② –6

院内感染関連微生物とその検査法

大阪公立大学大学院医学研究科 細菌学
金子　幸弘

はじめに

この講義は、地域の医療連携体制が求められる病院、診療所、助産所等向けとして、検査を中心に講義をします。原理などの基本的な部分が多いため、すぐに役に立つ内容ではないかもしれませんが、日常診療の理解にはお役に立てるのではないかと思います。

本講義では、院内感染で問題となる微生物、細菌学の基本、検査の意義と解釈、薬剤耐性（AMR）の重要性と検査方法について説明します。

1. 院内感染で問題となる微生物

院内感染で問題となる微生物は、ウイルス、細菌、真菌など多岐にわたります。全てをお話しできないため、基本的には、これらの中から特に問題となる、薬剤耐性菌（AMR）に焦点を当ててお話しします。

2. 細菌学の基本～検査の理解のために

検査を理解するためには、一定程度の細菌学の知識が必要です。まず、細菌学のツボを押さえておきたいと思います。

細菌学が分かると、検査の理解に役立ちます。例えば、結核菌は空気感染するため喀痰採取に注意が必要です。また、淋菌は乾燥や温度変化に弱いため、保存方法が重要です。こうした細菌の性質を理解することで、適切な検査法を選択することができます。

グラム染色は避けて通れませんので、先に整理しておきます（図1）。

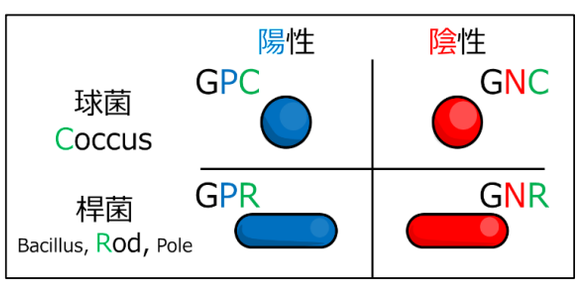

図１　グラム染色による分類

グラム染色は細菌を分類する基本的な方法です。図のように、細菌は染色の結果によりグラム陽性菌とグラム陰性菌に分けられ、青く染まれば陽性、赤く染まれば陰性と表現します。

また、形状によって球菌や桿菌に分類されます。染色と合わせると、グラム陽性球菌、グラム陰性桿菌などとよばれ、略語でGPC、GNRなどといいます。これらの分類は、検査結果を解釈する際に重要です。

多くの病原体の中でも、今回は、AMRという観点も踏まえて、院内感染しやすい細菌に絞り、3つのカテゴリー、常在菌、環境菌、芽胞形成菌、に分類しました（表1）。

表１　院内感染しやすい細菌の分類

	常在菌	環境菌	芽胞形成菌
グラム陽性	黄色ブドウ球菌 腸球菌		ディフィシル菌
グラム陰性	大腸菌 肺炎桿菌	緑膿菌 アシネトバクター	

●常在菌の特徴

黄色ブドウ球菌、腸球菌、大腸菌、肺炎桿菌などは、皮膚や腸に常在していますが、環境でも比較的長期に生き残りやすく、院内感染しやすい病原体です。検査でも比較的分離頻度が高く、また、原因菌と汚染菌の両方で検出されやすい細菌です。近年、AMRで問題となることも多くなっています。

●環境菌の特徴

院内感染を起こしやすい環境菌として、緑膿菌やアシネトバクターがあります。ブドウ糖非発酵菌とも呼ばれます。病原性が低いので、それほど病気を起こしやすいわけではありませんが、いったん病気を起こすと薬が効きにくいことが特徴です。

●芽胞形成菌の特徴

バチルス属も芽胞形成菌ですが、特に院内感染対策で問題となるのがディフィシル菌です。腸内常在菌の一種ですので、分離されたからといって直ちに原因菌として治療対象になるわけではありませんが、抗菌薬関連下痢症の原因として、接触感染対策の対象となります。

毒素産生菌が増えることで下痢を起こします。嫌気性菌であるため、酸素が多い環境中では発育しませんが、一部が芽胞となり、厳しい環境に耐えます。芽胞はアルコールにも耐性を示すため、接触感染で広がりやすい特徴を持ちます。次亜塩素酸ナトリウムによる消毒が必要になります。

●好気と嫌気

検査を理解するうえで、細菌の発育に酸素が必要であ

るかは重要です。緑膿菌のようなブドウ糖非発酵菌の場合には酸素が必要であるため、好気性菌とも呼ばれます。一方、ディフィシル菌のような嫌気性菌の場合には酸素があると増えられません。大腸菌は、発酵と呼吸の両方によってエネルギーを得ることができます。なお、緑膿菌は嫌気でも呼吸が行えますが、好気の方が圧倒的に効率よく増えるため、好気性と理解するのが現実的です。

この性質は、検査の理解にも重要です。例えば、血液培養で、好気のみ陽性なら、緑膿菌を、両方陽性なら、ブドウ球菌や大腸菌を疑います。

3. 検査の意義と解釈

感染症診療における検査の主な目的は、原因病原体と感染部位を突き止めることで、特に、微生物学的検査は、原因病原体の同定です。感染症を起こしやすい原因菌はおおよそ決まっているため、原因菌が同定できれば、感染部位も特定できることがあります。

例えば、次のような場合には、原則として分離されれば、採取部位に関わらず、直ちに原因菌と考えます。

●無菌検体から細菌が培養された場合（ただし、適切に採取した場合に限る）

例　血液から緑膿菌が分離された。

●健常者からは通常分離されえない細菌・真菌が分離された場合

例　カンピロバクター 、
コレラ菌、チフス菌・パラチフス菌、
赤痢菌、腸管出血性大腸菌（EHEC）、
結核菌、クリプトコックス・ネオフォルマンス

一方、判断に迷うケースとしては次のような場合があります。下痢をしていない患者の便から、ディフィシル菌が検出された場合などです。全てのディフィシル菌が、毒素を産生するわけではなく、毒素産生があっても、下痢がない場合には、治療や接触予防策は原則として不要となります。

どこから分離された検体であるかも、原因であるかどうかを判断するうえで重要です。検体による無菌の度合いについてはある程度理解しておくべきです。血液、髄液のように、原則として病原体が0の場合から、便のように大量の細菌が常にいる場合まで、かなりの幅があり、状況や菌量などによって判断しています。特に、無菌検体以外から検出された場合の解釈には注意が必要で、状況や菌量などによって総合的に判断しています。

培養検査は、感染症検査の基本ではありますが、必ずしも全ての病原体が培養できるわけではありません。そのような場合には、補助診断を利用することを検討します。抗原・抗体検査、遺伝子検査、そのほか、結核や梅毒などでは特殊な検査があります。

抗原・抗体検査の原理も多様で、インフルエンザのPOCTに用いるイムノクロマト法のような方法から、特殊な基質反応を用いるものまであります（表2）。

表 2　抗原・抗体検査の原理と概要

検査原理	概要・用途
イムノクロマト法	抗原や抗体を迅速に検出 インフルエンザ・COVID-19 など
放射線ラベル免疫法（RIA）	放射線ラベルした抗体を検出 IgE の検出など、極めて微量のものを検出
酵素免疫法（EIA）	酵素でラベルした抗体を用いて検査 麻疹の抗体価などの定量
酵素結合免疫吸着法（ELISA）	酵素でラベルした抗体を用いて検査 各種抗体、抗原の定量
ラテックス凝集法	グルクロノキシロマンナン抗原 ガラクトマンナン抗原
免疫沈降法	アスペルギルス沈降抗体
合成基質法	β-D グルカン検査

●補助診断

遺伝子検査や抗原・抗体検査が確定診断に用いられることもありますが、しばしば補助診断として用いられます。補助診断は、感度・特異度が原理やキットなどによって多種多様ですので、検査結果の解釈には注意が必要です。検査をする前に、陽性になった場合、陰性になった場合の解釈を考えておく必要があります。また、検査をする前に、事前確率を高くしておかないと、検査の解釈を誤る可能性があります。

遺伝子検査もたくさんありますが、通常使われるのはPCRなどの核酸増幅検査です（表3）。塩基配列検査、い

表 3　主な遺伝子検査

核酸増幅法（NAT/NAAT, Nucleic Acid Amplification Test）
- PCR (Polymerase Chain Reaction)
  - conventional PCR
  - reverse-transcription PCR (RT-PCR)
  - real-time PCR (RT-PCR) ≒ quantitative PCR (qPCR)
  - multiplex PCR
- LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification)
- TMA (Transcription Mediated Amplification)
- NEAR (Nicking Enzyme Amplification Reaction)

塩基配列解析（sequence analysis）
- Capillary sequence
- NGS (Next Generation Sequence)
  - short read sequence --- MiSeq など
  - long read sequence --- MinION
  - metagenome NGS

わゆるシークエンスは必要に応じて行われます。PCRなどの核酸増幅法は、増幅という過程を経るため、感度が高い検査の一つです。PCRでは、1サイクルで2倍になりますから、計算上は30サイクルで2の30乗となり、約10の9乗、つまり10億倍に増幅されます。

4. 薬剤耐性（AMR）の重要性

AMRは世界的な課題で、2050年にはAMR感染症による死亡者数が、がんによる死亡者数を上回るとの推測も報告されています[1)]。特に、従来から問題となっているメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）に加え、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）産生菌やカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）/カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌（CPE）、薬剤耐性緑膿菌（MDRP）や多剤耐性アシネトバクター（MDRA）といった治療抵抗性の病原細菌による感染症が増加傾向にあります。そのため、日本でも2016年および2023年にAMRアクションプランが作られ、AMR対策の強化が図られています[2)]。

5. AMRの検査

抗菌薬適正使用も、AMRアクションプランの目標の一つとなっています。治療に関する管理監督はAntimicrobial Stewardshipの略でASと呼ばれています。ASももちろん重要ですが、その前に、診断も必要です。そのため、近年、ASだけではなく、適切な診断・管理を意味するDiagnostic Stewardshipの略であるDSという言葉もよく用いられるようになりました。原因菌と感染部位を突き止めるためには、単に検査をすればよいというわけではなく、いつ、どんな検査をするかが重要です。特に、AMRでは、グラム染色と培養・同定・感受性検査が重要です。いずれにしても、質の良い検体が不可欠で、治療をする前に検体を採取するのが原則です。

喀痰の質を評価する方法として、Miller-Jones分類とGeckler分類があります。Miller-Jones分類は肉眼的分類、Geckler分類は顕微鏡観察による分類です（表4、5）。

表 4　Miller-Jones 分類

M1	唾液、完全な粘性痰
M2	粘性痰の中に膿性痰が少量含まれている
P1	膿性痰で膿性部分が 1/3 以下
P2	膿性痰で膿性部分が 1/3～2/3
P3	膿性痰で膿性部分が 2/3 以上

表 5　Geckler 分類（100 倍で観察）

群	細胞数（1 視野あたり）	
	上皮細胞	好中球
6	<25	<25
5	<10	>25
4	10～25	>25
3	>25	>25
2	>25	10～25
1	>25	<10

血液検査でも同様で、有効な血液培養は原因菌の推定に有用です。面倒ではありますが、しっかり汚染しないように消毒をするとともに、2セット採取することで、陽性率が上がり、汚染率が下がります。つまり、より正確な判断が下せるようになるということです。

●感受性検査

感受性検査の重要な指標として、最小発育阻止濃度、MICと呼ばれるものがあります。菌の発育を押さえるのに必要な抗菌薬の最小濃度のことで、原則として値が低いほど効きやすい、つまり感性でSとあらわします。逆に高いほど効きにくい、つまり耐性でRとあらわします。中間的な場合にはIとあらわします。

抗菌薬の菌に対する作用を、pharmacodynamics（PD）と呼びます。MICは抗菌薬の側から見た場合には、PDとほぼ同義で、抗菌力の目安となります。一方、病原体側から見ると、MICは効きにくさ、つまり、耐性の目安であるともいえます。

感受性を評価する方法としては、微量液体希釈法、寒天平板法、E-test、ディスク拡散法があります。前3者はMICを測定しますが。ディスク拡散法は、阻止円を測定するだけなので、SIRのみ評価します。

耐性の話題になりましたので、耐性について簡単に説明しておきます。菌がどのようにして耐性を獲得するか、その方法として、主に2つが知られています。一つは、耐性遺伝子を獲得する方法、そしてもう一つは、突然変異により耐性化する方法です。耐性遺伝子の獲得としては、βラクタマーゼなどによる耐性がよく知られています。一方、突然変異としてはキノロン耐性がよく知られています。耐性の獲得方法は、AMRの拡大に関連します。特に、AMRが拡大する際に、βラクタム系薬の場合には、原則として、少ないながら存在する耐性菌が選択されるため、感受性菌が突然耐性

菌に変化することはありません。一方、キノロン耐性は耐性を誘導するため、感受性菌が耐性菌に変化しえます。そのため、抗菌薬の使い方にも関連します。

また、近年、注目されている腸内細菌目細菌の耐性として、ステルス型カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌（CPE）と呼ばれる耐性があります。なお、類似の表現として、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）があります。CPEはカルバペネマーゼを持っていることを表し、CREはカルバペネム耐性であることを表します。両者が一致すればわかりやすいのですが、IMPというカルバペネマーゼを持つ腸内細菌科は、しばしば検査上、カルバペネムに感受性を示すことがあります。ただし、臨床上はカルバペネムが無効であるために、治療上問題となります。このように、本性を隠した耐性菌という意味で、ステルス型と呼ばれています。

培養と感受性検査が感染症検査のゴールドスタンダードではありますが、一部のAMRでは質量分析や遺伝子検査も利用可能です。特に、ディフィシル菌の場合には、核酸増幅法（NAAT）を、早期から実施することがガイドライン上も推奨されています。

まとめ

最後に、AMRにおける検査のポイントをまとめておきます。院内感染ではAMRは常にリスクとなっており、細菌学的な性質を知ることで、検査の方法、検体の取り扱い、結果の解釈の理解に役立ちます。

- 院内感染においてAMRは常にリスクとなる。
- 細菌の性質を知ることで検査の理解に役立つ。
- 細菌や真菌は培養が基本である。
  →培養によって、感受性・耐性もわかる。
  →必要に応じて補助診断を利用する。
- 検体の取り扱いが重要である。
  →感染症に応じた適切な検体管理を行う。
- 結果の解釈や対応に注意する。
  →原因菌か汚染菌かを判別する。
  →感度・特異度を考慮した判断が必要。
  偽陽性・偽陰性に注意

参考文献

1. O'Neill J. (2016). Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance.
2. 厚生労働省. (2023). 薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン（2023年改訂版）. https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/ap_honbun.pdf