

201028026A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

新型薬剤耐性菌等に関する研究

(H21 - 新興・一般 - 008)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 荒川 宜親

平成23(2011)年3月

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金
 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
 「新型薬剤耐性菌等に関する研究」班 名簿

研究代表者	荒川宜親	国立感染症研究所 細菌第二部	部 長
JANIS 研究 グループ 研究分担者 (50音順)	一山 智	京都大学大学院医学研究科臨床病態検査学	教 授
	河野文夫	独立行政法人 国立病院機構 熊本医療センター	副院長
	北島博之	地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター 新生児科	部 長
	小西敏郎	NTT 東日本関東病院 東京医療保健大学	副院長 教 授
	鈴木里和	国立感染症研究所細菌第二部	主任研究官
	谷原真一	福岡大学医学部衛生学教室	准教授
	土手健太郎	愛媛大学医学部集中治療部	准教授
	長沢光章	東北大学医学部附属病院診療技術部 東北大学医学部	副部長 教 授
	藤本修平	東海大学医学部基礎医学系生体防御学	教 授
	宮崎久義	独立行政法人 国立病院機構 熊本医療センター	名誉院長
	森兼啓太	山形大学医学部附属病院検査部	副部長 准教授
山口恵三	東邦大学医学部微生物・感染症学講座	教 授	

区 分	氏 名	所 属	職 名
薬 剤 耐 性 菌 基 礎 研 究 グ ル ー プ 研 究 分 担 者 (5 0 音 順)	飯沼由嗣	京都大学大学院医学研究科臨床病態検査学	助教授
	池 康嘉	群馬大学大学院医学系研究科 生体防御機構学/細菌感染制御学	教 授
	切替照雄	国立国際医療研究センター研究所 感染制御部研究部	部 長
	倉田 毅	富山県衛生研究所	所 長
	黒崎博雅	熊本大学大学院医学薬学研究部 構造機能物理化学分野	准教授
	柴山恵吾	国立感染症研究所細菌第二部	室 長
	松本哲哉	東京医科大学微生物学講座	教 授
	松本智成	地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 臨床研究部	部 長
	山口恵三	東邦大学医学部微生物・感染症学講座	教 授
	山根一和	国立感染症研究所細菌第二部	主任研究官
	山本友子	千葉大学大学院薬学研究院 微生物薬品化学講座	教 授
	和田昭仁	国立感染症研究所細菌第一部	室 長

目 次

I. 総括研究報告書

荒川宜親	新型薬剤耐性菌等に関する研究	1
------	----------------	---

II. 分担研究報告書

一山 智	国立大学附属病院感染対策協議会感染サーベイランスのシステム化と JANIS システムとの連携に関する研究	28
河野文夫	MRSA 感染症治療における転帰悪化への要因解析に関する研究	30
北島博之	新生児における病院感染症の予防あるいは予防対策に関する研究 (第2報)	33
小西敏郎	手術部位感染症の低減化に関する研究に関する研究	58
鈴木里和	院内感染対策サーベイランス還元情報の医療機関特性による層別化 および罹患率算出方法の妥当性に関する研究	70
谷原真一	傷病名に「敗血症」を含む入院レセプトの傷病名の検証	81
土手健太郎	ICU 内の院内感染に及ぼす新型薬剤耐性菌の影響と 感染サーベイランスの精度管理についての研究 (ICU 部門参加施設におけるサーベイランス実施体制と 提出データの精度に関する研究)	84
長沢光章	日常検査における薬剤耐性菌の検出方法の確立および 薬剤感受性検査の精度管理に関する研究	91
藤本修平	厚労省 JANIS 事業の安定運用と改善及び院内感染対策の 高精度化を目的とした電子システムの研究	108
宮崎久義	院内感染対策支援の方法と効果に関する研究	116
森兼啓太	院内感染対策サーベイランスにおける院内感染対策の 質向上に関する研究	119
山口恵三	「特定菌(特定耐性菌)異常集積時における対応事例集 各論『アシネトバクター属』の作製	125
山根一和	JANIS 事業の全般に関する安定運用と改善、精度向上に関する研究	143

荒川宜親	新型の薬剤耐性菌の分子機構の解析-----	147
	日本国内で分離された <i>Acinetobacter baumannii</i> の分子疫学的解析-----	152
池 康嘉	グラム陽性菌（腸球菌、黄色ブドウ球菌）の多剤耐性菌の研究--	157
飯沼由嗣	VRE、MDRP 等の伝播様式と蔓延防止に関する研究-----	163
切替照雄	多剤耐性緑膿菌の院内感染対策に関する研究-----	170
倉田 毅	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-----	182
黒崎博雅	カルバペネム耐性菌をはじめとする新型の薬剤耐性菌の 構造・機能解析と立体構造に立脚した蛍光剤の分子設計 並びに迅速・簡易検査法の確立-----	195
柴山恵吾	結核菌におけるピラジナミド作用メカニズムの研究-----	206
松本哲哉	国内の皮膚感染症患者より分離された市中感染型MRSAの解析---	209
松本智成	多剤耐性菌の耐性機序に関する研究-----	213
山口恵三	カルバペネム薬分解酵素の検出法構築に関する研究-----	217
山本友子	肺炎球菌のケトライド耐性機構ならびに 耐性伝播機構に関する研究-----	221
和田昭仁	小児侵襲性感染由来β-ラクタム剤低感受性・耐性肺炎球菌の解析-	224
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	228
IV. 研究成果の刊行物・別冊・資料	-----	230

I. 総括研究報告書
(平成22年度)

新型薬剤耐性菌等に関する研究

研究代表者 荒川 宜親（国立感染研 細菌第二部）

研究要旨

海外や国内の医療現場では、カルバペネムを含む多剤に耐性を獲得した緑膿菌やアシネトバクター属菌、さらに NDM-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)を産生する肺炎桿菌などの様々なグラム陰性菌が新たに出現、蔓延し、それらによる感染症の発生が、医療先進国、発展途上国を問わず、医療現場で現実的な問題となっている。このような状況の中で、本研究班では、国内で臨床分離された各種の病原細菌の中から、既知および新型の薬剤耐性機序を獲得した菌株を対象として、細菌学的、分子生物学的、分子疫学的などの多面的な観点から様々な解析などを実施し、同時に、各種検査法の開発や改良などを試みた。特に、2010年8月に Lancet Infectious Diseases 電子版で報告され、世界的に関心事となった NDM-1 型 MBL を産生する多剤耐性肺炎桿菌などの緊急調査を実施し、国内では、NDM-1 産生株は極めて稀である事を確認した。同時に NDM-1 産生株の簡便なスクリーニング検査法の改良等をおこなった。さらに地方衛生研究所における耐性菌の検査技術の向上のための技術講習会などを実施した。一方、国内の医療機関で分離される主要な病原細菌における薬剤耐性の獲得状況や各種薬剤耐性菌の検出状況、それらによる感染症の発生状況などを把握し、それぞれの医療機関における院内感染対策を支援する目的で、平成 12 年より厚労省により実施されている「院内感染対策サーベイランス (JANIS) 事業」について、その 5 つの部門サーベイランスである、検査部門、全入院患者部門、集中治療(ICU)部門、手術部位感染症(SI)部門、新生児集中治療(NICU)部門の安定的運用と改善を図るため、専門的かつ学術的な観点から様々な研究と支援を行なった。

研究分担者 (50 音順)

飯沼由嗣 京都大学大学院医学研究科
臨床病態検査医学 准教授
池 康嘉 群馬大学大学院 細菌感染制御学 教授
一山 智 京都大学大学院医学研究科
臨床病態検査医学 教授
河野文夫 国立病院機構熊本医療センター 副院長
北島博之 大阪府立母子保健総合医療センター
新生児科 部長
切替照雄 国立国際医療センター 感染症制御研究部
部長
倉田 毅 富山県衛生研究所 所長
黒崎博雅 熊本大学大学院 構造機能物理化学分野
助教授
小西敏郎 NTT 東日本関東病院 副院長
柴山恵吾 国立感染研 細菌第二部 第四室 室長
鈴木里和 同上 主任研究官
谷原 真一 福岡大学医学部衛生学
疫学・医療経済 准教授
土手健太郎 愛媛大学医学部集中治療部 准教授
長沢光章 東北大学附属病院
診療技術部・臨床検査 技師長
藤本修平 東海大学医学部医学科基礎医学系
生体防御学 教授
松本哲哉 東京医科大学微生物学 教授

松本智成 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター
免疫感染症学 部長
宮崎久義 国立病院機構熊本医療センター
名誉院長
森兼啓太 国立感染研 感染症情報センター 主任研究官
山口恵三 東邦大学医学部 微生物/感染症学 教授
山根一和 国立感染研 細菌第二部 主任研究官
山本友子 千葉大学大学院微生物薬品化学 教授
和田昭仁 国立感染研 細菌第一部 第三室 室長

A. 研究目的

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)やバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)などの薬剤耐性菌の蔓延とそれらによる感染症、特に医療行為に関連する医療関連感染症(院内感染症)が、欧米諸国のみならず、発展途上国を含む全ての国々や地域で、医療を脅かす現実的な障壁となっている。それらに加え、近年、カルバペネムを含む多剤に耐性を獲得したアシネトバクターや NDM-1 や KPC-2 と命名された特殊な酵素(β-ラクタマーゼ)を産生する肺炎桿菌や大腸菌などの新型の多剤耐性菌が出現、蔓延し医療にとって新たな脅威となっている。国内では、既に多剤耐性緑膿菌が、各地の基幹病院や大学附属病院などの大規模医療施設のみならず中小規模の病院においても、2-3%程度分離されるようになり、一部

の医療機関では、同時に多数の患者より分離されるなど、アウトブレイクが発生し、無視できない状況となっている。さらに、海外で問題となっている多剤耐性アシネトバクターなどが、新たに東京都内の大学附属病院（特定機能病院）や複数の基幹的医療施設で多数の患者から分離されるなど、多剤耐性菌をめぐる状況は、ますます深刻な事態に陥りつつある。また、栃木県内の大学附属病院に入院し治療を受けていた患者より、NDM-1を産生する大腸菌が国内ではじめて検出され大きな関心事となった。

そこで、このような事態に対処するため、本研究班では、基礎研究グループと JANIS 研究グループの二つの研究グループを組織し、前年度と同様に、様々な研究を実施した。基礎研究グループでは既存の薬剤耐性菌のみならず、新型の薬剤耐性機構を獲得した薬剤耐性菌の早期検出とそれらが獲得している耐性メカニズムについて分子、遺伝子レベルで解明をするとともに、その結果に基づいて、迅速、簡便な検査法の構築を目指す。同時に、既存の薬剤耐性菌とともに多剤耐性アシネトバクターなどの検出状況や遺伝子型別、さらにそれらの動向について、遺伝子解析、分子疫学的な解析手法などを加味して調査、分析を行なった。また、NDM-1 産生株等の新型多剤耐性菌については、厚生労働省の課長通知に基づいて緊急に実施された。一方、地方自治体が所管する医療機関において特定の薬剤耐性菌のアウトブレイクが発生した際に適切に対応するためには、地方衛生研究所における薬剤耐性菌の検査、解析技術の向上を図る必要があるため、基礎研究グループのサブグループとして地方衛生研究所グループを組織し、技術研修会の実施や検査情報の提供を行なった。また、これらの研究と並行して、JANIS 研究グループでは、厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)事業の安定的運用と改善のため、学術的、科学的観点から研究を実施し、JANIS 事業の向上を支援した。

（倫理的側面での配慮）

基礎研究グループでは、臨床分離された菌株についての解析が主であり、研究倫理の審査対象外である。薬剤耐性菌の分子疫学解析を行なう場合、若干の診療情報を必要とする際には、研究者の所属する機関で、疫学研究倫理審査等を受け、承認された後に実施した。JANIS 事業で提出されるデータを用いる研究を行う場合は、あらかじめ JANIS 運営委員会に申請し、さらに、総務省の統計データの扱いに関するルールに則り実施された。JANIS 事業に提出されるデータは、感染症の起因菌の種類や感受性試験結果、感染症患者の ID、入院日、基礎疾患名、感染症名などの臨床情報の一部の情報に限られ、しかも患者 ID は提出する医療施設の側で変換され、匿名化されて提出されるため、蓄積されたデータベースの情報から遡って逆に患者個人を特定することは技術的に不可能となっている。尚、研究班外へのデータの漏出などが発生することのないよう、その取り

扱いについては、データを格納するパソコンを鍵のかかる部屋に設置し、起動時にパスワードを設定し、さらにデータファイルを開く際にもパスワードを要求し管理者を限定する等十分な安全対策を行っている。

B. 研究方法

平成 22 年度の研究班では、JANIS 事業の平成 19 年 7 月からの大幅な改善を受け、「検査部門」、「集中治療部門(ICU)」、「全入院患者部門」、「手術部位感染症(SSI)部門」、「新生児集中治療部門(NICU)」の 5 つのサーベイランス部門において、JANIS 提出データや集積方法、集計方法、還元図表の内容など種々検討を継続した。また、JANIS 事業の円滑な運用のため、JANIS 事業参加医療機関に対し様々な支援を実施した。

同時に、サーベイランスデータの質的向上を図るため、細菌の分離/同定や薬剤感受性試験法の精度管理法の向上を目的として、昨年度に引き続き「臨床分離株の薬剤感受性成績調査および各種抗菌薬に対する感受性測定に関する研究」が（社）日本臨床衛生検査技師会の研究協力者グループにより行なわれた。

一方、地方衛生研究所における薬剤耐性菌の検査技術の向上のため、検査法の評価と最適化、および技術講習会などを行った。同時に、厚生労働省の課長通知に基づいて、我が国の臨床現場で分離された NDM-1 産生株などの多剤耐性腸内細菌の緊急調査を実施した。

上記の研究とともに、基礎研究グループでは、臨床現場で患者より分離された様々な薬剤耐性菌（抗酸菌を含む）について、複数の研究者で分担し、それらの細菌が獲得した新たな耐性メカニズムなどに関する基礎的な研究を行ない、得られた研究成果に基づき、耐性菌の検査法の開発や改善などが種々検討された。

C. 研究結果

1. 我が国における新たな多剤耐性菌の実態に関する研究

2010 年 9 月 15 日より 12 月 28 日の間に、厚生労働省の課長通知に基づき、全国の医療機関より感染研細菌第二部に送付された菌株のうち、検査や解析の対象となった株は、153 株であった。PCR 解析などの結果、それらの中に、NDM-1 産生株は 2 株、KPC 型カルバペネマーゼ産生株は、2 株確認された。菌種は 4 株とも *Klebsiella pneumoniae* (肺炎桿菌) であった。最も多いカルバペネム分解酵素は、IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼであり、72 株においてその遺伝子が確認された。しかし、77 株からは、NDM-1、KPC、IMP-型の何れの遺伝子も検出されず、カルバペネム耐性に関与する新しい機構を獲得した可能性のある株も一部に存在する化膿性が推察された。

詳しい調査結果は、厚労省のホームページ<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou19/cyousa_kekka_110121.html>を通じて公開されている。

2. JANIS 事業の有効かつ効率的なサーベイランスシステム改善等に関する研究

(山根一和、鈴木里和、筒井敦子、荒川宜親)

平成19年7月に大幅な改善を行なった院内感染対策サーベイランス(JANIS)事業<<http://www.nih-janis.jp/>>について、我が国の医療機関における薬剤耐性菌の検出状況や院内感染症の発生状況およびその要因についてより正確に把握が可能となるように、引き続き、運用体制の改良や整備を継続した。平成22年11月にサーベイランス参加施設の追加募集を行ない平成23年1月時点で951の医療機関が参加する多施設参加型の全国(ナショナル)サーベイランスに発展している<<http://www.nih-janis.jp/hospitalist/index.html>>。さらに、今後も引き続き、厚労省に提出されたサーベイランスデータの精度管理や運用の改善などを進め、我が国の院内感染対策の向上に寄与するナショナルサーベイランスシステムとして発展させるべく、仔細の検討と改善のための研究を継続している。

a. JANIS 事業の全般に関する安定運用と改善、精度向上に関する研究 (山根一和)

JANIS 検査部門のデータ精度を向上させるために、JANIS 検査部門参加医療機関から2009年1月1日～12月31日に提出されたすべてのデータのうち、薬剤感受性検査を行っているデータを対象とし、疑義のあるデータを抽出した。疑義のあるデータを報告した医療機関に対し、電子メールで確認を行った。232医療機関から提出された84,123件のデータが疑義のあるデータと考えられた。131医療機関(56.5%)から送信された57,046件分(67.8%)のデータについて疑義の原因が明らかとなった。明らかになった原因は合計147件で、もっとも多かった原因は「システム設定間違い」70件であった。中でもST合剤およびβ-ラクタム/β-ラクタマーゼ阻害剤の合剤のMIC値の設定間違いが多かった。

JANIS 検査部門では疑義のあるMIC値が報告された場合、警告を出すシステムが準備されているが、今回の検討によって、現在設定されている条件に加えて、1. 2のべき乗でないMIC値が報告された場合(Etestを除く)、2. ST合剤のMIC値が2のべき乗で報告された場合、の2つの条件についても追加する必要があると考えられた。

b. 院内感染対策サーベイランス還元情報の医療機関特性による層別化および罹患率算出方法の妥当性に関する研究 (鈴木里和)

JANIS 全入院患者部門においては箱ひげ図を用い

た施設間比較を実施し、昨年度の研究により、現行の罹患率、感染率の算出方法では、患者回転率が低い(平均在院日数が長い)医療機関では理論的に「入院患者あたり」と「患者日あたり」とで発生頻度による施設間順位が大きく乖離する可能性が示唆された。そのため、本年は実際のデータを用いた検討を行った。

全入院患者部門において2008年の12ヶ月間毎月データを提出した300医療機関のMRSA感染症発生頻度を対象として解析を行った。病院特性は病床数、患者回転率、病院タイプ(大学病院、国立病院機構、公的病院、私立病院)を指標とした。MRSA感染症の発生頻度は現行の「入院患者あたり」に加え、「患者日あたり」および「病床数あたり」を算出し、施設間順位の一貫性について検討した。ただし患者日に関するデータは収集していないため、入院患者数より推定した値を用いた。

検討した病院特性のうち患者回転率のみがMRSA感染症の発生頻度と独立して相関しており、その他の施設特性による層別化の必要性は認めなかった。患者回転率は平均在院日数を反映しているため、今後、平均在院日数の長短による層別化の検討が必要と思われる。また、患者回転率が1未満の医療機関では「入院患者あたり」と「患者日あたり」とで発生頻度による施設間順位が大きく乖離する可能性が明らかとなった。「患者日あたり」と「病床数あたり」で算出した発生頻度は施設間比較では高い相関を示したため、「患者日あたり」の代替として「病床数あたり」を使用しうる可能性が示唆された。

3. JANIS 各部門研究グループにおける研究成果

c. 検査部門サーベイランス研究グループ

「特定菌(特定耐性菌)異常集積時における対応事例集」の作成 (古谷信彦/山口恵三)

医療関連感染に精通している医療従事者が配置されていない医療施設で特定菌(特定耐性菌)の異常集積がみられた場合に何を、どのように調査し、どのように対応していくかについての情報が迅速に取得できるように「特定菌(特定耐性菌)異常集積時における対応事例集」の作成を試みた。今年度は、菌種別の各論部分のうちアシネトバクター属について作成した。作成方法はPubmedを用いた文献のmeta-analysisで院内感染のアウトブレイクに関わるもの81論文を調査し、内容が昨年決定したフォーマットに合致するもの64文献を対象とした。その結果、アウトブレイクを起こしたアシネトバクター属の91%が*A. baumannii*あるいは*A. calcoaceticus*であり、推定アウトブレイク期間の平均値、中央値は約6カ月であった。また、アウトブレイクの約20%において再アウトブレイクが報告されていた。アウトブレイクが発生した病棟の内訳ではICUが71%と圧倒的に多く、外科系部門での発生が内科系部門での発生約4倍を占めていた。アウトブレイクの感染・汚

染源及び伝播経路は不明の13論文を除いた51論文で66同定されており、ヒト-ヒト伝播は24、患者あるいは患者周囲環境からの伝播は6、機器・環境-ヒト伝播は36であった。伝播様式はほとんどが接触感染であったが、4件でエアゾルによる感染の可能性が指摘されていた。アウトブレイクが判明した時点での対策では、標準予防策、接触予防策、環境清掃、環境調査、医療従事者・患者の保菌状況調査が多く施設で採用されていた。再アウトブレイク時の対策としては、上記の対策で実施されていないものの追加や、病棟閉鎖を伴う徹底的な環境清掃などがみられた。

d. 全入院患者部門サーベイランス研究グループ

MRSA 感染症治療における転帰悪化への要因解析に関する研究 (河野 文夫)

MRSA 感染症の治療では、治療期間の延長や、転帰の悪化および医療経費の増大等、多くの問題が指摘されている。これら問題点を改善するために、MRSA 感染症治療で、転帰を悪化させる要因の検証を行った。

本年は、国立病院機構54施設で実施している薬剤耐性菌サーベイランスデータを基に、多項ロジスティック解析を用いることでMRSA 感染治療の転帰を悪化させる要因を明らかにした。

e. ICU 部門サーベイランス研究グループ

ICU 内の院内感染に及ぼす新型薬剤耐性菌の影響と感染サーベイランスの精度管理についての研究 (ICU 部門参加施設におけるサーベイランス実施体制と提出データの精度に関する研究) (土手 健太郎)

集中治療部における院内感染の実態を解明し、集中治療部における院内感染を減少させるために、ガイドラインの作成(H19, 20年度)と実施状況の調査、アンケート調査、サイトビジットなどを行い、感染防御ガイドラインの改正やICUの設備基準の改正に提言を行う。

国内の20数か所のICUを訪問し、そのICUにおける構造や感染対策を詳細にチェックしたところ、ベッド回りの広さ、汚物処理室の広さ、ICU内での薬液混合の方法など、問題が多いことが分かった。

f. SSI 部門サーベイランス研究グループ

手術部位感染症の低減化に関する研究

(小西敏郎)

本邦におけるSSI発生率の動向およびSSI発生に伴う医療費の増加額を明らかにすることを目的に、SSIサーベイランス全国集計(JHAIS No.11)の分析およびNTT 東日本関東病院での医療費調査を施行した。

本邦のSSI発生率は徐々に低下の傾向がみられること、比較的精度の高いSSIサーベイランスが本邦で広く施行されていること、SSI防止のためにある程

度の費用をかけても、費用対効果からみて許容されることが明らかとなった。

g. NICU 部門サーベイランス研究グループ

新生児における病院感染症の予防あるいは予防対策に関する研究 (第2報) (北島 博之)

1) 全国NICU病院感染症データ収集体制を確立する。平成20年度までに、全国のNICU施設における感染症入力用ソフトの作成を行ったが、それが利用されているかどうかを検討した。全国の465新生児研修施設にアンケート用紙を郵送し、213施設(46%)から有効回答を得て分析を加えた。サーベイランスに参加している施設は44(21%)であるが、入力用ソフトw6の使用は2施設のみであった。サーベイランスの認知度が低い事は、われわれの情宣が足りないだけではない。サーベイランスに参加していない116施設からは、条件がそろえば参加可能であるという回答を得た。条件として、入力者の簡素化や医師以外の入力者の必要性があげられた。サーベイランスへの情報提供者として、看護師(65)、ICT(36)、メディカルクラーク(50)が適任者とする施設もあったが、医師以外にいない(73)と回答する施設も多い結果であった。感染症入力シートは、必須入力情報は4項目であり簡素化は既にされているので、シートの周知徹底と、その感染症診断の重要性や還元情報の良さを強調して、使用施設を増やす方策を考えなければならない。

2) NICU病院感染予防対策のガイドラインから形をハンドブックに改めて作成を進めた。第4章 薬剤・輸液管理 1. 抗菌薬の使用 の項を全面改訂した。さらに、第1章 NICUにおける感染予防体制 6. 医療従事者と患者家族へのワクチン接種について と 7. サーベイランス業務 そして 第3章 環境整備 2. 再使用する医療器具・器材の管理 について追加を行った。

3) 正常新生児病棟での病院感染予防対策を進める。特に全国一般病院における産科混合病棟の解消と母子同室を進める。

4. JANIS 研究に関連する個別の研究成果

h. 院内感染対策支援の方法と効果に関する研究

(宮崎久義)

院内感染対策サーベイランス(JANIS)の全入院患者部門サーベイランスに参加する国立病院グループ58施設に対し、薬剤耐性菌による感染症アウトブレイクの経験の有無とアウトブレイク時の対応、相談窓口の必要性について調べた。アウトブレイクはMRSAに多く、次いでMDRPに見られた。相談窓口については2/3の回答施設が必要と答えた。

薬剤耐性菌によって引き起こされる院内感染症のアウトブレイク発生を終息するための対応方針と問題点が明らかになった。

i. 院内感染サーベイランスにおける院内感染対策の質向上に関する研究 (森兼啓太)

厚生労働省事業「院内感染対策サーベイランス」

の還元情報に関するダウンロード状況の調査、還元情報の感染対策への活用状況および方法の調査を実施した。

事業の還元情報のダウンロード率は還元情報全体の20~40%台であった。感染対策への活用およびその方法は施設によりばらつきが大きかった

j. 厚労省 JANIS 事業の安定運用と改善及び院内感染対策の高精度化を目的とした電子システムの研究 (藤本 修平)

システムの開発、普及、JANIS への応用。精度管理、標準化のための研究。アルゴリズムの正当性・有用性の検証を実施し、web 版「アンチバイオグラムの自動分類と二次元キャリアマップ」の JANIS 事業実装レベルでの運用検証、評価、普及。電子データ、菌株収集システムの構築と分子疫学的検索と電子データの突合。JANIS データの検証が行なった。

k. 日常検査における薬剤耐性菌の検出方法の確立および薬剤感受性検査の精度管理に関する研究 (長沢 光章)

平成9年度から継続している薬剤耐性率の経年的推移の把握、JANIS に参加している施設における日常検査での検出対象薬剤耐性菌と精度管理方法のアンケート調査の集計・解析を行った。

大きな薬剤耐性率の変化や多剤耐性菌として問題となっている MDRP、MDRA の増加傾向は認められなかった。JANIS 参加施設における日常検査で対象としている薬剤耐性菌、検出方法、精度管理の現状が把握できた。

l. 傷病名に「敗血症」を含む入院レセプトの傷病名の検証 (谷原 真一)

健康保険組合における被保険者本人及び被扶養者の敗血症を傷病名に含む診療報酬明細書に記載された全ての疾病を検討し、年齢階級別により敗血症並びに感染症以外の傷病名も含めた出現頻度を検討した。

感染症以外で頻度の高い疾病は10歳以上が「その他消化器系」(53.5%)、「糖尿病」(31.5%)、10歳未満で「徴候・異常所見等分類不能」(45.5%)、「その他周産期で発生した病態」(42.1%)と年齢で異なっていた。

m. 国立大学附属病院感染対策協議会感染サーベイランスのシステム化と JANIS システムとの連携に関する研究 (一山 智)

国立大学病院における医療関連感染(デバイス関連、手術部位)のサーベイランスを実施した。血液培養の採取状況、検出菌についてパイロットスタディを実施し、国立大学病院における血流感染の疫学調査を開始した。

国立大学病院において統一基準による手術部位感

染サーベイランスが実施でき、比較的感染率が高いことが確認された。パイロットスタディを経て血液培養、血流感染の疫学調査を全国的に必要性、妥当性が確認された。

5. 薬剤耐性菌基礎研究グループの研究成果

n. 国内の皮膚感染症患者より分離された市中感染型 MRSA の解析 (松本 哲哉)

2010年2月から9月まで日本各地の医療機関から検査センターに提出された皮膚疾患患者からの検体5577件を対象として、分離された MRSA 241株を対象に各種の検討を行った。

市中感染型は141株存在し MRSA の約6割を占めた。若年層以外の患者からも分離され、菌株の2割から PVL が検出された。アミノグリコシドやマクロライド耐性化が認められ、従来とは異なる傾向が示された。

o. グラム陽性菌(腸球菌、黄色ブドウ球菌)の多剤耐性菌の研究に関する研究 (池 康嘉)

日本で新たに分離された VRE の遺伝学的解析を行った。由来は国際医療センター1株、山口衛生環境研究所15株、ミロクメディカルラボラトリー10株、国立感染症研究所5株、沖縄県衛生環境研究所11株である。

日本で分離されたそれぞれの VRE の遺伝子型、染色体 DNA の PFGE、プラスミド解析等を行った。そのうち沖縄県で初めて分離された E. faecium vanA について詳しく解析した結果、vanA がプラスミド上に存在し、数年前に東京で分離された Tn1546 と同じ構造であった。

p. 肺炎球菌のケトライド耐性機構ならびに耐性伝播機構に関する研究 (山本 友子)

2009~2010 に全国の医療機関で分離された肺炎球菌500株についてマクロライド系抗菌薬とケトライド抗菌薬(テリスロマイシン TEL)に対する耐性化状況、耐性機構、耐性因子の伝播機構に関する分子遺伝学的研究を行った。

TEL 耐性菌1株、中程度耐性菌2株が分離された。耐性の主要因は *ermB* であった。実験室由来 TEL 高度耐性菌を解析し、高発現 *ermB* 獲得に加え L22 の特定部位が変異すると肺炎球菌は TEL 高度耐性化することが明らかとなった。

q. カルバペネム耐性菌をはじめとする新型の薬剤耐性菌の構造・機能解析と立体構造に立脚した蛍光剤の分子設計並びに迅速・簡易検査法の確立 (黒崎 博雅)

本年度は、メタロ-β-ラクタマーゼの基質認識に重要なアミノ酸残基の同定と活性中心に存在する二つの Zn(II)の結合親和性を検討するために、VIM-2 メタロ-β-ラクタマーゼと酢酸イオンとの複合体並びに Cd(II)置換 VIM-2 メタロ-β-ラクタマーゼの X

線結晶構造解析を行った。さらに、チオール化合物の IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼに対する阻害様式を明らかにするために、活性中心の Zn(II)を Co(II)で置換した金属置換 IMP-1 酵素を調製し、チオール化合物との相互作用を分光学的に検討し、以下の研究成果が得られた。

1. VIM-2 メタロ-β-ラクタマーゼと酢酸イオンとの複合体の X 線結晶構造解析
基質や阻害剤の結合・認識に重要なアミノ酸残基を同定するために、VIM-2 メタロ-β-ラクタマーゼと酢酸イオンとの複合体の X 線結晶構造解析を行った。Native VIM-2 と今回得られた構造との比較から、低分子の酢酸イオンの Zn(II)への結合に伴ってループ 1 だけではなく、ループ 2 も著しく可動していることがわかった。特に、ループ 2 上にある Arg228 は基質認識に重要な役割を担っていると考えられた。

2. Cd(II)置換 VIM-2 メタロ-β-ラクタマーゼの X 線結晶構造解析

高濃度 Cd(II)存在下、Cd(II)置換 VIM-2 メタロ-β-ラクタマーゼの結晶化を行った。X 線結晶構造解析から、活性中心に存在する二つの Zn(II)はすべて Cd(II)に置き換わっていることがわかった。また、活性中心近傍に位置している Asn233 は一つの水分子を介して、二つの Cd(II)に配位した水分子に水素結合していた。この結果から、Asn233 は二つの Cd(II)に配位している水分子を基質へ求核攻撃できるように方向付けする役割を担っていると考えられた。

3. Co(II)置換 IMP-1 とチオール化合物との相互作用

Co(II)置換 IMP-1 とチオール化合物との分光滴定を行った結果、チオール化合物のチオレート基は Co(II)置換 IMP-1 酵素の活性部位の金属イオンに配位することが明らかになった。これより、阻害剤が配位することによって酵素活性を阻害すると考えられた。

r. 多剤耐性緑膿菌の院内感染対策に関する研究
(切替 照雄)

多剤耐性緑膿菌に関する全国アンケート調査を実施し、日本の多剤耐性緑膿菌の現状を把握するとともに、多剤耐性緑膿菌迅速検出法としての抗 IMP-1 イムノクロマト法を構築した。

アンケート調査の結果、日本の医療施設で多剤耐性緑膿菌は新興しているが、この3年間では減少傾向にあることが分かった。イムノクロマト法は多剤耐性緑膿菌のモニタリングおよび早期検出に有効である。

s. 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
(倉田 毅)

地研の細菌検査担当者を対象として昨年度に実施した研修会とほぼ同じ内容で耐性菌の検査技術向上を目的とした研修会を開催した。また、耐性菌の新

しい分子疫学的方法の開発を行った。

今年度の研修会には27名の参加者があった。また、新しい分子疫学的手法として LinePCR を開発した。伝達性の機能遺伝子単位の異同を迅速に解析する方法として利用できることが示唆された。

t. 小児侵襲性感染由来β-ラクタム剤低感受性・耐性肺炎球菌の解析
(和田 昭仁)

2007年7月から2011年1月までに8県で分離された小児侵襲性感染症由来肺炎球菌441株のペニシリン G、セフトキシム、メロペネム、パニペネムに対する感受性を測定し、シーケンスタイプを決定した。

血清型19AでシーケンスタイプST320を示す菌は、6株全てがペニシリン G の MIC として 2-4 μg/mL、メロペネムの MIC として 0.25-0.5 μg/mL を示した。

u. カルバペネム薬分解酵素の検出法構築に関する研究
(石井良和、山口 恵三)

SMA ディスクを用いると検出困難な NDM-1 産生株が存在するため、その効率的な検出法に関する検討を行った。また、これまで検出方法がないカルバペネム系薬耐性アシネトバクター属菌の検出キットの構築を行った。

200~300 μg/mL のジピコリン酸含有培地を用いると NDM-1 を含むメタロβラクタマーゼ産生菌の検出が可能であることを明らかにした。イムノクロマト法による OXA-型カルバペネマーゼ産生菌の検出法を構築した。

v. VRE、MDRP 等の伝播様式と蔓延防止に関する研究
(飯沼由嗣)

緑膿菌の簡易分子疫学解析法開発のため、臨床分離株における ORF 保有パターンを調査し、MLST 解析との相関の確認および菌株特異的 ORF の特定を行い、タイピングに利用する ORF をほぼ特定した。

Genomic islet の保有パターン検出によって MLST 解析と相関のある結果が得られ、ファージを検出することで株レベルでの識別が可能であった。タイピングに利用する ORF セットをほぼ特定した。

w. 結核菌におけるピラジナミド作用メカニズムの研究
(柴山恵吾)

ピラジナミドの抗菌作用メカニズムとして、菌体内での標的候補分子ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ(Rv1330c)への作用による ATPase 活性の発現との関連を解析した。

ピラジナミドは菌体内でピラジン酸に変換され Rv1330c に作用し、ニコチン酸の正常な代謝を阻害するとともに ATPase 活性を発現させて ATP を消費させることが、抗菌活性のメカニズムと考えられた。

x. 「抗酸菌症の耐性機構：結核菌と比較して」に

関する研究 (松本 智成)

Mycobacterium avium and *intracellulare* complex (MAC)のMIC分布は*M. tuberculosis*と比べ高く、しかも薬剤感受性域が高く設定されており*M. tuberculosis*で耐性と判断されるMIC値でもMACでは感受性と判断された。*M. avium* ATCC 25291および*M. intracellulare* ATCC 13950の遺伝子配列を比較すると今回測定したすべてのMAC菌株においてrpo β hotspotに変異が認められた。

同じ抗酸菌である*M. tuberculosis*と比較すると非結核性抗酸菌症、特に、MACにおける薬剤感受性の設定は現実とかけ離れている。このことが2007 ATS guidelineにおける薬剤感受性が不要につながっている。MACのMICによる薬剤感受性試験の判定域の再評価が必要と判断する。また、RFPに対してMICが0.03の株があることより、治療の際はMIC測定を行い、MICが高い場合はRFPを使用せず、MICが*M. tuberculosis*の感受性域に低い場合はRFPもしくはRFBを加療メニューに加えたほうが妥当である。

y. 新型の薬剤耐性菌の分子機構の解析 (和知野純一、荒川宜親)

16S rRNA methyltransferase NpmAは、16S rRNAをメチル化することにより、細菌にアミノグリコシド耐性を付与する酵素である。本研究では、NpmAの詳細な機能を明らかにするために、X線結晶構造解析を行った。その結果、2.0Åの分解能で構造を決定することができた。NpmAは10個の α -helixと9個の β -strandsで構成され、Rossmann-fold様構造をしていた。活性中心には1分子のS-adenosyl-L-homocysteine(SAH)が結合していた。メチル基転位活性を中心に担うアミノ酸は107番目および197番目のトリプトファンであると予測され、実際にこれら2つのアミノ酸をアラニンに置換すると、NpmAのメチル基転位活性は完全に失われた。本研究により得られた構造情報は、16S rRNA MTaseを不活化する阻害剤開発等への応用が期待できる。

z. 日本国内で分離された *Acinetobacter baumannii* の分子疫学的解析

(松井真理、荒川宜親)

近年、世界中でアシネトバクター属、特に *Acinetobacter baumannii* による感染症の増加と急速な多剤耐性化が進んでいる。本研究は、わが国で分離されたアシネトバクター属の分子疫学的性状を検討した。

2000年から2008年にわが国で分離されたアシネトバクター属のうち、重複株を除いた59株を対象にカルバペネム耐性遺伝子の型別、菌種の再同定、Multilocus Sequence Typing (MLST) 解析を行った。イミペネム非感性 (MIC; $\geq 8 \mu\text{g/mL}$) であった26株のうち、24株はメタロ- β -ラクタマーゼ産生株であった。*A. baumannii* は59株中21株 (35.6%) のみと

諸外国の報告に比べると少なく、*A. genomic species* 3が23株、*A. genomic species* 13TUが15株含まれていた。また、*A. baumannii* 21株のうち6株がイミペネム非感性であった。IMP-1型メタロ- β -ラクタマーゼ産生の4株全てがMLST解析で新規のシーケンスタイプ(ST)であった一方で、2株はOXA型 β -ラクタマーゼ産生株であり世界流行株とされる clonal complex 92に属していた。

メタロ- β -ラクタマーゼ産生 *A. baumannii* は全て新規 ST であり日本固有の株の存在が示唆された。一方で、カルバペネム耐性の世界流行株も国内に存在しており、今後の広がりには注意が必要と考えられる。

D. 考 察

1. JANIS 事業の有用性と今後の発展の重要性

多剤耐性を獲得した緑膿菌は、平均的な検出頻度は未だ低い(3%程度)ものの、広く国内の医療施設に広がり、治療に難渋する事例も散見されている。さらに、新たに問題となっている、多剤耐性を獲得したアシネトバクター・バウマニについては、JANISの検査部門データを集計することにより、その分離頻度(0.3%程度)を、比較的容易に把握できる。このように、JANIS事業のデータを集計、解析することで、新たに問題となった多剤耐性アシネトバクターのような新型の耐性菌の分離状況等をつぶさに把握することができ、院内感染対策の支援のみならず、行政に対し科学的なデータを提供できる優れたサーベイランスシステムとなっており、今後の更なる充実と発展が期待される。

2. JANIS 検査部門データの活用の推進

JANIS 検査部門サーベイランス参加医療機関が、厚労省にデータを提出するのみならず、自施設のデータを活用し、よりレベルの高い対策に活用することができるように研究班として、解析ソフト(2DCM-web)を開発した。このソフトにより、医療機関内で分離される細菌の分別とそれぞれの広がりを経時的、空間的に、しかも視覚的に容易に把握する事ができる。このソフトについては、平成23年4月よりJANIS検査部門サーベイランス参加施設において、無償で利用できるようになり、それぞれの医療機関における対策の向上に貢献する事が期待されている。

3. NDM-1 を産生する多剤耐性腸内細菌

NDM-1型メタロ- β -ラクタマーゼを産生する多剤耐性肺炎桿菌や大腸菌については、国内では、現時点では極めて稀な耐性菌であることが、9月-12月にかけて実施された緊急の調査により確認できた。しかし、埼玉県で検出された2株については、それぞれの患者には海外への渡航歴はなく、感染源が特定できていない。この事実は、既に国内の一部の医療機関において、NDM-1産生株の患者間伝播が発生

している可能性を示唆しており、今後もその分離状況などについて厳重に監視する必要がある。

4. NDM-1 産生株の検出法の改良の必要性

NDM-1 産生株については、多くがイミペネムやメロペネムなどのカルバペネムに耐性を示すことから、その検出は比較的容易と考えられて来た。しかし、国内で分離された3株のNDM-1産生株に対しては、IPMの最小発育阻止濃度(MIC)が、 $2\mu\text{g/ml}$ 以下であり、「感性(S)」と判定されてしまうことが明らかとなった。このような形質を示すNDM-1産生株が少なからず存在する事が、海外からの報告でも明らかとなっている。IMP-1やVIM-2などのMBLを単独で産生する株の場合、我々が開発したメルカプト酢酸ナトリウム(SMA)を用いた試験により簡単にスクリーニングすることが可能であるが、NDM-1産生株は、同時にCMY-型やCTX-M-型などの別の種類の β -ラクタマーゼを産生していることが多く、原法のSMA disk法では、検出しづらい事が判明した。そこで、試験法を改良し、CAZの代わりに、MEPMのdiskを用い、MEPM diskとSMA diskの間隔を5-8mm程度に短縮することで、IPMのMIC値が低い株であっても検出が可能となることが確認され、研究班として、全国の病院の検査部などに情報提供を行った。この変法(modified-SMA disk法)については、更なる検証が必要であるが、PCRなどの装置を持たない一般の細菌検査室でもNDM-1などのMBL産生株のスクリーニングの実施が容易になり、今後も、継続した改良と検証を進める予定である。

5. 新型薬剤耐性菌に関する研究の推進の必要性

1990年代の後半から多剤耐性を獲得した緑膿菌やアシネトバクターなどのグラム陰性菌の多剤耐性菌が出現し、2000年以降増加しつつあり、一部の医療機関では、アウトブレイクを引き起こし、死亡者も出るなど、医療現場で国内外を問わず深刻な問題となっている。特に、最近では、IMP-1やVIM-2などのメタロ- β -ラクタマーゼ(MBL)に加え、NDM-1型のMBLもインド/パキスタン地域から英米、さらに世界各国に広がりつつあり大きな関心事となっている。それらに加えOXA-23やKPC-2などのカルバペネマーゼを産生する多剤耐性株、Qnrペプチド、AAC(6')-Ib-cr、QepAなどのプラスミド媒介性のフルオロキノロン耐性を獲得した病原菌、RmtBやArmAなどのプラスミド媒介性のアミノ配当体超高度耐性遺伝子を獲得したグラム陰性桿菌など多種多様な新型の多剤耐性菌などの出現と蔓延が大きな問題となっている。また、特効薬であるマクロライドに耐性を獲得したマイコプラズマや、これまでペニシリン耐性株はいないと認識されていたB群連鎖球菌(GBS)においてもペニシリン低感受性株(PRGBS)が新たに出現したり広がりつつあり、薬剤耐性菌をめぐる状況は、ますます複雑な様相を呈しつつある。

しかし、薬剤耐性菌、特に新型薬剤耐性菌に関する基礎研究を担う研究者数は年々減少傾向にあり、

前述したように、複雑な状態に陥っている薬剤耐性菌の研究に十分な対応ができない状況にあり、公衆衛生上も大きな問題となっている。そこで、将来を担う若手の研究者の育成のためにも、感染症の研究の中で薬剤耐性の問題を重点課題に位置づけて研究費の大幅な増額などを実施することが極めて重要となっている。

6. 地方衛生研究所における新型薬剤耐性菌の検査技術の向上の必要性

近年、多い薬剤耐性アシネトバクターやNDM-1産生株等の新型の薬剤耐性菌が相次いで出現し、一部は院内感染の原因となっている。行政対応が必要になった場合は、菌株の検査や解析は、地方衛生研究所で実施することになるが、種類や耐性機序が多様であるため、現時点で多くの地方衛生研究所で十分な対応ができないのが実態である。そこで、検査や解析の技術を地方衛生研究所に移転する必要があり、研究班の活動の一環として今後も継続する事が必要となっているが、本来は国の事業として、技術講習会などの実施が望まれる。

E. 結論

研究班として学術的観点から、様々な支援を行ない院内感染対策サーベイランス事業の安定的運用と改善のため、大きく貢献する事ができたが、引き続きの支援の継続が不可欠である。また、国内外の医療機関において様々な新型の薬剤耐性菌が検出されており、それらの動向の監視の継続、さらに、それらが獲得した新規の薬剤耐性メカニズムを分子、遺伝子レベルで解析し、その成果に依拠して新たな検査法などの開発を目指す研究の継続と推進が不可欠となっている。

F. 健康危険情報

国内の医療機関でアウトブレイクを引き起こした多剤耐性アシネトバクター・バウマニについて解析した結果、多くは、遺伝子型がST92、あるいはその近縁のクローナル・コンプレックス92(CC92)と呼ばれる特定の遺伝子型の耐性株であることが確認されたため、今後、この種の多剤耐性アシネトバクター・バウマニの分離状況やアウトブレイクの発生状況について、特に注意をしつつ監視を継続する必要がある。

G. 研究発表 (研究代表者の関連分のみ)

(分担研究者の分は各々の分担報告書に記載)

1. 論文発表

1. Wachino J, Shibayama K, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Arakawa Y. RmtC introduces G1405 methylation in 16S rRNA and confers high-level aminoglycoside resistance on Gram-positive microorganisms. FEMS Microbiol Lett. 2010

Oct;311(1):56-60

2. Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species. J Antimicrob Chemother. 2010 Sep;65(9):1975-83.

3. Wachino J, Yamane K, Suzuki S, Kimura K, Arakawa Y. Prevalence of fosfomycin resistance among CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes. Antimicrob Agents

Chemother. 2010 Jul;54(7):3061-4.

4. Yamaguchi Y, Takashio N, Wachino J, Yamagata Y, Arakawa Y, Matsuda K, Kurosaki H. Structure of metallo- β -lactamase IND-7 from a *Chryseobacterium indologenes* clinical isolate at 1.65-Å resolution. J Biochem. 2010 Jun;147(6):905-15.

2. 学会発表
多数のため省略

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当するものなし

Ⅱ. 分担研究報告書

我が国における新たな多剤耐性菌の実態に関する研究

研究代表者 荒川宜親（国立感染症研究所 細菌第二部）

研究要旨 本研究は、NDM-1型やKPC型βラクタマーゼ等を産生する腸内細菌科の多剤耐性菌が、我が国においてどの程度浸淫しているかの実態を把握することを目的として実施された。2010年9月から12月にかけて、カルバペネム系、フルオロキノロン系、アミノ配糖体系の3系統すべての抗菌薬に耐性を示す腸内細菌科に属す細菌を全国の医療機関より収集し、PCR法により、NDM-1型、KPC型、IMP-1型、IMP-2型、VIM-2型の5種類のカルバペネム耐性遺伝子の検出を行った。期間中、153株が国立感染症研究所に送付され、うち72株（47.1%）がIMP-1型カルバペネム耐性遺伝子陽性、2株（1.3%）がNDM-1型カルバペネム耐性遺伝子陽性、同じく2株（1.3%）がKPC型カルバペネム耐性遺伝子陽性であった。KPC型カルバペネム耐性遺伝子を保有していた2株は渡航歴のある同一患者より分離された*K. pneumoniae*であったが、NDM-1型カルバペネム耐性遺伝子を保有していた*K. pneumoniae*2株はいずれも渡航歴の無い2名の患者より分離されたものであった。本研究の結果は我が国においてカルバペネム耐性を示す腸内細菌科の多剤耐性菌が広く蔓延していることを示すものではなかった。しかし、渡航歴の無い患者からNDM-1型カルバペネム耐性遺伝子保有株が分離された事および多くのIMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子保有株が報告された事は、今後もこれらの多剤耐性菌の動向を注視する必要性を示すと考えられた。

協力研究者：

近田俊文（国立感染症研究所細菌第2部）

山根一和（同上）

鈴木里和（同上）

和知野純一（同上）

松井真理（同上）

甲斐久美子（同上）

吉村由美子（同上）

瀧世志江（同上）

筒井敦子（同上）

山岸拓也（同上）

A. 研究目的

近年、医療現場における多剤耐性菌の広まりが世界的な問題となっている。特に、2000年代後半以降は、腸内細菌科においてそれまで比較的稀であったカルバペネム耐性を含む多剤耐性菌の報告が増加し、さらに、2010年には、国内で初めてNDM-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌による感染症患者の報告がなされた。これらを受け、本研究では、NDM-1型やKPC型βラクタマーゼを産生する腸内細菌科の細菌が我が国においてどの程度浸淫しているかを把握することで、将来における蔓延のリスクを評価し、今後の薬剤耐性菌対策立案に必要な知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

● 対象

対象は国内の患者から通常の診療において採取された検体より分離された菌のうち

ア. 腸内細菌科の細菌

かつ

イ. カルバペネム系、フルオロキノロン系、アミノ配糖体系の3系統すべての抗菌薬（各1剤以上）に「R（耐性）」と判定されたものとした。

ただし、NDM-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌においてはイミペネムの最小発育阻止濃度（MIC）が比較的低い株が報告されていることから、イミペネムが耐性でなくてもセフトジジムに対して高度耐性を示す株であれば対象に加えることとした。

研究期間は2010年9月15日から12月28日としたが、この期間以前に分離された菌株であっても、上記ア. とイ. の基準を満たしている場合には解析対象とした。

● 該当菌株の報告および患者情報の収集

医療機関に対し、上記ア. とイ. の基準を満たしている株が分離された場合には、指定の「様式1」（添付資料）を記入し、電子メールもしくはFAXで国立感染症研究所に報告するよう依頼した。

● 菌株の輸送

基準に該当する菌が分離された医療機関に対して、国立感染症研究所から菌株輸送に関する器材を送付した。該当菌株は器材の中に含まれていた「イミペネム5mg/L ミューラーヒントン寒天培地入り試験管」に接種された後に、菌株輸送用容器に収納され、国立感染症研究所細菌第二部に輸送された。

菌株の輸送は世界保健機関（WHO）の「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス（2009-2010版）」

および国立感染症研究所「病原体等の輸送・運搬に関する取扱要領」の「カテゴリーAの感染性物質」輸送方法に準拠した。

- 菌種の同定

送付された菌株は MicroScan WalkAway 96 (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティック社) を用い、同定用パネル (Neg Combo Panel 6.11J) により菌種同定を行った。同定が不可能であった菌株についてはアピ 20 (シスメックス社) を用いた。

- 薬剤感受性試験

薬剤感受性検査はドライプレート栄研 (栄研化学) を用いた微量液体希釈法によりゲンタマイシン、アミカシン、シプロフロキサシン、ドリペネム、イミペネム、メロペネム、セフトジジム、コリスチン、ポリミキシン B について送付された菌株の MIC を測定した。

- PCR による薬剤耐性遺伝子の検査方法

PCR 法により、NDM-1 型、KPC 型、IMP-1 型、IMP-2 型、VIM-2 型の 5 種類のカルバペネム耐性遺伝子の検出を行った。

1. DNA 抽出 (boil 法)

ミューラーヒントン平板培地に抗菌薬ディスク (セフトジジムあるいはイミペネム) とともに被検菌を一晩培養した。抗菌薬ディスク近傍からコロニーをかきとり、TE-8 buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) 700 μ L に McFarland 0.5 程度になるよう懸濁し、100 $^{\circ}$ C のヒートブロックで 10 分間加熱、加熱後 13,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心後、上清 100 μ L を分取した。

2. PCR

illustra Hot Start Mix RTG (GE Healthcare) にプライマー (終濃度 0.4 μ M)、抽出 DNA 1 μ L を加え、滅菌精製水で 25 μ L にメスアップし反応溶液とした。NDM-1、KPC、IMP-1 は表 1 記載のプライマーのうちいずれかを使用した。PCR 反応は、94 $^{\circ}$ C 2 分の後、94 $^{\circ}$ C 1 分、55 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒を 29 サイクル行った後、72 $^{\circ}$ C 5 分反応させた。同様に、陽性対照溶液、陰性対照溶液 (抽出 DNA を加えない) を作製し、同時に PCR 反応させた。

3. アガロースゲル電気泳動

DNA 増幅の確認は、アガロースゲル電気泳動法で行った。0.5%TBE buffer で作製した 2%アガロースゲルを用いて、0.5% TBE buffer 中で 100V 約 40 分泳動後、0.5 μ g/mL のエチジウムブロマイド溶液で染色し、トランスイルミネーターで UV 照射下でゲル写真を撮影した。DNA サイズマーカーとして 100bp

DNA Ladder (TaKaRa) を用いた。

4. 再試験および基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子の検出

5 種類すべてのカルバペネム耐性遺伝子が陰性であった場合は、被検菌から Wizard SV Genomic DNA purification kit (プロメガ) もしくは QIAamp DNA mini kit (キアゲン) を用いて DNA を精製し、この精製した DNA を鋳型に再度 PCR を行った。さらに、再検査においても 5 種類のカルバペネム耐性遺伝子がすべて陰性であった株に対しては 3 種類 (CTX-M-1 型、CTX-M-2 型および CTX-M-9 型) の基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ遺伝子の検出を同様に PCR 法で行った (表 1)。

- NDM-1 型及び KPC 型カルバペネム耐性遺伝子の塩基配列解析

PCR 法により NDM-1 型または KPC 型カルバペネム耐性遺伝子の保有が確認された場合には、その PCR 産物の塩基配列解析を実施した。

PCR 産物は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (プロメガ) を用いて精製した。精製した PCR 産物を鋳型にし、PCR 時に用いたプライマーおよび Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (アプライドバイオシステムズ) を用いてシークエンス反応を行った。反応産物は DyeEx 2.0 Spin Kit (キアゲン) を用いて精製し、塩基解析には 3130x1 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) を使用した。得られた塩基配列をデータベースに登録されている塩基配列 (*bla*_{NDM-1}: FN396876、*bla*_{KPC-2}: AY210887) と比較した。

C. 結果

(添付資料参照)

- 医療機関からの報告

研究期間中、31 都道府県の医療機関より 174 株についての報告が感染症研究所になされた。174 株のうち 15 株は対象外菌種であり、4 株は薬剤耐性の基準を満たしていいなかった。また 2 株については菌株の保存がなされていなかった。これら 21 株を除いた 153 株が感染症研究所に送付された。この 153 株は 29 都道府県の 100 医療機関、143 名の患者より分離されたものであった。

送付された菌株が分離された 143 名のうち男性が 74 名、女性が 69 名であった。平均年齢は 74.4 歳 (12 歳-99 歳)、男性では 70 歳代が、女性は 80 歳代が最も多かった。過去 1 年以内の海外渡航歴は、「無し」が 105 名 (73.4%) とほとんどを占め、34 名 (23.8%) は不明であった。渡航歴があったのは 4

名 (2.8%) のみであり、これらの患者の渡航先は中国2名、インド1名、カナダ1名であり、カナダに渡航した患者以外は3名とも渡航先での入院歴があった。

菌株が分離された検体の採取日は144株(94.1%)が研究期間中、9株(5.9%)は研究期間以前に分離され、医療機関に保存されていた株であった。研究期間中は月平均41株(9月は0.5月と計算)が感染症研究所に報告された。検体の種類別にみると、最も多いのが尿検体で81株(53.0%)、次いで呼吸器検体30株(19.6%)、便12株(7.8%)、血液8株(5.2%)、その他が22株(14.3%)であった。

医療機関での同定結果に基づく菌種として最も多かったのが大腸菌 (*Escherichia coli*) で67株(43.8%)、次いで *Klebsiella pneumoniae* 35株(22.9%)、*Enterobacter cloacae* 28株(18.3%)であり、そのほかに *Serratia marcescens*、*Providencia* 属、*Citrobacter* 属、*Morganella morganii*、*Proteus mirabilis* であった。

● 菌種の同定

医療機関より送付された菌株について再度同定を行った。医療機関より *K. pneumoniae* 疑いとして送付された1株は、MicroScan WalkAway 96 Microscan では同定不能であったが、API 20 では *E. cloacae* と同定された。*Providencia* 属として報告された3株は1株が *P. rettgeri*、2株が *P. stuartii* と同定された。それ以外はすべて医療機関の同定結果と一致した。

● 薬剤感受性試験

送付された153株のセフトラジム、イミペネム、メロペネム、ドリペネム、ゲンタマイシン、アミカシン、シプロキサシン、コリスチンおよびポリミキシンBのMIC分布を図1に示す。

● PCR法による薬剤耐性遺伝子の検出

153株中、72株(47.1%)がIMP-1型カルバペネム耐性遺伝子陽性、2株(1.3%)がNDM-1型カルバペネム耐性遺伝子陽性、同じく2株(1.3%)がKPC型カルバペネム耐性遺伝子陽性であった。IMP-2型およびVIM-2型カルバペネム耐性遺伝子陽性の株は無かった。

5種類のカルバペネム耐性遺伝子がすべて陰性であった77株中48株(62.3%、全153株の31.4%)がCTX-M型β-ラクタマーゼ遺伝子陽性であり、型別内訳はCTX-M-1型が31株と最も多く、ついでCTX-M-9型が14株、CTX-M-2型が6株であった。なお、2株はCTX-M-1型とCTX-M-2型、1株はCTX-M-1

型とCTX-M-9型の2種類が陽性であった。

153株のうち29株(20.0%)についてはPCR法を実施した8種類すべての耐性遺伝子について陰性であった。なお、これら29株におけるイミペネムのMIC分布をみると21株が1μg/mL以下、2μg/mLが6株、4μg/mLが1株、16μg/mLが1株であり、多くがカルバペネム感性株であった。

● NDM-1型及びKPC型カルバペネム耐性遺伝子の塩基配列解析

PCR法によりNDM-1型カルバペネム耐性遺伝子が陽性となった2株について、そのPCR産物の塩基配列解析を実施したところ、いずれもNDM-1型の参考配列 (*bla_{NDM-1}*: Acc No. FN396876) と100%一致した。また、KPC型カルバペネム耐性遺伝子が陽性となった2株についても同様の塩基配列解析を実施したところ、先頭10bpについてはプライマー端であるため配列が不確定であったものの、KPC-2型の参考配列 (*bla_{KPC-2}*: Acc No. FJ223606) と100%一致した。

KPC型カルバペネム耐性遺伝子を保有していた2株はいずれも *K. pneumoniae* であり、渡航歴のある同一患者より分離されたものであった。NDM-1型カルバペネム耐性遺伝子を保有していた2株もまた *K. pneumoniae* であったが、これらの菌株はいずれも渡航歴の無い2名の患者より分離されたものであった。2名の患者は異なる医療機関の入院患者であった。

D. 考察

本研究は2010年9月10日発出の厚生労働省結核感染症課長通知に基づいて実施された。通知発出後間もない9月15日から実施されたが、当時、報道により薬剤耐性菌に対する社会的関心が高い時期であり、全国の多くの医療機関より国立感染症研究所に該当する菌株が報告された。

腸内細菌科に属する多剤耐性菌として報告された菌株の多くは渡航歴の無い高齢者より分離された。特に、NDM-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌はインド渡航歴のある患者を介して欧米諸国に広まったことが報告され、注目を浴びたが、本研究では渡航歴の無い2名の患者より分離された。さらにこの2名の患者は異なる医療機関に入院しており、直接的な疫学的関連が明らかでは無かったことから、NDM-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌がすでに我が国の複数の医療機関で地域的に伝播していた可能性が示唆された。一方で分離患者数が2名と限られており、かつ同一県内の2医療機関であることから、その伝播地域は限局的であると考えられ

た。

KPC型β-ラクタマーゼ産生菌については、渡航歴があり、かつ渡航先で入院歴のある患者1名からの分離にとどまっております、国内での伝播を強く示唆するものではなかった。

対象菌株は、カルバペネム系、フルオロキノロン系、アミノ配糖体系の3系統すべての抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌としたが、海外においてNDM-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌であってもイミペネムに対するMICは比較的低い株がしばしば報告されていたため、セフトジジムが高度耐性であれば対象に加えることとした。そのため、実際に送付された株の多くはカルバペネム系抗菌薬、特にイミペネムに対して感性であった。解析を行った153株の半数以上が5種類のカルバペネム耐性遺伝子がすべて陰性であった理由として、実際にはイミペネム感性菌が多く含まれていた事が考えられた。一方でセフトジジム耐性を反映して多くのESBL産生株が含まれていた。

一方で、NDM-1産生株と同様に、IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子を保有する株であってもイミペネムのMICは必ずしも高くは無く、1μg/mL以下のものも多くあった。これは腸内細菌科の細菌では、カルバペネム耐性遺伝子保有の有無を薬剤感受試験の結果から判定することが、困難であることを示唆する。

カルバペネム耐性遺伝子を保有していても、イミペネムに感性であれば感染症発症時にカルバペネム系抗菌薬が治療薬として使用できる可能性がある。しかし、一方で、このような菌株が、カルバペネム耐性遺伝子を保有していることが認識されないうまま耐性遺伝子のリザーバーとして蔓延した場合には、将来的に複数の薬剤耐性遺伝子が集積した結果、多剤耐性菌の出現と蔓延を促進してしまう可能性が危惧される。

今回の研究は短い周知期間の後に約3カ月間という短期間でのみ実施されたものであることから、これらのリスクを踏まえ、今後も同様の菌株の分離の動向について、必要に応じて薬剤耐性遺伝子の検出も含めたサーベイを実施し、十分に注視する必要があると思われた。

E. 健康危険情報

現時点で、NDM-1型やKPC型のカルバペネム耐性遺伝子を保有する多剤耐性菌が我が国の医療現場において広く蔓延している状況は否定的であった。しかし、これまで海外からの報告のみであった

NDM-1型カルバペネム耐性遺伝子を保有する多剤耐性菌が海外渡航歴の無い患者より分離されたことは、および、IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼを保有する腸内細菌科の多剤耐性菌については、今後その動向について十分に注視する必要があると思われた。

F. 研究発表 なし

G. 知的所有権の出願・登録状況 なし

謝辞

本研究を実施するにあたり、地方自治体の関係者、多くの医療機関、および細菌検査会社に多大なるご協力を頂きました。深く感謝申し上げます