

201123008B

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21・22・23年度 総合研究報告書

研究代表者 荒川 宜親

平成24(2012)年3月

I. 総合研究報告書

(平成21～23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

平成 21 年度より 23 年度の 3 年間を通じて、本研究班では、薬剤耐性菌に関する様々な研究や調査を実施する中で、国際的に問題となっている NDM-1 よりさらに新しい新型のメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)である SMB-1 を新たに発見した。一方で、つい最近までその出現が認識されていなかったペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌(PRGBS)を、平成 18-20 年度の研究で我々が世界で最初に発見したのを受け、その後も研究を継続した結果、PRGBS は、ST458 等、特定の遺伝的な背景を持つグループで多く発見されること、さらに国内での PRGBS の院内感染事例の解析から、ST458 に属する PRGBS 株は、MRSA や VRE と同様に医療環境で、患者間を伝播拡散することがはじめて確認されるなど、多くの成果を上げることができた。さらに、肺炎球菌におけるケトライド耐性に関与する新しい機構等が解析された。

一方で、薬剤耐性菌の検査法の改良や開発では、NDM-1 産生株を簡便に識別する「改良型 SMA-disk 法」の考案や、プラスミド媒介性のフルオロキノロンアセチル化酵素、AAC(6′)-Ib-cr、を産生する株の簡便な識別法、さらに IMP-1 型 MBL とアミノ配糖体修飾酵素、AAC(6′)-Iae、を産生する国内流行クローンをイムノクロマト法で識別する試験法の開発と実用化が行われた。また、開発段階の検査法としては、多剤耐性緑膿菌アウトブレイク時に面倒な PFGE 解析の代替法として実施可能な PCR ベースの分子疫学解析法などを構築中である。

他方、JANIS 事業を支援する研究としては、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、さらに、JANIS 検査部門で厚労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	常 彬(H23)	同上	細菌第一部 主任研究官
池 康嘉	群馬大学大学院細菌感染制御学 教授	鈴木里和	同上	細菌第二部 主任研究官
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	谷原真一	福岡大学医学部衛生学	准教授
河野文夫	国立病院機構熊本医療センター 副院長	土手健太郎	愛媛大学医学部集中治療部	准教授
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	長沢光章	東北大学附属病院 診療技術部・臨床検査	技師長
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	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
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	松本哲哉	東京医科大学微生物学	主任教授
倉田 毅 (H21-22)	富山県衛生研究所 所長	松本智成	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター	
小西敏郎	N T T 東日本関東病院 副院長	宮崎久義	国立病院機構熊本医療センター	名誉院長
佐多徹太郎(H23)	富山県衛生研究所 所長	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
柴山恵吾	国立感染症研究所 細菌第二部 部長	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
和田昭仁(H21-22) 国立感染症研究所
細菌第一部 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多剤耐性の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が必要となっており、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)事業の改善を支援する研究グループの二つの研究グループを組織し、平成 21 年より平成 23 年の 3 年間に亘り研究を継続した。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 NDM-1 などのメタロ-β-ラクタマーゼを産生する新型薬剤耐性菌の早期検出ならびに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た。また、H22 年の

9 月から 12 月にかけて、厚生省より NDM-1 産生腸内細菌の緊急調査が課長通知により指示されたため全国の医療機関の協力を得て対応した。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を把握するため、分子疫学的な解析手法などを加味して国内で分離される各種の薬剤耐性菌の調査、分析を行なった。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に、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、平成 21 年度と平成 22 年度には、技術講習会を開催し、また、耐性菌検査法の改良や構築などを試みた。

一方、JANIS 事業の向上に関する研究グループでは、平成 12 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(JANIS)事業のさらなる改善や向上のための研究を、学術的、科学的観点から実施することを目指して実施した。

(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、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、研究に従事する側から蓄積されたデータベースの情報から遡って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、データを収納、解析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講じた。

B. 研究方法

平成 21～23 年度の 3 年間、本研究班では、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、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、薬剤耐性菌の検査法の開発や改良などが種々検討された。同時に、様々な研究グループにより、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などが行われた。

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、検査法の評価や改良、最適化、および平成 21 年度と 22 年度には、技術講習会などを行った。

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(SSD)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、3 年間を通じ「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. 新型のメタロ-β-ラクタマーゼ SMB-1 の発見と酵素学的解析 (和知野純一、荒川 宜親)

2010 年に西日本地域の医療機関に入院していた患者から分離された多剤耐性セラチアは、カルバペネムに対しても高い耐性を示していたが、NDM-型や IMP-型など既知のメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)の遺伝子を検出する PCR にて、陽性とならなかった。そこで、カルバペネム耐性機構に関与する遺伝子をクローニングし解析した結果、これまで知られている MBL とは構造が異なる、新規の MBL であることが判明し、我々は、SMB-1 と命名し、その遺伝子の周辺の構造を詳しく解析した。その結果、SMB-1 の遺伝子は、外部から獲得され、染色体上に挿入されたものであることが

示唆された。次に、SMB-1 の酵素学的な解析を実施したところ、SMB-1 は、NDM-1 や IMP-1 などの既知の MBL より、イミペネムなどのカルバペネムをより効率よく分解不活化することが確認された。

a-2. *Acinetobacter* 属菌の薬剤耐性と消毒薬抵抗性の関連性に関する研究

(川村久美子、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的に警戒されている。そこで、国内の医療現場で分離されたアシネトバクター属菌について、薬剤耐性と消毒薬抵抗性の関連性について詳しく比較解析を実施したところ、多剤耐性を獲得している株は、同時に消毒薬に対しても抵抗性を獲得しており、また、逆に消毒薬に抵抗性を示す株は、多くの抗菌薬に対し耐性を獲得していることが明らかとなった。

医療機関内でアシネトバクター属菌の分離率が上昇するような局面では、薬剤耐性の獲得状況とともに消毒薬への抵抗性も確認する価値があり、消毒薬の適正使用が今後重要になると思われる。

a-3. カルバペネム耐性アシネトバクター属菌に関する研究 (松井真理、荒川 宜親)

多剤耐性アシネトバクターは、カルバペネムに対しい性を示すことで、警戒されている。特に、*Acinetobacter baumannii* は、医療環境で伝播拡散し、院内感染を引き起こしやすく世界的に警戒されている。そこで、国内の医療現場で分離されたアシネトバクター属菌について、カルバペネム耐性と菌株の遺伝的な関連性について詳しく比較解析を実施したところ、IMP-1 などの MBL を産生する株は、世界流行株である CC92 の中には確認されず、それらは、もっぱら、non-CC92 あるいは non-baumannii *Acinetobacter* spp. であることが確認された。なお、IMP-型の MBL を産生する *A. baumannii* は、OXA-型のカルバペネマーゼを産生する *A. baumannii* より、カルバペネムに対し高い耐性を獲得しており、その動向を監視する必要がある。

a-4. 新型のメタロ-β-ラクタマーゼ NDM-1 産生株の検査法の改良 (和知野 純一、荒川 宜親)

我々は、平成 10 年の厚生科学研究費により、MBL を産生する株を簡便に検出可能な、SMA disk 法を開発し実用化した。しかし、NDM-1 産生株は、MBL 以外に CMY-4 や CTX-M-15 などと呼ばれる SMA で阻害されにくいβ-ラクタマーゼを同時に産生していることもあり、SMA disk 法では、うまく検出できない株があることが示唆された。そこで、SMA disk 法の原法で用いるセフトジジム (CAZ) の disk をメロペネム (MEPM) に変更し、しかも、SMA disk と MEPM disk との disk 間隔を原法の約 20mm から 10 mm 以下 (5 mm~8 mm) に短縮することで、NDM-1 産生株を検出することが可能となった。

a-5. ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌の分子疫学的解析と院内伝播の可能性に関する検討

(木村幸司、長野則之、長野由起子、荒川 宜親)

我々は、B 群連鎖球菌におけるペニシリン低感受性株 (PRGBS) の出現を世界に先駆けて発見し報告して来た。その後の研究の中で、国内で臨床分離された PRGBS 株の MLST 解析を実施したところ、ST 型が 458 と判定される株が多いことが明らかとなった。さらに、特定の医療機関で PRGBS が一定期間内に複数の患者さんより検出されたため、それらの株の分子疫学解析を実施したところ、やはり、全ての株が ST458 と判定され、PFGE 解析によっても、菌株が相互に遺伝的に密接な関連性を持っていることが確認された。この結果は、PRGBS 株が、医療機関内で、患者から患者に接触感染などにより伝播拡散する能力を有していることを示しており、MRSA や VRE とともに、今後、PRGBS についても、院内感染の原因菌として今後、注目してゆく必要があることが世界で初めて確認された。

a-6. プラスミド媒介性のフルオロキノロンアセチル化酵素産生株の簡便な検出法の構築

(和知野純一、荒川 宜親)

プラスミド媒介性のフルオロキノロンアセチル化酵素として、AAC(6')-Ib-cr が 2006 年に新しく発見された。この遺伝子の保有の有無は PCR 法にて判別できるが、医療機関の細菌検査室では、PCR を日常検査に用いることはできない。そこで、AAC(6')-Ib-cr がシプロフロキサシンを試験管内で不活化することを利用して、簡便にこの酵素の産生性を検出する方法を開発した。具体的には、

AAC(6')-Ib-cr の産生が疑われる菌株を含む菌液に、8 μg/ml 程度のシプロフロキサシンを添加し一夜培養した後、その培養上清中に残存する活性型のシプロフロキサシンの濃度をフルオロキノロン高度感受性菌を用いてバイオアッセイ法で測定する試験法である。この方法は、細菌の培養装置を持つ検査室であればどこでも実施可能であり、しかも安価に検査を行うことができ、今後の普及が期待されている。

a-7. メタロ-β-ラクタマーゼを産生する多剤耐性緑膿菌の施設内伝播の様態に関する研究

(筒井 敦子、鈴木 里和、荒川 宜親)

多くの抗菌薬に耐性を獲得した多剤耐性緑膿菌 (MDRP) による院内感染の発生が警戒されている。国内の公的医療機関で、MDRP のアウトブレイク事例が発生したため、調査と対策に協力しつつ、MDRP の院内での広がりや定着の様態を観察した。MDRP は、最初の段階では、尿路系の臨床検体より多く検出される傾向が見られ、接触予防策の徹底と汚物室、尿量測定室の衛生管理の徹底等により、一旦は、MDRP の蔓延や伝播を抑制することに成功したように思われたが、やがて、再度、MDRP の検出数が増加した。その要因を解析すると、喀痰等呼吸器系の検体よりの分離の増加が背景となっていることが確認された。MDRP が呼吸器系の検体より多く分離される場合は、感染制御が難しくなることが示唆され、今後の対策の改善の上で、留意する必要がある。

b. 国内で分離された市中感染型 MRSA の検討

(松本 哲哉)

市中感染型 MRSA (Community Associated MRSA: CA-MRSA) は米国を中心に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おらず、平成 21 年度は東京医科大学病院において分離される MRSA 株を対象として検討を行ったが、院内からも CA-MRSA が分離されている状況が明らかになった。さらに 22 年度は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。また CA-MRSA type IV の株のおよそ 2 割と高率に PVL 遺伝子が検出された。さらに 23

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 130 株を対象に検討を行った。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。これらの結果から、国内においても皮膚・軟部組織感染症患者から高率に CA-MRSA が分離されることが明らかとなり、PVL 分離菌の頻度も高いことがわかった。一方、菌血症など侵襲性においては、まだ CA-MRSA の分離頻度は高くないことが判明した。

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. 日本で分離されるバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の耐性遺伝子構造と伝達機構の研究を行った。日本でこれまで分離された VRE (VanA型、VanB型) の遺伝子構造解析およびプラスミドの遺伝学的解析を行った。vanA 遺伝子は、Tn1546(10.85kb)にコードされている。Tn1546への IS挿入、欠損、アミノ酸置換等の構造解析により、Tn1546が分類される。これまで、日本で分離された VanA VREは12型に分類された。それらは、リファランズとして引用可能な結果を得た。特に、VanS のアミノ酸3箇所の変異の存在する株は、タイ産輸入鶏肉から分離される VREの型と同一で家畜 VRE の人への伝播を明らかにした。

VREのプラスミドの解析から、それらのプラスミドの接合伝達機構、遺伝子構造を解析し、バンコマイシン耐性の接合伝達機構を明らかにした。また、腸球菌の病原性因子のバクテリオシンプラスミドを保持しているもの、及びプラスミド上でバンコマイシン遺伝子と関連しているものを解析し、新型のバクテリオシンを発見した。

1) 欧米の VREは *E. faecium* 菌で VanA型が一般的であるが、日本では *E. faecalis* 菌及び VanB型も約 40%分離される。vanAはトランスポゾン Tn1546上に存在し、Tn1546に挿入された IS挿入等の遺伝子構造からリファランズが可能である。これまで海外で報告されたものとは別に、日本の特異的な IS256 が挿入された vanA型が存在することを解明した。

2) 日本で最初の院内感染 *E. faecalis* VRE (VanB型) は、フェロモン反応性接合伝達性プラスミド上に存在し、同プラスミドは腸球菌の各種プラスミドのモザイク型プラスミドで、VanB遺伝子と *E. faecalis* に特異的なバクテリオシン (Bac41) をコー

ドしていた。また、VanB遺伝子は野性型の構造をしていた。

3) バクテリオシンは腸球菌の病原性因子である。VanA型 *E. faecium* で、静菌作用を持つ新型のバクテリオシン (Bac51) をコードするプラスミド(6kb) を保持する VRE を発見し報告した。

4) 肺炎球菌の約 90%以上はマクロライド耐性菌である。中国で分離されたマクロライド耐性肺炎球菌の遺伝学的構造を解析した。これは今後の日中分離菌の比較構造研究のリファランズとなる。

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、国内の肺炎球菌のテリスロマイシン (ケトライド系抗菌薬) 耐性化の現況、新型耐性機構並びに耐性伝播機構を解明することを目的として、2009~2010 年に全国の医療機関で分離された 500 株の肺炎球菌について多面的な研究を行い、マクロライド耐性化が急速に進行し、テリスロマイシン耐性もわずかながら出現していることを明らかにした。分離されたテリスロマイシン耐性菌 S1215 に関する分子遺伝学的解析を行い、耐性化の主要因は *ermB* 遺伝子の獲得であり、*ermB* の発現を調節する上流領域の欠失により高発現となりテリスロマイシン耐性をもたらしたと考えられた。さらに *ermB* は *tetM* を含むト複合型のトランスポゾンにより伝播したと推測できた。

一方、テリスロマイシン高度耐性機構を明らかにするために、臨床分離低感受性株 S1(MIC=1 μ g/ml) からテリスロマイシン選択により耐性菌 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耐性に関わる新規の遺伝子 *rlmA*^{II} を同定した。RlmA^{II} は rRNA のテリスロマイシン結合サイト 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薬剤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 *rlmA*^{II} の変異に加えて riboprotein L22 の変異(K94E) を有していた。高度耐性化には同時に *ermB* 遺伝子が必須であった。*rlmA*^{II} 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. メタロ-β-ラクタマーゼの立体構造の決定と Zn(II)イオンの解明 (黒崎 博雅)

i. *Chryseobacterium indologenes* 由来の IND-7 メタロ-β-ラクタマーゼ(アミノ酸配列相同性:IMP-1(28%)、VIM-2(24%))の結晶構造を決定した。121 位の Arg 残基は第 2 の Zn(II) (Asp120、Cys221、His263 に配位)の結合親和性に大きく影響を与えていることを明らかにした。さらに、IND-7 の構造を基に、酵素-β-ラクタム剤複合体 (Michaelis モデル)を提唱した(J Biochem 2010)。

ii. IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼのアポ酵素の調製に初めて成功した(ChemBioChem 2011)。この成果により Co(II)置換 IMP-1 酵素の活性中心の 2 つの Zn(II)結合サイトへの Co(II)結合親和性を分光学的に検討できた。野生型の IMP-1 と Zn₂ サイト (Asp120、Cys221、His263 が Zn(II)に配位)の Cys221 残基を Ala に置換した変異体 C221A の Co(II)置換酵素との比較から、アポ IMP-1 酵素に 1 当量の Co(II)を添加して調製した単核 Co(II)置換 IMP-1 酵素では、Zn₁ と Zn₂ の両サイトに Co(II) が、それぞれ 2:1 の割合で分布してすることがわかった。さらに、Co(II)置換 IMP-1 酵素とメルカプト酢酸との反応を分光学的に追跡した。この結果、メルカプト酢酸のチオール基が Zn(II)に配位することでメタロ-β-ラクタマーゼの酵素活性を阻害することを明らかにした(Med Chem Commun 2011)。

iii. EDTA による野生型 IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼの Zn(II)の解離反応を速度論的に解析した。この結果、単核 Zn(II)IMP-1 酵素の酵素活性は野生型 IMP-1 の約 68%であることがわかった。

iv. 示差走査カロリメトリー(DSC)測定から、野生型 IMP-1>単核 Zn(II)IMP-1 酵素(アポ IMP-1 酵素に 1 当量の Zn(II)を添加して調製した酵素)≈アポ IMP-1 酵素の順で T_m 値が上昇し、酵素の熱安定性が高くなることがわかった。

以上、本研究では IND-7 メタロ-β-ラクタマーゼの立体構造を決定すると共にアポ IMP-1 酵素の調製法の確立と 2 つの Zn(II)の個々の役割を明らかにした。2 つの Zn(II)の内、Zn₁ はβ-ラクタム剤の加水分解を触媒する上で重要であり、一方、Zn₂ はその酵素活性の触媒効率の上昇と構造的な安定性向上に寄与していると考えられる。

f. 多剤耐性緑膿菌に関する研究 (切替 照雄)

i. 新規アミノグリコシド耐性因子 AAC(6')-Iaf の

同定

2009 年に分離された多剤耐性緑膿菌から新規アミノグリコシド耐性因子新規アミノグリコシド耐性因子 AAC(6')-Iaf を同定した。AAC(6')-Iaf を含むインテグロン In はプラスミドではなく染色体上に存在することが明らかとなった (Kitao et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009)。

ii. メタロβラクタマーゼ IMP/AAC(6')-Iae イムノクロマトキットの作成

メタロβラクタマーゼ IMP-1 およびアミノグリコシドアセチル化酵素 AAC(6')-Iae に対するモノクローナル抗体を作製し、IMP/AAC(6')-Iae イムノクロマトキットを作製した (Kitao et al. *J Antimicrob Chemother.* 2010, Kitao et al. *J Microbiol Methods.* 2011)。

iii. メタロ-β-ラクタマーゼ/ AAC(6')-Iae 産生新規クローンの同定

2009 年 8 月から 2010 年 4 月まで全国の医療施設から集められた多剤耐性緑膿菌臨床分離株 217 株の分子疫学解析を行った結果、PFGE パターンが同じ高度多剤耐性緑膿菌 16 株を同定した。この 16 株は北海道から沖縄を含む 9 道府県から分離され、日本に広がっている NCGM2.S1 株が属するクローンとは分子系統が異なる新興クローンであることが明らかとなった (Kitao et al. *Int J Antimicrob Agents.* accepted)。

iv. 高度多剤耐性緑膿菌のゲノム解析

IMP-1/AAC(6')-Iae 産生多剤耐性緑膿菌 NCGM2.S1 および NCGM1179 株のゲノムの全塩基配列を決定した (Tada et al. *J Bacteriol.* 2011, Akiyama et al. *J Bacteriol.* 2011)。その結果、IMP-1 および AAC(6')-Iae を含むインテグロン In113 がゲノムの *oprD* 遺伝子内に挿入され、その結果、*oprD* の機能が破壊されていることが明らかとなった。

v. 全国の 200 床以上の病院を対象とした多剤耐性緑膿菌に関するアンケート調査

調査の結果、多剤耐性緑膿菌の分離数は 600 以上の希望の病院では優位に減少し、それ以下の病院では分離数に変化はなく、全体としては減少傾向であった (Kirikae et al. *BMC Infect Dis.* submitted)。

g. 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 (綿引 正則、佐多 徹太郎)

新しい薬剤耐性菌が相次いで出現する中で高度耐性菌による院内感染の発生が危惧される。その中で、地方衛生研究所（地研）が貢献できる調査解析能力を強化するための事業を実施した。①地研等の担当者対象の検査能力強化技術研修会の開催（平成21、22年） VRE や MRSA の遺伝子検査法実習と耐性菌の PFGE や近年問題化している耐性菌（ESBL 産生大腸菌等）の最新の検査法や最新の情報について討議した。②地研で実施できる薬剤耐性菌の検査法の評価のための精度管理を実施した。一つは MRSA の新しい分子疫学的手法である POT 法と国立感染症研究所病原体検出マニュアルに記載されているメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌検査を実施し、いずれも良好な結果を得た。③薬剤耐性菌の急速な伝播に寄与しているファージやプラスミドの解析を効率よく実施できる分子疫学的手法である「LinePCR」を開発した。PFGE 法とは原理的に異なり、機能遺伝子単位に応じた多型解析が可能となった。④食品中の耐性菌の分布、耐性遺伝子の起源に関する調査研究を実施した。いずれも地研の特性を活かした事業、研究であり、これらの研究内容を地研の担当者間で共有することで、地研の耐性菌の検査、解析能力は向上すると考えられる。今後は、地研のネットワークを利用した研究の推進、共有化が重要である。

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、和田昭仁）

7 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン (PCV7) は、米国において 2000 年から導入され、ワクチンに含まれる血清型による侵襲性感染が減少する一方、ワクチンに含まれない血清型による侵襲性感染罹患率の増加 (Replacement) および分離菌の化学療法剤に対する低感受性化/耐性化が見られている。日本においても、2010 年 2 月に導入された PCV7 の効果が期待される一方、ワクチンに含まれない血清型肺炎球菌による感染症の増加および薬剤耐性化が懸念されている。本分担研究では、日本国内の小児侵襲性感染症から分離された肺炎球菌 562 株 (PCV7 導入前:258 株;PCV7 導入後:304 株) の血清型および薬剤感受性の解析を行った。その結果:

1: PCV7 が導入され後、小児侵襲性感染由来 β-ラクタム剤耐性の肺炎球菌の分離率は、PCV7

が導入され前の分離率と比較して、明らかな変化は見られなかった。

2: 血清型 19A 肺炎球菌に関しては、ペニシリン G の MIC は 4 μg/mL を示す株が 6 株、2 μg/mL を示す株が 3 株見られた。また、この 9 株中 8 株のメロペネムの MIC は 0.5 μg/mL であった。これらの肺炎球菌は特定の地域から分離された株で、ST はすべて ST320 であり、今後、分離頻度の上昇が懸念される。

3: ST320 型 19A 肺炎球菌の PBP1a、PBP2x、PBP2b のペニシリン結合部位周辺の配列は、多剤耐性の 19F 血清型肺炎球菌と同じ変異を持っていた。

この三年間の研究では、ワクチン導入前後にはっきりした肺炎球菌の薬剤耐性の変化は見られなかったものの、小児侵襲性感染から分離された肺炎球菌の薬剤耐性の状況を調査し、臨床現場へ疫学情報を提供することができた。

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)

クラス D に属するカルバペネマーゼ(Class D caebapenem hydrolyzing β-lactamase: CHDL)、いわゆる OXA-型カルバペネマーゼはアシネトバクター属菌における主要なカルバペネム耐性因子である。CHDL に特異的な阻害剤は存在せず、また 4 つのサブクラスに分類される酵素間の相同性が低いことなどから、その検出が極めて困難である。そこで、4 つのサブクラスに分類される CHDL の代表酵素を選択し、マウスモノクローナル抗体 (MAb) を作成した。すなわち、OXA-23、OXA-24、OXA-51 および OXA-58 に対する MAb を複数作成した。作成した MAb は Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) を用いて、複数の適切な組み合わせをスクリーニングした後、金コロイドを用いたイムノクロマトグラフィー法において最も感度・特異度の高い組み合わせを採用した。その結果、OXA-23、OXA-24、OXA-51 および OXA-58 産生株の検出系を確立することができた。本検出系は酵素によって感度は異なるが、何れも 5 ng/mL 以上の酵素が存在すれば陽性反応が認められる。また、本邦で分離されカルバペネム低感受性アシネトバクター属菌を用いて本検出系の性能検査を実施した。その結果、本検出系と PCR を用いた遺伝子検出系との間に 100% の相関が認められた。

j. VRE、MDRP 等の伝播様式と蔓延防止に関する研究 (飯沼 由嗣)

緑膿菌のデジタルタイピング法開発と PVL 産生市中獲得型 MRSA の解析を行った。

緑膿菌のデジタルタイピング法開発では緑膿菌全ゲノムデータを比較検討しタイピングの候補となる ORF を選出し、さらに臨床分離株における保有状態を調査することで最終的にタイピングに用いる ORF を決定した。検出に用いることとなった ORF は clonal complex (CC) レベルでの菌株識別を実現する genomic islet 10 個および同一 CC 内での菌株識別を実現するファージ 5 個となった。これらの ORF の有無を multiplex PCR 法で判定し、10 進法に変換し、それぞれの和を遺伝子型とした。この遺伝子型と菌株の MLST 解析との比較から、genomic islet の保有パターンはおおむね CC と一致することが示された。さらに PFGE 法との比較から、ほぼ PFGE 法と合致する正確なアウトブレイクの判定と、非関連株の識別が可能であった。このことから、本ゲノムタイピング法により緑膿菌の院内感染発生時の分子疫学解析が比較的容易かつ迅速に実施可能となるとともに緑膿菌の流行クローン調査にも有効と期待される。

MRSA に関しては、京都大学病院での PVL 産生 MRSA (USA300) による患者および職員間のクローナルな伝播を解析した。さらに、USA300 臨床分離株 (京大病院; 18 株、名古屋医療センター; 1 株) 並びに 2 株の ATCC 標準株は、米国で市販されている抗菌薬軟膏に含まれるバシトラシン及びフラジオマイシン耐性であった。このことより、USA300 の米国内での流行について、市販抗菌薬軟膏の汎用がその一因として考えられた。

k. 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)

ピラジナミドは結核菌の菌体内においてピラジナミダーゼによって活性型のピラジン酸に代謝された後、ニコチン酸フォスホリボシルトランスフェラーゼ (結核菌では Rv1330c) のフォスホリボシル基転移活性を酸性条件下で強く阻害することが分かった。また、ピラジン酸は Rv1330c により代謝はされないが、Rv1330c の ATP 加水分解活性を促進することが分かった。実際に、結核菌をピラジナミドに曝露させると、6 時間後

に菌体内 ATP 量が有意に減少した。コロニーカウントの結果より、ピラジナミドに曝露後 6 時間の時点では菌は生存していたことから、菌体内 ATP 量の減少は菌が死んだことによるものではなく、ピラジナミドの代謝産物であるピラジン酸が Rv1330c に作用した結果であると考えられた。これらの研究結果から、活性型のピラジン酸が Rv1330c に作用して、Rv1330c のホスホリボシル基転移活性を阻害することで NAD 合成の代謝経路を阻害するとともに、Rv1330c の ATP 加水分解反応を促進させて菌体内 ATP 量を減少させることが、結核菌におけるピラジナミド作用メカニズムの一つであると推測された。今後は、Rv1330c の機能構造相関解析からピラジン酸の構造を最適化することにより、ピラジナミドよりも抗菌活性が強い新規抗結核薬の開発に結びつけることが出来ると期待される。

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)

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、*Mycobacterium avium* and *intracellulare* complex (MAC) における RFP 薬剤感受性の設定は現実とかけ離れているという成果を得た。薬剤感受性の設定は現実とかけ離れているという結果、2007 American Thoracic Society (ATS) guideline における CAM 以外の薬剤感受性試験が不要という結論につながっていると判断した。そして 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いうことが明らかとする事ができた。肺非結核性抗酸症、特に *M. avium* 症の治療に貢献する事が期待される。

Mycobacterium heckeshornense は、非常にまれな抗酸菌症で、*Mycobacterium xenopi* としばしば混同される。今回、*M. heckeshornense* を持続排菌している患者から、リファンピシン感受性株と耐性株を得る事が出来た。この菌株同士の *rpo* β 遺伝子領域をシーケンス解析を行うことにより結核と同様に *rpo* β 遺伝子にアミノ酸変異があることを明らかにした。

今回の我々の研究結果によると、少なくとも MAC、*M. heckeshornense* のリファンピシン耐性化機構は、*rpo* β 遺伝子上の変異によることがわかった。

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

m. 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)

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では、参加医療機関における施設間比較を行っている。現行の入院患者あたり罹患率は、医療機関の年間入院患者数の多寡によって大きく影響を受け、患者回転率の低い長期療養型病院は急性期型病院に比べて高く算出される一方で、患者日あたり罹患率はその影響を受けない。JANIS全入院患者部門の毎月の入院患者数と繰越入院患者数から推計した患者日および患者回転率を用いて検討したところ、現行の算出方法では患者回転率が低い医療機関ほど急性期医療機関よりも高い罹患率を示す一方で、患者日あたり罹患率では急性期医療機関の方が長期療養型よりも有意に高かった。さらに、急性期型病院と長期療養型病院で、症例の入院から発症日までの日数を比較したところ、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症や多剤耐性緑膿菌感染症では入院時すでに発症していた「持ち込み症例」と入院後2週間以後に発症した「病院内発症症例」の両者の罹患率が急性期病院において長期療養型よりも高く、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により罹患率が高く、病院内発症例の罹患率には急性期型と長期療養型とで差は認めなかった。以上より今後 JANIS 全入院患者部門では患者日あたり罹患率を算出すると共に、急性期型と長期療養型とで層別化した解析を行うことが望ましいと考えられた。

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)

サーベイランスを行う上で、データの精度管理はデータの質を担保するために最も重要な作業の一つである。精度管理は院内感染対策サーベイランス(JANIS)事務局が行う必要があるが、様々な作業があるため効率化を図る必要があった。このため平成21年度は事務局の事務作業の効率化を図るための JANIS ホームページの改訂、参加医療機関から寄せられる JANIS に関する質問および回答を整理するソフトの開発を行った。また、各部門で作成している公開情報と還元情報についての仕様を点検し、仕様確認書を作成した。平成22年度および23年度は、検査部門のデー

タ精度管理の基準作成を目標として調査を行った。平成22年度は MIC 値で疑義のあるデータの基準を作成した。1. 2のべき乗でない MIC 値が報告された場合。ただし、薬剤感受性検査測定法コードが Etest に設定されているデータは除外、2. ST 合剤の MIC 値が2のべき乗で報告された場合は疑義のあるデータとして取り扱うべきである。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ため、平成23年度は血液検体および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。その結果、菌が分離された検体情報のみを提出していると考えられる医療機関があることが明らかとなり、以下の条件に該当する医療機関については確認が必要であると考えられた。1. 陽性検体の占める割合が、80%以上の医療機関、2. 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。

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)

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施設でも JANIS 還元情報が有効に活用されるように特定菌(特定耐性菌)の異常集積が判明した場合に何を、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各医療施設で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。H21年度に、事例集の構成を決定した。事例集は総論と各論で構成されるものとし、総論部分には異常集積がみられた場合の初期対応から終結および終結後の対応までの一連の流れを記載し、各論には異常集積を終結させるための介入策を決定するのに必要な資料として、文献調査による meta-analysis を行い、一覧表として各文献の中から「発生のみられた病院の規模」、「推定アウトブレイクの期間」、「発生部門とその規模」、「アウトブレイクに含まれた症例数(感染及び定着患者数)」、「汚染・感染源」、「伝播経路」、「アウトブレイク発生時及び再アウトブレイク時の感染制御対策」を掲載することとした。総論は同 H21 年度に「順天堂アウトブレイクマニュアル」を基に作製し、異常集積を認めた場合の感染対策

実務担当者による聞き取り調査から、院内感染対策会議によるアウトブレイクの同定と規模の把握、必要な介入策の決定、診療の可否の検討、アウトブレイク終結の確認と終結後の対応について記載した。各論は、H22年度にアシネトバクター属について、H23年度に *Pseudomonas aeruginosa* について作製した。アシネトバクター属では伝播経路の 93.9%が接触感染で、それらのうち医療従事者の手指や使用した手袋、あるいは他の患者からのヒト-ヒト伝播が 38.7%を占め、患者及び/あるいは患者周囲環境からの伝播は 9.7%、機器・環境-ヒト伝播は 51.6%を占めていた。機器・環境-ヒト伝播の中で最も多いものは人工呼吸器であった。なお、接触感染以外の伝播は全て空気感染であった。一方、*P. aeruginosa* は 62.4%が接触感染で、それらのうち 82.1%が機器・環境-ヒト伝播であった。機器・環境としては、*P. aeruginosa* の感染源・感染経路として、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、の3医療機器及び環境が特徴的であった。

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)

平成 21-23 年度の研究において以下の成果が得られた。

①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について検討を行った。

2009 年に報告された入院患者総数 559,235 名中、薬剤耐性菌の報告が 2,585 件であり、薬剤耐性菌の罹患率は 4.6‰であり、MRSA 感染による報告が 9 割以上を占めていた。また、年齢別では、50 歳を境に加齢と共に感染率の上昇が認められ、肺炎と診断された患者は約半数を占めていた。また、これら感染症治療に使用された抗生物質は VCM が最も多く使用されていた。

②VCM 投与設計での、血中濃度推移の精度は、RMSE (Root mean squared error)= 3.61µg/mL と良好な予測精度であった。

③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)を基に、多項ロジスティック解析を行う事により、MRSA 感染治療の転帰を悪化させる要因について検討を行った。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が認められた。

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)

従来の厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業の ICU 部門に参加した研究班の ICU を対象として、施設間の院内感染発生率の差異とその要因について検討したところ、発生率の高い施設は一貫して高い発生率で推移している一方、発生率の非常に低い施設も認められた。このことより、院内感染発生率は施設によりバラツキがあり、提出データの精度に問題がある可能性が示唆された。そこで、サーベイランスの精度向上を研究目標として、アンケート調査の結果の検討と、研究班員によるサイトビジット調査を行った。まず、アンケートの結果報告から、一般に ICU と括られる病棟も、機能的に 3 種に分けられること、肺炎の診断に関しても種々の運用がされていることが分かった。そこで、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。この 3 年で、46 箇所の調査を行った。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うか、誰が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。以上のことから、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と考えられた。

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

(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。また、SSI サーベイランスは少数の職員の責任感と献身の上で施行されていることが明らかとなり、入力業務負担軽減のためには、電子カルテにリンクした入力支援ソフトの開発、普及が必要と考えられた。SSI 発生に伴い結腸切除術で 129,000 円、直腸手術で 407,000 円、虫垂切除で 199,000 円の術後医療費の増加が認められることが明らかとなり、SSI 減少が認められれば、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と考えられた。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)

1. 新生児病院感染症の登録システムの開発とその普及

JANIS の感染症サーベイランスの内容改善を目的として、新しい NICU における感染症診断基準を作成し、感染症入力シートの普及を図っている。全国の NICU において感染症入力の実態調査を行った結果、サーベイランス入力システムを持たない NICU が 7 割以上を占めており、入力シートの普及が重要であることが判明した。

2. 「NICU 病院感染予防のためのガイドライン」の作成

「NICU における医療関連感染予防のためのハンドブック」を発行した。全国の NICU に配布したので、感染予防のための医療的ケアの標準化に役立つことが期待される。

3. 産科混合病棟の問題点に関するアンケート調査

産科単独病棟が 142 (24.6%)、混合病棟は 436 (75.4%) で、混合内容は、婦人科 99.5%、内科 37.2%、外科 22.2%、小児科 30.5%で、産婦人科以外の科の併設が 283 (49.0%) と多くを占める。母子同室は、分娩後すぐ 38.8%、生後 1 日 26.3%、

生後 2 日以上 6.4%、昼間だけ 10.4%、希望者のみ 6.4%、母子異室 11.8%で、都道府県別で大きな差があったが、産科混合病棟は 3 県を除き全国にかなり均一に分布していた。

4. JANIS 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)

本研究は厚生労働省院内感染対策サーベイランス (JANIS) 事業における全入院患者部門サーベイランスに参加している国立病院グループの中で、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、当該病院で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。

1. アウトブレイク事例の研究

過去に経験したアウトブレイク事例 2 例からサーベイランスと組織として総合的に院内感染対策に取り組むことの重要性を学んだ。

2. アンケート

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態、支援の在り方について 2 回にわたりアンケートにより意見を求めた。アンケートの回収率は 1 回目アンケートが 46.5% (27 施設)、2 回目アンケートが 27 施設 (50.9%) であった。

アウトブレイクは 1 回目アンケートで 27 施設中 11 施設 (41%)、2 回目アンケートで 27 施設中 12 施設 (44%) と 2 回ともほぼ同じであるが高い頻度でみられた。

アウトブレイクを起こしている薬剤耐性菌としては MRSA が最も多く、1 回目アンケートで 7 施設に、2 回目アンケートで 4 施設にみられた。次いで MDRP が多く 1 回目アンケートで 2 施設、2 回目アンケートでも 2 施設にみられた。

この 2 回のアンケートにより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医療現場の意見を集積することができた。

アウトブレイク時の相談支援窓口については 1 回目アンケートで 19 施設が、2 回目アンケートで 23 施設が必要と回答し、1 回目より 2 回目に希望する施設数が増えた。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 部門において、感染率の指標である標準化感染比を用いて自施設の感染率の変化を検証する方法は有用であり、感染対策の改善に関する検討が必要と思われるケースを有効に同定することができた。一方で同定されたケースに関する聞き取り調査からは、サーベイランスデータを有効に活用して感染対策を講じ、翌年の感染率の低下に結びつけたケースもある一方で、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、感染率などの指標が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があると考えられた。また、還元情報の活用状況を、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から検討した。ウェブサイトへのアクセスは前回調査より増加しており、事業への関心の高さが示されたが、特に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と考えられた。

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)

①2DCM の JANIS 事業組み込み

日常検査で得られる感受性検査の結果を利用して、院内感染症の直接的原因であって、院内感染症の難治化、耐性菌の拡散の原因となる院内拡散を可視化する「アンチバイオグラムの自動分類と2次元キャリアマップ作成」(2DCM)をwebアプリケーション化し JANIS 検査部門サーベイランス参加施設が自由に利用できるようにした。

②菌株の分子疫学的解析、電子データとの突合
複数施設の検査情報をリアルタイムで取り込み、自動解析するシステムを開発し稼働させた。医療施設、外注検査会社の協力の下、異常のあったデータに対応する菌種の菌株を前向きに収集するシステムを作った。収集した菌株の分子疫学的解析を行い、電子データと突合し、電子システムの精度向上を図った。

③JANIS 事業データの二次利用による研究
統計法の手続きに従って提供を受けた JANIS 事

業データを管理し、許可を得た他の研究者が利用できるように、あらかじめ作成した処理ツールを用いて、表計算ソフトなどで処理可能なデータに変換し、暗号化の上配布した。全国データを用いた2DCM解析をMRSAとVREについて行い、医療機関、さらに地域を越えた解析に利用できることを示した。

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

検出された時点で、確認、保存、報告などが必要となる耐性菌に対して、検査機器などから適切な警告・案内が行われるように、耐性菌の条件と発生時の指示内容を定義したメッセージの標準化を準備した。

⑤サーベイランスデータの国際連携

WHONETを用いて収集したデータを JANIS と連携させる方法を検討、中国の研究者と調整した。

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)

使用承諾の得られた施設の JANIS 検査部門データを集計・解析し、主要検出菌31菌種の薬剤耐性率集計、MDRPおよびMDRAの検出状況に加え、予備軍(2剤耐性株)の集計、施設別集計、*S. aureus*のVCMのMIC値の推移、機種、地域等の集計単位による耐性率の差などの薬剤感受性成績の変動因子を解析した。

LAMP法によるメチラーゼ (*rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *armA*) 検出法の開発と日本における検出率の検討を行った。33施設のアミノグリコシド耐性臨床分離株について検討した結果、腸内細菌科で *rmtB* 2株/52株中、*Acinetobacter*属で *armA* 2株/3株中、緑膿菌で *rmtA* 3株/77株中がそれぞれ検出された。なお、全分離株中からの分離率としては、5,998株中7株(0.12%)の検出率であった。

*K. pneumoniae*カルバペネマーゼ産生菌(KPC)のCLSIのスクリーニング基準(Hodgeテスト)の有用性の確認を行った。腸内細菌および *Aeromonas* spp. の974株についてKPC産生菌のスクリーニングとしてHodgeテストを行ったところ、±も含めた44株(4.5%)が陽性と判定された。しかし、遺伝子検査では全て陰性であった。

JANISに参加している施設にアンケートをお願いし298施設(54%)から回答があり、日常検査で何の薬剤耐性菌を目的として、どのような検査

法で検出しているのか、また精度管理はどのような方法で行われているのかを施設規模別の集計を行った。ESBLs 産生菌、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌、AmpC β-ラクタマーゼ、MDRP は多くの施設にて報告可能と回答があった。しかし、内部精度管理は約 50%の施設では実施されていなかった。

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)

わが国の感染症サーベイランスシステムは医療機関からの届出に基づいている。診療報酬明細書(レセプト)に記載された情報は保険診療である限り医師の届け出に左右されないという特徴を持つ。また、医療費や入院日数など社会的な影響についても検討可能である。本研究では、敗血症患者の医療費を検討するため、入院レセプトで「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、入院日数及び入院期間中の総医療費の平均は、敗血症という傷病名が疑い病名ではなかった場合より統計学的に有意に低く、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ことを明らかにした。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(患者総数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(患者総数345名)認められた。疑い病名を考慮すること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)

医療関連感染サーベイランスを実施し、システムの妥当性を評価すると共に、医療関連感染症に対する診療や予防策を考える上で必要な疫学的

データを集積し解析した。

1. 国公立大学附属病院感染対策協議会にて、多施設共同医療関連感染サーベイランスを実施し、カテーテル関連尿路感染、血管カテーテル関連血流感染、人工呼吸器関連肺炎、手術部位感染の発生率の平均値、中央値、主要な起因微生物の分布の解析を行った。いずれも過去に全国立大学病院にて実施したものと同等の感染率であり、検出微生物の分布も同様であった。またSSI発生率はJNISやNNISによる報告とほぼ同等であった。

2. 血流感染の発生率、臨床情報、診療レベルに関する調査は、22国立大学病院の参加表明を得て行った。病床数あたりの血液培養提出件数は、4.06(2008年)から5.01(2010年)、血液培養の2セット率は26.0%(2008年)から53.6%(2010年)と増加傾向であった。主要6菌種の菌血症のエピソード件数は*S. aureus* 16.7、*E. coli* 15.0、*Klebsiella* sp. 12.9、*Enterococcus* sp. 11.0、*Yeast* 7.7、*P. aeruginosa* 6.7/100,000 patient-daysであった。主要6菌種における耐性菌の割合の平均は変化はなかったが、施設間でばらつきが大きいことがわかった。

D. 考察

1. 新型薬剤耐性菌に関する研究推進の重要性

平成21年度から23年度の3年間にわたり、既存および新型の薬剤耐性菌に関する様々な研究や調査が行われた。MRSAは、医療現場において、院内感染症の原因となる筆頭格の耐性菌であるが、「常在菌化」したという認識からか、マスコミ等で話題となることは少なくなっている。しかし、JANISデータで見ると、MRSAは、依然として院内感染の主要な原因菌であり、引き続き、監視と対策が重要な耐性菌である。近年、NDM-1などの新しいメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)やKPC型のカルバペネマーゼを産生する新型の多剤耐性菌が相次いで出現し、医療現場のみならず、途上国等では市中にも、多剤耐性菌が浸淫しはじめており、この問題は、現在の医療現場が直面している最大の困難の一つとして海外の先進諸国でも認識されはじめている。それらに対する対策や監視を強化するためにも、次々と出現している新型の薬剤耐性菌を対象とした、基礎細菌学的な研究体制の整備と強化が、公衆衛生的にも重要な課題となっており、厚生労働科学研究の対象としてさらに充実強化することが急務となっている。

薬剤耐性菌は、MRSA や VRE などのようなグ

ラム陽性菌から MDRP や多剤耐性アシネトバクター等のようなグラム陰性菌、さらに、多剤耐性結核菌などの抗酸菌も含めると、その種類も多く、またそれぞれが獲得している耐性機構も多種多様であり、その全容を把握することがますます困難になりつつある。しかし、薬剤耐性菌の基礎研究に携わる研究者数は減少しており、現在、全ての薬剤耐性菌を網羅した研究体制が構築されているとはとても言えない。その背景として、基礎研究者の減少は直接的な原因であることは先にも述べたが、薬剤耐性菌の研究に向けられている研究費の総額は、ガンや再生医療などに向けられている研究費から比べると、微々たるものであり、今後、薬剤耐性菌に対する研究費の大幅増額による研究の政策的推進が不可欠となっている。

先にも若干述べたが、薬剤耐性菌の問題は、医療現場では診療科の如何を問わず、いずれの専門領域であっても、避けて通れない現実的かつ深刻な問題となっている。例えば、肝臓移植や骨髄移植などの際には、感染症への対策が患者の予後を左右する大きな要因となっている。万一、術後の感染症や院内感染症を発症し、その原因菌が多剤耐性菌であった場合は、有効性が期待できる抗菌薬が極めて限られることになり、予後の悪化は言うまでもない。したがって、全ての医療機関においては、感染症対策の充実強化は不可欠な要素となっており、多種多様な薬剤耐性菌が次々と出現しつつある中で、それらの早期検出と対策などに貢献する基礎研究の推進強化と病院の検査室での細菌の検査体制の整備が急務となっている。

近年、第三世代セファロスポリンとフルオロキノロンの両方に耐性を獲得した大腸菌 (*Escherichia coli*) が、世界の各地で増加しており、大きな関心事となっている。これには、医療機関内での院内感染による増加とともに、市中での健常者における、耐性大腸菌の保菌率の上昇が関与していることが、数年前から指摘されるようになっている。その背景には、畜産現場における耐性菌の蔓延と、食肉等の汚染があるとされ、事実、海外から、食用家畜や畜産品における耐性大腸菌の検出の報告が近年急増している。薬剤耐性菌の問題に対処するには、医療現場とともに畜産現場における抗菌薬の適正使用の推進が不可欠であり、国際的な場での基準作成とともに国内でも

関係省庁間での連携した対策や施策の強化が不可欠と考えられる。

2. 全国サーベイランス体制の支援体制の強化

平成 12 年 (2000 年) に厚労省により院内感染対策サーベイランス (JANIS) 事業が開始された。その後、研究班での種々の検討や院内感染対策中央会議などでの指摘を踏まえ平成 19 年 (2007 年) に JANIS 事業における収集データやデータの集計方法等が大きく改善され、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。そのことも影響してか、2012 年の 2 月時点で、JANIS 事業は、全国の 200 床以上の医療機関が 1000 施設参加する、国際的にも稀な大規模な全国サーベイランスに発展している。JANIS 参加施設に定期的に還元される集計結果は、それぞれの医療機関における院内サーベイランスのデータなどと対比され、日々の感染制御の活動に活用されているという事例も最近しばしば耳にするようになった。また、院内感染や薬剤耐性に関連する学会や研究会でも JANIS 事業の公開情報や、個別の医療機関への還元データが紹介されることも多くなっており、JANIS 事業は日本の医療現場に広く定着し、それにより得られたデータは、わが国のベンチマークとして活用されつつあるというのが実感である。

研究班としては、平成 12 年の JANIS 事業開始以降 12 年に亘り、JANIS 事業の向上や充実、安定的な運用に資する研究や検討を多くの分担研究者、研究協力者の方々の献身的な支援により継続して来た。本研究班の 3 年次にわたる研究を終えるにあたり、JANIS 事業も概ね軌道に乗りつつあることから、今後は研究班としての支援ではなく、厚生労働省の担当課や JANIS 運営委員会が中心となり、JANIS 事業が安定的に運用され、更なる発展を遂げることを期待したい。

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、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も重要である。

また、研究班として学術的観点から、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する事ができたが、JANIS 事業も概ね軌道に乗り、安定的な運用が継続されていることから、今後は、研究班としての支援ではなく、行政レベルでのマネジメントの継続が不可欠と考えられる。

F. 健康危険情報

新しい薬剤耐性菌として、欧州では、OXA-48 と命名されたカルバペネマーゼを産生する多剤耐性肺炎桿菌による死亡者が 2011 年に入り多発しており、今後、国内に侵入する可能性もある。さらに、海外では、NDM-1 を産生する多剤耐性株が医療機関内のみならず市中でも拡散し、大きな関心事となっているが、2010 年の全国調査以降、国内でも、中部地域や中国地域等で、新たに NDM-1 産生株が検出されており、さらに、関東地区の検出例では、1 年余に亘って、同一患者より NDM-1 産生株が検出され続けている等の情報を総合的に考慮すると、NDM-1 産生菌は、ヒトの腸管に定着しやすい性質を有していると考えられ、国内でも今後、NDM-1 産生株が増加することが強く懸念される。以上より、上記した新型耐性菌を含め、様々な薬剤耐性菌の国内での蔓延を未然に防止するため、それらに対する監視体制の一層の強化を行政的に推進する必要があると考える。

G. 研究発表（研究代表者の関連分のみ記載）

（全体の成果は、研究成果の刊行に関する一覧表に記載）

1. 論文発表

1. Wachino J, Yamaguchi Y, Mori S, Yamagata Y, Arakawa Y, Shibayama K. Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of the Subclass B3 Metallo- β -Lactamase SMB-1 that Confers Carbapenem Resistance. Acta Crystallographica Section F. 2012, in press.
2. 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]
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Nagano N, Kimura K, Nagano Y, Yakumaru H, Arakawa Y. Molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility recurrently isolated from a sacral decubitus ulcer. J Antimicrob Chemother. 2009 Dec;64(6):1326-8.
11. Kimura K, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S,

Yamane K, Shibata N, Arakawa Y. Practical disk diffusion test for detecting group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility. J Clin Microbiol. 2009 Dec;47(12):4154-7.

その他、本研究班と連携して実施された研究の成果

12. Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, Arakawa Y, Kuroda M. Complete sequencing of the *bla*_{NDM-1}-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. PLoS One. 2011;6(9):e25334.

13. Ohkura T, Yamada K, Okamoto A, Baba H, Ike Y, Arakawa Y, Hasegawa T, Ohta M. Nationwide epidemiological study revealed the dissemination of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a specific set of virulence-associated

genes in Japanese hospitals. J Med Microbiol. 2009 Oct;58(Pt 10):1329-36.

14. Park YJ, Yu JK, Kim SI, Lee K, Arakawa Y. Accumulation of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes, *qepA* and *qnrS1*, in *Enterobacter aerogenes* co-producing RmtB and class A β -lactamase LAP-1. Ann Clin Lab Sci. 2009 Winter;39(1):55-9.

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

特許出願：ペニシリン耐性 B 群連鎖球菌 (Group B streptococcus) を識別する方法及び識別用キット
木村幸司、黒川博史、荒川宜親
出願番号 特願 2006-190059

平成 21 年度-23 年度 「新型薬剤耐性菌等に関する研究班」 研究協力者名 一覧

研究協力者お名前	御所属	職名／役職等
研究代表者 荒川 宜親		
木村幸司	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	助教
八木 哲也	名古屋大学医学部 中央感染制御部	准教授
徳本 史郎	浜松医科大学健康社会医学講座	特任助教
長野 則之	船橋市立医療センター 臨床検査科	主任技師
長野由紀子	国立感染症研究所 細菌第二部	協力研究員
外山 雅美	船橋市立医療センター 臨床検査科	主任技師
柳沢 英二	株式会社 ミロクメディカルラボラトリー	代表取締役社長
玉井 清子	株式会社 ミロクメディカルラボラトリー	検査部 課長
横山 佳子	京都女子大学家政学部食物栄養学科	准教授
川村久美子	名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻	准教授
中根 邦彦	岡崎市総合検査センター衛生検査班	技師
服部 達也	名古屋大学大学院医学系研究科 医療技術専攻	修士 2 年
横山 覚	名古屋大学大学院医学系研究科 医療技術専攻	修士 1 年
後藤 謙介	名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻	学部 4 年
佐藤 夏巳	名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻	学部 4 年
村 竜輝	名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻	学部 3 年
善野 孝之	名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻	学部 3 年
研究分担者 飯沼 由嗣		
鈴木 匡弘	愛知県衛生研究所 生物学部 細菌研究室	主任研究員
長尾 美紀	京都大学大学院 臨床病態検査学	助教
馬場 尚志	金沢医科大学 臨床感染症学	准教授
研究分担者 池康 嘉		
富田 治芳	群馬大学大学院 医学系研究科 細菌学、同薬剤耐性菌実験施設	教授、施設長
谷本 弘一	群馬大学大学院 医学系研究科 附属薬剤耐性菌実験施設	准教授
井上 貴子	群馬大学大学院 医学系研究科 細菌学	助教
野村 隆浩	群馬大学大学院 医学系研究科 細菌学	技術専門職員
山下 均	群馬大学大学院 医学系研究科 細菌学	大学院生
堤 裕子	群馬大学大学院 医学系研究科 細菌学	大学院生
研究分担者 一山 智		
高倉 俊二	京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学講座	准教授
長尾 美紀	京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学講座	助教

研究分担者 河野 文夫		
平木 洋一	国立病院機構熊本医療センター 薬剤科	副薬剤科長
研究分担者 北島 博之		
大木 康史	群馬大学医学部 小児科 周産母子センター	講師
大城 誠	名古屋第一赤十字病院 小児保健科	副部長
森岡 一朗	神戸大学医学部 小児科 周産母子センター	医長/助教
堀越 裕歩	東京都立小児総合医療センター感染症科 感染管理室	科長
坂田 宏	旭川厚生病院小児科	部長
田中 太平	名古屋第二赤十字病院 新生児科	部長
早川 昌弘	名古屋大学医学部附属病院周産母子センター	講師/副部長
山田 恭聖	愛知医科大学小児科	医長
坂木 晴世	国立病院機構西埼玉中央病院 医療安全管理室	室員
研究分担者 切替 照雄		
秋山 徹	国立国際医療研究センター研究所感染症制御研究部	室長
北尾 公英	同上	研究員
多田 達哉	同上	研究員
島田 佳世	同上	研究助手
齋藤 暢子	同上	研究助手
賀来 満夫	東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座	教授
霜島 正浩	株式会社ビー・エム・エル細胞形態学部細菌学課	次長
坂入 和宏	同上	検査技師
小川 美保	同上	検査技師
檜原 謙次	株式会社ミズホメディイ開発部	部長
田中 雅士	同上	研究員
研究分担者 黒崎 博雅		
山縣ゆり子	熊本大学大学院生命科学研究部	教授
山口 佳宏	熊本大学環境安全センター	准教授
研究分担者 小西 敏郎		
針原 康	NTT 東日本関東病院外科	
高野八百子	慶應義塾大学病院感染対策室	
草地 信也	東邦大学大橋医療センター外科	
竹末 芳生	兵庫医科大学感染制御学	