

研究経過報告書

1. 研究課題名：βラクタマーゼ阻害剤アビバクタムを用いた薬剤耐性菌検出法の構築
2. 研究代表者氏名：藤原 麻有
3. 研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

4. 研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

【研究背景】

近年、カルバペネム系抗菌薬をはじめとする広域抗菌薬に耐性を獲得したグラム陰性桿菌が世界的に問題となっている。日本で検出されるカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌(CPE)の酵素型は欧米のタイプとは異なり、カルバペネム系抗菌薬の薬剤感受性結果が必ずしも耐性を示さない株が存在する。薬剤耐性菌が見逃された場合は、耐性化助長などのリスクに繋がるため、これらの株を迅速に判定することが重要である。特にクラスD βラクタマーゼに属する OXA-48 like は、カルバペネム系抗菌薬の MIC が低く検出が難しいとされており、PCR などの遺伝子検査によってのみ判定可能となる場合も多い。薬剤耐性菌検出法の課題として、今後こうした見逃しやすい感性株や特殊な酵素型に対して感度をあげるための、より簡便な検査法の開発が必要であると考えられる。本研究ではβラクタマーゼ阻害薬であるアビバクタムを利用した薬剤ディスクによる検出法の構築を目的として研究を行ったので報告する。

【対象】

酵素型：CPE (クラス A：KPC-3、クラス B：IMP-1, IMP-6, NDM、クラス D：OXA181, OXA-48 like)
non-CPE (ESBL, AmpC)

菌種：*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*

【検討項目】

1. 条件設定

比色法(CarbaNP 法)を原理とした検査法構築を目的として、下記 1) ~ 5) の組み合わせを変えて最適条件を調査した。

1) 薬剤ディスクの選定と溶出時間の検討

3 mL の生理食塩水に所定 (0-90 分) の時間薬剤ディスクを浸し、薬剤が最大量溶出する時間を調査した。対象薬剤は CAZ/AVI, CAZ, CMZ, CTX, MEPM(いずれもベクトン・ディッキンソン株式会社)とした。

2) 菌液作成方法の条件設定

試薬と反応させるサンプルの調整方法について検討を行った。サンプル調整法は 4 項目とし、a)TSB にて培養後の調整菌液(以下 TSB 培養液)、b)生理食塩水に 10 μL 白金耳の菌を懸濁したもの(以下生食菌液)、c)生理食塩水にて濃厚菌液を作成し、凍結融解(5 回)後に遠心分離して得られた上清(以下凍結融解)、d)生理食塩水にて濃厚菌液を作成し、バイオマッシャー(株式会社ニッピ)による物理的破碎(以下物理的破碎)、e)Lysis Buffer に菌を懸濁したもの(以下 Lysis 抽出)とした。添加菌液量は 5-20 μL で調整を行った。

3) アビバクタム添加濃度設定

アビバクタム添加濃度は最終濃度 10-200 μg/mL になるよう調整した。

4) 判定時間の設定

実験中のモニタリングは 30 分-24 時間後とした。

5) 試薬調整

反応試薬は CarbaNP 法を原理とし 0.2%フェノールレッド溶液(指示薬)を作成した。試薬作製のため、色調変化が起こる pH(7.1-7.8)を調査した。

2. 検査法の構築

1. 条件設定の結果より、96 穴プレートまたは PCR チューブにて試薬と菌液を反応させ、混濁と色調変化にて目視判定が可能か対象株を反復測定し検討を行った。方法は以下の通り。反応試薬(薬剤ディスク 1 h+指示薬)をウェルまたは PCR チューブに 100 μ L ずつ分注する。調整した菌液 20 μ L を加えてピペティング等によく混和する。37°C でインキュベーションし、色の変化と濁度を目視で確認する。3 時間以内に黄変したものを陽性と判定する(図 1)。

【得られた結果】

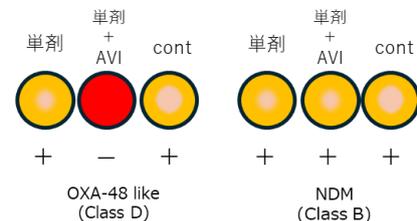
1. 条件設定

薬剤溶出時間は反復試行により平均 60 分で最大となり、指示薬 pH は 7.8 とした。pH7.3 にて反応は良好であったが、同一株であっても菌液濃度により偽陽性例が存在したため、安定性が得られた pH7.8 を採用した。菌液調整については b)生食菌液、d)物理的破碎、e)Lysis 抽出の 3 法は 24 時間後では判定可能となるものの、検査当日中(6 時間以内)での色調変化が乏しく(赤-橙色)、判定不能であった。よって検体調整法は a)または c)により検討を行うこととした。検体量は 20 μ L 添加、アビバクタム添加濃度は 10 μ g/mL で統一した。

2. 検査法の構築

6 時間以内の判定を目標としたが、菌株の酵素量に影響を受けるため色調変化が乏しい場合があり、判定には色調変化だけでなく濁度も併せて考慮する必要があった。この判定法を採用した場合、96 穴プレートと比較し PCR チューブで判定が容易であった。反復測定した結果、おおむね想定と一致する結果を得ているが、KPC-3 および p-AmpC (*E. coli*)においては条件設定により判定が異なるため追加調査を行っている。

図1：反応例(96ウェル)



【今後の展望】

遺伝子機器をもたない施設においても、簡便で迅速に判定可能となるような検査法構築を目的としたが、薬剤ディスクのみでは比色法による検出は不能であり、アビバクタム溶液調整の手間が必要となった。また、判定に色調変化だけでなく濁度も併せて評価する点については検査者間で判定に差が生まれまいよう今後改善をはかることとする。カルバペネム系抗菌薬が耐性であった場合は、薬剤ディスクの選定が容易(MEPM)であるが、感性であった場合には薬剤感受性検査の結果をふまえて使用ディスクを選択する必要があった。アビバクタムは Class A, C, D に対しても阻害効果を示すことが特徴である。本検討結果をふまえて課題点はあるものの、検査法構築のための基礎的データとして今後菌株を増やして引き続き検討を行っていく。既存の検査室の耐性菌検出フローチャートに組み込むことを目的として、新たな β ラクタマーゼ検査法の構築に応用していきたい。本研究の成果は、今後主学会発表、国内学術雑誌での論文発表を予定している。