アスペルギルス症は胸部 X 線にて肺梗塞様の楔状陰影や、後に空洞性病変を認める。これらの画像所見は数時間から数日の経過で増悪する。胸部 CT では発症早期に肺動脈末梢に位置する多発性小結節影やいわゆる halo sign と呼ばれる周囲に淡い濃度上昇域 (GGO) を伴う結節影が認められる。ただしこれら典型的な所見は全例に認められるわけではない。

クリプトコックス症の画像所見は特異的な所見はないが、単発あるいは多発性の結節影を示し、空洞を有することも多い。ただし免疫不全の患者では浸潤影を呈することが多いことに注意する必要がある。

2. 血清診断の種類と特徴

臨床的に多く用いられる血清診断を表 3 に示す。

1) β-D グルカン

β-D グルカンは接合菌を除くすべての真菌の構成成分である。そのため、深在性真菌症のスクリーニングとなりうる。ただし、その高次構造や分子量により陽性とならないこともあり、多くはカンジダ属、アスペルギルス属、および *Pneumocystis jirovecii* における感染症で有用と考えられている。クリプトコックス感染症やトリスコスポロン感染症では陽性になりにくい。

透析膜や人工心肺使用後、腹部術後、アルブミ

表 4 カンジダの菌種ごとの薬剤感受性

	フルコナゾール	イトラコナゾール	ボリコナゾール	フルシトシン	アンホテリシンB	キャンディン系
<i>Candida albicans</i>	S	S	S	S	S	S
<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S
<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S to R
<i>Candida glabrata</i>	S-DD to R	S-DD to R	S-DD to R	S	S to I	S
<i>Candida krusei</i>	S	S-DD to R	S	I to R	S to I	S
<i>Candida lusitanae</i>	S	S	S	S	S to R	S

S: 感受性 I: 中等度耐性 R: 耐性 S-DD: 用量依存的感受性

文献4より一部改変

ンやγグロブリンなどの血液分画製剤使用後などで疑陽性になることがある。

2) マンナン抗原

マンナンはカンジダの細胞壁構成成分であり、現在2つの測定方法が用いられている。いずれも特異度は高いものの、感度は必ずしも高いわけではない。*Candida krusei* に対する反応が低いなど、菌種ごとに反応性が異なることに注意する。

3) グルクロノキシロマンナン抗原

クリプトコックス莢膜多糖体抗原であるグルクロノキシロマンナンをラテックス凝集法により検出する。感度、特異度ともに優れた検査であり、無症状で胸部異常陰影を示すときにも陽性となるため、スクリーニング検査としても有用である。一般に肺クリプトコックス症では結節が2cmを超える場合に陽性となることが多い。ただし、肺クリプトコックス症では持続的に高値となることがあり、治療判定には用いることができない。また、本法はトリコスポロン属と交差反応を示すため、トリコスポロン感染症でも陽性となることがある。

4) ガラクトマンナン抗原

ガラクトマンナンはアスペルギルス細胞壁の主要構成成分である多糖類である。この抗原は画像所見などの臨床的な所見の出現前に陽性となり、早期診断に有用である。

抗ガラクトマンナン抗体のペニシリウム属との交差反応性があり、ペニシリウム属感染症や半合成ペニシリンの使用が疑陽性の原因のひとつである³⁾。

3. 遺伝子診断法

本邦で施行されている遺伝子診断は病原遺伝子診断(東洋紡ジーンアナリシス)とGeniQカンジダ[®]、GeniQアスペルギルス[®]およびニューモ

シスチス遺伝子診断がある。遺伝子診断は真菌症診療において最も重要な菌種レベルの同定が可能であり、また薬剤耐性遺伝子を直接検出することなども研究されるなど有望な領域である。ただし現在のところ感度が他の検査法に劣るほか、日常の臨床現場では実用性に欠けることが問題として挙げられている。

- 1) 病原遺伝子診断は広範囲の原因真菌をNested PCR法により同定可能である。接合菌ほか一部の真菌以外は検出できる。
- 2) GeniQ-カンジダ[®]はフルコナゾール低感受性のグループとそのほかのカンジダ属を鑑別できる。GeniQ-アスペルギルス[®]はアスペルギルス属を特異的に検出する。いずれもリアルタイムPCR法であるために定量的であり、そのため治療効果の評価などに期待できる。
- 3) ニューモシスチス遺伝子診断は、実質的に培養ができない*Pneumocystis jirovecii*を検出でき、確定診断としての価値がある。定量および通常のPCR法が提供されている。

Ⅲ. わが国において临床上重要な深在性真菌症

真菌症はその原因真菌の違いによって有効な治療法が異なるため、できる限り原因真菌を推定して、早期に治療を開始することが求められている。以下にわが国の主要な深在性真菌症について概説しながら、原因真菌の推定が重要であることをみていきたい。

1. カンジダ症

カンジダ属は、ヒトの口腔内、消化管、膣、皮膚に常在しており、深在性真菌症の原因として最も多い。

原因となるカンジダ属は複数あるが、一般に最も病原性が高く、分離頻度の高い *Candida albicans* (*C. albicans*) とそれ以外の non-*albicans candida* (NAC) とに分けて治療を検討することが多い。NAC はカンジダ感染症に用いられるアゾール系薬剤に低感受性であることが示されているからである。表4⁴⁾にカンジダの菌種ごとの抗真菌薬感受性を示す。カンジダの菌種レベルでの同定が重要であることがわかる。

2. アスペルギルス症

アスペルギルス属の胞子は空気中に長時間浮遊しており、病院においても室内空気から頻りに検出される。侵入門戸は気道であり、感染部位は副鼻腔および下気道が多い。

病型には、病態の変化に乏しい慢性のアスペルギローマから、週から月単位で増悪する慢性壊死性アスペルギルス症、時間、日単位で増悪する侵襲性アスペルギルス症まで存在する。急性であるほど予後が悪い。

アスペルギルス属に有効な薬剤としては、ポリエン系、キャンディン系とアゾール系の一部（ポリコナゾールやイトラコナゾール）などがある。菌種では *Aspergillus fumigatus* が最も多く分離されるが、*A. terreus* のようにポリエン系への耐性株が多い菌種があり注意を要する。

3. クリプトコックス症

Cryptococcus neoformans が主たる病原体である。自然界に広く分布しており、鳥類の糞、特にハトの糞や土壌から検出され、これらが乾燥して空気中に浮遊したものを吸入することによりヒトに伝播する。日本では健康人に感染しうるものとして最も重要である。エイズ患者などの免疫不全患者においては重症化しやすく難治性となり、また診断においては非典型的な症例があることに注意を要する。

有効な薬剤としては、ポリエン系、アゾール系、フッ化ピリミジンがあるが、近年使用量が増えているキャンディン系が無効であることに注意を要する。クリプトコックス症は侵入門戸である肺に感染するが、特徴として脳髄膜炎を合併しやすいことがあり、ほとんど神経症状を認めない段階であっても合併していることが少なくない。脳髄膜炎の合併例は肺に限局した症例とは治療法がことなるため、髄液穿刺による確認が必須である。

4. 接合菌症

Rhizopus 属、*Absidia* 属、*Rhizomucor* 属、*Mu-*

cor 属などのムーコル目の糸状菌も自然界に広く分布し、平素無害であるが、好中球減少症患者などでは、鼻腔や肺などに感染することがある。血管親和性が高いことが特徴である。

現在わが国で使用されている薬剤ではポリエン系のみが使用可能である。

IV. 抗真菌薬の特徴

原因真菌に有効な薬剤はポリエン系を除いて、比較的定まっていることが抗真菌薬の特徴である。以下に主として用いられる薬剤について示す。ただしニューモシスチス症に使用される ST 合剤などは抗真菌薬には分類されないためここでは示していない。

1. ポリエン系

アムホテリシン B (AMPH-B) は真菌の細胞膜のエルゴステロールと結合して、膜の透過性を変えて、殺真菌的な作用を示す。接合菌を含むほぼすべての真菌に対して有効である。ただし、副作用発現頻度が高く、時に重篤であることから連用に対する認容性が低い。現在では副作用軽減を図る目的でリポゾーム化した製剤：アムホテリシン B リポゾーム化製剤 (L-AMB) が使用可能である。

2. アゾール系

アゾール系抗真菌薬は、真菌の細胞膜の主成分であるエルゴステロールの合成を阻害することによって作用を発揮する。アゾール系の特徴は、安全性が高く連用に対する認容性が高いことである。ただし、アゾール系の使用に際しては、他の薬剤との相互作用に注意を要する。ポリエン系抗真菌薬との併用では、ポリエン系が結合するエルゴステロールの合成が阻害されるため、拮抗的に作用することもある。

イトラコナゾールは、アスペルギルス属にも効果を示す。内服薬と吸収のよい内用液と注射剤の剤形を有する。

フルコナゾールはアスペルギルス属には無効である。プロドラッグであるホスフルコナゾールの使用が可能であり、高用量の投与が可能となっている。

ポリコナゾールは侵襲性アスペルギルス症にも有効であり、接合菌を除く多くの菌種に有効である。また他のアゾール系薬剤に耐性の菌であっても有効である。特徴的な副作用として、使用開始直後に幻視などが現れるが一過性に終わる。

表 5 抗真菌薬のPK/PDパラメーター

	ポリエン系	アゾール系	カンディン系	ピリミジン系
PK/PDパラメーター	Peak/MIC	AUC/MIC	Peak/MIC	T>MIC

文献5より改変

MIC : minimal inhibitory concentration

AUC : area under the curve 血中薬物濃度時間曲線下面積

T : Time

3. キャンディン系

キャンディン系薬剤は真菌細胞壁のβ-Dグルカンの合成を阻害することにより作用する。キャンディン系の特徴は副作用が少なく認容性に優れ、他の抗真菌薬と作用機序が異なるため、併用によって相加・相乗効果が得られる点にある。重症例においてポリエン系、アゾール系それぞれと併用が可能である。

カンジダ症、アスペルギルス症といった頻度の高い真菌に効果が高いが、この2種を除いて効果がなく、抗真菌スペクトラムが狭いことが難点である。

4. フッ化ピリミジン

フルシトシンは人の細胞にはないシトシン・デアミナーゼという酵素によって、初めて5FUに変換され、細胞分裂を抑制する効果を発揮するため、副作用が少ないことが特徴である。一般に酵母真菌に対する治療として用いられるが、単独での使用では容易に耐性化を引き起こすため、単独での使用はするべきではない。脳脊髄液中への移行が良いため、クリプトコックス脳髄膜炎発症時に、ポリエン系などと併用で用いられることが多い。

V. 抗真菌薬の用量設計

適切な診断あるいは原因真菌の推定や患者背景に基づいて治療薬剤を選択するが、用量設計も重要な因子である。抗真菌薬の投与に当たっては十分な量の投与が必要であり、さらに急性の病態を示す場合には、早期より十分な効果を期待できるように投与しなければならない。

表5に一般的な抗真菌薬のPK/PDパラメーターを示している⁵⁾。真菌症治療に際しては、推定される原因真菌に抗真菌活性を有する薬剤を選択した後、表中のパラメーターの分子が大きくなるように投与しなければならない。

アゾール系薬剤は、AUC(area under the curve)が大きくなるように設計する必要がある。投与開始後定常状態に至るまでに一定期間かかることか

ら、初回投与量を通常投与量の倍量投与することによって、より早期に定常状態とし、AUCを大きくするloading dozeという投与法が一般的に用いられる。

ポリエン系薬剤は、副作用を軽減する目的で24時間持続点滴を行うことがあるが、分子はPeakであり、むしろ短時間で投与することが望ましい。しかし副作用の増加も認められることからリポゾーム化製剤を使用するなどして、2～3時間で投与することが必要である。

キャンディン系は投与による副作用は少なく、一度に薬剤の投与が可能であり、PK/PDパラメーターに従った投与が容易である。

ピリミジンはTime above MICがパラメーターであり、血中濃度がMICを越えている時間が重要である。そのため1日の投与回数を多くすることが必要となる。

VI. 真菌症の薬剤感受性の変化

抗真菌薬に対する耐性は使用に従い獲得する場合と、元来耐性の菌種が存在する場合がある。薬剤低感受性は現在カンジダ属による感染で多く報告され、元来低感受性の菌種の分離頻度増加が指摘されている。カンジダ属は先に記したように*C. albicans*とアゾール系に低感受性を示すことの多いNACがあるが、カンジダ血症における原因としてNACの割合が増加しており、アゾール系による治療には注意を要する。

カンジダ属の真菌には、薬剤ごとに低感受性を示すものが報告されており、表4に示している。原因真菌が同定された場合には、一考の余地があるが、フルシトシンやフルコナゾールを除いて、高度耐性の頻度は必ずしも高くなく、抗真菌薬の使用に際しては、臨床経過を尊重するべきである。

お わ り に

真菌に対する化学療法は、わが国において、ここ数年でやっとう海外のレパートリーに追いついて