

201123008A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 荒川 宜親

平成24(2012)年3月

平成23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	名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学／耐性菌制御学	教 授
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	福岡大学医学部公衆衛生学教室	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	副院長 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 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 (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学	准教授
	池 康嘉	群馬大学大学院医学系研究科 細菌学	名誉教授
	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
	佐多徹太郎	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	部 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	川崎医科大学医学部公衆衛生学	講 師
	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
	常 彬	国立感染症研究所細菌第一部	主任研究官

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

荒川 宜親

新型のメタロ- β -ラクタマーゼSMB-1の解析	13
---------------------------------	----

ペニシリン低感受性B群連鎖球菌の遺伝的背景に関する研究と院内多発事例の細菌学的解析	18
---	----

日本国内の医療機関で分離された <i>Acinetobacter baumannii</i> のタイピングと流行株の簡易検出法構築に向けた検討	23
---	----

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JANISシステムとの連携に関する研究	28
---	----

河野 文夫

薬剤耐性菌による感染症サーベイランスにおける感染率・罹患率の施設間格差に関する研究	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	32
-------------------------------	----

小西 敏郎

手術部位感染症の低減化に関する研究	56
-------------------	----

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	73
--	----

谷原 真一

傷病名に「敗血症」という文字列を含むレセプトの出現頻度並びに「疑い」コードの有無別に検討した医療費総額、入院日数、抗生物質使用状況の分析	77
--	----

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)	83
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 精密管理に関する研究	95
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	106
森兼 啓太	
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	117
宮崎 久義	
院内感染対策支援の方法と効果に関する研究	124
山口 恵三	
<i>Acineobacter</i> 属菌が産生する OXA-型カルバペネマーゼの検出法の構築と 国内分離株を用いた分子疫学調査	127
「特定菌 (特定耐性菌) 異常集積時における対応事例集 各論『 <i>P. aeruginosa</i> 』」の作製	131
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	145
飯沼 由嗣	
VRE、MDRP等の伝播様式と蔓延防止に関する研究	149
池 康嘉	
グラム陽性菌 (腸球菌、黄色ブドウ球菌) の多剤耐性菌に関する研究	158
切替 照雄	
多剤耐性緑膿菌の院内感染対策に関する研究	162
佐多徹太郎	
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	167
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	179

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	184
松本 哲哉	
侵襲性感染症を引き起こす市中感染型MRSAの国内における検討	188
松本 智成	
多剤耐性菌(特に抗酸菌)の耐性機序に関する研究	192
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	194
常 彬・和田 昭仁	
肺炎球菌のカルバペネム耐性機構の解析	198
《研究協力者報告書》	
川村久美子	
健康人から分離された基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生菌の 分子疫学的解析に関する研究	201
山岸 拓也	
厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業検査部門の2010年精度管理から 判明した疑義データの検討	203
網中 眞由美	
全入院患者部門における データ提出状況と病床数、サーベイランス担当者の 職種の関係についての検討	210
八柳 潤	
秋田県の一医療機関で分離された多剤耐性 <i>Achromobacter xylosoxidans</i> の 分子疫学性状と ClassI Integron の解析	216
市販鶏肉からの CTX-M 基質拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL) 遺伝子保有株の 分離と分離株の解析	222
秋田県内の医療機関における CTX-M 基質拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL) 遺伝子保有株の分離状況	230
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	237
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷・資料	241

I. 総括研究報告書
(平成23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
(名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学／耐性菌制御学)

研究要旨

H23 年度の研究班では、新型の薬剤耐性菌に関する基礎細菌学的な解析、臨床分離菌の分子疫学的解析、さらに、薬剤耐性菌の検査技術の向上や普及、新型耐性菌の検査法の開発等、多面的な研究活動を継続した。また、厚生労働省が実施している、院内感染対策サーベイランス(JANIS)事業の改善や向上を学術的、専門的な観点から支援するための研究を継続した。

新型の薬剤耐性菌に関する研究では、海外で問題となっている NDM-1 と同じメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)に属する新型の MBL である SMB-1 を新たにセラチア・マルセスセンスより発見しその酵素学的な特徴を解析した。さらに、本研究班では、ペニシリンに対し耐性菌がいないと長らく考えられて来た、B 群連鎖球菌(GBS)において、ペニシリン非感性を獲得した株(PRGBS)が出現したことを、世界に先駆けて発見し報告して来たが、本年度の研究により PRGBS は、ST458 と遺伝的に判定される特定の遺伝型のグループに多いことや、PRGBS は MRSA や VRE などと同様に、医療機関内において患者間で伝播し、院内感染の原因となりうることを確認した。幸いにも現時点までには、新生児や小児の髄膜炎症例、敗血症例からは PRGBS は確認されていないが、成人の呼吸器系検体から多く分離されており、今後の動向を監視する必要がある。

検査法の開発としては、OXA-型カルバペネマーゼの産生株を迅速に検出試験法の開発が進められているが、実用化段階に達したのものとしては、IMP-1 型 MBL とアミノ配糖体耐性酵素を同時に産生する緑膿菌を判定可能なイムノクロマト法、多剤耐性緑膿菌アウトブレイク時に面倒な PFGE 解析の代わりに実施できる PCR ベースの分子疫学解析法、さらに、最近、プラスミド媒介性のフルオロキノロン耐性機構の一つとして問題となっているフルオロキノロンアセチル化酵素、AAC(6')-Ib-cr、を産生する株を簡便に識別するディスク試験法などを構築した。

JANIS 事業に関連した研究では、提出データの精度管理や集計法の改善に関する研究、JANIS 事業の 5 つの部門である、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(SSI)部門、新生児集中治療(NICU)部門における感染症の低減化に資する研究、NICU における感染症を低減化させるための「ハンドブック」の作製、JANIS 検査部門で厚生労働省に提出される薬剤感受性データを活用し、薬剤耐性菌等の医療機関内での伝播拡散を可視化して院内感染対策を支援する解析ソフトウェア(2DCM-wed)の開発と JANIS 検査部門参加医療機関への公開と普及などを行った。

研究分担者 (50 音順)

飯沼由嗣	金沢医科大学臨床感染症学講座	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	国立国際医療研究センター	
	感染症制御研究部	部長
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
小西敏郎	N T T 東日本関東病院	副院長
佐多徹太郎	富山県衛生研究所	所長

柴山恵吾	国立感染症研究所 細菌第二部	部長
常 彬	同 上	細菌第一部 主任研究官
鈴木里和	同 上	細菌第二部 主任研究官
谷原真一	福岡大学医学部衛生学	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	主任教授
松本智成	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター	
		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	山形大学医学部附属病院	

検査部・感染制御部 教授
山口恵三 東邦大学医学部 微生物/感染症学 教授
山根一和 川崎医科大学公衆衛生学講座 講師
山本友子 千葉大学大学院薬学研究院
微生物薬品化学 教授

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)などの薬剤耐性菌が欧米諸国のみならず、発展途上国を含む多くの国々や地域で蔓延しつつあり、さらに2010年には、インド/パキスタン地域から英国や欧州、さらに世界各地にNDM-1と命名された新型のメタロ-β-ラクタマーゼを産生する多剤耐性の肺炎桿菌や大腸菌が広がり、世界的に大きな関心事となっている。国内では、NDM-1産生株は未だ少ないものの、多剤耐性を獲得したアシネトバクター・バウマニによる院内感染がしばしば発生し、監視と対策の強化が求められている。さらに、国内では、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、しばしば分離されており、一部の医療機関では、複数の患者より同時に多数分離されるなど、院内感染の起因菌として対策の強化が求められている。また、海外では、多剤耐性アシネトバクターに加え、KPC型のカルバペネマーゼを産生する肺炎桿菌なども蔓延しつつあり、大学附属病院などの高度医療を担当する特定機能病院のみならず一般の医療機関でも警戒されつつあり、薬剤耐性菌をめぐる状況は、ますます複雑かつ解決困難な事態に陥りつつある。

そこで、このような深刻な状況に対処し打開策を見いだすため、本研究班では、薬剤耐性菌の基礎研究グループと厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)事業の改善に関する研究グループの二つの研究グループを組織し、研究を継続した。前者の基礎研究グループでは、多剤耐性緑膿菌(MDRP)やバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)などの既存の薬剤耐性菌のみならず、新規の薬剤耐性機構を獲得した新型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の分子、遺伝子レベルでの解明を目指すとともに、その結果に基づいて、迅速、簡便な検査法の構築を目的として研究を進める。それと同時に、既存の薬剤耐性菌の検出状況やそれらの動向について、分子疫学的な解析手法などを加味して調査、分析を行なう。また、地方自治体が所管する地域の医療機関で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できるよう、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ことを目的として、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、検査法の改良や構築などを試みる。一方、JANIS事業の向上に関する研究グループでは、H12年から厚生労働省が開始した、院内感染対策サーベイランス

事業(JANIS 事業)のさらなる安定的運用と改善のための研究を、学術的、科学的観点から実施し、その向上を支援する。

(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、患者等の個人情報扱わず、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、疫学研究倫理審査を受け、承認された後に実施する。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る。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、管理者を限定する等十分な安全対策を行った。

B. 研究方法

平成 23 年度の研究班では、国内の臨床現場で臨床検体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、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。

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、検査法の評価や改良などを行った。同時に、我が国の臨床現場で分離された薬剤耐性菌の分子疫学調査が、様々な研究グループにより続行された。

JANIS 事業の「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、還元図表の内容の改良など種々検討を行なった。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や情報提供を行なった。

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微生物研究班の研究グループにより行なわれた。

C. 研究結果

1. 薬剤耐性菌基礎研究グループの研究成果

a-1. ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌の遺伝的背景に関する研究と院内多発事例の細菌学的解析 (木村 幸司、長野 則之、長野 由起子、荒川 宜親)

B 群連鎖球菌 (Group B streptococcus, GBS, *Streptococcus agalactiae*) は、新生児敗血症、髄膜炎の筆頭原因菌であり、また、糖尿病患者、高齢者に敗血症、髄膜炎を引き起こすことが知られている。臨床分離される GBS は、すべてペニシリン系薬を含むベータラクタム系薬に感性であるとされ、GBS 感染症の予防、治療の第一選択薬はペニシリン系薬であるが、我々は、ペニシリン結合蛋白(Penicillin-binding protein, PBP) 2X に変異を獲得し、ペニシリン系薬、一部のセファロスポリン系薬に感性でなくなったペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌(Group B streptococci with reduced penicillin susceptibility, PRGBS)の存在を世界で初めて報告した。本年度は、日本で分離された PRGBS 28 株を対照に Multilocus sequence typing(MLST)解析を行い、日本の PRGBS 株の遺伝的背景を明らかにした。また、一つの医療機関で PRGBS 疑い株が多発した事例があったため、PRGBS 疑い株を細菌学的に詳細に解析した。

a-2. 日本国内の医療機関で分離された *Acinetobacter baumannii* のタイピングと流行株の簡易検出法構築に向けた検討 (松井 真理、荒川 宜親)

アシネトバクター属、特に *Acinetobacter baumannii* による感染症の増加が世界中で進んでいる。中でも European clone II の系統株は、世界流行株とされる。本研究では、わが国で分離された *A. baumannii* の Multilocus Sequence Typing (MLST) と流行株の簡易検出方法開発を目指した検討を行った。2000 年から 2010 年に日本国内の医療機関で分離されたアシネトバクター属で、重複を除いた 77 株のうち、遺伝子学的手法で *A. baumannii* と菌種同定された 33 株の MLST を Bartual らの手法で行った。15 株が世界流行株とされる clonal complex 92 (CC92) に属し、他の 18 株のうち 17 株は新規 sequence type (ST) であった。2000 年から 2009 年に分離された 22 株は、Pasteur 研究所の手法でも MLST を行ったところ、Bartual らの手法で CC92 に属した 8 株は、全て ST2 に分類された。その他の株のうち 12 株はいずれの手法でも singleton であり、両手法の分類結果に大きな相違はなかった。

*bla*_{OXA-51-like} は、*A. baumannii* のみで検出され、他の種では検出されなかった。その塩基配列は、MLST 結果と高い相関があり、CC92/ST2 が有した *bla*_{OXA-66}、*bla*_{OXA-82}、*bla*_{OXA-83} と non-CC92/non-ST2 の有した遺伝子には nt107 に一塩基の違いがあった。当該塩基による CC92 の簡易検出法を構築し、その有用性を検討中である。

a-3. 新型のメタロ-β-ラクタマーゼ SMB-1 の解析 (和知野 純一、荒川 宜親)

臨床分離カルバペネム耐性 *Serratia marcescens* より新規メタロ-β-ラクタマーゼ (SMB-1 と命名) を発見した。活性中心の亜鉛に配位するアミノ酸の種類から、SMB-1 はメタロ-β-ラクタマーゼの中でもサブクラス B3 に属するものであることがわかった。SMB-1 酵素を精製し、酵素学的パラメータを算出したところ、本酵素がイミペネムやメロペネムなどのカルバペネム系薬を効率よく分解することがあきらかとなった。また、SMB-1 遺伝子は DNA 転位因子である *ISCR1* とともにゲノム DNA 上に存在した。したがって、SMB-1 遺伝子は *ISCR1* とともに何らかの細菌から *S. marcescens* に取り込まれたものと推測された。さらに我々は、SMB-1 酵素の結晶を作製し、SMB-1 酵素の X 線結晶構造解析を試みた。本年度は結晶作製を中心に作業をすすめ、その結果、X 線結晶構造解析に至適な結晶を得ることができた。今後、SMB-1 の 3 次元構造の詳細を決定し、得られた構造情報を SMB-1 酵素阻害剤の開発等へと応用したいと考えている。

a-4. 健常人から分離された基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ産生菌の分子疫学的解析に関する研究

(中根 邦彦、川村 久美子、荒川 宜親)

近年、市中感染症の起因菌として基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌の分離頻度が高くなりつつある。本研究ではその要因の一旦を明らかにすべく、一般健常人における ESBL 産生菌の保菌調査を行なうとともに、検出された菌の分子疫学的解析を行なった。重複除く 2,563 名 (男性 1,050/女性 1,513) を対象に調査した結果、123 名 (4.8%) (男性 62/女性 61) から合計 150 株 (大腸菌 145 株) の ESBL 産生菌を検出した。ESBL 産生大腸菌の O 血清型別では O25 (27 株) が最も多く、次いで O1 (11 株) であった。ESBL 関連遺伝子は CTX-M 型のみ (52.4%)、CTX-M 型 + TEM 型 (40.0%) で全体の 9 割を占め、その型は CTX-M-14 (44.9%)、-15 (18.8%)、-2 (13.8%)、27 型 (13.8%) であった。このうち、CTX-M-27 型の 84.2% が血清型 O25 で、全株がフルオロキノロン系抗菌薬耐性を示した。また、長期間 (6-8 ヶ月) 連続して ESBL 産生菌が検出される事例が 12 例あり、その多くが血清型 O25 および O1 の大腸菌であった。本研究で健常人の腸管内における ESBL 産生菌の保菌状況を明らかにする事ができ、市中における本菌の拡散ルートの予測および蔓延防止対策への貢献が期待される。

b. 侵襲性感染症を引き起こす市中感染型 MRSA の国内における検討 (松本 哲哉)

市中感染型 MRSA (Community Associated MRSA: CA-MRSA) は院内感染型の MRSA と異なり、一般社会において広がっている耐性の黄色ブドウ球

菌である。本菌は米国を中心に 2000 年以降、急激に拡大する傾向にあるが、国内ではその状況がまだ十分に把握されているとはいえない。我々は昨年度の本研究班の研究において、国内の皮膚感染症患者から分離された MRSA241 株を対象に SCCmec typing を用いた検討を行い、type IV あるいは type V の CA-MRSA と判定された菌株が 141 株 (58.5%) 存在し、国内でも高率に CA-MRSA が分離されている状況を明らかにした。さらに今年度は、菌血症など侵襲性の高い感染症における CA-MRSA の分離状況を明らかにするために、血液培養などの検体から分離された MRSA を対象に検討を行った。2011 年 1 月から 12 月までに日本各地の医療機関から検査センターに培養を目的として提出された無菌検体 (血液、カテ先、髄液、胸水、腹水) から分離された MRSA のうち、CA-MRSA の感度を上げるために FMOX $\leq$ 16、IPM $\leq$ 4、FOM $\leq$ 16 のいずれか 1 つでも条件を満たす菌株を選択し、130 株を対象として解析を行った。その結果、type IV の株が 19 株 (14.6%) 確認されたが、type V の株は分離されなかった。さらに CA-MRSA の代表的な病原因子である PVL (Panton-valentine leukocidin) はどの株からも確認できなかった。これらの結果から、国内において CA-MRSA は皮膚感染症に比べれば明らかに低率であるが、まれとは言えない程度に分離されることが明らかとなった。また、PVL 分離株は検出されなかったことから、血液分離株と異なるタイプの CA-MRSA が菌血症などの起炎菌となっている可能性が示唆された。

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

(1) VanA 型 VRE の VanA 遺伝子をコードとする Tn1546(10.85kb)の IS 挿入、欠損、アミノ酸置換等の遺伝子構造解析から、これまで日本で分離されたバンコマイシン耐性腸球菌(vancomycin resistant enterococci; VRE)の Tn1546 の構造は、12 型に分類された。これらは、欧米で報告されているもの、東アジアで報告されているもの、日本特有のものが存在する。今回、海外(米国)帰国患者から分離された *E. faecium* VanA を解析し、欧米で分離される型の Tn1546 の構造をしていた。

(2) 日本で分離された *E. faecium* VanA VRE から、VRE の病原性因子(定着因子)であるバクテリオシンを解析し、新型のバクテリオシン(Bac51)を発見した。このバクテリオシンは接合伝達性プラスミド(6kbp)にコードされ、精製したバクテリオシンは、これまで報告のない静菌的活性を示すバクテリオシンであった。

d. 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)

本研究では、肺炎球菌の Telithromycin (TEL) 高度耐性機構の解明を目的に、国内で臨床より分離され

た TEL 低感受性株 S1(MIC=1 μ g/ml)から TEL 選択により耐性菌 SP36(MIC=32 μ g/ml)を分離し、その耐性機構を検討した。次世代シーケンス解析により TEL 耐性に関わる新規の遺伝子 *rlmAII* を同定した。*RlmAII* は rRNA の TEL 結合サイト A752 に近い G748 をメチル化する。このメチル化活性を失うことにより TEL の結合力が低下し耐性化したと考えられる。さらに高度耐性化した SP52(MIC=512 μ g/ml)は *rlmAII* の変異に加えて riboprotein L22 の変異(K94E)有していた。高度耐性化には同時に *ermB* 遺伝子が必須であった。*rlmAII* の欠損と L22 変異、*ermB* の組合せにより TEL 高度耐性化することを明らかにし、肺炎球菌ケトライド高度耐性菌出現の予知情報提供に貢献すると期待できた。

e. 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)

メタロ- β -ラクタマーゼの基質認識と加水分解機構については未だなお論議されている。さらに問題なのはメタロ- β -ラクタマーゼに対する臨床で有効な阻害剤はなく、その開発が緊急の課題となっている。

本研究では、アミノ酸変異に伴う立体構造変化がどのように基質特異性に影響を及ぼすかを明らかにするために IMP-1 メタロ- β -ラクタマーゼと 85% のアミノ酸配列相同性を有する *Acinetobacter* spp.由来の IMP-2 メタロ- β -ラクタマーゼの立体構造を X 線結晶構造解析により決定した。IMP-1 の構造との比較から、IMP-2 の酵素活性ポケットは IMP-1 よりも狭くなっており、この酵素ポケットの空間の違いが両者の基質特異性に影響を及ぼす原因の一つであると考えられる。

f. 多剤耐性緑膿菌の院内感染対策に関する研究 (切替 照雄)

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し、多剤耐性緑膿菌臨床分離株より流行性の薬剤耐性因子を同定すると共に、それらを標的とする多剤耐性緑膿菌の迅速検出法を開発することである。2009 年から 2010 年に全国の医療施設から集められた多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析を行なった結果、AAC(6')-Iae 産生多剤耐性緑膿菌 NCGM2.S1 株が属するクローンとは異なる PFGE パターンを示す新興クローンを同定した。さらに、NCGM2.S1 株および新興クローンの一つ NCGM1179 株のゲノムをそれぞれ次世代シーケンサーで解析し、全塩基配列を決定した。IMP/AAC(6')-Iae 産生多剤耐性緑膿菌を迅速・簡便に検出できる高感度イムノクロマトキットを開発することができた。

g-1. 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

る研究 (綿引 正則、佐多 徹太郎)

耐性菌の細菌学的検査解析能力強化のため、今年度は、既知の耐性菌の検査に対応した検査法の精度管理、新たに出現する耐性菌の検査に対応した解析法の開発と地研の特性を活かした研究を実施した。その結果、①感染症マニュアルに示されているメタロβ-ラクタマーゼ産生菌の検査法の精度管理を実施し、再現性の高い検査であることを示した。さらに、②新しい分子疫学的検査法である LinePCR 法を開発、及び③多剤耐性菌の解析と公衆衛生上問題となりつつある基質拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) の分布や起源に関する研究を実施した。成果は、医療関連分野だけでなく、広く公衆衛生分野で貢献する成果となる。

g-2. 秋田県の一医療機関で分離された多剤耐性 *Achromobacter xylosoxidans* の分子疫学性状と Class I Integron の解析 (八柳 潤、佐多 徹太郎)

2003 年 7 月から 2006 年 9 月に秋田市内の 1 医療機関からメタロβ-ラクタマーゼ産生が疑われる 14 株のブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌が送付された。これらの分離株はいずれも IMP-1 遺伝子を保有する多剤耐性 *Achromobacter xylosoxidans* であることが判明したので、分子疫学的性状と耐性遺伝子の性状について基礎的な検討を実施した。XbaI PFGE パターンから分離株は同一起源と判断し得た。分離株が保有する Class 1 Integron のサイズは、株により約 2.5Kb 単独、約 3Kb 単独、約 2.5Kb ダブルレット、約 1.3Kb と 2.5Kb であった。4 株の Class 1 Integron のシーケンスを決定した結果、IMP-1、*aacA4*、*aadA5* を含む Gene Casette が同一 Class 1 Integron 中や、異なる Integron 間で組換え・転移した可能性が示唆された。今回供試した多剤耐性 *A. xylosoxidans* の多くが尿由来株であり、一医療機関において継続的に分離されたことは、*A. xylosoxidans* が院内感染起因菌として重要である可能性を示唆している。今後も秋田県内における多剤耐性 *A. xylosoxidans* の動向に注視する必要があると共に、分離株の多剤耐性機構についてさらなる検討が必要である。

g-3. 秋田県内の医療機関における CTX-M 基質拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離状況 (八柳 潤、佐多 徹太郎)

2003 年から 2010 年まで県内の医療機関から受領した 963 株の ESBL 疑い株のうち、680 株が CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有 ESBL であった。CTX-M 遺伝子保有株の 51.1% が *Escherichia coli*、42.2% が *Proteus mirabilis* であり、この 2 菌種が CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の 93.4% を占め、66.8% が尿由来であった。181 株の CTX-M 遺伝子を型別した結果、CTX-M-9 グループが 69 株と最も多く、CTX-M-2 グループが 68 株と続き、CTX-M-1 グループが 36 株であった。36 株の CTX-M-1 グループ遺伝子保有株はすべて *E. coli* であり、CTX-M 遺伝子のシーケンスを解析し

た結果 35 株が CTX-M-15、1 株が CTX-M-61 であることが明らかとなった。秋田県内の医療機関に CTX-M 型 ESBL 産生株が広く侵淫していることが明らかとなった。CTX だけではなく CAZ にも耐性を獲得した CTX-M-15 型 ESBL 遺伝子保有 *E. coli* が県内に侵淫していることが注目され、より適切な院内感染防止策の必要性を提起する必要がある。

g-4. 市販鶏肉からの CTX-M 基質拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離と分離株の解析 (八柳 潤、佐多 徹太郎)

CTX-M 遺伝子は *Kluyvera* 属菌の染色体遺伝子に由来すると考えられているが、*Kluyvera* 属菌の Reservoir に関する報告はほとんどみあたらない。我々は、市販鶏肉を対象として CTX-M 遺伝子を保有する *Kluyvera* 属菌の検出を試みた。秋田市内のスーパーで購入した鶏肉 16 検体を供試し、CTX-M-2 Group 遺伝子陽性 *Escherichia coli* 1 株と、これまでに報告されていない CTX-M-1 Group 遺伝子を保有する *K. cryocrescens* 2 株を分離した。分離された *K. cryocrescens* 2 株の CTX-M 遺伝子の周辺には、CTX-M 遺伝子の転移に関与するとされる *ISEcp1* により認識され得る遺伝子構造が存在していた。我々の成績は *Kluyvera* 属菌が CTX-M 遺伝子自体のジーンプールとなっている可能性を示すと共に、鶏の腸管が CTX-M 遺伝子保有大腸菌などの発生に関与する可能性を示唆するものと考えられた。今後も鶏が保有する *Kluyvera* 属菌とプラスミド性 CTX-M 遺伝子を保有する腸内細菌の遺伝子を解析し、CTX-M 遺伝子の起源に関する知見を集積する必要がある。

h. 薬剤耐性肺炎球菌の疫学と耐性機序の解析—肺炎球菌のカルバペネム耐性機構の解析— (常 彬)

本分担研究は日本国内の小児侵襲性感染症から分離された肺炎球菌 561 株血清型および薬剤感受性の解析を行い、そのうちメロペネムの MIC が 1 μg/mL を示す肺炎球菌 1 株が見出された。肺炎球菌のカルバペネム耐性機構を明らかにするため、メロペネムの MIC が 0.5 μg/mL と 1 μg/mL を示す菌の PBP1a、PBP2x、PBP2b のアミノ酸配列を調べ、比較した。その結果、メロペネムの MIC が 0.5 μg/mL と 1 μg/mL を示す肺炎球菌の PBP1a、PBP2x の配列には違いが見られなかった。一方、メロペネムの MIC が 1 μg/mL を示す肺炎球菌の PBP2b のアミノ酸配列は *Streptococcus mitis* B6 株の PBP2b と高い相同性があり、MIC が 0.5 μg/mL 肺炎球菌の PBP2b の C 末端配列と明らかな違いが見られた。これらの C 末端の違いは肺炎球菌のカルバペネムに対する高度耐性に関与するかどうかを解析し続ける予定である。

i. *Acinetobacter* 属菌が産生する OXA-型カルバペネマーゼの検出法の構築と国内分離株を用いた分

子疫学調査 (石井 良和、山口 恵三)

本研究では、簡便且つ迅速に *Acinetobacter* 属菌が産生する OXA-型カルバペネマーゼの検出システムを構築すること目的として研究を行い、イムノクロマトグラフィー法を応用した検出法を構築した。2007 年に収集された *Acinetobacter* 属菌の内、カルバペネム薬に 0.5 μ g/mL 以上の最小発育阻止濃度を示す菌株に対して、本方法による OXA-型カルバペネマーゼの検出を試みた。さらに、amplified rDNA restriction analysis によりカルバペネマーゼ産生 *Acinetobacter* 属菌の菌種同定を行うと共に、*Acinetobacter baumannii* に対しては multilocus sequence typing (MLST) を実施し、初めて全国レベルの分子疫学解析を実施した。その結果、2007 年におけるカルバペネマーゼ産生 *A. baumannii* に占める ST92 の割合が高く、クラス B に属するカルバペネマーゼのカルバペネム薬耐性への寄与は、*A. baumannii* では低く、non-baumannii *Acinetobacter* において高いことを明らかにした。これらの成果は、感染管理あるいは感染制御の分野で貢献する事が期待される。

j. VRE、MDRP 等の伝播様式と蔓延防止に関する研究 (鈴木 匡弘、長尾 美紀、飯沼 由嗣)

本研究では、多剤耐性緑膿菌 (MDRP) 等の容易な分子疫学解析法の開発を目的とし、菌株毎に保有状態の異なる open reading frame(ORF)の臨床分離株の保有パターンを利用した分子疫学に関する研究を行った。緑膿菌においては Genomic islet の検出パターンによって MLST 解析から得られる clonal complex レベルの識別が、溶原ファージによって株レベルでの識別が可能であった。その結果をもとに、10 個の genomic islet と 5 個のファージをマルチプレックス PCR で検出する、緑膿菌の迅速分子疫学解析法の開発に成功し、緑膿菌院内感染発生時における分子疫学解析を容易とし、感染管理に貢献する事が期待される。

k. 結核菌におけるピラジナミド作用メカニズムの研究 (森茂太郎、柴山 恵吾)

ピラジナミド (PZA) は結核菌の菌体内でピラジナミダーゼにより活性型のピラジン酸 (POA) に変換され、酸性条件下において抗結核菌活性を示すことが知られているが、POA の詳細な標的部位については不明な部分が多い。この研究では、結核菌における PZA 作用メカニズムを解明することを目的として、結核菌のニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Rv1330c) と POA の抗菌活性との関連について解析を進めてきた。本年度の研究では、POA による Rv1330c のホスホリボシル基転移反応の阻害が酸性条件下でより増強されることと、POA によって Rv1330c の ATP 加水分解活性が増強され、菌体内 ATP が消耗されることを明らかにした。これらの結果より、POA は Rv1330c を一つの標的部位として

抗菌活性を示している可能性が考えられた。今後は Rv1330c の機能構造相関解析を行うことにより、PZA や POA の構造を基にした新規抗結核薬の開発に結びつくことが期待される。

1. 多剤耐性菌 (特に抗酸菌) の耐性機序に関する研究 (松本 智成)

本研究では、リファンピシン耐性 *Mycobacterium heckeshornense* の耐性機構の解明を目的とし、*rpo* β 部位におけるシークエンス解析を行い、リファンピシン感受性 *M. heckeshornense* 株は、リファンピシン感受性 *M. tuberculosis* と DNA 塩基配列は異なっていたがアミノ酸配列は全く同じであった。RFP 耐性 *M. heckeshornense* 株は *M. tuberculosis* の rifampin 耐性化でも報告されている Gln から Lys へのアミノ酸置換が認められた。の成果を得た。その結果、リファンピシン耐性 *M. heckeshornense* の耐性責任遺伝子変異部位について明らかとする事ができ、非結核性抗酸菌症の耐性化機構に貢献する事が期待される。

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 (鈴木里和、山根一和、山岸拓也、網中眞由美、荒川宜親)

平成 12 年より開始され平成 19 年 7 月に大幅な改善が行なわれた院内感染対策サーベイランス (JANIS) 事業<<http://www.nih-janis.jp/>>は、平成 23 年 11 月にサーベイランス参加施設の追加募集が厚労省により行なわれ平成 24 年 2 月時点で 1000 施設の医療機関が参加する世界的にも稀な規模の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。これについて、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、データの精度管理や運用体制の改良や整備に関する研究を継続した。

m-1. 厚生労働省院内感染対策サーベイランス (JANIS) 事業 全入院患者部門における データ提出状況と病床数、サーベイランス担当者の職種の関係についての検討 (網中 眞由美、鈴木 里和)

厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 (JANIS) 全入院患者部門のデータ提出状況と病床数、サーベイランス担当者の職種の関係について 2010 年 2 月の時点で全入院患者部門参加登録していた医療機関 455 施設を対象として検討した。

参加医療機関の病床規模割合は、199 床以下 0.4%、200~399 床 50.1%、400~599 床 28.1%、600~799 床 12.3%、800~999 床 3.5%、1000 床以上 2.2%であった。サーベイランス担当者は臨床検査技師 (37.6%) と看護師 (28.1%) で全体の半数以上を占めた。提出期限内に 12 か月分のデータを提出したのは 228 施設 (50.1%) であった。データ提出の有無と病床数の間には関連は認めなかったが、サーベイランス担当者が臨床検査技師の場合、他の職種に比

べてデータ提出が有意に高いことが明らかになった。全入院患者部門は薬剤耐性菌感染症サーベイランスであり、患者発見のきっかけとなる微生物検査にかかわる臨床検査技師がキーパーソンとなることが示唆された。その上で全入院患者部門におけるサーベイランスシステム構築には、検査技師をはじめ組織的に多職種が連携していく必要があると考える。

m-2. 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業検査部門の 2010 年精度管理から判明した疑義データの検討 (山岸 拓也、鈴木 里和)

細菌検査に関わる全データを収集する院内感染対策サーベイランス事業検査部門では、検査システムから直接 JANIS のデータフォーマットに変換されたデータが提出されるため、真偽が疑わしい報告が含まれる。そのため精度管理が特に重要である。2010 年の年報集計のための精度管理ではバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌等これまで国内で報告されていない耐性菌の報告、年間を通じて大腸菌の分離報告無し、検体提出無しを疑義データとし、該当医療機関に対しその真偽を確認した。その結果、1 年分のデータを提出していた 534 医療機関の中で 97 医療機関から 218 件の疑義データを認めた。問い合わせに回答が得られた 145 件 (問い合わせの 66.5%) のうち、正しい報告と確認されたものは無く、誤報告が 110 件 (得られた回答の 75.9%)、不明が 35 件であった。誤報告の内訳は、薬剤感受性判定の誤り 37 (「誤り」の 33.6%)、他の菌の混入 19 (同 17.3%)、入力・設定の誤り 54 (同 49.1%) であった。不明の中には昔のデータのため確認不可という回答が多かった。疑義データが報告される理由は半数が入力や設定ミスであり、これは事務局側の依頼で修正可能である。そのため 2011 年からは還元情報の発信やエラー表示方法を改善した。

m-3. 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)

院内感染対策サーベイランス(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ている。本年度は、患者回転率の影響を受けない患者日あたり罹患率を用いて、長期療養型と急性期医療機関における罹患率の差異の要因を検討した。

全入院患者部門において 2008 年の 12 ヶ月間毎月データが提出され、かつ患者の基本情報がえられた 296 医療機関の全入院患者部門データを対象とした。患者回転率より医療機関を「長期療養型」「混合型」「急性期」の 3 群に分類し、入院日と検査日(発症日)との日数により持ち込み罹患率と病院内発症罹患率を算出し、病院群別に検討を行った。

MRSA 感染症については、持ち込み罹患率および病院内発症罹患率の両方が急性期型病院が長期療養

型病院に比べ高く、急性期型病院において罹患率が高いのは、持ち込みが多いのみならず病院内での発症も長期療養型に比べ多いと考えられた。同様の傾向は多剤耐性菌感染症についてもみられた。一方で、ペニシリン耐性肺炎球菌感染症については急性期型病院での持ち込み症例の多さが高い罹患率の要因であると考えられた。

n. 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)

検査部門は培養検査に提出されたデータを菌株の分離の有無にかかわらず全ての検体情報を提出する必要がある。血液、髄液検体について菌株の分離が無い検体の提出がなされているか検討した。血液、髄液検体において陽性検体のみ提出している医療機関は血液検体 24、髄液検体 20 であった。また、陽性検体の占める割合が、80%以上の医療機関を異常と仮定すると、該当する医療機関は血液検体 36、髄液検体 23 であった。これらの医療機関については早急に確認が必要と考えられる。また、血液検体が 200 検体以上採取されているにも関わらず、陽性検体が報告されていない医療機関が 2 医療機関あり、併せて確認が必要と考えられる。

3. JANIS 各部門研究グループにおける研究成果

o. 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」の作製 (古谷 信彦、山口 恵三)

我々は、JANIS サーベイランスの還元情報で、特定菌(特定耐性菌)の異常集積がみられた場合にどのような対応・調査を実施すべきかについての情報が迅速に得られるように各医療機関が閲覧できる「特定菌(特定耐性菌)異常集積時における対応事例集」を作成を試みた。事例集は総論と各論で構成されるものとし、総論部分は「順天堂アウトブレイクマニュアル」を基に作製し、各論は、H22 年度に *Acinetobacter* 属について、H23 年度に *Pseudomonas aeruginosa* について作製し、*Acinetobacter* 属では感染源は、医療機器や環境などのほか医療従事者の手指保菌も重要であり、*P. aeruginosa* では医療機器や環境に関連したものが主であり、内視鏡や自動内視鏡再生器(AER)、病院の給排水システム、泌尿器科機器・手技、が特徴的であった。

p. 全入院患者部門サーベイランス研究グループ

薬剤耐性菌による感染症サーベイランスにおける感染率・罹患率の施設間格差に関する研究 (河野 文夫)

医療施設は薬剤耐性菌の感染が拡大する場となっている。特に MRSA による感染症は、多くの医療機関でその対策に苦慮しているのが現状であり、治療期間の延長や転帰の悪化および医療経費の増大等、社会的な問題と発展している。そこで、国立病院機構 54 施設における薬剤耐性菌による感染状況を把

握・検討を行うことにより薬剤耐性菌に感染症の中でMRSA, MDRP および PRSP による感染症における転機へ及ぼす影響について検討を行った。特に薬剤耐性菌感染症報告の中で9割を占めているMRSA感染のデータ(2009年1月～12月)を基とした、多項ロジスティック解析により、MRSA感染治療の転帰を悪化させる要因の抽出を行った。その結果、MRSAによる感染症では、高齢で膀胱留置カテーテルや気管内挿管を使用した治療において、転帰が悪化する傾向が明らかとなった。また、MRSA感染による菌血症や肺炎では、転帰が悪化する傾向を明らかにした。薬剤耐性菌のサーベイランスを実施し、現状の把握に努めると共に発生件数を監視することは、各医療機関における感染症の防止措置対策の貴重な情報となり、医療のみならず公衆衛生に貢献する事が期待される。

q. 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)

日本国内の認可を受けている ICU を訪問し、ICU 内外の各種項目を調査した。平成 23 年度に約 30 箇所訪問したことで、合計 46 箇所の調査となった。その結果、ベッド回りの環境(大部屋のベッド間隔)、ICU での薬液混合の状況、などが感染症発症率の差につながったと考えられた。また、JANIS に参加している ICU 9 か所の検討からは、誰が感染症の診断を行い、データの提出を行うかで、明らかな差があることが分かり、これが感染症発症率の施設間格差につながったことがわかった。以上より、ベッド回りの環境を整えることで、ICU の院内感染症発症率を減少させることができ、JANIS のデータ提出過程を整えることで提出データの施設間格差を減少させることができる。

r. 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

(針原 康、小西敏郎)

本邦における SSI 発生率の動向を明らかにすることおよび SSI サーベイランスに関する諸問題を解決することを目的として検討を行った。その結果、本邦の SSI 発生率は以前と比較して低下していること、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、腹腔鏡手術は本邦では引き続きリスク調整因子として用いていくことが適当と思われること、人工物埋入を伴う手術での術後 1 年間の経過観察は必要であること、手術手技ごとに関与する重要リスク調整因子が異なることが明らかとなった。精度の高い SSI サーベイランスの普及は SSI を減少させる上で今後も重要と考えられる。

s. 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
(北島 博之)

本研究では、新生児病院感染症の登録システムの開発とその普及を目指し、まず NHSN に準拠した NICU における新しい感染症診断基準作成し、次いで感染症入力シート of 普及を行う。昨年度は「NICU 病院感染予防のためのガイドライン」作成を目指し、最終的に「NICU における医療関連感染予防のためのハンドブック」として刊行した。その後全国の NICU に配布 (HP でもダウンロード可) した。今年度は、この英文化を行い、海外の NICU 関係者に批判してもらう予定である。2 年前から産科混合病棟の問題点に関するアンケート調査を行っていたが、このたび、論文として周産期新生児医学会雑誌に投稿し査読中である。

NICU 入院児における感染予防対策の検討項目として、PICC の管理に関する全国アンケート調査、NICU におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌保菌・感染症に関する全国調査、2010 年出生極低出生体重児の感染症に関するアンケート調査を施行した。

さらに、新しい問題生起に対する検討項目として①退院後早期の百日咳罹患の予防と、MRSA の交差感染予防のための未滅菌手袋着用によるパチルス感染などを予定している。

4. サーベイランス研究に関連する個別の研究成果

t. 院内感染対策支援の方法と効果に関する研究

(宮崎久義)

本研究は特定の薬剤耐性菌 (MRSA、PRSP、MDRP、VRSA、VRE) によるアウトブレイク事例の発生が疑われ、対応に苦慮しているケースについて当該病院の依頼等に応じて研究ベースで訪問し、調査や対策の相談を受け、実行ある支援の試行を行うことを目的とする。

本研究に参加している国立病院グループにおけるアウトブレイク経験の有無と実情、支援の在り方についてアンケートにより意見を求めた。回答施設数は 27 施設で、回収率は 50.9% であった。回答施設 27 のうち、アウトブレイク経験があると答えた施設が 12 施設あった。そのうち MRSA のアウトブレイクが 4 施設、MDRP のアウトブレイクが 2 施設においてみられた。アウトブレイクの実態、対応の課題、効果的対策の立て方について現場の意見を集積することが出来た。

アウトブレイク時の相談支援窓口については設置の希望が 23 施設から出された。各都道府県に窓口を置き、当地の衛生研究所とタイアップしてアウトブレイクへ対応するシステム構築の提案がなされた。

v. 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)

厚労省の JANIS 事業における還元情報のあり方を多角的に検討した。SSI サーベイランスにおける施設毎の感染率の変化を調査し、感染対策の改善に関

する検討が必要と思われるケースに聞き取り調査を行なった。感染率の上昇に気づいてすらいない施設もあった。事業においては、前年度などと容易に比較できる様式に変更すること、感染対策改善の検討が必要な施設に対して警告を発し、対策立案を促すようなシステムを構築する必要性がある。公開ウェブサイトへのアクセスと参加施設による還元情報のダウンロード状況の検討からは、事業への関心の高さが示されたが、3ヶ月毎の季報のダウンロード率やアクセス件数が少なく、廃止すべき集計である。

w. 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)

感染対策の高精度化、高効率化を目的とし、①2DCM-webのJANIS事業への移行、改良、②JANIS事業データの二次利用による研究のために統計法の規定に基づくデータ提供を受け、許可を受けた他の分担研究者への配布、VREの全国レベルの2DCM解析、③菌株の分子疫学的解析、電子データとの突合、④耐性菌の条件と検出された場合の警告・案内内容を定義したメッセージの標準化、および、⑤耐性菌サーベイランスの国際連携に関する調整をおこなった。成果は、院内感染症の抑止、耐性菌の拡散抑止に貢献するとともに、院内感染症、耐性菌拡散、耐性菌の国際情勢の理解に重要な役割を果たし、院内感染症による健康被害を最小化し国民の安全の確保に貢献する。

x. 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年から15年間の薬剤耐性率の経年的推移において、*P. aeruginosa*の薬剤耐性率は全ての薬剤において横ばいまたは年々減少傾向にあるが、*Acinetobacter*ではPIPC、IPM、LVFXの3薬剤において増加傾向を認めた。また、MDRPおよびMDRAの検出率は増加傾向ではないが、2剤耐性株がそれぞれ7.6%、4.7%であり今後の動向に注意が必要である。なお、MDRAの判定基準でIPMまたはMEPM、LVFXまたはCPFXとなっているが、それぞれの薬剤でやや耐性率や異なることを十分理解しておくことが必要である。また、我々が集計したJANIS検査部門におけるMRSA生データは臨床に報告されたデータであるにもかかわらず、毎年0.1%~0.4%程度のVCM耐性MRSAが報告されており、感染症診断・治療に大きな影響を与えていると考える。

以上より、微生物検査室では検査結果の報告の際、目視確認のみならずシステムによる警告機能の導入、薬剤感受性検査の内部精度管理実施率を高めるとともに、JANIS参加施設に対しては精度管理の実施状況を確認し、データの信頼性を高め

ることが必要性と考える。

y. 傷病名に「敗血症」という文字列を含むレセプトの出現頻度並びに「疑い」コードの有無別に検討した医療費総額、入院日数、抗生物質使用状況の分析 (谷原 真一)

本研究では、敗血症患者の医療費を検討することを目的とし、入院分診療報酬明細書(レセプト)で「敗血症」という文字列を含む傷病名が記載されたものを1)ある健康保険組合の2006年4月~2007年3月診療分、2)K県国民健康保険被保険者および後期高齢者の2010年4月~2011年3月診療分(電子レセプトのみ)について分析を実施した。1)において敗血症という傷病名が疑い病名の場合は、入院日数の平均は25.3日、入院期間中の総医療費の平均は900873円であり、疑い病名ではなかった場合はそれぞれ56.8日と2643084円で有意差があった。抗生物質の使用状況も疑い病名の有無によって異なっていた。2)においては、ICD10でA41.9(敗血症、詳細不明)を含むレセプトが11,229件(患者数5,703名)、A41.0(黄色ブドウ球菌による敗血症)を含むレセプトが657件(患者数345名)認められた。疑い病名の有無で診療内容の違いが存在することを明らかにし、電子レセプトを用いた広範囲なレセプト情報を活用することで薬剤耐性菌などによる重篤な感染症の医療費の推計精度を向上させることが期待される。

z. 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)

本研究では、耐性菌による医療関連感染の制御を目的とし、手術部位感染、人工呼吸器関連肺炎、院内発症の菌血症などの医療関連感染症のサーベイランスに関する研究を行った。国公立大学病院における医療関連感染症の発生頻度、原因微生物や臨床情報の収集解析を行った。この研究の結果、質の高い疫学情報を収集するためのシステムの妥当性、実現可能性を確認でき、次の段階としての調査企画の完成という成果を得た。

D. 考 察

1. 新型薬剤耐性菌に関する研究の推進

平成23年度の研究では、NDM-1に続く新しいメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)を、我々は世界に先駆けて発見し、SMB-1と命名した。SMB-1は、世界的に広がり問題となっているNDM-1などと同様のMBLに属するが、NDM-1より、カルバペネムを分解する活性が高いという特徴を有する。SMB-1は今のところセラチア属の菌種から発見されているのみであるが、セラチア属菌は、この種のMBLの遺伝子を本来は持っておらず、外来性に獲得されたものと考えられる。このことは、大腸菌や肺炎桿菌等の他の菌種でも同様にSMB-1の遺伝子を獲得する危険性が

あり、その場合、NDM-1 産生株より臨床的に問題となる可能性があり、今後の継続的監視が必要と考えられる。

本研究班では、数年前にペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌 (PRGBS) の出現を世界で最初に確認し、それらが獲得したペニシリン感受性の分子機構についても解明を行い 2008 年に報告した。本年度の研究として、引き続き臨床分離株を監視する中で、PRGBS 株は、特定の遺伝型の株(ST458)に多く、また、医療機関内で患者から患者に伝播する能力も有していることが確認された。現時点では、幸いなことに新生児の髄膜炎や敗血症の症例からの分離株には、PRGBS は確認されておらず、もっぱら、成人の喀痰等からの検出が多い。しかし、今後、新生児の侵襲性感染症の起因菌として分離された GBS においてペニシリンに対する感受性の変化を注意深く監視してゆく必要がある。また、PRGBS の多くはペニシリンに低感受性を示すのみならず、マクロライド系やフルオロキノロン系にも広く耐性を獲得した多剤耐性株であることが多く、成人における PRGBS 感染症についてもその動向を注意深く監視していく必要がある。

多剤耐性アシネトバクターは、文字どおりカルバペネムに対しても耐性を示すため問題視されている。海外で警戒されている多剤耐性アシネトバクターは、主にアシネトバクター・バウマニであり、しかも OXA-型カルバペネマーゼを産生する株が問題となっている。しかし国内では、OXA-型カルバペネマーゼ産生株より IMP-1 などの MBL を産生する株が多く見られる傾向があり、MBL 産生株は、OXA-型カルバペネマーゼ産生株よりカルバペネムに対し高い耐性度を示す傾向を示し、臨床的に警戒する必要がある。ただし、現時点では、国内分離株の中には、海外で問題となっているアシネトバクター・バウマニの世界流行株である CC92 の中に、MBL を産生する株は確認されていない。一方、海外では、NDM-1 を産生するアシネトバクター・バウマニが既に出現しており、今後、国内でも注意してゆく必要がある。

現在、アシネトバクター・バウマニと同定された株が医療環境で伝播拡散しやすい CC92 に属する株であるか否かを、一般の細菌検査室で判別する方法が無く、問題視されている。今後、CC92 などの流行株か否かを簡便、迅速に判別する試験法の開発が必要となっている。

PRGBS の出現や SMB-1 の新たな発見に示されるように今後も新型の薬剤耐性機構を獲得した耐性菌が出現することが十分予想されるため、全国および個々の医療機関での分離菌サーベイランスを強化し、臨床分離株における薬剤感受性の動向を監視しつつ、特異な耐性傾向を示す臨床分離株について、遺伝子、分子のレベルで耐性メカニズムを解明する研究をさらに推進する必要がある。

2. JANIS 事業の向上のための研究の強化

平成 19 年 (2007 年) に、JANIS 事業参加施設のサーベイランス担当者の負担を軽減するとともに、各医療機関へ定期的に返される還元データも、各施設における院内感染対策に活用されやすい形式での図表 (例えば、箱ヒゲ図) に大幅に改善された。その後、JANIS 事業参加医療機関数も増加し続け、2012 年の 2 月時点で、全国の 200 床以上の医療機関が 1000 施設参加する、大規模な全国サーベイランスに発展している。現在、膨大なデータがデータベースに蓄積されつつあり、例えば検査部門サーベイランスを例に挙げると、2010 年の年報では、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) では、約 17 万株、大腸菌では、約 12 万株のデータが蓄積され、菌種毎に、各種の抗菌薬に対する薬剤感受性状況や耐性株の分離率等が把握可能になっている。このデータを見る限り、国内でのアシネトバクター属菌におけるカルバペネム耐性率は、2007 年から 2010 年までの間では 2-3% であり、欧米よりかなり低いことを確認することが可能となっている。また、大腸菌や肺炎桿菌におけるカルバペネム耐性率も 1% 以下であり、海外で問題となっている、NDM-1 や KPC 型のカルバペネマーゼを産生する株は、国内では極めて稀な状況となっている実態を確認することができる。しかし、フルオロキノロンに耐性を獲得した大腸菌は、2000 年以降急激に増加しており、2010 年の段階で、30% を越える実態も JANIS 事業により全国規模で把握することも可能となっている。また、全入院部門や ICU 部門、NISU 部門では、MRSA による感染症患者の発生状況が把握できるようになっている。このように、JANIS 事業は、国内の臨床現場で分離される各種の病原菌における薬剤耐性の獲得状況や耐性菌による感染症患者の発生状況をつぶさに把握できる優れたシステムとなっている。なお、海外でもこの種の大規模な全国サーベイランスは CDC などが実施しているサーベイランスを除きほとんど例がなく、この分野におけるわが国の先駆性を示す重要な要素となっており、海外からも注目されつつある。JANIS が大きく発展した背景には、研究班の多数の研究分担者、研究協力者による学問的、科学的に緻密な継続的な支援があったことが重要な要因と考えられる。

多剤耐性緑膿菌の分離率やそれによる感染症患者数については、この数年間、横ばいあるいは低下傾向が見られる。これには、全国規模の JANIS 事業と連携しつつ、それぞれの医療機関内における院内サーベイランスも充実され、それらのデータの対比に基づき、個々の医療機関における綿密な院内感染対策や感染制御のための各種の予防策等の徹底と抗菌薬の適正使用の推進が貢献していると考えられている。このように、個々の医療機関がそれぞれの実態を正確かつ客観的に把握・自認し、全国規模のデータと比較対比しつつ、問題点等を認識する上でも、JANIS 事業の継続と発展、ならびに精度の向上が求

められており、平成 24 年度以降も引き続き、その改善や安定的な運用の向上に関し、学術的、専門的な観点からの支援を継続する必要がある。

研究班では、藤本先生を中心に薬剤感受性パターンのデータを活用して、特定の耐性菌が医療機関内でどのように分離され拡散しているかを視覚的に容易に把握することができる、2DCM-web という解析プログラムを開発し、2011 年 4 月より JANIS 検査部門に参加している施設で利用できるように公開した。このプログラムを活用することで、JANIS 事業に提出したデータを、全国的なデータベースの構築に用いるのみならず、個々の医療機関でも活用することが可能となり、特定の細菌による院内感染の発生を早期に検出し、適切な対策が早い時点で講じられ、感性制御の向上に資することが期待される。

E. 結 論

国内の医療機関において SMB-1 産生株や PRGBS などの様々な新型薬剤耐性菌が出現しており、それらの監視の継続とともに、それらが獲得した新規の薬剤耐性メカニズムを解析する研究を推進しつつ、その結果を活用して検査法などの開発を目指す研究の継続が重要となっている。

また、研究班として学術的観点から、平成 12 年度以降 JANIS 事業の改善と向上のため、様々な支援を行ないその安定運用に貢献してきた。JANIS 事業の更なる発展のためには、引き続き支援の継続が重要である。

F. 健康危険情報

NDM-1 と比べカルバペネムをより効率よく分解する新型の MBL である SMB-1 がセラチア属菌より新たに発見された。今後、SMB-1 の遺伝子が肺炎桿菌や大腸菌などに拡散する危険性があり、その動向を監視する必要がある。

ペニシリン低感受性を獲得した GBS(PRGBS)が、同一医療機関内で複数の患者から分離され、PRGBS が院内伝播する能力を獲得していることが確認されたため、PRGBS についても今後院内感染の起因菌の一つとして監視してゆく必要がある。

海外では OXA-型のカルバペネマーゼを産生する多剤耐性アシネトバクターが問題となっているが、国内では、それらよりカルバペネムに対し高い耐性を示す MBL 産生アシネトバクターが多く検出される傾向があり、今後の動向を監視する必要がある。

JANIS データを経年的に比較すると、大腸菌にお

ける第三世代セファロスポリン耐性とフルオロキノロン耐性が、それぞれ、13%、30%を越える状況となっており、その背景の一つとして、薬剤耐性菌による食肉などの汚染の広がりと考えられ、実態の把握と継続的な監視、ならにび対策を急ぐ必要がある。

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. Nagano N, Nagano Y, Toyama M, Kimura K, Tamura T, Shibayama K, Arakawa Y. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1. J Antimicrob Chemother. 2011 Dec 29. [Epub ahead of print]
 2. Wachino J, Yoshida H, Yamane K, Suzuki S, Matsui M, Yamagishi T, Tsutsui A, Konda T, Shibayama K, Arakawa Y. SMB-1, a novel subclass B3 metallo- β -lactamase, associated with ISCR1 and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Nov;55(11):5143-9.
 3. Kimura K, Nagano N, Nagano Y, Wachino J, Suzuki S, Shibayama K, Arakawa Y. Predominance of sequence type 1 group with serotype VI among group B streptococci with reduced penicillin susceptibility identified in Japan. J Antimicrob Chemother. 2011 Nov;66(11):2460-4.
 4. Wachino J, Yamane K, Arakawa Y. Practical disk-based method for detection of *Escherichia coli* clinical isolates producing the fluoroquinolone-modifying enzyme AAC(6')-Ib-cr. J Clin Microbiol. 2011 Jun;49(6):2378-9.
 5. Tsutsui A, Suzuki S, Yamane K, Matsui M, Konda T, Marui E, Takahashi K, Arakawa Y. Genotypes and infection sites in an outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J Hosp Infect. 2011 Aug;78(4):317-22.
- ##### 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

新型薬剤耐性菌等に関する研究 新型のメタロ-β-ラクタマーゼ SMB-1 の解析

研究分担者 荒川 宜親 (名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学 教授)

研究要旨 臨床分離カルバペネム耐性 *Serratia marcescens* より新規メタロ-β-ラクタマーゼ (SMB-1と命名)を発見した。活性中心の亜鉛に配位するアミノ酸の種類から、SMB-1はメタロ-β-ラクタマーゼの中でもサブクラス B3 に属するものであることがわかった。SMB-1 酵素を精製し、酵素学的パラメータを算出したところ、本酵素がイミペネムやメロペネムなどのカルバペネム系薬を効率よく分解することがあきらかとなった。また、SMB-1 遺伝子は DNA 転位因子である *ISCR1* とともにゲノム DNA 上に存在した。したがって、SMB-1 遺伝子は *ISCR1* とともに何らかの細菌から *S. marcescens* に取り込まれたものと推測された。さらに我々は、SMB-1 酵素の結晶を作製し、SMB-1 酵素の X 線結晶構造解析を試みた。本年度は結晶作製を中心に作業をすすめ、その結果、X 線結晶構造解析に至適な結晶を得ることができた。今後、SMB-1 の3次元構造の詳細を決定し、得られた構造情報を SMB-1 酵素阻害剤の開発等へと応用したいと考えている。

研究協力者

和知野純一(国立感染症研究所 細菌第二部)

森茂太郎(同上)

柴山恵吾(同上)

山口佳宏(熊本大学環境安全センター)

A. 研究目的

近年、医療現場における多剤耐性菌の広がりが問題となっている。特に、NDM-1 などメタロ-β-ラクタマーゼを産生し、カルバペネム耐性を獲得した大腸菌や肺炎桿菌の世界的な広がりが深刻な状況となっている。このような状況を鑑み、本研究班では昨年度、国内の医療機関から菌株を収集、調査を行い、我が国における多剤耐性菌の実状を明らかにした。その過程で、収集した菌株の中に未知のカルバペネム耐性メカニズムを有すると予測される菌株が存在した。本研究では、これら未知の耐性メカニズムを明らかにすることを目的に、研究を行った。

B. 研究方法

メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子のクローニング: *Serratia marcescens* 10mdr-148 株の DNA を抽出し、制限酵素 *Sau3AI* で処理した。処理した DNA を pCL1920 vector に連結し、大腸菌 KAM32 株に導入した。形質転換体をセフトジジム入りの培地で選択した。

薬剤感受性試験: 寒天平板希釈法を用いて測定した (CLSI に準拠)。

SMB-1 酵素の精製: SMB-1 遺伝子を pET30a に連結し、*E. coli* BL21(DE3)pLysS に導入した。IPTG による誘導後、菌体を回収し、フレンチプレスで破砕を行った。陽イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを用いて精製を行った。

酵素学的パラメータの算出: 各種 β-ラクタム薬を基質とし、酵素反応速度論解析を行った。

PFGE およびザンハイブリダイゼーション: プラグを作製し、I-CeuI で処理後、CHEF-DRIII システム