

スクの阻止円径を比較することで、簡便に ESBL を確認できるようにしたものである。

C. 研究結果

1) 耐性菌の検出率の推移

表 1 に、1998 年に全検体および血液からの分離が多かった上位 15 菌種を示した。全体として分離菌種に大きな変化はみられず、外来患者からは、*E.coli*、*S.aureus* (MSSA)、*Haemophilus influenzae*、*S.pneumoniae* などの市中感染症の起炎菌となる菌種が上位に検出されていた。入院患者からは、*P.aeruginosa*、MRSA、*Enterococcus faecalis*、*Staphylococcus epidermidis* などが上位に検出され、外来患者とは分離菌種が大きく異なっていた。臨床的に重要な血液からの分離菌は入院患者とほぼ同様に、MRSA、*E.faecalis*、*Acinetobacter* spp.、MSSA などが上位に検出されていたが、1997 年に 18 株が検出され第 3 位を占めた *P.aeruginosa* は 1998 年は 9 株と半減した。

表 2 に、千葉大学病院における最近 4 年間の臨床的に重要な耐性菌の検出率の推移を示した。MRSA は一定して入院患者から分離される *S.aureus* の約 70 % を占めており、増加も減少もみられない。なお全ての MRSA が VCM に対して $2 \mu\text{g/ml}$ 以下の MIC を示した。*S.pneumoniae* の Penicillin G 耐性株 (MIC: $\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$) の PRSP は、最近 4 年間に外来患者株において 33.3 % から 55.8 % に増加しており、1998 年も引き続き増加傾向にある。PCG に対する PRSP の MIC の上限値は従来と同様に $4 \mu\text{g/ml}$ であった。なお VRE (Van C 型を除く) は 1998 年も当院では検出されなかった。なお 1997 年に当院では始めて分離された BLNAR は、1998 年は検出されなかった。

入院患者株における *P.aeruginosa* の IPM 耐性株 (MIC: $\geq 16 \mu\text{g/ml}$) の検出率は約 23 % と一定しており、増加はみられない。しかし *S.marcescens* の IPM 耐性株は 1998 年は 15.3 % と増加しており、今後の動向が注目される。なお表 3 に 1998 年に分離された *P.aeruginosa* の耐性率を示したが、入院患者株はいずれの抗菌薬にも 10 % 以上の耐性株が検出されている。

2) ESBL 産生株の検出法の研究

表 3 に示したが、一昨年に関東地方の 5 施設から分離された *E.coli* と *Klebsiella* spp. の ESBL 産生株を用い、NCCLS 法の希釈法による検出率を、感度 ($\geq 2 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示した株に占める ESBL 産生株の割合)、および特異性 ($\leq 1 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示した株に占める ESBL 非産生株の割合) から検討した。この結果、抗菌薬単独では CTRX が感度 64 %、特異性 71 % と最も良い成績であったが、ESBL 産生株の確定検査としては不十分な成績と考えられた。そこで ESBL 産生株の検出精度を向上させるため、各抗菌薬に CVA を $4 \mu\text{g/ml}$ 添加した際に、ESBL 産生株は MIC が 4 管以上低下する現象を判定に加えたところ、CPDX の成績が最も良く、感度・特異性ともに 100 % となった。この成績からより簡便な ESBL 産生株の検出法として CPDX に CVA を加えた ESBL 検出用ディスクの開発を試みた。

このディスクの有用性を検討したところ、ESBL 産生 *E.coli* 6 株および *Klebsiella pneumoniae* 14 株の成績では、CPDX 単独のディスクの阻止円径が 0 ~ 11mm であったのに対し、CVA を加えたディスクの阻止円径は 15 ~ 25mm 拡大した。しかし Class C タイプの β -lactamase を産生する株でも阻止円径が 12mm 拡大した株がみられた。

検出株数の多い上位 15 菌種

表 1

順位	外来患者分離菌 (1,498 株)	株数	入院患者分離株 (4,448 株)	株数	血液分離菌 (210 株)	株数
1	<i>Escherichia coli</i>	163	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	597	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	44
2	<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	130	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	430	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	21
3	<i>Haemophilus influenzae</i>	119	<i>Enterococcus faecalis</i>	348	<i>Enterococcus faecalis</i>	11
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	111	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	301	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	10
5	<i>Streptococcus agalactiae</i>	97	<i>Escherichia coli</i>	227	<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	9
6	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	77	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	161	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
7	<i>Enterococcus faecalis</i>	60	<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	153	<i>Escherichia coli</i>	9
8	<i>Gardnerella vaginalis</i>	59	<i>Clostridium difficile</i>	149	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	41	<i>Enterobacter cloacae</i>	125	<i>Enterobacter cloacae</i>	8
10	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	41	<i>Serratia marcescens</i>	119	<i>Staphylococcus hominis</i>	6
11	<i>Streptococcus pyogenes</i>	38	<i>Enterococcus faecium</i>	96	<i>Klebsiella oxytoca</i>	5
12	<i>Branhamella catarrhalis</i>	35	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	95	<i>Serratia marcescens</i>	5
13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	31	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	96	<i>Burkholderia cepacia</i>	5
14	<i>Serratia marcescens</i>	21	<i>Citrobacter freundii</i>	72	<i>Propionibacterium acnes</i>	5
15	<i>Klebsiella oxytoca</i>	18	<i>Bacteroides fragilis</i>	69		

表 2

主な耐性菌の検出率の推移

耐性菌	由来	年				
		1995	1996	1997	1998	
MRSA	入院	69.3	72.9	71.4	71.8	
PR(1)SP	外来	33.3	42.6	47.1	55.8	
VRE ¹⁾	入院	0	0	0	0	
BLNAR	外来	0	0	0.9	0	
IPM 耐性株 ²⁾	<i>P.aeruginosa</i>	入院	23.6	25.1	23.0	23.1
	<i>S.marcescens</i>	入院	8.9	4.2	2.9	15.3

1) Van C 型を除く。

2) IPM に対する MIC が $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ の株。

表 3

緑膿菌の主要抗菌薬に対する耐性率 (%)

菌種	由来	株数	PIPC	GPR	GAZ	GFS	IPM	AZT	GM	TOB	AMK	ISP	FOM	OFLX
			≥ 32	≥ 32	≥ 32	≥ 32	≥ 16	≥ 32	≥ 16	≥ 16	≥ 32	≥ 16	≥ 32	≥ 8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	外来	111	12	9	2	3	5	5	9	5	8	14	89	16
	入院	603	24	20	12	10	23	15	17	10	11	21	80	26
	救急部	54	26	20	17	13	46	17	11	9	9	10	61	7

(1998年千葉大学病院分庫株)

表 4

NCCSL 法による ESBL 産生株の検出率

菌種	総株数	ESBL 産生株	検出薬	スクリーニング検査 ¹⁾		確認検査 ²⁾	
				感度 (%)	特異性 (%)	感度 (%)	特異性 (%)
<i>Escherichia coli</i>	21	7 (32%)	CPDX	35	7	100	100
			CTR _X	64	71	NT	NT
			CAZ	39	21	57	82
			AZT	35	7	NT	NT
			CTX	47	7	NT	NT
<i>Klebsiella spp.</i>	35	15 (42%)	CPDX	48	20	87	90
			CTR _X	48	20	NT	NT
			CAZ	48	25	47	71
			AZT	48	25	NT	NT
			CTX	45	20	NT	NT

1) ESBL 産生株のスクリーニングの基準は各抗菌薬に $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示す株とする。2) CVA $4 \mu\text{g/ml}$ を添加した際に MIC が 3 管以上低下したものを ESBL 産生株とする。

D. 考察

今回の検討では抗菌薬耐性菌で分離の増加が著しいものは PR(I)SP であった。外来患者由来株でも PR(I)SP が 56% を占めたことは従来のペニシリン薬を中心とした *S.pneumoniae* の治療法を改める必要を感じた。特に欧米で PRSP の治療に広く用いられている Vancomycin は日本では保険上 *S.pneumoniae* への適応が認められていないことは大きな問題である。IPM 耐性 *P.aeruginosa* は当院では一定して入院患者由来株の 23 ~ 25% を占めており、これまで継続して IPM 耐性株に対する治療法を検討してきたが、当面は Tobramycin を中心としたアミノ配糖体薬と、Meropenem あるいは抗緑膿菌作用を有する CAZ などセフェム薬の併用療法の有用性が高いと考える。

ESBL は 1980 年代から報告されてきたが、日本では分離が稀で、ESBL 産生株が院内感染した報告も少ない。しかし ESBL 産生株の検出法が十分整理されていないため、現在の感受性検査では MIC の低い ESBL 産生株は見落とされている可能性もある。このため ESBL を簡便に検出できる新しい検査法の開発が急務である。NCCLS は 1999 年の指針で、CAZ または CTRX のディスクに CVA を 10 μ g 加えたディスクを作成し、単剤ディスクに比べて CVA を添加したディスクの阻止円径が 5mm 以上拡大した場合に ESBL 産生株と判定する検査法を提唱した。しかし日本の ESBL 産生株に対しては CAZ や CTRX による検査法は検出率が低く、CAZ や CTRX よりも CPDX の方が ESBL の検出に適する株もみられる。しかし Class C β -lactamase との高精度な鑑別や、Class C β -lactamase と ESBL を両方産生する菌株との鑑別などの問題が残されており、NCCLS の検査法とともに、日本での有用性について今後の検討が必要である。

E. 結論

抗菌薬耐性菌に関する最近 4 年間の観察では、PR(I)SP の増加が著しく、依然として増加傾向にある。また Van A および Van B を保有する VRE は当院では現在まで検出されていない。IPM 耐性株では *S.marcescens* は年により分離率に大きな差がみられ、院内感染による伝播が疑われた。ESBL 産生 *E.coli*、*Klebsiella* spp. の検出には CPDX に CVA を加えたディスクが有用であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

高橋公毅,菅野治重:緑膿菌の薬剤感受性と抗菌薬の併用療法.日本化学療法学会誌, 47:67-73, 1999.

2. 学会発表

菅野治重,高橋公毅,村田正太,渡邊正治:千葉大学病院における臨床分離菌の研究.第 46 回日本化学療法学会総会,和歌山市, 1999 年 6 月 4 ~ 5 日,

*bla*_{IMP} 遺伝子保有緑膿菌の検出並びに臨床的意義に関する研究

分担研究者 河野 茂 (長崎大学医学部第二内科学講座)

研究要旨

1991 年月から 1998 年 12 月の間に長崎大学医学部附属病院において分離された 6293 株の緑膿菌のなかで、セフトジジム (CAZ) に対する最小発育濃度 (MIC) が 64 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示した 367 株で、ED-PCR (enzymatic detection of PCR product)法により *bla*_{IMP} 遺伝子の検出を行った。その結果、*bla*_{IMP} 遺伝子陽性であった緑膿菌は 81 株であった。91 年から 98 年の間に増加や、減少など一定の傾向は認められなかった。*bla*_{IMP} 遺伝子保有緑膿菌の分離された患者では、感染症の有病率、基礎疾患を有していたり抗菌薬投与の病歴などの頻度が高かった。*bla*_{IMP} 遺伝子陽性緑膿菌について、その遺伝子を用いてパルスフィールド・ゲル電気泳動により *bla*_{IMP} 遺伝子保有株の遺伝子的な関連を検討した結果、院内で伝搬した可能性があることも示唆された。

A. 研究目的

I MP-1 型メタロー β -ラクタマーゼ遺伝子 (*bla*_{IMP}) を保有する *Pseudomonas aeruginosa* や *Serratia marcescens* などのグラム陰性菌が本邦では多施設で分離されている。メタロー β -ラクタマーゼ産生菌は、 β -ラクタム剤のなかでも強力な抗菌活性が期待できるカルバペネム系抗菌薬も分解し、治療抵抗性となりうる点で臨床的に非常に重要な問題である。実際に *bla*_{IMP} 遺伝子を保有するグラム陰性菌は第 3 世代セフェム系抗菌薬であるセフトジジム (CAZ) に耐性を示すことが知られている。このような耐性菌は除菌され難いため病院内で伝播され、院内感染の原因となりうる点でも注意が必要である。しかしながら、*bla*_{IMP} 陽性菌の臨床的意義や、病院内における拡散についての情報は少ない。そこで我々は、当院における *bla*_{IMP} 遺伝子の検出を ED-PCR (enzymatic detection of PCR product) 法を用いて行い、*bla*_{IMP} 遺伝子保有緑膿菌の分離状況の経年変化を調べた。また、*bla*_{IMP} 遺伝子保有緑膿菌が分離された患者の臨床的背景についても検討した。

B. 研究方法

菌株：1991 年 1 月から 1998 年 12 月に長崎大学医学部附属病院において分離された緑膿菌 6293 株を対象とした。菌の同定は、Vitek グラム陰性菌同定カード (bioMerieux-Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.) によった。分離菌は、分離後凍結保存されていたも

のを実験に際し使用した。Senda らにより *bla*_{IMP} 遺伝子を保有するグラム陰性菌の CAZ 最小発育阻止濃度 (MIC) は 128 $\mu\text{g/ml}$ 以上であることが報告されているため (Senda et al., Antimicrob Agent Chemother. 40: 349-353, 1996)、微量液体希釈法による CAZ に対する MIC が 64 $\mu\text{g/ml}$ 以上の株を選び、*bla*_{IMP} 遺伝子の検出をおこなった。

DNA の増幅：PCR の template DNA の抽出は基本的に Clark らの方法によった (Clark et al., Antimicrob Agent Chemother. 37: 2311-2317, 1993)。overnight incubation した菌のコロニーを 100 μl の滅菌水で suspend し 10⁶ CFU/ml に希釈して 96 穴マイクロプレートに apply した。PCR は総量 50 μl で 2.5U Taq DNA polymerase (宝酒造, 滋賀)、0.2mM dNTPs、0.5 μM プライマーを用いた。プライマーは Arakawa らの報告している CTA CCG CAG AGT CTT TG および AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT (Senda et al., J Clin. Microbiol. 34: 2909-2913, 1996) を用いた。サーマルサイクラーは Perkin-Elmer Cetus 9600 を使い、最初に 94 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間 denature し、その後 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒、58 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒を 35 サイクルの条件で PCR を施行した。

ED-PCR：PCR 産物の enzymatic detection は Ubukata らの方法 (Ubukata et al., Clin. Microbiol. 30: 1728-1733, 1992) を modify して行った。96 穴マイクロプレートを 10 $\mu\text{g/ml}$ の streptavidin (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) で

4°C overnight でコートし、37°C 3 時間 0.1% gelatin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) で block した。20 μ l の PCR 産物と 100 μ l のアルカリフォスファターゼ・コンジュゲイト抗ジゴキシゲニン抗体 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) をウェルに添加した。プレートは 37°C 1 時間インキュベートし、3 回 wash し、100 μ l の *p*-nitrophenylphosphate (Kirkegard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) を添加した。

パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) : 抽出した DNA は *Spe* I および *Xba* I にて制限酵素処理を行う Gen-Path group reagent kit (Bio-Rad Laboratories) を用いた後電気泳動を行った。泳動は Gene Navigator System (Pharmacia LKB Biotechnology Uppsala, Sweden) を用い、180V 22 時間 (pulse range 10~45 秒) または 17V 22 時間 (pulse range 5~50 秒) の条件で行った。泳動パターンは、Dendron software (Soltech, Inc., Oakdale, CA) を用いて近似性を解析した。

薬剤感受性 : NCCLS のガイドに沿って液体微量希釈法により、piperacillin (PIPC)、CAZ、imipenem (IPM)、gentamicin (GM)、ofloxacin (OFLX) の各薬剤に対する MIC を測定した。

臨床背景 : *bla*_{IMP} 遺伝子保有緑膿菌が分離された患者のカルテの調査を行った。感染症の有無は、CRP (C reactive protein) の上昇、白血球増多のいずれかの炎症反応を認め、発熱などの症状により主治医が感染症と判定したものを感染症例とした。不明な項目についてはその症例は除外した。緑膿菌が分離され、分離菌の *bla*_{IMP} 遺伝子が陰性であった群を対照群として比較した。

C. 研究結果

*bla*_{IMP} 遺伝子保有緑膿菌の分離状況 : CAZ 耐性菌緑膿菌 367 株のうち、ED-PCR により *bla*_{IMP} 陽性であったのは 81 株 (22.1 %) であった。1991 年から 1998 年の間に増加傾向は認められなかった (表 1)。

表 1. *bla*_{IMP} 遺伝子保有緑膿菌数の年次推移

	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	合計
緑膿菌分離株数	928	779	780	615	779	798	765	849	6293
CAZ 耐性株数	39	54	34	30	39	33	96	38	363
<i>bla</i> _{IMP} 陽性数	11	24	10	13	8	8	5	2	81

*bla*_{IMP} 遺伝子保有緑膿菌分離患者の臨床的背景 : 患者の性別、年齢などに *bla*_{IMP} 遺伝子陽性群と対照群では違いは認められなかったが、*bla*_{IMP} 遺伝子陽

性群では全て入院患者で合ったのに対して、対照群では外来患者が有為に多かった。感染症の発症は *bla*_{IMP} 遺伝子陽性群で有為に高く、定着例は対照群に多かった。検体材料では、*bla*_{IMP} 遺伝子陽性群では尿路系の検体が多かったが、陰性群では呼吸器系の検体が多かった。*bla*_{IMP} 遺伝子陽性群で有為に基礎疾患を有する頻度が高かった。また、*bla*_{IMP} 遺伝子陽性群では、抗癌剤投与や尿道カテーテル留置例が有為に多く、逆に対照群では、IVH 例が多かった。使用抗菌薬については、*bla*_{IMP} 遺伝子陽性群で β -ラクタム剤投与が有意多く、ニューキノロンでは有意な差は認めなかった。

薬剤感受性 : 抗菌薬に関しては PIPC、CAZ、IPM、GM、OFLX に関して *bla*_{IMP} 遺伝子保有株の耐性化率が有意に高かった。

PFGE : 別々の患者から分離された *bla*_{IMP} 遺伝子保有株のうち、7 組 14 株の中では PFGE において全く identical なパターンを示すものがみられ、病院内での伝播が疑われた。しかし、その他の 67 株は identical なパターンを示すものはなかった (図 1)。

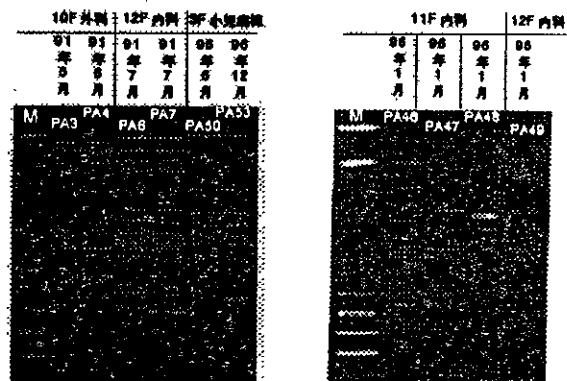


図 1. PAGE による *bla*_{IMP} 遺伝子保有緑膿菌の分類。左図 ; ほぼ同時期に同じ病棟の別々の患者から、分離された PA3 と PA4、PA6 と PA7、PA50 と PA53 はそれぞれ同一のパターンを示した。右図 ; 同時期に同一の診療科の病棟から分離された別患者の *bla*_{IMP} 遺伝子保有緑膿菌は全く違うパターンを呈した。

D. 考察

メタロー β -ラクタマーゼ遺伝子である *bla*_{IMP} を簡便に検出する系を作成し、臨床分離された緑膿菌から *bla*_{IMP} 遺伝子の検出を行った。*bla*_{IMP} 遺伝子保有株は、当院においては 1992 年に 24 株と最も多くみられたが、それ以降は増加すること

なく1998年には2株が検出されたのみであった。現状では、分離の推移からみる限り *bla_{IMP}* 遺伝子保有株の outbreak は認められなかった。ただし、1998年に当院では、*Klebsiella pneumoniae* の SHV 型 ESBL 産生菌と考えられる株がはじめて分離されるなど、耐性菌に対する監視は重要であると考えられる。

bla_{IMP} 遺伝子保有株では CAZ を含めた抗菌薬に耐性を示すものが殆どであったが、これはまず CAZ 耐性により菌の選択をおこなっていることも原因である。ただし、*bla_{IMP}* 遺伝子保有株では CAZ 耐性になると既が報告にあるように(Senda et al., J Clin. Microbiol., 34: 2909-2913, 1996)、我々の検討でも CAZ 感受性株 210 株からは *bla_{IMP}* 遺伝子は検出されなかった。また、IPM に対する *bla_{IMP}* 遺伝子保有緑膿菌の感受性は、CAZ 耐性ほど明らかではなかった。

bla_{IMP} 遺伝子保有株が分離された患者の臨床背景については、全例入院例であること、基礎疾患の存在、抗癌化学療法や抗菌化学療法をうけている頻度が、対照群と比較すると高いことから、軽症よりも基礎疾患を有する重症患者において *bla_{IMP}* 遺伝子保有緑膿菌が分離されやすいという傾向が認められた。明らかに、各種抗菌薬に対する *bla_{IMP}* 遺伝子保有緑膿菌の感受性は低かったことから、*bla_{IMP}* 遺伝子保有緑膿菌は、より治療抵抗性であると考えられることから、臨床的には、*bla_{IMP}* 遺伝子保有緑膿菌の分離は予後を予測するマーカーになる可能性があると考え、分離後の生存日数を調べたが、症例数が少ないために、特に *bla_{IMP}* 遺伝子緑膿菌分離と予後の間には相関は認められなかった。

PFGE の結果からは、同時期に同じ病棟内に限り identical なパターンを示す *bla_{IMP}* 遺伝子陽性菌が分離されていた事実からは、院内における伝播が強く疑われた。*bla_{IMP}* 遺伝子保有株は CAZ を含めた多くの抗菌薬に耐性を示すことから、院内感染対策上、重要な菌であると考えねばならない。MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) や VRE (バンコマイシン耐性腸球菌) などと同様に、院内における *bla_{IMP}* 遺伝子保有株の拡散状況を把握することは、outbreak を未然に防ぐためには院内感染対策上有用であると考えられた。

E. 結論

院内感染対策上問題となる耐性菌の拡散や、病原性の強い菌種への transmission を防止するための

情報を得る手段として、*bla_{IMP}* 遺伝子保有菌の検出は有用であると考えられた。今回、*bla_{IMP}* 遺伝子保有菌が分離された患者の臨床的な検討からは、より重症な患者から、おおくの抗菌薬に対し耐性を示す *bla_{IMP}* 遺伝子保有菌が分離されている傾向が認められた。この点については、さらに症例を増やして検討する必要があると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Y Hirakata et al., Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple -drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-β-lactamase gene *bla_{IMP}*. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2006-2011, 1998.

2. 学会発表

山口敏行ほか、カルバペネム耐性遺伝子 *bla_{IMP}* 保有緑膿菌の臨床的意義についての検討、第10回日本臨床微生物学会、川崎、1999年1月30日

ICUにおける薬剤耐性菌による感染症サーベイランスに関する試行研究

分担研究者 武澤 純 (名古屋大学救急医学/集中治療部)

研究趣旨

8施設のICUで、平成10年6月15日から30日間(1ヶ月間)の調査期間に48時間以上在室した症例(267例)を対象として、前向き、チャートレビューによる感染症に関する疫学調査を行った。ICUでの感染症症例は27症例(10%)であり、その病院内死亡率は約40-50%に及んだ。感染症症例27例中9症例(33%)が薬剤耐性菌による感染症であった。尿路感染症のリスク別の頻度は3/1714延べ尿道カテ日(1.75/1000延べ尿道カテ日)であり、血流感染のリスク別頻度は2/896延べCVカテ日(2.2/1000延べCVカテ日)であった。ICUで獲得された肺炎(7症例)の人工呼吸期間は平均13.8日であり、リスク別頻度は10.8/1000延べ人工呼吸器日であり、全ての症例(62症例)の人工呼吸期間は平均8.9日(range 1-66)であった。

A. 研究目的

本研究班の一環として、薬剤耐性菌による感染症が最も起こりやすいICUを対象とした感染症サーベイランスの試行を行った。

B. 研究方法

大学病院5施設(東北大、帝京大、名古屋大、大阪大、川崎医大)、公立病院3施設(市立船橋医療センター、県西部浜松医療センター、広島市民病院)において、平成10年6月15日から平成10年7月14日までの30日間(1ヶ月間)にICUに入室し48時間以上在室した全ての症例を対象として、前向き、チャートレビューによる感染症に関する疫学調査を行った。調査項目は、施設属性データとして、病床数、診療医師数、看護婦数、年間収容患者数、病床稼働率とした。患者属性データとして、年齢、性別、主要病名、手術または処置、APACHEスコアによる予測死亡率、在室日数、在院日数、ICU退室時転帰、退院時転帰および合併症とした。感染症データとして、感染部位(上記研究班が作成した感染症判断基準による)、起炎菌(薬剤感受性菌も含む)、ICU獲得肺炎の頻度、転帰および人工呼吸期間、ICU入室前入院日数、デバイス日、コストデータとして、在室時および在院期間中のレセプト医療費とした。消耗品費と人件費は含めなかった。また、施設機能評価は16歳以上の症例に対し、APACHE II scoreより算出される予測死亡率と実際の病院での死亡率を比較した(APACHE II scoreは

ICU入室後24時間で求めた)。但し、Technology Assessmentからの経済的評価は行わなかった。

C. 研究結果

調査期間中48時間以上ICUに在室した全症例数は267例であった。平均年齢は55.6歳(range:0歳から90歳)性別では男性167(62.8%)であった。調査期間中にICUで治療した感染症症例は27例(10%)、そのうち感染症として診断されて入室したのは14例、ICU入室中に感染症を獲得したのは13例(5.2%)であった。施設別の症例数を表1に示す。

入室前に感染症と診断された症例とICUで感染症を獲得した症例の予測死亡率と実死亡率を表2に示した。ICUにおいて感染症に対する治療を受けた症例では病院内実死亡率が約40-50%に及ぶことが判明した。感染症症例27例中9症例(33%)が薬剤耐性菌による感染症であった。

ICUで獲得された感染症(13例)について検討すると、感染部位では肺7例、尿路3例、菌血症(敗血症)2例、目耳鼻咽頭1例であった。施設別では、川崎医大6例(肺2例、尿路2例、目1例、敗血症1例)、名古屋大1例(肺)、山口大2例(肺)、帝京大1例(肺)、浜松1例(尿路)、船橋1例(肺)、東北1例(敗血症)であった。ICU在室日数は16.0日、range 7-41日(全症例では6.9日、range 1-66日)であった。ICU入室前在院日数は15.9日、range 1-114日(全症例では21日)であっ

た。起炎菌では *Pseudomonas aeruginosa*、不明、*Stenotrophomonas maltophilia*、MSSA、*Streptococcus* sp.、*Pseudomonas aeruginosa*、**MRSA**、*Haemophilus influenzae*、G群β容連菌、*Enterobacter cloacae*、*Enterococcus faecalis*、*E. coli*、*E. coli*、*Candida albicans* であり、そのうち下線の菌が耐性菌であった。感染症の診断が確定した後にICUに入室した14例について検討を加えると、感染部位では肺（6例）、尿路（1例）、創（4例）、心血管系（1例）、目、耳（2例）であった。

これらの症例のICU在室日数は9.4日、在院日数は95.5日（range 6–210 days）であった。

ICU入室前在院日数は79.8日（range 1–312 days）であった。起炎菌では**MRSA**、*Streptococcus pneumoniae*、**MRSA**、**MRSA**、**MRSA**、*Pseudomonas cepacia*、**MRSA**、**MRSA**、マイコプラズマ、**MRSA**、*Pseudomonas cepacia*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Klebsiella morganae* であり、下線の菌が耐性菌であった。

尿路感染症例は3例であり、リスク別の頻度は3/1714延べ尿道カテ日（1.75/1000延べ尿道カテ日）であった。血流感染は2例あり、リスク別頻度は2/896延べCVカテ日（2.2/1000延べCVカテ日）であった。

ICUで獲得された肺炎症例（7症例）の人工呼吸期間は平均13.8日（延べ日数：69日）であり、発生頻度は10.8/1000延べ人工呼吸器日であり、人工呼吸を必要とした全ての症例（62症例）の人工呼吸期間は平均8.9日（range 1–66）であった。医療費に関して調査が可能であったのは名古屋大、船橋、浜松、東北大から収集した68症例であった。このうち、ICUにおける医療費は平均1,553,296円（47症例）であった。ICUで獲得した感染症症例のICUにおける医療費は平均2,421,270円（3症例）であった。

D. 考察

今回の調査は収集データ項目の設定とデータ収集方法の整備およびその改善を目的として行われた。従って、収集した症例数も少ないため、統計学的検討としては不十分である。それでもなおNNISシステムと比較して、興味ある結果が得られた。今

回のICUデータをNNISの内科/外科混合ICUのデータと比較すると、表3ようになる。NNISに比べて、本邦のICUでは尿路感染、および菌血症の頻度が低いことが推測された。また、薬剤耐性菌では依然としてMRSAによる感染症の頻度が高いこと、加えて、*Pseudomonas cepacia*による院内感染が疑われる施設の存在も明らかになった。また、ICUにおいて、感染症を新たに獲得すると投下された医療費が約50%余分に必要となることがうかがわれた。また、ICUにおいて感染症に対する治療を受けた患者では、ICUを生存退室しても病院内で死亡する確率が約50%にのぼることも判明した。従って、感染を合併することによってAPACHEより予測した予測死亡率は約2倍に上昇し、なおかつ、必要医療費は50%増加することが予測された。従って、院内感染は患者転帰および病院経費に重大な影響を与えていることが予測された。

また、今回のデータ収集の試行では以下のような問題点が明らかになった。各病院の医療情報がレセプト中心となっているため、患者情報を収集するためには、それぞれのデータベースから出力したものを再度手入力する必要がある。つまり患者情報収集を主要コンセプトとした病院内情報処理システムがほとんど存在していない。疾患名、菌名、抗菌薬、手術・処置のコード化がされていないため、今後大量のデータ処理を行う際に障害となる。従って、これらデータコードの統一が必要である。MIC、ブレイクポイントなど、細菌検査室での検査法とデータベースおよび出力方法がバラバラであるため、これらの標準化が必要である。

以上、今回のサーベイランス試行を行うことによって、サーベイランス施行上の問題点と院内感染特に薬剤耐性菌による感染症が患者転帰および医療費に与えるインパクトが明らかになった。今後恒常的にリスクで層別化した感染症発生頻度の平均値を提供することによって、各施設での薬剤耐性菌による感染症の発生状況の把握、およびその数値を基にした、より科学的な院内感染対策が可能になると思われる。今後、病院患者情報システムとリンクしたICU内のサーベイランスを効率よく、強力に押し進める必要がある。

表1 施設別症例数

	山口	広島	川崎	大阪	名古屋	浜松	帝京	船橋	東北
症例数	55	22	26	16	17	20	24	65	21

表2 重症度と予後：16歳以上

	APACHEII スコア	予測死亡率	病院実死亡率	ICU実死亡率
全症例 (245)	14.9	17.6%	23.3%	12.4%
入室前感染症例 (13)	20.7	27.9%	50.0%	8.3%
入室後獲得感染症例 (13)	17.3	20.3%	42.9%	27.3%

表3 NNIS および本邦ICUでのリスク別感染頻度*

	尿路感染	肺炎	菌血症
NNIS/ICU	6.1	12.7	4.9
本邦/ICU	1.8	10.8	2.2

*感染症を起こした患者数/延べケアバイス日 x 1000

班友

松川 周 東北大学集中治療部/助教授

多治見公高 帝京大学救命救急センター/講師

境田康二 市立船橋医療センター集中治療部/
部長

妙中信之 大阪大学集中治療部/講師

福田充宏 川崎医大救急部/助教授

多田恵一 広島市民病院集中治療部/部長

前川剛志 山口大学救急医学/教授

浦野美恵子 県西部浜松医療センター/婦長

長谷川友紀 東邦大学公衆衛生学/助教授

参考文献

武澤 純：薬剤耐性菌による感染症のサーベイランスシステムに関して. 感染防止 1998: 18;13-8

国立病院における薬剤耐性菌による感染症のサーベイランス構築に関する研究

分担研究者 宮崎久義 国立熊本病院

研究要旨

薬剤耐性菌による感染症のサーベイランスシステムの構築に国立病院・療養所のネットワークを応用することを考えた。九州の国立病院のなかから各県1施設を選び協力を依頼した。調査対象菌種はMRSA、PRSP、メタロ-β-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌、VRE、VRSAの5種とし、患者情報を国立病院等総合情報ネットワーク(HOSPnet)を利用して蒐集した。試行期間は1998年7月から9月までの3ヶ月間で、7病院から報告された総数は330件で、保菌237件、感染93件であった。感染率は7月0.45%、8月0.49%、9月0.41%とほぼ一定であるが、施設間に相当の差がみられた。菌種別では、MRSA 74件、IPM耐性緑膿菌17件、MRSAとIPM耐性緑膿菌の混合2件であった。VREとVRSAの報告はなかった。この結果を菌種別、病院別に分析し病院特性、背景因子等について成果を得た。HOSPnetの利用により、全体像と病院の状況を即座に把握できるので本システムから得られる情報は感染対策に大きく貢献すると期待できる。

A. 研究目的

抗菌剤の開発と、その耐性菌の出現は交互に交差しながら、感染症対策の歴史を繰り返しつつある。更に、近年の薬剤耐性菌の出現は加速的に進みつつあり、その対策は新興・再興感染症対策の重要部分を占めると同時に薬剤耐性菌による感染症のサーベイランスシステム構築の必要性が注目される。本研究の目的は、世界最大規模のチェーン・ホスピタルであり、医療の質を保証された全国に展開する国立病院・療養所を調査定点とし、その間に張りめぐらされたコンピューターネットワーク(HOSPnet)を利用した薬剤耐性菌による感染症のサーベイランスシステムの構築にある。

B. 研究方法

- 1) 九州における試行を計画し、九州各県(沖縄を除く)それぞれから国立病院1施設を選び本研究における研究協力を依頼した(表1)。

表1. 研究協力病院(施設コード順)

国立嬉野病院
国立長崎中央病院
国立熊本病院
国立別府病院
国立南九州中央病院
国立都城病院
国立病院九州医療センター

2) 各協力病院は医師、薬剤師、臨床検査技師でチームを作り、表2のシステムを参考に報告システムを夫々構築する。

3) 調査の進め方

① 調査対象菌種はMRSA、PRSP、metallo-β-lactamase産生グラム陰性桿菌、VRE、VRSAとし、前3種については感染症と考えられるものについて月報として翌月15日までに定期報告する。VRE、VRSAを疑う菌、また新しい薬剤耐性菌が分離さ

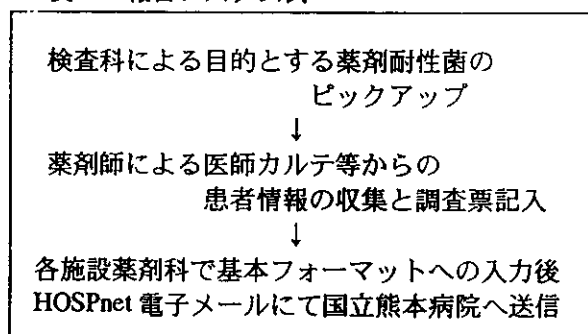
れた場合は、感染、保菌に関係なく直ちに報告する。「耐性菌判定基準」は「荒川案」に従う。

② 感染症か否かの判断は各病院における担当医師の判断に委ねる。判断に迷う場合は、「耐性菌による感染症診断のためのガイドライン」(一山、山口案)に従う。

③ 調査期間内の全患者数と上記5種の細菌の分離された患者数は、保菌・感染を問わず、全数把握する。

④ 調査対象は入院は必ず全患者、外来は出来る範囲で報告する。

表2. 報告システム例



4) 調査票(表3)の記入方法

- ・施設コードは「国立病院部施設番号」により入力する。
- ・報告番号は各施設に委ねるが原則としてID番号を用いる。
- ・報告日は各施設のHOSPnetへの入力日とする。
- ・診療科コードは「国立病院案」により入力する。
- ・住所は全国地方公共団体市区町村コードを利用する。
- ・分離菌名は5種の中から選択できるようにする。
- ・検体名コードは「荒川案」により入力する。
- ・感染症関連データの体温については、発熱ピーク時のものとする。

表3. 調査票

薬剤耐性菌患者調査票

施設コード番号	報告番号	報告日
主治医	性別	生年月日
診療科	所属	入院日
住所	区分	退院日
分離菌名	検体名	検査日

注) 分離菌名がその他に分類される時には、詳細菌名を右にお願いします

<感染症関連データ> 注) 該当するものにチェック印をお願いします

体温	<input type="checkbox"/>	37℃以下	<input type="checkbox"/>	37.1～38.9℃以下	<input type="checkbox"/>	39℃以上	<input type="checkbox"/>
白血球数	<input type="checkbox"/>	8,000未満	<input type="checkbox"/>	8,000～10,000未満	<input type="checkbox"/>	10,000以上	<input type="checkbox"/>
CRP値	<input type="checkbox"/>	1.0未満	<input type="checkbox"/>	1.0～10.0未満	<input type="checkbox"/>	10.0以上	<input type="checkbox"/>

<感染症診断名>

出来る範囲で、診断名は詳細にお願いします

1. 尿路感染症	[]
2. 肺炎	[]
3. 2. 以外の呼吸器感染症	[]
4. 消化器系感染	[]
5. 中枢神経系感染	[]
6. 皮膚・軟部組織感染	[]
7. 手術創感染	[]
8. 菌血症	[]
9. その他	[]

<基礎疾患名>

病 名

1. 悪性腫瘍	[]
2. 尿路系疾患	[]
3. 呼吸器系疾患	[]
4. 循環器系疾患	[]
5. 消化器系疾患	[]
6. 精神・神経系疾患	[]
7. 内分泌代謝疾患	[]
8. 自己免疫疾患	[]
9. その他	[]

<関連する手術・カテーテル・人工器官等> * 関連なしの場合は空欄で結構です

1年以内の手術歴	手術名	手術年月日	
尿道カテーテル	IVHカテーテル		ドレーン留置
気管挿管・人工呼吸器			末梢血管内留置カテーテル
人工器官(人工弁・人工骨頭・人工血管)	透析		その他
			経鼻・経管栄養
			PTCD

<基礎疾患に対する治療> * 該当する薬剤か治療が有る時のみ入力してください (無しの場合は空欄で結構です)

免疫抑制剤	薬剤名	[]
副腎皮質ステロイド剤	薬剤名	[]
抗悪性腫瘍剤	薬剤名	[]
放射線治療	治療部位	[]

<化学療法> … 使用された薬剤名については商品名の半角入力をお願いします

菌分離前1か月以内に投与された抗菌剤	[]
当該感染症に対する抗菌剤	[]

<転帰>

- 治療中
 治療/正常化
 軽快
 不変
 悪化
 当該感染症起因での死亡
 当該感染症以外での死亡

注) 該当するものに黒丸印をお願いします

- ・基礎疾患名では1. 悪性腫瘍を優先する。
 - ・手術については、感染症に関係があると思われるものについて記載する。
- 5) 施行期間は1998年7月から9月までの3ヶ月間とする。

C. 研究結果

試行期間の3ヶ月間の7病院からの報告件数は保菌237件、感染93件の計330件であった。感染率は7月が0.45%、8月が0.49%、9月が0.41%と大きな変化はなく、3ヶ月間の平均は0.45%であった。病院間では0.09%から1.2%まであり、かなりの差が認められた。菌種別ではMRSAが74件、IPM耐性緑膿菌が17件、MRSAとIPM耐性緑膿菌の混合感染が2例であった。VREとVRSAについての報告はなかった。

MRSAについて分析すると、診断科別では内科22.4%、泌尿器科と外科が10.5%、ついで心臓血管外科、整形外科の順であった。検体では、喀痰が49.4%と最も多く、ついで膿16.0%、尿及び糞便6.2%、血液3.7%であった。感染症診断名では肺炎が35件と多く、ついで手術創感染15件、皮膚軟部組織感染10件、肺炎以外の呼吸器感染症9件、尿路感染症8件の順であった。

基礎疾患としては悪性腫瘍19件、循環器疾患18件、ついで呼吸器系疾患10件の順に多かった。病院別に分析すると病院の特性が強く認められた。

IPM耐性緑膿菌は7病院のうち4病院から報告があり、17件のうち14件は2病院からの報告で、いずれも感染例であった。診療科別では内科が多く8件で、検出検体は膿が最も多く6件、ついで咽頭粘液、気管支洗浄液各3件が多かった。

基礎疾患としては悪性腫瘍7件が最も多かった。

D. 考察

国立病院・療養所のネットワークを利用した薬剤耐性菌のサーベイランス手法としてはほぼ完全に近いシステムを構築出来た。7つの病院の病院群、しかも九州という広域全域にわたる薬剤耐性菌の情報を3ヶ月の試行でほぼ把握できた。この情報を分析することにより、薬剤耐性菌の現状及び病院の特性や患者背景等の関与が判明した。現在もこのシステムは継続中であり、その情報の集積、分析は感染対策の有用な資料となることが期待される。さらに国立病院等総合情報ネットワーク(HOSPnet)の利用は即時性があり、直近の情報を集めることが出来ることに特色があり、威力を発揮する。今後は抗生剤の有効性も含めて、集める情報の種類と質を向上させることも必要となるであろう。

E. 結論

薬剤耐性菌によるサーベイランスシステムとしての国立病院・療養所ネットワーク、特に全国約230の国立病院・療養所をつなぐコンピューターシステムである国立病院等総合情報ネットワーク(HOSPnet)の利用は、サーベイランスシステム

として大変有用であることが分かった。今回は試行として九州管内の7つの国立病院で実施したが、今後全国規模のサーベイランスへ発展させる予定であり、その成果が期待される。

F. 謝辞

研究の実施に当たり、貴重なご意見をいただいた国立感染症研究所 荒川宜親部長(研究班長)、岡部信彦室長、厚生省医薬安全局安全対策課 三宅智、佐々木健両専門官並びに快く研究協力を引き受けて頂いた協力施設関係各位に感謝申し上げます。

「薬剤耐性菌によるサーベイランスの構築」に関する研究

分担研究者 山口恵三 研究協力者 古谷信彦 東邦大学医学部微生物学教室

研究要旨 我々は薬剤耐性菌の迅速な検出や抗菌薬の適性使用に必要な科学的根拠を得るために、検査部を中心として臨床検体からの分離菌の頻度や薬剤感受性の動向を年間を通してリアルタイムで把握できるサーベイランスシステムの構築を目指している。今回は、本研究参加 23 施設で、調査票を用いて 3～7 日間の試行を行い、①調査項目、②調査方法について検討した。調査項目では最低限必要と思われる項目については、住所と入院日を除くと 94～100%の充足率であったが、患者背景、検査所見の充足率は施設によって大きく異なった。したがって、サーベイランスを効率よく始めるには各施設を収集できる項目によって層別し、そのグループ毎にサーベイランス項目を定めて行うのが最も良い方法と思われた。また、調査方法では調査票方式は記入のためのマンパワーが確保できなければ年間を通して行うことは困難であり、情報がリチンワークの中で新たな労力負担を必要とせずに検査部のデータベースに収集されるシステムの開発が必要と考えられた。

A. 研究

耐性菌の動向を正確に把握することは、エンピリックセラピーにおける抗菌薬の選択や院内感染のコントロールを行う上で極めて重要である。

米国ではすでに CDC が中心となり、多施設の参加によるサーベイランスが実施されており、全国規模で院内感染や耐性菌出現の動向に関する調査が行われている。我が国においては、厚生省委託事業の一環として平成 4 年度より「抗生物質感受性状況調査」が全国規模で年 2 回、時期を指定して実施され、それらの成績は報告書を通じて関係施設に配布されてきた。しかし、この報告書には患者背景に関する情報が含まれていないことや情報収集時期が限られることもあって、その利用率は必ずしも高いものではない。すなわち、臨床の場では検体から分離された菌が感染症の原因菌としてどのような意義を有しているのかも情報として要求されるからである。しかも、耐性菌による感染症に対して有効な対策を早急に確立するためにはこのような情報をリアルタイムで収集・解析し、報告しなければならない。

このような観点から、我々は臨床検体由来の分離菌の頻度や薬剤感受性の動向とともに感染症患者の実態に関する調査をリアルタイムで行えるサーベイランスシステムの構築を試みている。今年度は、調査票を用いて、実際に各施設で 3～7 日間の試行を行い、①サーベイランスで調査すべき項目、②調査方法について検討した。

B. 研究方法

検査部を中心とした場合の理想的なサーベイランスのフローチャートを(図 1)に示すが、①情報をどのように入手するか、②最低限必要な患者情報と検査結果はなにか、③収集した患者情報と検査結果をどのようにして共通フォーマットに入力するか(表 1)、がサーベイランスを行う上での課題として浮かび上がった。これらの問題点のうち今回の試行では①と②の問題点について調査票を用いて検討した。

図1.「検査部を中心としたサーベイランス」における試行前のフローチャート

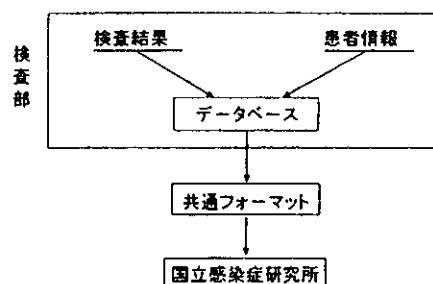


表1.「検査部を中心としたサーベイランス」
—試行前の問題点—

1. 患者情報の入手をどのように行うのか。
2. 最低限必要な患者情報と検査結果の設定をどのようにするのか。
3. 収集した患者情報、検査結果をどのようにして共通フォーマットに入力するのか。

今回の試行では、主に1と2の問題点について検討した。

試行に参加した施設は当施設以下、東北大学加齢医学研究所胸部腫瘍内科、群馬大学医学部微生物学、名古屋大学医学部微生物学、岐阜大学嫌気性実験施設、和歌山県立医科大学第二外科、京都大学臨床病態検査学、京都府立医科大学病院臨床検査科、産業医科大学泌尿器科、長崎大学医学部第二内科、国立三重病院、国立小児病院感染科、神奈川県衛生看護専門学校附属病院内科、帝京大学医学部内科、大阪市立総合医療センター感染症センター、北里大学医学部感染症学、東京都老人医療センター、聖マリアンヌ医科大学微生物学、長崎大学医

学部熱帯医学研究所内科、東京慈恵会医科大学泌尿器科、関東通信病院、千葉大学医学部検査部の23施設であった。

試行を行った期間は各施設で若干の相違がみられるが、1998年9月中の任意の3~7日間であった。

調査票で収集する項目は病院コード、患者コード、住所、生年月日、性別、入院年月日、入院・外来の区分と入院病室番号、各病院での担当科名、検体採取日、検査材料名、炎症所見(検体採取前後3日間の体温、白血球数、CRPの最高値)、基礎疾患および医療措置、推定感染症名、過去1週間の抗菌薬の投与歴(薬剤名、投与方法、投与量、投与期間)、過去1週間の抗菌薬以外の薬剤の投与歴(薬剤名、投与方法、投与量、投与期間)、検体の塗抹鏡検所見、嫌気培養の有無、分離菌名と菌量、薬剤感受性検査(測定方法と測定結果)とした(表2)。図2に今回使用した調査票を示す。

表2 試行で収集したサーベイランスに必要な患者情報と検査結果

- A 必須項目**
 病院コード(全国共通の医療機関コード)、患者コード(各病院の患者ID)、住所(都道府県、市町村まで)、生年月日(西暦)、性別、入院年月日(西暦)、入院・外来の区分と入院病室番号、各病院での担当科名、検体採取日、検査材料名
- B 患者背景**
 炎症所見(検体採取前後3日間の体温、白血球数、CRPの最高値)、基礎疾患および医療措置、推定感染症名、過去1週間の抗菌薬の投与歴(薬剤名、投与方法、投与量、投与期間)、過去1週間の抗菌薬以外の薬剤の投与歴(薬剤名、投与方法、投与量、投与期間)
- C 検査結果**
 検体の塗抹鏡検所見、嫌気培養の有無、分離菌名と菌量、薬剤感受性検査(測定方法と判定結果)

図2

施設	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1																								
2																								
3																								
4																								

施設	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1																								
2																								
3																								
4																								

調査票の記入方法としては、①検査依頼をする際に主治医が調査票の患者背景の記入を行い、検査依頼用紙とともに検査部に提出し、その後、検査部で調査票の検査結果を記入する方法と、②検査部での検査結果に基づいて調査担当者が病棟・外来に赴き患者調査を行なう方法(図3)の二通りが考えられたが今回は調査方法は各施設に任せた。

C. 研究結果

1) 医療情報開発センターの解析結果

23 症例から収集できた情報は 1257 症例で、検体数では 1441 件であった。調査票の各項目の充足率は、必須項目ではほとんどの項目が 94~100%であったが、入院日と住所はそれぞれ 78%と 80%であった。

患者背景では炎症反応の記入充足率は、体温が 66%、白血球数が 78%、CRP が 83%と検査項目で差がみられた。基礎疾患の充足率は 83%であったが、推定感染症名、薬剤の投与歴の充足率は低く、特に抗菌薬以外の薬剤の投与歴については 11%の充足率にすぎなかった。検査結果でも低倍率でグラム染色所見や膿尿の評価を行っている施設はかなり少なかった(表3)。

今回の試行では、これらの項目の充足率に加えて各施設で採用されている薬剤感受性検査についても検討した。各施設で採用されている薬剤感受性検査では微量液体希釈法が圧倒的に多く、19 施設中 17 施設で本法が採用されていた。薬剤感受性検査の件数でも微量液体希釈法は全件数の 86%を占めており、その他ではセンシディスク、栄研 KB ディスクがそれぞれ 8%、4%であった(表4)。

図3. 調査票による患者情報の入手方法

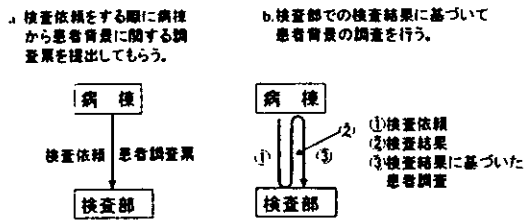


表3. 第1回目の試行の結果(1)

MEDISのデータ

総患者数 1257例
総検体数 1441件

1. 記入充足率

1) 必須項目

病院コード	1257/1257例	100%
患者コード	1257/1257例	100%
住 所	978/1257例	78%
生年月日	1233/1257例	98%
性 別	1239/1257例	99%
入 院 日*	719/1257例	80%
外来・入院	1229/1257例	98%
担当科名	1216/1257例	97%
検体採取日	1210/1257例	96%
検査材料名	1350/1441例	94%

*入院日は 記入数/入院件数

2) 患者背景

炎症所見		
体 温	831/1257例	66%
白血球数	981/1257例	78%
CRP	1041/1257例	83%
基礎疾患名	1042/1257例	83%
推定感染症名	843/1441例	59%
抗菌薬の投与歴	525/1257例	42%
抗菌薬以外の投与歴	144/1257例	11%

3) 検査所見

グラム染色所見*	411/1441例	29%
膿 尿	102/1441例	7%
分離菌量	1139/1441例	79%

*低倍率による細胞の鏡検を示す。

表4. 第1回目の試行の結果(2)

— 薬剤感受性試験 —
MEDISのデータ

1. 主な薬剤感受性検査法

微量液体希釈法	17施設
栄研KBとセンシディスク	1施設
その他	1施設

2. 件数別の薬剤感受性検査の割合

微量液体希釈法	465例	86%
センシディスク	42例	8%
栄研KBディスク	24例	4%
昭和濃度ディスク	0例	0%
栄研KBディスク ₁	0例	0%
E-テスト	0例	0%
寒天平板希釈法	1例	0%
その他	9例	2%

2) アンケート調査による解析

調査票の各項目の内容と各施設での調査票の収集方法についてアンケート調査を行った。調査票の項目に関しては、①項目が多いこと、②検査結果と患者背景の項目が混在していること、③記入が複雑でかなりの時間と労力がかかることが指摘された。したがって、多くの施設で、実際に調査票に記入したのは本調査担当者であり、労力負担が一人に集中してしまう状況となった(表5、表6)。

表5 20施設より得られたアンケートの結果(1)

調査票に記入なさった方はどなたでしょうか。(複数回答可)

病棟勤務者(医師、看護婦)	4施設
外来勤務者(医師、看護婦)	1施設
検査技師	6施設
本調査担当者	11施設
その他	3施設

表6. 20施設より得られたアンケートの結果(2)

— 病棟・外来からの協力が得られなかった理由 —

- ・項目が多い(クレームが出た)。
- ・検査項目と臨床背景の記入が混在しているので当惑しやすい。
- ・記入手順が複雑。
- ・時間外労働となる。
- ・調査の目的・意義がわからない(目的・意義のパンフレットが必要である)。
- ・自分の仕事を中断して協力しなければならない(かなりの時間と手間がかかる)。

D. 考 察

調査票を用いた情報収集では記入のために多大な労力を必要とし、この方式を採用するならば、新たなマンパワーが得られない限りサーベイランスを年間を通してリアルタイムで行うことは難かしいと考えられた。しかし、現実的には各施設ともマンパワーの確保は困難であり、それに代わるものとしてサーベイランスに必要な情報を検査部のルチン検査の一環として収集できるシステムの構築が最も望ましいと考えられた。具体的には、今回使用した調査票の項目の見直し、削減を行い、患者背景は検査依頼用紙として主治医が病棟・外来で記入し、それらを検査部で検査結果とリンクさせて、検査部のデータベースとして活用させることで情報を得るシステムである(図 4)。

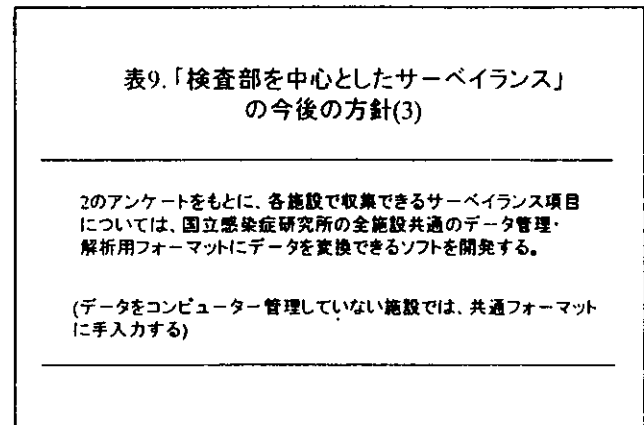
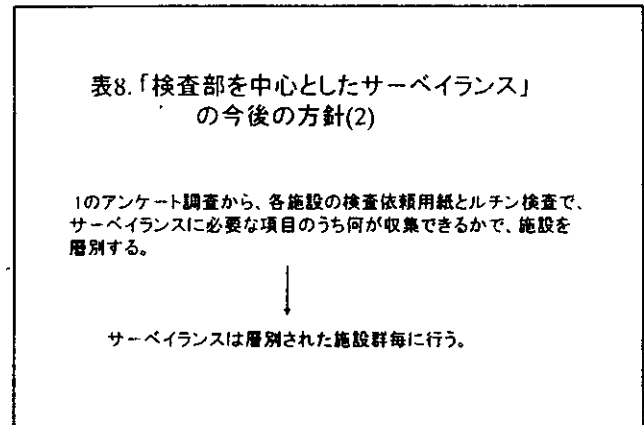
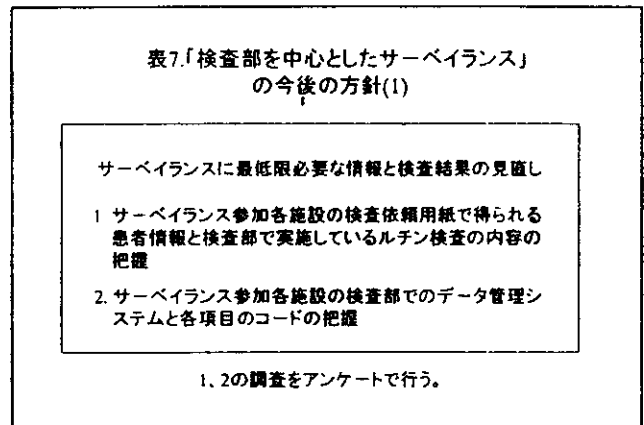
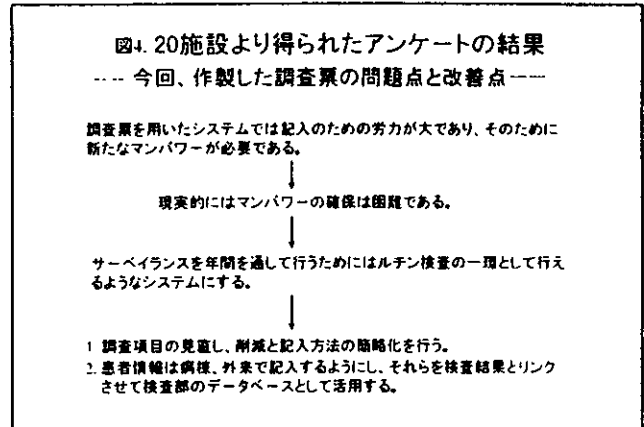
しかし、収集する項目を決定し、それに準じて各施設の検査依頼用紙や検査方法、データベースの内容を共通のものに変えるのは困難であり、もしできたとしてもそれはかなりの時間を要することが否めない。

したがって、次年度は、①表 7 で示したように、各施設で得られる調査項目と、検査部でのデータ管理システムおよび各項目のコードをアンケート調査で把握する、②アンケート調査をもとに各施設をどんな項目が収集できるかで層別する、③層別したグループ毎にサーベイランスを行なう(表 8)、が必要と考えられる。

②と③に関しては、第 1 回目の試行で充足率が 94～100%である項目を最低限必要な項目とし、これのみを満たす施設群をグループ A、さらに項目が増加するに従いグループ B、グループ C に分け、現時点では収集できる項目が少ない施設でも将来的にグレードアップできるシステムを提供すれば、サーベイランスの質は自然と向上することが期待できる。

また、アンケート調査で把握できたデータ管理システムや各項目のコードをもとに、全施設共通のデータ管理・解析用フォーマットにデータを変換できるソフトを開発することが不可欠であり、これによって各検査部のデータを共通フォーマットに入力する必要がなくなる(表 9)ので、各施設でのデータ収集からデータが共通フォーマットに保存されるまでの過程が、新たなマンパワーの必要もなく、年間を通してルチン検査として実施することが可能になると考えられる。

なお、項目としては薬剤感受性検査の結果をどのように扱うかが問題となるが、第 1 回目の試行後のアンケート調査ではほとんどの施設で微量液体希釈法が実施されており、サーベイランスに関して方法は問題とはならないと考えられる。しかし、感受性検査に用いる抗菌薬が各施設で異なるので、クラスディスクによる抗菌薬のグループ化が必要と思われる。



E.結 論

調査票を用いてサーベイランスを行なったが、項目によって充足率に差がみられ、項目の見直し、削減が必要と思われた。また調査票方式では本調査担当者が調査票の記入を行なわなければならない、実際にこの体制でサーベイランスを行なうならば、新たなマンパワーが必要と考えられた。

今回の第 1 回目の試行とそれに関するアンケートから次年度は、①各施設で得られる調査項目と、検査部でのデータ管理システムおよび各項目のコードのアンケート調査を行い、②アンケート調査をもとに各施設でどんな項目が収集できるかでグループに分け、③そのグループ毎に第 2 回目の試行を行なう予定である。また、抗菌薬のクラスディスク化と共通フォーマットへのコンバート用ソフトの開発が不可欠と考えられる。

多剤耐性結核菌を対象とするサーベイランスシステムの構築に必要な結核菌薬剤感受性試験の開発

分担研究者 山根 誠久 琉球大学医学部 臨床検査医学講座

研究要旨 多剤耐性結核菌を対象とするサーベイランスシステムの構築に必要な、国際的にも互換性をもつ結核菌薬剤感受性試験の開発を試み、Middlebrook 7H9 プロスを用いる微量液体希釈法での最小発育阻止濃度 (MIC) の測定を国内複数施設で検討し、以下の結論を得た。(1) 精度管理用菌株を用いた反復試験で測定された MIC に高い再現性と施設間の互換性が確認された。1,022 件の MIC の内 1,020 件(99.8%)は 2 倍希釈系列での許容範囲、 $3\log_2$ 以内に分布した。(2) 精度管理用菌株を用いて、NCCLS M24-T 勧告の agar proportion 法との互換性を検討したが、両者の間に高い相関を認め、99.4%の一致率が得られた。(3) 臨床分離株について agar proportion 法との互換性を評価すると、設定された MIC breakpoint で 97%~100%の判定一致率が得られた。唯一 EB については一致率が低く、77%にとどまった。(4) 臨床材料由来の結核菌 1,217 株について MIC 測定を行った。すべての菌株は培養 7 日間で肉眼的に充分菌発育終末点を判読することが可能であった。以上の成績から、今回新たに開発した結核菌薬剤感受性試験は、迅速で、定量的な高い測定精度をもつ試験方法として充分臨床応用できることが確認され、国際的な成績とも互換性をもつことから、今後わが国における多剤耐性結核菌のサーベイランスシステムに組み込まれるべき検査技術であると結論された。

A. 研究目的

わが国の医療施設で採用されている結核菌薬剤感受性試験は、全卵を主成分とする小川培地での培養を検査原理としている。しかしこの卵培地での薬剤感受性試験は、国際的に認証された方法ではなく、米国の臨床検査標準化委員会、National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) の勧告、M24-T には卵培地 (小川培地) は結核菌の薬剤感受性試験に使用してはならないと明記されている。従って、現在のところわが国には、世界から報告される成績と互換性をもつ結核菌薬剤感受性試験が存在しない。一方で世界的には rifampicin, isoniazid などの一次抗結核剤に耐性を示す多剤耐性結核菌の拡がり懸念されており、1994 年に発表された米国 Centers for Disease Control and Prevention (CDC) からの勧告では、結核菌検査の迅速化が強く提唱され、特に薬剤感受性試験では検体採取から 30 日以内に結果報告することが求められてきた。これまで我々は Middlebrook 7H9 プロスを用いた液体培地での抗酸菌薬剤感受性試験を検討してきた。既に酸性条件下での結核菌の培養から pyrazinamide (PZA) 薬剤感受性試験を開発し、現在広く臨床応用されている。また一般細菌と同じ検査原理から微量液体希釈法での最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) を定量する測定系を考案し、複数施設での評価から高い再現性と互換性を確認した。今回、最終的な臨床応用を目的として、結核菌での MIC 測定系を開発し、その測定精度と成績信頼性を評価すると共に、得られた MIC から耐性・感性を判定するための breakpoint を、現在のところ最も標準法に近いとされる NCCLS の

勧告する agar proportion 法との互換性から設定した。

B. 研究方法

(1) 試験薬剤

微量液体希釈法では、以下の 8 剤を試験対象とした; streptomycin (SM), ethambutol (EB), kanamycin (KM), isoniazid (INH), rifampicin (RFP), levofloxacin (LVFX), sparfloxacin (SPFX), ciprofloxacin (CPFX)。いずれも原薬を分与あるいは購入し、その指示に従って水溶液を調製した。MIC 測定の濃度域は、SM, EB, KM については $0.125 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 128 \mu\text{g}/\text{ml}$, INH, RFP, LVFX, SPFX, CPFX については $0.03 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 32 \mu\text{g}/\text{ml}$ に設定した。

(2) 使用菌株

異なる施設間での再現性を評価する目的で、*M. tuberculosis* ATCC 27294, 臨床材料由来の保存株、H-17, H-52, H-55 の計 4 株を使用した。

またこの共同研究に参加した 7 施設にて各種の臨床材料より分離、同定された *M. tuberculosis* 1,217 株を使用した。いずれの分離株も DDH マイコバクテリア '極東' (極東製薬工業, 東京)あるいは AccuProbe(Gen-Probe, San Diego, U.S.A.)にて菌種同定を行った。

(3) 微量液体希釈法での MIC 測定

先に報告した試験方法に則り、薬剤乾燥固着マイクロプレートに調整、希釈した *M. tuberculosis* の菌浮遊液を接種して培養した。

小川培地上に発育した培養 4 週間以内の新鮮分離菌コロニーを綿棒にて Middlebrook 7H9 broth に接種し、McFarland #1 濁度に達するまで $36 \pm 1^\circ\text{C}$ にて培養した。得られた菌浮遊液を光学的に

McFarland #1 濁度に正確に調整し、その 0.21 ml を 21 ml の変法 Middlebrook 7H9 broth に加え、接種菌液とした(6×10^5 cells/ml)。薬剤乾燥固着マイクロプレートの各ウェルに菌液 0.2 ml を接種し、5%~10%CO₂、36±1℃にて培養した。MIC の判定は培養 7 日目と 10 日目の 2 回行った。いずれも肉眼的に菌発育がまったく認められない最小薬剤濃度を MIC と判定した。

(4) Agar proportion 法

NCCLS M24-T に記載された Middlebrook 7H10 寒天培地を用いる agar proportion 法を正確に遵守して試験した。培養 21 日目に薬剤を含まない菌発育対照でのコロニー数と薬剤含有培地でのコロニー数を計測し、その比率で 1%以上のコロニー数が観察された菌株を耐性、1%未満の菌株を感性に判定した。なお NCCLS M24-T に試験薬剤濃度の記載されていない LVFX, SPFX, CPFEX については、先の検討で測定された MIC の分布から培地中の薬剤濃度を 0.5 µg/ml に設定して試験した。

C. 研究結果

(1) 反復試験による施設間再現性の評価

4 株の精度管理用菌株を異なる 7 施設で反復測定し、施設内再現性と施設間の互換性を解析した。H-52 株での KM 2 件(10 日間培養)、H-55 株での SM 1 件(10 日間培養)、EB2 件(7 日間および 10 日間培養、各 1 件)、RFP1 件(7 日間培養)を除き、測定された MIC はすべて 2 倍希釈系列での精度管理許容限界、±1 管(3log₂)以内に分布した。総計 1,022 件中、7 日間培養では 1,020 件(99.8%)、10 日間培養では 1,018 件(99.6%)が再現性の許容範囲の値を示した。また 7 日間培養と 10 日間培養で判定された MIC を比較すると、10 日間培養で若干高い MIC に判定される傾向が観察されているが、H-55 株での RFP を除き、いずれも設定された MIC 許容範囲(3log₂)には有意の差が認められなかった。また各薬剤に比較的感性を示す 2 株(ATCC 27294 および H-52)と比較的耐性を示す 2 株(H-17 および H-55)では、得られた MIC から明確に感性株、耐性株を区別することが可能であり、本試験の高い測定精度が確認された。

(2) 精度管理用菌株での Agar Proportion 法との比較

精度管理用菌株 4 株を反復試験して得られた MIC と参照法とした agar proportion 法での結果の判定互換性を解析した。Agar proportion 法での 1%耐性を感性・耐性の判定 breakpoint とし、得られた MIC の分布を解析すると、SM では、agar proportion 法で感性を示した ATCC 27294 株および H-52 株の MIC はすべて 1 µg/ml、逆に耐性を示した H-55 株の MIC は 32~128 µg/ml に分布した。EB では、agar proportion 法で耐性の H-17 株、H-55 株の MIC はすべて 4 µg/ml 以上に分布し、比較的感性の ATCC 27294 株、H-52 株の

MIC は 1 µg/ml であった。同様に KM では、感性の ATCC27294 株、H-17 株、H-52 株の MIC は 1~4 µg/ml に分布し、耐性 H-55 株の MIC、> 128 µg/ml とは明確に区分された。INH についても、感性株である ATCC 27294 株、H-52 株の MIC はすべて 0.5 µg/ml 以下に、他方耐性株(H-17 株、H-55 株)の MIC は 8~16 µg/ml に分布した。RFP でも感性株(ATCC 27294 株、H-52 株)の MIC はすべて 0.03 µg/ml 以下、耐性株(H-17 株、H-55 株)の MIC はすべて 4 µg/ml 以上の MIC を示し、両者の判定には高い互換性が認められた。今回新たに検討した LVFX, SPFX, CPFEX についても、agar proportion 法での 1%耐性率を breakpoint として判定すると、耐性株、H-17 株および H-55 株の MIC は明確に感性株(ATCC 27294 株、H-52 株)と区分される分布を示した。総計 352 件の試験結果の内、350 件(99.4%)について両法で一致した判定を得ることができ、良好な再現性と参照法との高い互換性が確認された。

(3) 臨床分離株での Agar Proportion 法との互換性—判定 Breakpoint の設定

7 施設で分離、同定された *M. tuberculosis* 93 株について、MIC と agar proportion 法での %耐性率の分布を解析したが、先の精度管理用菌株での反復試験から暫定的に設定された MIC breakpoint とほぼ一致する成績が得られた。SM では、agar proportion 法で感性の 71 株の MIC はすべて 4 µg/ml 以下、他方耐性の菌株では、1 株を除き、8~>128 µg/ml に MIC が分布した。EB の成績がふたつの試験方法間で最も乖離する結果となった。感性株の MIC は 0.5~4.0 µg/ml に分布したが、1%以上の耐性率を示す菌株の MIC も 0.5~>128 µg/ml の広い範囲に分布し、両者を明確に区分できる MIC breakpoint を設定することができなかった。KM については、32~64 µg/ml を MIC breakpoint に設定すると、3 株の判定乖離が生じ、判定一致率は 96.8%であった。INH では MIC 0.5 µg/ml 以下、4.0 µg/ml 以上で判定すると、1 株のみが偽耐性で乖離し、98.9%の一致率が得られた。RFP でも感性株のほとんどは 0.03 µg/ml 以下の MIC を示し、耐性株は 4 µg/ml 以上で、2 株が偽感性に判定され、97.8%の一致率が得られた。LVFX, SPFX, CPFEX については、いずれも 0.5~1.0 µg/ml に MIC breakpoint を設定することで、97.8~100%の判定一致率が得られた。

(4) 臨床分離株での MIC 分布

各施設で臨床材料より分離、同定された結核菌 1,217 株について測定された 8 剤の MIC 分布を解析した。SM, EB, KM の 3 剤では 7 日間培養と 10 日間培養でほぼ同じ MIC 分布を示し、培養日数による有意の差は観察されなかった。INH, RFP, LVFX, SPFX, CPFEX の 5 剤についても培養日数による明らかな差異は観察されていないが、INH と

SPFX の 2 剤については 10 日間培養で若干高い MIC に判定される傾向があった。特に $0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ に分布する MIC の範囲でこの傾向が顕著に観察された。今回測定対象とした 8 剤について、50%および 90%の菌株の発育を抑制する MIC₅₀, MIC₉₀ と先に設定した MIC breakpoint で判定したときの耐性頻度を解析すると、MIC₉₀ では RFP が、MIC₅₀ では INH と SPFX が 10 日間培養で 1 管高くなり、その他の薬剤については有意の変化を認めなかった。また耐性率では、SM, INH, RFP の一次選択薬剤で 10%を越える耐性頻度が算出され、これらの薬剤の使用頻度に伴って耐性化が進んでいることが推測された。

D. 考 察

Middlebrook 7H9 broth を用いた微量液体希釈法での MIC 測定を、結核菌を対象に開発し、その測定精度と互換性を国内複数施設において評価した。既に我々は同じ培地を用いて酸性 pH での培養が必要な PZA について 7 日間の培養での macrodilution 法から耐性・感性を定性判定する試験方法を開発し、報告している。また今回評価した微量液体希釈法での MIC 測定についても、結核菌を含む幅広い抗酸菌を同一の条件で試験することを目的として評価した成績を報告している。今回評価した試験方法は最終的な臨床応用を企図したものであり、対象菌種を結核菌のみに限定している。菌種を限定した理由はふたつあり、ひとつは同じ抗酸菌といえども菌種が異なれば必然的に適用となる抗菌剤の種類が異なること、もうひとつは将来的に MIC から耐性・感性を判定する際に用いられる MIC breakpoint が菌種によって異なると予想されることによる。

得られた成績からは、新たに開発された試験方法は高い測定精度をもち、現在のところ世界的に最も標準法に近いとされる NCCLS M24-T 勧告にある agar proportion 法とも高い互換性が確認された。今回用いた精度管理用菌株は 4 株あり、内 2 株は感性、残る 2 株は比較的耐性の菌株を選定した。NCCLS も微量液体希釈法での精度管理用菌株には、MIC 測定濃度域のほぼ中間の MIC を示す菌株を選ぶように勧告しており、*M. tuberculosis* ATCC 27294 に加え in-house 株の 3 株を新たに検討した。総計 1,022 件の試験の内、1,020 件(99.8%)は 2 倍希釈系列を用いた終末点法での許容限界 $3\log_2$ 以内に分布し、高い再現性と互換性を異なる施設間で保証できることが示された。また参照法とした agar proportion 法とも、耐性・感性の定性判定で高い互換性が確認されている。精度管理用菌株の反復試験と臨床分離株での相関から、暫定的に MIC breakpoint を設定したが、この breakpoint を用いて agar proportion 法と比較すると 96.8%から 100%の判定一致率が得られた。しかし EB については 77%の一致率にとどまり、明確な breakpoint

の設定が困難であった。この原因にはいくつか考えられるが、今回の精度管理用菌株の反復試験からも明らかのように、むしろ agar proportion 法に十分な再現性を期待することができないこともその一因としてあげられる。MIC breakpoint の設定は今後に残された課題のひとつであり、例えば RFP については、今回その MIC が $0.06 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ までの間に分布する菌株がなかったため、この濃度域の判定は未だ判定保留として残されている。各薬剤の breakpoint 付近の菌株を含め、判定保留域の菌株をより詳細に解析することで最終的な breakpoint を提示することが必要であろう。

本試験方法を実際に臨床検査として実施する際には、現行の培養法、同定検査との整合性を図る必要がある。特に検体からの抗酸菌分離を目的とする一次培養では、従来からの小川培地から Middlebrook 7H9 broth を用いる方向にあることから、その臨床応用でふたつの問題が生じてくる。ひとつはマイクロプレートへ接種するための均一な菌浮遊液の作成で、Middlebrook 7H9 broth に Tween 80 が添加されている培地では問題はないが、Tween 80 を含まない場合には液体培地に固い菌塊が形成されてくるため、培養陽性と判定された培地を直接接種することができない。もうひとつは小川培地での薬剤感受性試験ではあまり問題とならなかった一般細菌の混入発育である。これまでの検討でも、小川培地上に微量に残存している streptococci が Middlebrook 7H9 broth に接種されると沈殿発育し、肉眼的には本来の試験対象である結核菌と識別できないことが経験されている。液体培地で一次分離培養する場合には、陽性培地の一部をまずグラム染色して一般細菌の混入の有無を確認することが必要である。

今回新たに開発した微量液体希釈法での結核菌薬剤感受性試験を採用することでわが国は世界に先駆けて CDC 勧告を最初に実現できる可能性が高まった。7 日間あるいは 10 日間の培養で薬剤感受性の結果を臨床医へ報告することが可能となった訳で、迅速検査という意味でその臨床的意義は極めて高いと評価される。しかしここで注意しなければならないのは、①MIC 測定は結核症の治療効果と直接結びつくものではないこと、②開放された培養系で試験するため、十分なバイオハザード対策を前提としていることである。われわれは、①については、結核症のすべてが複数薬剤で治療されていることから、単一の薬剤についてその MIC を測定することは表現型 (phenotype) としての薬剤耐性をより正確に検出することを目的とした検査、すなわち耐性検査であるとみなしている。従って breakpoint の設定にあたっては極力 very major error, 耐性を感性と誤る頻度を減らすものでなければならない。また②については、本試験を含め、検体の希釈、遠心、再浮遊、液体培地での培養、遺