

20000816

厚生科学研究研究費補助金

医薬安全総合研究事業

医療機関等における安全対策に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

平成13(2001)年4月

主任研究者 一 山 智

## 目 次

I. 総括研究報告書	
医療機関等における安全対策に関する研究	----- 1
一山 智	
II. 分担研究報告書	
医療機関等における安全対策に関する研究	
耐性菌検出精度管理に用いる菌株の選定とその精度管理について	----- 4
飯沼 由嗣	
荒川 宜親	
(資料) 表 1～5	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 16
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 17

厚生省科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
総括研究報告書

医療機関における安全対策に関する研究

主任研究者 一山 智（京都大学臨床病態検査学 教授）

研究要旨

医療施設の細菌検査室での抗菌薬耐性菌検査の標準化と精度管理に関する研究で、本年度の検討においては、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）、多剤耐性緑膿菌、ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）、広域スペクトラムβラクタマーゼ（ESBL）産生菌大腸菌、およびESBL産生 *K. pneumoniae* の6菌種について全国の20施設で菌株の安定性や検査の再現性を検討した。

その結果、VRE1株、PRSP1株、ESBL産生大腸菌2株、ESBL産生 *K. pneumoniae* 2株、および前年度検討済みのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）1株と多剤耐性緑膿菌1株、合計8株を抗菌薬耐性菌精度管理用菌株と設定した。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

荒川 宜親 国立感染症研究所  
細菌・血液製剤部 部長  
岩田 進 日本臨床衛生検査技師会  
事務局 会長  
飯沼 由嗣 名古屋大学医学部附属病院  
検査部 助手

すなわち、肺炎球菌（PRSP）2株、Van-A型およびVan-B型腸球菌2株、緑膿菌1株（昨年度選定分）、及びESBL産生菌4株（SHV-12型、Toho-1型の *E. coli* 及び *K. pneumoniae*）の4菌種、9株である。これらの菌株についてNCCLSで定められた抗菌薬感受性試験方法（ディスク法及び微量液体希釈法）を実施した。具体的には以下の方法で検査した。

ディスク法：ESBL以外はBBLのKBディスクを使用した。ESBLについては栄研化学のCAZ、CTX、CAZ/CVA、CAZ/CVAを使用した。培地は、肺炎球菌はミューラーヒントン血液寒天培地を、その他の菌はミューラーヒントンII寒天培地を使用した。結果は、阻止円径の測定とS、I、Rの判定を行った。

微量液体希釈法：栄研化学のドライプレート（既製品）とフローズンプレート（特注品）または自動検査機器（デードベアリング社のWalk/Awayあるいはピオメリュー社のVitek）を使用し、最小発育阻止濃度（MIC）を測定、S、I、Rの判定を行った。

その他：E-testを用いた抗菌薬感受性試験を実施している施設は、本法によりMICを測定し、S、I、Rの判定を行った。また、ESBLに関しては

A. 研究目的

本研究は細菌検査室での薬剤感受性試験の標準化と精度管理を目的としている。さらに、厚生科学研究「新興・再興感染症研究事業；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関する研究」および「新興・再興感染症研究事業；薬剤耐性菌による感染症症例情報ネットワークの構築に関する研究」の目的に合致させるものである。

B. 研究方法

菌株の選定は臨床分離株のなかから比較的典型的な耐性パターンを示す株のうち、薬剤耐性の遺伝学的な背景も明らかな菌株を選定した。

デードベアリング社の ESBL confirmation パネルによる検査も実施した。

また、継代による安定性試験もそれぞれの菌株について、週 1 回ずつ計 5 回の継代で感受性試験を実施し、さらに、京都大学、名古屋大学、滋賀医大、安城更正病院、防衛医大の 5 施設で保存（マイクロバンク内、 $-80^{\circ}\text{C}$  保存）された菌株を用いて、月 1 回検査し保存による影響も検討した。

（倫理面への配慮）

耐性菌の分離された患者についてプライバシーの保護には万全を期す。

### C. 研究結果

#### ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）

検討した 2 株（*S. pneumoniae* KK-133 と *S. pneumoniae* 197）はいずれもディスク法で MIPIC の阻止円直径が 19mm 以下であった。PCG に対する MIC では、2 株間で分布に差がみられ、そのうち耐性度が比較的高く、すなわち I（中間）と判定される率が少ない株（*S. pneumoniae* 197）を基準株とした。その際の感受性結果の基準範囲を、MIPIC のディスク法では not S（阻止円直径 19mm 以下）、PCG の MIC 法では I or R（MIC 1-4）と設定した。なお、継代による感受性の変化はみられなかった。

#### バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）

VanA 型 VRE（*E. faecium* NCB-43）と VanB 型 VRE（*E. faecalis* HKY-RV1）の 2 株を検討した。いずれもディスク拡散法で VCM 耐性と判定され、MIC はいずれも 32 以上で R であった。TEIC に対しては、VanA 型 VRE はディスク拡散法および MIC 法いずれでも、I または R と判定結果が一定しなかった。一方、VanB 型 VRE はディスク拡散法では 98%、MIC 法では 100%で S と判定された。また、ABPC に対して 100%で S と判定された。したがって、これらの感受性結果が安定しているため、VanB 型 VRE（*E. faecalis* HKY-RV1）を基準株とした。その際の感受性結果の基準範囲

を、VCM のディスク法では R、VCM の MIC は 32 以上で R、TEIC の MIC は 8 以下で S、ABPC の MIC は 8 以下で S と設定した。なお、継代による感受性の変化はみられなかった。

#### カルバペネム耐性緑膿菌

前年度までに IPM および CAZ に対して耐性を示し、精度管理用株として設定された株（*P. aeruginosa* MSA-137）を用いた。今回はさらに AMK および LVFX の感受性結果も検討した。AMK に対してはディスク法では 99%、MIC 法では 97%で S を示し、LVFX に対してはディスク法では 100%、MIC 法では 97%で S を示した。したがって、感受性結果の基準範囲をディスク法では両薬剤とも S、MIC 法では AMK においては 16 以下、LVFX においては 2 以下と設定した。AMK および LVFX に対しては、継代による感受性の変化はみられなかったが、IPM および CAZ に対しては、一施設で継代によるプラスミドの脱落と思われる感受性の変化が観察された。

#### 広域スペクトラム $\beta$ ラクタマーゼ（ESBL）産生菌

SHV-12 型 ESBL 産生大腸菌（*E. coli* HKY-741）、SHV-12 型 ESBL 産生クレブシエラ（*K. pneumoniae* HKY-525）、Toho-1 型 ESBL 産生大腸菌（*E. coli* HKY-R163）、Toho-1 型 ESBL 産生クレブシエラ（*K. pneumoniae* HKY-R150）の 4 株を検討した。

SHV-12 型 ESBL 産生菌の 2 株はいずれも CTX に対してディスク法で 90%で I と判定され、MIC 法では S~R まで大きく判定結果にばらつきがみられた。一方、CAZ に対してはディスク法および MIC 法いずれでも 100%で R と判定された。ただし、一施設で継代によるプラスミドの脱落と思われる感受性結果は除外した。また、CVA 添加による阻止円の 5mm 以上の拡大はほぼ 100%で観察された。したがって、感受性結果の基準範囲を、CAZ に対してディスク法では R かつ CVA 添加で阻止円の 5mm 以上の拡大、MIC 法では 32 以上と設定した。CTX に対しては判定結果が一定でないため、基準

範囲の設定はできなかった。

Toho-1 型 ESBL 産生菌の 2 株のうち E. coli HKY-R163 は、CTX に対してディスク法では 100% で R と判定され、MIC 法では 91% で R、9% で I と判定された。ただし、一施設で継代によるプラスミドの脱落と思われる感受性結果は除外した。また、CVA 添加による阻止円の 5mm 以上の拡大は 100% で観察された。また、K. pneumoniae HKY-R150 は、CTX に対してディスク法では 97% で R、3% で I と判定され、MIC 法では 84% で R、8% で I、8% で S と判定された。また、CVA 添加による阻止円の 5mm 以上の拡大は 100% で観察された。一方、2 株いずれも CAZ に対しては 100% で S と判定された。したがって、感受性結果の基準範囲を、CTX に対してディスク法では R かつ CVA 添加で阻止円の 5mm 以上の拡大、MIC 法では 32 以上と設定した。

マイクロバンク内、-80℃ 保存での感受性試験の安定性

5 施設で月 1 回の割で 2 年間検討した結果、感受性結果に変動はみられなかった。

#### D. 考察

本研究において、薬剤耐性菌検査のための精度管理用菌株の選定と検査結果の基準範囲が設定された。これによって、各医療機関検査室において統一された基準株を用いることで、精度高い検査が行われることが期待される。しかしながら、本研究で明らかになった問題点は、1) 耐性遺伝子がプラスミド上に存在する場合、継代によって高率にそれが脱落し感受性が復活すること、2) 自動機器での MIC 測定による判定が、機器によってばらつきがみられることである。1) に対しては今後信頼のおける機関での菌株を保管し、各医療機関に適切に分与できるシステムを確立する必要があること、2) に関しては今後さらに機種間での精度管理のあり方を検討する必要があると思われた。

#### E. 結論

医療施設の細菌検査室での抗菌薬耐性菌検査の標準化と精度管理を目的として、VRE1 株、PRSP1 株、ESBL 産生大腸菌 2 株、ESBL 産生 K. pneumoniae 2 株、および前年度検討済みのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 1 株と多剤耐性緑膿菌 1 株、合計 8 株を抗菌薬耐性菌精度管理用菌株と検査結果の基準範囲が設定された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Toshinobu Horii, Satoshi Ichiyama, et al. Relationship between morphological changes and endotoxin release induced by carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 48: 309-315; 1999

##### 2. 学会発表

特になし。

#### H. 知的所有権の取得状況

(未取得)

厚生省科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
分担研究報告書

医療機関における安全対策に関する研究  
～耐性菌検出精度管理に用いる菌株の選定とその精度管理について～

分担研究者 飯沼 由嗣（名古屋大学医学部附属病院 検査部助手）  
荒川 宜親（国立感染症研究所 細菌・血液製剤部部長）

薬剤耐性菌検出のための多施設参加耐性検査の精度管理を実施するに先立ち、精度管理に用いる菌株の選定を行い、全国 20 施設細菌検査室にて予備調査を行った。本年度は、新たな肺炎球菌 2 株、VAN-A 型および VAN-B 型腸球菌 2 株、緑膿菌 1 株（昨年度選定分）及び ESBL4 株（SHV-12 型、Toho-1 型の E. coli 及び K. pneumoniae）を用いて、全国 20 施設にて 5 回にわたる感受性試験が実施された。肺炎球菌では PRSP の 1 株、腸球菌では VAN-B 型 VRE、ESBL では 4 株すべて精度管理株として採用された。前年度選定された MRSA の 1 株、メタロβラクタマーゼ陽性緑膿菌の 1 株と合わせ 8 株が選定された。耐性プラスミド脱落による感受性の回復現象が見られており、菌株の保存配布システムの確立が急務である。

A. 研究目的

薬剤耐性菌検出のための精度管理を実施するために、典型的な薬剤耐性を示す菌を臨床分離株より選定し、その基準範囲の設定を行う。

B. 研究方法

本年度検討を行った菌は以下の 4 菌種 9 株である。

- 1) ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）
- 2) バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）
- 3) カルバペネム耐性緑膿菌（メタロβラクタマーゼ陽性菌）
- 4) 基質拡張型βラクタマーゼ陽性菌（ESBL）

1. 菌株の選定は臨床分離株のなかから比較的典型的な耐性パターンを示す株のうち、薬剤耐性の遺伝学的な背景も明らかな菌株を選定した。
2. 選定菌株：肺炎球菌（PRSP）2 株、VAN-A 型および VAN-B 型腸球菌 2 株、緑膿菌 1 株（昨年度選定分）、及び ESBL4 株（SHV-12 型、Toho-1 型の E. coli 及び K. pneumoniae）の 4

菌種、9 株（表 1）。

3. 検査方法：NCCLS で定められた抗菌薬感受性試験方法（ディスク法及び微量液体希釈法）で実施。

4. ディスク法：ESBL 以外は、BBL の KB ディスクを使用。ESBL については、栄研化学の CAZ, CTX, CAZ/CVA, CAZ/CVA を使用した。培地は、肺炎球菌は、ミューラーヒントン血液寒天培地で、その他の菌はミューラーヒントン II 寒天培地を使用し、NCCLS 法に準拠して感受性試験を実施。結果は、阻止円径の測定と S, I, R の判定を行う。

5. 微量液体希釈法：栄研化学のドライプレート（既製品）とフローズンプレート（特注品）または自動検査機器（デードベアリング社の Walk/Away あるいはピオメリュー社の Vitek）を使用し、NCCLS 法に準拠して感受性試験を実施。最小発育阻止濃度（MIC）を測定、S, I, R の判定を行う。

6. その他：E-test を用いた薬剤感受性試験を実施している施設は、本法により MIC を測定し、

S, I, R の判定を行う。また、ESBL に関しては、デードベアリング社の ESBL confirmation パネルによる検査も実施した。

7. 継代による安定性試験：それぞれの菌株について継代培養を行い、週 1 回ずつ計 5 回の感受性試験を実施。

8. 保存による安定性試験：各施設に配布された菌株を保存（マイクロバンク内、 $-80^{\circ}\text{C}$  保存）し、保存による影響を見た。試験は月 1 回実施、本試験は、京都大学、名古屋大学、滋賀医大、安城更生病院、防衛医大の 5 施設で実施。

9. 結果の回収及び解析：結果は所定のエクセルファイルにデータを書き込み、フロッピーディスクあるいは電子メールの書類添付機能を使用して、回収し解析を行った。

10. 本研究参加施設

愛媛大学医学部附属病院、安城更生病院、千葉大学医学部附属病院、山形大学医学部附属病院、京都大学医学部附属病院、国立循環器病センター、香川医科大学附属病院、長崎大学医学部附属病院、滋賀医科大学附属病院、広島大学医学部附属病院、防衛医大附属病院、東海大学医学部附属病院、東北大学医学部附属病院、大阪大学医学部附属病院、川崎医科大学附属病院、名古屋大学医学部附属病院、札幌医科大学附属病院、市立札幌病院、天理よろず相談所病院、S R L 静岡 以上 20 施設の検査部（臨床病理部）細菌室。

11. MIC 測定機器、プレート

1) 肺炎球菌

ドライプレート（栄研）：愛媛、京都、安城、山形、千葉、東海、東北、防衛、名古屋

フローズプレート（栄研）：広島、香川、滋賀、長崎

E-test：札幌医大、大阪、天理

実施せず：4 施設

2) 腸球菌、緑膿菌

ドライプレート（栄研）：愛媛、京都、安城、山形、千葉

フローズプレート（栄研）：広島、香川、国循、滋賀、長崎

Walk/Away（デードベアリング）：札幌医大、市立札幌、川崎、大阪、名古屋

Vitek（バイオメリュー）：東海、東北、防衛

E-test：天理

実施せず：1 施設

3) ESBL

ドライプレート（栄研）：京都、安城、山形、千葉

フローズプレート（栄研）：広島、香川、国循  
ESBL confirmation パネル（デードベアリング）：札幌医大、滋賀、川崎、大阪、天理、名古屋

Walk/Away（デードベアリング）：市立札幌、名古屋

Vitek（バイオメリュー）：東海、東北、防衛

実施せず：3 施設

C. 研究結果

1. 各菌株における使用抗生物質と標準的薬剤耐性結果を表 1 に示す。①肺炎球菌：ペニシリン（PCG）の微量液体希釈法とオキサシリン（MIPIC）によるディスク拡散法、②腸球菌：バンコマイシン（VCM）、テイコプラニン（TEIC）、アンピシリン（ABPC）のディスク拡散法と微量液体希釈法、③緑膿菌：イミペネム（IPM）、セフトジジム（CAZ）、アミカシン（AMK）、レボフロキサシン（LVFX）のディスク拡散法と微量液体希釈法、④ESBL：セフトタックス（CTX）とセフトジジム（CAZ）のディスク拡散法と微量液体希釈法、及びセフトタックス/クラブラン酸（CTX/CVA）とセフトジジム/クラブラン酸（CAZ/CVA）のディスク拡散法をそれぞれ実施した。

2. ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）（表 2）

MIPIC に対するディスク拡散法で両株ともすべて阻止円径が 19mm 以下（感受性ではない、ここでは便宜的に耐性と判定）となり、PRSP の判断が可能であった。

PCG に対する MIC 値の分布では、肺炎球菌-1 では MIC=2 が最も多く、1~4 までで 88% を占めた。肺炎球菌-2 でも MIC=2 が最も多く、1~2 までで 91% を占めた。フローズンプレートでは両者の差はなかったが、ドライプレートおよび E-test では、肺炎球菌-1 に比べて、肺炎球菌-2 では R (耐性) と判定される例が明らかに多く、97% を占めた。このため、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) の基準株として、肺炎球菌-2 が適当と考えられた。また継代培養の耐性度に対する影響も見られなかった。

### 3. バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) (表 3)

腸球菌-1 は vanA 型 VRE、腸球菌-2 は vanB 型 VRE、腸球菌-3 は腸球菌-1 のゼラチンディスク化したものである。VCM はディスク拡散法、微量液体希釈法及び E-test の三法ともにすべての株で 100% 耐性と診断された。また、ABPC は腸球菌 1、3 では三法ともにすべて耐性、腸球菌-2 ではすべて感受性と安定した結果が得られた。

これに対して、TEIC では腸球菌-2 ではディスク拡散法は 98%、微量液体希釈法及び E-test では 100% 感受性の結果が得られた。しかし、腸球菌 1 及び 3 では、ディスク拡散法ではそれぞれ 74%、62% が耐性となったが、微量液体希釈法及び E-test では、耐性から感受性まで広い範囲の結果となった。特に Walk/Away では、他の試験の比べ感受性と判定する傾向が明らかであった (両者で耐性率 20%)。このため、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の基準株として、TEIC の感受性が安定している点より、vanB 型 VRE である腸球菌-2 が適当と考えられた。また継代培養の耐性度に対する影響も見られなかった。

### 4. カルバペネム耐性緑膿菌 (表 4)

この菌株は前年度の調査結果より精度管理に適していると判定された緑膿菌である。本年度は、IPM および CAZ に加え、AMK 及び LVFX

の精度管理も実施した。

IPM では、ディスク法、微量液体希釈法および E-test とともにほぼ耐性の結果となったが、ドライプレートの 2 回において I の判定がされている。これはある施設において三継代目以降に発生した現象であり、耐性遺伝子の組み込まれたプラスミドが脱落したための感受性の回復と考えられた。同様に、ディスク法でも判定は耐性ではあるものの、阻止円径の拡大が見られている。

CAZ では、ディスク法およびドライプレートで感受性の結果が 3 回づつ出されているが、これは前述の IPM の感受性試験結果同様、耐性プラスミドの脱落による感受性の回復と考えられる。その他、VITEK では、他の微量液体希釈法および E-test ではみられなかった I (中間) 判定が 80% に見られ、他法に比べ感受性傾向に判定する可能性が示唆された。

AMK および LVFX はともに感受性であるものと考えられた。プラスミドの脱落の影響は見られなかった。

### 5. ESBL (表 5)

#### 1) SHV-12 型

ESBL-1 は SHV-12 型 *E. coli* であり、ESBL-2 は SHV-12 型 *K. pneumoniae* である。ともに CTX のディスク法では中間との判定が 90% を占め、微量液体希釈法の結果もばらつきが大きい。ESBL-1 の方がやや耐性度が高いようだが、機種による特徴として Walk/Away は耐性傾向に、Vitek は感受性傾向に判定していた。

CAZ については、ESBL-1 ではディスク法および全微量液体法で耐性と判定された。これに対して、ESBL-2 では 1 施設においてディスク法および微量液体希釈法 (ESBL-confirmation パネル) で 5 回ともに感受性の結果となっていた。これは、菌株送付時より耐性プラスミドが脱落したための感受性の回復と考えられた。また ESBL-2 では CTX 同様、Vitek では他の微



量液体法に比して感受性傾向に判定された。

クラバン酸の添加による阻止円径の拡大による ESBL の判定については、ESBL-1 では 100% 可能であった。ESBL-2 では CTX の感受性は感受性傾向がよかつたため、判定率 81% にとどまった。しかし、CAZ ではプラスミド脱落の 5 回分を除けば 99% 判定可能であった。

## 2) Toho-1 型

ESBL-3 は Toho-1 型 *E. coli* であり、ESBL-4 は Toho-1 型 *K. pneumoniae* である。CTX については、ESBL-3 のディスク法による判定は 96% 耐性となった。4 例の感受性は、1 施設における継代培養中に発生しており、前述の ESBL-2 同様耐性プラスミドの脱落に伴う感受性の回復と考えられた。微量液体希釈法では Walk/Away において感受性の判定が出されているが、これはディスク法で感受性の判定が出されている施設の結果であり、耐性プラスミドの脱落に伴う感受性の回復と判定された。ドライプレート及び Vitek の判定では I (中間) 判定が 33% を占めており、他 3 法に比して感受性傾向の判定となった。ESBL-4 のディスク法による CTX の判定は 97% 耐性となった。微量液体希釈法では ESBL-3 同様ドライプレート及び Vitek の判定では I (中間) 判定が 53-67% を占めており、他 3 法に比して感受性傾向の判定となった。

CAZ に関しては、両株ともにディスク法、Vitek の 1 施設 5 回分を除きすべて感受性の判定となり、感受性であると判定された。Vitek の耐性の判定ははずれ値と理解された。

両株とも CAZ に感受性のため、クラバン酸の添加による阻止円径の拡大による ESBL の判定については不可能であった。CTX では、耐性プラスミド脱落の 4 回を除き、100% 判定可能であった。

## 6. 保存による安定性試験

プラスミドの脱落もなく、反復継代試験同様施設特異的な判定結果となった。

## D. 考察

### 1. ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP)

両株ともディスク拡散法ですべて阻止円径が 19mm 以下となり、PRSP の判断が可能であり、スクリーニング試験として安定した結果が得られる株であることが判明した。

微量液体希釈法による PCG に対する MIC 値の測定では、ともに MIC=2 を頂点とする分布を示し、I (中間) ~ R (耐性) の判定がなされる菌株であることが判明した。肺炎球菌-2 は 1 に比して耐性傾向がやや強く、NCCLS 基準によるペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) としてよいものと考えられた。このため基準株として、肺炎球菌-2 が適当と考えられた。またペニシリン耐性は PBP の遺伝子変異によるもので、耐性プラスミドによるものではないため、継代培養による耐性の脱落などの影響は見られなかった。

### 2. バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)

腸球菌-1 は vanA 型 VRE、腸球菌-2 は vanB 型 VRE、腸球菌-3 は腸球菌-1 のゼラチンディスク化したものであり、VCM は安定して耐性と判定された。腸球菌 1、3 は *E. faecium*、腸球菌-2 は *E. faecalis* であるため、ABPC は腸球菌 1、3 では耐性、腸球菌-2 では感受性となった。

これに対して、TEIC では腸球菌-2 ではディスク拡散法は 98%、微量液体希釈法及び E-test では 100% 感受性の結果が得られた。しかし、腸球菌 1 及び 3 では、ディスク拡散法ではそれぞれ 74%、62% が耐性となったが、微量液体希釈法及び E-test では、耐性から感受性まで広い範囲の結果となった。特に Walk/Away では、他の試験の比べ感受性と判定する傾向が明らかであり、vanB タイプとの誤判定される可能性がある。バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の基準株として、TEIC の感受性が安定している点および安全性より、vanB 型 VRE である腸球菌-2 が適当と考えられた。

当初懸念された、プラスミドの脱落による感受性の回復は今回の試験では経験されなかった。

### 3. カルバペネム耐性緑膿菌

この菌株は前年度の調査結果より精度管理に適していると判定された緑膿菌である。本年度は、IPMおよびCAZに追加して、AMK及びLVFXの精度管理も実施した。

IPM及びCAZは耐性、AMK及びLVFXは感受性と考えられたが、CAZの判定でVitekが感受性傾向を示した。また継代中に耐性プラスミドの脱落に伴うと思われる感受性の回復がIPM及びCAZで見られており、基準株の施設管理の重要性が示唆された。これに対してAMKおよびLVFXは、プラスミドの脱落の影響は見られなかった。

### 4. ESBL

#### 1) SHV-12型

ESBL-1 (E. coli)、ESBL-2 (K. pneumoniae)ともにCTXのディスク法では中間との判定が90%を占め、微量液体希釈法の結果もばらつきが大きく、機種による特徴としてWalk/Awayでは耐性傾向に、Vitekは感受性傾向で判定されていた。

CAZについては、両株とも耐性と考えられたが、ESBL-2の判定で耐性プラスミド脱落に伴うと思われる感受性の回復が見られた。またESBL-2ではCTX同様、Vitekでは他の微量液体法に比して感受性傾向に判定された。

クラブラン酸の添加による阻止円径の拡大によるESBLの判定については、ESBL-1では100%可能であり、ESBL-2ではCTXでは判定率81%にとどまったが、CAZではプラスミド脱落分を除けば99%判定可能であった。

#### 2) Toho-1型

ESBL-3 (E. coli)、ESBL-4 (K. pneumoniae)ともにCAZ感受性と考えられた。CTXの判定については、前述のESBL-2同様耐性プラスミドの脱落に伴う感受性の回復が見られた。微量液体希釈法ではSHV-12陽性株同様ドライプレート及びVitekの判定では他の微量液体希釈法に比して感受性傾向の判定され

た。

両株ともCAZに感受性のため、クラブラン酸の添加による阻止円径の拡大によるESBLの判定については不可能であった。CTXでは、耐性プラスミド脱落の4回を除き、100%判定可能であった。

### 5. 耐性菌の管理について

今回用いた9株中、耐性プラスミドにより薬剤耐性となる、カルバペネム耐性メタロβラクタマーゼ陽性緑膿菌、ESBLの4株中2株において耐性プラスミドの脱落によると思われる感受性の回復が見られた。これらはそれぞれ別の3施設で発生しており、特定の施設の菌株の管理体制の問題ではない。

このことは、薬剤耐性基準株を精度管理に用いる際には、基準菌の継代を行うことにより基準株として用いることが出来なくなることを意味する。-80℃保存下では、菌は長期間安定した状態で保存できるため、分与あるいは購入した基準株を保存する際には、1代のみ継代培養し、そこから複数個の保存株を作ることが望ましい。

これは、また、基準株を整理、分与する施設の管理体制にも影響する。出来る限りオリジナルに近い状態で多数個の保存を行い、各施設の要望に応じて精度管理用菌株として提供する必要がある。ただし、この作業はかなり手間のかかる作業となるため、商業的手法をも視野に入れた菌の配布システムの確立が望まれる。

### E. 結論

精度管理用菌株の選定についてはMRSAの1株、PRSPの1株、VAN-B型VREの1株、メタロβラクタマーゼ陽性緑膿菌1株、ESBL4株の計8株が精度管理株として選定された。今後の課題として、菌株の保存配布システムの確立が急務であると考えられる。

### F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 青田菜美、奈田俊、飯沼由嗣、他：研究報告 愛知県における臨床分離肺炎球菌のペニシリン耐性率と各種抗菌薬の薬剤感受性について *Progress in Medicine* 1999; 19: 2823-2827.
- 2) Kawamura-Sato K, Iinuma Y, Ohta M, et al : Effect of subinhibitory concentrations of macrolides on expression of flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2869-2872.
- 3) 山口恵三、飯沼由嗣 他：1998年に全国26施設から分離された臨床分離株5180株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス *Jpn J Antibiotics* 2000; 53: 387-408.
- 4) 飯沼由嗣、太田美智男：XIV 院内感染対策としての微生物検査室（技師）の役割、院内感染対策テキスト 改訂4版；221-234, 2000.
- 5) Sugino Y, Iinuma Y, Ichiyama S, et al : In vivo development of decreased susceptibility to vancomycin in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *Diag Microbiol Infect Dis* 2000; 38: 159-167.
- 6) Kawamura-Sato K, Iinuma Y, Ohta M, et al : Postantibiotic suppression effect of macrolides on the expression of flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* *J Infect Chemother* 2001; in press.
- 7) 中川佐理、飯沼由嗣、山本秀子、他：Mupirocin 軟膏使用患者における Mupirocin 耐性ブドウ球菌の検出状況 *感染症学雑誌* 2001; 75: 7-13.

### 2. 学会発表

- 1) 相原雅典、長沢光章、飯沼由嗣、荒川宜親他：わが国における薬剤耐性菌の検出と判定の現状に関する調査報告、その1：感受性の精度管理および肺炎球菌の感受性検査、第12回日本臨床微生物学会総会、岐阜、2001

- 2) 長沢光章、相原雅典、飯沼由嗣、荒川宜親他：わが国における薬剤耐性菌の検出と判定の現状に関する調査報告、その2：腸球菌、ブドウ球菌およびインフルエンザ菌の感受性検査、第12回日本臨床微生物学会総会、岐阜、2001
- 3) 飯沼由嗣、相原雅典、長沢光章、荒川宜親他：わが国における薬剤耐性菌の検出と判定の現状に関する調査報告、その3：ESBL 産生菌および緑膿菌の感受性検査、第12回日本臨床微生物学会総会、岐阜、2001

## H. 知的所有権の取得状況

(未取得)

表1：試験菌株及び推奨される判定結果一覧（平成12年度）

番号	耐性種別	菌株番号	POG	MPIPC		
肺炎球菌-1	α-2型/中間耐性肺炎球菌	KK-133	1 or R (MIC 1-4)	not S (≤19 mm)		
肺炎球菌-2*	α-2型/耐性肺炎球菌	197	1 or R (MIC 1-4)	not S (≤19 mm)		
番号	耐性種別	菌株番号	VCM	TEIC	ABPC	
腸球菌-1	Van-A型VRE	NCB43	R (MIC ≥32)	1 or R (MIC ≥16)	R (MIC ≥16)	
腸球菌-2*	Van-B型VRE	HKY-RV1	R (MIC ≥32)	S (MIC ≤8)	S (MIC ≤8)	
腸球菌-3	Van-A型VRE(α-2型/α-1型)	NCB43	R (MIC ≥32)	1 or R (MIC ≥16)	R (MIC ≥16)	
番号	耐性種別	菌株番号	IPM	CAZ	AMK	LVFX
緑膿菌-1*	metalo β +P. aeruginosa	MSA137	R (MIC ≥16)	R (MIC ≥32)	S (MIC ≤16)	S (MIC ≤2)
番号	耐性種別	菌株番号	CTX	CAZ	CTX/CVA	CAZ/CVA
ESBL-1*	SHV-12 E.coli	HKY741	判定なし	R (MIC ≥32)	判定なし	5 mm以上拡大
ESBL-2*	SHV-12 K.pneumoniae	HKY525	判定なし	R (MIC ≥32)	判定なし	5 mm以上拡大
ESBL-3*	Toho-1 E.coli	HKY-R163	R (MIC ≥32)	S (MIC ≤8)	5 mm以上拡大	判定なし
ESBL-4*	Toho-1 K.pneumoniae	HKY-R167	R (MIC ≥32)	S (MIC ≤8)	5 mm以上拡大	判定なし
番号	耐性種別	菌株番号	MPIPC	VCM	TEIC	ABK
MRSA-1*	α-2型/耐性黄色ブドウ球菌	4863	R (MIC ≥4)	S (MIC 0.5-2)	S (MIC 1-2)	S (MIC 0.25-1)

\*精度管理選定株、MRSAについては昨年度実施結果に基づく

表2. 肺炎球菌

肺炎球菌-1 抗生物質	方法				E-test
	ディスク拡散法	微量液体希釈法			
		ドライプレート	フローズンプレート		
PCG	R	22/45	15/20	R	10/15
		データなし	5/20	I	5/15
	S	0	0	S	0
MIPIC	R	100/100	データなし		データなし

肺炎球菌-2 抗生物質	方法				E-test
	ディスク拡散法	微量液体希釈法			
		ドライプレート	フローズンプレート		
PCG	R	43/45	15/20	R	15/15
	I	2/45	5/20	I	0
	S	0	0	S	0
MIPIC	R	100/100	データなし		データなし

表3. 腸球菌

腸球菌-1		方法							
抗生物質	ディスク拡散法			微量液体希釈法				E-test	
	R	100/100	R	ドライプレート	フローズプレート	Walk/Away	Vitek		
				25/25	25/25	25/25	15/15		
VCM	R	100/100	R	25/25	25/25	25/25	15/15	R	5/5
	R	74/100	R	15/20	5/5	1/10		R	5/5
TEIC	I	26/100	I	5/20	0	6/10	データなし	I	0
	S	0	S	0	0	3/10		S	0
ABPC	R	100/100	R	30/30	20/20	25/25	15/15	R	5/5

  

腸球菌-2		方法							
抗生物質	ディスク拡散法			微量液体希釈法				E-test	
	R	100/100	R	ドライプレート	フローズプレート	Walk/Away	Vitek		
				25/25	25/25	25/25	15/15		
VCM	R	100/100	R	25/25	25/25	25/25	15/15	R	5/5
	R	0/100	R	0	0	0		R	0
TEIC	I	2/100	I	0	0	0	データなし	I	0
	S	98/100	S	20/20	5/5	10/10		S	5/5
ABPC	S	100/100	S	30/30	20/20	25/25	15/15	S	5/5

  

腸球菌-3		方法							
抗生物質	ディスク拡散法			微量液体希釈法				E-test	
	R	100/100	R	ドライプレート	フローズプレート	Walk/Away	Vitek		
				25/25	25/25	25/25	15/15		
VCM	R	100/100	R	25/25	25/25	25/25	15/15	R	5/5
	R	62/100	R	15/20	5/5	3/10		R	4/5
TEIC	I	38/100	I	5/20	0	7/10	データなし	I	1/5
	S	0	S	0	0	0		S	0
ABPC	R	100/100	R	30/30	20/20	25/25	15/15	R	5/5

表4. 緑膿菌

緑膿菌-1 抗生物質	方法																
	ディスク拡散法					微量液体希釈法											
	R	I	S	23/25	25/25	Walk/Away	Vitek	25/25	25/25	15/15							
IPM	100/100	0	0	R	I	S	0	0	0	0	R	I	S				
CAZ	97/100	0	3/100	R	I	S	22/25	0	3/25	5/5	25/25	0	0	R	I	S	
AMK	0	1/100	99/100	R	I	S	0	0	15/15	0	2/20	18/20	0	0	R	I	S
LVFX	0	0	95/95	R	I	S	0	0	15/15	0	2/20	18/20	0	0	R	I	S

表5. ESBL

ESBL-1	方法						
	抗菌物質	ディスク拡散法		微量液体希釈法			MS-ESBL pan
		ドライプレート	フローゾーンプレート	Walk/Away	Walk/Away	MS-ESBL pan	
R	9/100	R	9/15	0	9/10	11/30	
CTX	I	91/100	I	1/15	5/5	15/30	
S		S	5/15	0	0	4/30	
CAZ	R	100/100	R	20/20	15/15	30/30	
CTX/CVA	ESBL*-100/100						
CAZ/CVA	ESBL*-100/100						

\*単剤に比べ5mm以上阻止円が拡大したものをESBLとする

ESBL-2	方法						
	抗菌物質	ディスク拡散法		微量液体希釈法			MS-ESBL pan
		ドライプレート	フローゾーンプレート	Walk/Away	Walk/Away	MS-ESBL pan	
R	0	R	0	0	8/10	0	
CTX	I	90/100	I	1/15	0	9/30	
S	10/100	S	14/15	S-5/5	1/10	21/30	
CAZ	R	95/100	R	20/20	15/15	25/30	
I	0	I	0	0	0	0	
S	5/100	S	0	0	0	5/30	
CTX/CVA	ESBL*-81/100						
CAZ/CVA	ESBL*-94/100						



表5. ESBL (続き)

ESBL-3		方法						
抗生物質	ディスク拡散法	微量液体希釈法						
		ドライプレート	フローズンプレート	Walk/Away	MS-ESBL pan	Walk/Away	MS-ESBL pan	
	R	96/100	R	10/15	R	5/5	6/10	30/30
CTX	I	0	I	5/15	I	0	0	0
	S	4/100	S	0	S	0	4/10	0
	R	0	R	0	R	0	0	0
CAZ	I	0	I	0	I	0	0	0
	S	100/100	S	20/20	S	15/15	10/10	30/30
CTX/CVA	ESBL*-96/100							
CAZ/CVA	ESBL*-19/100							
ESBL-4		方法						
抗生物質	ディスク拡散法	微量液体希釈法						
		ドライプレート	フローズンプレート	Walk/Away	MS-ESBL pan	Walk/Away	MS-ESBL pan	
	R	97/100	R	5/15	R	5/5	10/10	30/30
CTX	I	3/100	I	5/15	I	0	0	0
	S	0	S	5/15	S	0	0	0
CAZ	S	100/100	S	20/20	S	15/15	10/10	30/30
CTX/CVA	ESBL*-100/100							
CAZ/CVA	ESBL*-3/100							

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
飯沼由嗣、 太田美智男	XIV 院内感染対策としての微生物検査室（技師）の役割	日本感染症学会	院内感染対策テキスト 改訂4版	へるす出版	東京	2000	221- 234

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
青田菜美、奈田俊、飯沼由嗣、他	愛知県における臨床分離肺炎球菌のペニシリン耐性率と各種抗菌薬の薬剤感受性について	Progress in Medicine	19	2823-2827	1999
Toshinobu Horii, Satoshi Ichiyama et al	Relationship between morphological changes and endotoxin release induced by carbapenems in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	J Med Microbiol	48	309-315	1999
Kawamura-Sato K, Iinuma Y, Ohta M, et al	Effect of subinhibitory concentrations of macrolides on expression of flagellin in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Proteus mirabilis</i>	Antimicrob Agents Chemother	44	2069-2072	2000
山口恵三、飯沼由嗣 他	1998年に全国26施設から分離された臨床分離株5180株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス	Jpn J Antibiotics	53	387-408	2000
Sugino Y, Iinuma Y, Ichiyama S, et al	In vivo development of decreased susceptibility to vancomycin in clinical isolates of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Diag Microbiol Infect Dis	38	159-167	2000
Kawamura-Sato K, Iinuma Y, Ohta M, et al	Postantibiotic suppression effect of macrolides on the expression of flagellin in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Proteus mirabilis</i>	J Infect Chemother	in press		2001
中川佐理、飯沼由嗣、山本秀子、他	Mupirocin軟膏使用患者におけるMupirocin耐性ブドウ球菌の検出状況	感染症学雑誌	75	7-13	2001

20000816

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
P.16「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。