

BM4147 (Tn1546)

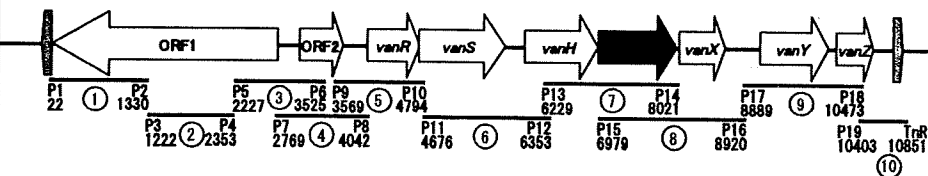


FIG. 1. Primer sets for PCR analysis of Tn1546

TABLE 3. *E. faecium* の MLST

strain No.	Species	MLST(Alelic profile)							ST	CC
		<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>		
58	<i>E. faecium</i>	15	1	1	1	1	7	1	192	17

TABLE 1. VanA 型 VRE 株

No.	VRE型	菌種	MIC (μg/ml)		No.	VRE型	菌種	MIC (μg/ml)		No.	VRE型	菌種	MIC (μg/ml)		
			VCM	TEIC				VCM	TEIC				VCM	TEIC	
1	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	36	VanA	<i>E. avium</i>	-	-	70	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
2	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	37	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	71	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
3	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	38	VanA	<i>E. avium</i>	-	-	72	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
4	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	39	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	73	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
5	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	40	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	74	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
6	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	41	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	75	VanA	<i>E. faecium</i>	128	2	
7	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	42	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	76	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
8	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	43	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	77	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
9	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	44	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	78	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
10	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	45	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	79	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
11	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	46	VanA	<i>E. faecium</i>	128	8	80	VanA	<i>VanC2</i>	<i>E. casseliflavus</i>	64	16
12	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	47	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	81	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
13	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	48	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	82	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
14	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	49	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	83	VanA	<i>E. faecium</i>	256	16	
15	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	50	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	84	VanA	<i>VanC1</i>	<i>E. gallinarum</i>	512	64
16	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	51	VanA	<i>E. faecium</i>	128	8	85	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
17	VanA	<i>E. faecium</i>	256	16	52	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	86	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
18	VanA	<i>E. faecium</i>	256	16	53	VanA	<i>E. faecium</i>	128	8	87	VanA	<i>E. faecium</i>	256	16	
19	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	54	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	88	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
20	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	55	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	89	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
21	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	56	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	90	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
22	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	57	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	91	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
23	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	58	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	92	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
24	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	59	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	93	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
25	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	60	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	94	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
26	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	61	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	95	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
27	VanA	<i>E. faecium</i>	128	8	62	VanA	<i>E. faecium</i>	128	8	96	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
28	VanA	<i>E. faecium</i>	128	8	63	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	97	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
29	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	64	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	98	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
30	VanA	<i>E. faecium</i>	128	8	65	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	99	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
31	VanA	<i>E. faecium</i>	128	8	66	VanA	<i>E. faecium</i>	128	8	100	VanA	<i>E. faecium</i>	128	8	
32	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	67	VanA	<i>E. faecium</i>	128	8	101	VanA	<i>E. faecium</i>	256	16	
33	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	68	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	102	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	
34	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	69	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8	103	VanA	<i>E. faecium</i>	128	8	
35	VanA	<i>E. faecium</i>	256	8											

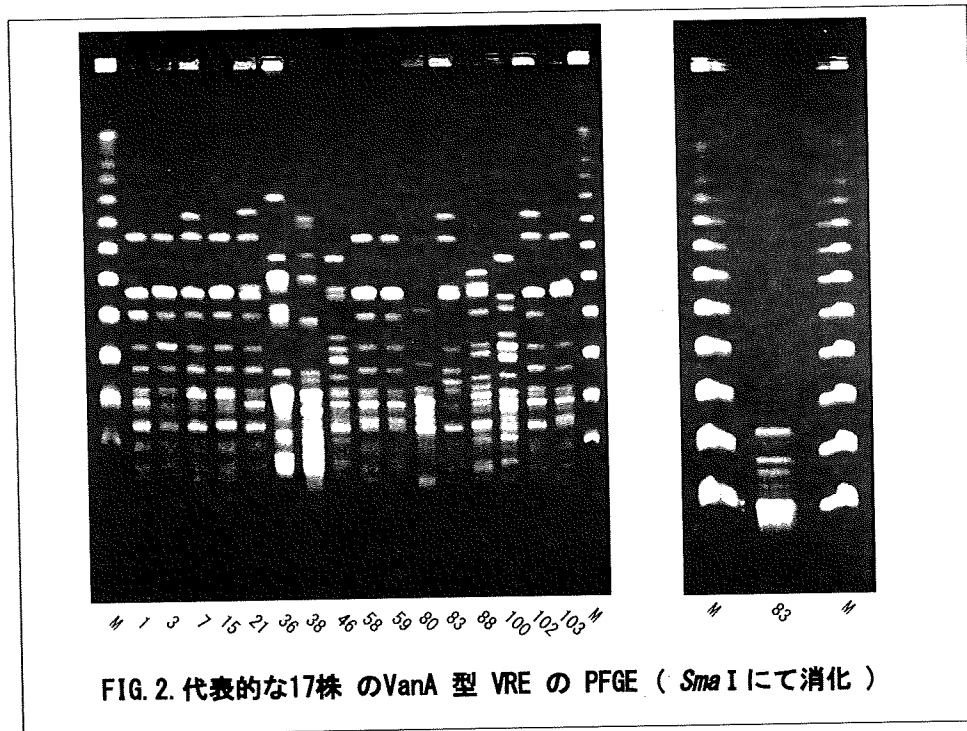


TABLE 2. Tn1546の各ORFのPCR解析

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
3	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
7	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
15	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
21	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
36	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
38	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
46	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
58	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
59	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
80	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
83	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
84	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
88	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
100	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
102	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
103	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-
std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

PCR産物のサイズ : + 野生型 ++ 野生型より大きいサイズ - 検出無し

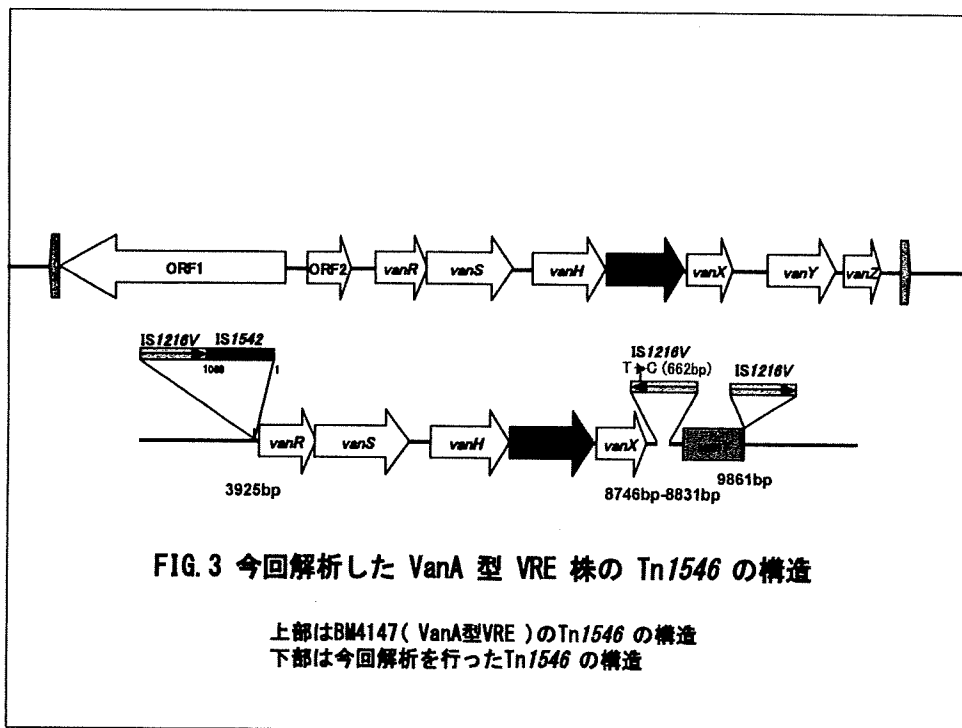


FIG. 3 今回解析した VanA 型 VRE 株の Tn1546 の構造

上部はBM4147 (VanA型VRE) のTn1546 の構造
 下部は今回解析を行ったTn1546 の構造

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)

研究要旨

近年、多剤耐性緑膿菌による院内感染が全国の医療施設で問題となっている。本研究の目的は、院内感染に関与する多剤耐性緑膿菌臨床分離株より流行型の薬剤耐性因子を同定し、それらをターゲットとした多剤耐性緑膿菌の迅速な検出法を開発することである。今年度は、これまでに東日本において高頻度に分離された高度多剤耐性緑膿菌 IMCJ2.S1 株が産生するアミノグリコシドアセチル化酵素 AAC(6')-Iae に着目し、同因子を標的とした同酵素産生株の簡易迅速診断法の開発、ならびに同酵素産生株の分子疫学解析を実施した。その結果、15分で AAC(6')-Iae 産生株を同定する事が可能なイムノクロマト法が完成した。また、同診断法の予備評価試験では、AAC(6')-Iae 産生株が、これまでに分離の報告がある宮城県、広島県、関東地方の他に、九州地方、四国地方、北海道においても分離される事が明らかとなった。

研究協力者

秋山 徹 (国立国際医療センター研究所)
安藤 公英 (同上)
島田 佳世 (同上)
賀来 満夫 (東北大学大学院医学系研究科)
霜島 正浩 (株式会社 BML 総合研究所)
坂入 和宏 (同上)
小川 美保 (同上)

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、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、耐性因子の探索を試みると共に、これまでに宮城県、広島県、関東地方において高頻度に分離された高度多剤耐性緑膿菌 IMCJ2.S1 株の分子疫学解析を行った。特に、同株の産生するアミノグリコシドアセチル化酵素 AAC(6')-Iae に着目し、その日本における分子疫学、および、同酵素を標的とした簡易迅速診断法の開発に取り組んだ。

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

B. 研究方法

1. 簡易迅速診断法の開発

AAC(6')-Iae産生株を簡便かつ迅速にスクリーニングする為の方法として抗AAC(6')-Iaeモノクローナル抗体を用いたイムノクロマト法を開発した。抗体は、His-AAC(6')-Iaeをラットに免疫後、腸骨リンパ節とHela細胞を融合させたハイブリドーマを作製し、その培養上清より精製した。第一次スクリーニングは、His-AAC(6')-Iaeを用いてELISAにより実施した。他のサブタイプAAC(6')-Iタンパク質との交差反応の確認は、精製タンパク質His-AAC(6')-Iae、-Iad、および-Ibを用いたELISAにより行った。得られた抗AAC(6')-Iae抗体を用いて、インフルエンザ診断キットを基にイムノクロマト法を構築した。

2. 抗AAC(6')-Iaeイムノクロマト法の評価試験

評価試験① 多剤耐性緑膿菌の多発事例があった関東地方の医療施設より分与いただいた緑膿菌臨床分離株116株について抗AAC(6')-Iaeイムノクロマト試験を実施した。

評価試験② 生化学的性状において緑膿菌であることが確認された臨床分離株129株について抗AAC(6')-Iaeイムノクロマト試験を実施した。

3. 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

開発したイムノクロマト法の評価試験においてAAC(6')-Iae陽性を示した緑膿菌臨床分離株に関して、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を用いて、高度多剤耐性緑膿菌IMCJ2.S1株との比較解析を行った。

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_{IMP-1}*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。イムノクロマト法の評価試験においてAAC(6')-Iae陽性を示した緑膿菌臨床分離株が同様の遺伝子周辺構造を有するかどうかを調べるために、陽性株のゲノムDNAを抽出し、PCRによるインテグロンの検出とその増幅断片のDNAシーケンス解析を行った。

(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. 簡易迅速診断法の開発

モノクローナル抗体のスクリーニングの結果、ELISAを用いた一次スクリーニングにおいてAAC(6')-Iaeに高い反応性を示す3種の抗体、1H7、3D4、および3F12を安定的に得た。これらのAAC(6')特異性を調べるために、精製タンパク質AAC(6')-Iae、-Iad、および-Ibを用いてELISAとウェスタンブロットングを行った結果、1H7と3F12がAAC(6')-Iaeに高い特異性を示す事が分かった(図1)。そのため、抗AAC(6')-Iaeイムノクロマト法の構築は、インフルエンザウィルスの迅速診断のためのイムノクロマト法を基に、1H7と3F12を用いて行った。具体的には、テストプレート内にセットしてあるメン

ブレンフィルター上の標識金コロイド塗布部には金コロイド標識抗 AAC(6')-Iae ラットモノクローナル抗体と確認ライン用の金コロイド標識ウサギγグロブリンが塗布してあり、メンブレンフィルター上の判定ライン部(T)には抗 AAC(6')-Iae ラットモノクローナル抗体を固相化し、確認ライン部(R)には抗ウサギ免疫グロブリン抗体を固相化した(図2)。このイムノクロマトでは、試料に AAC(6')-Iae 抗原が存在する場合、試料滴下部から移動してきた試料中の AAC(6')-Iae 抗原は、標識金コロイド塗布部において金コロイド標識抗 AAC(6')-Iae ラットモノクローナル抗体と結合し、複合体を形成する。クロマトグラフィーの原理により移動したこの複合体が、判定ライン部(T)において固相化されている抗 AAC(6')-Iae ラットモノクローナル抗体に捕捉され、これらでサンドイッチ型の複合体を形成し、金コロイドによる赤紫色のラインが出現する。また、同時に金コロイド標識ウサギγグロブリンも移動して確認ライン部(R)で抗ウサギ免疫グロブリン抗体に捕捉されるため、AAC(6')-Iae 抗原の有無にかかわらず赤紫色のラインが出現する(図3)。

2. AAC(6')-Iae イムノクロマト法の評価試験

構築された抗 AAC(6')-Iae イムノクロマト法の評価試験は、図4に示す操作手順で行った。

評価試験① 多剤耐性緑膿菌の多発事例があった関東地方の医療施設より分与いただいた緑膿菌臨床分離株 116 株について抗 AAC(6')-Iae イムノクロマト試験を実施した結果、60 株の AAC(6')-Iae 陽性株を検出した。AAC(6')-Iae 陽性株の検体材料はカテーテル尿が最も多く、次に喀痰が多かった。

評価試験② 生化学的性状において緑膿菌であることが確認された臨床分離株 129 株について抗 AAC(6')-Iae イムノクロマト試験を実施した。その結

果、40 株の AAC(6')-Iae 陽性株を検出した。AAC(6')-Iae 陽性株の検体材料の多くは、カテーテル尿であった。

3. AAC(6')-Iae の分子疫学解析

評価試験①で検出された60株の AAC(6')-Iae 陽性株と評価試験②で検出された40株の AAC(6')-Iae 陽性株、のべ100株についてパルスフィールド電気泳動を行った。その結果、比較的類似性の高いクラスターを複数示した(図5)。これら陽性株100株の薬剤感受性パターンは、1株を除く99株においてイミペネム(IPM)、アミカシン(AMK)、シプロフロキサシン(CPFX)の3剤耐性が確認された。しかしながら、3剤耐性を示した99株中2株は SMA ディスクを用いた試験においてメタロβラクタマーゼ非産生であり、IMCJ2.S1 株の IPM の MIC(128μg/ml)と比較して 32μg/ml と低い値を示した。3剤耐性を示さなかった1株は、AAC(6')-Iae 陽性にも関わらず IPM および CPFX 耐性の2剤耐性を示す AMK 感受性株であった。

4. *aac(6')-Iae* の遺伝子周辺構造

まず、評価試験で検出された AAC(6')-Iae 陽性株について、PCRにより *aac(6')-Iae* 遺伝子の有無を確認した。その結果、AAC(6')-Iae 陽性株100株のうち、1株を除く99株が PCR 解析においても *aac(6')-Iae* 遺伝子陽性を示した。しかしながら、これら99株の *aac(6')-Iae* 遺伝子陽性株のうち、1株については *aac(6')-Iae* 遺伝子内部において400番目のグアニンからアデニンの置換を確認した。この変異は、アミノ酸レベルでは、AAC(6')-Iae の134番目のグルタミンからリジンへの1アミノ酸置換に相当する。*aac(6')-Iae* 遺伝子陰性株については、複数回 PCR 解析を行ったが、いずれにおいても陰性であった。次に、*aac(6')-Iae* 遺伝子の周辺構造を調べるため

に、クラス1インテグロンの可変領域についてPCR解析を実施した。その結果、AAC(6')-Iae陽性株100株中、メタロ陰性を示した2株および薬剤感受性試験においてAMK感受性を示した2剤耐性の1株を除く97株は、可変領域にIMCJ2.S1株と同様に、メタロベータラクタマーゼをコードする bla_{IMP-1} 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 $aadA1$ 遺伝子を有していた。メタロ陰性を示した2株は可変領域に bla_{IMP} 遺伝子が存在せず、インテグロン構造中で、 $aac(6')-Iae$ が第一カセットとして存在した。イムノクロマト試験でAAC(6')-Iae陽性にも関わらず、PCR解析で $aac(6')-Iae$ 遺伝子陰性であった1株に関しては、インテグロンは検出されなかった。

D. 考察

多剤耐性緑膿菌による院内感染を防止するためには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:

・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。

・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

今年度は、抗 AAC(6')-Iae イムノクロマト法を開発し、その評価試験を行った。この評価試験の結果得られた AAC(6')-Iae 陽性株に関する分子疫学解析は、これまで宮城県、広島県、東京都の医療施設で分離が確認されている AAC(6')-Iae 産生高度多剤耐性緑膿菌が、北海道、九州地方、四国地方、中国地方においても分離されることを示しており(図 6)、この結果は、日本全土において AAC(6')-Iae 産生菌が存在する可能性、また、これらが抗生剤の使用により選択され院内感染を引き起す可能性を示唆している。今後は、 $aac(6')-Iae$ ならびに同遺伝子を含むインテグロンの伝達様式についての詳細を明らかにして行く必要がある。また、考察に述べたように、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は非常に重要である。

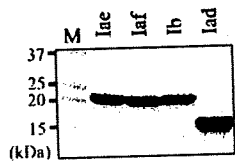
F. 研究発表

1. 論文発表

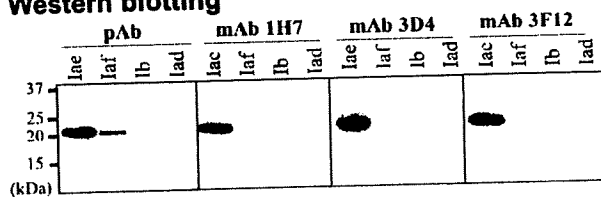
該当なし

図1 抗 AAC6')-lae モノクローナル抗体の特異性

A. 精製した AAC(6')-lae タンパク質



B. Western blotting



C. ELISA

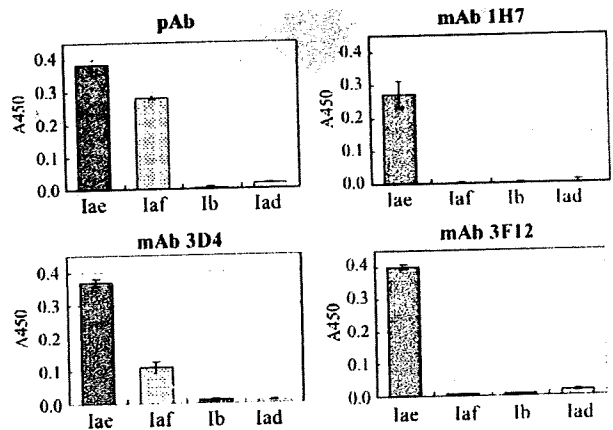


図2 抗 AAC6')-lae イムノクロマト法の開発

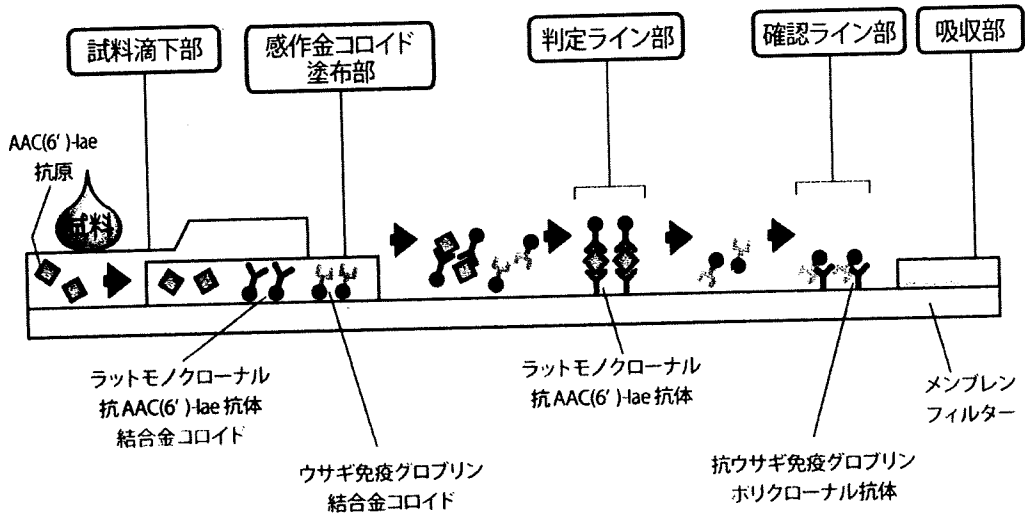
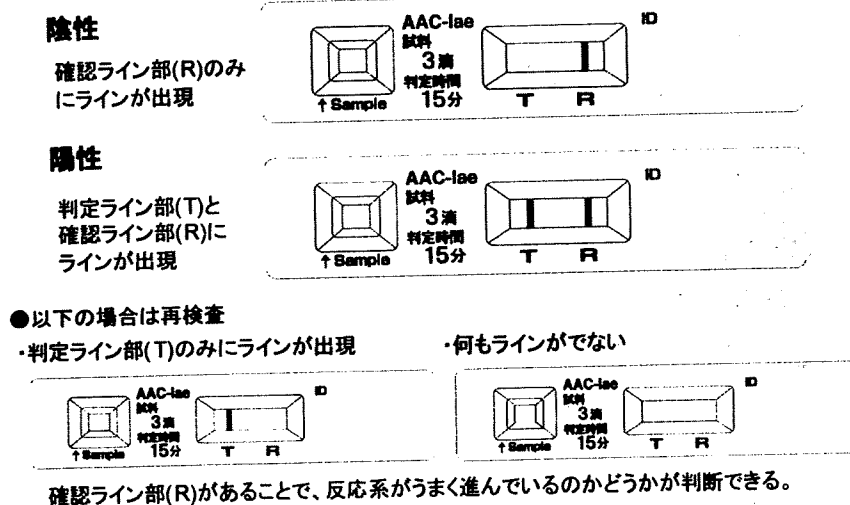
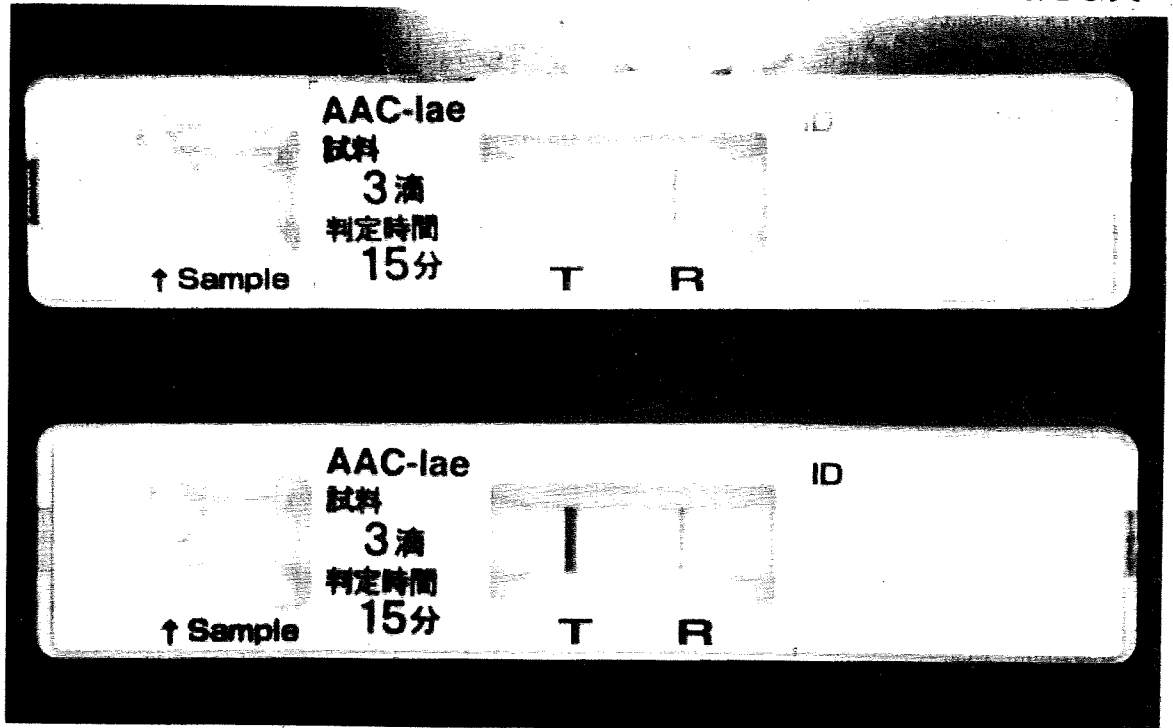


図3 開発した抗 AAC6')-lae イムノクロマト法の判定模式図と実際の写真

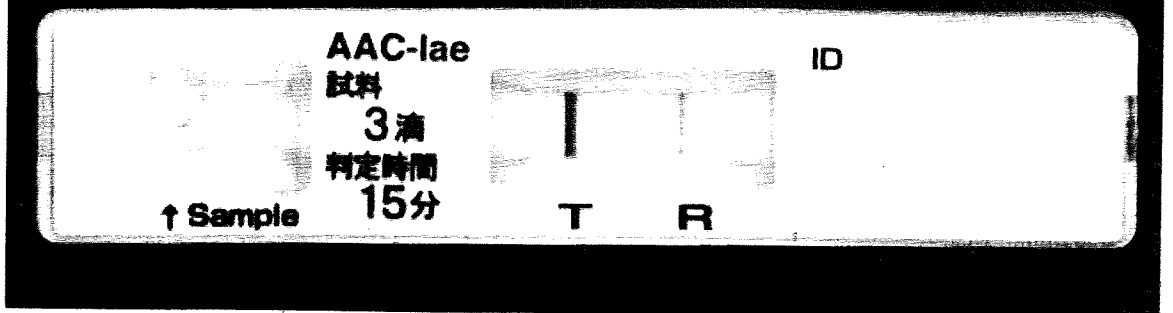


15分後の判定写真

陰性



陽性



AAC(6')-laeキットの構成内容

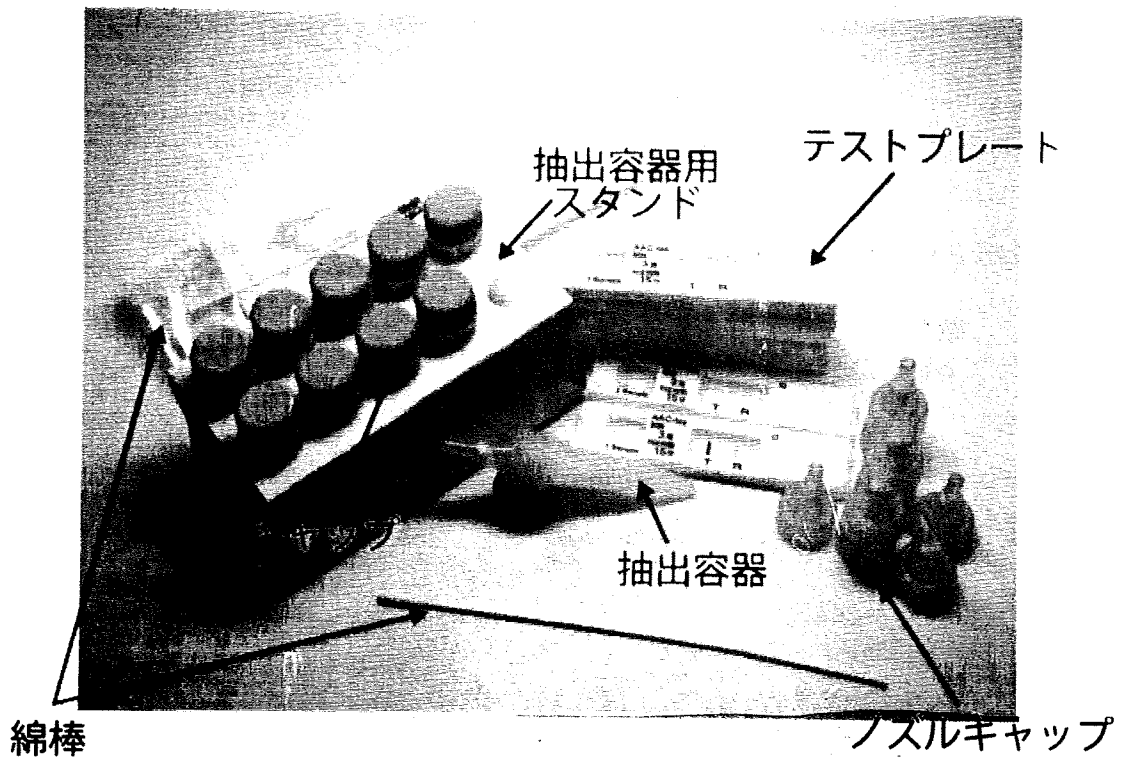
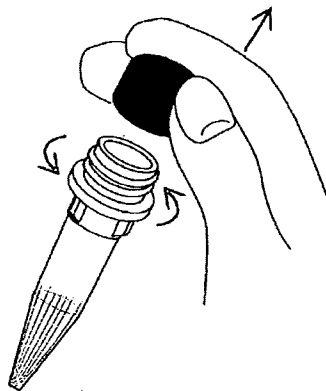


図4 開発した抗 AAC6'-Iae イムノクロマト法の操作手順

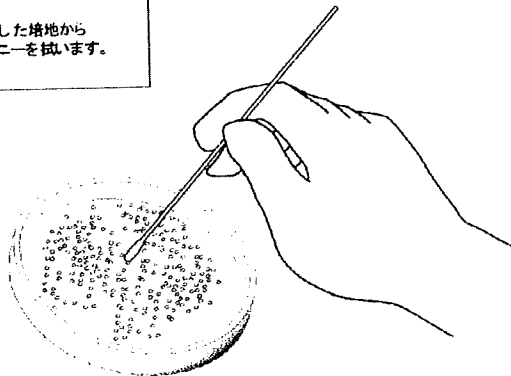
操作手順1 ... 抽出液の準備



緑色のキャップを取り外し、菌体を入れる準備をします。
*抽出液は予め容器内に充填されています。

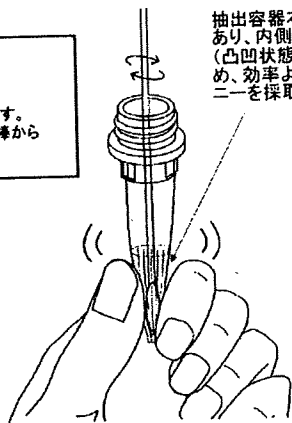
操作手順2 ... コロニーの採取

緑膿菌を培養した培地から緑膿菌のコロニーを拭きます。



操作手順3 ... 抽出作業

コロニーを拭った綿球部を抽出容器の底まで入れた後抽出容器を左右から挟みこみ綿棒を数回左右に回転させます。このことにより、コロニーが綿棒から抽出液中に移ります。

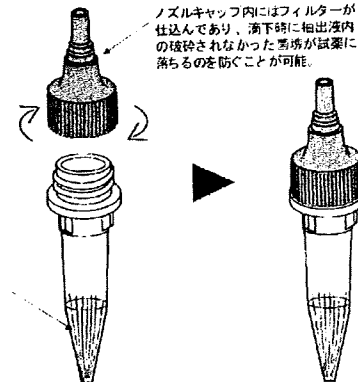


抽出容器本体は柔軟性があり、内側にはスリット状(凸凹状態)の溝があるため、効率よく綿棒からコロニーを採取することが可能。

操作手順4 ... 抽出作業

ピンク色のノズルキャップを容器に装着し、容器下部の溝の部分で指で握り合わせ、箇所を細かく壊し、数回振ると試料が完成します。

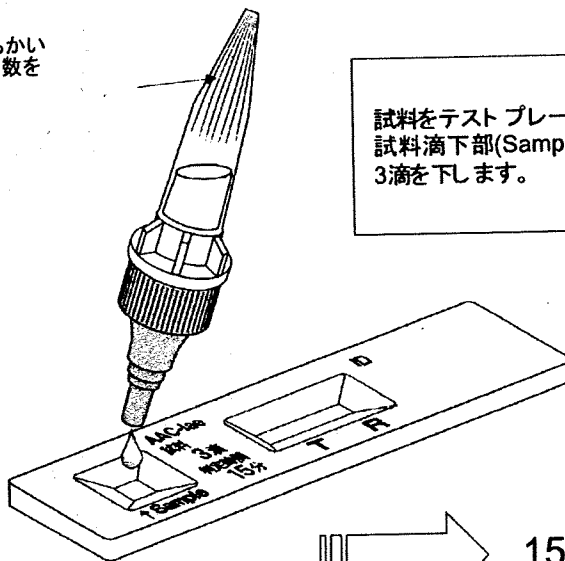
抽出容器本体は柔軟性があり、内側にはスリット状(凸凹状態)の溝があるため、効率よくコロニーを破碎することが可能。



ノズルキャップ内にはフィルターが仕込んであり、滴下時に抽出液内の破砕されなかった菌体が試薬に落ちるのを防ぐことが可能。

操作手順5 ... 滴下

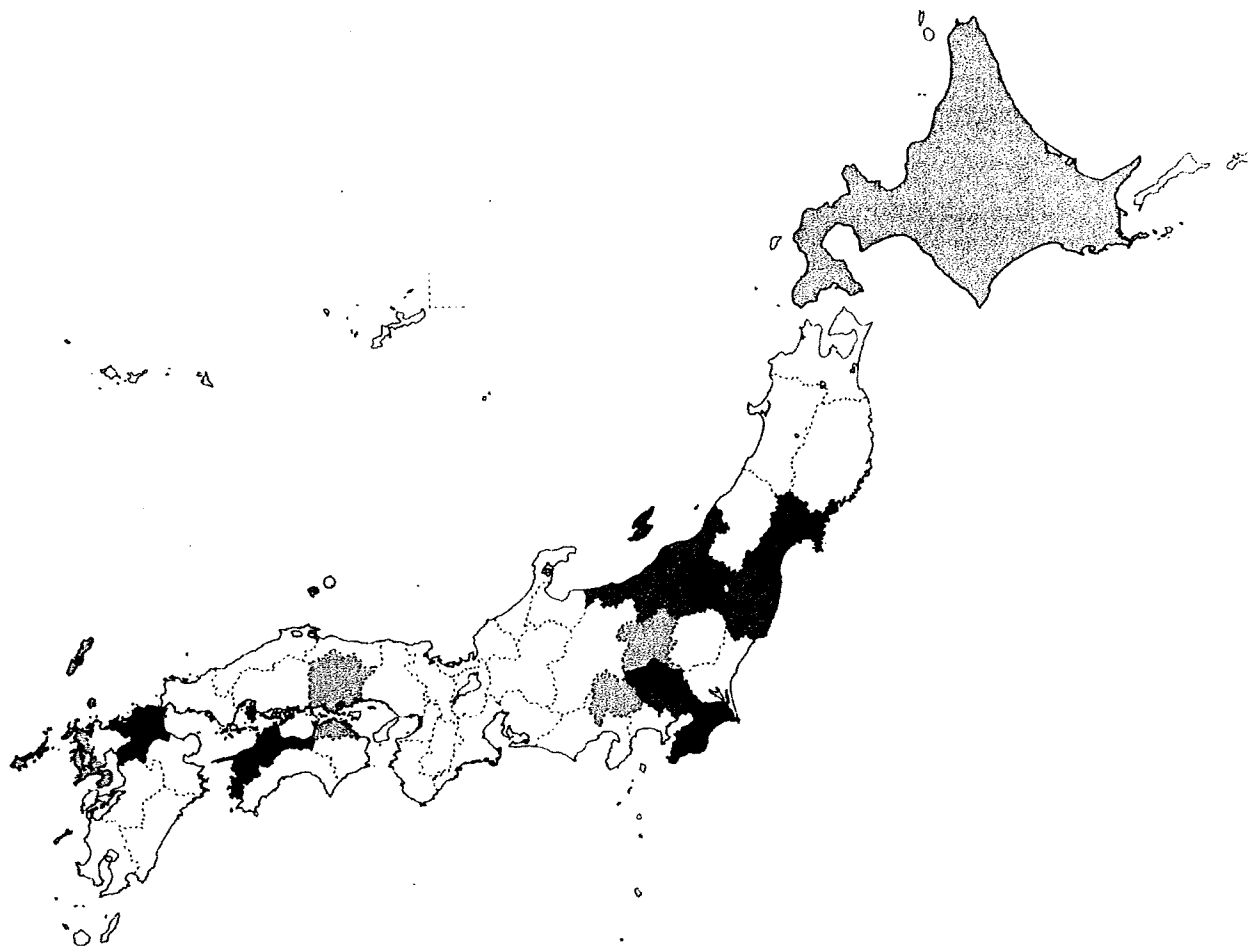
抽出容器はある程度柔らかいので、押す力加減で滴下数を調整することができます。



試料をテストプレートの試料滴下部(Sample)に3滴を下します。

15分間静置

図6 AAC(6')-Iae 陽性菌の日本における地理的分布



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（地研）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のが現状である。地研では、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地研への導入が進み、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。従って、本研究では、薬剤耐性菌による健康被害の発生・拡大防止における地研の役割を明確にし、具体的提言を行うために、地研の薬剤耐性菌調査機能強化のため研修会を行った。その結果、研修会の重要性及び今後薬剤耐性菌検査について、継続的に情報を発信し、議論できる地研ネットワークの構築の重要性が期待された。

研究協力者

綿引 正則（富山県衛生研究所）
磯部 順子（同上）
八柳 潤（秋田県健康環境センター）
白木 豊（岐阜県保健環境研究所）
鈴木 匡弘（愛知県衛生研究所）
菅野 奈美（福島県衛生研究所）
青木 敦子（埼玉県衛生研究所）
砂押 克彦（同上）
村上 光一（福岡県保健環境研究所）

A. 研究目的

薬剤耐性菌による院内感染（診療所等も含めた用語として、最近では「医療関連感染」と使用されており以下、これにならう）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研の細菌学的な専門性の高い検査解析能力は非常に有益である。しかしながら、実際にはほとんど利用されていないのが現状である。一方で、平成 19 年 4 月、医療法が改正され、医療関連感染の防止が、医療安全の一環として法的に義務付けられた。これにより、医療機関が患者に対して、薬剤耐性菌に関する対応、あるいはその情報公開等に関して、その責任が明確に示された。しかし、抗生物質等利用による化学療法剤の使用は、以前にも増して、新たな薬剤耐性菌の出現を招き、最近では、多くの化学療法剤に関して高度な耐性能力を獲得した多剤耐性菌が出現し、問題化している。また、このような薬剤耐性菌は医療機関だけの問題ではなく、食料自給率の低い日本においては、様々な国からのたくさんの食料、加工食品の輸入がおこなわれており、その食品を介した薬剤耐性

菌が国内に入ることが懸念されており、細菌学的に専門性の高い検査を行なっている地研の薬剤耐性菌の検査能力は、今後その必要性が高くなると思われる。

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(1)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あるいは最新の検査法）を把握するため、衛生微生物協議会に加入している地研及び政令都市の衛生研究所の細菌検査担当者を対象とした研修会を開催した。

また、医療関連感染のアウトブレイクが発生したとき、しばしば感染源調査を目的として、パルスフィールド電気泳動（PFGE）やその他 PCR をベースとした分子疫学的方法が試みられている。しかし、薬剤耐性菌の急速な伝播には、ファージやプラスミドを介した耐性遺伝子の急速な伝達がその要因であることが広く知られている。従って、これまでの遺伝子型別法は、染色体あるいはプラスミドを迅速に区別する方法はなく、その場合には詳細な実験的な解析を必要とし、実用的な迅速法の開発が望まれていた。従って、我々は、新しい方法の検討を開始した。

B. 研究方法

B-1. 研修会の実施

「薬剤耐性菌解析機能強化記述研修会」（以下、「研修会」として、これまで行ってきた薬剤耐性菌解析に関する地研アンケートの結果に基づ

き、研修日程、内容等の立案、選定を行った。募集期間は、8月上旬から9月上旬とした。

また、研修会で実施する実習の確認については、研究結果で詳細に述べることとする。

C. 研究結果

C-1. 研修会の概要

研修会は、平成21年10月30日(金)～31日(土)の二日間にわたり、国立感染症研究所村山庁舎・講義室及び実習室にて行なった。

微生物協議会に加入している関係機関に開催案内を送付した。その結果、44機関から応募あり、研修内容及び施設等の関係から、参加者は28名とした。

C-2. 実習内容

実習内容の選定は、2日間の実習日程、アンケートの結果から、法律上、薬剤耐性菌の感染が確認された場合の届出義務がある、医療関連感染症として重要なバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)およびメシチリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の検査法を行なうこととした。そして、内容としては、前者は、バンコマイシン耐性遺伝子の検出、後者は研究協力者のひとりである鈴木により開発されたPCRによる迅速なMRSAの分子疫学的解析法であるphage ORF typing法(POT法)

(Suzuki, M., et al. *J. Appl. Microbiol.*, 101:938-947, 2006; Suzuki, M., et al. *J. Appl. Microbiol.*, 107:1367-1374, 2009)を行うこととした。

また、アンケート結果で要望の強かった薬剤耐性菌のパルスフィールド電気泳動(PFGE)の実際や基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生菌の検査法については、協力研究者による講義形式で、行うこととした。

C-2-1. 実習内容の事前確認

実習に先立ち、実施内容について、協力研究者(7機関)間で実習内容の確認のため、実際のプロトコルに従って、コラボレイティブ・リサーチを実施した。

C-2-1-1. VRE同定のためのvan遺伝子のPCRによる検定

実習はVREのvan遺伝子を検出するPCRとした。VREのvan遺伝子のPCRによる検査法として、

病原体検出マニュアルに記載されている方法

(Dutka-Malen, S., et al. *J. Clin. Microbiol.*, 33:24-27, 1995)及びこれと並行して、使用するプライマーの本数が少ないPatel, R.らの方法(*J. Clin. Microbiol.*, 35:703-707, 1997)を検討した。PCRのプライマーは、プロトコルあるいは文献に記載されている配列を合成し、各協力研究者に配布した。また、実際のPCRは、使用したDNAポリメラーゼ及び増幅装置を記録した。また、VRE株は実習に使用予定の株を配付し、DNA調製法等は統一した。

その結果、実験実施者、PCR反応組成、PCR装置の違いによらず、安定な結果を与えたDutka-Malen, S.らの方法を採用することとした。一方、Patel, R.らの方法は、使用するPCRプライマーの本数が少なく、メリットがあると思われるが、今回の結果では、vanA, B及びvanC1, C23の鑑別不能という結果となる場合が報告され、再現性の点で問題があることが判明、実用的でない判断した。

C-2-1-2. MRSAのPOT法のコラボレイティブ・リサーチ

検査に使用するMRSA 10株、及びPOT法に使用する試薬の一部については、鈴木より供与されたものを使用した。

その結果、各機関で行なわれたPOT法の解析結果を取りまとめ、実習時の作業の確認を行なうことが出来た。

C-3. 研修会の実施と感想

研修会は、実習テキストを作成し(資料1)、予定通り、欠席者もなく実施された(資料2)。研修会后に実施した研修会に対する感想を資料3としてまとめた。

D. 考察

地研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我々研究班の活動の一環として、これまでのアンケート調査の結果に基づいて、研修会を企画、実施した。細菌学的な検査手法の習得に努め、討議することで、薬剤耐性菌検査だけでなく、検査結果の取扱い等に関する情報について、共有するきっかけになった。また、この研修会を足がかりに、我々の健康被害の大きなリスク因子のひとつである微生物、特に細菌の薬剤耐性菌の予防、蔓延防止に我々、地研がどのように拘ることが出来るのか考えるきっかけになったと思われる。

E. 結論

今回の研修会は、地研の検査担当者を対象に開催したものである。これにより地研の担当者における薬剤耐性菌検査に対する意識の向上や具体的な検査手法の習得等への足がかりになったと思われる。しかし、医療関連感染に関する予防、蔓延防止、アウトブレイクへの対応に関しては、検査を主体とする地研単独で対応するものではなく、関係者相互の連携が必要となる。今後、このような連携構築が具体的に議論されるなか、地研の役割を明確に位置づけられることが期待される。

また、今回あるいは今後予定される研究班の活

動から生まれるネットワークを活かす仕組みづくりとその維持が期待される。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

平成21年度事業
「認知症予防・認知症対応技術研修会」
テキスト

平成21年10月30(金)、31(土)日
国立認知症研究所(山形県)
(国直認知症センター山形)

研究分担者 森田 敏
(研究代表者 荒川重雄)

国立認知症研究所(山形県) 研究代表者(山形県) 研究代表者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)

研究分担者 森田 敏
(研究代表者 荒川重雄)

国立認知症研究所(山形県) 研究代表者(山形県) 研究代表者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)

認知症予防・認知症対応技術研修会に関する研究

研究分担者 森田 敏
(研究代表者 荒川重雄)

国立認知症研究所(山形県) 研究代表者(山形県) 研究代表者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)

研究分担者 森田 敏
(研究代表者 荒川重雄)

国立認知症研究所(山形県) 研究代表者(山形県) 研究代表者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)

認知症予防・認知症対応技術研修会に関する研究

研究分担者 森田 敏
(研究代表者 荒川重雄)

国立認知症研究所(山形県) 研究代表者(山形県) 研究代表者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)

研究分担者 森田 敏
(研究代表者 荒川重雄)

国立認知症研究所(山形県) 研究代表者(山形県) 研究代表者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)

認知症予防・認知症対応技術研修会に関する研究

研究分担者 森田 敏
(研究代表者 荒川重雄)

国立認知症研究所(山形県) 研究代表者(山形県) 研究代表者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)

研究分担者 森田 敏
(研究代表者 荒川重雄)

国立認知症研究所(山形県) 研究代表者(山形県) 研究代表者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)
地方自治体等関係者(山形県) 関係者(山形県) 関係者(山形県)

