

[総 説]

感染制御および抗菌薬適正使用に役立つ耐性菌検出の表現型試験

口広智一

公立那賀病院臨床検査科

(令和4年8月2日受付)

臨床微生物検査において耐性菌の正確な検出は大きな責務の一つである。それは感染症治療における抗菌薬適正使用において重要な情報となり、一方で感染制御においても耐性菌の正確な把握は重要な事項となる。薬剤感受性検査が適切に実施されていれば、多くのケースではその検査結果だけでも十分ではあるが、一部の細菌の耐性機構については薬剤感受性検査のみでは検出できない場合がある。これらの耐性機構を明らかにし、抗菌薬適正使用や感染制御に役立つ情報を伝える必要があるが、そのために有用な検査方法として表現型試験と遺伝子型試験がある。本稿では臨床微生物検査室として、必要時に実施できる体制を準備しておくべき表現型試験について紹介する。

Key words: 抗菌薬適正使用, 感染制御, 表現型試験, 薬剤感受性検査, 耐性菌

1. はじめに

細菌感染症の治療には抗菌薬が使用されるが、抗菌薬は万能ではなく、適切に使用しないと治療の失敗や耐性菌の増加を助長する場合がある。1929年のフレミングによるペニシリンの発見以降、人類により様々な抗菌薬が発見、開発されており、現在では感染症治療において抗菌薬は欠かせない存在となっている。しかしながら、ほぼ全ての抗菌薬に対して耐性を獲得した菌が発見されているのも現実である。また、近年では新たな抗菌薬の開発が鈍化しているため、耐性菌には既存の抗菌薬の適正使用による感染症治療を実施していく必要がある。抗菌薬適正使用を実施するにあたり重要な情報の一つであるのが微生物検査結果であり、特に薬剤感受性検査結果は欠かせないツールとなっている。しかしながら、薬剤耐性菌の種類によっては、通常の薬剤感受性検査のみでは検出が困難な耐性機構を持ち合わせている菌種が存在する。これらの耐性機構を明らかにし、抗菌薬適正使用に繋げる必要があるが、それらに有用な耐性菌検査方法には、表現型試験 (phenotyping test) と遺伝子型試験 (genotyping test) がある。

2. 表現型試験と遺伝子型試験

表現型試験とは、微量液体希釈法やディスク拡散法などを応用した検査法を用いることで、実際に菌が耐性であることの表示を読み取る検査である。長所としては、試薬の準備があれば多くの施設で実用的なコストで実施可能であること、実際に耐性であることを目視にて確認できること、および未

知の新たな耐性機構においても、薬剤耐性を示せば検出可能であることなどが挙げられる。短所としては、明らかな耐性は見つけやすいが、わずかな耐性や複数の耐性機構の重複時には結果の解釈が困難となる場合があることである。遺伝子型試験は、PCR等の遺伝子検査を用いることで、耐性機構を司る耐性遺伝子を検出することで、耐性菌であることを証明する方法である。長所としては、既存の耐性遺伝子であればプライマー試薬の準備ができれば検出可能であること、耐性遺伝子が重複しても目的遺伝子に対するプライマー試薬を複数用いることで問題なく検出可能なことである。特に近年利用されている Whole genome sequence を用いれば、既存の耐性遺伝子はほぼ網羅的に検出が可能である。欠点としては、耐性遺伝子を検出しても耐性メカニズムが必ずしも発動していない場合があること、遺伝子検査機器を要すること、検査法によっては高コストとなる場合があること、未知の耐性遺伝子やメカニズムは検出できないことが挙げられる。本稿では、ICT (Infection Control Team) による耐性菌の感染制御や、AST (Antimicrobial Stewardship Team) による耐性菌治療における抗菌薬適正使用に役立つ表現型試験について紹介する。

3. グラム陽性球菌における表現型試験

(1) *Staphylococcus* spp.におけるβ-ラクタム系耐性(メチシリン耐性)

1) 臨床的意義と耐性機構

わが国におけるブドウ球菌感染症に対する抗菌薬としては、cefazolin (CEZ) が第一選択薬として使用される事が多い。CEZを含めたβ-ラクタム系抗菌薬は、*Staphylococcus* 属に対してペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding protein: PBP) 1~4に作用してペプチドグリカン合成を阻害するが、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) などでは *mecA* 遺伝子の保有により PBP2'が産生され、β-ラクタム薬の結合部位の親

著者連絡先: (〒649-6414) 和歌山県紀の川市打田 1282
公立那賀病院臨床検査科
口広智一
TEL: 0736-77-2019
FAX: 0736-77-7171
E-mail: tk_kensa@nagahp.jp

表 1. *Staphylococcus* spp. における *mecA* 保有判定基準 (CLSI M100-S32)

	Zone diameter (mm)				MIC (μg/mL)			
	Oxacillin		Cefoxitin		Oxacillin		Cefoxitin	
	S	R	S	R	S	R	S	R
<i>S. aureus</i>	—	—	≥22	≤21	≤2	≥4	≤4	≥8
<i>S. lugdunensis</i>	—	—	≥22	≤21	≤2	≥4	≤4	≥8
<i>S. pseudointermedius</i>	≥18	≤17	—	—	≤0.5	≥1	—	—
<i>S. schleiferi</i>	≥18	≤17	—	—	≤0.5	≥1	—	—
<i>S. epidermidis</i>	≥18	≤17	≥25	≤24	≤0.5	≥1	—	—
Other <i>Staphylococcus</i> spp. 注)	—	—	≥25	≤24	≤0.5	≥1	—	—

注) *S. epidermidis* 以外の Other *Staphylococcus* spp. では *mecA* 陰性株でも Oxacillin の MIC 値が 1 ~ 2 μg/mL を示す株があるので注意

和性が変異することにより β-ラクタム系薬全般が耐性化する。近年、海外では *mecA* 以外にも *mecC* 遺伝子による耐性メカニズムが報告されている¹²⁾。抗 MRSA 薬である vancomycin (VCM) は、メチシリン感性黄色ブドウ球菌 (methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* : MSSA) に対して CEZ より効果が劣る事が報告されているため、早期の β-ラクタム耐性検査は抗菌薬適正使用の上でも重要となる。

2) 検査法と解釈

検査の基準抗菌薬としては、oxacillin (MPIPC) と cefoxitin (CFX) が推奨されている。現在 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) は CEZ の薬剤感受性検査については、CEZ の阻止円径や MIC 値から判定するのではなく、MPIPC と CFX の結果に基づいて判定する事を推奨している³⁾。表 1 に *Staphylococcus* spp. における CLSI の判定基準を示す³⁾。判定基準や推奨検査薬は菌種により異なるため、正しい菌種同定が重要であり、それらに応じた正しい検査法の実施が必要となる。近年では多くの薬剤感受性の自動機器で MPIPC と CFX が測定されているため、特に追加試験が必要なケースは多くはないが、両薬剤の結果が一致しない場合には他法の検査等で確認することが望ましい。メチシリン耐性と判定されれば、ceftaroline (国内未使用薬) を除く全ての β-ラクタム系薬の感受性結果は、ディスク直径や MIC 値に関わらず耐性として報告する必要がある³⁾。β-ラクタム系薬の迅速感受性検査としては、MRSA 選択培地を用いた培養も有用である。Gram 染色にてブドウ球菌を疑う GPC を認めた場合には、MRSA 選択培地を追加培養しておけば、翌日耐性菌を容易に推定する事が可能となる。加えて、著者らが報告した MRSA 選択培地を光学顕微鏡で直接鏡検する Micro colony detection method (MCD) 法を用いれば、血液培養陽性から約 3 時間でメチシリン耐性を推定することが可能である⁴⁾ため、重症敗血症などにおける抗菌薬選択時には有用である。血液培養液や培地集落から直接イムノクロマト法により PBP2' を検出する Q ライン極東 PBP2' (極東製薬工業) は、約 30 分で結果を得られる迅速診断に有用なキット試薬である。

(2) *Staphylococcus* spp. におけるペニシリナーゼ産生

1) 臨床的意義と耐性機序

ブドウ球菌における penicillin G (PCG) の耐性機序は、

mecA 遺伝子によるメチシリン耐性、またはプラスミド性に *blaZ* 遺伝子を獲得する事によるペニシリナーゼ産生である。ブドウ球菌感染症に対する殺菌力は PCG が優れているため、ペニシリンに対する耐性機構を持ち合わせていない MSSA 感染症に対しては最適治療の抗菌薬となる。特に長期間で高用量の抗菌薬治療を必要とする感染性心内膜炎 (Infectious endocarditis : IE) においては、世界的な第一選択薬である Nafcillin がわが国では未承認であり使用ができず、CEZ が第一選択薬として推奨されているのが現状である⁵⁾⁶⁾。しかしながら、CEZ の殺菌力は PCG に劣ること、CEZ はまれにペニシリナーゼ過剰産生にて分解され治療失敗となるリスクがある⁶⁾ことから、PCG が使用できるか否かは MSSA の重症感染症において臨床的意義の高い情報となる。そのため、MSSA による重篤な IE 症例では、正確なペニシリナーゼ産生試験が PCG 投与の判断材料となる極めて重要な検査となる。

2) 検査法と解釈

薬剤感受性検査において PCG の MIC 値が ≤0.12 μg/ml あるいは阻止円直径が ≥29 mm で感性和判定された *Staphylococcus* spp. は、報告前に確認試験として誘導性 β-ラクタマーゼ試験を実施することが望まれる³⁾。*blaZ* 遺伝子を保有していても薬剤感受性検査ではブレイクポイントを下回り耐性を示さない場合が存在し、このような株では PCG で治療してもペニシリナーゼ産生が誘導され治療失敗となる。そのため、Induced Cefinase test や Penicillin disk zone edge test を実施する³⁾⁷⁾⁸⁾。Induced Cefinase test は、セフィナーゼディスク (日本 BD) を蒸留水で湿らせ、ペニシリンやセフェム系薬剤ディスク周辺の集落を塗布して 60 分後に赤色の変化の有無を判定する。zone edge test は、PCG ディスクを用いてディスク拡散法を実施し、阻止円の辺縁が明瞭で崖状 (クリフ状) を示した場合は陽性、辺縁が不明瞭であり砂浜状 (ビーチ状) を示した場合は陰性と判断する (図 1)³⁾⁸⁾。*Staphylococcus aureus* の β-ラクタマーゼ産生の検出には Cefinase test でも検査可能であるが、zone edge test の方が高感度であることが知られている。なお、*Staphylococcus lugdunensis* についてはペニシリナーゼ産生と薬剤感受性結果との一致率が高いため、本検査を追加実施する必要はないとされている³⁾。

(3) *Staphylococcus* spp.におけるクリンダマイシン耐性誘導

1) 臨床的意義と耐性機序

Staphylococcus spp.において clindamycin (CLDM) を用いた抗菌薬治療を行うケースは多くはないと思われるが、 β -ラクタム系抗菌薬がアレルギーで使用が難しい場合や外来治療時には選択肢の一つとなる。CLDM の耐性機序は、*ermA* および *ermB* 遺伝子にコードされた 23S rRNA のメチル化による薬剤標的部位の修飾によるものと、薬剤の膜貫通型汲み出し蛋白をコードする *mefA* 遺伝子による排出機構によるものの2つが知られており、マクロライド系薬の耐性機構と密接に関係している。前者はマクロライド系と CLDM 共に耐性に関与するが、後者は、14, 15 員環マクロライドのみが耐性となる。

2) 検査法と解釈

CLDM 耐性に関与する *erm* 遺伝子の保有株の中には、通常の薬剤感受性検査では感性和と判断される株が存在する。これらはマクロライド系の存在下のみで耐性を示すため誘導型 CLDM 耐性と呼ばれている。そのため、マクロライド耐性で CLDM に感性和または中間を示す株においては、CLDM 耐性誘導試験を実施する必要がある。微量液体希釈法では Erythromycin (EM) 1 μ g + CLDM 0.5 μ g にて発育があれば陽性、発育なしであれば陰性と判定する³⁾。ディスク拡散法を用いる場合は EM および CLDM のディスクを 15~26 mm の距離で隣に設置して実施する³⁾。本検査は D-zone test と呼ばれ、CLDM の阻止円か EM に近い方が誘導型酵素により小さくなり、阻止円形が“D”の字のような形となれば陽性とする。感受性検査にて感性和を示しても、これらの確認検査で陽性を示した場合は、CLDM は臨床的には有効性は期待できないものとして耐性と報告する。CLSI は対象菌種として *S. aureus* および *S. lugdunensis* においては D-zone test の実施を推奨している。

(4) *Enterococcus* spp.属におけるアミノグリコシド高濃度耐性

1) 臨床的意義と耐性機序

Enterococcus spp.は多くの抗菌薬に対して自然耐性や獲得耐性機構を有する菌種である。病原性はさほど高くない菌種であるため、培養検査にて検出されても感染症の原因菌ではなく保菌のみと判断されることも少なくない。しかしながら、血液などの無菌材料から検出された場合には、治療抗菌薬の選択肢が少なく治療が難しい場合がある。特に IE においては、ampicillin (ABPC) や VCM と共に gentamicin (GM) や Streptomycin (SM) を併用して相乗効果を得る抗菌薬投与方法が推奨されており⁵⁾⁶⁾、単独治療だけでは再燃、再発が起こりやすいとされている。*Enterococcus* spp.の中には、様々なアミノグリコシド系修飾酵素の獲得やリボゾームの遺伝子変異による作用点の結合能力低下などにより、アミノグリコシド高度耐性腸球菌 [(high-level aminoglycoside-resistant : HLAR) *Enterococcus* spp.] が存在する⁹⁾。これらは通常殺菌的作用を示すペニシリン系薬が静菌性作用となり、最小殺菌濃度 (Minimum bactericidal concentration : MBC) と MIC の差が大きくなる torelance と呼ばれる特徴があり、治療失敗の危険性が指摘されている。IE 症例においては、HLAR

Enterococcus spp.か否かの鑑別が治療上極めて重要となる。

2) 検査法と解釈

HLAR *Enterococcus* spp.の検査法は、CLSI 推奨法ではディスク拡散法では GM120 μ g または SM300 μ g 含有ディスクを用いて実施し、阻止円 10 mm 以上で感性和、7~9 mm で中間、6 mm 以下で耐性と判断し、中間の場合は他法での再検査を考慮する³⁾。微量液体希釈法を用いる場合は、GM500 μ g/ml、SM1000 μ g/ml での発育の有無にて判定する³⁾。一方で The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) の推奨法においては、ディスク拡散法については GM では阻止円 8 mm 以上で感性和、8 mm 未満で耐性と判定し、SM では阻止円 14 mm 以上で感性和、14 mm 未満で耐性と判断する¹⁰⁾。微量液体希釈法については GM128 μ g/ml、SM512 μ g/ml での検査が推奨されており¹⁰⁾、CLSI とは推奨薬剤濃度が異なる点に注意が必要である。本検査で高度耐性と判断された場合、該当薬剤を用いた併用療法では効果が期待できないと判断されるため、他の薬剤を用いた併用療法を模索する必要がある。

(5) *Streptococcus agalactiae* におけるペニシリン耐性

1) 臨床的意義と耐性機序

Streptococcus agalactiae (Group B Streptococci : GBS) は腸管に常在する菌種の1つであるが、妊婦が保菌していた場合には出生時に新生児への感染が起こることがある。特に新生児髄膜炎の原因菌となった場合には、適切な抗菌薬治療が必要となり、PCG や ABPC が第一選択薬となる⁶⁾¹¹⁾。これは従来ペニシリンに非感性的の GBS は存在しないという理由が一つであったが、近年ペニシリンをはじめとする β -ラクタム系薬に対する低感受性株 (GBS isolates with reduced penicillin susceptibility : PRGBS) が報告されている。本菌が髄膜炎の原因菌となった場合、抗菌薬選択には注意が必要となる。耐性機構は PBP の変異によるものであるが、PBP2X、PBP2B、PBP1A におけるアミノ酸置換を伴う変異の獲得と集積によるものであり¹²⁾¹³⁾、特に PBP2X におけるアミノ酸置換 V405A and/or Q557E がキーとなる置換として報告されている。

2) 検査法と解釈

微量液体希釈法にて PCG の MIC が ≥ 0.25 μ g/ml、ABPC ≥ 0.5 μ g/ml を示す株を対象とし、ceftibuten 30 μ g 含有ディスクを用いてディスク拡散法を実施する¹⁴⁾。阻止円の形成を認めない場合は、PRGBS と判定する。PRGBS と判定される株の中には PCG 感性和株も含まれる場合もあるが、その場合は一部のセファロスポリン系薬に低感受性を示す。PRGBS の中には、PCG や ABPC の他に cefotaxime (CTX) や ceftriaxone (CTRX) にも非感性和を示す場合があるため注意が必要である。PRGBS による髄膜炎症例においては、ペニシリンやセファロスポリン系薬を用いた治療には十分注意する必要がある。

4. グラム陰性桿菌における表現型試験

(1) ESBL 産生菌

1) 臨床的意義と耐性機序

Ambler の分類にてクラス A に属する β -ラクタマーゼのうち、ペニシリン系のみ分解可能であった酵素がセファロス

ポリン系やモノバクタム系にまで基質が拡張したものを Extended spectrum β -lactamase (ESBL) と呼ぶ。ESBL は主に SHV 型, TEM 型, CTX-M 型に分類され, さらに各型ともに数十種類以上のコードする遺伝子が存在する。ESBL 産生遺伝子は細胞質内のプラスミド上に存在するため, 菌種間で伝播していくことが可能であるため, 医療関連感染対策上の重要菌種として位置づけられている。近年では ESBL 産生腸内細菌目細菌 (*Enterobacterales*) による感染症が増加傾向であり, 加えて健常人保菌者や食物からの分離も認められているため, 抗菌薬治療および感染対策上の注意が必要な耐性菌である。ESBL 産生菌の抗菌薬治療としては meropenem (MEPM) や tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) が挙げられるが, ESBL 単独産生菌であれば感染臓器によっては cefmetazole (CMZ) などのセファマイシン系や flomoxef (FMOX) などのオキサセフェム系抗菌薬も使用可能となるため, 正確な表現型試験による ESBL 産生菌の耐性機構の検査が有用である。

2) 検査法と解釈

ESBL はクラス A に属する β -ラクタマーゼであるため, クラバン酸 (clavulanic acid : CVA) によって活性が阻害される性質がある。第3世代セファロスポリン系薬剤等に対して CVA による阻害反応が認められれば, ESBL 産生を確認することができる。CLSI では *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis* が確認試験の対象菌種として推奨されている。これら以外の菌種でも ESBL 産生菌は存在するため, 必要に応じて検査対象菌種を検討する必要がある。薬剤感受性検査にて第3世代セファロスポリン系薬等で非感性を示した場合や, ESBL 選択培地に発育した場合には, ESBL 産生菌の確認試験の実施が推奨される。

①ESBL 確認試験 (CLSI 推奨法)

CLSI に準拠した CVA 含有第三世代セファロスポリン系薬ディスクや Etest を用いて阻害試験を実施する³⁾。自動機器などの感受性パネルに搭載された CVA による阻害確認試験も有用である。ディスク拡散法では 5 mm 以上の拡大, 微量液体希釈法では MIC 値の3管以上の低下を認めた場合に阻害反応陽性とし, ESBL 産生株と判定する。しかし, クラス B やクラス C の他の β -ラクタマーゼ同時産生株において偽陰性を示す場合があるため, 判定には注意が必要である。

②Double Disk Synergy Test (DDST) 法

CLSI 法での推奨薬剤に, cefepime (CFPM) などの第4世代セファロスポリン系薬やモノバクタム系薬の aztreonam (AZT) などを加えてディスクを設置し, 各薬剤の中央に CVA を設置してディスク拡散法を実施する方法である。ESBL 産生菌であれば, 各薬剤と CVA との間に形成される阻止帯が確認できる (図2)。ESBL とセファロスポリナーゼの両産生株や, ESBL とカルバペネマーゼ産生菌の両産生株においても, AZT や CFPM などの追加薬剤との組み合わせにより阻止帯を検出する事が可能となる¹⁵⁾¹⁶⁾。Disk の距離は 2.0~2.5 cm 間隔で設置し, 37°C, 16-18 時間培養後, いずれかの薬剤間に阻止帯形成を認めた場合に ESBL 産生株と判定する。AmpC β -ラクタマーゼを産生する *Enterobacter* spp. などでも検出可能である。*P. mirabilis* において遊走により阻止帯の観察が困難な場合は, ミューラーヒントン寒天

培地 (以下 MH 培地) の代わりに遊走を阻止する MacConkey 寒天培地やドリガルスキー改良培地を使用すると観察しやすくなる。

③ESBL NDP test

ESBL 産生菌の迅速法として開発された方法である¹⁷⁾。CTX3 mg/mL に調整したフェノールレッド溶液を試薬とし, 10 μ L ルーブ一杯の菌をトリス塩酸緩衝液 150 μ L にて溶解し, 30 分放置後に遠心して上清を検体とする。上清 30 μ L を試薬 10 μ L に加え, 37°C, 30 分インキュベートし, 試薬が黄色に変化すれば陽性と判定し, ESBL 産生菌疑いとなる。CTX への tazobactam の添加や, CTX/CVA ディスクを添加した場合も合わせて検査をすることで, 阻害反応の確認により ESBL 産生性の確定も可能となる¹⁸⁾。トリス塩酸緩衝液の代わりにガラスビーズを用いた菌液調整でも検出可能との報告もある¹⁹⁾。試薬調整は手間ではあるが, 感度特異度も高く約1時間程度で判定が可能であるため, 迅速性に優れた方法で血液培養陽性液からの直接検査も有用である¹⁸⁾²⁰⁾。

④その他の検査法

血液培養においては ESBL 産生菌の迅速スクリーニングが報告されている。EUCAST では血液培養陽性液を直接用いてディスク拡散法を実施する RAST (Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing) 法が公開されており, スクリーニングだけではなく4~8時間で薬剤感受性試験の判定が可能となる²¹⁾。E-GSI 培地 (極東製薬工業) は第三世代セファロスポリン薬を含有した半流動培地であり, 6時間で ESBL 産生菌のスクリーニングが可能である²²⁾。また, クロモアガー ESBL 培地 (バイオメリュージャパン) を用いた MCD 法も約3時間で ESBL 産生菌等の耐性菌スクリーニングが可能である⁴⁾。血液培養においては, 薬剤耐性の迅速検出が抗菌薬治療に有用であるため, 重症例など必要に応じて実施できる体制を準備しておく事が重要である。

(2) プラスミド性 AmpC 産生菌

1) 臨床的意義と耐性機序

Ambler の分類にてクラス C に属する β -ラクタマーゼ (セファロスポリナーゼ) であり, AmpC β -ラクタマーゼとも呼ばれている。*Enterobacter* spp. や *Citrobacter* spp. などが色体性 AmpC 産生遺伝子を保有している事が知られているが, DHA 型や CIT 型などのプラスミド性 AmpC β -ラクタマーゼ (pABL) の存在が知られている。AmpC は第1, 2, 3 世代セファロスポリン系とモノバクタム系に加え, セファマイシン系やオキサセフェム系薬まで分解するが, 第4世代セファロスポリンはあまり分解できない特徴をもつ。*Klebsiella* spp., *Proteus* spp. および *Salmonella* spp. においては染色体性 AmpC 遺伝子を保有していないため, セファマイシン耐性などを示した場合には pABL を疑い検査を進めるのがよい。近年 ESBL 産生菌の治療にセファマイシン系が使用されるケースが増加しているが, pABL 産生菌はセファマイシン系を分解するため, 正確に ESBL 産生菌との鑑別が必要である。また, ESBL と pABL の同時産生株も存在し, これらの菌のアウトブレイクの報告²³⁾もあることから, 臨床的にも疫学的にも必要時には確認試験が重要となる。

2) 検査法と解釈

CLSI には pABL 検出方法に関する記載はなく, 標準法は

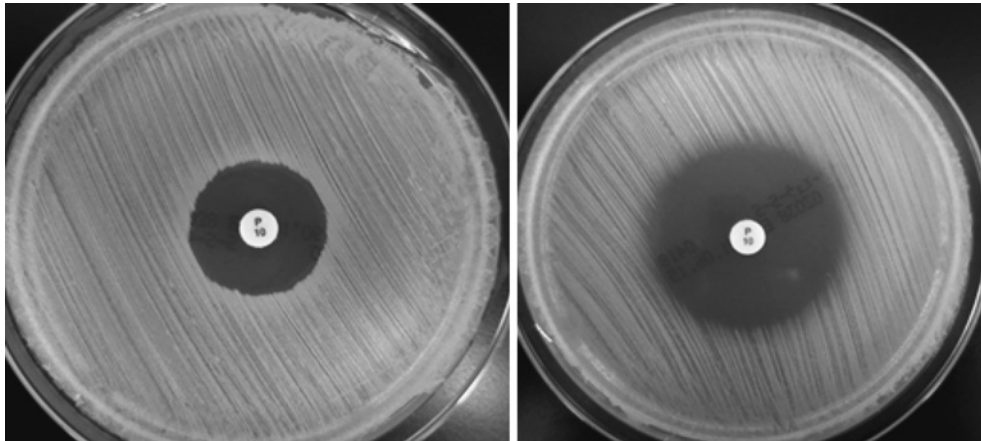
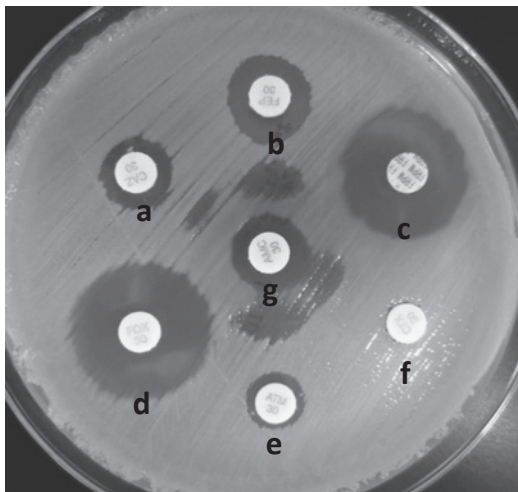


図1. *Staphylococcus aureus* における Penicillin disk zone edge test
 左：陽性（阻止円の辺縁が明瞭で崖状（クリフ状）を示す）
 右：陰性（阻止円の辺縁が不明瞭で砂浜状（ビーチ状）を示す）

A: CTX-M型ESBL産生*Escherichia coli*



B: CIT型AmpC産生*Escherichia coli*

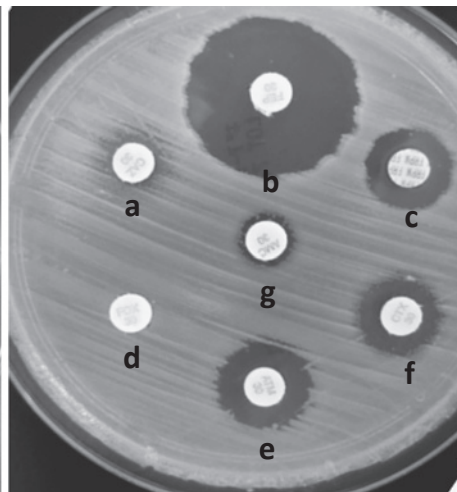


図2. Double Disk Synergy Test (DDST) の1例

（公立那賀病院ではESBL検出と同時にFRPMによるカルバペネマーゼ、CFXによるAmpCのスクリーニングも同時に実施している）

a: ceftazidime (CAZ), b: cefepime (CFPM), c: faropenem (FRPM), d: ceftiofur (CFX), e: aztreonam (AZT), f: cefotaxime (CTX), g: amoxicillin/clavulanic acid (AMPC/CVA)

A: CTX-M型ESBL産生*Escherichia coli*

セファロスポリン系薬とモノバクタム系であるa, b, e, fと、阻害薬であるgの間に阻止帯の形成を認めるため、ESBL陽性と判定する。

B: CIT型AmpC産生*Escherichia coli*

セファロスポリン系薬とモノバクタム系であるa, b, e, fと、阻害薬であるgの間に阻止帯の形成を認めず、d（セファマイシン系）に耐性、かつb（第四世代セファロスポリン）に感性を示すため、ESBLではなくAmpC産生を疑う

確立されていない。*Klebsiella* spp., *Proteus* spp.および*Salmonella* spp.においてAmpC産生が疑われれば、pABLである可能性が高い。上記以外のEnterobacteralesは染色体性AmpC遺伝子を保有しているため、表現型試験だけではpABLとの鑑別は困難であり、遺伝子検査が必要となる。*E. coli*は染色体性AmpC遺伝子を保有しているが、通常ほとんど発現していない。酵素発現に関与するプロモーターの変異で過剰産生となるが、染色体性とpABLとの鑑別は困難であり、遺伝子検査が必要とされている。ただし、*E. coli*においてはpABLの方が染色体性よりMIC値が高くなる傾向

があるため、セファマイシン耐性かつESBL確認試験陰性株においてCTX ≥ 6 $\mu\text{g/mL}$ のMIC値を示す株はpABLの可能性が高いとの報告があり²⁴⁾、プラスミド性か染色体性を推測できるポイントとなる。

①modified hodge test

かつてCLSIにてカルバペネマーゼ検出法として推奨されていた方法であるが、セファマイシン系薬ディスクを用いて実施することでAmpCを検出することができる。*E. coli* ATCC 25922株をMcF0.5に調整し、10倍希釈してMH培地に塗布し、培地中央にcefmetazoleやCFXなどのセファ

マイシン系薬ディスクを設置する。被検菌株を白金耳や綿棒で採取し、ディスクからシャーレの外側に直線的に塗布をする。一昼夜培養後、被検菌の発育と阻止円の交差部分で、*E. coli* ATCC 25922 株の発育増強がみられれば陽性となる。同様の原理を用いた方法の一つとして、より感度の良い方法として三次元拡散法も有用である²⁵⁾。ただし、セファマイシンを分解するカルバペネマーゼ産生株において偽陽性を示すことがあるため注意が必要である。

②阻害薬を用いた確認試験

pABL はクラス C に属する β -ラクタマーゼであるため、m-アミノフェニルボロン酸 (m-aminophenylboronic acid ; APBA) とクロキサシリン (cloxacillin : MCIPC) により活性が阻害される性質がある²⁴⁾²⁵⁾。そのため、第3世代セファロスポリン系薬やセファマイシン系薬等に対してこれらの薬剤にて阻害反応が認められれば、AmpC であることを確認することができる。APBA 阻害試験では 50 mg/mL, 6 μ L 添加, MCIPC 阻害試験では 75 mg/mL, 10 μ L を添加する²⁶⁾²⁷⁾。添加なしと比較して 5 mm 以上の阻止円の拡大を認めれば陽性と判定する。ただし、APBA では KPC 型カルバペネマーゼ産生株にて偽陽性を示す点に注意する。また、稀に APBA 感受性菌も存在するため、ブランクディスクを用いた偽陽性防止の確認も有用である。AmpC/ESBL 鑑別ディスク (関東化学) は、ESBL 産生、AmpC 産生および ESBL と AmpC 同時産生株も判定可能であり有用である。

(3) カルバペネム耐性・カルバペネマーゼ産生菌

1) 臨床的意義と耐性機序

カルバペネム系薬は、グラム陰性桿菌に対する感染症治療において非常に重要な抗菌薬であるが、これらの治療を困難とさせる耐性菌が存在する。*Enterobacterales* におけるカルバペネム耐性機構としては、カルバペネマーゼ非産生腸内細菌目細菌 (non-Carbapenemase Producing *Enterobacterales* : non-CPE) と、カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (Carbapenemase Producing *Enterobacterales* : CPE) とに分類される。前者は主に AmpC や ESBL の過剰産生に外膜変異によるポーリン孔の減少が加わる事で耐性を獲得したものである。後者はカルバペネムをも分解する β -ラクタマーゼであるカルバペネマーゼ産生を獲得した株である。これらは *Enterobacterales* だけではなく、*Pseudomonas* spp. や *Acinetobacter* spp. などのブドウ糖非発酵菌群においても問題の耐性機構となっている。カルバペネマーゼは、Ambler の分類にてクラス B に属するメタロ β -ラクタマーゼ (Metallo- β -lactamase : MBL) と、クラス A または D に属するセリン型カルバペネマーゼに分類される。臨床的に重要なプラスミド性カルバペネマーゼとしては、MBL ではわが国で最も多く報告がある IMP 型をはじめ、VIM 型や NDM 型などの遺伝子型が分類され、セリン型カルバペネマーゼではクラス A の KPC 型や GES 型、クラス D の OXA-48 型などに分類される。

CPE の中には、薬剤感受性検査においてカルバペネム薬に必ずしも耐性を示さない、いわゆる“ステルス型”と呼ばれる株が存在し、これらは通常の薬剤感受性検査だけでは検出が困難である。ステルス型 CPE の検出基準として、EUCAST では疫学的カットオフ値として MEPM の MIC 値

が $>0.12 \mu\text{g/mL}$ を示した場合にカルバペネ検出試験を実施することが推奨されている。そのため、現時点でステルス型 CPE の検出に必要なスクリーニング方法としては、①MEPM において $0.12 \mu\text{g/mL}$ 付近まで測定レンジの拡大測定、②FRPM スクリーニング²⁸⁾、③LMOX などを用いたスクリーニング²⁹⁾、④CPE 選択培地を用いたスクリーニング³⁰⁾などが挙げられる。上記の4条件のうち、少なくともいずれか一つの方法も実施していない場合は、ステルス型 CPE の検出は困難であるものと予想される。

カルバペネム耐性菌は、ステルス型 CPE も含めてカルバペネム単剤での抗菌薬治療が困難になるため、感染症例では抗菌薬選択に苦慮する事となる。加えて、ステルス型 CPE では、in vitro での薬剤感受性検査にて感性与判定されても、実際の in vivo の感染症治療では感染臓器の菌量が多い場合には臨床効果成績が良くない可能性がある³¹⁾。これらはいわゆる inoculum effect と呼ばれる現象であるため、ステルス型 CPE の検出は抗菌薬適正使用上においても重要な検査となる。過去には CPE の大規模なアウトブレイク事例も報告されており³²⁾、CPE 等のカルバペネマーゼ産生菌は院内感染対策上でも極めて重要な耐性菌となる。耐性菌の水面下での拡大を防止するためには、耐性菌の早期発見が非常に重要となるため、適切な耐性菌検査の実施が大きな防御壁となる事は明白であろう。

2) 検査法と解釈

カルバペネマーゼの表現型試験の検査法としては、カルバペネマーゼ全般の検出法と、MBL 等の確認試験に分類される。MBL 確認試験のみの実施ではセリン型カルバペネマーゼ菌が検出できずに見落とす可能性があるため、まずはカルバペネマーゼ検出試験から実施することが推奨される。MBL かセリン型カルバペネマーゼ産生菌かどうかの鑑別試験は、抗菌薬選択や感染制御の観点からも、できる限り実施しておくことが望ましい。

①自動機器を用いた CPE 検出法

a. BD フェニックスの「グラム陰性菌用 CPO パネル」

自動機器を用いた薬剤感受性検査は広く実施されているが、ステルス型を含めて機器の結果のみで CPE 検出を確定することは難しい。しかしながら、近年自動機器にて特定の薬剤感受性パネルとカードを使用することで CPE 推定が可能となってきた。BD フェニックスの「グラム陰性菌用 CPO パネル」(日本 BD) では、MEPM や doripenem, temocillin や MCIPC に加え、様々な β -ラクタマーゼのキレート剤と阻害剤の測定結果の組み合わせのアルゴリズムにより CPO の検出を可能としているとされている³³⁾³⁴⁾が、その詳細は公開されていない。薬剤感受性検査と同時に CPE 検出が可能であるため迅速性にも優れており、多くの論文報告でその性能が検証されている^{33)~37)}。

b. VITEK2 感受性カード AST-XN17

VITEK2 感受性カード AST-XN17 (バイオメリュージャパン) は、ルーチンで使用される薬剤感受性カードに追加して測定することで、耐性菌のスクリーニングや治療に使用される薬剤の感受性検査や ESBL 確認試験を追加実施できるカードである。われわれはこのカードの追加測定により、MEPM に加え CPE スクリーニング薬剤である FRPM, lata-

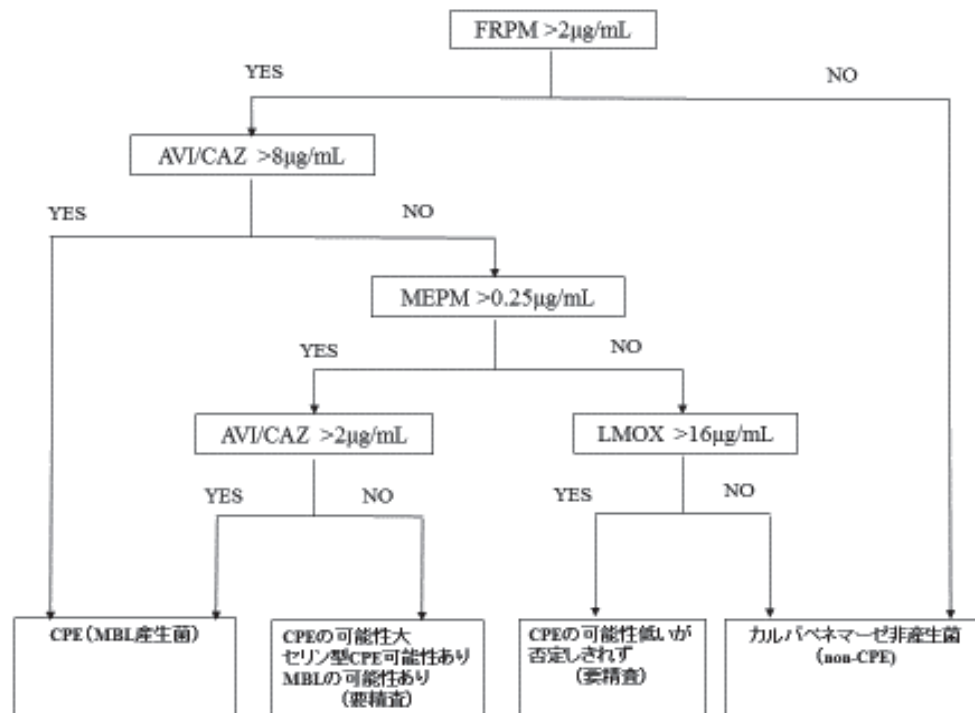


図3. VITEK2 AST-XN17 カードを用いた薬剤感受性検査による CPE スクリーニングのアルゴリズム (文献 38 より引用改変)

CPE: Carbapenemase producing Enterobacterales, FRPM: faropenem, MEPM: meropenem, LMOX: latamoxef, AVI/CAZ: avibactam/ceftazidime

moxef, および avibactam /ceftazidime (AVI/CAZ) の測定結果を用いた CPE 検出のアルゴリズム (図 3) を報告した³⁸⁾。このアルゴリズムはわが国で検出率の高い MBL を高確率で検出可能であり、自動機器の測定で簡便かつ迅速に実施できる有用な方法であると考えられる。

②カルバペネマーゼ検出試験

a. modified Carbapenem Inactivation Method test (mCIM)

van der Zwaluw らが報告した Carbapenem Inactivation Method test³⁹⁾を原法とした改良法であり、2017 年に CLSI M100-S27 にて初めて採用されたカルバペネマーゼ産生菌検出試験である。現在の CLSI では、対象菌種は *Enterobacterales* と *Pseudomonas aeruginosa* であり、実施条件は IPM と MEPM が非感性 (MIC $\geq 2 \mu\text{g/mL}$) であった場合に推奨されている³⁾。しかしながら、現実的にはカルバペネム感性を示すステルス型が存在するため、前項で述べたスクリーニング基準を満たした場合には本試験を実施されることが望ましい。検査手順としては、まず 2 mL トリプチケースソイブロスに血液寒天で一昼夜培養したコロニーを *Enterobacterales* では 1 μL ループ、*P. aeruginosa* では 10 μL ループで 1 杯採取し、混濁する。これに 10 μg MEPM ディスクを入れ、 $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ で 4 時間 ± 15 分で培養する。その後 McF0.5 に調整した *E. coli* ATCC 25922 の調整菌液を MH 培地上に接種し、反応させた MEPM ディスク取り出して設置し、 $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 、18-24 時間培養を実施する。MEPM ディスクの阻止円直径を測定し、6~15 mm で陽性、16~18 mm で判定保留、19 mm 以上で陰性と判定する。ただし、阻止円内での発育

(satellite colony) が出現した場合は、6~18 mm で陽性、19 mm 以上で判定保留とする (表 2)。阻止円周囲の発育 (Narrow ring of growth) は無視する。mCIM 法が陽性の場合、全てのカルバペネム薬は耐性として報告する必要がある³⁾。われわれが実施した IMP 型を主とする CPE 分離株を用いた mCIM の性能評価の検討では、非常に優れた感度特異度の成績を示しており、非常に有用な方法であると考えられる⁴⁰⁾。注意点としては、結果の得るのに一昼夜の培養を要し迅速性に欠けること、一部の遺伝子型で偽陰性の報告があること、およびブドウ糖非発酵菌群ではやや感度が劣り、特に *Acinetobacter* spp. においては検出感度が低く、現在は推奨されていない点である。

b. carba NP test

2012 年に Dortet らにより報告されたカルバペネマーゼ検出法である⁴¹⁾。被検菌のカルバペネマーゼの存在を、IPM の分解により産生された水素イオンを PH 指示薬 (フェノールレッド) の変化によって検出する方法である。現在の CLSI 推奨法の一つであるが、CLSI 推奨法は原法とはやや異なり手順が少し改良されている。まず IPM 濃度 6 mg/mL のフェノール・ZnSO₄ を試薬として調整 (用事調整が望ましい) する。1 μL ループの菌を Lysis buffer 100 μL に溶解して菌液とする。IPM 溶液 100 μL に菌液 100 μL を加え、 37°C 、2 時間インキュベート後、黄色への色調の変化があれば陽性と判定する³⁾。迅速性に優れており、感度特異度も高く迅速性に優れた方法であるが、調整試薬の失活が早い用事調整が望ましいこと、OXA-48 型や GES 型など一部の遺伝子型や、ムコイド型集落株においては偽陰性となる場合がある⁴⁰⁾

表 2. mCIM, CIM-tris, sCIM の検査手順の比較

	mCIM	CIM-tris	sCIM
判定基準 (mm)			
陽性	6-15	6-15	6-20
陽性 (SC ありの場合)	16-18	16-18	21-22
判定不能	16-18	16-18	23-25
陰性	≥19	≥19	≥26
使用ディスク	MEPM	MEPM	IPM
ディスクインキュベーション時間	4 時間	2 時間	なし
菌液調整液	トリブチケース ソイブロス 2 mL	トリス塩酸 バッファー 400 μL	なし (集落をディスクに直接塗布)
前培養	一昼夜	一昼夜	1 ~ 3 日

SC : satellite colonies

ことに注意する必要がある。RAPIDEC CARBA NP (バイオメリュージャパン) や CARBA PAcE (関東化学) などのキット試薬も市販されており、使用可能である。

c. CIM-Tris 法

CIM 原法を基として、菌液調整に 0.5M Tris-HCl buffer (pH7.6) を使用することで、酵素活性を高めて検出感度を向上させた方法である⁴²⁾。血液寒天で一昼夜培養したコロニーを用いて、400 μL の 0.5M Tris-HCl buffer (pH7.6) に 10 μL ループ 1 杯の菌を溶解して混和する。これに MEPM10 μg ディスクを加えて 35℃、2 時間インキュベートする。あとは mCIM と同様に *E. coli* ATCC 25922 菌液を MH 培地に塗布し、インキュベートした MEPM ディスクを設置、35℃、18 時間培養する。判定は、阻止円径 6~15 mm にて陽性、16~18 mm では判定保留、19 mm 以上で陰性と判定する (表 2)。*Pseudomonas* spp. や *Acinetobacter* spp. では感度よく検出することが可能である⁴²⁾⁴³⁾。注意点としては、Tris-HCl buffer 自体が MEPM の抗菌活性を低下させる⁴⁴⁾ため、インキュベート時間を厳守しないと偽陽性の原因となる可能性がある。さらに培養時間や接種菌量を改良調整した CIM-Tris II 法も報告されており⁴⁵⁾、それを利用した KBM CIM-Tris II キット (コージンバイオ) がキット試薬として市販されている。

d. その他の CIM 変法

CIM 法の改良法は多くの研究報告がされている。精製水やブロスを用いたインキュベートを実施せず、ディスク裏面に直接被検コロニーを 1~3 個分を塗り付けるといふ、シンプルで簡便な変法が simple-CIM test (sCIM) である⁴⁶⁾。使用ディスクは MEPM ではなく IPM ディスクを使用する点が本法の大きな特徴である (表 2)。sCIM は *Enterobacterales* については mCIM と同等の性能を示しており、十分使用可能な方法であると思われる⁴³⁾。1~3 日培養した集落でも検出できる利点があるが、24 時間以内の集落では偽陰性となる傾向がみられるため注意が必要である。

迅速判定を可能とした方法としては、rapid CIM (rCIM) は約 2.5 時間で判定が可能とされている。判定に阻止円直径ではなく菌液の濁度差を用いることで迅速診断を可能としている。精製水 1 mL に 10 μL ループ 2 杯分の集落を溶解し、そこに MEPM ディスク 2 枚を加えて 30 分インキュベートする。10000 rpm, 5min 遠心後の上清 500 μL を、McF1.0

に調整した *E. coli* ATCC 25922 菌液 2500 μL に加え、2 時間培養後に濁度計を用いて濁度を測定する。培養前と比較して濁度 0.5 以下の上昇であれば陰性、>0.5 の濁度上昇を認めれば陽性と判定する⁴⁷⁾。

他にも、CIM 原法に 0.3 mM となるよう硫酸亜鉛 (ZnSO₄) を加えて、MBL の酵素活性を増加させて検出感度を向上させた zCIM 法⁴⁸⁾が報告されている。*Acinetobacter* spp. に対する検出法として、CLSI では非推奨の mCIM を改良し、ブロス量や菌量を調節してとて検出感度を向上させた改良法⁴⁴⁾⁴⁹⁾や、20 mM MOPS 緩衝液に 2.0% Triton X-100 (v/v) を加えた溶液で菌液調整し、感度を向上させた LCIM などが報告されている⁵⁰⁾。

③MBL 確認試験

カルバペネマーゼは Ambler 分類のクラス B に属する MBL と、クラス A または D に属するセリン型カルバペネマーゼに分類されるが、これらの分類は疫学上重要であり、感染制御の面からも必要な検査となる。MBL は亜鉛を活性とするため、亜鉛のキレート剤である EDTA、メルカプト酢酸、ジコピリン酸 (DPA) などによる阻害反応を用いることで、MBL であることを確認試験として証明することが可能である。

a. 阻害剤を用いた mCIM 法による確認試験

通常の mCIM に加えて MBL 阻害剤を添加して実施することで、阻止円径の変化から MBL の存在を検知する確認試験である。CLSI では通常の mCIM に加えて 0.5M EDTA 20 μL を添加する方法が EDTA CIM (eCIM) がとして推奨されている³⁾。本検査はまず mCIM 陽性であることが前提となるが、通常法と比較して 5 mm 以上の阻止円拡大にて MBL、それ以外ではセリン型カルバペネマーゼと判定する³⁾。EDTA の代わりにメルカプト酢酸ナトリウムを含有する SMA ディスク (栄研化学) を添加して実施する SMA-mCIM も報告されている⁵¹⁾。判定は eCIM と同様に 5 mm 以上の阻止円拡大にて MBL、それ以外ではセリン型カルバペネマーゼと判定する。阻害剤は遺伝子型により反応に違いがあり、eCIM は IMP 型での感度が低く⁵²⁾⁵³⁾、SMA-mCIM は NDM 型での感度が低い傾向にある⁵³⁾ため、使用する阻害剤によって判定時には注意が必要である。

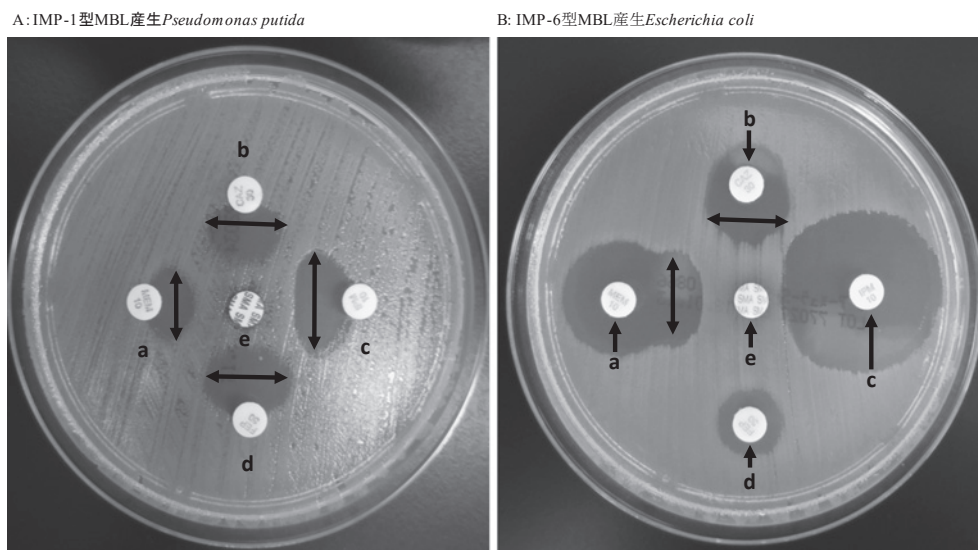


図4. SMA ディスクを用いた Double Disk Synergy Test (DDST) 変法の1例

a: meropenem (MEPM), b: cefepime (CFPM), c: imipenem (IPM), d: ceftazidime (CAZ), e: sodium mercaptoacetic acid (SMA)

A: IMP-1 型 MBL 産生 *Pseudomonas putida*

a, b, c, d と阻害薬である e の間にてディスク間からみて垂直方向への阻止帯の拡大を認める。

B: IMP-6 型 MBL 産生 *Escherichia coli*

a, d と阻害薬である e の間にてディスク間からみて垂直方向への阻止帯の拡大を認める。

b. 阻害剤を用いたディスク拡散法による確認試験

ディスク拡散法を用いた MBL 確認試験は多数報告されている。EDTA やメルカプト酢酸を添加する場合、これらの薬剤自体に抗菌活性を有する場合があるため、対象薬剤の隣に設置したブランクディスクに阻害剤を添加して、阻止帯の形成の有無を確認する必要がある。SMA ディスク（栄研化学）を用いる場合も、IPM や CAZ を対象薬剤として 20 mm の距離をあけて隣に設置し、培養後に阻止帯の形成の有無を確認する。阻止帯の判定時の注意点として、ディスク間に対して垂直方向への阻止帯の形成を見る必要がある。平行方向への伸び（ディスクに引っ張られる現象）だけ認める場合は、判定保留として他法にて確認した方がよい。また、SMA を中心に 4 薬剤を設置する DDST 変法（図4）も有用である⁵⁴⁾。複数の耐性機序が存在する株や、IPM に感性を示す IMP-6 産生株などの検出において本法は有用である。ただし、SMA ディスクは NDM 型においては阻害反応が劣る傾向にあるため、ディスク間の距離を縮めて実施しないと偽陰性となる場合があるので注意する。カルバペネマーゼ鑑別ディスク Plus（関東化学）では、FRPM ディスクと DPA 添加 FRPM ディスクとの阻止円径を比較し、5 mm 以上の阻止円拡大が認められれば MBL 陽性と判定する。

c. MIC 値を用いた確認試験

阻害剤の添加により、MIC 値が低下することで MBL の存在を確認することが可能である。この場合は ESBL 確認試験と同様に 3 管以上の MIC 値の低下にて陽性と判定する。ドライプレート DPE1（栄研化学）では、DPA を用いた阻害試験が実施可能である。Etest（バイオメリュージャパン）では、IPM と MEPM にて EDTA との阻害試験が可能な製品が市販されている⁵⁵⁾。Etest では、MIC 値の低下以外にストリップの中央にファントム現象と呼ばれる阻止帯を認める場

合があるが、この場合も MBL 陽性と判定可能である。

④セリン型カルバペネマーゼ確認試験

セリン型カルバペネマーゼにおいて、表現型試験による確認試験が可能であるのは KPC 型のみである。KPC はクラス A に属するものの、特異的に APBA により阻害される特徴があるため、これを用いた阻害試験が有用となる。MEPM 等のカルバペネム系薬剤に、pABL 確認試験と同様に APBA 50 mg/mL、6 μ L 添加してディスク拡散法を実施し、5 mm 以上の阻止円拡大にて陽性と判定する。ただし、AmpC 過剰産生と膜変異によりカルバペネム耐性を獲得した株では、本法は偽陽性を示す場合があるので注意すべきである。そのためには、まず mCIM や Carba NP test にてカルバペネマーゼ産生を確認した上で実施すること、または MCIPC 阻害試験を実施して AmpC 陰性を確認することが有用である。カルバペネマーゼ鑑別ディスク Plus では、KPC 型や AmpC 過剰産生と膜変異も併せて鑑別することが可能である。その他のセリン型カルバペネマーゼについては、確認試験とまでは言えないがクラス分類を推測可能な表現型試験がある。Uechi らは mCIM に CVA1 mg を添加して実施することで、GES 型産生株にて阻害反応が確認できたと報告しており⁴²⁾、この方法によりクラス A カルバペネマーゼであることが推定可能である。クラス D カルバペネマーゼに関しては、現在特異的阻害剤は発見されていないため、表現型試験による検出方法は確立していない。カルバペネマーゼ産生を確認し、MBL とクラス A を否定した上で temocillin ディスクによるディスク拡散法を実施し、10 mm 以下の阻止円径であれば、クラス D である OXA 型カルバペネマーゼの可能性が考えられる⁵⁶⁾。

(4) 多剤耐性グラム陰性桿菌

本稿における多剤耐性グラム陰性桿菌とは、CRE や CPE

のようなβ-ラクタム系薬耐性に加え、アミノグリコシド系やニューキノロン系、テトラサイクリン系などの幅広い系統に耐性を示し、感染症の原因菌となった場合に抗菌薬選択に苦慮する多剤耐性菌を示す。多剤耐性緑膿菌 (MDRP) や、多剤耐性アシネトバクター (MDRA)、そして多系統薬剤耐性を獲得した CRE などである。本邦におけるこれらの感染症報告は減少傾向ではあるが、いつどこで発生するかわからない。近年ではわが国でも tazobactam/ceftolozane や、relebactam/meropenem などの新薬が治療薬として使用可能となってきたが、これらの耐性菌に対して明確に有効といえる抗菌薬は少なく、新薬の薬剤感受性検査を実施できる状況も十分整っているとは言えないのが現状であろう。そのため、治療上有効な抗菌薬を確認するためには、臨床微生物検査室として可能な限りの検査を実施していく体制準備が必要となる。

1) 抗菌薬併用効果スクリーニング

多剤耐性菌の抗菌薬治療においては、単剤での治療が困難な場合が多い。しかしながら、1 剤では耐性を示しても、2 剤以上の併用によってブレイクポイントを下回り、臨床的効果が期待できる可能性がある。ブレイクポイント・チェッカーボード法を用いた BC プレート (栄研化学) は、2 薬剤の併用効果を確認できる方法である⁵⁷⁾。MDRP を対象に作成されたプレート試薬ではあるが、MDRA や CRE に対しても使用可能である。本検査は 2020 年の診療報酬改定より「抗菌薬併用効果スクリーニング」として 150 点が算定可能となっており、臨床的意義が高く必要時には実施すべき検査である。

2) 高度アミノグリコシド耐性試験

アミノグリコシド系薬は尿路感染症以外での単剤治療では選択し難い薬剤ではあるが、多剤耐性菌治療において感性を示す場合には併用薬として選択されることがある。アミノグリコシド系の主要な耐性機構は、アミノグリコシド系薬修飾酵素産生による不活化である。特に AAC (6') を獲得すると amikacin (AMK) を始めとする多くのアミノグリコシド系薬に耐性となる。そして、最も問題となるのが *ArmA* 遺伝子等の獲得による 16S rRNA メチラーゼ産生であり、アミノグリコシド系薬全てが高度耐性となる厄介な耐性機構である。この鑑別試験として、arbekacin (ABK) の薬剤感受性検査が使用可能である。ABK は本来抗 MRSA 薬として位置づけられているため、グラム陰性桿菌に対して薬剤感受性検査はほぼ実施されていないと思われるが、ABK を用いたディスク拡散法により阻止円が認められなければ 16S rRNA メチラーゼの可能性が高くなり、アミノグリコシド系の併用療法は難しいことが推測可能となる。阻止円を認めた場合は 16S rRNA メチラーゼ産生の可能性は低いと判断され、適応外ではあるが ABK による併用療法が有効である可能性が残されている。実際に ABK を用いた MDRP への併用療法が有効と思われる報告がある⁵⁸⁾⁵⁹⁾。16S rRNA メチラーゼ産生菌は諸外国では分離報告が多く、特に NDM 産生菌では高確率で高度アミノグリコシド耐性も獲得していると報告されている。本邦での発生報告は少ないものの 16S rRNA メチラーゼ産生 *Acinetobacter* 属の分離報告がされており⁶⁰⁾、発生に備えて検査の準備をしておくことが肝要である。

3) コリスチン耐性試験

Colistin (CL) は多剤耐性グラム陰性桿菌治療において最後の砦と言っても過言ではない重要な薬剤である。しかしながら、近年プラスミド性の *mcr* 遺伝子等の拡散により CL 耐性菌の増加が報告されている。*mcr* 遺伝子保有株は中国での報告が多いが、本邦でも家畜などでの保有検査にて報告されており、本邦においても水面下での耐性菌の拡散が懸念されている。一方で CL の薬剤感受性検査にも課題があるとされている。自動分析装置等での薬剤感受性検査が難しい場合が多く、その精度の検証も十分とは言えない状況である。ディスク拡散法などブロスを用いた微量液体希釈法偽以外では偽感性傾向を示し、精度が低い可能性が示唆されている⁶¹⁾。そのため、CLSI では *Enterobacteriales* と *P. aeruginosa* を対象とした CL の感受性検査として、Colistin Broth Disk Elution (CBDE) 法を推奨している³⁾。10 mL のミューラーヒントンブロス (CAMHB) 4 本を準備し、各ブロスに CL10 µg ディスクを 1 本目に 1 枚 (1 µg/mL)、2 本目に 2 枚 (2 µg/mL)、3 本目に 4 枚 (4 µg/mL)、4 本目は添加なし (0 µg/mL) とし、ディスクを入れて希釈系列を作成する。ボルテックスミキサーにて混和後 30 分室温放置し、被検菌を McF0.5 に調整して各ブロスに 50 µL 添加し、ゆっくりと混和する。33~35°C にて 16~20 時間好気培養し、CAMHB 4 本目を Growth Control として各 CAMHB の発育から MIC 値を読み取り、1 µg/mL で感性、2 µg/mL で中間、4 µg/mL で耐性と判定する³⁾。CL での抗菌薬治療が実施される場合には、本検査を考慮すべきである。

おわりに

耐性菌の表現型試験は、高額な機器を導入する必要は少ない、試薬の準備等だけでどの臨床微生物検査室でも幅広く実施可能と思われる検査法である。抗菌薬治療や感染制御に直結する検査でもあるため、常に実施する必要がある検査ではないが、臨床的意義が高いケースなど必要時に実施できる体制を整えておくべきである。しかしながら、各検査法にはビットフォールも存在するため、その結果の解釈にも注意が必要であり、それらの特徴を知っておく必要がある。特に CPE の検査法においては様々な検査法が報告されているが、現時点ではどれも一長一短あることから、複数の方法を組み合わせて検査精度を高めていく事が肝要であると考えられる。今回紹介した耐性菌の表現型試験が、各施設における ICT や AST に貢献できる臨床微生物検査の運用として、一助になれば幸いである。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) García-Álvarez, L., M.T.G. Holden, H Lindsay, et al. 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study. *Lancet Infect. Dis* 11: 595-603.
- 2) Shore, AC, EC Deasy, P Slickers, et al. 2011. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying

- highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 55: 3765-3773.
- 3) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2022. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 32th Informational Supplement N100-S32, CLSI, Wayne, PA.
 - 4) Kuchibiro, T, A Hirano, S Ogasawara, et al. 2020. The microcolony detection method (MCD), a simple and rapid screening test for antimicrobial resistance bacteria on positive blood cultures. *Heliyon* 6: e05494.
 - 5) Kaase, M, S Lenga, S Friedrich, et al. 2008. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 14: 614-616.
 - 6) Gill, VJ, CB Manning, CM Ingalls, et al. 1981. Correlation of penicillin minimum inhibitory concentrations and penicillin zone edge appearance with staphylococcal beta-lactamase production. *J Clin Microbiol* 14: 437-440.
 - 7) 菊池 賢, 橋本正良. 2021. 日本語版サンフォード感染症治療ガイド (第51版), ライフサイエンス出版, 東京.
 - 8) JAID/JSC 感染症治療ガイド・ガイドライン作成委員会. JAID/JSC 感染症治療ガイド2019, 日本感染症学会・日本化学療法学会.
 - 9) Torres, C, C Tenorio, M Lantero, et al. 1993. High-level penicillin resistance and penicillin-gentamicin synergy in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2427-2431.
 - 10) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical breakpoints - breakpoints and guidance (Ver 12.0), valid from 2022-01-01.
 - 11) 細菌性髄膜炎診療ガイドライン作成委員会. 細菌性髄膜炎診療ガイドライン2014, 日本神経学会, 日本神経治療学会, 日本神経感染症学会.
 - 12) Kimura, K, S Suzuki, J Wachino, et al. 2008. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2890-2897.
 - 13) Nagano, N, Y Nagano, K Kimura, et al. 2008. Genetic heterogeneity in *pbp* genes among clinically isolated group B Streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 4258-4267.
 - 14) Kimura, K, J Wachino, H Kurokawa, et al. 2009. Practical disk diffusion test for detecting group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility. *J Clin Microbiol* 47: 4154-4157.
 - 15) Drieux, L, F Brossier, W Sougakoff, et al. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 14 (Suppl 1): 90-103.
 - 16) Tzelepi, E, P Giakkoupi, D Sofianou, et al. 2000. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 38: 542-546.
 - 17) Nordmann, P, L Dortet, L Poirel. 2012. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 50: 3016-3022.
 - 18) 上地幸平, 仲宗根勇, 野中実可子, 他. 2018. ESBLs 迅速検出法 modified ESBL NDP test の有用性に関する検討. *日臨微誌* 28: 173-182.
 - 19) 前田和樹, 大友志伸, 林 智弘, 他. 2018. ガラスビーズを用いた ESBLs 産生菌の迅速スクリーニング法. *医学検査* 67: 727-733.
 - 20) Dortet, L, L Poirel, P Nordmann. 2015. Rapid detection of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in blood cultures. *Emerg Infect Dis* 21: 504-507.
 - 21) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Rapid AST in blood cultures (Ver 5.1). https://www.eucast.org/rapid_ast_in_blood_cultures/ 2022年8月1日現在.
 - 22) 茂木千代子, 大崎さゆり, 栗田佳祐, 他. 2021. 当院のグラム陰性桿菌による菌血症における E-GSI 培地の有用性. *日臨微誌* 31: 197-200.
 - 23) 中家歩美, 山崎勝利, 近藤孝美, 他. 2014. 日本赤十字社和歌山医療センターでアウトブレイクが疑われた ESBL およびプラスミド性 AmpC 同時産生 *Klebsiella pneumoniae* に関する解析. *日臨微誌* 24: 131-137.
 - 24) Jordy, PM, T Coolen, PM Evert, et al. 2019. Development of an algorithm to discriminate between plasmid- and chromosomal-mediated AmpC β -lactamase production in *Escherichia coli* by elaborate phenotypic and genotypic characterization. *J Antimicrob Chemother* 74: 3481-3488.
 - 25) Coudron, PE, ES Moland, KS Thomson, et al. 2000. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol* 38: 1791-1796.
 - 26) Yagi, T, J Wachino, H Kurokawa, et al. 2005. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 43: 2551-2558.
 - 27) Brenwald, NP, G Jevons, J Andrews, et al. 2005. Disc methods for detecting AmpC β -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 56: 600-601.
 - 28) 中村竜也, 小林紗織, 大沼健一郎, 他. 2017. カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) のディスク拡散法を用いたスクリーニング検査に関する検討. *感染症学雑誌* 91: 14-19.
 - 29) Imai, W, M Sasaki, K Aoki, et al. 2017. Simple Screening for Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* by Moxalactam Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol* 55: 2276-2279.
 - 30) Viau, R, KM Frank, MR Jacobs, et al. 2016. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods. *Clin Microbiol Rev* 29: 1-27.
 - 31) Adler, A, M Ben-Dalak, I Chmelnitsky, et al. 2015. Effect of Resistance Mechanisms on the Inoculum Effect of Carbapenem in *Klebsiella pneumoniae* Isolates with Borderline Carbapenem Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 5014-5017.

- 32) 国立感染症研究所. 2014. 病原微生物検出情報(IASR). IASR 35: 290-291.
- 33) Thomson, G, D Turner, W Brasso, et al. 2017. High-Stringency Evaluation of the Automated BD Phoenix CPO Detect and Rapidec Carba NP Tests for Detection and Classification of Carbapenemases. J Clin Microbiol 55: 3437-3443.
- 34) Croxatto, A, AT Coste, T Pillonel. 2020. Evaluation of the BD Phoenix™ CPO Detect Test for the detection of carbapenemase producers. Clin Microbiol Infect 26: 644-644.
- 35) Jonas, D, S Reuter, S Klassen, et al. 2021. Evaluation of the BD Phoenix CPO detect panel for prediction of Ambler class carbapenemases. Sci Rep 11: 13150.
- 36) Berneking, L, A Both, B Berinson, et al. 2021. Performance of the BD Phoenix CPO detect assay for detection and classification of carbapenemase-producing organisms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 40: 979-985.
- 37) Simon, M, S Gatermann, Y Pfeifer, et al. 2019. Evaluation of the automated BD Phoenix CPO Detect panel in combination with the β -CARBA assay for detection and classification of carbapenemase-producing *Enterobacterales*. J Microbiol Methods 156: 29-33.
- 38) Kuchibiro, T, M Komatsu, K Yamasaki, et al. 2022. Evaluation of the VITEK2 AST-XN17 card for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacterales* in isolates primarily producing metallo β -lactamase. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 41: 723-732.
- 39) van der Zwaluw, K, A de Haan, GN Pluister, et al. 2015. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. PLoS One 10: e0123690.
- 40) Kuchibiro, T, M Komatsu, K Yamasaki, et al. 2018. Evaluation of the modified carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. J Infect Chemother 24: 262-266.
- 41) Dortet, L, L Poirel, P Nordmann. 2012. Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas* spp. J Clin Microbiol 50: 3773-3776.
- 42) Uechi, K, T Tada, K Shimada, et al. 2017. A Modified Carbapenem Inactivation Method, CIMTris, for Carbapenemase Production in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Species. J Clin Microbiol 55: 3405-3410.
- 43) Kuchibiro, T, M Komatsu, K Yamasaki, et al. 2021. Comparison of the performance of three carbapenem inactivation methods for the detection of carbapenemase-producing gram-negative bacilli. J Infect Chemother 27: 1634-1638.
- 44) Vu, TN, JH Byun, R D'Souza, et al. 2020. Adjustment of Modified Carbapenem Inactivation Method Conditions for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii*. Ann Lab Med 40: 21-26.
- 45) Uechi, K, T Tada, K Kuwahara-Arai, et al. 2019. An Improved Carbapenem Inactivation Method, CIMTrisII, for Carbapenemase Production by Gram-negative Pathogens. J Medical Microbiol 68: 124-131.
- 46) Jing, X, H Zhou, X Min, et al. 2018. The Simplified Carbapenem Inactivation Method (sCIM) for Simple and Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. Front Microbiol 9: 2391.
- 47) Muntean, MM, AA Muntean, L Gauthier, et al. 2018. Evaluation of the Rapid Carbapenem Inactivation Method (rCIM): A Phenotypic Screening Test for Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 73: 900-908.
- 48) Baeza, LL, N Pfennigwerth, C Greissl, et al. 2019. Comparison of Five Methods for Detection of Carbapenemases in *Enterobacterales* With Proposal of a New Algorithm. Clin Microbiol Infect 25: 1286.
- 49) Howard, JC, J Creighton, R Ikram, et al. 2020. Comparison of the performance of three variations of the Carbapenem Inactivation Method (CIM, modified CIM [mCIM] and in-house method (iCIM)) for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacterales* and non-fermenters. J Glob Antimicrob Resist 21: 78-82.
- 50) Yamada, K, K Aoki, T Nagasawa, et al. 2020. Carbapenem inactivation method using bacterial lysate and MOPS (LCIM): a very sensitive method for detecting carbapenemase-producing *Acinetobacter* species. J Antimicrob Chemother 75: 2812-2816.
- 51) Yamada, K, M Kashiwa, K Arai, et al. 2017. Evaluation of the modified carbapenem inactivation method and sodium mercaptoacetate-combination method for the detection of metallo- β -lactamase production by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. J Microbiol Methods 132: 112-115.
- 52) Tsai, YM, S Wang, HC Chiu, et al. 2020. Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. BMC Microbiol 20: 315.
- 53) Yamada, K, M Sasaki, W Imai, et al. 2019. Evaluation of inhibitor-combination mCIM for detecting MBL-producing *Enterobacterales* using three MBL inhibitors. J Med Microbiol 68: 1604-1606.
- 54) 日本臨床微生物学会検査法ガイド等作成委員会. 2017. 耐性菌検査法ガイド. 日臨微誌 27 (supplement 3): 108-109.
- 55) Walsh, TR, A Bolmström, A Qwärnström, et al. 2002. Evaluation of a New Etest for Detecting Metallo- β -Lactamases in Routine Clinical Testing. J Clin Microbiol 40: 2755-2759.
- 56) van Dijk, K, GM Voets, J Scharringa, et al. 2014. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. Clin Microbiol Infect 20: 345-349.
- 57) 西尾久明, 小松 方, 末吉範行, 他. 2011. 多剤耐性 *Pseudomonas aeruginosa* に対する併用薬スクリーニングのためのブレイクポイント・チェッカーボード法の有用性. 日化療誌 59: 29-33.
- 58) 樽本憲人, 阿部良伸, 山口敏行, 他. 2009. 多剤耐性緑膿

- 菌による尿路感染症に Aztreonam と Arbekacin の併用療法が奏功した一例. 環境感染誌 24: 279-282.
- 59) 荒岡秀樹, 馬場 勝, 米山彰子. 2009. Checkerboard plate を用いた多剤耐性緑膿菌に対する aztreonam とアミノグリコシド系抗菌薬の併用効果の検討. 感染症誌 83: 133-135.
- 60) Tada, T, T Miyoshi-Akiyama, K Shimada, et al. 2014. Dissemination of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and emergence of OXA-72 carbapenemase coproducers in Japan. Antimicrob Agents Chemother 58: 2916-2920.
- 61) Matuschek, E, J Åhman, C Webster, et al. 2018. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. Clin Microbiol Infect 24: 865-870.

Phenotyping tests for detection of antimicrobial-resistant bacteria useful for infection control and antimicrobial stewardship

Tomokazu Kuchibiro

Department of Clinical Laboratory, Naga Municipal Hospital

Detection of antimicrobial-resistant bacteria is one of the important missions in clinical microbiological laboratories. Such information is important for antimicrobial stewardship and infection control in the treatment of infectious diseases. In many cases, the results of antimicrobial susceptibility testing alone may be sufficient. However, it may be difficult to detect the resistance mechanism of some microorganisms only by performing an antimicrobial susceptibility testing. Phenotyping tests and genotyping tests are useful testing methods to elucidate such resistance mechanisms. This article introduces phenotypic tests that should be prepared as a clinical microbiological laboratory so that they can be performed when needed.