

などが考えられる。

複数の施設の感染率を比較するうえでリスク調整は欠かせないが、毎日のデバイス装着状況の調査は現場のスタッフの負担になる。サンプリングによる分母のデバイス装着人日の推計はサンプリングの方法の工夫で十分実用可能であると考えられ、今後の検討が期待される。

E. 参考文献

1. 国立感染症研究所感染症情報センター  
 JANIS ホームページ  
<http://www.nih-janis.jp/guidance.html>

2. Nosocomial infection rates for interhospital comparison: limitations and possible solutions. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991; 12: 609-621.

3. Klevens RM, Tokars JI, Edwards J, Horan T. Sampling of collection of central line-day denominators in surveillance of healthcare-associated bloodstream infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 338-342.

表1 デバイス装着人日の実測値と推計値の相関

			Mean ± SD	相関数算値	
人呼吸 装着日 (65施設月)	実値		89.2 ± 54.6		
	推計	7日間々	90.5 ± 62.9	0.90	(p0.01)
		3日間々	93.5 ± 69.5	0.84	(p0.01)
		1日間々	103.7 ± 77.2	0.81	(p0.01)
CVカテー 装着日 (65施設月)	実値		129.8 ± 64.7		
	推計	7日間々	132.3 ± 71.1	0.93	(p0.01)
		3日間々	134.0 ± 75.3	0.89	(p0.01)
		1日間々	138.6 ± 79.1	0.88	(p0.01)

表2 リスク調整感染率の実測値と推計値の相関

			Mean ± SD	相関数算値	
人呼吸 関連炎 (65施設月)	実値		19.3 ± 13.7		
	推計	7日間々	20.1 ± 16.5	0.80	(p0.01)
		3日間々	19.3 ± 15.1	0.75	(p0.01)
		1日間々	17.3 ± 14.0	0.71	(p0.01)
カテー 関連感染 (50施設月)	実値		8.2 ± 3.2		
	推計	7日間々	8.3 ± 4.1	0.86	(p0.01)
		3日間々	8.5 ± 5.1	0.71	(p0.01)
		1日間々	8.1 ± 4.3	0.78	(p0.01)

※ 感染発生施設・月のみを分析した

表3 デバイス装着人日の推計値の偏差の分布

		Min	5%タイル	25%タイル	Median	75%タイル	95%タイル	Max
人呼嚙	7日間々	-1.00	-0.68	-0.21	0.01	0.20	0.68	4.08
装着日	3日間々	-1.00	-1.00	-0.24	0.04	0.32	0.96	4.07
(85施設月)	1日間々	-1.00	-1.00	-0.21	0.16	0.51	1.40	18.33
CVカテ形	7日間々	-1.00	-0.46	-0.09	0.02	0.11	0.46	3.44
装着日	3日間々	-1.00	-0.74	-0.11	0.04	0.16	0.68	12.58
(85施設月)	1日間々	-1.00	-1.00	-0.08	0.06	0.20	0.74	27.67

表4 リスク調整感染率の推計値の偏差の分布

		Min	5%タイル	25%タイル	Median	75%タイル	95%タイル	Max
人呼嚙	7日間々	-0.65	-0.36	-0.16	-0.04	0.17	0.67	2.49
関節炎	3日間々	-0.66	-0.43	-0.23	-0.07	0.14	0.88	5.07
(85施設月)	1日間々	-0.75	-0.54	-0.34	-0.17	0.08	0.94	2.86
カテ形	7日間々	-0.48	-0.23	-0.07	-0.02	0.03	0.36	1.52
関連感染	3日間々	-0.61	-0.32	-0.10	-0.04	0.05	0.48	3.13
(50施設月)	1日間々	-0.54	-0.30	-0.13	-0.05	0.00	0.42	2.02

※ 感染発生施設・月のみを分析した

表5 デバイス装着人日の推計値（7日間データ）の偏差に関する二元配置分散分析

			調整均	95%範囲	
人呼嚙 装着日 (85施設月)	在患数	1~2	0.41	0.37-0.45	(p0.01)
		25~8	0.34	0.31-0.37	
		50~	0.20	0.16-0.24	
	デバイス傾比	0.01~0.09	0.56	0.52-0.60	(p0.01)
		0.30~0.09	0.27	0.25-0.30	
		0.60~	0.12	0.08-0.16	
CVカテ形 装着日 (85施設月)	在患数	1~2	0.30	0.27-0.34	(p0.01)
		25~8	0.23	0.20-0.26	
		50~	0.16	0.12-0.19	
	デバイス傾比	0.01~0.09	0.50	0.46-0.53	(p0.01)
		0.50~0.09	0.16	0.14-0.18	
		0.90~	0.03	0.00-0.07	

表6 リスク調整感染率の推計値（7日間データ）の偏差に関する二元配置分散分析

			調整均	95%範囲	
人呼嚙 関節炎 (85施設月)	在患数	1~2	0.31	0.24-0.39	(p0.01)
		25~8	0.31	0.27-0.35	
		50~	0.18	0.13-0.23	
	デバイス傾比	0.01~0.09	0.41	0.33-0.49	(p0.01)
		0.30~0.09	0.26	0.22-0.30	
		0.60~	0.13	0.08-0.18	
カテ形 関連感染 (50施設月)	在患数	1~2	0.16	0.10-0.22	(p0.3)
		25~8	0.18	0.13-0.23	
		50~	0.12	0.07-0.17	
	デバイス傾比	0.01~0.09	0.30	0.22-0.39	(p0.01)
		0.50~0.09	0.13	0.08-0.17	
		0.90~	0.04	0.00-0.08	

※ 感染発生施設・月のみを分析した

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① 須賀万智, 吉田勝美, 武澤純. 病院情報システムを活用した院内感染サーベイランスに関する検討. 環境感染 2007; 22: 197-202.
- ② Suka M, Yoshida K, Takezawa J. Epidemiological approach to nosocomial infection surveillance data: the Japanese Nosocomial Infection Surveillance System. Environ Health Prev Med 2007 (印刷中).
- ③ Suka M, Oeda S, Ichimura T, Yoshida K, Takezawa J. Neural networks applied to medical data for prediction of patient outcome. Current Trends in Intelligent Systems and Computer Engineering 2007 (印刷中).

### 2. 学会発表

- ① 須賀万智. 日本衛生学会奨励賞受賞講演－院内感染サーベイランスの疫学的評価に関する研究. 第77回日本衛生学会 (2007)
- ② Suka M, Oeda S, Ichimura T, Yoshida K, Takezawa J. Advantages and disadvantages of neural networks for predicting clinical outcomes. International MultiConference of Engineers and Computer Scientists (2007)
- ③ Suka M, Oeda S, Ichimura T, Yoshida K, Takezawa J. Application of multiple neural networks to time

sequence data: prediction of

nosocomial infection in intensive care unit patients. MEDINFO (2007)

- ④ 須賀万智, 吉田勝美, 武澤純. JANIS データを用いたリスク調整感染率に関する疫学的検討－サンプリングによる分母のデバイス装着人日の推計. 第23回環境感染学会 (2008)
- ⑤ 須賀万智, 吉田勝美, 武澤純. 集中治療室のリスク調整感染率に関する疫学的検討－サンプリングによる分母のデバイス装着人日の推計. 第78回日本衛生学会 (2008)

## G. 知的所有権の取得など

1. 特許許可
2. 実用新案登録
3. その他

薬剤耐性菌等に関する研究班  
バンコマイシン耐性等腸球菌(VRE)に関する研究

分担研究者 池 康嘉 群馬大学大学院医学系研究科 細菌感染制御学、  
同 薬剤耐性菌実験施設

### 研究要旨

1999 年日本で最初のバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) による院内感染例より分離された VRE を解析した。分離された VanB 型 *E. faecalis* 菌 19 株のうち PFGE で 18 株は同一株であった。18 株の *vanB* 遺伝子は接合伝達性プラスミド上に、1 株は染色体上に存在した。18 株の中で代表株 NKH16 を選び詳しく解析した。

*E. faecalis* NKH16 (VanB) は、プラスミド MG220 (106kbp) と MG2201 (70kbp) を保持していた。pMG220 は VanB2 (Tn1549, 33, 805bp) をコードし pMG2201 はエリスロマイシン耐性 (Em) と  $\beta$ -hemolysin/bacteriocin (cytolysin) をコードしていた。それぞれのプラスミドは液体培地中で高頻度 (供与菌当たり  $\sim 10^4$ ) で *E. faecalis* 受容菌に接合伝達するフェロモン反応性プラスミドであった。

pMG2200 は新型バクテリオシン Bac41 もコードしていた。pMG2200 は各種の接合伝達性プラスミドの各種の遺伝子から成るモザイク様巨大プラスミドで、VanB 遺伝子を広げる役割をすることが解った。

### 研究協力者：

富田治芳<sup>1)</sup>、藤本修平<sup>1)</sup>、野村隆浩<sup>1)</sup>、谷本弘一<sup>2)</sup>、井上貴子<sup>1)</sup>、李耘<sup>1)</sup>、荒川宜親<sup>3)</sup>  
群馬大学大学院医学系研究科細菌感染制御学<sup>1)</sup>、  
同 薬剤耐性菌実験施設<sup>2)</sup>、国立感染症研究所細菌第二部<sup>3)</sup>

### A. 研究目的

平成 14 年度に行った VRE の分離状況の全国調査において VanA 型、VanB 型、および VanD 型 VRE は、1,778 医療関連施設のうち 31 施設 (1.7%) から分離された。このうち VanA 型は 14 施設、VanB 型は 15 施設、VanD 型は 1 施設から分離された。VRE が分離された全症例数は 128 例である。VanA 型は 71 例 (55%)、VanB 型は 56 例 (44%)、VanD 型は 1 例 (1%) から分離された。VRE が分離された 31 施設のうち、19 施設から合計 81 株の VRE が分与された。19 施設の中で、9 施設の 19 人から合計 23 株の VanA 型 VRE が分離されていた。残りの 57 株は VanB 型、1 株は VanD 型である。

欧米では VanA 型 VRE の分離頻度が高いことが特徴であるが、日本においては VanB 型 VRE が比

較的によく分離された。今回はこれらの VanB 型 VRE の中で日本で初めての院内感染原因菌となった VanB 型 VRE について解析した。

### B. 研究方法

#### 材料および方法

用いた菌株は表 1 に示した。

培地：VRE の培地は Todd Hewitt broth (THB) (Difco)、および Todd Hewitt broth agar を用いた。薬剤感受性は Mueller Hinton broth 及びその寒天培地を用い、寒天平板希釈法を用い NCCLS 標準法に従った。

PCR 方法、Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)、Plasmid DNA の分離と解析、Agarose gel electrophoresis 等は概報の方法を用いた。

VRE の型別決定は、PCR を用いて行った。VCM と TEIC の MIC は平板希釈法を用いた。

プラスミドの分離、DNA 塩基配列の決定、プラスミドの接合伝達、プラスミドのフェロモン反応性、Southern hybridization, Pulsed Field Gel Electrophoresis 等は前報に従った。

## C. 研究結果

### VRE の形質

長野県の病院で発生した VRE による院内感染のうち 19 症例 19 株の VRE を解析した。19 株はすべて *E. faecalis* 菌であった。各種抗菌剤に対する感受性を表 1 に示す。高度バンコマイシン耐性、テイコプラニン感受性で、その他 EM, GM, KM, TC 等各種の抗菌剤に高度耐性の多剤耐性菌であった (表 2)。

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) による染色体 DNA Sma I 断片の解析で、19 株のうち 1 株を除いて全て同一の菌であった (図 1)。

### 薬剤耐性の接合伝達

Van, Teic, Em, Gm, Km, Tc それぞれの薬剤耐性の、受容菌 *E. faecalis* FA2-2 への接合伝達を調べた。PFGE で同一菌とされた 18 株の Van 耐性が液体培地中での接合伝達で高頻度 (供与菌当たり  $10^{-7} \sim 10^{-3}$  頻度) に受容菌に接合伝達した (表 2)。また、12 株の Em 耐性が液体培地中で接合伝達した (供与菌当たり  $10^{-4} \sim 10^{-2}$  頻度)。菌株の異なるその他の 1 株の Van 耐性は接合伝達しなかったが、Em 耐性は  $\sim 10^{-3}$  の頻度で受容菌に接合伝達した。これらの結果から、VRE の Van 耐性と Em 耐性が *E. faecalis* のフェロモン反応性プラスミド上にコードされていることが推測された。

### バクテリオシン生産

VRE のバクテリオシン生産を調べた。19 株すべてバクテリオシン活性を示した。14 株は Cytolysin (HIly/Bac) 活性を示した。これは PCR により *cyl* 遺伝子を獲得していることが解った。14 株の Cytolysin 生産株のうち 12 株は、Cytolysin が Em 耐性と関連し、液体培地中での接合により受容菌に接合伝達した。この 12 株の接合伝達株は、プラスミドのアガロースゲルによる解析により同一のプラスミドを保持していて、また、これらのプラスミドは *E. faecalis* のフェロモン反応性 Cytolysin プラスミド pAD1 (60kb)

と特異的 probe と相補結合したことにより、pAD1 型プラスミドであることを示した。

すべての VRE 耐性 *E. faecalis* にもみバクテリオシン活性を示した。このバクテリオシン活性は、バンコマイシン耐性と関連し、Van 耐性接合伝達株はすべてこのバクテリオシン活性を保持していた。このことは、バンコマイシン耐性と *E. faecalis* のバクテリオシンが同一の接合伝達プラスミドにコードされていることを示している。

### VRE のプラスミド解析

バクテリオシン活性が受容菌に接合伝達する株の中から代表株 *E. faecalis* NKH16 を選びプラスミドを解析した。NKH16 の、FA2-2 への Van 耐性接合伝達株はプラスミド pMG2200 を保持していた。pMG2200 は Van 耐性とバクテリオシン活性を宿主菌に賦与した。このバクテリオシン活性は *E. faecalis* のみに活性を示した。*E. faecalis* OG1S (pMG2200) はすでに報告されているバクテリオシン bacteriocin41 (Bac41) 活性に耐性 (溶菌しない) ことから、Bac41 と同一のバクテリオシンであることが解った。

NKH16 の Em 耐性接合伝達株は 65.7kb のプラスミド (pMG2201) を保持していた。pMG2201 (65.7kb) は Em 耐性と Cytolysin (HIly/Bac) をコードしていた。pMG2200 と pMG2201 はそれぞれ *E. faecalis* のフェロモン反応性プラスミドに対するフェロモン cCF10, cAD1 に反応するプラスミドであった (図 2)。

### pMG2200 の DNA 塩基配列

pMG2200 は分子サイズ 106,527bp (106.5kbp) である (Fig. 2200)。コンピュータ解析からプラスミドにコードされる ORFs は 114 個で、それらを表 3 に示した。pMG2200 は VanB 型接合伝達性トランスポゾン (Tn1549 型) (33,812bp) を含み、VanB 型の中で VanB2 型であることが解った。また、接合伝達に必要な *oriT* 部位を決定していた (図 3、4、5) (表 3)。

## D. 考察

これまで報告された VanB 型 VRE の vanB 型遺伝子は約 30kbp の比較的大きい接合伝達性トランスポゾン Tn1549 型、又は Tn5382 型上に存在する。しかしながら、これまで VanB 型の接合伝達性トランスポゾンの全構造を解析した報告はない。一般に Tn1549 型には VanB が、Tn5382 型には VanB2 遺伝子がコードされている。

今回の Tn1549 (VanB2) の全構造解析は初めての報告である。院内感染原因菌となった *E. faecalis* は、Van/バクテリオシンプラスミド、Em/Cytolysin プラスミドをそれぞれ含んでいた。これらのバクテリオシン、Cytolysin はこれらの菌が細菌叢でコロナイゼーションするために重要な物質である。この VRE が Van 耐性と共に細菌叢に定着し拡散するための形質を保持していることを示している。

#### E. 結論

日本で最初の VRE による院内感染例から分離された 19 株の *E. faecalis* (VanB2) VRE を解析した。18 株は同一株であった。代表株として NKH16 を選び解析した。NKH16 はプラスミド pMG220 (106kbp, VanB2, Bacteriocin(Bac))、pMG2201 (70kbp, Em<sup>γ</sup>, Cytolysin(HIy/BAC)) をコードしていた。これらはフェロモン反応性プラスミドで高頻度に受容菌に接合伝達した。

#### F. 健康危険情報

腸球菌は日和見感染菌で健常者に感染症を起こすことは無い。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Zheng B, Tomita H, Xiao YH, Wang S, Li Y, **Ike Y**. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococcus faecium isolates from mainland China. *J Clin Microbiol*, 45(9):2813-8,(2007)
2. Zheng B, Tomita H, Xiao YH, **Ike Y**. The first molecular analysis of clinical isolates of VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains in Mainland China. *Letters in Applied Microbiology*, 45:307-312, (2007)

3. Tomita H, Kamei E, **Ike Y**. Cloning and genetic analyses of the bacteriocin 41 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYII4: a novel bacteriocin complemented by two extracellular components (lysin and activator). *J Bacteriol*. 190(6):2075-85,(2008)

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

なし

##### 2. 実用新案登録、その他

なし

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1.

PFGE of *Sma*I-digested chromosomal DNAs. Lane 1 to 19, chromosomal DNAs from strains NKH1, NKH2, NKH3, NKH4, NKH5, NKH6, NKH7, NKH8, NKH9, NKH10, NKH11, NKH12, NKH13, NKH14, NKH15, NKH16, NKH17, NKH18, NKH19, respectively; lane 20, molecular mass marker (Midrange Molecular Marker; New England Biolabs)

### Figure 2.

Agarose gel electrophoresis of restriction endonuclease-digested DNA of pMG2200 and pMG2201 and Southern hybridization with the specific genes of pheromone-responsive plasmids. Agarose gel electrophoresis of *Eco*RI-digested plasmid DNA (A) and the Southern hybridization with pMG326 (Shiojima et al 1997) (B). Lanes: 1, *Hind*III-digested lambda DNA; 2, pMG2200; 3, pMG2201; 4, pAD1.

### Figure 3.

Genetic map of pMG2200. The open arrows and its direction show the open reading frames (ORFs) and the transcription. Each color indicates the significant homology with reported plasmid or mobile element. The representative homologous genes are shown on the ORFs (Table 2).

### Figure 4.

Nucleotide sequences of the *oriT* region of pMG2200 plasmid. The 332-base pairs non-coding DNA region between ORF41 and ORF42 is shown. The horizontal arrows under the sequences indicated the direct repeats "TGCTA" (DR-1 to DR-14) and inverted repeats (IR-1 and IR-2) in the *oriT* region. The names and locations of oligonucleotide primers used for the analysis of *oriT* region are shown on the sequence with the angle arrows. The complementary sequence corresponding 3'-GTCGAA-5' show the possible nick sites. The italicized characters in the 178 bp segment mapped between -43,733 bp and -43,910 bp indicate the identical sequences found in pAM $\alpha$ 1 plasmid (from 3618 to 3795 bp position on the plasmid).

### Figure 5.

Comparison of the N-terminal region of the deduced ORF44 protein of pMG2200 with the possible relaxase found in sequence databases. The bold characters indicated the conserved amino acid residues in each protein. The asterisks on the sequences show the key residues, Tyr, Ser, and His<sub>3</sub> (3His) in motifs I, II, and III, respectively. There are two motif III candidates (Ia and Ib) in the most of the proteins.

Fig. 2

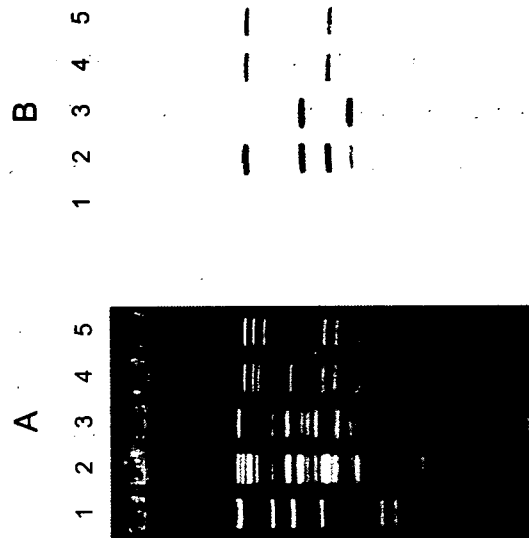


Fig. 1

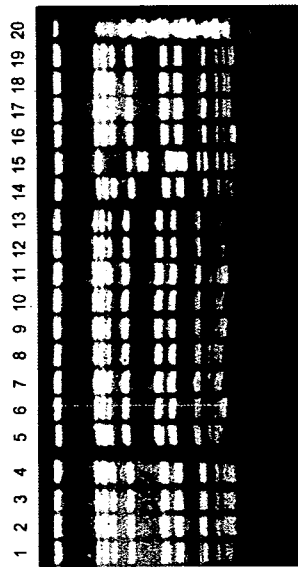








Table 2. VanB-type vancomycin-resistant first outbreak strains in a Japanese hospital

Strain	Date of isolation (Y/M/D)	Source	Diagnosis/Underlying disease	Species	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>										Transfer frequencies <sup>b</sup> (per donor cell)		Bacteriocin production <sup>c</sup>		Plasmid contents <sup>d</sup>	
					VCM	TEIC	ABPC	CPFX	EM	GM	KM	SM	CP	TC	vancomycin resistance broth mating filter mating (18hr)	erythromycin resistance broth mating filter mating (4hr)	Bac	Cytolysin (Hy/Bac)		pMG2200 -like
NKH1	1999/7/9	Sputum	Urinary tract infection	<i>E. faecalis</i>	128	0.25	4	64	0.25	>1024	>1024	32	8	64	$10^{-7}$	$<10^{-7}$	P	P	P	N
NKH2	1999/7/19	Urine	Cerebral infarction	<i>E. faecalis</i>	256	0.25	4	64	>1024	>1024	>1024	32	8	64	$10^{-4}$	$10^{-2}$	P	P	P	P
NKH3	1999/7/31	Rectal swab	Diarrhea	<i>E. faecalis</i>	64	0.25	4	64	>1024	>1024	>1024	32	8	32	$10^{-4}$	$10^{-2}$	P	P	P	P
NKH4	1999/7/27	Urine	Cerebral infarction	<i>E. faecalis</i>	64	0.25	4	64	>1024	>1024	>1024	32	8	32	$10^{-3}$	$10^{-2}$	P	P	P	P
NKH5	1999/8/1	Rectal swab	Gallbladder cancer	<i>E. faecalis</i>	64	0.25	4	64	0.125	>1024	>1024	32	4	64	$<10^{-7}$	$<10^{-7}$	P	N	P	N
NKH6	1999/8/1	Rectal swab	Esophagus cancer	<i>E. faecalis</i>	64	0.25	4	64	>1024	>1024	>1024	32	8	64	$10^{-3}$	$10^{-2}$	P	P	P	P
NKH7	1999/8/1	Rectal swab	Parkinson's disease	<i>E. faecalis</i>	64	0.25	8	64	>1024	>1024	>1024	32	4	64	$<10^{-7}$	$<10^{-7}$	P	N	P	N
NKH8	1999/8/1	Rectal swab	Pneumonia	<i>E. faecalis</i>	256	0.25	8	64	0.125	>1024	>1024	32	8	64	$10^{-3}$	$10^{-2}$	P	P	P	P
NKH9	1999/8/1	Rectal swab	Melioid-Weiss's syndrome	<i>E. faecalis</i>	256	0.25	8	64	>1024	>1024	>1024	32	8	64	$10^{-3}$	$10^{-2}$	P	P	P	P
NKH10	1999/8/1	Rectal swab	Bedsores	<i>E. faecalis</i>	256	0.25	4	64	>1024	>1024	>1024	32	8	64	$10^{-3}$	$10^{-2}$	P	P	P	P
NKH11	1999/8/1	Rectal swab	Ileocecal abscess	<i>E. faecalis</i>	64	0.25	4	64	0.125	>1024	>1024	32	8	64	$10^{-3}$	$10^{-2}$	P	N	P	N
NKH12	1999/8/1	Rectal swab	Lung cancer	<i>E. faecalis</i>	256	0.25	4	64	>1024	>1024	>1024	32	8	64	$10^{-3}$	$10^{-2}$	P	P	P	P
NKH13	1999/8/1	Rectal swab	Cerebral infarction	<i>E. faecalis</i>	256	0.125	8	64	>1024	>1024	>1024	32	8	64	$10^{-3}$	$10^{-2}$	P	P	P	P
NKH14	1999/8/1	Sputum	Pneumonia	<i>E. faecalis</i>	256	0.25	8	64	>1024	>1024	>1024	32	8	64	$10^{-4}$	$10^{-2}$	P	P	P	P
NKH15	1999/8/1	Rectal swab	Hypoxic encephalopathy	<i>E. faecalis</i>	8	0.25	1	2	>1024	2	>1024	>1024	64	64	$<10^{-7}$	$10^{-3}$	P	P	N <sup>e</sup>	N <sup>e</sup>
NKH16	1999/8/1	Rectal swab	Hepatic cancer	<i>E. faecalis</i>	64	0.25	4	64	>1024	>1024	>1024	32	8	32	$10^{-3}$	$10^{-2}$	P	P	P	P
NKH17	1999/8/1	Rectal swab	Cholecholelithiasis	<i>E. faecalis</i>	64	0.25	8	64	0.125	>1024	>1024	32	4	32	$<10^{-7}$	$<10^{-7}$	P	N	P	N
NKH18	1999/8/1	Rectal swab	Cholecystitis	<i>E. faecalis</i>	32	0.125	8	64	0.125	>1024	>1024	32	4	32	$10^{-3}$	$<10^{-7}$	P	N	P	N
NKH19	1999/8/1	Rectal swab	Dementia	<i>E. faecalis</i>	64	<0.125	8	64	>1024	>1024	>1024	32	8	32	$10^{-3}$	$10^{-2}$	P	P	P	P

<sup>a</sup> Abbreviations: VCM: vancomycin; TEIC: teicoplanin; ABPC: ampicillin; CPFX: ciprofloxacin; EM: erythromycin; GM: gentamicin; KM: kanamycin; SM: streptomycin; CP: chloramphenicol; TC: tetracycline

<sup>b</sup> The wild strains and *E. faecalis* FA2-2 were used as the donor and a recipient, respectively (Clewell et al 1982)

<sup>c</sup> Indicator strains used for bacteriocin activity: *Staphylococcus aureus* FDA209P, *E. faecalis* FA2-2, OG15, *E. faecium* BM4105RF, *E. nissae* ATCC9790. P: positive, N: negative.

<sup>d</sup> The activity was weak and trait of cytolysin was not transferable.

<sup>e</sup> pMG2200-like (108.5-hb, vanB2, Bac44, cCF10-responsive), pMG2201-like (80-hb, erm, Oyl(Hy/Bac), cAD1-responsive). P: positive, N: negative.

<sup>f</sup> NKH13 contained a multiple drug resistant pheromone plasmid (Bac, Em, Km, CP, TC)

Table 3. Open Reading Frames (ORFs) identified in pMG2200

ORF	Direction	5'	3'	Consensus/Protein(s)	Homology	Identity (%)	Similarity (%)	Organism or plasmid	Function
1	CW	9	2012	2004/667	PCP50	23	44	<i>Clostridium perfringens</i> pCP13	transmembrane protein, ATPase
2	CW	2019	2399	3811/26	PCP49	25	43	<i>Clostridium perfringens</i> pCP13	
3	CW	2636	4351	1716/571	PCP48/46	30	49	<i>Clostridium perfringens</i> pCP13	TrnC-like transmembrane bound ATPase
4	CW	4404	5088	1077/359	PCP46	30	53	<i>Clostridium perfringens</i> pCP13	
5	CW	5294	6445	1149/303	LacC-like	28	45	<i>Bacillus thuringiensis</i>	
6	CW	6442	7524	1063/60	ORF14/Tn3/δ <sub>1</sub> /NLP/PP60	48	66	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn3/δ	
7	CW	7579	7821	243/90	hypothetical protein	42	58	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
8	CW	7822	8148	3271/08	PenK-like protein	47	68	<i>Enterococcus faecalis</i>	
9	CW	8240	8579	341/113					toxin of the CtpA-ChpR toxin-antitoxin system, endoribonuclease interrupted by Tn1549-like insertion at 1142b amino acid of the original OR
10	CW	8831	10030	1200/399	ORF13	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
11	CW	10052	10264	213/70	ORF14	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
12	CW	10339	10815	477/158	ORF15	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
13	CW	10812	12620	1806/564	Trk-like protein	91	96	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> MG21/2	TrnG/TrnD/VcrD4 family involved in type IV secretion
14	CW	13004	13867	864/287	ORF17	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
15	CW	13898	14440	543/180	ORF18, MetL-like protein	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	methyletransferase
16	CW	14454	14876	423/140	ORF19	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
17	CW	14886	17285	2408/799	ORF20, TrnE-like protein	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	TrnE
18	CW	17237	19228	1950/363	ORF21	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	VirB4
19	CW	19251	19502	252/93	ORF22	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
20	CW	19492	20721	1230/409	ORF23	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
21	CW	20718	22799	2062/693	ORF24	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
22	CW	22948	26968	3921/1306	ORF25	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	DNA topoisomerase III-like protein
23	CW	26969	27813	943/14	ORF26	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
24	CW	28746	28320	447/148	ORF27	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
25	CW	30435	29107	1329/442	ORF28, Relaxase	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
26	CW	30725	30396	330/109	ORF29	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
27	CW	31354	30983	372/123	ORF30	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
28	CW	32627	33286	660/219	VanR <sub>9a</sub>	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
29	CW	33289	34632	1344/447	VanS <sub>9</sub>	99(2)	99	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
30	CW	34803	35609	807/268	VanY <sub>9</sub>	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
31	CW	35627	36454	829/275	VanW <sub>9a</sub>	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
32	CW	36451	37422	972/323	VanH <sub>9a</sub>	100/94(18)	100/97	<i>Enterococcus faecalis</i> II <sub>9</sub> , <i>faecalis</i> Tn1549	
33	CW	37415	38443	1023/342	VanB <sub>2</sub>	100/99(2)	100/99	<i>Enterococcus faecalis</i> II <sub>9</sub> , <i>faecalis</i> Tn1549	
34	CW	38849	39057	609/202	VanC <sub>9a</sub>	99(2)/95(9)	99/91	<i>Enterococcus faecalis</i> II <sub>9</sub> , <i>faecalis</i> Tn1549	
35	CW	39645	40076	432/143	ORF7	100/99(1)	100/100	<i>Enterococcus faecalis</i> II <sub>9</sub> , <i>faecalis</i> Tn1549	
36	CW	40083	40316	234/87	ORF8	100/85(11)	100/88	<i>Enterococcus faecalis</i> II <sub>9</sub> , <i>faecalis</i> Tn1549	
37	CW	40743	40960	201/66	Xis-Tn1549	100/98(1)	100/100	<i>Enterococcus faecalis</i> II <sub>9</sub> , <i>faecalis</i> Tn1549	
38	CW	41024	42217	1194/397	Int-Tn1549	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> Tn1549	
39	CW	42392	42492	101/32					
40	CW	42522	42695	174/57					
41	CW	42702	43643	942/313	PCP43	22	44	<i>Clostridium perfringens</i> pCP13	
42	CW	44015	44296	282/93	PCP41	30	50	<i>Clostridium perfringens</i> pCP13	
43	CW	44289	44681	393/130	hypothetical protein	26	47	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	putative transcriptional regulator, AraC family
44	CW	44674	46734	2261/686	PCT39	32	52	<i>Clostridium perfringens</i> pCP13	putative relaxase(nuclease)
45	CW	46811	48469	1659/532					
46	CCW	49999	48656	1341/447	PcdQ(EF B0033)	86	93	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10(pTEF2)	
47	CCW	50772	49999	793/258	PcdK(EF B0034)	78	88	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10(pTEF2)	phage related
48	CCW	51447	50916	553/182	PcdL(EF B0035)	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10(pTEF2)	
49	CCW	51564	51491	174/57	PcdM(EF B0036)	98	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10(pTEF2)	
50	CCW	51852	51667	186/61	PcdN(EF B0037)	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10(pTEF2)	
51	CW	52148	52348	201/66	PcdR(EF B0040)	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10(pTEF2)	
52	CCW	52680	52450	231/76	PcdQ(EF B0041)	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10(pTEF2)	
53	CW	52837	53229	393/130	PcdS(EF B0042)	98	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10(pTEF2)	
54	CW	53295	53747	453/150	PcdT(EF B0043)	98	98	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10(pTEF2)	phage-related single strand binding protein
55	CW	53761	53913	153/50	EF B0044	88	92	<i>Enterococcus faecalis</i> pTEF2	
56	CW	53925	54515	591/196	PcdT	81	88	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10	thromboxane precursor
57	CW	54521	54841	330/109	PcdU(EF B0046)	95	97	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10(pTEF2)	
58	CW	54949	54841	346/91					
59	CW	55248	55430	183/60	ORF5	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pY114	
60	CW	55625	56341	717/238	ORF6/EF1001	100/103	100/101	<i>Enterococcus faecalis</i> pY114/V583	lipoprotein
61	CW	56479	58266	1788/595	BacL1/EF2093	99(1)/45	99/60	<i>Enterococcus faecalis</i> pY114/V583	backbone 4U/endothelin
62	CW	58452	59087	636/211	BacL2	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pY114	probactinon secretion
63	CW	59110	59541	432/133	ORF9/Holin	100/42	100/68	<i>Enterococcus faecalis</i> pY114/Streptococcus phage SnpP	putative e holin
64	CW	59544	60071	528/175	ORF10/EF0637	97(6)/27	99/45	<i>Enterococcus faecalis</i> pY114/V583	
65	CW	60114	62234	2181/726	BacA/VtG	100/40	100/65	<i>Enterococcus faecalis</i> pY114/ <i>Bacillus amyloliquifaciens</i> FEZ42	activator-peptidoglycan binding domain
66	CW	62402	62944	543/180	BacD	99(1)	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pY114	immunity
67	CW	63011	63586	576/191	ORF11	98(4)		<i>Enterococcus faecalis</i> pY114	
68	CW	63729	64061	333/110	EF B0057/ORF14	100/98(2)	100/9	<i>Enterococcus faecalis</i> pTEF2/pY114	
69	CCW	65554	64245	111/74/39	Trp	75	85	<i>Lactococcus lactis</i> Tn3721	Transposase
70	CW	65797	65997	141/46					
71	CW	66024	66894	871/276	ORF8/ORF130	27/45	46/68	<i>Lactobacillus lactis</i> pES21 L. sobri	
72	CW	66917	67126	210/69					
73	CW	68042	69464	423/140	Ep97D	58	80	<i>Enterococcus faecalis</i>	enterocin EJ97 plasmid, C&D stress protein
74	CW	68628	69194	567/188	EF0053	65	82	<i>Enterococcus faecalis</i>	
75	CW	69211	69408	190/65	EF0054	61	77	<i>Enterococcus faecalis</i>	
76	CW	69435	69971	537/178	Glz24	88	95	<i>Enterococcus faecalis</i> V583	stress response
77	CCW	71158	70100	1059/352	EngDRAFT 2618	45	69	<i>Stygosarcoma vibriosum</i>	EzrA, S1epatin ring formation regulator
78	CCW	71425	71183	243/80	EP2708	72	87	<i>Enterococcus faecalis</i> V583	putative membrane protein
79	CW	71630	71872	243/80					
80	CW	71958	72170	213/70	Trp	53	71	<i>Lactococcus lactis</i>	Transposase
81	CW	72346	72456	111/36					
82	CW	72694	73314	621/206	PcdY	94	97	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10'	DNA invertase
83	CW	73331	73618	288/95	PcdZ	90	97	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10	
84	CW	73612	73716	123/40	UvrC-N	97	98	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10	
85	CCW	76852	73880	2973/990	EP0008	99	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pAM073	Transposase, Tn3 family
86	CW	76983	77588	606/201	EP0007	63	78	<i>Enterococcus faecalis</i> pAM073	recombinase
87	CW	77651	77761	111/36	UvrC-C	97	98	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10	
88	CW	77836	78045	210/69	UvrB	92	91	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10	
89	CW	78057	78359	303/100	UvrA	94	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10	UV resistance
90	CW	78786	80114	1329/442	UvrA	99	99	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10	
91	CW	80111	80461	351/115	UvrE	95	98	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10	
92	CW	80418	80630	213/70	UvrF	97	98	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10	
93	CW	81062	81358	294/99	PrgN	98	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pTEF2(pCF10)	replication control
94	CW	81612	82394	783/260	PwA(EF B0064)	99	99	<i>Enterococcus faecalis</i> pTEF2	plasmid partitioning
95	CW	82387	82743	354/118	EF B0065	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pTEF2	
96	CW	83003	84010	1008/335	RlpA(EF B0001)/PrgW	97/64	98/77	<i>Enterococcus faecalis</i> pTEF2/pCF10	plasmid replication
97	CW	84169	85806	1638/545	PrgZ	99	99	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10	pheromone uptake
98	CW	85817	86971	1153/394	PrgY	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10	pheromone shut down
99	CCW	87957	87004	954/319	PrgX	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10	cCF10 pheromone receptor, negative regulator(DNA binding protein)
100	CW	88156	88237	72/23	PrgQ	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10	cCF10 precursor, cCF10-inhibitor
101	CW	88726	89082	357/118	TrnE1	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pAD1(pTEF1)	positive regulator for conjugation
102	CW	89664	89969	306/100	OrfY/PrgT/EE A0053	97	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pAD1(pCF10)pTEF1	
103	CW	89990	92655	2678/891	Sea1(EF A0052)	89	94	<i>Enterococcus faecalis</i> pAD1(pTEF1)	Surface exclusion protein
104	CW	92676	92963	279/92	EP2120	66	86	<i>Enterococcus faecalis</i> V583	
105	CW	93413	93748	336/111	Orf1(EF A0048)	100	100	<i>Enterococcus faecalis</i> pAD1(pTEF1)	
106	CW	94055	97981	3921/1308	PrgB(EF B0011)/Aam1	95/82	97/87	<i>Enterococcus faecalis</i> pCF10(pTEF2)pAD1	aggregation substance
107	CW	98078	98398	321/106	Orf3/PrgU	98/97	99/99	<i>Enterococcus faecalis</i> pAD1(pCF10)	
108	CW	98614	99444	831/276	Pd53/P4113	81/95	95/87	<i>Enterococcus faecalis</i> pPD1	
109	CW	99690	100025	336/111	Pd96	56	71	<i>Enterococcus faecalis</i> pPD1	
110	CW	100033	101160	1128/375	Pd377	85	89	<i>Enterococcus faecalis</i> pPD1	
111	CW	101325	101468	144/47					
112	CW	101688	103247	1569/519	Pd78	88	91	<i>Enterococcus faecalis</i> pPD1	pheromone-induced surface protein
113	CW	103417	103950	534/177	RumAococcus torques	20	45	<i>Bacillus subtilis</i> p19	permease
114	CW	104015	19	2532/843	TrnGV rD4	25	47		coupling protein

薬剤耐性菌等に関する研究班

VRE の地域における感染制御—*E. gallinarum*/*E. casseliflavus*+*vanA/B* の解析

分担研究者 京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学 一山 智

研究要旨

京都市内の一施設における VRE の大規模アウトブレイクをきっかけとして、京都大学他 3 施設と行政が対策チームを結成し、2005 年より地域での感染対策を実践している。しかし、2006 年度調査で検出施設数の増加が明らかとなり、2007 年度当初よりアクティブサーベイランスの実施や保菌情報の共有などの対策の強化をはかった結果、当初流行の主体であった *vanA/E. faecium* (EfmA) の検出施設/株数は減少したが、*vanB/E. faecium* が新たに増加傾向を示した。検出施設数は減少傾向であり地域での感染予防策が一定の効果を示したものと考えられたが、さらに多くの施設による感染予防策の周知徹底が必要と考えられた。また、これまで報告例が稀であり、院内感染との関連性が乏しいと考えられてきた *vanA/E. gallinarum* (EgA) が 6 施設から検出された。PFGE 解析では菌株の類似性が示唆され、Paghogenic Island (PAI) Tn1546 の解析では、当初流行した EfmA からのプラスミド伝播が示唆された。疫学調査結果より、EgA の流行については施設内での EfmA からのプラスミド伝播の他に、施設間伝播も発生しているものと考えられた。

研究協力者：

飯沼由嗣（京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学）

A. 研究目的

京都市内の一施設における VRE の大規模アウトブレイクをきっかけとして、京都府、京都市と京都大学、京都府立大学、京都市立病院を中心とした対策チームを結成し、①年 1 回の匿名の全病院・介護施設を対象とした便 VRE スクリーニング、②臨床検体で提出された便 VRE スクリーニング、③アウトブレイク施設への支援を 2005 年から実施している。①のスクリーニング調査では、VRE 検出病院数は 2005 年の 1 施設 (0.95%) から 2006 年の 10 施設 (10.3%) へ激増しており、京都府内における VRE の伝播蔓延が疑われた。このため、2007 年度よりさらに対策を強化し、④ハイリスク患者（転入院患者、免疫不全患者等）に対する積極的な保菌調査 (Active Surveillance Culture, ASC)、⑤保菌歴の情報伝達を軸とした対策も加えて実施している。

この調査の中で、報告例が稀であり、院内感染と関連性が乏しいと考えられてきた *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*+*vanA/B* が複数の施設から検出されており、施設内伝播および施設間伝播が疑われ、その細菌学的あるいは分子疫学的解析を実施し、発生及び伝播の仕組みを解析する。

B. 研究方法

対象：京都府下で実施中の、地域での VRE 対策の一環として行った保菌調査において検出された、*E. gallinarum*/*E. casseliflavus*+*vanA/B* を対象とする。

方法：最も検出数の多かった、*vanA/E. gallinarum* について解析を行った。解析方法は、① Paghogenic Island (PAI) Tn1546 の解析 (PCR-RFLP (Tn1546 全長、*vanRSHAX* 領域) および PCR fragment 解析 (10 領域))、② PFGE 解析、③ Plasmid 解析、④ 疫学調査である。

C. 研究結果

1. 2007 年度京都府下全病院・介護施設を対象と

## した便 VRE スクリーニング結果

2007 年度当初より、対策が更に強化された結果、2006 年度に増加した、vanA/*E. faecium* の検出施設/株数は 6/11 から 2/4 へと減少した。しかし、2006 年度には 2/3 であった vanB/*E. faecium* が 4/17 と増加した。一方 2006 年度介護施設 2 施設 (3.2%) から検出されていたが、2007 年度は 0 であった。合計の検出施設数 (病院のみ) は 10 施設から 8 施設 (9.0%) と減少に転じた。また、転入院時のスクリーニングで発見された事例も 3 件あり、強化された VRE 対策が有効であったものと考えられた。

## 2. vanA/*E. gallinarum* の解析

京都地区で検出される VRE のうち、*E. gallinarum*/*E. casseliflavus*+vanA/B が複数の施設で検出されている。特に、vanA/*E. gallinarum* (EgA) はこれまでに、6 施設から検出されている。

## 1) 疫学調査

EgA が検出されていた 6 施設のうち 5 施設で vanA/*E. faecium* (EfmA) も検出されていた。検出の時系列では、EfmA 検出後に EgA が検出された施設が 3 施設、逆が 2 施設、EfmA が検出されていない施設が 1 施設となった。この結果より、施設内での EfmA からのプラスミド伝播のみならず、EgA の施設間伝搬の可能性が示唆された。

## 2) PFGE 解析

5 施設から検出された EgA はバンドパターンがほぼ一致していたが、1 施設のみ明らかに異なるバンドパターンを示し、施設間伝搬のみが複数施設からの検出の原因ではないと考えられた。

## 3) Pathogenic Island (PAI) Tn1546 の解析 (表)

EfmA および EgA が検出された 5 施設について、PAI 解析の比較を行った。

まず、PCR-RFLP 解析では、Tn1546 全長、vanRSHAX 領域ともにすべての施設の EfmA および

表 Pathogenic island (PAI) Tn1546 解析

施設	菌種	van遺伝子	PCR-RFLP		Overlapping fragments										
			Tn1546	vanRSHAX	P1P2	P3P4	P5P6	P5P10	P9P10	P11P12	P13P14	P15P16	P17P18	P19P1	
			Clal	Ddel	1309 <sup>*2</sup>	1132	1299	2700	1225	1679	1793	1965	1584	428	
A	<i>E. faecium</i>	vanA	Q	p	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. gallinarum</i>	vanA, vanC1	Q	p	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	<i>E. faecium</i>	vanA	Q	p	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. gallinarum</i>	vanA, vanC1	Q	p	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C	<i>E. faecium</i>	vanA	Q	p	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. gallinarum</i>	vanA, vanC1	Q	p	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	<i>E. faecium</i>	vanA	Q	p	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. gallinarum</i>	vanA, vanC1	Q	p	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	<i>E. faecium</i>	vanA	Q	p	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. gallinarum</i>	vanA, vanC1	Q	p	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control 1	<i>E. faecium</i>	vanA	*1	q	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control 2	<i>E. faecium</i>	vanA	*1	p	-	-	-	-	+	+	+	2500	1000	+	+
Control 3	<i>E. faecalis</i>	vanA	P	p	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control 4	<i>E. faecium</i>	vanA	*1	q	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

P7P8については、非特異的バンドが多く出るためP5P10で代用した。

\*1: PCR産物が得られなかったもの。

\*2: Tn1546のシーケンスから予測されたPCR産物の大きさ (bp)。

\*3: +; 予測されたものと同じ大きさのPCR産物が得られたもの。 -; PCR産物が得られなかったもの。

数字は予測と異なるサイズのPCR産物が得られた場合、およその大きさ。

EgA で一致した結果となった。また、PCR fragment 解析においても、全て一致した結果となった。これに対して、他地域において検出された EfmA の解析では、Tn1546 全長が検出されず (fragment の一部脱落を示唆)、また PCR fragment 解析においても一致しなかった。このことより、京都地区で検出された EgA は、それ以前に流行した VRE である EfmA からの耐性遺伝子の獲得が強く示唆された。

#### D. 考察

VRE は感染伝播力が強く、また便中に保菌状態で長期間存在しうるため、一施設のアウトブレイクが、地域での拡散につながる可能性がある。実際、京都地区で 2004 年末に発生した VRE のアウトブレイクは、地域での感染伝播を引き起こした可能性が高い。

地域での感染伝播を防ぐためには、地域ぐるみの感染予防策の徹底が必要である。このため、アウトブレイク発生の翌年である 2005 年より、京大病院他 3 施設と行政が地域での対策に取り組んできた。

しかし、当初の対応のみでは、地域での感染コントロールは不十分と考え、2007 年度当初よりアクティブサーベイランスの実施や保菌情報の共有などの対策の強化をはかった。その結果、当初流行の主体であった vanA/E. faecium (EfmA) の検出施設/株数は減少したが、vanB/E. faecium (EfmB) が新たに増加傾向を示した。検出施設数は減少傾向であり、転入院時のスクリーニングで発見された事例も 3 件みられ、地域での感染予防策が一定の効果を示しているものと考えられた。一方、新たな耐性菌である EfmB や EgA の感染拡大が認められた。地域での感染予防策はできるだけ多くの施設が感染予防策の周知徹底を行うことによって実現可能であり、今後さらに多くの施設による地域での感染対策の協力体制の確立が必要と考えられた。

また、これまで院内感染と関連性が乏しいと考

えられてきた vanA/E. gallinarum (EgA) が 6 施設から検出され、このうち 5 施設で vanA/E. faecium も検出されていた。EgA による、院内感染や感染伝播の報告は非常に少なく、EfmA の流行クローンである CC17 のような、E. gallinarum の伝播クローンが vanA 遺伝子を獲得した可能性がある。

EgA 株の PFGE 解析では菌株の類似性が示唆された。Pathogenic Island (PAI) Tn1546 の解析では、当初流行した EfmA からのプラスミド伝播が示唆された。疫学調査結果より、同じ施設からの EfmA の検出もみられたことより、施設内での遺伝子の獲得、および施設間伝播の両者の可能性が考えられた。この結果より、EgA という新たな耐性菌が、CC17 EfmA のような世界的流行クローンとなりうる可能性が示唆され、更なる細菌学的解析と感染伝播防止のための十分な感染予防策が必要と考えられた。

#### E. 結論

京都市内の一施設における VRE の大規模アウトブレイクから始まった地域での VRE 感染対策の取組は、2007 年度当初よりアクティブサーベイランスの実施や保菌情報の共有などの対策の強化をはかっている。この結果、当初流行の主体であった EfmA の検出施設/株数の減少一定の効果を示してきているが、あらたなタイプの耐性菌の出現も見られ、さらに地域での感染予防策の徹底を図る必要がある。

また、これまで報告が稀であった EgA が複数施設より検出され、PFGE 解析や PAI Tn1546 の解析結果より、施設内での EfmA からの耐性遺伝子の獲得あるいは施設間伝播の可能性が示唆された。今後も対策を緩めることなく、新たな耐性菌の出現には十分な注意が必要と考えられた。

#### F. 健康危険情報

VRE による、感染伝播は、腸球菌による治療を困難とし、特に Immunocompromised host における難治感染症の原因となりうる。しかも、一施設でのアウトブレイクが、地域での拡散を惹起する

可能性もあり、一施設の問題とせず、地域ぐるみの対応が必要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1. Takakura S, Iinuma Y, Ichiyama S, et al. Regional spread of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) in a newly-introduced area in Japan after a nosocomial outbreak and importance of laboratory-based screening. 47<sup>th</sup> ICAAC, Chicago, 2007.

2. 高倉俊二, 飯沼由嗣, 一山 智, 他. 京都において分離されたバンコマイシン耐性腸球菌の遺伝子型の相同性. 第81回日本感染症学会総会, 京都, 2007.

3. 松島晶, 飯沼由嗣, 一山智, 他. 京都地区で分離されたバンコマイシン耐性 *E. faecium* の MLST 解析. 第81回日本感染症学会総会, 京都, 2007.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

なし

##### 2. 実用新案登録、その他

なし



厚生省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

高度多剤耐性緑膿菌の院内感染対策に関する研究

分担研究者 切替 照雄 国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部長

**研究要旨**

我が国の医療施設における高度多剤耐性緑膿菌の実態と有効な感染対策を明らかにすることを目的として、分子疫学解析、アンケート調査及び迅速診断法の開発を実施した。具体的には、アンケート調査等をもとに、高度多剤耐性緑膿菌による感染事例を調査し、多発事例に関しては菌株を収集し、薬剤耐性遺伝子等の感染拡大因子探索を試みると共に、分子疫学的情報からの感染伝播様式を考察した。その結果、過去に宮城県で流行した高度多剤耐性緑膿菌クローン、IMCJ2型多剤耐性緑膿菌が、東京都、茨城県、千葉県、神奈川県、広島県で分離されることを見出した。また、本研究から新たにIMCJ2型の亜型を見出した。さらに、高度多剤耐性緑膿菌流行株を同定するための迅速簡便診断法(凝集法)を開発し、実用化に向けて、現在多施設における評価試験を実施している。

**A. 研究目的**

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緑膿菌の分離報告及び院内感染報告がな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、治療が極めて困難であると共に、個々の施設内での伝播を引き起こす。今日の医療提携システムのもとでは、施設を超えて広域に伝播拡大していくことが懸念されている。このような背景のもと、感染拡大の防止及び対策を講じ、医療の質と信頼を確保するため、高度多剤耐性緑膿菌の院内分離状況を把握する必要がある。本研究の目的は、我が国の医療施設における多剤耐性緑膿菌の実態を明らかにすることである。

そこで、全国アンケート調査を実施し、高度多剤耐性緑膿菌による感染事例を調査した。多発事例に関しては菌株を収集し、薬剤耐性遺伝子等の感染拡大因子探索を試みると共に、これまでに宮城県内において多施設に渡る多発事例を起した高度多剤耐性緑

膿菌(以下、IMCJ2型高度多剤耐性緑膿菌と呼ぶ)(図1)との比較解析を行う事により、分子疫学的情報からの感染伝播様式を考察した。さらに、高度多剤耐性緑膿菌流行株を迅速簡便に同定するための診断法(凝集法)を開発した。

**B. 研究方法**

**[B-1. アンケート調査と多剤耐性緑膿菌の分離]**

全国の多剤耐性緑膿菌の分離状況を把握する為、平成15年から平成18年6月までの3年半の多剤耐性緑膿菌の分離状況等に関して、全国538医療施設 および臨床検査受託事業所4施設を対象に、調査を実施した。今年度は、引き続き分離された多剤耐性緑膿菌について、IMCJ2型高度多剤耐性緑膿菌との比較解析を行った。

**[B-2. 疫学解析：パルスフィールドゲル電気泳動および薬剤感受性試験]**

アンケート調査により分離された東日本および西日本より分離された多剤耐性緑膿菌 140 株についてパ

ルスフィールドゲル電気泳動および薬剤感受性試験を行った。薬剤感受性試験は微量液体希釈法を用いて行った。

### **[B-3.PCR によるインテグロンの検出および増幅断片のシーケンス解析]**

IMCJ2 型高度多剤耐性緑膿菌は、ゲノム上に存在するインテグロン構造中に、メタロベータラクタマーゼをコードする *bla<sub>IMP-1</sub>* 遺伝子、アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼをコードする *aac(6')-Iae* 遺伝子およびアミノグリコシドアデニルトランスフェラーゼ *aadA1* 遺伝子を有している。18 年 4 月以降分離された多剤耐性緑膿菌のゲノム DNA を抽出し、PCR によるインテグロンの検出、さらには、増幅断片のシーケンス解析を行った。

### **[B-4. LAMP 法による *aac(6')-Iae* の検出]**

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法は、一定温度のもとで、DNA を増幅することが出来る。*aac(6')-Iae* の有無によって、アンケート調査により分離された多剤耐性緑膿菌が IMCJ2 型高度多剤耐性緑膿菌か否かを判別するというを目的とし、アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 *aac(6')-Iae* に特異的なプライマーを用いた LAMP 法を実施した。

### **[B-5. 多剤耐性緑膿菌の迅速診断法の開発]**

IMCJ2型高度多剤耐性緑膿菌を迅速かつ簡便に診断する為、凝集法の製品開発を企業と協同で行った。具体的には、多剤耐性緑膿菌が産生するアミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼAAC(6')-Iaeに着目し、このタンパク質を大腸菌内で過剰発現させ、精製分離した。精製したAAC(6')-Iaeをウサギに免疫して得られた抗AAC(6')-Iaeポリクローナル抗体をラテックスビーズに結合させ、凝集ビーズとした。緑膿菌 PAO1株とATCC27835株をネガティブコントロール株とし、AAC(6')-Iaeを産生する高度多剤耐性緑膿菌を特異的に検出する為の至適条件の検討を行い、迅速

診断法(スライド凝集法)を開発した。

(倫理面への配慮)

研究対象は、患者情報と完全に切り離された臨床分離株を使用する。本研究内容は、疫学研究に関する倫理指針(文部科学省、厚生労働省)の対象外である。

## **C. 研究結果**

### **[C-1-1. アンケート調査と多剤耐性緑膿菌の分離]**

全国の多剤耐性緑膿菌の分離状況を把握する為、平成15年から平成18年6月までの3年半の多剤耐性緑膿菌の分離状況等に関して、全国538医療施設および臨床検査受託事業所4施設を対象に、調査を実施した結果、全国339医療施設(回答率63%)及び臨床検査受託事業所4施設(回答率100%)より回答を得た。そのうち、291医療施設(85.8%)から平成15-18年の3年半を通じて多剤耐性緑膿菌が分離されていた。その分離数及び患者数は、平成15年と比較すると、平成16年以降若干の増加傾向が見られたが、急激な増加は見られず、年間1000病床あたり数例程度が大半であると推定された。検査材料別で見た場合、多剤耐性緑膿菌は、尿路系検査材料、ついで呼吸器系検査材料から多く分離される傾向が見られた。一方、臨床検査受託事業所の件数は、同時期の医療施設での件数と比較すると低値であった。以上の結果より、我が国の医療施設を中心に多剤耐性緑膿菌が新興し始めている実態が明らかになった。(図2)

今年度は、東日本においては、東京都、千葉県、神奈川県および茨城県の6医療施設より43株の多剤耐性緑膿菌が分離された。西日本においては、大阪府、高知県、広島県、大分県および熊本県の5医療施設より97株の多剤耐性緑膿菌が分離された。(図3)

## [C-1-2. アンケート調査フォローアップ]

上記アンケート調査に関するフォローアップを65施設に依頼した(依頼日:平成20年20年3月5日、回答期限:同年4月4日)。

## [C-2: 疫学解析:パルスフィールドゲル電気泳動および薬剤感受性試験]

東日本および西日本より分離された多剤耐性緑膿菌140株についてパルスフィールドゲル電気泳動および薬剤感受性試験を行った結果、107株の分離株が大きなクラスターを形成した(図4)。このクラスターは、パルスフィールドゲル電気泳動のパターンがIMCJ2型多剤耐性緑膿菌と約80%の相同性を示す事が明らかとなった。クラスターに属する分離株の薬剤耐性プロファイルはIMCJ2型多剤耐性緑膿菌と酷似しており、パルスフィールドゲル電気泳動のパターンとも相関を示すことが明らかとなった。このクラスターに含まれる分離株は、東京都、神奈川県、千葉県、茨城県および広島県の医療施設において分離された分離株であった。東京都および広島県の医療施設から分離された多剤耐性緑膿菌は、ほぼ全ての分離株がIMCJ2型多剤耐性緑膿菌と高い相同性を示した事から、宮城県外において、仙台の流行株によるアウトブレイクが発生している実態が明らかとなった。

## [C-3. PCRによるインテグロンの検出および増幅断片のシーケンス解析]

パルスフィールドゲル電気泳動および薬剤感受性試験の結果、IMCJ2型多剤耐性緑膿菌と80%の相同性を持つクラスターを形成した107株について、PCRによるインテグロンの検出を行った。その結果、全てにおいてIMCJ2型多剤耐性緑膿菌と同一の大きさ(約2.5kbp)のPCR断片が増幅された。これらのシーケンスを行った結果、6株を除くすべての分離株が、IMCJ2型多剤耐性緑膿菌と同一の薬剤耐性遺伝子、メタロベータラクタマーゼをコードする *bla<sub>IMP-1</sub>* 遺伝子、アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼをコードする *aac(6')-Iae* 遺伝子およびアミノグリコシドアデニルト

ランスフェラーゼ *aadA1* 遺伝子を有している事が分かった。

クラスター全体の約5%にあたる6株においては、*bla<sub>IMP-1</sub>* 遺伝子が *bla<sub>IMP-10</sub>* 遺伝子に置換している事が明らかとなった。具体的には、*bla<sub>IMP-1</sub>* 遺伝子の145番目のG(グアニン)がT(チミン)に変異し、その結果、アミノ酸レベルで49番目のV(バリン)がF(フェニルアラニン)に変異した *bla<sub>IMP-10</sub>* 遺伝子に置換されていた。この結果は、IMCJ2型多剤耐性緑膿菌の亜型が出現した事を示唆している。

## [C-4. LAMP法による *aac(6')-Iae* の検出]

LAMP法の結果、緑膿菌140株中106株から上記のアミノグリコシド耐性遺伝子 *aac(6')-Iae* を検出した。薬剤感受性試験の結果より、これらは多剤耐性緑膿菌であることが確認できた。未検出の28株は、アミノグリコシド耐性遺伝子 *aac(6')-Ib* を保有することがPCRで確認できている3株、及び薬剤感受性菌であった。また、アミノグリコシド耐性遺伝子 *aac(6')-Id* を保有する *Acinetobacter baumannii* NCB0211-439株でも検出されず、多剤耐性緑膿菌を効率に検出することができた。

## [C-5. 多剤耐性緑膿菌の迅速診断法の開発: 感作ラテックスビーズによる逆受身凝集反応]

アルカリ加熱法によって菌体を溶菌し、その溶出液を凝集抗原液とした。薬剤耐性緑膿菌15株中、アミノグリコシド耐性遺伝子 *aac(6')-Iae* を保有する6株、及びアミノグリコシド耐性遺伝子未検出の1株で凝集した。アミノグリコシド耐性遺伝子 *aac(6')-Ib* を保有する4株及びアミノグリコシド耐性遺伝子未検出の3株で凝集は起きなかった。また、交差反応の確認として、MRSA・MSSA・VRE(VamB)・大腸菌・*Acinetobacter baumannii* NCB0211-439株を用いて凝集抗原液を作成し、凝集反応を確認したが、どれも凝集は起きず、多剤耐性緑膿菌を効率に検出することができた(図5)。

## D. 考察

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緑膿菌の分離報告及び院内感染報告がな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、治療が極めて困難であると共に、個々の施設内での伝播を引き起こす。今回の分子疫学解析の結果、宮城県内だけでなく全国の複数の病院から同一の PFGE 型を示す高度多剤耐性緑膿菌株が分離された。アンケート調査から推測されたように、多剤耐性緑膿菌が全国に新興し始めているこの時期に、高度多剤耐性緑膿菌の治療法及び院内感染防止対策法を確立し、良質な医療サービスが提供できる体制を構築が急務であると考えられる。

## E. 結論

今回の調査によって、宮城県内で施設を超えて流行した IMCJ2 型高度多剤耐性緑膿菌クローンが、宮城県外である東京都および広島県でも蔓延している実態が明らかとなった。今後は、今年度開発した高度多剤耐性緑膿菌流行株を同定するための迅速簡便診断法(凝集法)を配布し、IMCJ2 型高度多剤耐性緑膿菌による院内感染伝播のあった施設の今後の感染伝播防止対策を行わなければならない。

さらに、アンケート調査や多発事例での聞き取り調査等から、以下の対策が重要であると考えられる。

### 【多剤耐性緑膿菌感染対策に関わる提案】

- 1) 病院長のリーダーシップ: 病院長の強いリーダーシップのもとに多剤耐性緑膿菌分離に焦点を絞った感染対策プログラムを実施する。
- 2) 職員教育(周知徹底): すべての医療従事者が多剤耐性緑膿菌に関する知識を十分に持つ。

- 3) 感染制御に関わる院内体制の見直し: 実行力のある感染制御チーム(ICT)を作る。
- 4) 多剤耐性緑膿菌分離の重点的な監視:
  - (1) 施設内監視体制の強化: 細菌検査室を中心に、多剤耐性緑膿菌を重点的に監視し、得られた情報をできるだけ早く医療現場に周知。
  - (2) 地域連携: 他の医療施設と情報を交換し、地域内での多剤耐性緑膿菌の分離状況を把握する。
- 5) 感染制御マニュアルの作成: 標準予防策、接触予防策、場合によっては飛沫予防策の手順(感染制御マニュアル)を作成。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sekiguchi J, Morita K, Watanabe N, Okazaki M, Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Kanamori M, Kirikae T: KHM-1, a Novel plasmid-mediated metallo- $\beta$ -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother** in press.
2. Kirikae T, Mizuguchi Y, Arakawa Y: Investigation of isolation rates of *Pseudomonas aeruginosa* with and without multidrug resistance in medical facilities and clinical laboratories in Japan. **J Antimicrob. Chemother** 61:612-615, 2008
3. Sekiguchi J, Teruya K, Horii K, Kuroda E, Konosaki H, Mizuguchi Y, Araake M, Kawana A, Yoshikura H, Kuratsuji T, Miyazaki H, Kirikae T: Molecular epidemiology of outbreaks and containment of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Tokyo hospital. **J Infect Chemother** 13:418-422, 2007
4. Sekiguchi J, Asagi T, Miyoshi-Akiyama T, Kasai A, Mizuguchi Y, Araake M, Fujino T, Kikuchi H, Sasaki S, Watarai H, Kojima T, Miki H, Kanemitsu