

Surveillance of Infection Control Measures among All Hospitals Collecting Infection Prevention Medical Fees in Gifu Prefecture

Tamayo WATANABE¹⁾, Takashi NIWA^{1,2)}, Mayumi TSUCHIYA¹⁾, Yuki TONOGAI^{1,2)},
Hiroto OHTA^{1,3)} and Nobuo MURAKAMI¹⁾

¹⁾*Center for Nutrition Support and Infection Control*, ²⁾*Department of Pharmacy*,
³⁾*Department of Laboratory Medicine, Gifu University Hospital*

Abstract

Prevention of hospital infections requires efforts at individual centers and at the regional level. An observational prospective study was performed using an electronic questionnaire sent to the infection control team (ICT) representative of 54 hospitals in Gifu Prefecture, Japan. Each hospital provided data regarding the number of beds, number of patient-days, frequencies of ICT meetings and rounds per month, number of cases of drug-resistant organisms detected, number of blood cultures and the results, amount of alcohol-based hand rub (ABHR) consumption, and antimicrobial usage. To evaluate the effect of the surveillance, the data during the period April 2012–February 2014 was analyzed. The frequencies of ICT meetings increased from 2.0 in April 2012 to 2.9 in February 2014, and rounds per month increased from 2.5 in April 2012 to 3.3 in February 2014. The detection rates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), extended spectrum beta lactamase (ESBL)-producing organisms, and *Clostridium difficile* (CD) toxin did not decrease. The average amount of ABHR consumption significantly increased. However, the number of blood cultures and the antimicrobial use density remained stable. Apparently this study activated ICT activities and increased ABHR consumption. Although the detection rates of MRSA, ESBL-producing organisms, and CD toxin were not decreased, further research is needed to determine whether increasing consumption of ABHR and antimicrobial stewardship reduces the prevalence of MRSA and ESBL-producing organisms.

Key words : surveillance, infection control and prevention, infection control team, alcohol-based hand rub, antimicrobial agent

地域で取り組むサーベイランス事業

Regional surveillance for infection prevention and control

やぎ てつや
八木 哲也¹⁾

〔臨床検査 59 : 809-814, 2015〕

Point

- 地域で連携して行う感染症サーベイランスには、さまざまな方法や組み合わせがあり、その目的によって選択が必要である。
- 地域連携サーベイランスの意義は、お互いの顔が見える施設間でサーベイランスデータの情報を共有することによって、自施設のベンチマーキングや感染対策の質向上に役立つことである。
- カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)の感染制御のためにも、今後、地域連携サーベイランスの重要性は増していくであろう。

Keywords

感染防止対策加算, 耐性菌サーベイランス, 血液培養サーベイランス, カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)感染制御

はじめに

地域の医療機関が連携して行う感染症サーベイランスには、さまざまな形がある。2012年の診療報酬改定で導入された感染防止対策加算 I-1, I-2 施設間連携はもちろん、そうした連携を超えて行われるサーベイランスもあると思われる。

本稿では、愛知県で実施されている感染症サーベイランスの取り組みについて紹介し、地域でのサーベイランスの意義と検査室とのかかわりについて考察する。

地域での感染症サーベイランスの意義

地域で連携して感染症を制御するために行うサーベイランスの目的には、①現状を把握して問題点を見いだすこと、②感染対策が十分に実践されているかをモニターすること、③介入の効果を

評価すること、④他の施設の成績と比較して自分の施設をベンチマークすること、などが挙げられる。

血液培養検査のサーベイランス(検出件数, 陽

1) 名古屋大学大学院医学系研究科臨床感染制御学分野 〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65

性率、複数セット率など)、アルコール性手指消毒薬使用量サーベイランス、抗菌薬使用量調査などは、感染対策のプロセスをモニターする意味合いがあり、耐性菌検出サーベイランス、院内感染症発生率サーベイランス〔例えば、中心静脈カテーテル関連血流感染症(central line associated bloodstream infection: CLABSI)サーベイランス〕などは、感染対策の現状や介入効果をモニターする意味合いがあると思われる。

厚生労働省が主催する院内感染対策サーベイランス事業(Japan Nosocomial Infections Surveillance: JANIS)などの全国規模のサーベイランスもあり、各施設に還元される有用な情報もあるが、地域で行うサーベイランスの場合には、お互いが顔のみえる立場で比較検討ができるというメ

リットがある。また、状況の変化に合わせてサーベイランス項目を容易に変更・選択できる。実際、どのようなサーベイランスをどのように組み合わせるかは、地域や参加する施設内の感染制御の体制や、地域における施設の役割により異なるであろう^{1,2)}。例えば、感染防止対策加算 1-1 施設間の連携では、上記に例を出したサーベイランスの集計結果を年 1 回共有して、自施設の立ち位置を確かめ、実践的なディスカッションを行って、改善へのモチベーションとすることができる。感染防止対策加算 1-2 施設間での連携では、こうしたサーベイランスの手法そのものやその活用方法の指導も、連携の目的となると考えられる。

名古屋大学医学部附属病院が行っている感染症サーベイランスの取り組み

名古屋大学医学部附属病院(以下、当院)が、愛知県内で地域連携として行っている感染症サーベイランスの取り組みを以下に紹介する。

院内感染対策ネットワーク

これは、愛知県が国からの補助を受けて行っている、院内感染対策についての相談事業である。委員の構成は愛知県の 4 大学病院と 2 中核病院の医師・看護師・薬剤師・検査技師の計 12 名からなっており、年間約 10 件の相談事業のほかにもアウトブレイク事例への改善支援調査も過去 4 件実施している。

2012 年度からは 6 施設間で情報共有として、各施設での病院の基本情報(年間新入院患者数など)、血液培養検査の情報(複数セット率など)、院内感染対策上重要な薬剤耐性菌〔メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)や(基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(extended-spectrum β -lactamases: ESBLs)産生菌など)の検出状況、届け出が必要な感染症の発生数、抗菌薬使用量の調査を行っている(調査内容は、後記の愛知県地域感染制御ネットワーク研究会と同じ内容で調査を行っている)。

MRSA の検出状況の変化を例にとると、外来では MRSA 検出率が横ばいか、またはやや上昇傾向である。一方、入院では、2013 年までは次

第に減少傾向であったが、2014 年では 2 施設が増加に転じている(図 1)。

愛知県地域感染制御ネットワーク研究会

愛知県地域感染制御ネットワーク研究会(Aichi Regional Infection Control Outreach Network: ARICON)は、2009~2010 年の新型インフルエンザの流行時に立ち上げられた、名古屋市外の病院ネットワークを基礎とした、各種サーベイランス活動を主体とした研究会である。当初は 15 施設の参加であったが、現在は名古屋市外も含め、参加施設は 24 施設に増加している。

サーベイランス項目は当初は、MRSA、バンコマイシン耐性腸球菌(vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.: VRE)、アシネトバクター属、緑膿菌などの耐性菌だけであったが、2011 年からは抗菌薬使用量調査が、2012 年には血液培養検査のサーベイランスが、前記の菌種だけでなく包括的な耐性菌サーベイランスへ拡大し、さらに 2013 年からは CLABSI サーベイランスの情報共有を行っている。

2014 年には、通年でのアルコール性手指消毒薬使用量も情報共有し、手指衛生遵守率の向上に向けての取り組みを開始した。図 2 に、参加施設の血液培養検査の実施状況を示す。血液培養検査実施数がまだ少ない施設は多いが、複数セット採

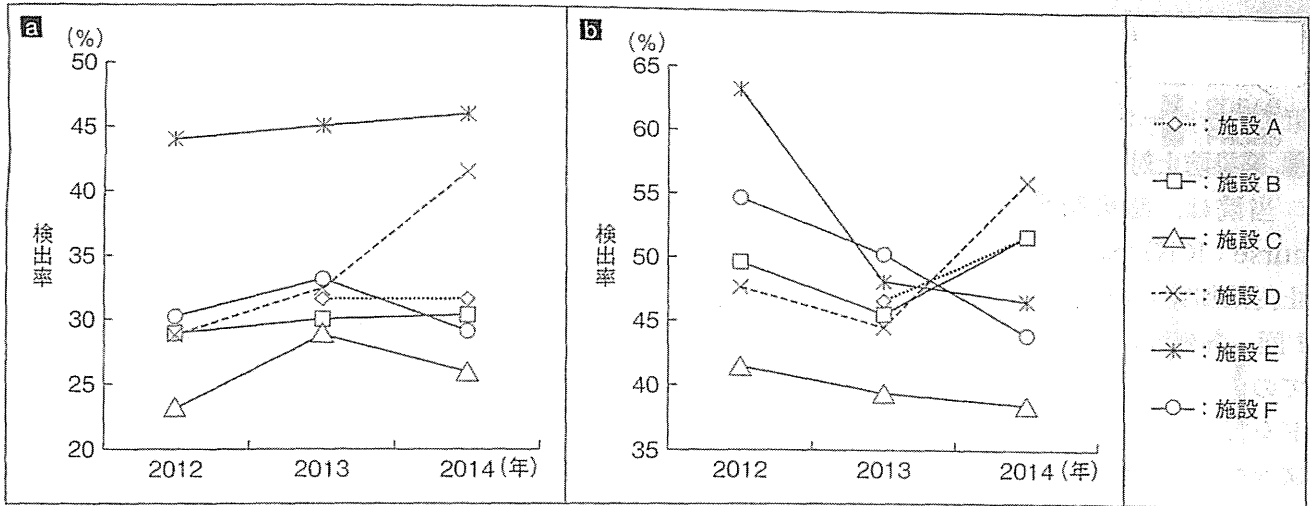


図1 愛知院内感染ネットワーク参加6施設のMRSA検出状況

a: 外来でのMRSA検出率。外来では各施設で検出が横ばいか、または、増加傾向にあることがわかる。
 b: 入院でのMRSA検出率。入院での検出は3施設で減少傾向、3施設が増加していることがわかる。
 MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

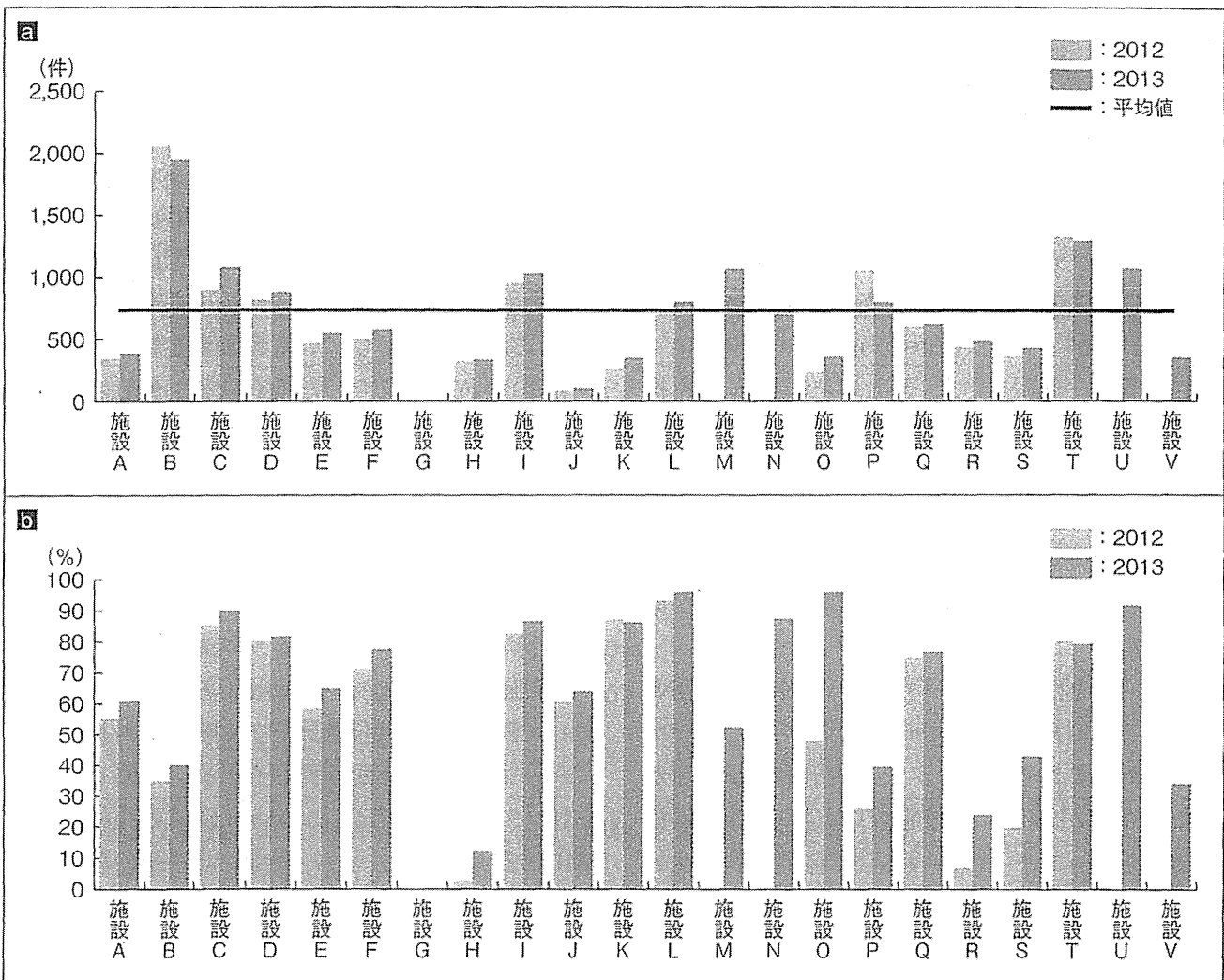


図2 ARICON参加施設での血液培養検査の状況

ARICONに参加している22施設での血液培養検査の状況を示す。
 a: 100ベッド当たりの血液培養検出件数。22施設中9施設が平均である約700件/100ベッドを超えている。
 b: 血液培養複数セット採取率。各施設とも複数セット採取率は増加傾向であり、8施設が80%を超えていた。
 ARICON: Aichi Regional Infection Control Outreach Network.

取率は増加傾向にあることがわかる。こうしたサーベイランス活動によって、各施設での感染対策のモチベーションが上がるのが期待される。

■ 感染防止対策加算 1-2 連携でのサーベイランス

当院は、感染制御看護師 (infection control nurse : ICN) がいるが専従化できていない感染防止対策加算 2 の 2 施設と連携を組んで、3 カ月に 1 回、各施設のサーベイランスデータをもち寄ってのディスカッションと、年に 1 回の現場ラウンドを行っている。感染防止対策加算 1-2 施設の地域連携では、感染防止対策加算 2 の病院への感染

対策の指導にも踏み込む必要があるため、例えば、サーベイランス項目も細かく月ごとに、MRSA などの主な耐性菌とアルコール性手指消毒薬使用量は病棟ごとに集計して動向を把握することが望まれる³⁾。

■ 愛知県アンチバイオグラム研究会

各施設での感染症患者から分離される菌を収集し、感受性および耐性機序を解析し、地域でのアンチバイオグラムを作成しようという研究会である。これまでに緑膿菌⁴⁾やインフルエンザ菌などを対象に研究を行っている。

地域連携サーベイランスの意義と検査室とのかかわり

細菌検査室では、日々蓄積した培養同定・薬剤感受性検査データを、施設横断的切り口でみることによって、病院内での検出菌の集積や分布を観察することができ、それがアウトブレイクの早期発見にもつながる。また、耐性菌の検出という結果(アウトカム)のサーベイランスだけでなく、図 2 に示すような、血液培養検査の検出数や複数セット率をモニターすることで、感染対策や診療の重要なプロセスの評価も可能であり、細菌検査技師は感染制御チーム(infection control team : ICT)活動の一環として、ともにその質向上を推進することができる立場にある。

各施設での耐性菌や検査のサーベイランス結果を持ち寄って情報共有し、自施設のベンチマークを行って感染対策につなげることは有意義であると考えられ、細菌検査技師には積極的な参画が期待される。

筆者らの地域連携サーベイランス(ARICON)における情報共有がきっかけとなり、ある施設での 2 剤耐性アシネトバクターの検出集積が明らかになった例がある。当該施設の ICT でさらに疫学調査を行って、その原因として特定の病室への入室の関与が示唆されたため、その病室の環境整備を徹底したところその検出が減少した(図 3)。

このとき、ICT メンバーの一員として細菌検査技師が積極的にかかわっており、対策を進めるうえで ARICON のサーベイランスのデータが活用されたと聞いている。地域でのサーベイランスデータの共有の有効性を示す 1 例である。

一方で、図 4 に示すように、バンコマイシン(vancomycin : VCM)-最小発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration : MIC) ≥ 2 を示す黄色ブドウ球菌の検出率には大きな施設間差がある。これは、使用している自動測定機器の差によるものであり、そうした検査機器の特性も理解して結果を解釈し、フィードバックに反映させる必要がある。この差は同じグリコペプチド系薬剤であるテイコプラニン(teicoplanin : TEIC)ではみられないことにも注意が必要である。

こうした感染制御の地域連携の海外での報告例はそう多くはないが、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* : CRE)のまん延によって、欧米でも地域連携の下、菌株解析・臨床情報を共有してその制御を試みている^{5,6)}。CRE については、その検出では MIC だけでなく、カルバペネマーゼの産生を注意深く検出する必要があるが、地域での情報共有も非常に重要になってくると考えられる。

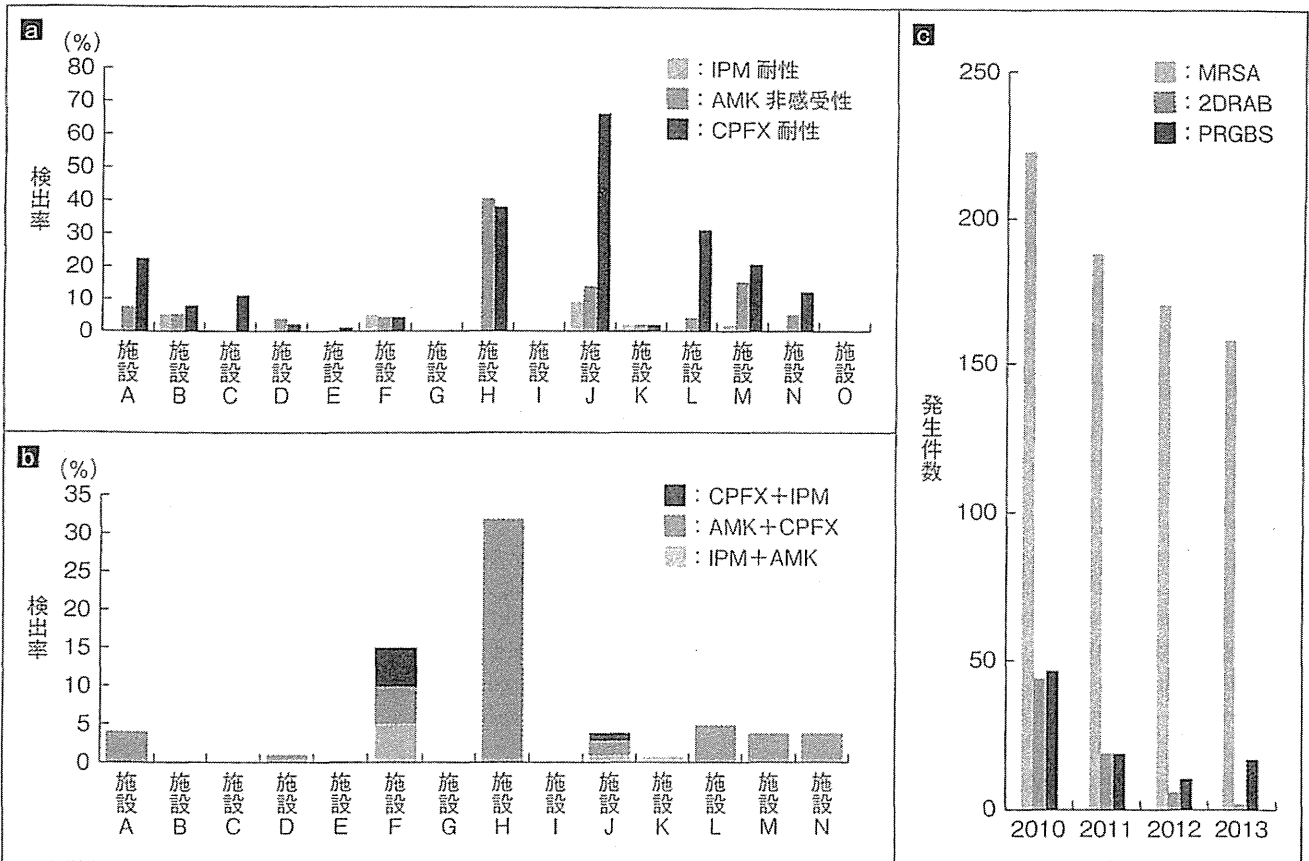


図3 2010年のARICONでの検出状況と、施設Hでのその後の変化

a : 薬剤耐性 *Acinetobacter* spp. の検出状況。
 b : 2剤耐性 *Acinetobacter* spp. の検出状況。
 c : その後、施設Hで感染対策が行われた後の検出状況の変化。
 2DRAB : 2剤耐性 *A. baumannii*, PRGBS : ペニシリン耐性B群溶連菌。

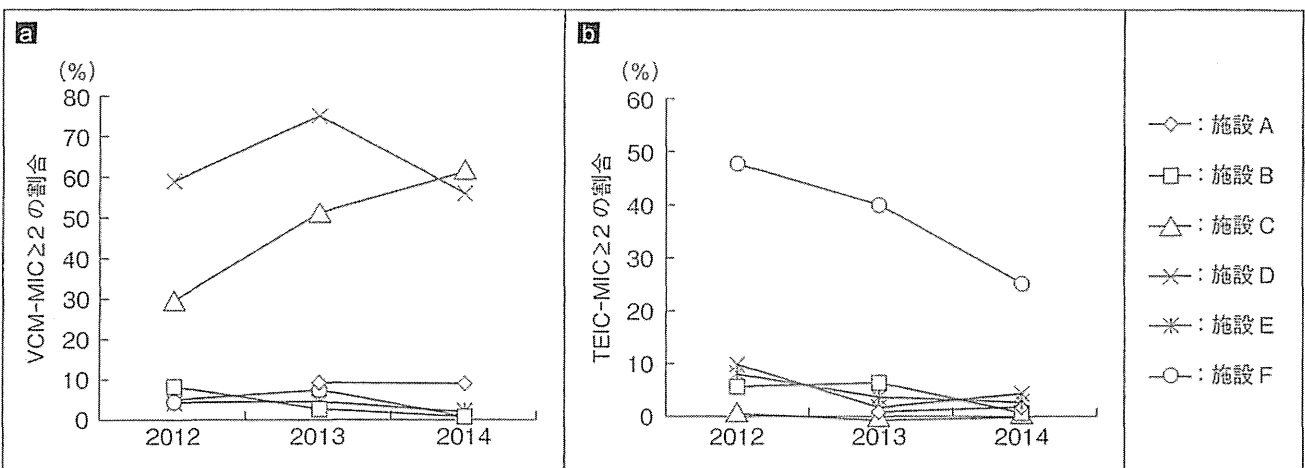


図4 各施設での黄色ブドウ球菌のVCMとTEICのMIC ≥ 2の割合の経時的変化

a : VCM-MIC ≥ 2, b : TEIC-MIC ≥ 2。
 各施設で分離される黄色ブドウ球菌株のVCMのMIC ≥ 2を示す株の割合をみると、施設Cと施設Dで高率である。この2施設では薬剤感受性検査としてベックマン・コールター社のWalkAway[®]を使用しており、検査機器による差を考慮する必要がある。一方でTEICの感受性はそうした測定機器の違いによらないことがわかる。
 VCM : vancomycin, TEIC : teicoplanin, MIC : minimum inhibitory concentration.

愛知県下で行われている感染症サーベイランスを紹介し、その意義と細菌検査室とのかかわりについてみてきた。地域で取り組む感染症サーベイランスは、参加施設の感染制御の質向上において、非常に有意義であると考えられる。細菌検査室での日々の培養同定検査、薬剤感受性検査の積み重ねが、適正な感染対策や感染症診療の基礎に

なっており、その積み重ねによって初めて施設横断的なサーベイランスも可能となる。

感染制御活動のなかで置かれた細菌検査室の位置付けの重要性と可能性を自ら確認したうえで、ICTの施設内での活動と施設を越えた地域連携活動にぜひ積極的に参画してほしい。

文献

- 1) 徳田浩一, 賀来満夫: 感染症サーベイランス—その役割と展望—それぞれの機関が果たす役割 大学, 臨と微生物 38: 321-324, 2011
- 2) 西岡みどり: 中小規模施設・有床診療所でサーベイランスを行う人へ—サーベイランス“基本のき”. INFECTION CONTROL 23: 964-970, 2014
- 3) 中澤武司, 中村美子, 秋田美佳, 他: 地域連携での感染カンファレンスに備えて—耐性菌サーベイランスの活用. 千臨技会誌 120: 18-23, 2014
- 4) 井口光孝, 望月まり子, 八木哲也, 他: 愛知県において分離された緑膿菌の薬剤感受性サーベイランス. Jpn J Antibiot 66: 211-225, 2013
- 5) van Duin D, Perez F, Rudin SD, et al: Surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: tracking molecular epidemiology and outcomes through a regional network. Antimicrob Agents Chemother 58: 4035-4041, 2014
- 6) Brennan BM, Coyle JR, Marchaim D, et al: Statewide surveillance of carbapenem-resistant enterobacteriaceae in Michigan. Infect Control Hosp Epidemiol 35: 342-349, 2014

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

誰も教えてくれなかった 乳腺エコー

何森亜由美

◎B5 頁168 2014年
定価: 本体5,500円+税
[ISBN978-4-260-01938-5]

これまでの「経験で上達する」「数をこなせば見えるようになる」という主に経験則に基づく超音波の見方でなく、乳腺の正常構造に注目し、その正常構造からの逸脱部に病変の検出のヒントがあるという著者が提唱する読影法を、症例を通して解説している。またその解説を助ける動画もQRコードを読み込めば、視聴可能である。読了後には、今までの乳腺エコーに対する見方・考え方が変わり、もっと身近に捉えられるだろう。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>飯沼由嗣</u>	必携 検査室の感染管理 5.感染患者に接する場合の対応 2) 消化管疾患患者	Medical Technology	26	1419-1426	2015
<u>飯沼由嗣</u>	臓器移植患者の感染制御	日本臨床微生物学雑誌	26	11-23	2016
渡邊珠代、 丹羽隆、 土屋麻由美、 外海友規、 太田浩敏、 <u>村上啓雄</u>	岐阜県内感染防止対策加算算定全病院での感染対策活動に関するサーベイランス結果報告	日本環境感染学会雑誌	30	44-45	2015
<u>八木哲也</u>	【感染症サーベイランスの実際】地域で取り組むサーベイランス事業	臨床検査	59	809-814	2015
<u>八木哲也</u>	【感染症診断の新たなツール】遺伝子検査の応用 薬剤耐性検出(解説/特集)	化学療法の領域	31 (増刊号)	275-282	2015

感染症診断の新たなツール

V 遺伝子検査の応用

7. 薬剤耐性検出

Detection of drug-resistance genes

八木 哲也*

薬剤耐性遺伝子を検出する遺伝子検査には, multiplex PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法や real-time PCR 法に基づいた方法, 検出にハイブリダイゼーション法を用いた microarray 法, 次世代シーケンス (NGS) 法を用いた方法などがある。NGS 法を除くこうした遺伝子検査は, 従来の培養同定・薬剤感受性検査よりも迅速に, 高い感度・特異度をもって薬剤耐性遺伝子を検出できるのが利点で, 菌同定検査とも組み合わせられて, いくつかの自動化された方法がすでに実用化されている。本稿では, 薬剤耐性遺伝子を検出するいくつかの遺伝子検査について紹介し, その臨床的な意義について考察したい。

Key Words : Multiplex PCR 法 / Real-time PCR 法 / Microarray 法 /
次世代シーケンス法 / 自動化キット

I はじめに

薬剤耐性菌は当初, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) のようにグラム陽性菌が臨床的に問題とされてきたが, 近年, 基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌やカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE), 多剤耐性緑膿菌・アシネトバクターといったグラム陰性菌が大きな脅威となっている。ESBL 産生菌や KPC 型カルバペネマーゼ産生菌感染症では, 非産生菌感染症と比べ, 临床上, 患者の予後を悪化させ, 医療経済的にもマイナスが大き

い^{1) 2)}。こうした薬剤耐性菌感染症患者の適切な治療と, 薬剤耐性菌の蔓延防止のためには, 早期の正確な薬剤耐性の検出, サーベイランスと感染対策, 抗菌薬適正使用が重要である。

本稿では, 薬剤耐性の検出法のひとつである遺伝子検査法について紹介し, その可能性と限界について考えてみたい。

II 薬剤耐性因子の検出法の現状

薬剤耐性因子を早期に特定することは, 薬剤耐性菌感染症患者への早期の適切な抗菌薬治療にとっても, また, 薬剤耐性菌の伝播を

*名古屋大学大学院医学系研究科 臨床感染統御学 教授 Tetsuya Yagi

V 遺伝子検査の応用

防止する感染対策上も非常に有用であると考えられる。薬剤耐性因子の検出には、①表現型による方法、②酵素による薬剤の分解を検出する方法、③PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法などをベースにした遺伝子検査法がある。

①のmodified Hodge法や β -ラクタマーゼ阻害薬を用いたdisk potentiation法³⁾、②のCarba NP法⁴⁾は一般の細菌検査室で行われる標準法と考えられるが、①および②については本稿の趣旨から外れることになるため、③の薬剤耐性因子の遺伝子検査について述べることにする。

III 薬剤耐性遺伝子検出法

通常の細菌培養検査において、菌の同定・薬剤感受性検査の結果が出るまでには約48～72時間程度かかる。さらに、表現型による方法などで産生されている β -ラクタマーゼの型を同定しようとする、さらにもう1昼夜かかることになる。

一方で、薬剤耐性遺伝子を検出する方法においては、上記の標準的な方法に比べ耐性遺伝子を迅速に検出できるものが多い。薬剤耐性遺伝子検出法には、①Single PCR法、②Multiplex PCR法、③Real-time PCR法などのPCR法に基づいた方法、④Microarray法、⑤NGS（次世代シーケンス）法を用いた方法、⑥自動化されたキットがある。それぞれの方法の報告を紹介し、優れた点と欠点について見てみよう（表1）。

① Single PCR法

PCR法は目的の遺伝子を短時間に増幅できる手段である。目的遺伝子に対応するプライマーセットをそれぞれ作成し、反応を行う。検体数が多くなると手技が煩雑となる。

② Multiplex PCR法

Multiplex PCR法を用いれば1回の反応で多くの薬剤耐性因子を検出することが可能となる。そのための反応系を確立するためには、標的遺伝子に特異的で、自己同士で反応しない、増幅産物の大きさが異なるようなプライマーの設計を行う必要がある。表2に、我々がCREの β -ラクタマーゼ遺伝子を検出する場合に使用しているsingle PCR法とmultiplex PCR法のプライマーセット、その増幅産物の大きさを示す。

③ Real-time PCR法

Real-time PCR法を用いれば増幅産物の検出時間を短縮できる。さらに、TaqMan/HYB probeなどを用いて複数の目的遺伝子産物を区別してラベルし、検出可能となる。

Singhらは、real-time PCR法を用いたKPC型カルバペネマーゼ遺伝子の検出法は、2つの選択培地（CHROMagar培地、VACC培地）による方法よりも感度・特異度に優れ、検出時間も短かったと報告している⁶⁾。

Monteiroらはmultiplex real-time PCR法で58株の臨床分離株から、IMP型、OXA-48型、NDM-1型、GES型、VIM型、KPC型カルバペネマーゼ遺伝子の検出を試みており、3時間で100%検出可能であったと報告している⁷⁾。

④ Microarray法

Multiplex PCR法で検出できる遺伝子はせいぜい数個であるが、microarray法を用いれば検出できる遺伝子の数は飛躍的に増えることになる。オランダのCheck-Points社のmicroarray法を評価した報告がいくつかある。このmicroarray systemは、培養された菌液から全DNAを抽出し、ligation step、PCR法を経て、PCR産物をmicroarray

MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌） VRE（バンコマイシン耐性腸球菌）
ESBL（基質拡張型 β -ラクタマーゼ） CRE（カルバペネム耐性腸内細菌科細菌）
PCR（ポリメラーゼ連鎖反応） NGS（次世代シーケンス）

表1 カルバペネマーゼ遺伝子検出に用いる single PCR 法と multiplex PCR 法のプライマーセットの例

Single	PCR 検出用プライマー	Size
IMP-1 型	IMP-F1 5-ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC-3	587
	IMP-R1 5-ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC-3	
IMP-2 型	IMP-F2 5-GTT TTA TGT GTA TGC TTC C-3	678
	IMP-R2 5-AGC CTG TTC CCA TGT AC-3	
VIM-2 型	VIM-F 5-ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG-3	387
	VIM-R 5-CTA CTC AAC GAC TGA GCG-3	
NDM-1 型	NDM-1F (5-TTG CCC AAT ATT ATG CAC CC-3)	420
	NDM-1R (5-ATT GGC ATA AGT CGC AAT CC-3)	
SMB-1 型	SMB-F 5-CAG CAG CCA TTC ACC ATC TA-3	492
	SMB-R 5-GAA GAC CAC GTC CTT GCA CT-3	
TMB-1 型	TMB-1 F GCC AAC GAA GAA ATA CCC GC	557
	TMB-1 R TTC TAG CGG ATT GTG GCC AC	
KPC 型	KPC-F 5-ATC TGA CAA CAG GCA TGA CG-3	405
	KPC-R 5- AGT CAT TTG CCG TGC CAT AC-3	
OXA-48 型	OXA-48F 5-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3	744
	OXA-48R 5-GAGCACTTCTTTTGTGATGGC-3	
Multiplex	PCR 検出用プライマー	Size
OXA-23 型	OXA-23F 5-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3	501
	OXA-23R 5-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3	
OXA-24/40 型	OXA-24/40F 5-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3	246
	OXA-24/40R 5-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3	
OXA-51 型	OXA-51F 5-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3	353
	OXA-51R 5-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3	
OXA-58 型	OXA-58F 5-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG -3	599
	OXA-58R 5-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3	

我々が CRE のカルバペネマーゼ遺伝子検出を行う際に使用するプライマーセットを示す。手間はかかるが、single PCR 法で遺伝子の有無を確実に確認することが多い。

CRE：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌，PCR：ポリメラーゼ連鎖反応
(名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学/耐性菌制御学教授・荒川宜親先生のご好意による)

V 遺伝子検査の応用

表2 各種遺伝子検査の特徴

	検出に要する時間	コスト	特徴
Single PCR 法	2～4時間	+	遺伝子をひとつずつ増幅検出。手間がかかる。生体物質による反応阻害。DNA抽出が必要なことが多い
Multiplex PCR 法	3～4時間	+	プライマー設計が大切。手間は中等度。生体物質による反応阻害。DNA抽出が必要なことが多い。疫学的に有用
Real-time PCR 法	2～3時間	++	短時間で検出可能。定量も可能。治療や保菌者調査にも有用。DNA抽出法の標準化が必要
Microarray 法	5～6時間 ～それ以上	++ +++	1反応で多くの耐性遺伝子について解析可能。1塩基変異も検出可能。検出に要する時間が比較的長い。キットは高価。プラスミド性と染色体性 AmpC の区別困難
NGS 法	3時間～数日	+++	点変異の違いを検出可能。全ゲノム解析は情報量は多いが、解析に時間と技術が必要。高価

5つの薬剤耐性遺伝子検出法のそれぞれの特徴を示した。

PCR：ポリメラーゼ連鎖反応，NGS：次世代シーケンス

(文献5より改変)

panel とハイブリダイゼーションすることで遺伝子を検出するが、それにかかる時間はトータルで6～7時間である。検出できるβ-ラクタマーゼ遺伝子の種類により、Check KPC/ESBL, Check MDR CT101-103まで進化しており、CT103では、グラム陰性桿菌が産生しうる主要なESBLsの遺伝子、プラスミド性のAmpC型β-ラクタマーゼ遺伝子、カルバペネマーゼ遺伝子を網羅している。臨床分離株を用いた評価では感度・特異度ともに100%と報告されている⁸⁾。

血液培養陽性検体から直接、Check KPC/ESBLを用いて耐性遺伝子を検出するFishbainらの検討では、最適なDNA抽出法を用いた場合、感度・特異度はそれぞれ、94.4%、100%と報告されている⁹⁾。

⑤ 次世代シーケンス (NGS) の技術を使用した方法

核酸シーケンスの技術は飛躍的に向上しており、より短時間に、より多くの遺伝子情報をシーケンスすることが可能になった。

Poirelらは、PCR産物をNGS法でシーケンスすることにより、突然変異によるGES型β-ラクタマーゼ遺伝子の鑑別を行っている¹⁰⁾。GES型β-ラクタマーゼは遺伝子変異により基質特異性が変化するため、短時間で変異が同定できるこの方法は有用と考えられる。全ゲノムシーケンスを行う場合は、菌の正確な同定やmultilocus sequence typing (MLST)法による分子疫学的分類、染色体遺伝子変異による薬剤耐性機構なども解析が可能になる。

2011年のドイツでの腸管出血性大腸菌O104:H4のアウトブレイクをIon Torrent PGM™を用いて解析したときには、62時間でアウトブレイク株と参照株のシーケンスデータのマッピングが可能となっている¹¹⁾。新しい第三世代のシーケンサーを使用すれば、マッピングに必要な時間はさらに短縮可能となるであろう。

このNGS法は今後、耐性菌制御を含めた感染制御の領域で革新的な進歩をもたらす可能性があるが、オープンアクセスのシーケ

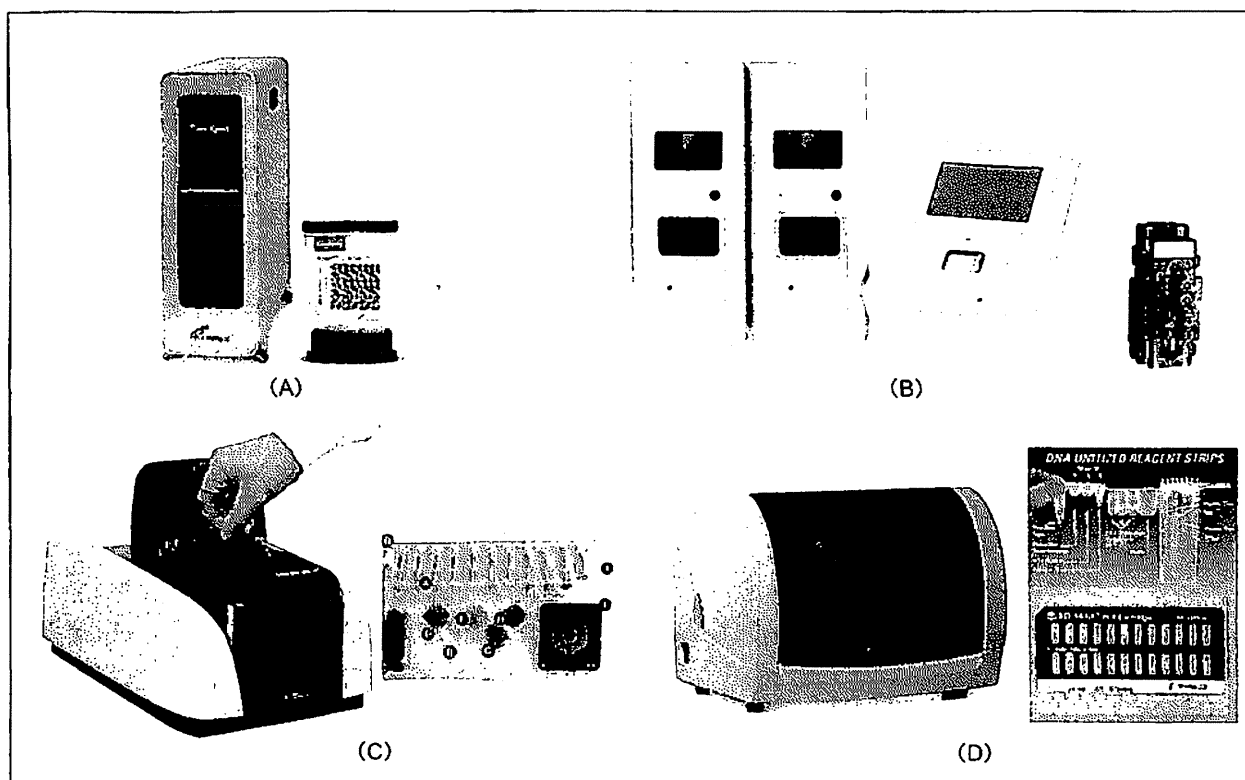


図1 自動化された遺伝子検査

(A) Cepheid社のGeneXpert® IとXpert® Carba-R (<http://www.cephheid.com/us/>より), (B) Nanosphere社のVerigene system (左: processor, 右: reader)とVerigene® Gram-Negative Blood Culture test (<http://www.nanosphere.us/products/verigene-system>より), (C) Idaho Technology社のFilmArray systemとFilmarray pouch(文献17より), (D) Becton Dickinson社のBD Max (<http://www.bd.com/products/product-categories/molecular.aspx>より)と、DNA反応液用のストリップとPCRカートリッジ(BD MAX system users manual FDA assay version.pdfより)。

PCR: ポリメラーゼ連鎖反応

(各社ホームページおよび文献17より)

ンスデータベースのさらなる充実, 臨床に役立つ情報が容易に得られるような解析ソフトの進化などの問題があり, 普及するにはまだ時間がかかると考えられる¹²⁾。

⑥ 自動化された遺伝子検査

こうした遺伝子検査の欠点のひとつが, ルーチンの細菌培養検査とは異質な手技が必要で, 特にmicroarray法となると手間がかかるという点である。こうした手技が自動化されていれば現場の労力も減り, 標準化された検査として普及の後押しになると考えられる(図1)。

(1) Xpert® MTB/RIF, Xpert® Carba-R
自動化された遺伝子検査の中でもっともそ

の意義が評価され普及が進んでいるのは, 結核菌の同定とそのリファンピシン耐性を同時に検出できるCepheid社のXpert® MTB/RIF¹³⁾であろう。この検査はひとつのカートリッジの中で, 溶菌, DNA抽出, PCR増幅と産物の検出が行われるもので, 飛沫核を生じるリスクはほとんどなく, 2時間ほどで検査結果を得ることができる。感度は塗抹陽性例で98.2%, 特異度は99.2%と報告されている。発展途上国では安定した温度管理と電力供給およびコストが問題となるが, 技術的な指導も喀痰塗抹検査よりも簡便であり, さまざまな結核蔓延国で使用されてきている。

近年, このXpert®のシステムで, 肛門ス

V 遺伝子検査の応用

ワブや便検体から、KPC型、VIM型、NDM型カルバペネマーゼ遺伝子を検出するキットが開発されてきている¹⁴⁾。日本で検出の多いIMP型が検出できるようになれば、わが国でも利用価値の高いものとなる可能性がある。

(2) Verigene Gram-Positive or Negative Blood Culture Nucleic Acid Test

血液培養検査が陽性となってから細菌同定・薬剤感受性検査結果が出るまでには48～72時間かかるが、Nanosphere社のこの自動化されたDNA抽出とハイブリダイゼーションによる検出システムを用いると、約2.5時間以内に主要な菌の同定と薬剤耐性遺伝子が検出できる。

すでにグラム陽性菌では臨床応用がなされ、腸球菌による菌血症患者での適切な治療に有用であったとの報告がある¹⁵⁾。7種類の腸内細菌科細菌とアシネトバクター属、緑膿菌の同定と、CTX (cefotaxime)-M型、IMP型、VIM型、KPC型、NDM型、OXA-23型、OXA-24/40型、OXA-48型、OXA-58型β-ラクタマーゼ遺伝子の検出ができる、グラム陰性菌用のキットをTojoらが評価しており、臨床検体では、*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* spp. で検出・同定率が81～92%とやや劣るものの、人工検体において、β-ラクタマーゼ遺伝子は100%検出されている¹⁶⁾。今後、臨床検体でのさらなる検討が必要と考えられる。

(3) FilmArray® (国外のみ)

微量液体技術 (microfluidic technology) と nested multiplex PCR 法の技術を組み合わせた FilmArray® プラットフォームを用いると、迅速に、高感度・高特異度で臨床検体中の病原体や薬剤耐性遺伝子を検出することが可能である¹⁷⁾。

Altunらによる、グラム陰性菌 10 菌種、グ

ラム陽性菌 8 菌種、カンジダ属 5 菌種の同定と、耐性因子 4 種類 (mecA, vanA/vanB, KPC) の検出が可能なパネルの評価では、血液培養陽性検体からの直接検出で 91.6% 検出が可能であった¹⁸⁾。検出までの時間は、FilmArray® を用いた場合では血液培養陽性後平均 21.67 時間、通常の培養検査では平均 53.92 時間であった。今後、検出できる菌種と薬剤耐性遺伝子の組み合わせにより、より有望な迅速検査となり得ると考えられる。

(4) BD Max System

BD Diagnostics社のBD Max Systemでは、サンプルからのDNA抽出、multiplex SYBR green real-time PCR法を用いたPCR産物の融解曲線解析により、IMP型、GES型、KPC型、VIM型、OXA-23、48型、NDM型カルバペネマーゼ遺伝子を検出する方法が考案されており、実際の臨床分離株を用いた評価では100%の感度・特異度が示されている¹⁹⁾。今後、実際の臨床検体からの検出精度の評価が必要と考えられる。

IV 遺伝子検査の臨床的意義

優れた薬剤耐性遺伝子検査が実用化されつつある中で、その臨床的な意義や活用法について考えておきたい²⁰⁾。感染症診療の現場で、こうした遺伝子検査を活用するときには注意すべき点は以下の2点であると思われる。

ひとつは、薬剤耐性遺伝子が存在しても、それだけではその遺伝子が発現されているかどうかはわからないという点である。薬剤感受性検査があつてはじめて遺伝子検査の意義があるのであつて、遺伝子検査を行えば薬剤感受性検査は不要ということでは決してない。

第2点としては逆に、遺伝子検査で薬剤耐性遺伝子が見つかったが、薬剤感受性検査ではそう高度な耐性を示さない場合、その耐性遺伝子の存在が軽視される可能性がある。最

初は薬剤耐性遺伝子産物の産生量が少なくても、抗菌薬に曝された環境においてはその産生量が増し、薬剤耐性の度合いが上がるということが起こり得るからである。現在、大きな問題となりつつある CRE では、MIC (最小発育阻止濃度) 上はカルバペネム感受性であっても、感染症によってはカルバペネムによる治療が困難となる可能性があり、今後は薬剤感受性検査に加え、遺伝子検査を含めた耐性因子の検出が不可欠になると考えられる。

V おわりに

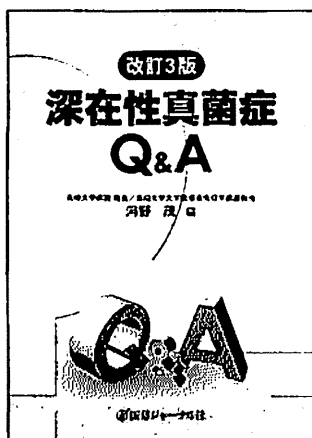
科学の進歩は目覚ましく、その進歩の賜物として、さまざまな有用な薬剤耐性遺伝子検査が実用化されつつある。それぞれの検査の原理や特性、そして結果の示す意味を十分理解して、臨床現場で活用していきたいものである。

文 献

- 1) Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, et al : Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **50** (4) : 1257-1262, 2006.
- 2) Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, et al : Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect* **17** : 1798-1803, 2011.
- 3) Clinical Laboratory Standards Institute : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing : nineteenth informational supplement M100-S21. Wayne, PA, 2011.
- 4) Nordmann P, Poirol L, Dortet L : Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* **18** (9) : 1503-1507, 2012.
- 5) Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, et al : Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Diag Microbiol Infect Dis* **77** : 179-194, 2013.
- 6) Singh K, Mangold KA, Wyant K, et al : Rectal screening of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases : Comparison of real-time PCR and culture using two selective screening agar plates. *J Clin Microbiol* **50** (8) : 2596-2600, 2012.
- 7) Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, et al : Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother* **67** : 906-909, 2012.
- 8) Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, et al : Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, Fox, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM). *J Antimicrob Chemother* **67** : 1865-1869, 2012.
- 9) Fishbain JT, Sinyavskiy O, Riederer K, et al : Detection of extended-spectrum β -lactamase and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes directly from blood cultures by use of a nucleic acid microarray. *J Clin Microbiol* **50** (9) : 2901-2904, 2012.
- 10) Poirol L, Naas T, Nordmann P : Pyrosequencing as a rapid tool for identification of GES-type extended-spectrum β -lactamases. *J Clin Microbiol* **44** (8) : 3008-3011, 2006.
- 11) Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, et al : Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104 : H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS ONE* **6** (7) : e22751, 2011.
- 12) Török ME, Peacock SJ : Rapid whole-genome sequencing of bacterial pathogens in the clinical microbiology laboratory – pipe dream or reality? *J Antimicrob Chemother* **67** : 2307-2308, 2012.
- 13) Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al :

V 遺伝子検査の応用

- Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Eng J Med* **363** (11) : 1005-1015, 2010.
- 14) Tenover FC, Canton R, Kop J, et al : Detection of colonization by carbapenemase-producing gram-negative bacilli in patients by use of the Xpert MDRO assay. *J Clin Microbiol* **51** (11) : 3780-3787, 2013.
- 15) Sango A, McCarter YS, Johnson D, et al : Stewardship approach for optimizing antimicrobial therapy through use of a rapid microarray assay on blood cultures positive for *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* **51** (12) : 4008-4011, 2013.
- 16) Tojo M, Fujita T, Ainoda Y, et al : Evaluation of an automated rapid diagnostic assay for detection of gram-negative bacteria and their drug-resistance genes in positive blood cultures. *PLoS ONE* **9** (4) : e94064, 2014.
- 17) Poritz MA, Blaschke AJ, Byington CL, et al : FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection : development and application to respiratory tract infection. *PLoS ONE* **6** (10) : e26047, 2011.
- 18) Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, et al : Clinical evaluation of the FilmArray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* **51** (12) : 4130-4136, 2013.
- 19) Hofko M, Mischnik A, Kaase M, et al : Detection of carbapenemases by real-time PCR and melt curve analysis on BD Max system. *J Clin Microbiol* **52** (5) : 1701-1704, 2014.
- 20) Tuite N, Reddington K, Barry T, et al : Rapid nucleic acid diagnostics for the detection of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria : is it time for a paradigm shift? *J Antimicrob Chemother* **69** : 1729-1733, 2014.



深在性真菌症 Q & A 改訂3版

長崎大学病院 院長 / 長崎大学大学院感染免疫学講座教授 河野 茂 編

A5判 220頁 定価(本体 3,500円+税) 送料実費
ISBN978-4-7532-2364-0 C3047

- ◎深在性真菌症は、もはやまれな感染症ではない——。一般臨床医が日常診療で直面する疑問点、問題点をQ & A形式でわかりやすく解説。疫学・環境から、真菌の感受性、診断、治療までを最新情報に改訂。
- ◎「MIC測定の意味と解釈」、「バイオフィルム形成と抗真菌薬の感受性変化」、「抗真菌薬の併用療法」など新たな項目も追加し、更に充実した一冊に!

株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (振替番号)
〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369 00910-1-33353
<http://www.iyaku-j.com/> 書籍・雑誌バックナンバー検索、ご注文などはインターネットホームページからが便利です。

