

	n	イミペネム MIC (μg/mL)									
		<0.25	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
<i>Acinetobacter baumannii</i>	21										
<i>bla</i> _{OXA-51-like} only	10	7		2		1					
<i>ISAbal</i> - <i>bla</i> _{OXA-51-like}	6			1	1	2	1		1		
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	1									1	
<i>bla</i> _{IMP-1} + <i>bla</i> _{OXA-58-like}	1									1	
<i>bla</i> _{IMP-1}	3									2	1
<i>Acinetobacter</i> genomic species 3	23										
No tested carbapenemase genes*	11	5*		1	1	3	1				
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	1						1				
<i>bla</i> _{IMP-1} + <i>bla</i> _{OXA-58-like}	3									2	1
<i>bla</i> _{IMP-1}	2								1		1
<i>bla</i> _{IMP-2}	6									3	3
<i>Acinetobacter</i> genomic species 13TU	15										
No tested carbapenemase genes	6	3		1		2					
<i>bla</i> _{IMP-1} + <i>bla</i> _{OXA-58-like}	1									1	
<i>bla</i> _{IMP-1}	7							2		2	3
<i>bla</i> _{IMP-2}	1										1
total	59	15	0	5	2	8	3	2	2	12	10

表 1. イミペネムの最小発育阻止濃度 (MIC) とカルバペネム耐性遺伝子保有株数

*1 株は *bla*_{OXA-51-like} 遺伝子陽性であったが、上流に *ISAbal* 配列は検出されなかった

菌種同定			<i>bla</i> _{OXA-51-like} 遺伝子の検出		
Vitek2 compact	分子生物学的手法による 再同定	菌株数	陽性	陰性	合計
<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	21	21	0	21
	<i>A. gen. sp. 3</i>	23			
	<i>A. gen. sp. 13TU</i>	15	1*	37	38
	<i>A. calcoaceticus</i>	0			
合計		59	22	37	59

表 2. 菌種の再同定と *bla*_{OXA-51-like} 遺伝子の検出結果

**Acinetobacter* genomic species 3

菌株番号	分離年	カルバペネム耐性遺伝子	MIC (mg/L) ^a			ST ^b	Allele No. ^b						
			IPM	AMK	CIP		<i>gltA</i>	<i>gyrB</i>	<i>gdhB</i>	<i>recA</i>	<i>cpn60</i>	<i>gpi</i>	<i>rpoD</i>
						(clonal complex)							
04-1278	2004	IS <i>Abal</i> - <i>bla</i> _{oxa-51-like}	4	8	64	92(92)	1	3	3	2	2	7	3
09-642	2008	IS <i>Abal</i> - <i>bla</i> _{oxa-51-like}	16	>256	32	92(92)	1	3	3	2	2	7	3
09-767	2005	IS <i>Abal</i> - <i>bla</i> _{oxa-51-like}	2	8	64	92(92)	1	3	3	2	2	7	3
09-774	2008	IS <i>Abal</i> - <i>bla</i> _{oxa-51-like}	0.5	4	64	92(92)	1	3	3	2	2	7	3
04-888	2004	<i>bla</i> _{oxa-51-like} only	2	256	64	74*(92)	1	3	3	2	2	75*	3
04-1363	2004	IS <i>Abal</i> - <i>bla</i> _{oxa-51-like}	4	256	32	74*(92)	1	3	3	2	2	75*	3
09-946	2009	<i>bla</i> _{oxa-23-like}	32	32	64	75*(92)	1	3	3	2	2	11	3
04-93	2002	<i>bla</i> _{oxa-51-like} only	0.5	32	32	76*(92)	1	12	3	2	2	10	3
09-780	2008	<i>bla</i> _{oxa-51-like} only	0.5	4	0.25	77*	1	1	66*	12	33*	76*	21
09-782	2009	<i>bla</i> _{oxa-51-like} only	0.5	4	<0.125	79*	34*	12	68*	41*	32*	7	46*
09-785	2009	<i>bla</i> _{oxa-51-like} only	0.25	4	<0.125	80*	34*	12	68*	41*	34*	10	4
07-786	2002	<i>bla</i> _{IMP-1}	64	32	0.25	ND ^c	34*	12	68*	41*	32*	ND ^c	4
04-1279	2004	<i>bla</i> _{oxa-51-like} only	0.5	4	0.25	109	10	12	4	11	4	9	5
04-565	2004	<i>bla</i> _{IMP-1}	32	256	0.25	81*	1	54*	69*	11	4	69	45*
07-791	2003	<i>bla</i> _{IMP-1} + <i>bla</i> _{oxa-58-like}	32	64	0.25	82*	1	12	70*	15	4	52	45*
09-781	2009	<i>bla</i> _{oxa-51-like} only	0.25	2	<0.125	83*	21	12	2	15	35*	77*	4
08-1648	2008	<i>bla</i> _{oxa-51-like} only	0.25	4	<0.125	85*	21	15	2	15	1	52	4
09-94	2008	<i>bla</i> _{oxa-51-like} only	0.25	4	<0.125	86*	21	15	2	15	1	78*	4
08-943	2008	<i>bla</i> _{oxa-51-like} only	0.25	8	<0.125	84*	1	12	2	15	22	72	5
04-774	2004	<i>bla</i> _{oxa-51-like} only	0.5	8		87*	1	52	29	15	18	24	7
09-775	2005	<i>bla</i> _{IMP-1}				78*	13	26	67*	40*	1	22	7

表 3. *A. baumannii* 21 株のカルバペネム耐性遺伝子、薬剤感受性試験結果及び Multilocus Sequence Typing (MLST) のシーケンスタイプ

- a. 着色欄は、耐性(R)を示す
 - b. *は、本研究で新たに同定したシーケンスタイプ(ST)あるいは Allele No.
 - c. ND; 判定不能
- 略号 : IPM; イミペネム、AMK; アミカシン、CIP; シプロフロキサシン

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

研究分担者 池 康嘉 （群馬大学大学院医学研究科細菌学講座）

研究要旨

沖縄における VRE の疫学調査により、2 病院、11 人の患者から分離された 11 株の VRE の細菌学的解析を行った。11 株は VanA 型 *Enterococcus faecium* (VRE) であった。Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) による *Sma*I 断片の各菌の染色体 DNA の解析により、5 つの菌株型に分類された。各菌のプラスミド DNA と *vanA* probe を用いた Southern hybridization により、*vanA* 遺伝子はプラスミド DNA 上に存在した。各菌を donor として *E. faecium* BM4105RF を受容菌とした固形培地上での 4 時間の接合伝達実験により、11 株のうち 8 株の VanA 耐性が接合伝達した。PFGE によるそれぞれの菌株型に属する菌は、それぞれ同じような頻度で VanA 耐性が接合伝達した。OKN1 株について、*vanA* 遺伝子の構造解析の結果、東京地区ですでに分離されている VanA VRE の *vanA* 遺伝子と同じ遺伝子構造をしていた。このことは、これらの分離株が日本の特異的な VRE であり、また、これまで VRE の解析が日本のリファランスとなり得ることを示すものである。

研究協力者

久高 潤 沖縄県衛生環境研究所
野村隆浩 群馬大学細菌学 技術専門職員
富田治芳 群馬大学細菌学 准教授
谷本弘一 群馬大学薬剤耐性菌実験施設 准教授
山下 均 群馬大学大学院生
堤 裕子 群馬大学大学院生

感染が発症する。分離頻度の少ない状況におけるこれらの VRE は、日本の VRE の標準株（リファランス株）になり得る。そのため、本研究においては日本で散発的に分離される VRE の形質、遺伝子構造を解析することを目的としている。

本年度は我が国で初めてとなる沖縄県で分離された VRE のバンコマイシン耐性の形質、遺伝子構造解析を行った結果を報告する。

A. 研究目的

薬剤耐性の基礎的研究の分担研究において、腸球菌、特にバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）の薬剤耐性機構、接合伝達性プラスミドの伝達機構および疫学的研究を行っている。1988 年と 1989 年に欧米における VRE の最初の報告がされた。VRE の分離と増加の要因は、米国ではバンコマイシンの使用量の増加が医療界に拡がり、EU 各国では家畜、特に養鶏においてグリコペプチド系のアボパルシンを成長促進の目的で使用したことにより、家畜や一般の人々の腸管に VRE が定着した。いずれもグリコペプチド系の使用量の増加により、それぞれの環境で VRE が選択的に増加したものである。

米国の VRE 分離率は臨床分離腸球菌の約 30%と推測されている。アジアでは韓国において約 10～15%と推測されている。日本における VRE の臨床分離頻度は他の国々と比較して例外的に低く、大学附属病院等の教育病院においてはほとんど分離されない。しかしながら、毎年地域において VRE の散発的な分離と院内

B. 研究方法

用いた菌株は 2010 年に沖縄の 2 病院、12 名の患者から分離された。そのうち VanA 型 *E. faecium* (VanA VRE) 11 株を使用。用いた実験株は *E. faecium* BM4105RF (*Rif^r*, *Fus^r*)、*E. faecium* BM4105SS (*Str^r*, *Spc^r*)、*E. faecalis* FA2-2RF、*E. faecalis* JH2SS である。薬剤耐性（プラスミド）の接合伝達、DNA 解析方法等は既報に従った。

倫理面への配慮

C. 研究結果

- 1) 11 株の VRE はすべて *E. faecium* VRE であった。PCR にて遺伝子的にも *vanA* 型 VRE であった。
- 2) パルスフィールド電気泳動の結果
11 株は 5 型に分離された。それぞれのグループの菌株番号は 1 型 1、2 型 2, 4, 10、3 型 3, 6, 7、4 型 5, 11、5 型 8, 9 である（図

1)。

3) バンコマイシン耐性遺伝子の存在部位

① プラスミド DNA を分離し VanA 型 VRE の *vanA* 遺伝子内の 731bp の PCR 産物を probe として Southern hybridization を行った。プラスミド DNA はそれぞれの菌株の全プラスミド DNA の *EcoRI* 断片のアガロースゲル電気泳動を blotting したものをを用いた。検出された *vanA* 遺伝子は 4.1kbp の *vanA* 遺伝子内の *EcoRI* 断片と相補結合した (図 2-①)。

② 全 DNA の *EcoRI* 断片のアガロースゲル電気泳動を blotting したものをを用いた Southern hybridization においても、プラスミド DNA を用いた実験と同じ結果を得た (図 2-②)。

以上の結果はこれらの VRE の *vanA* 遺伝子がプラスミド DNA に存在することを示した。

4) バンコマイシン耐性の接合伝達

11 株の VRE それぞれを供与菌とし、*E. faecium* BM4105(RF)、または *E. faecalis* FA2-2(RF)を受容菌とし、バンコマイシン (6μg/ml) Rif, Fus を選択薬として液体培地中、または固形培地上での接合伝達実験を行った。その結果、バンコマイシン耐性は固形培地上での接合伝達において伝達するものがあつた。それらはそれぞれの菌株番号 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 および 11 の 8 株で、それぞれのバンコマイシンの接合伝達頻度は表 に示すとおりであつた。

5) Tn1546(*vanA*)の遺伝子構造

代表株として OKN1 の Tn1546 の遺伝子構造解析を行い、他の株については PCR により Tn1546 の遺伝子構造解析を行った。その結果、すべての株の Tn1546 は同一構造であつた。そしてそれらの構造はすでに東京地区で分離された VanA VRE の D 型の Tn1546 に分類されたものと同一であつた (図 3)。

D. 考察

沖縄県で初めて分離された *E. faecium* VanA 型 VRE11 株を解析した。11 株は染色体型 DNA 型により 5 つの型に分類できた。それぞれの型

に属する菌株はほぼ同じ頻度で VanA 耐性が接合伝達した。これは、11 株は 5 型の異なる菌株である可能性を示唆するものである。*vanA* 耐性トランスポゾン Tn1546 の解析により、*vanA* 遺伝子構造がすでに数年前に東京地区で分離された *vanA* 遺伝子と同じ構造であつた。このことは、日本の原型と考えられる VRE の存在と、これまで分離された Tn1546 の構造が日本のリファランスになり得ることを示している。

E. 結論

11 株の *E. faecium* VanA を解析した。*vanA* 遺伝子はプラスミド上に存在した。11 株のうち 8 株の VanA が接合伝達した。*vanA* トランスポゾン Tn1546 の遺伝子構造はすでに東京地区で分離されている *vanA* の Tn1546 と同じ構造であつた。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Li Y, Tomita H, Lv Y, Liu J, Xue F, Zheng B, and Ike Y: Molecular characterization of *erm*(B)- and *mef*(E)-mediated erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in China and complete DNA sequence of Tn2010. Journal of Applied Microbiology, 110: 254-265, 2010

2. 学会発表

1. Y. Ike, T. Inoue, H. Yamashita, H. Tomita. Novel Enterococcal Bacteriocins. 3rd International ASM Conference on Enterococci. 2010. Portland, USA.

2. H. Tomita, Y. Ike. Highly Conjugative PMG1-Like Plasmids In Enterococci. 3rd International ASM Conference on Enterococci. 2010. Portland, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

図1 *E. faecium* VanAの染色体Sma I断片のPFGE

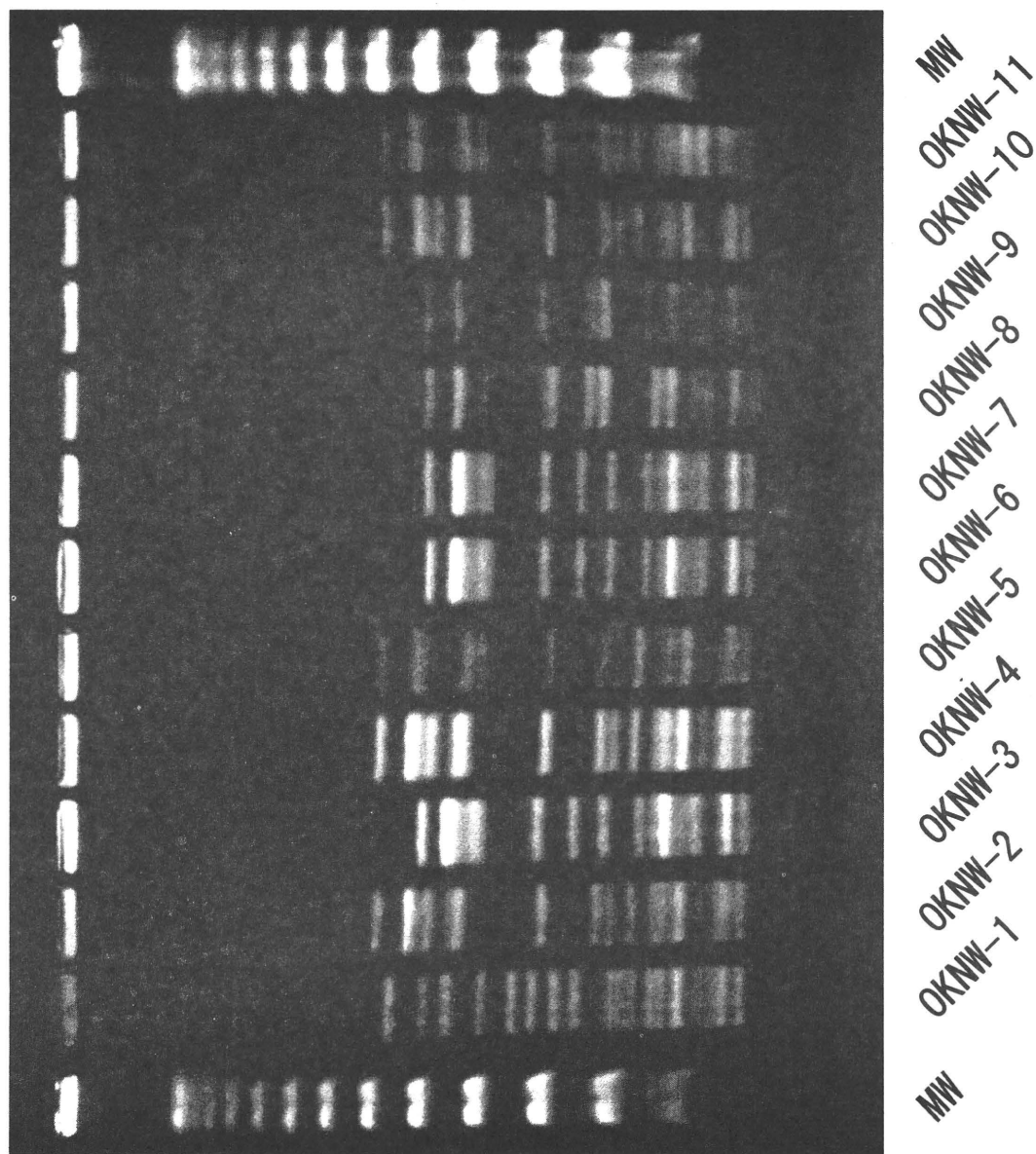
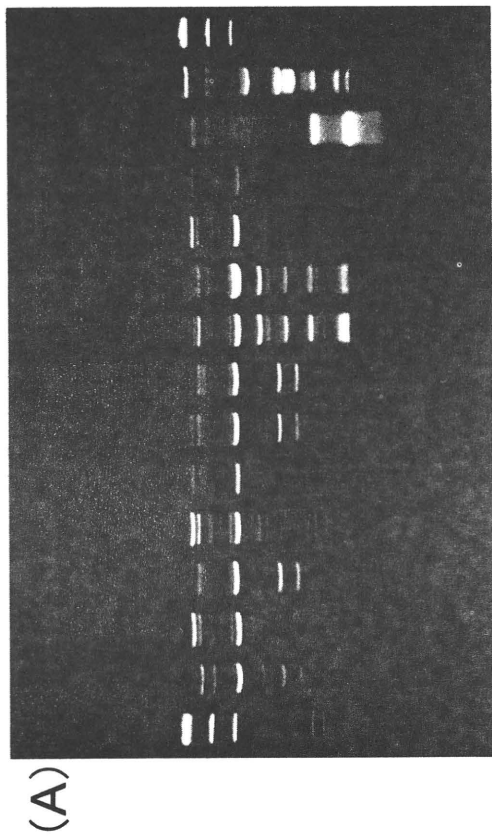


図2-① *E. faecium* VanAのプラスミドDNA *EcoRI*断片のアガロースゲル電気泳動(A)と*vanA* probeを用いたSouthern hybridization(B)。



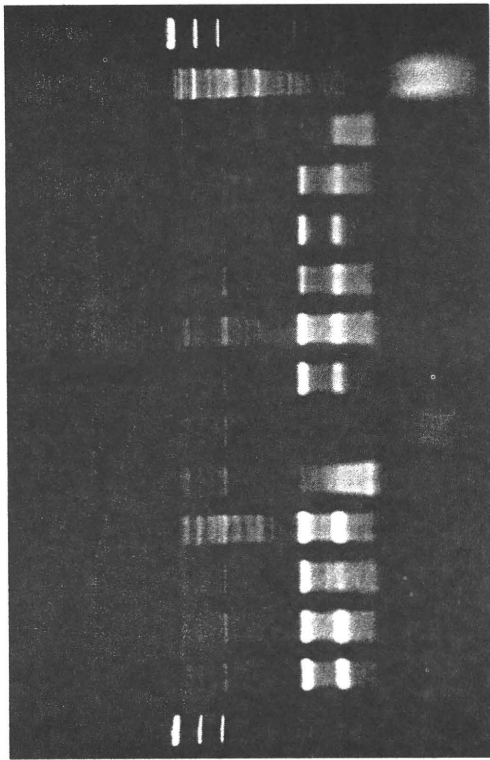
(A)

(B)



MW
OKNW-1
OKNW-2
OKNW-3
OKNW-4
OKNW-5
OKNW-6
OKNW-7
OKNW-8
OKNW-9
OKNW-10
OKNW-11
Vana
IMCJ-16
MW

図2-② *E. faecium* VanAの染色体DNA *EcoRI*断片のアガロースゲル電気泳動(A)と*vanA* probeを用いたSouthern hybridization(B)。



(A)

(B)



MW
OKNW-1
OKNW-2
OKNW-3
OKNW-4
OKNW-5
OKNW-6
OKNW-7
OKNW-8
OKNW-9
OKNW-10
OKNW-11
Vana
IMCJ-16
MW



表 *E. faecium*(*vanA*)の由来、PFGE、および*VanA*接合伝達頻度

菌株実験No.	菌株No. (Original)	病院	Species	PFGE型	接合伝達頻度(供与菌当たりの伝達株数)	
					受容菌 <i>E. faecium</i> BM4105RF	
OKN1	016	NG	血液	1	3×10 ⁻⁴	
OKN2	051	NB	血液	2	3×10 ⁻⁷	
OKN3	058	NB	血液	3	<10 ⁻⁷	
OKN4	059	NB	尿	2	5×10 ⁻⁷	
OKN5	060	NB	便	4	5×10 ⁻⁶	
OKN6	061	NB	便	3	<10 ⁻⁷	
OKN7	062	NB	便	3	<10 ⁻⁷	
OKN8	092	NB	便	5	6×10 ⁻⁷	
OKN9	097	NB	便	5	4×10 ⁻⁷	
OKN10	098	NB	便	2	3×10 ⁻⁶	
OKN11	105	NG	便	4	2×10 ⁻⁴	

VRE、MDRP 等の伝播様式と蔓延防止に関する研究

研究分担者 飯沼 由嗣 （金沢医科大学臨床感染症学）

研究要旨

本研究は、MDRP 等の薬剤耐性菌の感染伝播の解析のために、実施が容易な分子疫学解析法の開発及び評価を目的としている。緑膿菌株毎に保有状態の異なる open reading frame(ORF)の臨床分離株における保有パターンを解析し、ORF の保有パターンが菌株毎に異なることを示し、さらに ORF の有無による緑膿菌の迅速分子疫学解析法が可能であることを明らかにした。本タイピング法は、病院における感染管理に貢献する事が期待される。

研究協力者

鈴木 匡弘 愛知県衛生研究所 生物学部
長尾 美紀 京都大学大学院 臨床病態検査学

A. 研究目的

医療関連感染の主要な原因菌として多剤耐性緑膿菌（MDRP）は適切な感染管理を必要としている。感染管理の一法として、集団感染が疑われる際にはパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE 法）のような分子疫学解析が実施され、感染源調査や集団感染の規模を特定するのに効果を発揮する。また PFGE 法のような分子疫学解析結果を医療スタッフに提示することで、感染管理意識の高まりも期待できる。

ところが、PFGE 法は少なくとも 3 日と時間がかかることに加え、複雑なバンドパターンを解析する必要があり、データベース化や結果報告に手間取ることが多い。また緑膿菌は遺伝子変異により PFGE パターンの変化がしばしば起こり、判定が困難な場合も多い。PFGE 法の問題点の解決策として、MRSA においては multiplex PCR を利用した phage ORF typing 法（POT 法）が開発された。POT 法では菌株により保有状態の異なる ORF（主に溶源化ファージを構成する ORF）を 16 個検出し、その有、無を 1, 0 に置き換えることで遺伝子型をデジタルに捉えることができる。POT 法は 3 ～ 4 時間で結果が得られる、PFGE 法と同等の菌株識別能を有しているといった特徴のみならず、遺伝子型のデータベース化や結果報告にも有利であった。このように遺伝子型を ORF の有無で決定するデジタル分子疫学解析法は、感染管理の実用上有利であることを示している。

近年全ゲノム塩基配列の解明が進み多くの菌種で複数株の全ゲノム情報が利用できるようになり、緑膿菌においても少なくとも 4 株のゲノム情報が利用可能である。複数株の全ゲノム情報を比較することで、菌株間の差異に関する情報を容易に得られ、新たな解析法の開発が可能と考えられる。そこで本研究では緑膿菌の全ゲノム配列を比較し、菌株毎に保有状態が異なる部分を選別し、それらの中からタイピングに利用する ORF の候補を選び、臨床分離株における保有状態を調査することで、デジタル分子疫学解析法開発の可能性を検討した。

21 年度までに 3 株（PA7(NC_009656)、PA14(NC_008463)、PAO1(NC_002516)）の緑膿菌全ゲノム塩基配列を比較、検討して選択した ORF 95 個について臨床分離緑膿菌 23 株の保有状態を調査した。その結果 68 個の ORF については保有状態に菌株間で差が見られた。さらに、その中から特に菌株識別に有効と期待される 24 個の ORF を選択した。

22 年度には臨床分離株における ORF 保有状態調査を進め、臨床分離株をタイピングするために必要な ORF の取捨選択を行い、最終的に検出する ORF の決定を目指した。

B. 研究方法 菌株

愛知県で分離された 24 株及び新潟県で分離された 4 株、京都府で分離された 9 株、MDRP を中心に全国から収集された 200 株（国立国際医療研究センター、切替先生から分与）を用いた。SpeI 切断による PFGE 解析ならびにデンドログラム解析を行い、ORF 保有パターンと比較、検討した。

1. ORF 12 個によるタイピング

21 年度のスクリーニング結果から得られた菌

株識別に有効と期待される 24 個の ORF のうち、21 年度にスクリーニングに用いた 23 株が十分に区別できるよう ORF を 12 個選択した。この 12 個の ORF の保有状態を供試した 237 株すべてについて調査した (ORF12 タイピング)。12 個の ORF 保有パターンは genomic islet と考えられる 7 個と高変異領域あるいはファージと考えられる部分 5 個の 2 つに分けて数値化した。数値化は ORF 増幅の有無を 1、0 に置き換え、それぞれに 2^0 (1) から 2^6 (64) または 2^4 (16) の係数を掛け合わせ、算出した (表 2)。前半の数値は大きく分類されるクローナリティを、後半の数値は菌株識別に有効と期待される。

2. Multi-Locus Sequence Typing (MLST)

PFGE は異なるクラスターだが ORF 保有パターンが同一の場合、または ORF 保有パターンは異なるが PFGE が同一クラスターの場合について分離株のクローナリティを明確にする目的で MLST 解析を行った。MLST 解析は既報に従い、PubMLST (<http://pubmlst.org/>) データベースにて検索し、Sequence type (ST 型) を決めた。

3. 検出 ORF の再検討

ORF12 タイピングの結果から明らかとなった問題点を、克服するために検出 ORF の再検討を行った。

ORF12 タイピングの結果十分な菌株識別能が得られなかったクローンについて、PFGE パターンをもとに代表株を選択し、当初保有状態調査に供した 95 個の ORF のうち ORF12 タイピングに採用されなかった ORF および新たに候補として抽出した ORF 27 個について保有状態調査を行い、タイピングに利用可能な ORF の検討を行った。

4. ORF 追加による菌株識別能

検出 ORF の再検討の結果から選択されたクローナリティ推定部分 (主に genomic islet 由来 ORF 11 個) および株レベルでの識別部分 (主にファージあるいは genomic island 由来 ORF 7 個) の保有パターンを調査した (ORF18 タイピング)。また遺伝子型番号を新たに付与した。遺伝子型番号は genomic islet 01 - 11 (GI01 - 11、ゲノム中の位置に従って整列) および phage 01-07 (P01-07) の有無を 1、0 に置き換え、それぞれに 2^0 (1) から 2^{10} (1024) または 2^6 (64) の係数を掛け合わせ、クローナリティ推定部分と株レベルでの識別部分に分けて和を取り遺伝子型とした。ORF 追加後の遺伝子型を MLST 解析と比較した (表 3)。

237 株の分離株から ORF12 タイピングによる遺伝子型あるいは PFGE パターンが異なる株を中心に 85 株を選択し、ORF18 タイピングを行った。

5. 倫理面への配慮

本研究では患者情報を切り離した臨床分離菌株のみを取り扱い、患者情報は不明であるため、倫理上の問題は発生しない。

C. 研究結果

1. ORF 12 個によるタイピング (ORF12 タイピング) 結果

237 株は 44 遺伝子型に分類できた (表 1)。PFGE パターンがよく似た MDRP の多く (149/237) は 123-0 または 123-1 であった。また、MDRP、感受性株にかかわらず 114-16 または 114-17 となる株が多数 (28/237) 見られた。PFGE パターンが似ており、クローナルと考えられる菌株の中に ORF12 タイピング結果が異なる株が含まれていた (77-18 と 109-18、91-0 と 123-0、114-17 と 82-17 など)。また前半の数値が同じで後半の数値が異なる株の中には PFGE パターンが異なるものも含まれていた (108-〇〇、110-〇〇、111-〇〇など)。

2. ORF12 タイピング結果と MLST 解析

12 個の検出 ORF のうち 1 個の保有状態が異なるだけの菌株の一部について MLST 解析による評価を行った。77-18 と 109-18、91-0 と 123-0、82-17 と 114-17 についてはそれぞれ同一 ST 型又は clonal complex (CC) に分類された。これらは全て ORF06 のみの保有パターンが異なっていた。後半の数値が異なる 114-16 と 114-17 は ST357 に分類され、クローナルであった。

一方 ST198slv と STnew(NCGM776)、及び ST606 と ST244 の前半の ORF 保有パターンは ORF06 のみが異なるよく似たパターンであった。

高変異領域と考えられた 3 個の ORF (ORF10、ORF11、ORF12) は同一 ST 型または CC 型株における菌株識別にはほとんど寄与していなかった。

分離株数の多い 114-16/17 および 123-0/1 はファージ関連 ORF と考えられる ORF08 によって分けられていた。

3. 検出 ORF の再検討

MLST 解析レベルのクローナリティを決めるための genomic islet、および菌株を識別するためのファージ構成 ORF について保有状態を調査した。

ST198slv と STnew(NCGM776)、及び ST606 と ST244 は 1 個の genomic islet 検出を追加することで識別可能であった。高変異領域と考えられた 3 個の ORF (ORF10、ORF11、ORF12) はクローナリティ推定のセットに加えることとした。

123-0 または 123-1 となったクローンは識別能を確保するためにファージインテグラーゼを中心に保有状態調査を行ったところ、7つの ORF が菌株識別に有効であることが確認された。

4. ORF 追加による菌株識別能

検出 ORF の再検討を行った結果分離株の ST 型あるいは CC と ORF 保有パターンのクローナリティ推定部分は良く相関した (表 3)。しかし、GI04 および GI05 はそれぞれ CC155 (ST155 及び ST155slv) の分離株、STnew(NCGM725) の分離株において保有パターンが異なっており、同一クローン内での保存が悪い傾向にあった。また、GI04 および GI05 を除く他の genomic islet の保有パターンが異なる株は異なる ST 型であった (KUN6483 と CC179 の 4 株、NCGM732 と 2008N488、2007N534 と NCGM772、2007N535 と CC357 の 2 株)。

ファージを構成する ORF 検出によって MDRP に多い 1985-〇〇 (ORF12 タイピングでは 123-0/1) の株は 10 種類に分類された。また 1736-〇〇 (ORF12 タイピングでは 114-16/17) の株は 4 種類に分類された。

ORF18 タイピングによって 85 株は 58 遺伝子型に分類された (表 4)。

D. 考察

MLST 解析および genomic islet 保有パターンの結果から多剤耐性化していない緑膿菌は多様なクローンの存在が示唆された。さらに MLST 解析ではデータベース上に登録されておらず、近縁な ST 型も存在しない sequence type の分離株がしばしば見つかり、遺伝的バックグラウンドの多様性の高さが示唆された。従って、緑膿菌のデジタルタイピング法を開発する際には多様な遺伝的バックグラウンドを検出可能とするよう、CC と相関する検出 ORF セットを充実させる必要があると考えられる。

同一クローン内における菌株間の差異は主に溶原ファージの違いであった。ファージの検出は株レベルでの分類に有効であった。しかし、緑膿菌ファージはモザイク構造を取らないため、ファージ検出による株レベルでの識別能向上には限界があると考えられた。その一方で多様性が高いため、同一クローンが同時に検出される可能性は高くはないと考えられる。ファージ検出は菌株識別効果の高いものに限定することになると考えられる。

緑膿菌ではクローナリティが同じであるにもかかわらず PFGE パターンのクラスターが異なる場合がしばしば見られる。多くの場合溶原ファージが異なっていたが、PFGE パターンが大きく異

なる原因は不明である。また緑膿菌の PFGE パターンは集団感染由来株間でもバンド数本程度の変化が見られることが多く、結果の判定に迷う場面があると考えられる。本研究で実現されるタイピング法は微妙な判定を必要とせず、結果を容易に判定可能になると期待される。

今年度保有パターンを調査した 18 個の ORF を基本としてタイピング法を完成させることとなる。今後検出 ORF のシーケンス解析を行い、マルチプレックス化の可能な再現性の高いプライマーを設計することで実用性の高いデジタルタイピング法開発が可能と考えられる。

E. 結論

Genomic islet とファージを検出することでデジタルタイピング法の開発が可能であることが明らかとなった。Genomic islet の検出パターンにより MLST 解析から得られる CC レベルの分類をおこない、さらにファージ検出パターンによって株レベルでの識別を実現できると期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsushima A, Iinuma Y, et al: High prevalence of mutators among *Enterobacter cloacae* nosocomial isolates and their association with antimicrobial resistance and repetitive detection. Clin Microbiol Infect 16:1488-1493, 2010.

2) Nagao M, Iinuma Y, Suzuki M, et al: First outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 harboring the Pantone-Valentine leukocidin genes among Japanese health care workers and hospitalized patients. Am J Infect Control 38:e37-9, 2010.

3) Shirano M, Nagao M, Iinuma Y, et al: Regional spread of VanA- or VanB-positive *Enterococcus gallinarum* in hospitals and long-term care facilities in Kyoto prefecture, Japan. Epidemiol Infect 139:430-6, 2011.

2. 学会発表

1) 松島晶、長尾美紀、飯沼由嗣、他：京都および国内他地域の vanA 遺伝子陽性腸球菌の Tn1546-like element 構造、第 84 回日本感染症学会総会、2010 年 4 月、京都市

2) 鈴木匡弘、他：Phage ORF typing (POT) 法を利用した MRSA のクローナリティ調査、第 84 回日本感染症学会総会、2010 年 4 月、京都市

3) 鈴木匡弘、他：黄色ブドウ球菌の分子疫学解析用キット (POT 法キット) の性能評価、第 39 回薬剤耐性菌研究会、2010 年 11 月、群馬県渋川

市

4) 長尾美紀、飯沼由嗣、他：血液腫瘍患者におけるメタロ-β-ラクタマーゼ陽性多剤耐性緑膿菌感染のリスク因子ならびに予後の検討、第 22 回日本臨床微生物学会総会、2011 年 1 月、岡山市

5) 鈴木匡弘、他：黄色ブドウ球菌の分子疫学解析用キット（POT 法キット）の性能評価、第 22 回日本臨床微生物学会総会、2011 年 1 月、岡山市

6) 長尾美紀、飯沼由嗣、他：多角的介入によるメタロ-β-ラクタマーゼ産生多剤耐性緑膿菌の制

御、第 26 回日本環境感染学会総会、2011 年 2 月、横浜市

7) 鈴木匡弘、他：POT 法キットによるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の感染管理、第 26 回日本環境感染学会総会、2011 年 2 月、横浜市

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

表1 ORF12 タイピングによる遺伝子型

ORF12			ORF12			ORF12			ORF12		
genotype		株数	genotype		株数	genotype		株数	genotype		株数
4	0	1	77	18	3	107	0	1	111	20	1
14	0	1	78	18	1	108	16	2	111	23	1
14	28	1	79	14	1	108	17	1	111	30	5
43	20	1	82	17	1	108	20	4	111	31	2
44	17	1	91	0	1	108	24	1	114	16	13
44	20	1	96	28	1	109	18	1	114	17	15
47	16	1	97	22	1	109	22	1	115	0	1
49	0	1	101	28	2	110	2	1	122	10	1
56	10	7	101	29	1	110	16	1	123	0	144
59	3	2	104	24	1	110	20	2	123	1	5
64	28	1	104	28	1	110	21	1	126	30	1

表2 ORF12 タイピングによる遺伝子型と MLST による ST 型

strain	ORF							ORF					ORF12		MLST†
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	genotype*		
2008N491	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	77	18	ST179slv‡
2008N529	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	77	18	ST179
2008N687	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	77	18	ST179
NCGM758	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	109	18	ST179
KUN6483	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	109	22	STnew(KUN6483)
KUN5040	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	110	2	ST155slv‡
2008N561	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	78	18	ST155
NCGM737	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	91	0	ST235
NCGM986	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	123	0	ST235slv‡
NCGM732	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	64	28	ST198slv‡
NCGM776	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	96	28	STnew(NCGM776)
2007N534	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	79	14	ST606
NCGM772	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	111	31	ST244
2008N099	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	114	16	ST357
2008N624	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	114	17	ST357
NCGM759	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	114	17	CC357?§
2007N723	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	82	17	CC357?§
2007N535	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	115	0	ST620
NCGM725	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	104	24	STnew(NCGM725)
NCGM766	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	104	28	STnew(NCGM725)

*左側の数値 = ORF01×1 + ORF02×2 + ORF03×4 + ORF04×8 + ORF05×16 + ORF06×32 +

ORF07×64、右側の数値 = ORF08×1 + ORF09×2 + ORF10×4 + ORF11×8 + ORF12×16

†新規ST型はSTnew(strain No)とした。‡slv : single locus variant.

§2 locusでデータが得られていないが5 locusのデータはCC357と矛盾しない。

表3 ORF18タイピングによる遺伝子型とMLSTによるST型

strain	genomic islet																phage								ORF18 genotype*	MLST†
	GI		GI		GI		GI		GI		GI		GI		P		P		P		P					
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11				
2008N687	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1323	0	ST179	
NCGM758	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1323	0	ST179	
2008N491	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1323	16	ST179slv†	
2008N529	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1323	32	ST179	
KUN6483	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1337	4	STnew(KUN6483)	
KUN5040	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1378	8	ST155slv†	
2008N561	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1386	16	ST155	
NCGM737	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1985	18	ST235	
NCGM986	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1985	34	ST235slv†	
NCGM2S1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1985	6		
NCGM939	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1985	10		
NCGM989	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1985	24		
NCGM741	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1985	26		
NCGM740	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1985	27		
NCGM776	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1182	0	STnew(NCGM776)	
NCGM732	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1214	64	ST198slv†	
2008N488	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1215	0	ST274	
2007N534	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1525	32	ST606	
NCGM772	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1535	7	ST244	
2007N723	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1736	3	CC357? §	
NCGM759	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1736	11	CC357? §	
2007N724	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1736	66		
2007N535	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1729	0	ST620	
NCGM725	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1326	0	STnew(NCGM725)	
NCGM766	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1342	0	STnew(NCGM725)	
2007N722	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	379	0	ST164	
2007N497	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	902	2	STnew(2007N497)	
2007N542	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1988	0	ST446	

* 左側の数値=GI01×1+GI02×2+GI03×4+GI04×8+GI05×16+GI06×32+GI07×64+GI08×128+GI09×256+GI10×512+GI11×1024、右側の数値=P01×1+P02×2+P03×4+P04×8+P05×16+P06×32+P07×64

†新規ST型はSTnew(strain No)とした。 ‡slv : single locus variant。 § 2 locusでデータが得られていないが5 locusのデータはCC357と矛盾しない。

表4 ORF18タイプピングによる遺伝子型

	genotype			株数	genotype			株数	genotype			株数	
	ORF18	ORF12	ORF12		ORF18	ORF12	ORF12		ORF18	ORF12	ORF12		
128	0	4	0	1	1323	16	77	18	1535	6	111	30	3
379	0	43	20	1	1323	32	77	18	1535	7	111	31	2
424	1	44	17	1	1326	0	104	24	1729	0	115	0	1
442	0	44	20	1	1336	0	108	20	1736	2	114	16	3
482	2	14	0	1	1337	4	109	22	1736	3	82	17	1
491	2	47	16	1	1338	0	108	20			114	17	5
510	2	14	28	1	1342	0	104	28	1736	11	114	17	2
641	0	49	0	1	1370	112	110	20	1736	66	114	16	1
902	2	56	10	1	1378	8	110	2	1985	0	123	0	4
961	33	59	3	1	1386	16	78	18	1985	2	123	0	3
961	35	59	3	1	1400	3	110	21	1985	6	123	0	5
1182	0	96	28	1	1400	10	110	20	1985	10	123	0	4
1211	4	97	22	1	1450	0	108	16	1985	18	91	0	1
1214	64	64	28	1	1452	0	108	24	1985	24	123	0	1
1215	0	101	28	2	1473	18	107	0	1985	26	123	0	2
1215	3	101	29	1	1514	6	110	16	1985	27	123	1	1
1290	1	108	17	1	1525	32	79	14	1985	32	123	0	1
1322	0	108	16	1	1531	0	111	20	1985	34	123	0	1
1323	0	77	18	1	1531	7	111	23	1988	0	122	10	1
		109	18	1	1535	2	111	30	2014	4	126	30	1

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 ((独)国立国際医療研究センター・研究所・感染症制御)

研究要旨

本研究の目的は、多剤耐性緑膿菌の院内感染の実態を明らかにすること、ならびに、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、それらを標的とする多剤耐性菌の迅速検出法を開発することである。本年度は、多剤耐性緑膿菌に関する全国アンケート調査を実施した。その結果、我が国の医療施設で多剤耐性緑膿菌が新興しているが、この3年間では減少傾向にあることが明らかになった。一方、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')-Iac およびメタロβラクタマーゼ IMP に着目し、これら2因子を標的としたイムノクロマト法を開発した。全国から無作為に集まった多剤耐性緑膿菌を用いてイムノクロマト試験を実施した結果、AAC(6')-Iac およびメタロβラクタマーゼ IMP を産生する多剤耐性緑膿菌は日本全国で広く検出されることが明らかとなった。本研究で開発されたイムノクロマト法は擬陽性、偽陰性がない簡便な検出法であることから、今後、院内感染対策として多剤耐性緑膿菌のモニタリングならびに早期検出に有効であることが期待される。

研究協力者

秋山 徹 (国立国際医療研究センター)
安藤 公英 (国立国際医療研究センター)
島田 佳世 (国立国際医療研究センター)
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 (株式会社 BML 総合研究所)
小川 美保 (株式会社 BML 総合研究所)

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。本研究では、日本の医療施設における多剤耐性緑膿菌による院内感染の実態を把握するために全国アンケート調査を実施した。また、多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析を行なうことにより

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

重要な薬剤耐性因子を同定し、同菌の早期検出やモニタリングに有用な簡便かつ迅速な薬剤耐性菌検出法の開発を目指した。

B. 研究方法

1. 多剤耐性緑膿菌に関するアンケート調査

対象は、全国の 2,719 医療施設及び臨床検査受託事業所 2 施設であった。このうち医療施設は、全国の 200 床以上のすべての病院を対象とした。

アンケート調査用紙を平成 22 年 3 月 16 日に対象施設へ発送し、同年 4 月 30 日までに回答を得た(資料 1-3)。アンケート参加施設は、病院 771 施設(回答率 28.4%)及び臨床検査受託事業所 2 施設であった。アンケート参加医療施設の平均病床数は、 410 ± 208 床(中央値: 346)であった。アンケートを配布した全医療施設の平均病床数は、 370 ± 177 床(中央値: 313)であった。アンケートを配布した全医療施設に比較して、アンケート参加医療施設は有意に平均病床数が多かった($p < 0.0001$)。

多剤耐性緑膿菌の定義として、カルバペネム系薬剤(イミペネム等)、アミカシンおよびフルオロキノロン系薬剤(シプロキサシン等)の 3 剤全てに耐性(感受性以外)の緑膿菌とした。また、これらの 3 剤のうち、2 剤に耐性の緑膿菌を 2 剤耐性緑膿菌と定義した。各抗菌薬剤のブレイクポイントは表 1 に示す。

アンケートでは、平成 19 年 4 月から平成 22 年 3 月までの 3 年間にそれぞれの施設で分離された緑膿菌、2 剤耐性緑膿菌 および多剤耐性緑膿菌の年度別総数および分離された臨床材料の種類、2 剤耐性緑膿菌 および多剤耐性緑膿菌に

関しては分離された患者数を質問した。臨床検査受託事業所では、患者数に関する情報の集計を行わなかった。なお、アンケートの内容(資料 1-3)は、疫学研究に関する倫理指針(文部科学省、厚生労働省)の対象外の研究である。

統計解析はフリードマン順位付双方向分析及び $m \times n$ 分割表の検定を行った。

2. 簡易迅速診断法の開発

前年度、私達は、AAC(6')-Iae 産生株を簡便かつ迅速にスクリーニングする方法として抗 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。本年度は、これに加え、メタロ β ラクターゼ IMP-1 に対する抗体を調製し、抗 IMP-1 イムノクロマトとしてキット化した。同時に、抗 AAC(6')-Iae/IMP-1 イムノクロマトプレートの作製も試みた。抗体調製では、まずメタロ β ラクターゼ IMP-1 の His タグ付き組換え蛋白質をラットに免疫後、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 タグ付き IMP-1 を用いて ELISA により実施した。

3. 抗 AAC(6')-Iae/IMP-1 イムノクロマトの評価試験

株式会社 BML 総合研究所より分与いただいた 248 株の多剤耐性緑膿菌臨床分離株を対象に、抗 AAC(6')-Iae/IMP-1 イムノクロマト試験を実施した。

4. 分子疫学解析: パルスフィールドゲル電気泳動

開発した抗 AAC(6')-Iae/IMP-1 イムノクロマト法の評価試験に用いた 248 株の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を行った。得られたパルスフィールドゲル電気泳動のパターンは、高度多剤耐性緑膿菌 IMCJ2.S1 株のパルスフィールドゲル電気泳動パターンとの比較解析、ならび

にクラスター解析を行った。

5. PCRによるインテグロンおよび薬剤耐性遺伝子の検出

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の可変領域内に、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用いた 248 株の多剤耐性緑膿菌についてインテグロンの可変領域の PCR 検出を行なうことに加え、*aac(6')-Iae*、*aac(6')-Ib*、および *bla_{IMP-1}* についての PCR 検出も行い、得られた DNA 断片について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. 多剤耐性緑膿菌に関するアンケート調査

1-1. 医療施設における緑膿菌の分離状況

平成 19 ～ 21 年度における分離総数および年・1000 床あたりの分離数は、3 年間を通しての増加または減少傾向は見られなかった(表 2)。3 年間に分離された緑膿菌の検体材料の種類は、呼吸器系材料 55.5 %で、過半数を占めていた(図 1 a)。また、尿路系材料 19.1 %、便 7.3 %、血液 2.7 %、その他の材料 15.4 %であった。これらの割合は年度毎に比較してもほぼ同様であっ

た(データは示さない)。

1-2. 医療施設における 2 剤耐性緑膿菌の分離状況

表 2 に示したように、平成 19 年度の分離数及び年・1000 床あたりの分離数は共に他の年度と比較すると多く、平成 20 年度及び 21 年度にかけて減少傾向が見られた(分離数：

$p = 0.0003$ 、年・1000 床あたりの分離数： $p = 0.03$)。緑膿菌分離総数あたりの 2 剤耐性緑膿菌の割合は、平成 19 年度は 6.3 %であったが、平成 20 年度 6.0 %、平成 21 年度 5.8 %と有意に減少していた($p < 0.0001$)。2 剤耐性緑膿菌の検体材料の種類は、呼吸器系材料 56.4 %と過半数を占めていた。尿路系材料は 24.1 %で、緑膿菌における尿路系材料(図 1 a)と比較すると有意に高値であった($p < 0.0001$)。また、便 4.9 %、血液 2.6 %、その他の材料 12.1 %であった(図 1 b)。2 剤耐性緑膿菌が分離される材料の種類は年度毎に比較してほぼ同様であった(データは示さない)。

2 剤耐性緑膿菌が分離された患者数は、年・1000 床あたり、平成 19 年度は 21.5 名であったが、平成 20 年度は 20.5 名、平成 21 年度は 19.7 名で、年を追って減少していた($p = 0.03$)。

2 剤耐性緑膿菌が分離された医療施設は、771 施設中、平成 19、20、21 年度は、各々 521 施設(67.6%)、537 施設(69.6%)、553 施設(71.7%)と増加していたが有意差は見られなかった。平成 19 ～ 21 年度の 3 年間に、583 施設(75.6%)から 2 剤耐性緑膿菌が分離された。

図 2a は、各医療施設で 2 剤耐性緑膿菌が分離された患者数(年・1000 床あたりの換算値)を年度別に示した。2 剤耐性緑膿菌の分離患者数の

中央値は、平成 19 ～ 21 年度は、各々年間 1000 病床あたり 12.0、12.5、11.4 名であった。平成 19 年度に 2 剤耐性緑膿菌が分離された患者数は、95%の医療施設で 0-73.4 名/年・1000 床の範囲であった。残りの 5%の医療施設ではそれ以上の患者数（最大 255.4 名/年・1000 床）であった。平成 20 年度及び 21 年度では 95 パーセンタイルはそれぞれ 64.8 及び 68.0 名/年・1000 床で、最大値はそれぞれ 338.7 及び 383.9 名/年・1000 床であった。2 剤耐性緑膿菌が分離された患者数が多かった医療施設（95 パーセンタイルを超える施設）は、全国に分布し、特定の地域に偏在してはいなかった（データは示さない）。22 県では 95 パーセンタイルを超える患者数を報告した医療施設はなかった。

1-3. 医療施設における多剤耐性緑膿菌

表 2 に示したように、平成 19 年度の分離数及び年・1000 床あたりの分離数は共に他の年度と比較すると多く、平成 20 年度及び 21 年度にかけて減少傾向が見られた（分離数： $p = 0.0001$ 、年・1000 床あたりの分離数： $p = 0.02$ ）。平成 19 年度の年・1,000 床あたりの分離数は、24.4 であったが、平成 20 年度 20.7、平成 21 年度 18.0 と減少していた。緑膿菌分離総数あたりの多剤耐性緑膿菌の割合は、平成 19 年度 3.4%であったが、平成 20 年度 2.8%、平成 21 年度 2.5%と有意に減少していた（ $p < 0.0001$ ）。多剤耐性緑膿菌の検体材料の種類は、3 年間を通してみると、呼吸器系材料 37.7%で、緑膿菌や 2 剤耐性緑膿菌における呼吸器系材料の割合と比較すると有意に低値であった（ $p < 0.0001$ ）。その一方、尿路系材料は 42.6%で、

緑膿菌や 2 剤耐性緑膿菌における割合と比較すると有意に高値だった（図 1 c、 $p < 0.0001$ ）。また、便 7.2%、血液 2.2%、その他の材料 10.3%であった。多剤耐性緑膿菌が分離される臨床材料の種類は年度毎に比較してほぼ同様であった（データは示さない）。

1-4. 多剤耐性緑膿菌が分離された患者数

多剤耐性緑膿菌が分離された患者数は、平成 19 年度 8.8 名/年・1000 床であったが、それ以降、平成 20 年度 7.9 名/年・1000 床、平成 21 年度 7.1 名/年・1000 床で、平成 19 年度の値と比較すると減少傾向が見られた（ $p = 0.003$ ）。

多剤耐性緑膿菌が分離された医療施設は、771 施設中、平成 19、20、21 年度は、各々 411 施設（53.3%）、405 施設（52.5%）、409 施設（53.0%）であった。平成 19 ～ 21 年度の 3 年間に、545 医療施設（70.7%）から多剤耐性緑膿菌が分離された。

図 2b は、各医療施設で多剤耐性緑膿菌が分離された患者数（年・1000 床あたりの換算値）を年度別に示した。多剤耐性緑膿菌の分離患者数の中央値は、平成 19 ～ 21 年度では、年間 1000 病床あたり各々 1.9、1.9、1.8 名であった。多剤耐性緑膿菌が分離された患者数の 95 パーセンタイル値は、平成 19 年度 39.5 名/年・1000 床で、最大値は 502.5 名/年・1000 床であった。平成 20 年度及び 21 年度では 95 パーセンタイル値は各々 33.1 及び 32.6 名/年・1000 床、最大値 275.6 及び 373.3 名/年・1000 床と、平成 19 年度と同様の傾向を示した。多剤耐性緑膿菌が分離された患者数の割合（年・1000 床あたり）が高かった医療施設（95 パーセンタイル値を超える施

設)は、全国に分布し、特定の地域に偏在していなかった(データは示さない)。27 県では 95 パーセンタイル値を超える患者数を報告した医療施設はなかった。多剤耐性緑膿菌を分離した患者数(1000 床あたり)が多い医療施設は、病床数の規模とは相関しなかった。

1-5. 臨床検査受託事業所における緑膿菌の分離状況

臨床検査受託事業所における年別の分離状況を表 3 に示す。緑膿菌株の分離数は、平成 19 年度と比較すると、平成 20 年度及び平成 21 年度は減少していた。データは示さないが、緑膿菌が分離された検体材料の種類は、呼吸器系材料 60.5 %、尿路系材料 18.5 %、便 3.0 %、血液 0.7 %、その他の材料 17.2%であった。

1-6. 臨床検査受託事業所における多剤耐性緑膿菌の分離状況

臨床検査受託事業所における多剤耐性緑膿菌の年あたりの分離数は、平成 19 年度と比較すると、平成 20 年度は減少したが、平成 21 年度では増加に転じた(表 3)。緑膿菌分離総数あたりの多剤耐性緑膿菌の割合では、平成 19 年度 1.8%、平成 20 年度 1.6 %、平成 21 年度 2.1%であった。しかし、臨床検査受託事業所における 3 年間の多剤耐性緑膿菌の分離割合を医療施設と比較すると、全ての年度で低値であった。多剤耐性緑膿菌の検体材料の種類は、3 年間を通してみると、呼吸器系材料は 41.7 %で、緑膿菌における呼吸器系材料の割合と比較すると有意に低値であった($p < 0.0001$)。その一方、尿路系材料は 49.4 %で、緑膿菌における割合と比較すると有意に高値だった($p < 0.0001$)。また、便 2.0 %、

血液 0.7 %、その他の材料 6.3%であった(データは示さない)。

2. AAC(6')-Iae/IMP-1 イムノクロマトの開発

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複数の抗体を安定的に得た。これらのエピトープを決定するために、IMP-1 の全長をカバーする、15 残基のペプチドを 24 本設計し ELISA による解析を行った。その結果、得られた抗体のエピトープは、大きく 2 箇所に分けられ、それぞれに IMP 型メタロβラクタマーゼの各種サブタイプ間で保存されていることが明らかとなった(データ非表示)。以上の結果は、これらの抗体は広範囲の IMP 型メタロβラクタマーゼを認識可能であることを示唆していた。得られた抗体のうち 2 種を選択し、イムノクロマトプレートを作製し、組換え蛋白質 IMP-1 を用いて試験した結果、クリアなテストラインを検出した。

3. 抗AAC(6')-Iae/IMP-1イムノクロマトの評価試験

248 株の多剤耐性緑膿菌を対象に AAC(6')-Iae/IMP-1 イムノクロマト試験を実施した結果、AAC(6')-Iae のみ陽性を示す株は 7 株(2.8%)、IMP-1 のみ陽性を示す株は 41 株(16.5%)、AAC(6')-Iae および IMP-1 の両因子に陽性を示す株は 150 株(60.5%)、両因子ともに陰性の株は 50 株(20.2%)、であった。

PCR による *aac(6')-Iae* 遺伝子の検出ならびにシーケンス解析結果は、イムノクロマト試験の結果と完全に一致した。*bla_{IMP}* 遺伝子の PCR 検出とシーケンス解析は、本試験における陽性株が、*bla_{IMP-1}*、*bla_{IMP-6}*、*bla_{IMP-7}*、*bla_{IMP-10}*、および *bla_{IMP-11}* を保有していることを示した。本結果は、抗体エピトープの解