

平成16年度 厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

病原性グラム陰性桿菌における

16S-rRNA メチレーズ遺伝子の

獲得状況等に関する緊急調査

(H16 - 特別 - 027)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 荒川 宜親

平成17(2005)年4月

平成16年度 厚生労働科学研究費補助金  
(厚生労働科学特別研究事業)

病原性グラム陰性桿菌における 16S-rRNA メチレーズ遺伝子の  
獲得状況等に関する緊急調査

研究班員名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	荒川宜親	国立感染症研究所 細菌第二部	部 長
分担研究者	山根一和	国立感染症研究所 細菌第二部	研究員
	鈴木里和	国立感染症研究所 細菌第二部	研究員
	長沢光章	防衛医科大学校病院 検査部	主任技師
	倉辻忠俊	国立国際医療センター研究所	所 長
研究協力者	(山根分)		
	和知野純一	国立感染症研究所 細菌第二部	
	柴田尚宏	国立感染症研究所 細菌第二部	
	加藤はる	国立感染症研究所 細菌第二部	
	柴山恵吾	国立感染症研究所 細菌第二部	
	石川暁志	国立感染症研究所 細菌第二部	
	小澤良之	国立感染症研究所 細菌第二部	
	木村幸司	国立感染症研究所 細菌第二部	
	甲斐久美子	国立感染症研究所 細菌第二部	
	近田俊文	国立感染症研究所 細菌第二部	
	(倉辻分)		
	切替照雄	国立国際医療センター	
	関口純一郎	国立国際医療センター	
	藤野智子	国立国際医療センター	
	菊池喜博	国立病院機構仙台医療センター	
浅黄 司	国立病院機構仙台医療センター		

16S rRNA メチレーズ遺伝子保有株の調査に御協力頂いた医療施設名（順不同）

国立病院機構北海道がんセンター	自治医科大学附属大宮医療センター	滋賀県立成人病センター
秋田大学医学部附属病院	済生会川口総合病院	国立病院機構 大阪医療センター
秋田組合総合病院	川口市立医療センター	市立豊中病院
平鹿総合病院	さいたま市立病院	関西医科大学附属病院
由利組合総合病院	越谷市立病院	財団法人 結核予防会大阪支部
山本組合総合病院	獨協医科大学越谷病院	大阪病院
岩手医科大学附属病院	埼玉医科大学附属病院	星ヶ丘厚生年金病院
岩手県立胆沢病院	埼玉医科大学総合医療センター	近畿大学医学部附属病院
県立江刺病院	防衛医科大学校病院	京都府立医科大学附属病院
青森県立中央病院	埼玉県立循環器・呼吸器病センター	京都第二赤十字病院
八戸市立市民病院	大阪医科大学附属病院	社会保険 京都病院
弘前市立病院	埼玉県立がんセンター	京都大学医学部附属病院
弘前大学医学部附属病院	前橋赤十字病院	京都桂病院
市立室蘭総合病院	社会保険 群馬中央総合病院	市立舞鶴市民病院
医療法人 王子総合病院	伊勢崎市民病院	奈良県立医科大学附属病院
札幌鉄道病院	館林厚生病院	奈良県立三室病院
北海道大学医学部附属病院	長野赤十字病院	和歌山労災病院
国立病院機構札幌南病院	(財)長野市保健医療公社	国立病院機構南和歌山医療センター
北海道社会保険病院	長野市民病院	社会保険紀南総合病院
労働福祉事業団 美唄労災病院	長野県立こども病院	神戸大学医学部附属病院
滝川市立病院	山梨県立中央病院	神戸市立中央市民病院
三井記念病院	山梨大学医学部附属病院	医療法人社団神鋼会 神鋼病院
国立がんセンター中央病院	沼津市立病院	西神戸医療センター
東京大学医学部附属病院	静岡厚生病院	川崎病院
東邦大学医学部附属大森病院	静岡県立総合病院	兵庫県立淡路病院
東京女子医科大学病院	静岡市立静岡病院	財団法人 甲南病院
帝京大学医学部附属病院	焼津市立総合病院	労働者健康福祉機構 関西労災病院
日本大学医学部附属板橋病院	藤枝市立総合病院	兵庫県立尼崎病院
国家公務員等共済組合連合会	県西部浜松医療センター	財) 甲南病院加古川病院
立川病院	袋井市立袋井市民病院	山陰労災病院
聖マリアンナ医科大学病院	豊橋市民病院	鳥取大学医学部附属病院
昭和大学藤が丘病院	岡崎市民病院	松江市立病院
横浜市立大学医学部附属病院	名古屋大学医学部附属病院	松江生協病院
横浜市立市民病院	藤田保健衛生大学病院	国立病院機構 松江病院
千葉市立青葉病院	岐阜県立岐阜病院	財団法人 島根難病研究所
千葉大学医学部附属病院	羽島市民病院	島根大学医学部附属病院
千葉県がんセンター	大垣市民病院	岡山済生会総合病院
成田赤十字病院	岐阜県立多治見病院	総合病院岡山赤十字病院
総合病院国保旭中央病院	総合病院中津川市民病院	川崎医科大学附属病院
国保君津中央病院	市立四日市病院	重井医学研究所附属病院
総合病院 取手協同病院	鈴鹿中央総合病院	国立病院機構 南岡山医療センター
筑波大学附属病院	国立病院機構 三重病院	医療法人創和会 しげい病院
茨城県立中央病院	国立病院機構 三重中央医療	財団法人 倉敷中央病院
獨協医科大学病院	センター	広島県農業協同組合連合会
栃木県済生会宇都宮病院	三重大学医学部附属病院	尾道総合病院
栃木県・県南総合病院	厚生連松阪中央総合病院	広島市立広島市民病院
自治医科大学附属病院	山田赤十字病院	広島市立安佐市民病院
埼玉社会保険病院	公立高島総合病院	済生会広島病院

広島県立広島病院  
広島大学病院  
広島県厚生農業協同組合連合会広島総合病院  
山口県立中央病院  
(社)下関市医師会病院  
高松赤十字病院  
香川県立中央病院  
香川大学医学部附属病院  
厚生農業協同組合連合会 滝宮総合病院  
国立病院機構 善通寺病院  
三豊総合病院  
阿南共栄病院  
高知大学医学部附属病院  
愛媛県立中央病院  
松山赤十字病院  
福岡大学病院  
久留米大学病院  
佐賀県立病院好生館  
嬉野医療センター  
長崎市立市民病院  
日本赤十字社 長崎原爆病院  
熊本大学医学部附属病院  
熊本中央病院  
公立玉名中央病院  
労働者健康福祉機構 熊本労災病院  
大分県立病院  
国立病院機構 別府医療センター  
医療法人同心会 古賀総合病院  
国立病院機構都城病院  
鹿児島大学医学部附属病院  
鹿児島市立病院  
福井心臓血管センター福井循環器病院  
公立丹南病院  
福井赤十字病院  
石川県立中央病院  
小松市民病院  
公立松任石川中央病院  
富山医科薬科大学附属病院  
富山県立中央病院  
高岡市民病院  
厚生連高岡病院  
黒部市民病院  
長岡赤十字病院  
長岡中央総合病院  
新潟県立中央病院  
信楽園病院  
大原総合病院附属大原医療センター  
福島県立医科大学附属病院  
大原総合病院

財団法人 星総合病院  
(財)太田総合病院附属太田西ノ内病院  
福島県立会津総合病院  
財団法人 竹田総合病院  
福島県立南会津病院  
財団法人厚生会 仙台厚生病院  
東北労災病院  
N T T東日本 東北病院  
山形県立中央病院  
山形市立病院済生館  
公立置賜総合病院  
国立病院機構 神戸医療センター  
高知赤十字病院  
(順不同)

(調査研究に御協力頂いた施設は、以上のとおりですが、データが充足され、解析に活用させて頂けた施設は、169施設でした。)

## 目 次

### I. 総括研究報告書

荒川宜親	病原性グラム陰性桿菌における 16S-rRNA メチレーズ遺伝子の 獲得状況等に関する緊急調査 -----	1
------	--	---

### II. 分担研究報告書

山根一和 鈴木里和 長沢光章	アミノグリコシド高度耐性グラム陰性桿菌の保有する 16S-rRNA メチラーゼ分離獲得状況の調査研究-----	9
----------------------	--	---

倉辻忠俊	多剤耐性緑膿菌感染症の解析 -----	27
------	---------------------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	34
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別冊等-----	35
-----------------------	----

病原性グラム陰性桿菌における16S-rRNAメチレーゼ遺伝子の  
獲得状況等に関する緊急調査

主任研究者 荒川宜親 国立感染症研究所 細菌第二部 部長

研究要旨

ゲンタマイシンやカナマイシンのみならずアミカシン、トブラマイシン、アルベカシンなどの広域抗菌スペクトルを示す半合成アミノグリコシドに対しても広範な耐性を付与する16S rRNAメチレーゼ（RmtA）を産生する緑膿菌が、2003年の12月に我が国から報告された（K. Yokoyama, et al., *Lancet* 362(9399):1888-1893, 2003.）。さらに、*Serratia mersecegens* からも、同様なメチレーゼが我が国で発見された（Y. Doi et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 48:491-496, 2004.）ため、2004年9月1日から10月31日の二ヶ月間に、全国169の医療施設で分離された、87,626株のグラム陰性菌について、16S rRNAメチレーゼの遺伝子の保有状況を緊急に調査した。アルベカシンなどに対する耐性度に基づいたスクリーニングの結果、最終的に21施設からの35株が、16S rRNAメチレーゼ遺伝子を保有する可能性がある株として選択された。そこでPCR解析を実施した結果、*rmtA*, *rmtB*, *armA* のうちのいずれかの16S rRNAメチレーゼの遺伝子を保有する株が16施設から29株確認された。その内訳は、緑膿菌が17株（保有率=17/18,037=0.00094）と最も多く、それらは全て *rmtA* 遺伝子保有株であった。次いで *armA* を保有する4株の *Acinetobacter baumannii* が2施設で（保有率=4/3,116=0.00128）確認された。さらに3施設から *Escherichia coli* が3株（*armA* が2株、*rmtB* が1株）、*armA* を保有する *Enterobacter cloacae* が1株確認された。また、*rmtA*, *rmtB*, *armA* 以外の新型の16S rRNAメチレーゼ遺伝子を保有する2株の *Proteus mirabilis* が2施設から各々確認された。特に、同一の施設の複数の患者から16S rRNAメチレーゼ産生株が分離され、それらのPFGE解析パターンが類似していた事実から、この種の新型耐性菌が既に一部の国内の医療施設では院内伝播している事が確認された。

また、多剤耐性緑膿菌の多発事例が国内の医療施設で問題になっているため、東京都と宮城県の医療施設の分離株について分子疫学解析が実施された結果、尿留置カテーテルに関連した多剤耐性緑膿菌感染症が病院内でヒトからヒトへと伝播している実態が明らかとなった。さらに、同じPFGEパターンを示す高度多剤耐性緑膿菌が都内と宮城県の病院から各々独立に分離された事実から、特定の遺伝的背景を持った特定の高度多剤耐性緑膿菌株のクローンが、国内の医療施設に広く伝播拡散しつつある可能性が示唆された。

分担研究者

山根一和（国立感染症研究所 細菌第二部）  
鈴木里和（同上）  
長沢光章（防衛医科大学校病院 検査部）  
倉辻忠俊（国立国際医療センター研究所）

グラム陰性桿菌の多剤耐性化が我が国の臨床現場で進行し、多剤耐性株による死亡事例も少なからず発生しており、深刻な医療問題の一つとなりつつある。臨床現場で現在頻繁に使用される抗菌薬としてはβ-ラクタム剤やニューキノロン剤が多いが、グラム陰性桿菌の治療にはアミノグリコシドも重要な抗菌薬として使用されている。またメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の治療薬

A. 研究目的

近年、*Pseudomonas aeruginosa* をはじめとする

としてバンコマイシン、テイコプラニンと並んで、半合成アミノグリコシドであるアルベカシンが使用されている。これまでアミノグリコシドに耐性を付与する分子機序としては、アミノグリコシドにアセチル基やリン酸基、アデニル基など特定の基を結合させ薬剤が、その標的である細菌の30S リボソームに結合できなくしてしまうアミノグリコシド修飾酵素（多くはプラスミド性）が一般的であった。ところが2003年から2004年にかけて我が国及びヨーロッパ諸国から、RmtA、RmtB、ArmA と命名されたアミノグリコシドに高度耐性を付与する16S rRNA メチラーゼが、緑膿菌や *Serratia marcescens*、*Citrobacter freundii*、*Klebsiella pneumoniae* などの種々のグラム陰性桿菌で相次いで発見された(3, 4, 9)。アミノグリコシドは主として30S リボソームの中に存在する、16S リボソーム RNA(16S rRNA)に結合し、蛋白の合成を阻害する。16S rRNA メチラーゼは、アミノグリコシドの結合部位である16S rRNA をメチル化することによって、放線菌並みの超高度耐性を付与する。つまり、既存のプラスミド媒介性のアミノグリコシド修飾酵素は特定のアミノグリコシドのみに対して耐性を付与するが、16S rRNA メチラーゼは、我が国の臨床現場で使用されているほとんど全てのアミノグリコシドが属する4,6-disubstituted deoxystreptamini グループすべてに対して最小発育阻止濃度が1,024 µg/ml を越える超高度耐性を付与する。そこで、過去に国内の医療施設で分離され、感染研細菌第二部で保存されていた株を用い、事前調査を実施したところ、既に様々なグラム陰性桿菌がこの耐性遺伝子を保持していることが強く示唆された(7)。そこで、今回、我が国の臨床現場において、どの程度この種の16S rRNA メチラーゼ遺伝子を保有するグラム陰性桿菌が分離されるかを正確に調査把握することを目的として調査研究を行った。また同時に、多剤耐性緑膿菌が国内各地の医療施設で分離されるようになり、一部で院内感染事例や感染死亡事例の原因にもなっている為、東京都と宮城県内の大規模医療施設において、その分離状況や伝播様

式などが解析された。

## B. 研究方法

### 1) 16S rRNA メチラーゼ産生株の調査研究

(社)日本臨床衛生検査技師会会員の所属する200施設の病院長と検査部門責任者に対して分離菌株の情報と提供を依頼する依頼状(資料参照)を送付し、病院長もしくは検査部門責任者の許可を得た後に、菌株と若干の臨床背景に関する情報の提供を受けて調査研究を実施した。

調査期間は2004年9月1日から10月31日の二ヶ月間とした。

調査期間中に細菌検査室に依頼された総検体数、分離菌体総数、グラム陰性菌分離総数、菌種別分離総数(対象菌種：*P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* 属, *Proteus* 属, *Acinetobacter* 属, *Alcaligenes* 属, *Citrobacter* 属, *Klebsiella* 属)、検体情報(内訳：呼吸器系検体、尿、血液、便、髄液、その他)をそれぞれ収集した。

調査期間中に各施設において分離した菌株のうち、各施設で感受性検査を施行したアミノグリコシド全てに耐性を示す腸内細菌と *P. aeruginosa*、*Acinetobacter* 属を収集した。1患者について複数回、同じ薬剤感受性パターンを示す株が分離された場合は、1菌種につき1株を収集した。菌株は各施設からアミカシン32 µg/ml 含有カジトン培地に接種し国立感染症研究所細菌第二部に送付された。

送付された菌株は雑菌の混入の有無を確認した後、一次スクリーニングとしてアミカシン32 µg/ml 含有 Luria-Bertane(LB)培地に接種した。この培地でコロニーを形成した菌株は、次にアルベカシン500 µg/ml 含有 LB 培地に接種され、二次スクリーニングが行なわれた。コロニーを形成した菌株についてはPCR法によって型別し、さらにPCR反応産物の塩基配列を決定することにより既存の16S rRNA メチラーゼの塩基配列と比較した。PCRプライマーは *rmtA* RMTA-F 5'-CTA GCG TCC ATC CTT TCC TC-3', RMTA-R 5'-TTT GCT TCC

ATG CCC TTG CC-3', *rmtB* RMTB-F 5'-CCC AAA CAG ACC GTA GAG GC-3', RMTB-R 5'-CTC AAA CTC GGC GGG CAA GC-3', *armA* ARMA-F 5'-AGG TTG TTT CCA TTT CTG AG-3', ARMA-R 5'-TCT CTT CCA TTC CCT TCT CC-3'をそれぞれ使用し、PCR 産物を2%TBE アガロースゲルに電気泳動し 16S rRNA メチラーゼ遺伝子の有無と種類を決定した。

同一の医療施設から同じ菌種が分離された場合、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) によって同一の菌か否かを判定した。同一クローンか否かの判定は Tenover らの分類を用いた。

アルベカシン 500 µg/ml 含有 LB 培地にコロニーを形成した菌株に対する各種抗菌薬の最小発育阻止濃度(MIC)を米国臨床検査標準化委員会

(NCCLS) の定める寒天平板標準法を用いた。

対象とした抗菌薬はカナマイシン、トブラマイシン、アミカシン、アルベカシン、ゲンタマイシン、シソマイシン、ストレプトマイシン、ネオマイシン、セフォタキシム、セフトジジム、イミペネムの 11 薬剤とした。

各施設から収集した検体情報は一ヶ月、100 病床あたりの検体情報に変換し、その平均値などを比較した。

## 2) 多剤耐性緑膿菌感染症の解析

都内の国立病院機構に所属する大規模基幹医療施設において分離されたアミノグリコシド薬、ニューキノロン薬、カルバペネム薬の 3 剤に耐性を示す多剤耐性緑膿菌について以下の試験が実施された。

a. 薬剤感受性ディスク法及び微量液体希釈法による薬剤感受性試験

b. パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による遺伝子型別

c. SMA ディスク法によるメタロベータラクタマーゼ産生性の有無の判定

d. PCR 法によるカルバペネム薬耐性遺伝子であるメタロベータラクタマーゼ遺伝子及びアミノグリコシド薬耐性遺伝子であるアミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の検出

e. ニューキノロン薬耐性要因の 1 つである *gyrA* 遺伝子、*gyrB* 遺伝子、*parC* 遺伝子、*parE* 遺伝子内変異の有無

また、感染経路特定の為の環境調査が実施された。さらに抗菌薬の適正使用との関連を明らかにすべく病棟別の薬剤使用状況が調査された。

一方、宮城県内においては、多剤耐性緑膿菌は個々の施設内での伝播に加え、施設を超えて広域に伝播拡大していることが懸念されていた。そこで、平成 15 年 10 月より宮城県内の 20 施設を対象に、多剤耐性菌の分離状況並びに分子疫学調査が開始され、継続した菌株収集が行なわれた。また、同時期に分離された薬剤感受性緑膿菌 23 株を多剤耐性緑膿菌との比較に用い、分子疫学調査が実施された。

(倫理的側面での配慮)

各施設から提出された情報には、各施設で分離された細菌の菌種や薬剤感受性、臨床材料などのデータは含まれるが、個人名もしくは個人を識別しうるデータは含まれず、その点において、匿名化、連結不可能性が確保され、研究実施上、倫理的、あるいは個人情報の保護に関する問題は発生しなかった。

## C. 結果

### 1) 16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株の調査研究

本研究は 169 の国内医療施設の参加で実施された。各施設での細菌検査の依頼検査総数は 326,605 件、分離菌株総数は 250,343 株、うちグラム陰性菌は 87,626 株であった。

各施設から送付されたアミノグリコシド耐性腸内細菌、*P. aeruginosa*、*Acinetobacter* 属は 527 株であり一次スクリーニング (アミカシン 32 µg/ml 含有 LB 培地) で 481 株が陽性となった。二次スクリーニング (アルベカシン 500 µg/ml 含有 LB 培地) では 7 菌種 35 株が陽性となり、分離された施設数は 169 施設中 21 施設 (12.4%) であった。

既知の *rmtA*、*rmtB*、*armA* の 3 種類の 16S rRNA

メチラーゼ検出用 PCR プライマーのうちの何れかに陽性となった株は 27 株 (77%) であった。また、新型の 16S rRNA メチレース遺伝子が 2 株から確認された。分離された施設数は 169 施設中 16 施設 (9.5%) であった。*rmtA* は *P. aeruginosa* のみで分離されたが、*armA* は *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, の 5 菌種から分離された。*rmtB* は *E. coli* 1 株のみから検出された。今回の 3 種類の PCR プライマーで遺伝子の確認ができなかった新型の 16S rRNA メチレースの遺伝子を保有する可能性が考えられた菌株は 6 株でその内訳は *P. aeruginosa* 5 株、*E. cloacae* 1 株であった。

16S rRNA メチラーゼ遺伝子を保有する同じ菌種が複数検出された施設は合計 4 施設で 3 施設では *P. aeruginosa* (病院 C; 3 株、病院 D; 7 株、病院 F; 2 株)、1 施設では *A. baumannii* (病院 V; 3 株) であった。また病院 M では *armA* が *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* の 3 菌種から分離された。

既知の 16S rRNA メチラーゼ遺伝子を検出する PCR 法で陽性となった 27 株のうち呼吸器検体から 7 株、便から 4 株、尿から 1 株分離されており、残りの 15 株はその他の検体から分離されているため詳細は不明であった。血液および髄液からは分離されなかった。

4 つの医療施設から同一の菌種が複数分離されたため PFGE をおこない、同一クローンによる感染か否かを判定した。その結果病院 F では異なる菌株と判定されたが、病院 C で分離された菌株のうち 2 株が同じクローン由来であると推察された。また病院 D では 2 種類のクローンが、病院 V では 1 種類のクローンの施設内伝播が確認された。

PCR 法で 16S rRNA メチラーゼ遺伝子が陽性となった菌株はすべてストレプトマイシン、ネオマイシン以外の 4,6-disubstituted deoxystreptamini グループに属するアミノグリコシドに対して高度耐性を示した (MIC,  $\geq 512$   $\mu\text{g/ml}$ )。既知の 3 種類の 16S rRNA メチラーゼ遺伝子が陰性となった菌株

のうち *E. cloacae* 1 株と *P. mirabilis* 2 株のアミノグリコシド耐性パターンは 16S rRNA メチラーゼ遺伝子が PCR 法で陽性となった菌株と同じであった。その他の薬剤については一定の傾向は認められなかった。

本調査で対象となった検体数は 326,605 検体でその内訳は呼吸器系検体 105,957 検体 (32.4%)、尿 45,389 検体 (13.9%)、血液 41,215 検体 (12.6%)、便 30,881 検体 (9.5%)、髄液 4,907 検体 (1.5%)、その他 98,256 検体 (30.1%) であった。1 ヶ月 100 病床に換算した検体の提出数の平均は全検体数で 167.1 検体/100 病床/1 ヶ月、呼吸器検体は 56.2 検体/100 病床/1 ヶ月、尿は 22.8 検体/100 病床/1 ヶ月、血液は 18.3 検体/100 病床/1 ヶ月、便は 18.8 検体/100 病床/1 ヶ月、髄液は 2.3 検体/100 病床/1 ヶ月であった。

主な腸内細菌とブドウ糖非発酵菌群に属する *P. aeruginosa* および *Acinetobacter* 属の分離状況は *P. aeruginosa* が最も多く全体の 20.6% を占めていた。ついで *E. coli* が 16.8%、*Klebsiella* 属 14.0% で上位 3 菌種がグラム陰性菌の分離頻度の約半分を占めていた。以下 *Enterobacter* 属 7.3%、*Acinetobacter* 属 3.6%、*Serratia* 属 3.4%、*Citrobacter* 属 2.8%、*Proteus* 属 2.7%、であった。

## 2) 多剤耐性緑膿菌感染症の解析

平成 16 年 6 月から平成 17 年 3 月までに、都内の 1 基幹病院の 1 つの病棟において、計 10 株の緑膿菌が分離され、その内の 6 株が高度多剤耐性緑膿菌であった。緑膿菌の PFGE 型は 6 型に分類されたが、高度多剤耐性緑膿菌の PFGE 型は 2 型に大別された。両型の緑膿菌がそれぞれの病棟の患者間で院内感染を引き起こしていることが強く示唆された。環境調査の結果、両病棟において手洗い用シンク及び蓄尿器 (蓄尿瓶乾燥台) から緑膿菌が分離された。また、同病棟はカルバペネム (イミペネム) の使用頻度が院内で最も多く、多くの病棟の 2 から 3 倍の使用頻度であった。レトロスペクティブな調査の結果、多剤耐性緑膿菌感染患者の大多数が尿留置カテーテルの挿入がある

ことが明らかになった。PCR の結果ではこれらの多剤耐性緑膿菌全てが IMP-1 型メタロベータラクタマーゼ遺伝子を保有しており、さらに、ニューキノロン薬耐性を要因づける *gyrA* 遺伝子と *parC* 遺伝子の QRDR 領域内に変異が認められた。この遺伝子内変異は宮城県で分離された緑膿菌にも認められた。PFGE 型においても宮城県で分離された緑膿菌と全く同一の PFGE 型を示す株が同定された。また、この菌株は宮城県で分離された緑膿菌に特徴的なアミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を保有していた。

宮城県内に医療施設においても院内感染を推測させる同一の PFGE 型を有する多剤耐性緑膿菌が分離された。PFGE 型によって分類された、宮城県内で最も高頻度に分離された多剤耐性緑膿菌は、県内全域に渡って分離され、また、医療施設内において尿路カテーテルと関連した院内感染を引き起こしていた。

平成 15 年 10 月より平成 16 年 3 月までに、11 施設よりアミノグリコシド薬、ニューキノロン薬、カルバペネム薬に耐性を示す多剤耐性緑膿菌が計 53 株分離された。分離された地域別としては、宮城県の県北地域の 4 施設より 21 株、県南地域施設より 2 株、仙台区地域の 6 施設より 30 株が分離された。PCR の結果、これらの多剤耐性緑膿菌全てが IMP-1 型メタロベータラクタマーゼ遺伝子を保有していた。PFGE により、分離された緑膿菌すべての遺伝子型を比較した結果、多剤耐性緑膿菌は 13 パターンに分類されたが、それらの類似性は 90%以上であった。一方、薬剤感受性緑膿菌の PFGE パターンには多剤耐性緑膿菌に認められたような類似性は見られず、21 パターンに大別された。また、これらの感受性緑膿菌の PFGE パターンと多剤耐性緑膿菌の PFGE パターンは全く異なっていた。

16S-rRNA メチレーゼの遺伝子の保有状況については現在解析中である。

#### D. 考 察

##### 1) 16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株の調査

#### 解析

今回調査の対象となったグラム陰性菌の総数は 87,626 株であり、この中で各施設のアミノグリコシド感受性検査においてすべてのアミノグリコシドに耐性となった菌株は 527 株 (0.6%) であった。2002 年におこなった調査 (厚生科学特別研究事業 H13-特別 -066) ではアミカシンのみの耐性に対象をしぼって菌株を収集したところ、*P. aeruginosa* のアミノグリコシド耐性は 4.7%であったのに対して、今回の調査では *P. aeruginosa* 18,037 株中 384 株 (2.1%) であった。今回の調査では単独でアミノグリコシド修飾酵素を産生する菌株は対象とならないためこのような差が生じたものと思われる。二次スクリーニングで陽性となったアルベカシン高度耐性株は 35 株であり、このうち既知の 16S rRNA メチラーゼ遺伝子陽性と判定された菌株は 27 株であり、また、新型のメチレーゼ産生株も 2 株確認されたが、これらはすべてストレプトマイシン、ネオマイシン以外のアミノグリコシドには高度耐性を示したが、その他の薬剤については結果はまちまちであった。母集団に対する多剤高度耐性株の割合は 0.03%と非常に低い値であった。

今回検討した PCR 法で既知の 3 種類の 16S rRNA メチラーゼが検出されなかった 8 株のうち、1 株の *E. cloacae* と 2 株の *P. mirabilis* は、16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株とアミノグリコシドの耐性パターンが同じであることからこれまでに分かっている 3 種類以外の新型 16S rRNA メチラーゼ遺伝子を保持している可能性が強く示唆され、シーケンス解析の結果、2 株の *P. mirabilis* からは、第 4 番目の新型メチレーゼの遺伝子が確認された。また *P. aeruginosa* 5 株も PCR 法では陽性とならなかったが、アミノグリコシドの耐性パターンは若干異なっているため アセチル化酵素とアデニリル化酵素の同時産生など、複数のアミノグリコシド修飾不活化酵素の同時産生による耐性機序も考えられた。

今回の参加施設は 159 施設 (94%) が 200 床以上の病院であった。平成 15 年現在で 200 床以上

の病院は全国に 2,752 施設が登録されており、今回の参加施設は日本の 200 床施設の 5.8%を占めている。また 16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株が分離された施設は 16 施設でこれは参加施設の 9.5%を占めていた。これらの結果から日本における 200 床以上の病院において検査される検体からは日常的に分離されるグラム陰性菌からは 16S rRNA メチラーゼ産生菌は現時点では稀にしか分離されないものの、参加施設の約 1 割から 16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株が分離された事実から日本における医療施設全体を考えると相当数の病院から 16S rRNA メチラーゼ産生菌が散発的に分離されているものと推定され、今後、国内での一層の蔓延が懸念される。

同一の菌種が複数分離された医療施設は 4 施設で PFGE の解析結果から 3 施設で同一菌株または同一のクローンに由来すると考えられる菌株が分離され、16S rRNA メチラーゼ産生菌の院内伝播が強く疑われた。この種の新型耐性菌は、現時点では分離頻度は低いもののひとたび病院内に侵入すると院内感染の原因にもなりかねず、警戒と対策が必要である。

病院 M からは異なる 3 菌種から同一の 16S rRNA メチラーゼ遺伝子(*armA*)が検出された。*armA* はプラスミド上に存在することが知られており、プラスミドを介した菌種間の遺伝子拡散が、病院 M 内で発生していた可能性が強く示唆された。

緑膿菌に関しては、近年、各地の医療施設から多くの抗菌薬に高度耐性を示す株の分離報告及び院内感染事例報告がなされ、大学附属病院のような高度医療を実施する特定機能病院などにおいても、死亡原因になる事例がしばしば経験されるようになってきた。これらの高度多剤耐性緑膿菌はアミノグリコシド薬、ニューキノロン薬、カルバペネム薬に高度耐性を示し、治療が極めて困難になることが予想される。今回の分子疫学解析の結果、東京から宮城間の地理的隔離にも関わらず、同一の PFGE 型を示す高度多剤耐性緑膿菌株が分離された。この事実は特定の遺伝的背景を持った

特殊な高度耐性緑膿菌クローンが存在し、それが全国規模で伝播拡大しつつある可能性を強く示唆した。今後、高度多剤耐性緑膿菌の全国規模で疫学調査の継続的な実施とともに、新たな治療法の開発及び院内感染防止対策法の確立が急務となっている。

## E. 結 論

日本の 169 の医療施設において 16S rRNA メチラーゼ遺伝子を保有するグラム陰性桿菌が日常検査で分離される頻度は 0.1%程度であり未だ稀ではあるものの、この種の遺伝子を保有する株は、今回の調査では少なくとも 16 施設 (9.5%) で確認されており、既に国内の医療施設に 16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株が、密かに拡散しつつある事実が確認された。しかも、今回の調査では、同一菌株による院内感染や菌株間における 16S rRNA メチラーゼ遺伝子の伝播拡散を疑わせる事例も確認された。

多剤耐性緑膿菌については、既に院内感染の起因菌として無視できない状況となっており、また、同じ遺伝子型を示す多剤耐性株が、地理的に遠く隔たった医療機関から分離された事実から、特定の多剤耐性クローンが、国内に広く拡散しつつある可能性が強く示唆された。

以上の結果から、今後、16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株とともに、多剤耐性緑膿菌の分離状況やその動向について特段の注意と監視が必要と思われる。

## F. 健康危険情報

日本の臨床現場で広く用いられている複数のアミノグリコシド系抗菌薬に高度耐性を付与する 16S rRNA メチラーゼ遺伝子を保有する菌株が、調査した 169 施設中 16 施設 (9.5%) で分離された。この新規耐性機序を有するグラム陰性桿菌の分離頻度は、日常の細菌検査ではほ 0.1%程度であり、現時点では稀にしか遭遇しないが、一部の病院で同一のクローンが複数の患者に伝播している事例も確認されており、多剤耐性を獲得した緑膿菌株

とともに、院内感染対策の対象として監視するとともに、実効ある対策を講じる必要がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

・ Kirikae T, Tokunaga O, Inoue Y, Fujino T, Saruta K, Yoshikura H, Kuratsuji T, Miyanomae T.: Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* in a long-term care facility for patients with severe motor and intellectual disabilities. *Jpn J Infect Dis.* 2004, 57:226-228.

・ Yamane, K., J. Wachino, Y. Doi, H. Kurokawa, and Y. Arakawa. Global Spread of Multiple-aminoglycoside-resistance Genes, *Emerg Infect Dis.* 2005, 11(6), in press.

### 2. 学会発表

・ 山根一和、他、グラム陰性桿菌にアミノグリコシド高度耐性を付与する 16S rRNA メチレーズの型別と臨床分離株の保有調査、第 16 回日本臨床微生物学会総会（京都）、2004

・ 山根一和、他、同一の医療施設から分離されたアミノグリコシド高度耐性 16S rRNA メチラーゼ産生株の解析、第 78 回日本細菌学会総会（東京）、2004

## H. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## I. 参考文献

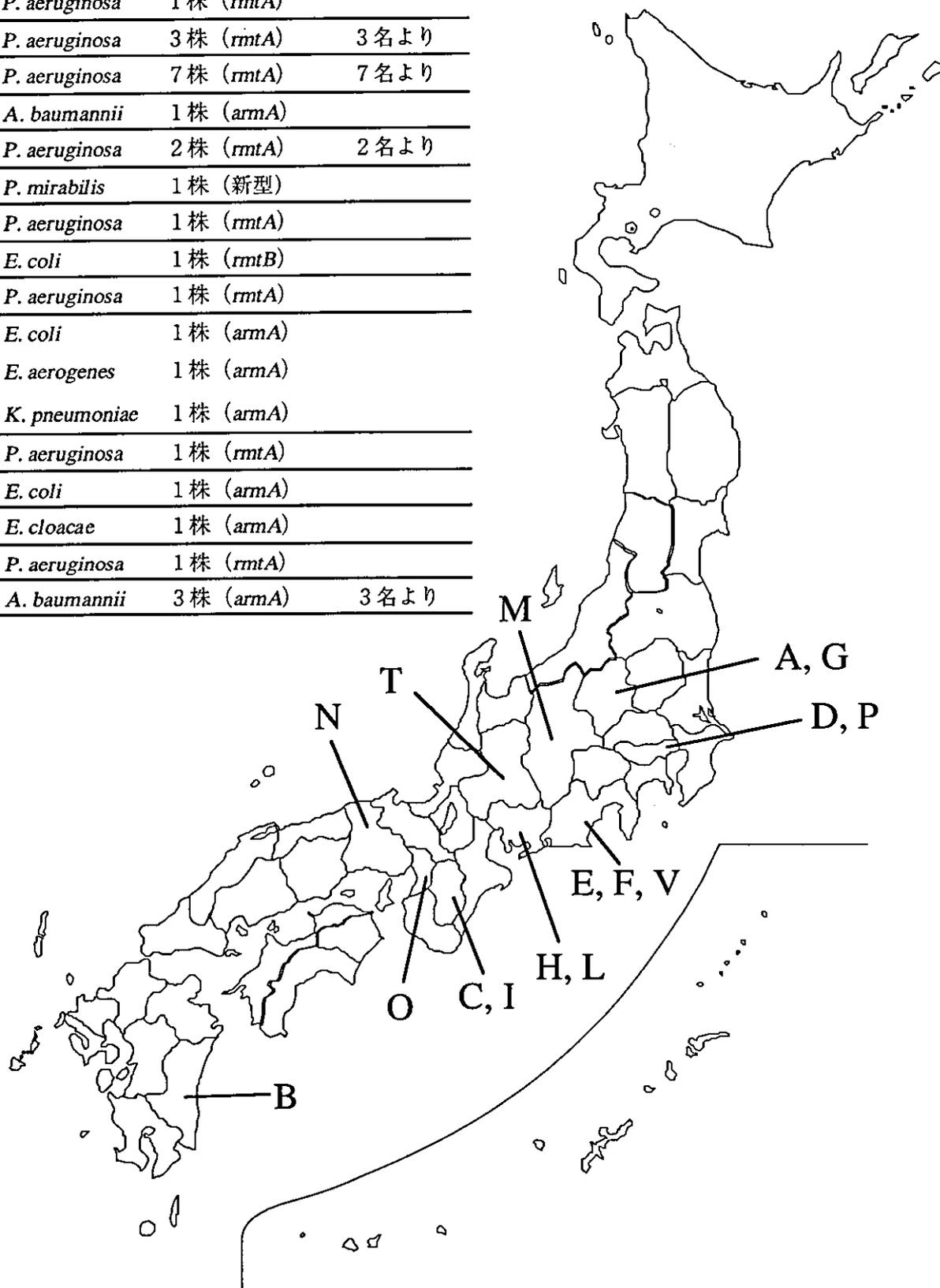
1. 医療施設（動態）調査・病院報告の概況  
<http://www.mhlw.go.jp/foukei/saikin/hw/iryosd/03/index.html>
2. アシネトバクター等多剤耐性グラム陰性桿菌に関

する調査研究 厚生科学特別研究事業（H13-特別-066）

3. Galimand, M., P. Courvalin, and T. Lambert. 2003. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2565-71.
4. Doi, Y., K. Yokoyama, K. Yamane, J. Wachino, N. Shibata, T. Yagi, K. Shibayama, H. Kato, and Y. Arakawa. 2004. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 48:491-6.
5. Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233-9.
6. Yamane, K., Y. Doi, K. Yokoyama, T. Yagi, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, H. Kato, and Y. Arakawa. 2004. Genetic environments of the rmtA gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2069-74.
7. Yamane, K., J. Wachino, Y. Doi, H. Kurokawa, and Y. Arakawa. Global Spread of Multiple-aminoglycoside-resistance Genes, *Emerg Infect Dis.* 2005, 11(6), in press.
8. Yan, J. J., J. J. Wu, W. C. Ko, S. H. Tsai, C. L. Chuang, H. M. Wu, Y. J. Lu, and J. D. Li. 2004. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. *J Antimicrob Chemother* 54:1007-12.
9. Yokoyama, K., Y. Doi, K. Yamane, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, T. Yagi, H. Kato, and Y. Arakawa. 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 362:1888-93.

# 16S rRNAメチレーズ遺伝子保有株が確認された施設の所在地

施設	所在	菌種名	株数 (遺伝子型)	分離患者数
A	群馬	<i>P. mirabilis</i>	1株 (新型)	
B	宮崎	<i>P. aeruginosa</i>	1株 ( <i>rmtA</i> )	
C	奈良	<i>P. aeruginosa</i>	3株 ( <i>rmtA</i> )	3名より
D	東京	<i>P. aeruginosa</i>	7株 ( <i>rmtA</i> )	7名より
E	静岡	<i>A. baumannii</i>	1株 ( <i>armA</i> )	
F	静岡	<i>P. aeruginosa</i>	2株 ( <i>rmtA</i> )	2名より
G	群馬	<i>P. mirabilis</i>	1株 (新型)	
H	愛知	<i>P. aeruginosa</i>	1株 ( <i>rmtA</i> )	
I	奈良	<i>E. coli</i>	1株 ( <i>rmtB</i> )	
L	愛知	<i>P. aeruginosa</i>	1株 ( <i>rmtA</i> )	
		<i>E. coli</i>	1株 ( <i>armA</i> )	
M	長野	<i>E. aerogenes</i>	1株 ( <i>armA</i> )	
		<i>K. pneumoniae</i>	1株 ( <i>armA</i> )	
N	兵庫	<i>P. aeruginosa</i>	1株 ( <i>rmtA</i> )	
O	大阪	<i>E. coli</i>	1株 ( <i>armA</i> )	
P	東京	<i>E. cloacae</i>	1株 ( <i>armA</i> )	
T	岐阜	<i>P. aeruginosa</i>	1株 ( <i>rmtA</i> )	
V	静岡	<i>A. baumannii</i>	3株 ( <i>armA</i> )	3名より



アミノグリコシド高度耐性グラム陰性桿菌が保有する  
16S rRNA メチラーゼ分離状況の調査研究

分担研究者 山根 一和 国立感染症研究所 細菌第二部 研究員  
鈴木 里和 同上  
長沢 光章 防衛医科大学校病院 検査部 主任技師

研究要旨

2004年9月1日から10月31日の二ヶ月間に、全国169の医療施設で分離された、87,626株のグラム陰性菌について、アミノグリコシドに対し高度耐性を付与する、16S rRNA メチラーゼの遺伝子の保有状況を調査した。アミカシンのMIC値が32 µg/ml以上の481株について、アルベカシンの濃度が500 µg/mlの培地に接種し、生育した7菌種35株について、PCRによる試験を実施した。この35株は21施設から分離され、内訳は、緑膿菌が22株と最も多く、次いで *Acinetobacter baumannii* が4株、*Escherichia coli* が3株、*Enterobacter cloacae* が2株、*Proteus mirabilis* が2株、*Enterobacter aerogenes* と *Klebsiella pneumoniae* が各々1株であった。遺伝子型別では、*rmtA* 保有株の17株は全て緑膿菌であった。*armA* は9株、*rmtB* は1株で確認された。その他、新型の16S rRNA メチラーゼを産生すると推定される株が少なくとも2株の *P. mirabilis* で確認された。*armA* 保有株の内訳は、*A. baumannii* が4株 *E. coli* が2株、*E. cloacae*、*E. aerogenes*、*K. pneumoniae* が各々1株ずつであった。しかし、*rmtB* は、今回は1株の *E. coli* のみにおいて確認された。緑膿菌における *rmtA* 遺伝子の保有率は、 $17/18,037=0.00094$  で約0.1%であった。また、*A. baumannii* における *armA* 保有率は、 $4/3,116=0.00128$  で約0.13%であった。しかし、16S rRNA メチラーゼの何れかの遺伝子を保有する株は、調査に参加した169施設のうち少なくとも16施設(9.5%)から分離され、すでに、国内に広く分布し始めている事実が確認された。さらに同一の施設から、複数の16S rRNA メチラーゼ産生株が分離され、それらのPFGE解析パターンが類似していた事実から、この種の新型耐性菌が既に一部の国内の医療施設では院内伝播している事が確認された。

研究協力者

和知野純一、柴田尚宏、加藤はる、柴山恵吾、石川暁志、小澤良之、木村幸司、甲斐久美子、近田俊文（国立感染症研究所 細菌第二部）

A. 研究目的

近年、*Pseudomonas aeruginosa* をはじめとするグラム陰性桿菌の多剤耐性化が我が国の臨床現場で進行しており深刻な問題となっている。臨床現場で現在頻繁に使用される抗菌薬はβ-ラクタム剤やニューキノロン剤が多いが、グラム陰性桿菌の治療にはアミノグリコシドが重要な抗菌薬として使用されている。またメチシリン耐

性黄色ブドウ球菌（MRSA）の治療薬としてバンコマイシン、テイコプラニンと並んで、アミノグリコシドの一種であるアルベカシンが使用されている。これまでアミノグリコシドに対する細菌の耐性機序は、アミノグリコシドにアセチル基やリン酸基など特定の基を結合させることにより薬剤の不活化を行うアミノグリコシド修飾酵素の存在が一般的であった。ところが2003年から2004年にかけて我が国及びヨーロッパ諸国からアミノグリコシドに高度耐性を付与する16S rRNA メチラーゼがグラム陰性桿菌から発見された。アミノグリコシドはリボソームに結合し細菌のタンパク合成を阻害するが、16S rRNA

メチラーゼはアミノグリコシドの結合部位であるリボソーム RNA をメチル化することによって耐性を発揮する。アミノグリコシド修飾酵素が特定のアミノグリコシドのみを不活化するのに対して 16S rRNA メチラーゼは、我が国の臨床現場で使用されているほとんどのアミノグリコシドが属する 4,6-disubstituted deoxystreptamini グループすべてに対して最小発育阻止濃度が 1,024 µg/ml を超える高度耐性を付与する。我々の事前調査で様々なグラム陰性桿菌がこの耐性遺伝子を保持していることが強く示唆された (Yamane et al., *Emerg. Infect. Dis.* 11(6), June 2005)。そこで、今回、我が国の臨床現場においてどの程度この耐性遺伝子を保有するグラム陰性桿菌が分離されるかを正確に調査把握することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 調査研究協力依頼施設

(社)日本臨床衛生検査技師会会員の所属する 200 施設の病院長と検査部門責任者に対して以下に示す分離菌株の情報と提供を依頼する依頼状を送付し、病院長もしくは検査部門責任者の許可を得た上で調査を実施した。

### 2) 調査期間

調査期間は 2004 年 9 月 1 日から 10 月 31 日の二ヶ月間とした。

### 3) 収集情報

調査期間中に細菌検査室に依頼された総検体数、分離菌体総数、グラム陰性菌分離総数、菌種別分離総数 (対象菌種: *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* 属, *Proteus* 属, *Acinetobacter* 属, *Alcaligenes* 属, *Citrobacter* 属, *Klebsiella* 属)、検体情報 (内訳: 呼吸器系検体、尿、血液、便、髄液、その他) をそれぞれ収集した。

### 4) 収集菌株

調査期間中に各施設において分離した菌株のうち、各施設で感受性検査を施行したアミノグリコシド全てに耐性を示す腸内細菌と *P. aeruginosa*,

*Acinetobacter* 属を収集した。1 患者について複数回、同じ薬剤感受性パターンを示す株が分離された場合は、1 菌種につき 1 株を収集した。菌株は各施設からアミカシン 32 µg/ml 含有カジトン培地に接種し国立感染症研究所細菌第二部に送付された。

### 5) 16S rRNA メチラーゼスクリーニングと PCR 法による型別

送付された菌株は雑菌の混入の有無を確認した後、一次スクリーニングとしてアミカシン 32 µg/ml 含有 Luria-Bertane(LB)培地に接種した。この培地でコロニーを形成した菌株はアルベカシン 500 µg/ml 含有 LB 培地に接種し二次スクリーニングを行った。コロニーを形成した菌株については PCR 法によって型別し、さらに PCR 反応産物の塩基配列を決定することにより既存の 16S rRNA メチラーゼの塩基配列を比較した。PCR プライマーは *rmtA* RMTA-F 5'-CTA GCG TCC ATC CTT TCC TC-3', RMTA-R 5'-TTT GCT TCC ATG CCC TTG CC-3', *rmtB* RMTB-F 5'-CCC AAA CAG ACC GTA GAG GC-3', RMTB-R 5'-CTC AAA CTC GGC GGG CAA GC-3', *armA* ARMA-F 5'-AGG TTG TTT CCA TTT CTG AG-3', ARMA-R 5'-TCT CTT CCA TTC CCT TCT CC-3' をそれぞれ使用し、PCR 産物を 2%TBE アガロースゲルに電気泳動し 16S rRNA メチラーゼ遺伝子の有無と種類を決定した。

### 6) パルスフィールドゲル電気泳動による菌株型別

同一の医療施設から同じ菌種が分離された場合、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) によって同一の菌か否かを判定した。同一クローンか否かの判定は Tenover らの分類を用いた。

### 7) 薬剤感受性試験

アルベカシン 500 µg/ml 含有 LB 培地にコロニーを形成した菌株に対する各種抗菌薬の最小発育阻止濃度(MIC)を米国臨床検査標準化委員会 (NCCLS) の定める寒天平板標準法を用いた。対象とした抗菌薬はカナマイシン、トブラマイシン、アミカシン、アルベカシン、ゲンタマイシン、シソマイシン、ストレプトマイシン、ネ

オマイシン、セフォタキシム、セフトジジム、イミペネムの11薬剤とした。

#### 8) 検体情報の解析

各施設から収集した検体情報は1ヶ月、100病床あたりの検体情報に変換し、その平均値などを比較した。

#### 9) 倫理的側面での配慮

各施設で分離された細菌の菌種などのデータは個人名もしくは個人を識別しうるデータとは切り離されており、各施設から提出された情報から個人を特定することはできず、その点において、研究実施上、倫理的な問題は発生しない。

### C. 結果

#### 1) 情報収集について

本研究に参加を表明したのは200施設であったが、有効な細菌検査室の情報が収集できたのは169施設(84.5%)であった(表1)。依頼検査総数は326,605件、分離菌株総数は250,343株、うちグラム陰性菌は87,626株であった。

#### 2) 送付菌株の解析

各施設から送付されたアミノグリコシド耐性腸内細菌、*P. aeruginosa*、*Acinetobacter* 属は527株であり、感染研での一次スクリーニングでアミカシン 32 µg/ml 含有 LB 培地に481株が生育することが確認された。二次スクリーニングではアルベカシン 500 µg/ml を含有する LB 培地では7菌種 35株が生育し、それらが分離された施設数は169施設中21施設(12.4%)であった(図1)。

同じ種の菌株が複数患者から検出された施設は合計4施設で3施設では*P. aeruginosa*(病院C; 3株、病院D; 7株、病院F; 2株)、1施設では*A. baumannii*(病院V; 3株)であった。また病院Mでは*armA*が*E. coli*、*E. aerogenes*、*K. pneumoniae*の異なる3菌種から分離された。各スクリーニングの概要と菌種の内訳を図1、表2に示す。

#### 3) PCR法による16S rRNAメチラーゼの型別

既知の3種類の16S rRNAメチラーゼの検出用

プライマーの何れかで陽性となった株は27株(77%)であった。分離された施設数は169施設中14施設(8.3%)であった。*rmtA*は*P. aeruginosa*のみで分離されたが、*armA*は*E. coli*、*Acinetobacter baumannii*、*Enterobacter cloacae*、*Enterobacter aerogenes*、*Klebsiella pneumoniae*、の5菌種から分離された。*RmtB*は*E. coli*1株のみから分離された。今回のPCR法では遺伝子の確認ができなかった新型の16S rRNAメチラーゼの遺伝子を保有すると考えられた菌株は8株でその内訳は*P. aeruginosa*5株、*Proteus mirabilis*2株、*E. cloacae*1株であった(表3)。そのうち、2株の*P. mirabilis*からは、新型のメチラーゼの遺伝子が確認され、何らかの16S rRNAメチラーゼの遺伝子を保有する事が確認された株は、29株で、それらは、16施設から検出された。

#### 4) 16S rRNAメチラーゼ遺伝子陽性菌株の分離検体について

PCR法で陽性となった27株のうち呼吸器検体から7株、便から4株、尿から1株分離されており、残りの15株はその他の検体から分離されているため詳細は不明であった。血液および髄液からは分離されなかった(表3)。

#### 5) PFGEによる菌株型別

4病院から同一の菌種が複数分離されたためPFGEをおこない、同一クローンによる感染か否かをTenoverらの分類によって判定した。その結果病院Fでは異なる菌株と判定されたが、病院Cで分離された菌株のうち2株が同じクローン由来であると推察された。また病院Dでは2種類のクローンが、病院Vでは1種類のクローンが分離されていたことが判明した(表3、図2)。

#### 6) 薬剤感受性試験結果

何れかの16S rRNAメチラーゼ遺伝子を保有する菌株はすべて、ストレプトマイシン、ネオマイシン以外の4,6-disubstituted deoxystreptaminiグループに属するアミノグリコシドに対して高度耐性を示した(MIC,  $\geq 512$  µg/ml)。しかし、3種類の16S rRNAメチラーゼ遺伝子が全て陰性となった8株のうち、*E. cloacae*1株のアミノグリ

コシド耐性パターンは 16S rRNA メチラーゼ遺伝子が PCR 法で陽性となった菌株と同じであったため、この株は第 5 番目の 16S rRNA メチラーゼ遺伝子を保有している事が示唆され、現在解析が行われている。16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株は、アミノグリコシド以外の薬剤に対する耐性度については一定の傾向は認められなかった(表4)。

#### 7) 各種検体の提出状況および分離されるグラム陰性菌

本調査で対象となった検体数は 326,605 検体でその内訳は呼吸器系検体 105,957 検体 (32.4%)、尿 45,389 検体 (13.9%)、血液 41,215 検体 (12.6%)、便 30,881 検体 (9.5%)、髄液 4,907 検体 (1.5%)、その他 98,256 検体 (30.1%) であった。1ヶ月 100 病床に換算した検体の提出数の平均は全検体数で 167.1 検体/100 病床/1 ヶ月、呼吸器検体は 56.2 検体/100 病床/1 ヶ月、尿は 22.8 検体/100 病床/1 ヶ月、血液は 18.3 検体/100 病床/1 ヶ月、便は 18.8 検体/100 病床/1 ヶ月、髄液は 2.3 検体/100 病床/1 ヶ月であった(図3)。

主な腸内細菌とブドウ糖非発酵菌群に属する *P. aeruginosa* および *Acinetobacter* 属の分離状況は *P. aeruginosa* が最も多く全体の 20.6% を占めていた。ついで *E. coli* が 16.8%、*Klebsiella* 属 14.0% で上位 3 菌種がグラム陰性菌の分離頻度の約半分を占めていた。以下 *Enterobacter* 属 7.3%、*Acinetobacter* 属 3.6%、*Serratia* 属 3.4%、*Citrobacter* 属 2.8%、*Proteus* 属 2.7%、であった(図4)。

## D. 考 察

### 1. 16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有菌株について

今回調査の対象となったグラム陰性菌の総数は 87,626 株であり、この中で各施設のアミノグリコシド感受性検査においてすべてのアミノグリコシドに耐性となった菌株は 527 株 (0.6%) であった。一般的にグラム陰性菌のアミノグリコシド耐性はアミノグリコシド修飾酵素による

ことがほとんどであり、これらの酵素は一部の例外を除いて臨床で広く用いられているアミノグリコシドである 4,6-disubstituted deoxystreptamini グループに属するカナマイシン系アミノグリコシド(カナマイシン、アミカシン、トブラマイシン、ジベカシン、アルベカシンなどが属する)もしくはゲンタマイシン系アミノグリコシド(ゲンタマイシン、イセパシン、シソマイシンなどが属する)のいずれか一方をより効率的に不活化することが多い。2002 年におこなった調査ではアミカシンのみの耐性に対象をしばって菌株を収集したところ、*P. aeruginosa* のアミノグリコシド耐性は 4.7% であったのに対して(厚生科学特別研究事業 H13-特別-066) 今回の調査では *P. aeruginosa* 18,037 株中 384 株 (2.1%) であった。今回の調査では単独でアミノグリコシド修飾酵素を産生する菌株は対象とならないためこのような差が生じたものと思われる。二次スクリーニングで陽性となったアルベカシン高度耐性株は 35 株であり、この何らかの 16S rRNA メチラーゼ遺伝子陽性と判定された菌株は 29 株である。29 株はすべてストレプトマイシン、ネオマイシン以外のアミノグリコシドには高度耐性となったが、その他の薬剤については結果はまちまちであった。母集団に対する割合は 0.03% と非常に低い値となったが、*P. aeruginosa* と *A. baumannii* については 0.1% 前後と、腸内細菌科より高い保有率を示した。

今回検討した PCR 法で既知の 3 種類の 16S rRNA メチラーゼが検出されなかった 8 株のうち、*E. cloacae* と *P. mirabilis* は 16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株とアミノグリコシドの耐性パターンが極めて類似していることから今回検討した 3 種類以外の 16S rRNA メチラーゼを保持している可能性があり、シークエンス解析の結果、異なる施設から分離された 2 株の *P. mirabilis* から、新型の 16S rRNA メチラーゼ遺伝子と思われるシークエンスが確認され、現在詳しい解析を進めている。また *P. aeruginosa* 5 株も PCR 法で陽性とならなかったが、アミノグリコシドの耐性パ

ターンは 16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株とは若干異なっているため 16S rRNA メチラーゼ以外の耐性機序、例えば複数の修飾酵素の同時産生による可能性も考えられた。

今回の参加施設の中で 159 施設 (94%) が 200 床以上の病院である。平成 15 年現在で 200 床以上の病院は全国に 2,752 病院登録されており、つまり、今回の参加協力施設数は日本の 200 床施設の 5.8% を占めている。また 16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株が分離された施設は 16 施設でこれは参加施設の 9.5% を占めている。これらの結果から、日本における 200 床以上の病院における日常的な細菌検査により分離されるグラム陰性菌からの 16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株の分離は現時点では稀と考えられる。しかし参加施設の約 1 割から 16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株が確認されたことから日本における病院全体を考えると相当数の病院から 16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株が分離されていると推定され、今後、国内での一層の蔓延が懸念される。

同一の菌種が複数分離された医療施設は 4 施設で PFGE の解析結果から 3 施設で同一菌株または同一のクローンに由来すると考えられる菌株が分離されていることが明らかになった。これは 16S rRNA メチラーゼ産生菌の施設内伝播による院内感染を疑わせるものであり、分離頻度は少ないもののひとたび病院内に侵入すると院内感染の原因にもなり得る事を示しており、今後の動向に嚴重な注意が必要である。

病院 M からは異なる 3 菌種から同一の 16S rRNA メチラーゼ遺伝子である *armA* が検出された。*armA* はプラスミド上に存在することが知られており、同一の病院から複数の菌種で分離された事例があり、これらの菌から抽出したプラスミドを調べてみると同じものであったという報告がある。病院 M の事例も同様のことが起こっているのかもしれない。

## 2) 各種検体の分離状況について

病床数の違いによる格差を是正するために一ヶ月 100 床あたりの検体数に換算したところ、

最もよく提出される検体は呼吸器系検体で、ついで尿、血液、便、髄液の順であった。それぞれの検体の提出数は施設の規模に関係なく分散しており施設ごとに検体提出の基準が異なっていることが関係していると思われる。

血液培養は敗血症などの重症感染症を疑う際に必ず行うべき検査であり、比較的検体の採取時期が決まっている検査であるが、今回の調査では施設ごとに値がまちまちであった。今回は血液培養の陽性検体数や分離菌名は情報収集しなかったが、総血液培養検体数と併せて収集すれば、陽性率などが算出でき、適切な時期に検体採取が行われているか、検体採取時の人為的な汚染の頻度などを評価できる可能性があり、今後検討してゆく余地があると思われる。

## E. 結 論

日本の 200 床以上の病院において 16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株が日常検査で分離される頻度は 0.1% 程度であり、未だ稀であるものの、既に調査に参加した 169 施設中 16 施設 (9.5%) から、16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株が確認され、既にこの種の新型耐性株が国内の複数の医療施設に、薄く広範に広がっている事実が確認された。さらに、今回の調査では、同一菌株による院内感染を疑わせる事例が確認された。以上の事実から、今後、16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株の分離動向について注意が必要と思われる。今回の調査の結果をもとに各医療施設の細菌検査室で簡便に行うことができる簡易スクリーニング方法を考案した。

また各種検体の検査依頼状況から、検体採取の基準において統一されたものがないことが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

日本の臨床現場で広く用いられているアミノグリコシド系抗菌薬に高度耐性を付与する 16S rRNA メチラーゼ遺伝子を保有する株が、調査した 169 施設中 16 施設 (9.5%) で確認された。この

新規耐性機序を有するグラム陰性桿菌の分離頻度は、日常の細菌検査では、ほぼ 0.1%以下であり、現時点では稀にしか遭遇しないが、一部の病院で同一のクローンが既に複数の患者に伝播している事例も確認されており、院内感染対策の対象として警戒をする必要がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Yamane, K., J. Wachino, Y. Doi, H. Kurokawa, and Y. Arakawa. Global Spread of Multiple-aminoglycoside-resistance Genes, *Emerg Infect Dis.* 2005, 11(6), in press.

### 2. 学会発表

- 山根一和、他、グラム陰性桿菌にアミノグリコシド高度耐性を付与する 16S rRNA メチラーゼの型別と臨床分離株の保有調査、第 16 回日本臨床微生物学会総会（京都）、2004
- 山根一和、他、同一の医療施設から分離されたアミノグリコシド高度耐性 16S rRNA メチラーゼ産生株の解析、第 78 回日本細菌学会総会（東京）、2004

## H. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## I. 参考文献

1. 医療施設（動態）調査・病院報告の概況  
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/irvosd/03/index.html>
2. アシネトバクター等多剤耐性グラム陰性桿菌に関する調査研究 厚生科学特別研究事業（H13-特別-066）
3. Galimand, M., P. Courvalin, and T. Lambert. 2003.

Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2565-71.

4. Doi, Y., K. Yokoyama, K. Yamane, J. Wachino, N. Shibata, T. Yagi, K. Shibayama, H. Kato, and Y. Arakawa. 2004. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 48:491-6.
5. Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233-9.
6. Yamane, K., Y. Doi, K. Yokoyama, T. Yagi, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, H. Kato, and Y. Arakawa. 2004. Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2069-74.
7. Yamane, K., J. Wachino, Y. Doi, H. Kurokawa, and Y. Arakawa. Global Spread of Multiple-aminoglycoside-resistance Genes, *Emerg Infect Dis.* 2005, 11(6), in press.
8. Yan, J. J., J. J. Wu, W. C. Ko, S. H. Tsai, C. L. Chuang, H. M. Wu, Y. J. Lu, and J. D. Li. 2004. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. *J Antimicrob Chemother* 54:1007-12.
9. Yokoyama, K., Y. Doi, K. Yamane, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, T. Yagi, H. Kato, and Y. Arakawa. 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 362:1888-93.

表1 調査に協力した施設、調査期間中に分離された総株数等

調査期間	2004年9月1日～10月31日
調査依頼施設数	200 施設
データ充足施設数	169 施設 (うち159施設は200床以上)
調査期間中の総検査検体数	326,605 件
調査期間中の分離菌株総数	250,343 株
調査期間中のグラム陰性菌総数	87,626 株