

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09413

研究課題名(和文)重症尿路感染症の抗菌薬治療モニタリングにおける全自動尿中有形成分分析装置の有用性

研究課題名(英文)Utility of a fully automated urine particle analyzer in monitoring antibiotic therapy for severe urinary tract infections

研究代表者

山本 新吾 (Yamamoto, Shingo)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：80322741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：UF-5000がフローサイトメトリー法により精度が高い尿中細菌情報を取得することが可能であることに注目し、抗菌薬による細菌形態の変化を捉えることで、初期投与抗菌薬の有効性を治療開始後早期に判定することができるかを検証することを目的とした。まず純粋培養系では、感受性菌の細菌形態の変化および溶菌によるスカッタグラムの変化と菌数の減少が、抗菌薬投与後24時間以内で観察された。実臨床においても同様の所見が観察され、初期抗菌薬投与直後からUF-5000により細菌形態の変化後の細菌数減少を速やかに捉えることで、尿培養による薬剤感受性試験結果を待つことなく治療効果の判定が可能であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、抗菌薬治療中の患者尿検体をUF-5000で測定することによって、通常の薬剤感受性試験では3～4日を必要とするエンピリックセラピーの有効性判定が、より早期に判定できる可能性があることを示した。尿培養による薬剤感受性試験よりも迅速な抗菌薬の有効性判定方法が確立されれば、耐性菌などで抗菌薬の効果が不十分であった場合など早期に発見することも可能である。患者にとってより安全で効率的な治療を提供することができ、抗菌薬投与期間の短縮、入院治療日数の短縮、耐性菌誘導の回避などが可能になることから、医療経済にも大きく貢献できる。

研究成果の概要(英文)：The UF-5000 can obtain highly accurate urinary bacterial information using flow cytometry, and by capturing changes in bacterial morphology caused by antibiotics. The purpose of this study was to determine the effectiveness of administered antibiotics early after the start of treatment. First, in an experimental pure culture system, when the causative bacteria are susceptible to antibiotics, changes in bacterial morphology (filamentation, etc.) due to bacteriolysis and a decrease in the number of bacteria were observed within 24 hours after the start of antibiotic treatment (after administration). Similar findings have been observed in clinical practice. UF-5000 detected the decrease in the number of bacteria and the change in bacterial morphology immediately after the initial administration of antibiotics, suggesting that it would be possible to judge the therapeutic effect of the administered antibiotic without waiting for drug susceptibility test results using urine culture.

研究分野：尿路感染症

キーワード：尿路感染症 薬剤感受性試験 UF-5000

1. 研究開始当初の背景

(1) 重症尿路感染症の治療において、抗菌薬投与前に採取された尿培養の薬剤感受性試験の検査結果が判明するまでは、エンピリックセラピーの効果判定には、採血データ、バイタルデータ、身体症状の観察などの臨床所見より主観的に判断せざるを得ない。

(2) 尿路感染症領域においては、多くの論文報告で原因菌種の迅速診断法としてPCR法が採用されているが、いずれも費用が高いこと、手技が煩雑であること、一度に多くの検体が処理することが難しいこと、などの理由から実臨床で日常的に運用するのは困難である。また、尿路感染症において高頻度に分離される大腸菌はβ-ラクタム系抗菌薬により細菌形態が大きく変化することが報告されている(文献①)。グラム染色での顕微鏡観察で形態変化や半定量での精度で細菌数減少を追跡することは可能であるが、この方法は検出感度が低く(10⁶ CFU/mL以上の菌数が必要)、さらに観察者の技量に大きく依存する。

(3) 自動尿中有形分析装置UF-5000(以下、UF-5000)(シスメックス株式会社)はフローサイトメトリー法を測定原理とし、尿中の細菌と白血球の定量測定を全自動かつ同時に行う装置である(文献②)。細菌の情報をスキャッタグラムとして提供することができるため(文献③)、UF-5000で抗菌薬による細菌形態の変化および溶菌による細菌数の減少をとらえられることができると考えられるが、本研究に類似した研究はいまだ国内外で報告されていない。

2. 研究の目的

UF-5000がフローサイトメトリー法により精度が高い尿中細菌情報を取得することが可能であることに注目し、抗菌薬による細菌形態の変化を捉えることで、初期投与抗菌薬の有効性を治療開始後早期に判定し、より効率的な抗菌薬治療を可能とすることができるかを検証した。

3. 研究の方法

(1) 純粋培養系でのUF-5000スキャッタグラムの経時的变化の検証

実験に用いる菌株は尿路感染症の代表的なグラム陰性桿菌の菌種(*E. coli*, *K. pneumoniae*)の尿路感染症患者からの臨床分離株で、β-ラクタム系抗菌薬(TAZ/PIPC, CTRX)に対する耐性株、およびコントロールとして感性株もしくはATCC株を用いた(文献④)。細菌量を調整後、抗菌薬の薬剤感受性の中間値の濃度以上の抗菌薬の添加後、振盪培養を行った。規定の培養時間(0, 3, 6, 24時間)を経過した検体についてそれぞれUF-5000で測定してスキャッタグラムを取得し、耐性株と感性株の経時变化の違いを検証した。

(2) 臨床尿検体におけるUF-5000スキャッタグラムと臨床検査との相関性の検証

重症尿路感染症(腎盂腎炎、複雑性尿路感染症)で抗菌薬治療を受けている入院患者から抗菌薬治療開始前(投薬前)、菌薬投与後6から12時間、24時間に尿検体を採取し、UF-5000のBACTスキャッタグラムに変化を観察した。同時に培養検査(半定量、菌種同定、薬剤感受性試験)及びグラム染色による顕微鏡観察検査を行った。

4. 研究成果

純粋培養系において TAZ/PIPC (ピペラシリン/タゾバクタム) の暴露により TAZ/PIPC 感受性株 EC156 がフィラメント状に伸長した後 24 時間以内に溶菌することが確認した (図 1-1 上段)。興味深いことに、このような細菌形態の変化を UF-5000 で測定すると、フィラメント状に伸長した細菌クラスターは BACT スキャッタグラム (細菌数計測用) から減少・消失するが CAST スキャッタグラム (細胞・硝子円柱計測用) に出現することが確認された (図 1-2 上段: 3 時間後)。すなわち通常形態の細菌は BACT スキャッタグラムで捉えることができるが、抗菌薬が作用してフィラメント状に伸長した細菌は BACT スキャッタグラムで捉えることができず、CAST スキャッタグラムではじめて確認できるという現象が見出された。その後は PIPC/TAZ 感受性株が完全に溶菌すると、BACT・CAST いずれのスキャッタグラムからも細菌クラスターは消失した (図 1-2 上段)。これらの結果は標準株である ATCC35218 株でも同様となった (データ示さず)。一方、TAZ/PIPC 耐性株である EC352 (最小発育阻止濃度 128 µg/mL) を TAZ/PIPC 32µg/mL に暴露すると、同様に形態変化が生じ BACT および CAST スキャッタグラムに影響を与えるが (図 1-1 および図 1-2 下段: 3 時間後)、添加後 6 時間で正常形態の細菌がグラム染色で観察されるようになると (図 1-1 下段)、再び正常な BACT スキャッタグラムに戻り始め (図 1-2 下段)、なおかつ菌数が著しく増加することを確認した (図 1-2 下段: 24 時間後)。また、*K. pneumoniae* の各菌株に CTRX (セフトリアキソン) を添加した実験でも、同様な結果が得られた (データ示さず)。

純粋培養系で観察される現象が実際に抗菌薬治療の経過中に観察されるのかを検証するため、重症尿路感染症で治療を受けている患者から抗菌薬投薬前、投与後 3, 6, 24, 48 時間に尿検体を採取し、UF-5000 BACT スキャッタグラムの経時的に解析した。大腸菌もしくは *P. aeruginosa* (緑膿菌) が単独で同定された症例において、セフトリアキソン投与後 3 時間で BACT スキャッタグラムの細菌クラスターの位置に変化が生じ、細菌数が減少し始め、48 時間では細菌クラスターが消失した (図 2)。

そこで、同定された細菌に薬剤感受性があった症例の検体について、グラム染色で経時的な観察を行ったところ、症例 1 では、投与後 12 時間ではすでにグラム陰性桿菌 (GNR) が消失し、24 時間後ではグラム陽性球菌 (GPC) も消失していた (図 3 上段)。症例 2 では、投与後 12 時間では、細菌が大幅に減少していたが、24 時間で細菌数が維持していたのが観察された (図 3 下段)。両症例とも、フィラメント化などの抗菌薬による形態変化は観察されなかった。これらの症例について、UF-5000 のスキャッタグラムは、症例 1 では投与後 24 時間で細菌数が大幅に減少しており (図 3 上段)、症例 2 では投与後 12 時間と 24 時間では細菌数が維持されていた (図 3 下段)。また両症例とも、CAST スキャッタグラムでは、フィラメント化に特有のクラスターのパターンは検出されなかった (図 3)。これらの結果から、グラム染色と細菌数 (BACT) は同じ様な経時的な変化が生じていることが示された。

本研究では、抗菌薬治療中の患者尿検体を UF-5000 で測定することによって、通常の薬剤感受性試験では 3~4 日を必要とするエンピリックセラピーの有効性判定が、より早期に判定できる可能性があることを示した。尿培養による薬剤感受性試験よりも迅速な抗菌薬の有効性判定方法

が確立されれば、耐性菌などで抗菌薬の効果が不十分であった場合など早期に発見することも可能である。さらに、尿培養によって原因菌が特定できない状況や薬剤感受性試験の検査パネルにのっていない菌種と抗菌薬の組み合わせであっても、実臨床でその抗菌薬の有効性を評価できる可能性がある。患者にとってより安全で効率的な治療を提供することができ、抗菌薬投与期間の短縮、入院治療日数の短縮、耐性菌誘導の回避などが可能になることから、医療経済にも大きく貢献できる。

<引用文献>

- ① Buijs, J., Dofferhoff, A. S., Mouton, J. W., Wagenvoort, J. H., van der Meer, J. W., Concentration-dependency of beta-lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria, *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 2008, 344-349
- ② Christy, P., Sidjabat, H. E., Lumban Toruan, A. A., Moses, E. J., Mohd Yussof, N., Puspitasari, Y., Fuadi, M. R., Aryati, Marpaung, F. R., Comparison of Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections Based on Leukocyte and Bacterial Parameters Using Standardized Microscopic and Flow Cytometry Methods, *International Journal of Nephrology*, 2022,
- ③ De Rosa, R., Grosso, S., Lorenzi, G., Bruschetta, G., Camporese, A., Evaluation of the new Sysmex UF-5000 fluorescence flow cytometry analyser for ruling out bacterial urinary tract infection and for prediction of gram negative bacteria in urine cultures, *Clinica Chimica Acta*, 484, 2018, 171-178
- ④ Kobayashi, K. et al, The third national Japanese antimicrobial susceptibility pattern surveillance program: Bacterial isolates from complicated urinary tract infection patients, *Journal of Infection and Chemotherapy*, 26, 2020, 418-428

図1-1 純粋培養系におけるTAZ/PIPC添加後各ポイントにおける大腸菌の形態変化の推移（グラム染色での顕微鏡観察像）

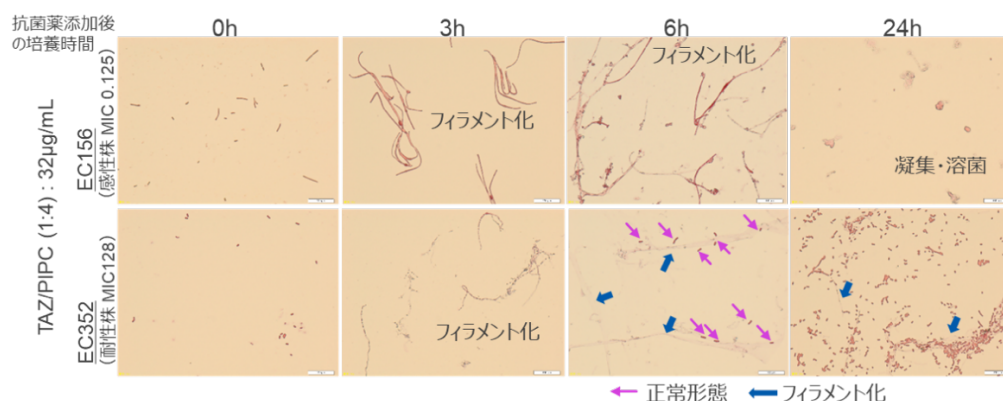


図1-2 純粋培養系におけるTAZ/PIPC添加後のBACTおよびCASTスキヤットグラムの経時的変化

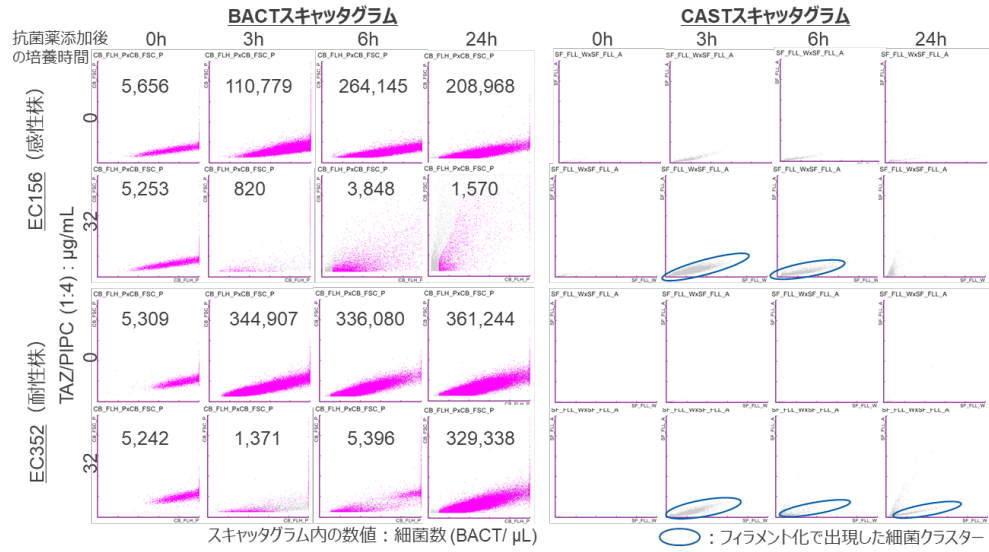


図2 患者尿検体（冷凍保存検体）におけるセフトリアキソン投与後のBACTスキヤットグラムの経時的変化

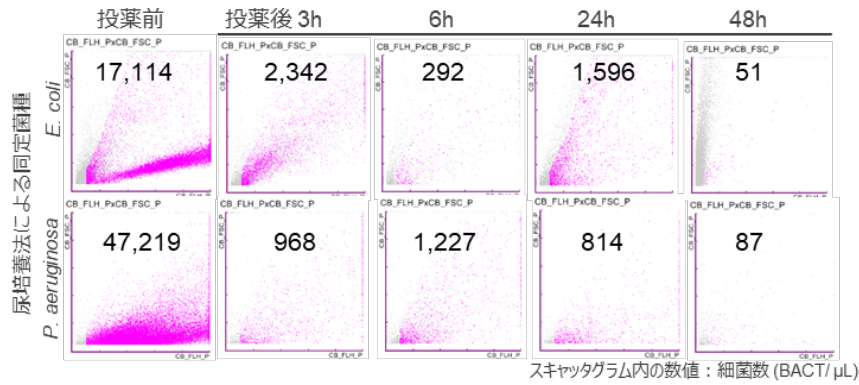
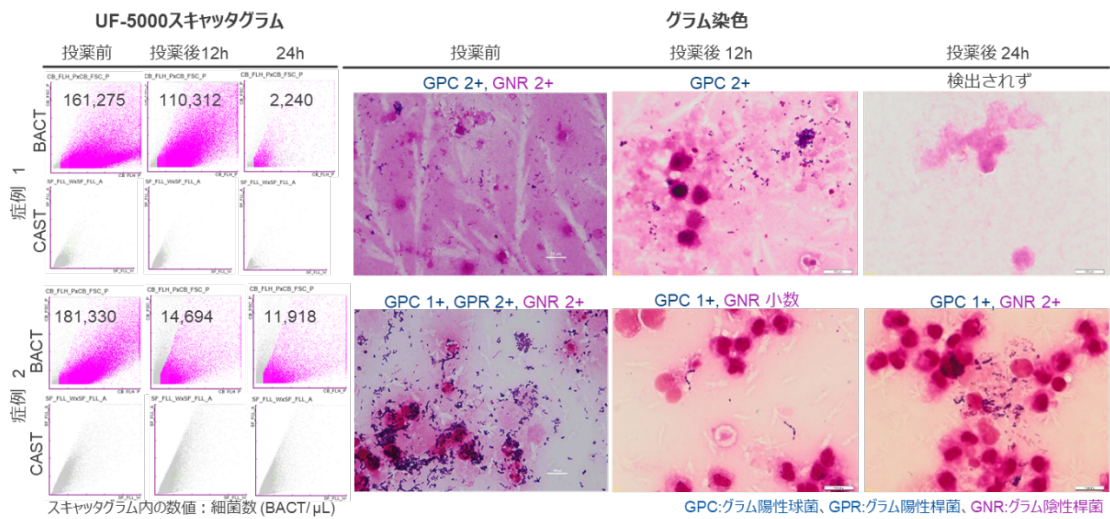


図3 患者尿検体における抗菌薬投与後のスキヤットグラムおよびグラム染色の経時的変化



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山崎 栄樹 (Yamasaki Eiki) (40514708)	帯広畜産大学・動物・食品検査診断センター・准教授 (10105)	
研究分担者	奥村 香世 (Okumura Kayo) (70415561)	国立感染症研究所・安全実験管理部・主任研究官 (82603)	
研究分担者	兼松 明弘 (Kanematsu Akihiro) (90437202)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関