

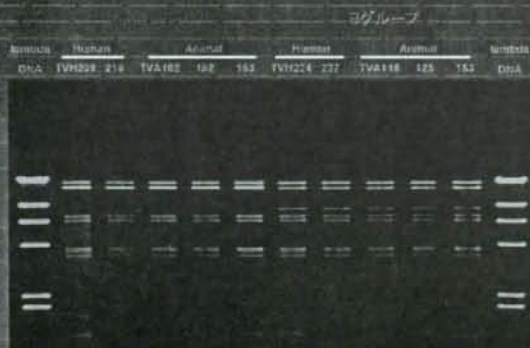
ヒト分離VanA型VREのVanB形質株の  
パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)



家畜および家畜取扱員由来VanA型VREのVanB形質株の  
パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)



放者および家畜、環境分離VREの接合伝達性Van耐性プラスミドDNAの同一性  
(プラスミドDNAのEcoRI断片のアガロースゲル電気泳動)



VanA型遺伝子オペロンの構造

プロトタイプVanA遺伝子オペロン(BM4147株)



VanB型VanA遺伝子オペロン(チリ産株)



類似プラスミド保持接合転送株(*E. faecalis*)のMIC値

グループ	分離菌株	VOM	TBC	EM	VanB遺伝子
A	TVH101	312	8	250	LS9V, ES4Q, Q09H
	TVH102	312	8	250	LS9V, ES4Q, Q09H
	TVH103	312	4	250	LS9V, ES4Q, Q09H
	TVH104	312	4	250	LS9V, ES4Q, Q09H
	TVH105	312	4	250	LS9V, ES4Q, Q09H
	TVH106	312	4	250	LS9V, ES4Q, Q09H
B	TVH107	312	8	250	LS9V, ES4Q, Q09H
	TVH108	312	8	250	LS9V, ES4Q, Q09H
	TVH109	312	1	250	LS9V, ES4Q, Q09H
	TVH110	312	1	250	LS9V, ES4Q, Q09H
	TVH111	312	1	250	LS9V, ES4Q, Q09H
	TVH112	312	1	250	LS9V, ES4Q, Q09H
	TVH113	312	1	250	LS9V, ES4Q, Q09H
	TVH114	312	1	250	LS9V, ES4Q, Q09H
	TVH115	312	1	250	LS9V, ES4Q, Q09H
	TVH116	312	1	250	LS9V, ES4Q, Q09H

接合転送株のフェロモン産生能力とプラスミド保有状況に関する調査結果  
(eAD1, cOB1, cOB2, cOB3, cAD372)

調査菌株由来		調査菌株	
分離菌株	フェロモン	分離菌株	フェロモン
TVH101	other	TVH201	
TVH102	cOB1	TVH202	
TVH103	cOB1	TVH203	other
TVH104		TVH204	other
TVH105	other	TVH205	other
TVH106	cOB1	TVH206	other
TVH107	other	TVH207	other
TVH108	cAD1	TVH208	other
TVH109	other	TVH209	cAD1
TVH110	cAD1	TVH210	cOB1
TVH111	cAD1	TVH211	cOB1
TVH112	cAD1	TVH212	cOB1
TVH113	cAD1	TVH213	cAD1
TVH114	cAD1	TVH214	cAD1
TVH115	cAD1	TVH215	cOB1
TVH116	cAD1	TVH216	other
TVH117	cAD1	TVH217	cAD1
TVH118	cAD1	TVH218	cOB1
TVH119	cAD1	TVH219	cAD1
TVH120	cOB1	TVH220	cOB1
TVH121	cAD1	TVH221	other
TVH122	cAD1	TVH222	cAD1
TVH123	cAD1	TVH223	cAD1
TVH124	other	TVH224	cAD1
TVH125	other	TVH225	cOB1

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

研究分担者 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。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、京都 VRE 対策指針に基づき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、2008 年度実施した全施設サーベイランスでは、VRE 検出施設数は減少傾向とな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。また、今年度は vanA/*E. gallinarum* の解析をさらに進め、当初京都地区で流行した vanA/*E. faecium* のプラスミド上の耐性遺伝子が、*E. gallinarum* のゲノム上へ伝播し耐性化したものと考えられた。*E. faecium* および *E. faecalis* によるアウトブレイク発生時には、通常は感受性検査の対象とならない *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* についても、耐性獲得の可能性を考慮し、随時感受性試験を実施すべきであると考えられた。

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 准教授）

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、今年度はさらに耐性遺伝子解析を進めた。

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

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* を対象とする。

方法：京都府内で検出された vanA/B *E. gallinarum* について解析を行った。解析方法は以下の通りである。①PCR 方による耐性遺伝子検索（VanA, VanB, VanC）と疫学調査、②vanA/B *E. gallinarum* の PFGE 解析（SmaI 切断）、③薬剤感受性試験：ABPC, EM, CLDM, LVFX, ST）、④Pathogenic Island (PAI) Tn1546 の解析（PCR-RFLP (Tn1546 全長、vanRSHAX 領域) および PCR fragment 解析 (10 領域)）、⑤プラスミド抽出と制限酵素切断パターンと比較および VanA 遺伝子プローブによるサザンハイブリダイゼーション、⑥ *E. faecalis* (JH2-SS) をレシピエントとした接合実験。

## C. 研究結果

1. 2008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、京都VRE対策指針が策定され、対策が更に強化された結果、2006年度10.0%であった施設検出率が、2007年度は9.0%と減少に転じ、2008年度はさらに7.7%にまで低下した。また、京都VRE監視ネットワークでの報告からは、転入院時のスクリーニングで発見された事例がこれまでに計8件にものぼり、早期発見および感染対策に効果的であった。対策指針に基づいて強化された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*が計13施設から検出された。*vanA/E. gallinarum* (EgA)、*vanB/E. gallinarum* (EgB)それぞれ7施設から検出されている。

1) 耐性遺伝子検索と疫学調査

EgAが検出されていた7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、逆に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

PFGE解析を行ったEgAおよびEgBのうち、EgA5施設5株、EgB4施設5株はバンドパターンがほぼ一致していた(1a-1)。さらにEgAは全株がほぼPFGEパターンが類似した1クラスター(I群)に入った。一方EgBでは、パターンの異なる株が3株検出されていた。

3) 薬剤感受性試験

PFGEの最大クラスター(I群)にはいる15株のEgA、EgBともにABPC感受性、EM、CLDM、LVFX、ST

に耐性の株であった。このパターンをとる*E. gallinarum*は稀であり(0.8%、京大病院)、特異的な薬剤感受性をもった*E. gallinarum*がVRE遺伝子を保有した結果と考えられた。

4) Pathogenic Island (PAI) Tn1546の解析

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。

5) プラスミド抽出およびハイブリダイゼーション

京都で検出されたEfmAおよびEgAのプラスミド抽出及び制限酵素(EcoRI)切断パターン(RFLP)の比較を行った。その結果EfmAおよびEgAともにプラスミドが抽出されたが、RFLPパターンは一致しなかった。さらにVanA遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション結果からは、EfmAから抽出されたプラスミドにはハイブリ・バンドが検出されたが、EgAからは検出されなかった。

6) 接合実験

京都地区で検出されたEfmA、EgAについて*E. faecalis*(JH2-SS)をレシビエントとしたfilter membrane法による接合実験を行った。その結果、コントロール株(N040553、VanA *E. faecalis*)では接合がおこったが、京都地区で検出されたEfmA、EgAでは接合はおこらなかった(接合効率 $10^{-8}$ 未満)。

## 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、京都 VRE 対策指針が策定され、対策が更に強化された結果、2006 年度 10.0%であった施設検出率が、2007 年度は 9.0%と減少に転じ、2008 年度はさらに 7.7%にまで低下した。また、京都 VRE 監視ネットワークでの報告からは、転入院時のスクリーニングで発見された事例が計 8 件にもものぼり、早期発見および感染対策に効果的であった。対策指針に基づいて強化された VRE 対策が有効であったものと考えられた。

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 EgA が 7 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。耐性遺伝子を獲得した *E. gallinarum* は ABPC 感受性、EM や LVFX 耐性など稀な薬剤感受性を共通して示し、VanA *E. faecium* 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高いと考えられた。

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 からの耐性遺伝子伝播が示唆された。

さらに京都地区で検出された EfmA および EgA のプラスミドを抽出し、RFLP およびハイブリダイゼーション解析を行った結果、EfmA ではプラスミド上に VanA 遺伝子が存在し、EgA ではプラスミド上ではなくゲノム遺伝子上に存在することが示された。

接合実験では、京都地区で検出された EfmA と EgA とともに接合は起こらず、接合効率は悪いと考えられた。

## 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。この結果検出施設/株数の減少など一定の効果を示してきている。

しかし、より病原性の低い腸球菌への耐性遺伝子の伝播が確認され、地域での感染予防策の徹底を今後とも図っていく必要がある。

## 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および病原性がより病原性の低い腸球菌への耐性遺伝子の伝播も起こりうるため、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. 白野倫徳、飯沼由嗣、一山智、他、京都における施設内バンコマイシン耐性腸球菌の地域

的検出・情報提供体制とその重要性. 第55回  
日本臨床検査医学会学術集会, 名古屋, 2008.

2. 飯沼由嗣. シンポジウム1 菌種別にみた耐  
性菌対策 2)VRE への日常的対策及びアウト  
ブレイク対策, 第24回日本環境感染学会総会,  
横浜, 2009.

3. 飯沼由嗣. 第81回ICD講習会(日本細菌  
学会総会開催時), VRE感染対策ー地域での感  
染対策の重要性, 名古屋, 2009.

#### 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

高度多剤耐性緑膿菌の院内感染対策に関する研究

研究分担者 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 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、前年度より引き続き、多剤耐性緑膿菌に関するアンケート調査、分子疫学解析および迅速診断法の開発を実施した。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.S1株が、東日本、特に関東地方（東京都、茨城県、千葉県、神奈川県、群馬県）で分離されることを見出した。また一方で、西日本においてはIMCJ2.S1株と同等の高度多剤耐性でありながら、IMCJ2.S1株とは異なる薬剤耐性因子を産生する多剤耐性緑膿菌IMCJ798株・IMCJ799株を分離し、その詳細な解析を行った。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の開発に関しては、これまでに開発したLAMP法や凝集ビーズ法とは異なるイムノクロマト法の開発を行い、その評価試験を実施した。

### A. 研究目的

近年、各地の医療施設において多剤耐性緑膿菌の分離報告及び院内感染報告が多数見受けられる。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、個々の施設内での感染伝播を引き起こす。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も懸念されている。そのため、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に、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。

このような背景のもと、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ために、多剤耐性緑膿菌の全国アンケート調査を実施した。

また、高度多剤耐性緑膿菌による感染事例と流行株を同定・把握することを目的とし、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、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 IMCJ2.S1 株との比較解析を行った。さらに、高度多剤耐性緑膿菌流行株を検査室レベルで迅速簡便に同定するための診断法の開発にも取り組んだ。

### B. 研究方法

#### 1. アンケート調査と多剤耐性緑膿菌の分離

平成18年度までに実施した多剤耐性緑膿菌に関するアンケート結果から、多剤耐性緑膿菌が分離された患者数が比較的多い事が分かった全国の



基幹病院・65施設を対象に、その後の分離状況を調査することを目的として、アンケートを送付した。質問内容は、1.平成18年～平成19年の2年間の緑膿菌および多剤耐性緑膿菌年間分離総数、2.平成18年～平成19年の2年間の多剤耐性緑膿菌が分離された患者数、3.分離された臨床材料、4.多剤耐性緑膿菌感染対策の実施状況、の4問である。得られた回答に関しては前年度までのデータと併せて解析し、年度別推移等を考察した。

## 2. 分子疫学解析：パルスフィールドゲル電気泳動および薬剤感受性試験

今年度新たに東日本および西日本より分離された多剤耐性緑膿菌52株に関して、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。得られたパルスフィールドゲル電気泳動パターンと薬剤耐性プロファイルは、高度多剤耐性緑膿菌 IMCJ2.S1 株のそれらとの比較解析を行った。

## 3. LAMP 法による *aac(6')*-*lae* 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。IMCJ2.S1 株に特異的な *aac(6')*-*lae* 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高度多剤耐性緑膿菌 IMCJ2.S1 株か否かを判別するために、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')*-*lae* に特異的なプライマーを用いた LAMP 法を実施した。

## 4. 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

高度多剤耐性緑膿菌 IMCJ2.S1 株は、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>MPP-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')*-*lae* 遺伝子およびアミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ *aadA1* 遺伝子を有している。分与された株のうち、高度多剤耐性を示すものに関してゲノム 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。

## 5. 多剤耐性緑膿菌の迅速診断法の開発

医療施設の検査室において多剤耐性緑膿菌を迅速に診断（検出）し、その治療法及び院内感染対策を迅速に確立することは非常に重要である。そのため、高度多剤耐性緑膿菌 IMCJ2.S1 株を迅速かつ簡便に診断する方法の開発に取り組んだ。これまでに、上述した LAMP 法（遺伝子診断）や、凝集法（アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ産生株の診断）の開発を企業と協同で行ってきた。今年度はさらに簡便化を図る為に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')-*lae* に着目し、このタンパク質を抗原とした抗体を用いてイムノクロマト法を作製した。具体的には、このタンパク質を大腸菌内で過剰発現させ、精製分離し、精製した AAC(6')-*lae* を免疫し得た抗 AAC(6')-*lae* 抗体を用いた。

（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

### 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、引き続きアンケート調査を実施した（依頼日：平

成 20 年 3 月 5 日、回答期限: 同年 6 月 20 日)。

具体的には、平成 18 年度に実施した多剤耐性緑膿菌に関するアンケートの結果、多剤耐性緑膿菌が分離された患者数が比較的多かった全国の基幹病院 65 施設を対象に、その後の状況を調査する目的でアンケートを送付した。65 施設の内訳は、17 施設の国立病院機構およびナショナルセンター、7 施設の赤十字病院、12 施設の大学病院、29 施設の地方基幹病院である。アンケートを送付した 65 施設のうち、60 施設(回答率 92%)から回答があり、これをもとに解析を行った。

各医療施設の平成 18 年～平成 19 年の 2 年間の多剤耐性緑膿菌が分離された患者数を、年・1,000 病床あたりの換算値に算出してプロットし、年度別推移を解析した(図 1A)。その結果、3 年間を通して全体的に多剤耐性緑膿菌の分離数の減少傾向が見られたが、2 施設では分離数が未だ高いことが分かった。

さらに、各年度別に、多剤耐性緑膿菌が分離された患者数がある医療施設の分布を箱ひげ図を作成し解析を行った(図 1B)。箱ひげ図の作成に用いた値は、95% 値、75% 値、中央値、25% 値、及び 5% 値である。中央値は平成 17 年が 29.4 名、平成 18 年が 23.4 名、平成 19 年が 15.6 名であり、年々減少していた。その他の値においても減少していた。これらのデータに関してサイン検定を用い統計学解析を行うと、平成 17 年と平成 18 年では危険率は  $P=0.008$  であり、平成 18 年と平成 19 年では  $P=0.003$  であった。多剤耐性緑膿菌が分離された患者数は、平成 17 年から平成 19 年の 3 年間で有意差 ( $P<0.001$ ) を持って減少傾向にあるといえた。

平成 17 年において全ての施設で多剤耐性緑膿菌が分離された患者がいたが、平成 18 年において

年間を通して患者が 0 名であった施設は 1 施設あった。平成 19 年においては年間を通して患者が 0 名であった施設は 3 施設あったが、平成 18 年に 0 名であった施設とは異なる施設であった。

なお、65 施設中 1 施設に関しては平成 17 年のデータが保存されていなかったため、その施設における解析は平成 18 年及び平成 19 年に限られている。

分離状況を臨床材料別に見た場合、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、緑膿菌は、呼吸器系検査材料、ついで尿路系検査材料から多く分離される傾向が見られた(図 2)。

多剤耐性緑膿菌感染対策の実施状況に関しては、65 施設中、「多剤耐性緑膿菌感染対策を実施している」施設が 28 施設(47%)、「特に多剤耐性緑膿菌感染に特定していないが院内感染対策を実施している」施設が 31 施設(51%)、「院内感染対策を特に実施していない」施設が 1 施設(2%)であった(図 3)。

以上、アンケート調査の結果をまとめると、アンケート等により監視を続ける事により、大部分の施設で多剤耐性緑膿菌が分離される患者数は減少する傾向が見られることが分かった。

今年度は、東日本の医療施設より 35 株、西日本の医療施設より 17 株、計 52 株の多剤耐性緑膿菌を分離、分与いただいた。これらの株を用いて分子疫学解析を行った。

## 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 52 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、17 株

(32.6%)の分離株が多剤耐性を示した。さらに、これらの株は、パルスフィールドゲル電気泳動のパターンが多剤耐性緑膿菌IMCJ2.S1株と約75%の相同性を示すクラスターを形成した(図4)。このクラスターに含まれる分離株は、関東地方、具体的には群馬県、東京都、神奈川県 of 医療施設において分離された分離株であった。以上の結果は、関東において多剤耐性緑膿菌IMCJ2.S1株によるアウトブレイクが発生している事を示唆している。

### 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、多剤耐性緑膿菌 IMCJ2.S1 株と80%の相同性を持つ17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、全ての株がインテグロンを保有しており、また、これらの分離株は、多剤耐性緑膿菌 IMCJ2.S1 株に特異的な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* 遺伝子を保有していることが分かった。この結果は、パルスフィールドゲル電気泳動結果と併せて、多剤耐性緑膿菌 IMCJ2.S1 株と同じ耐性因子を産生する亜型が、東日本、特に関東地方で伝播している事を示している。

この他には、平成19年度に西日本で分離された高度多剤耐性菌緑膿菌 IMCJ798 株と IMCJ799 株の解析を行った。これらの株は、IMCJ2.S1 株と同等の高度多剤耐性でありながら、IMCJ2.S1 株とは異なるパルスフィールドゲル電気泳動パターンを示し、また、IMCJ2.S1 株が有する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* 遺伝子が検出されない株であった(図5)。これらの株についてインテグロンの検出を行った結果、IMCJ798 株と IMCJ799 株は、インテグロン中に、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')-Iaf* 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>* 遺伝子を保有していることが分かった(図6)。

### 4. 多剤耐性緑膿菌の迅速診断法の開発: 抗 AAC(6')-Iae 抗体を用いたイムノクロマト法

まず、前年度までに開発した抗 AAC(6')-Iae 抗体を用いた凝集ビーズ法の評価試験を行った。凝集抗原液は、アルカリ法や加熱法によって菌体を溶菌し調整した。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 (VanB)・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。しかしながら、菌体を溶解する段階での凝集抗原液の液性や、菌体を溶解する方法による感度の違い等、評価試験の段階で改良すべき課題が残されており、さらに簡便化を目指すためにイムノクロマト法の開発を行った。凝集法で用いた抗体と同等の抗体を用いて試作品を作成した結果、凝集法よりも簡便かつ迅速に AAC(6')-Iae 産生株を検出することが可能であることが分かった(データ非表示)。

今後は、西日本より新たに見出された AAC(6')-Iaf 産生株も検出可能な抗体を調整し、多剤耐性緑膿菌の迅速診断法の品質向上、体外診断薬化を目指したいと考えている。

## D. 考察

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): 全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。

## E. 結論

前年度に引き続き調査によって、宮城県内で施設を超えて流行した高度多剤耐性緑膿菌 IMCJ2.S1 株が、宮城県外である東日本、特に、群馬県、東京都、神奈川県および茨城県でも蔓延している実態が明らかとなった。また、西日本においては、IMCJ2.S1 株とは異なる薬剤耐性因子を産生

する高度多剤耐性緑膿菌が 2 株見出された。今後は、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の体外診断薬化を目指し、IMCJ2.S1 株、IMCJ798 株のような高度多剤耐性緑膿菌による院内感染伝播の感染伝播防止対策を行わなければならない。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T AAC(6<sup>+</sup>)-Iaf, a Novel aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase from multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. Submitted
2. Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, Kanamori M, Kirikae T. KHM-1, a novel plasmid mediated metallo- $\beta$ -actamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 52(11):4194-4197, 2008
3. 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(3):612-5, 2008

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

発明者: 切替 照雄、秋山 徹、安藤 公英。

特許出願「緑膿菌の新規薬剤耐性遺伝子」

特願 2008-268799, 出願日: 2008 年 10 月 17 日。

### 2. 実用新案登録 なし

図1 各医療施設において多剤耐性緑膿菌が分離された患者数の年度別推移

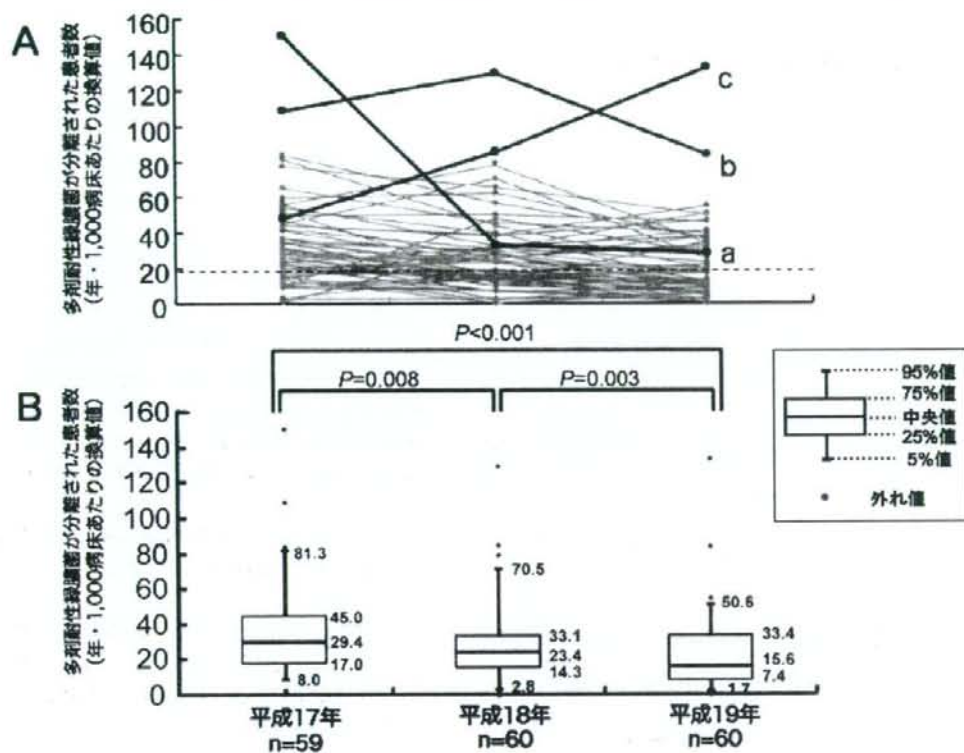


図2 緑膿菌及び多剤耐性緑膿菌が分離された臨床検体の種類とその割合

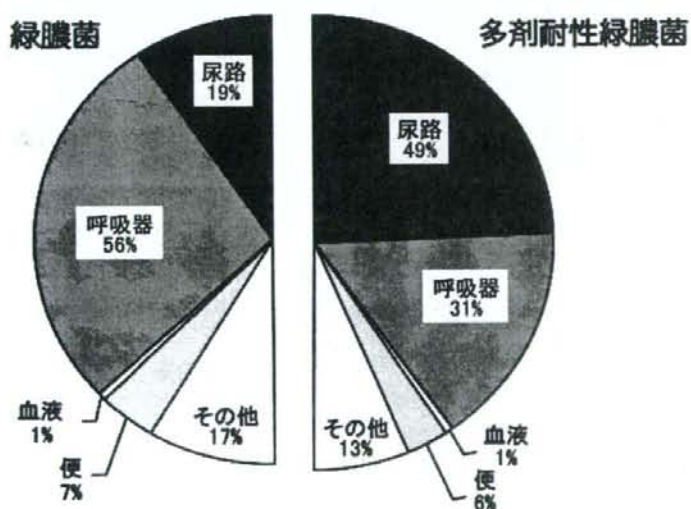


図3 多剤耐性緑膿菌感染対策の実施状況

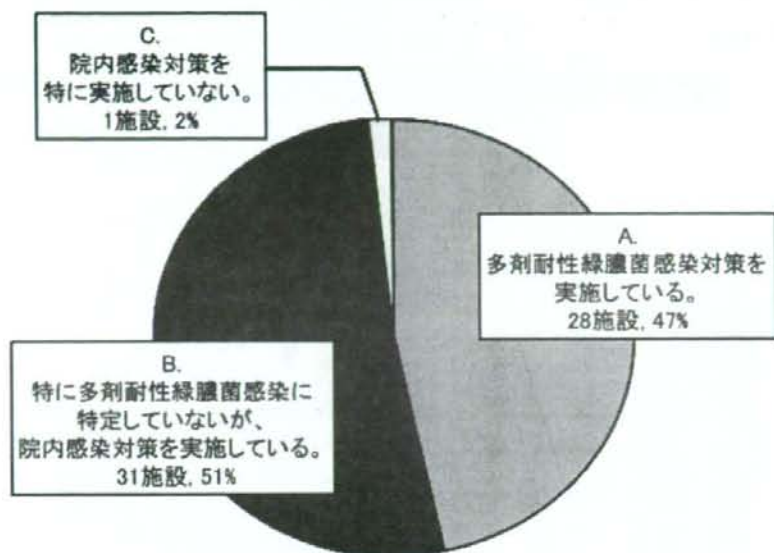


図4 関東地方におけるIMCJ2.S1株型高度多剤耐性緑膿菌のPFGE解析

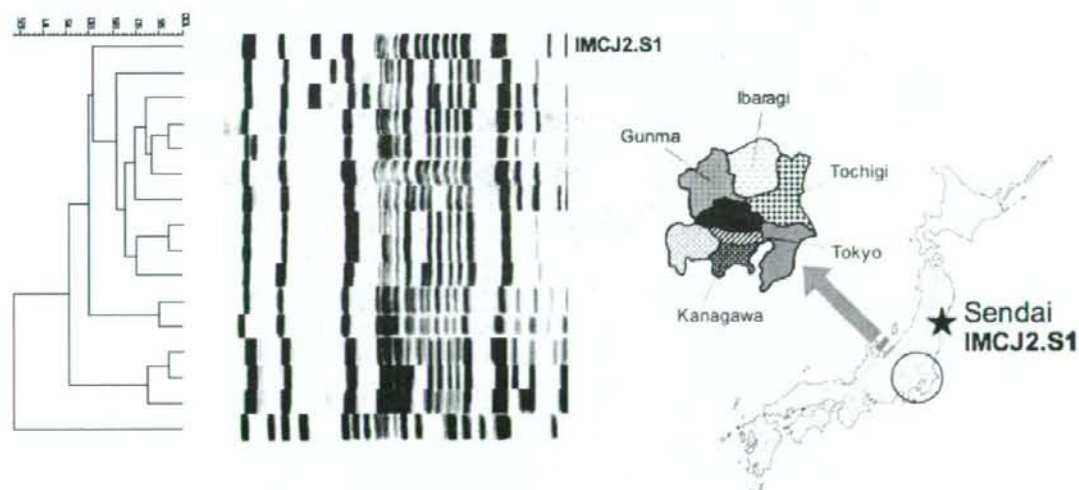


図5 西日本で新たに分離された高度多剤耐性緑膿菌 IMCJ798・IMCJ799

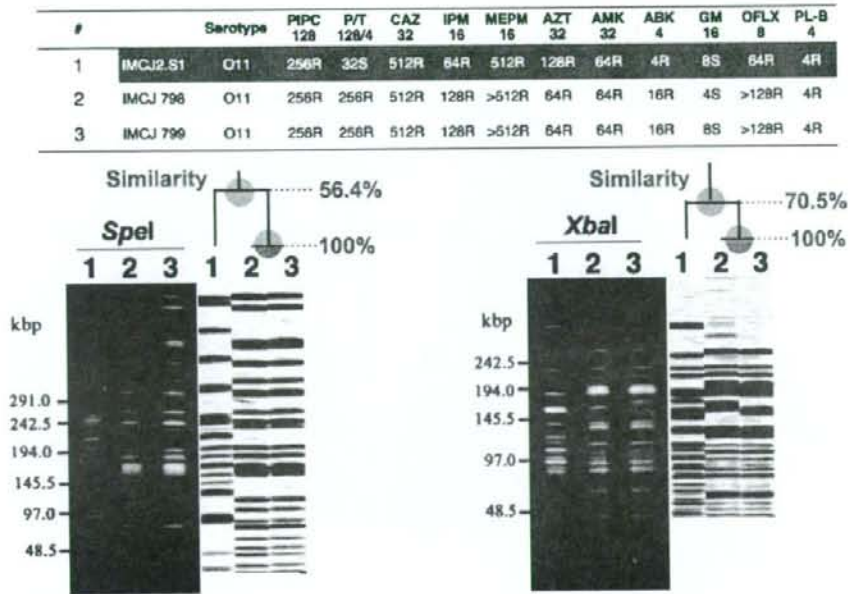
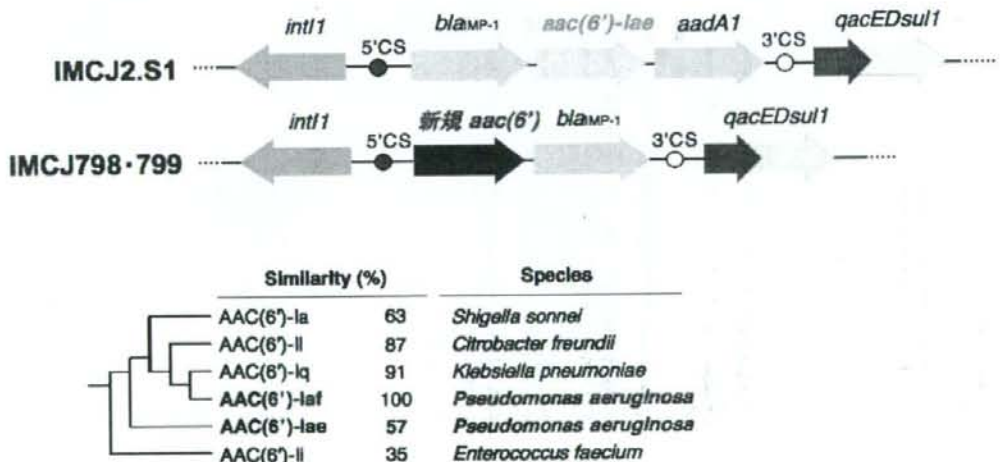


図6 IMCJ798・IMCJ799株におけるインテグロンと新規AAC



地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究

研究分担者 倉田 毅 (富山県衛生研究所)

研究要旨

薬剤耐性菌による院内感染などの発生を早期に把握し、健康被害の拡大を防止するうえで地方衛生研究所の技術力は非常に有益と思われるが実際にはほとんど利用されていない。しかしながら、地方衛生研究所は、食中毒あるいは感染症の原因菌の分離・同定のための遺伝子検査技術の導入が進み、感染源解明に必要な分子疫学的な解析技術も充実しつつある。本研究は、薬剤耐性菌による健康被害の発生・拡大防止における地方衛生研究所の役割を明確にすることと併せ、各種薬剤耐性菌の分離・同定・分子疫学解析的調査機能の強化方法に関する具体的提言をすることを目的として3年間(平成18～20年)の最終年度の活動を報告する。最終年度は、この2年間のアンケート調査から薬剤耐性菌に関する現状を総括的に理解する研修会の実施と資料集を発行した。

研究協力者

綿引正則 富山県衛生研究所 副主任研究員  
磯部順子 同上  
八柳潤 秋田県保健環境センター 主任研究員  
白木豊 岐阜県保健環境研究所 専門研究員  
鈴木匡弘 愛知県衛生研究所 主任  
山口正則 埼玉県衛生研究所 担当部長  
村上光一 福岡県衛生研究所 専門研究員  
菅野奈美 福島県衛生研究所 医療技師

A. 研究目的

薬剤耐性菌による院内感染などの発生を早期に把握し、健康被害の拡大を防止する上で地方衛生研究所(以下、「地衛研」)の細菌学的な検査解析能力は非常に有益と思われるが実際にはほとんど利用されていない。平成19年4月、医療法が改正され、院内感染の防止が、医療安全の一環として法的に義務付けられた。本研究は、薬剤耐性菌による健康被害の発生・拡大防止における地衛研の役割を明確にすることと併せ、各種薬剤耐性菌の分離・同定・分子疫学解析機能の強化について、具体的な提言をすることを目的とし、これまでの2年間のアンケート調査により、要望の多かった薬剤耐性菌の現状(法律、行政および各論として各種薬剤耐性菌の最新情報等)を把握する目的で研修会を開催した。さらにこの研修会参加者に、耐性菌に関する様々な情報を収めた「薬剤耐性菌資料集」を配布し、薬剤耐性菌の現状に関する各種情報を取りまとめ、地衛研の細菌検査担当者への今後の参考となることを目指した。

B. 実施内容

1. 研修会

本研究初年度(平成18年度)および2年目(平成19年度)のアンケート調査から、薬剤耐性菌に対する高い関心とその検査能力強化に対して、研修会等の要望が強かった。従って、地衛研の細菌検査担当者を対象とした「薬剤耐性菌解析機能強化研修会」を企画した。

この研修会は、我々研究班の企画する最初の研修会であり、研修内容の希望として、検査実習の要望が多かった。しかし、当年度においては、先ず薬剤耐性菌の現状を理解するための研修会とし、その分野で経験の深い講師を依頼し、実施した。

2. 薬剤耐性菌参考資料集の作成

薬剤耐性菌に関して、検査担当者がいつでも参考になる情報を提供する資料集を作成した。本資料集は、研修会のプログラム抄録集だけでなく、行政的な対応に関する過去の資料、データ集からなっている。

C. 結果

1. 薬剤耐性菌解析機能強化研修会

研修会に先立ち、全国の地方衛生研究所の細菌検査担当者向けに開催案内したが、一部、保健所からの参加希望もあり、最終的に83名の参加があった。

本研修会のプログラムは図1に示した。

また、本研修会の発表原稿は、参考資料として最後に



添付した。

## 2. 薬剤耐性菌参考資料集の作成と配布

研修会に合わせて、講師による発表内容を盛り込んだ第一部「研修会」編と第二部「資料」編の二部から資料集を作成し、参加者に配布した。

第一部の研修会編は、研修会の講師あるいは演者の方から頂いた資料から構成されており、妙録集として使用することを目的とした。

第二部の資料編は、これまで厚生労働省から自治体へ出された、薬剤耐性菌に関する事務連絡、通知等をまとめたものである。薬剤耐性菌が近年増加傾向にあること、そしてその脅威、院内感染との関連、感染症法の改正、医療法改正、患者権利に対する医療安全確保の法制化の流れ等、理解を助けることを期待して編集した。

この資料集は、研修会終了後でも、近年、複雑化している薬剤耐性菌事情に関して、すぐに必要な情報として参照できる資料として利用価値が高いと期待している。

## 3. 研修会後のアンケート

このアンケートの結果は、図 2 及び 3 に示した。

研修会終了後、参加者に研修会に関するアンケートを行った。その結果、参加者の 90%の方が参考になったと回答した(図2)。また、研修内容については、概ね満足したという回答であった(図3)が、「④耐性菌の現状(リスク・脅威)を新たに認識した」とほとんどの参加者(97%)が回答、逆に「⑦耐性菌の種類や検査法、遺伝子情報については理解できた」が 52%と低かった。さらに、「①耐性菌・院内感染対策の法的位置付けの理解、②耐性菌の蔓延防止に関する地衛研の役割、及び③院内感染にかかる地衛研の役割の理解」に関しては、79~86%が肯定的であった。

しかし、「⑤地衛研の役割は理解するも、実際の機能強化は困難と思ったか」及び「⑥何らかの耐性菌の対策と体制作りの必要性があるとおもった」が、それぞれ、64%、68%であった。

また、「⑧更に詳細な情報が必要であると思った」「⑨事例報告は今後の参考になった」が、各々、90%、81%であった。

更に、今後実際に実習したい薬剤耐性菌の希望を聞いたところ、菌種等の希望としては、感染症法で届出が定められている VRE、MRSA に関する研修希望が、それぞれ 12、11 名であったが、ESBL 関連の研修希望が 12 名からあった。

## D. 考 察

平成 19 年の医療法改正により、院内感染の事前防止、蔓延防止に関する義務が患者の医療安全の観点から、医療機関の責任が明確にされている。近年の様々な報告によると、院内感染の事例は、度々発生しており、また、新たな薬剤耐性菌が輸入食品から国内に入る可能性は高くなっている。従って、地域の保健衛生領域で科学的な証拠に基づいた調査研究を行っている地衛研が、薬剤耐性菌の検査等に積極的に関わっていくことは自然の流れである。

一方で、医療機関で最も注意すべき薬剤耐性菌の院内感染に関しては、これまで地衛研は余り関わってこなかったというのが事実であろう。しかし、改正医療法において、地域の細菌学的検査を行う専門機関として地衛研の役割が見直されている。これまで薬剤耐性菌の検査、解析については、一部を除いてほとんど経験のない地衛研である。従って、薬剤耐性菌と地衛研の関係を認識するための最初として、薬剤耐性菌の現状について知るために、研修会を実施した。

この研修会において、薬剤耐性菌に関する、法律、行政、細菌学的な特徴及び院内感染事例を経験した地衛研からの報告を聞いた。本研修会に対して、概ね参加者の感想は、重要な課題であり、有益であったという声を頂いた。しかし、今後、医療機関で発生する薬剤耐性菌による感染症、その集団発生事例に関して、地衛研が拘っていけるきちんとしたルートが確立されていない状況で、地衛研がどのように関わっていけるのか、まだ疑問視する意見もあった(図 3 ⑤)。しかし、ほとんどの地衛研の細菌検査担当者の耐性菌に対する意識は高いことも判明し、今後、薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析能力を強化していくことは充分可能であると思われる。

## E. 結 論

地衛研の薬剤耐性菌等に関して、細菌学的、疫学的調査解析能力を強化することは将来的に可能であることは判った。しかし、それをどのように維持していくか、地衛研の現状から、人的、予算的な問題も指摘されており、議論すべきことは多い。ここで、重要なことは、本研究の目的である「薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析能力を強化」について、その目的を考えたとき、関係機関(地域の医療機関、行政機関等々)との連携が必須であり、公設機関としての地衛研の位置付けから、なんらかの制度的な確立が必要であると思われる。

今後、地衛研として、薬剤耐性菌の検査等、関係機関等へ何がどのように出来るのかを伝えることも重要であると思われる。

## F. 参考文献

なし

## G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

1)綿引正則、磯部順子、八柳潤、白木豊、鈴木匡弘、鈴木理、倉田毅、荒川宜親：地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究、第37回薬剤耐性菌研究会（群馬）2008.9.13

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

薬剤耐性菌解析機能強化研修会 プログラム

(平成20年6月23日)

開会 13:30-13:40

あいさつ

研究代表者 荒川宜親  
地研代表として 倉田 毅

総論 13:40-14:45

座長：荒川宜親（感染研）

1. 薬剤耐性菌対策に関する厚労省の取り組み  
講師：（厚生労働省）
2. 地方自治体における耐性菌対策及び院内感染対策の法的位置付  
講師：（厚生労働省）
3. 研究班活動としてのアンケート調査結果の報告  
富山県衛生研究所 綿引正則

座長：八柳 潤（秋田健環セ）

4. 薬剤耐性菌に関する概況と新型耐性菌  
国立感染症研究所 荒川宜親

14:45-15:00 休憩

各論 15:00-17:00

座長：白木 豊（岐阜保環研）、鈴木匡弘（愛知衛研）、磯部順子（富山衛研）

5. 地方衛生研究所に対して今後解析が求められる耐性菌の現状  
MRSA 鈴木匡弘（愛知衛研）  
MRSA（食中毒由来） 緒方喜久代（大分衛環研セ）  
VRE 鈴木里和（感染研）  
MDRP 鈴木里和（感染研）  
VRSA 綿引正則（富山衛研）  
ESBL 産生菌、病原性大腸菌（臨床） 八柳 潤（秋田健環セ）  
ESBL 産生菌、病原性大腸菌（家畜） 白木 豊（岐阜保環研）  
サルモネラ 泉谷 秀昌（感染研）  
カンピロバクター 横山敬子（東京健安研セ）  
クロストリジウム・ディフィシル 加藤 はる（感染研）  
結核菌 御手洗 聡（結核研究所）

事例 17:05-17:20

座長：綿引正則（富山衛研）

6. 地方衛生研究所で経験した事例報告  
埼玉県における院内感染対策事例

山口正則（埼玉衛研）

閉会 17:20-17:30

7. アンケート記入

(以上)

図. 1 薬剤耐性菌解析機能強化研修会プログラム

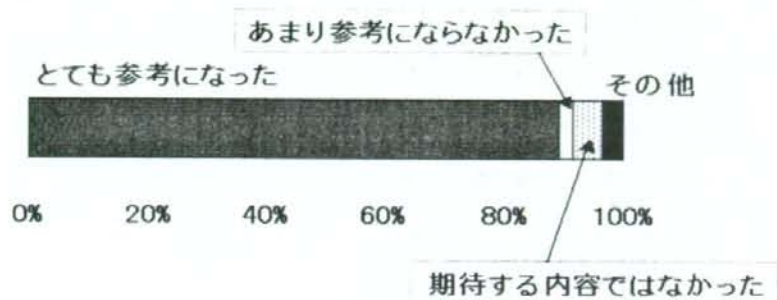


図2. 研修会の全体的な感想

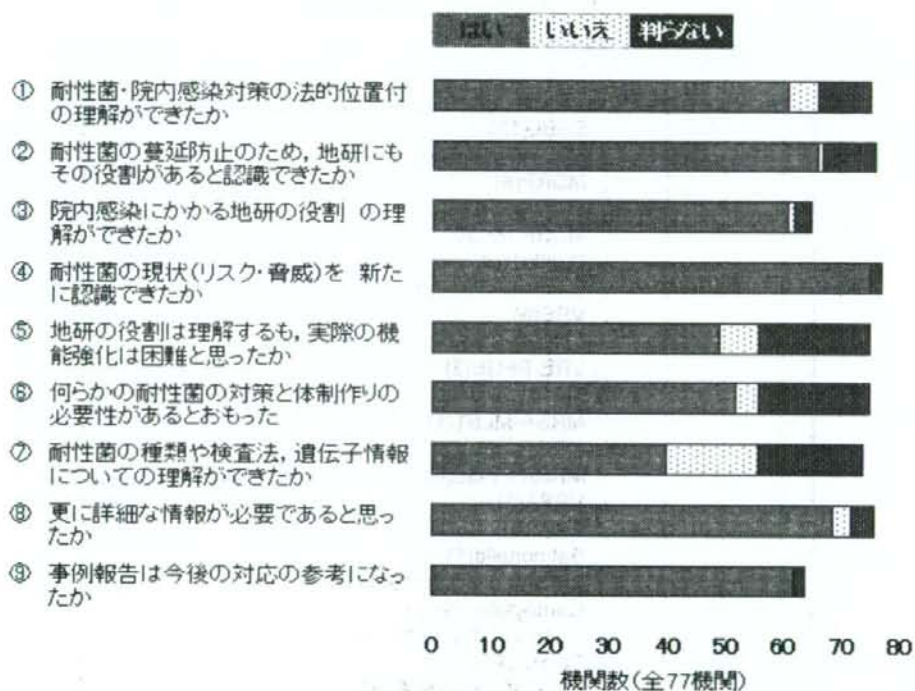


図3. 研修内容に関する感想