

新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 (ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌に関する研究)

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／耐性菌制御学・教授)
研究協力者 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・講師)

研究要旨：B 群溶血性レンサ球菌(B 群連鎖球菌、*Streptococcus agalactiae*, Group B streptococcus, GBS)は、これまでペニシリンを含むβ-ラクタム系薬に一樣に感受性を示すと考えられてきたが、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、セファロスポリン系薬に低感受性を獲得したペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌 (Group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility, PRGBS)の出現を報告した(Kimura K., et al. AAC 2008)。2007-2008 年に分離された妊婦臍スワブ由来 141 株の GBS の中からは PRGBS は検出されなかった(Kimura K., et al. JJID 2013)。また、1977-2005 年に分離された 349 株の GBS では、1995 年より以前に分離された株の中には PRGBS は分離されなかった(Kimura K., et al. JJID 2013)。また、PRGBS は、ペニシリン感受性の GBS に比べ、キノロン系薬、マクロライド系薬に同時に耐性である割合が統計学的に有意に高く、PRGBS は多剤耐性化傾向を示すことを明らかにした(Kimura K., et al. JAC 2013)。しかし、国内で広く使用されている、A 社の自動機器による感受性測定では、PRGBS の半数程度でしか正しくペニシリンに対する感受性を判定できないことを見いだした(Kimura K., et al. JAC 2013)。

A. 研究目的

B 群溶血性レンサ球菌(*Streptococcus agalactiae*, Group B streptococcus, GBS)は、新生児の敗血症、髄膜炎の筆頭原因菌であるとともに、高齢者や糖尿病患者等に侵襲的な感染症を引き起こす。GBS は、これまでペニシリンを含むβ-ラクタム系薬に一樣に感受性を示すと考えられてきたが、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、セファロスポリン系薬に低感受性を獲得したペニシリン低感受性B群レンサ球菌 (Group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility, PRGBS)の出現を報告した(Kimura K., et al. AAC 2008)。これまでに、PRGBS の検出には、オキサシリン、セフチゾキシム、セフチブテンの各ディスクを用いたディスク拡散法が有効であること (Kimura K., et al. JCM 2009)、数週間の間隔をあけて遺伝的に同一と考えられる PRGBS 二株が分離された症例 (Nagano N., Kimura K., et al. JAC 2009)、PRGBS の PBP 遺伝子の変異箇所の解析から、PRGBS が多源的に出現していること (Nagano N.,

Nagano Y., Kimura K., et al. AAC 2008; ASM Microbe 誌の Journal Highlight に取り上げられる)、Multilocus sequence typing (MLST)により、国内の PRGBS は、ST458 と ST1 を含む Clonal Complex から多く出現しているが、その他遺伝的に関連性の薄い菌株群からも多源的に出現していること (Kimura K., et al. JAC 2011)などを明らかにしてきた。しかし、PRGBS の妊婦臍スワブからの分離頻度、PRGBS の出現時期、PRGBS 株に対する他系統の抗菌薬の感受性、自動感受性測定装置での PRGBS 検出能力などが不明であったため、今回、これらの点について解析や解明を行った。

B. 研究方法

2007-2008 年に分離された妊婦臍スワブ由来 141 株の GBS について、前述の PRGBS を検出可能なディスク拡散法、寒天平板希釈法による薬剤感受性試験を行った(Kimura K., et al. JJID 2013)。また、1977-2005 年に分離された 349 株の GBS については、前述の PRGBS を検出できるディスク拡散法を行い、PRGBS 疑い株につい

ては寒天平板希釈法による薬剤感受性試験、PBP2X 遺伝子の配列決定を行った(Kimura K., et al. JJID 2013)。また、PBP2X 遺伝子の配列決定済みの 19 株の PRGBS と 38 株のペニシリン感受性 B 群連鎖球菌について、キノロン系薬、マクロライド系薬の薬剤感受性試験を平板希釈法で行い、結果を統計学的解析を行った(Kimura K., et al. JAC 2013)。さらに、広く国内で使用されている、A 社の自動感受性測定機器を用いて、28 株の PRGBS に対するペニシリンの MIC 値を 3 回測定し、寒天平板希釈法による結果と比較した。

倫理面への配慮：今回の研究では、主に菌株を対象とした研究であり、倫理審査を必要とする研究計画は含まれていない。

C. 研究結果

2007-2008 年に分離された妊婦膣スワブ由来 141 株の GBS の中からは PRGBS は検出されなかった(Kimura K., et al. JJID 2013)。また、1977-2005 年に分離された 349 株の GBS からは、2005 年分離株の中に 1 株 PRGBS が検出されたが、1995 年より古い保存株からは PRGBS は分離されなかった(Kimura K., et al. JJID 2013)。また、ペニシリン感受性 GBS の 18.4% (7/38) がレボフロキサシン非感性、7.9% (3/38) がエリスロマイシン耐性であるのに対し、PRGBS の 100% (19/19) がレボフロキサシン非感性、47.4% (9/19) がエリスロマイシン耐性であった。このことから PRGBS は、ペニシリン感受性 B 群連鎖球菌に比べ、キノロン系薬、マクロライド系薬に同時に耐性である割合が統計学的に有意に高く(キノロン系薬 $p = \leq 0.0001$ 、マクロライド系薬 $p = 0.0012$)、PRGBS は多剤耐性を獲得している傾向が高いことを明らかにした(Kimura K., et al. JAC 2013)。しかし、国内で広く使用されている、A 社の自動機器による感受性測定では、PRGBS の半数程度(13/28, 46.4%)に対してペニシリンへの感受性を正しく判定できないことを見いだした(Kimura K., et al. JAC 2013)。

D. 考察

2007-2008 年に分離された妊婦膣スワブ由来 141 株の GBS から PRGBS が検出されなかったことから、少なくとも 2007-2008 年の対象とした医療施設においては、妊婦膣スワブ由来の GBS 中の PRGBS は比較的稀であったと考えられる。

1977-2005 年に分離された 349 株の GBS の中で、1995 年より古い株からは PRGBS は分離されなかったことから、PRGBS の最古の株は現在のところ、1995 年に分離された株であり、

PRGBS は 1990 年代に出現した可能性が示唆される。

PRGBS は、ペニシリン感受性 GBS に比べ、キノロン系薬、マクロライド系薬に同時に耐性である割合が統計学的に有意に高く、PRGBS は多剤耐性化傾向があることから、今後、さらに PRGBS の動向に関して注意と詳細な解析が必要であると考えられる。

A 社の自動感受性測定機器では、PRGBS の半数程度(13/28, 46.4%)においてペニシリンに対する感受性を正しく判定できないことから、自動感受性測定機器による薬剤感受性試験では、多くの PRGBS が見逃されている可能性が示唆された。この問題を克服するには、PRGBS を検出しやすい薬剤を薬剤感受性試験に加えることや PRGBS 疑い株の場合には警告を出すようにするなど、自動機器による薬剤感受性測定のプロトコルやアルゴリズムに何らかの改良が必要と考えられる。また、自動測定機器の改良の前には、前述の PRGBS を検出できるディスク拡散法などによる PRGBS の検出が有用であると考えられる。

E. 結論

我々が世界に先駆けて報告した新規耐性菌である PRGBS に関しては、不明な点が多く、研究すべき課題が多々残されている。今後、PRGBS に関する研究を基礎研究とともに臨床研究としてもさらに充実促進する必要がある。

F. 健康危険情報

PRGBS 株は、多剤耐性傾向を示すため、特に、妊婦や新生児からの分離動向に注意する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) K. Kimura, Y. Nishiyama, S. Shimizu, J. Wachino, M. Matsui, S. Suzuki, K. Yamane, K. Shibayama, Y. Arakawa (2013)

“Screening for Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility (PRGBS) in Clinical Isolates Obtained between 1977 and 2005”, **Jap. J. Infect. Dis.** in press

2) K. Kimura, K. Matsubara, G. Yamamoto, K. Shibayama, Y. Arakawa (2013)

“Active Screening of Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility and Altered Serotype Distribution, Isolated from Pregnant Women in Kobe, Japan”, **Jap. J. Infect. Dis.** in press

3) K. Kimura, N. Nagano, Y. Nagano, J. Wachino,

K. Shibayama, Y. Arakawa (2013)
“Ability of the VITEK[®] 2 System to Detect Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility (PRGBS)” **J. Antimicrob. Chemother.** in press

4) K. Kimura, N. Nagano, Y. Nagano, S. Suzuki, J. Wachino, K. Shibayama, Y. Arakawa (2013)

“High Frequency of Fluoroquinolone- and Macrolide-resistant Streptococci among Clinically Isolated Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility” **J. Antimicrob. Chemother.** in press

2. 学会発表

1) 木村幸司、長野則之、長野由紀子、鈴木里和、和知野純一、柴山恵吾、荒川宜親(2012)

“ペニシリン低感受性B群連鎖球菌(PRGBS)は多剤耐性化傾向がある”

第49回日本細菌学会中部支部総会 金沢 11月9日-10日

2) 木村幸司、長野則之、長野由紀子、外山雅美、荒川宜親(2012)

“連鎖球菌感染症にみられる新しい知見”

第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第59回日本化学療法学会東日本支部総会、合同学会 東京 10月10-12日 教育講演7

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) B群連鎖球菌を検出するためのプライマーセット及びその利用 荒川宜親、木村幸司、柳沢英二 登録日 平成24年12月14日 特許番号 特許第5153726号

2) 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 登録日 平成24年3月30日 特許番号 特許第4956721号

新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 (黄色ブドウ球菌の薬剤耐性に関する研究)

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/耐性菌制御学・教授)
研究協力者 山田 景子 (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)

研究要旨：

国内の医療機関で2012年までに分離された黄色ブドウ球菌について抗MRSA薬を中心に薬剤感受性を調査した。595株について調査した結果、抗MRSA薬VCM、TEIC、LZDに対し耐性を示す菌株は確認されなかった。ABK耐性株およびABK中等度耐性株が、それぞれ、5株と10株、確認されたが経年的な変動は見られなかった。これらの株の遺伝的背景をPOT法にて解析したところ、少なくとも同一遺伝子型に属する複数菌株の伝播は認められなかった。ABK耐性遺伝子は、プラスミドを介して伝播されるとされているが、解析した株の中には、すでにゲノム染色体上にABK耐性遺伝子が保持されている菌株が多く確認された。今回発見された高度耐性（ABK MIC, 256 μ g/ml）の1株は、*aac(6')/aph(2'')*の構造遺伝子領域に変異等がないことが確認されており、この株がABKに高い耐性を示す分子機構について解析を継続中である。

A. 研究目的

2012年までに臨床分離された黄色ブドウ球菌の中に臨床的に問題となるような薬剤耐性菌が出現あるいは拡散していないか調査を行う。また、新たな耐性機序を獲得した菌株が出現した場合、耐性機序について解析する。解析結果について学会などで報告し周知することを通じて、耐性菌やその疫学についての理解を深め、臨床現場における耐性菌対策を促す。

B. 研究方法

全国の医療機関で臨床検体より分離された595株の*S. aureus*について寒天平板希釈法によりバンコマイシン(VCM)、テイコプラニン(TEIC)、リネゾリド(LZD)、アルベカシン(ABK)の最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。ダプトマイシン(DAP)については、396株について微量液体希釈法にて耐性株をスクリーニングした。さらに、ABKのMICが比較的高かった株に着目し、その遺伝的背景をPhage open reading frame typing法(POT法)により比較解析し、特定の遺伝背景を持った流行株が存在するか否か検討を行った。ABK耐性株の数について年代比較などを行った。ABKの修飾酵素をコードする遺伝子*aac(6')/aph(2'')*についてプロモーター領域および構造遺伝子領域の塩基配列の解析、発現

量などを解析した。また、注目すべき耐性菌についてはその耐性機構について検討した。

倫理面への配慮

患者の個人情報などは取り扱わず、菌株は連結不可能匿名化された番号により管理されており、倫理審査の対象外の研究である。

C. 研究結果

VCM、TEIC、LZD、DAPに対し検査された全株、感性与判定され、耐性を持つ株は見られなかった(図1)。0.84%にあたる5株がABKのMIC \geq 16(μ g/ml)となったが、2003年以前の株(2株/201株、1.0%)と比較して2010年分離株(3株/394株、0.76%)で増加傾向は認められなかった。ABKのMICが比較的高かった株を中心にPCR解析を行い*aac(6')/aph(2'')*の存在が14株で確認された(表1)。POT法の結果では菌株の遺伝子型にバリエーションが見られた(図2)。*aac(6')/aph(2'')*をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析から、この遺伝子を染色体上に保持する可能性が高い菌株が多数見られた(図3)。*aac(6')/aph(2'')*の構造遺伝子領域の塩基配列を確認したところ、報告されているABK高度耐性化に関わる変異などは見られず、通常配列を持った*aac(6')/aph(2'')*であることが確認された。これらの株のMIC値は8-256 μ g/mlとばらつ

きがあり、リアルタイム PCR による *aac(6')*/*aph(2'')* の mRNA の転写量は耐性度と比例した(図 4)。

D. 考察

今回解析した 595 株は多くの抗 MRSA 薬に感性と判定された。ABK 耐性株は若干認められたが経年的な増加傾向は見られなかった。また、少なくとも同一遺伝子型に属する菌株の流行も認められなかった。ABK 耐性遺伝子は、プラスミドを介して伝播されるといわれているが、すでにゲノム染色体上に保持されている菌株の方がプラスミドに保持されているとみられる菌株より多かった。今回発見された高度耐性 (MIC256) の 1 株は、*aac(6')*/*aph(2'')* に塩基配列の変化等の質的变化がないことが確認されており、この株が ABK 高度耐性を示す分子機構について解析を継続中である。

E. 結論

解析された 595 株中に抗 MRSA 薬 VCM、TEIC、LZD、DAP に対し耐性を示す菌株は確認されなかった。ABK 耐性株の割合に増加傾向は見られなかった。これまでの報告より高い MIC を示す ABK 高度耐性株が検出された。

F. 健康危険情報
無し。

G. 研究発表

1. 論文発表 無し。
2. 学会発表
 - 1) 山田景子、白井義憲、金万春、岡本陽、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 「黄色ブドウ球菌の抗 MRSA 薬の感受性調査」第 41 回薬剤耐性菌研究会、抄録集 41 頁、平成 24 年
 - 2) 山田景子、白井義憲、金万春、岡本陽、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 「抗 MRSA 薬耐性黄色ブドウ球菌の調査とその疫学」日本細菌学会中部支部総会、予稿集 41 頁、平成 24 年
 - 3) 山田景子、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 「抗 MRSA 薬耐性黄色ブドウ球菌の調査とその疫学」日本臨床微生物学雑誌 Vol. 22, 173 頁、平成 24 年

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む。)

1. 特許取得 無し。
2. 実用新案登録 無し。
3. その他 無し。

MIC分布 (n=595)

	薬剤濃度 (μg/ml)													Rのみ		
	0.125	0.25	0.5	1	1.5	2	4	8	16	32	64	128	256		512	>512
オキシサリン	42	167	34	2	-	2	5	4	15	11	18	37	138	86	23	58
ST合剤	-	-	594	1	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	0
バンコマイシン	-	-	58	472	56	9	0	0	-	-	-	-	-	-	-	0
テイコブラニン	-	-	148	351	-	63	20	13	0	-	-	-	-	-	-	0
リネゾリド	-	0	33	400	-	162	0	0	-	-	-	-	-	-	-	0
アルベカシン	-	1	21	309	-	201	48	10	4	0	0	1	-	-	-	0.84
テトラサイクリン	-	307	7	9	-	3	2	0	3	264	-	-	-	-	-	45
ダプトマイシン	-	-	-	396	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
ムピロシチン	-	-	-	-	-	92	0	1	4	-	-	-	-	-	-	0

□ : 感受性 (S)、□ : 中等度 (I)、□ : 耐性 (R)

図1 薬剤感受性調査結果

菌株番号

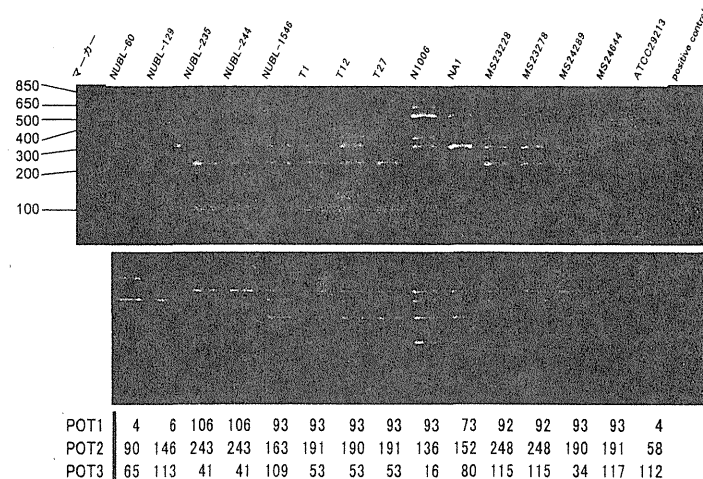


図2 POT法による遺伝的背景の調査

		GM MIC	AMK MIC	ABK MIC	地域	材料	採取年
N1006	MRSA	>512	>512	256	愛知県	創ガーゼ	1992
NUBL-244	MRSA	>512	128	16	茨城県	か行先	2010
NUBL-235	MRSA	>512	64	16	愛知県	吸引痰	2010
MS24644	MRSA	>512	64	16	広島県	喀痰	2003
NUBL-1546	MRSA	>512	32	16	千葉県	膿	2011
T1	MRSA	>512	64	8	愛知県	痰	2003
T12	MRSA	>512	64	8	愛知県	口腔内分泌液	2003
T27	MRSA	>512	64	8	愛知県	開放膿	2003
MS24289	MRSA	512	64	8	大阪府	皮膚	2003
NUBL-60	MSSA	>512	32	8	東京都	耳漏	2011
NA1	MRSA	>512	32	8	大阪府	膿	2003
MS23228	MRSA	>512	32	8	東京都	血液	2003
MS23278	MRSA	>512	32	8	神奈川県	膿	2003
NUBL-129	MSSA	128	8	4	長野県	膿	2010

表1 ABK耐性遺伝子aac(6')/aph(2")が確認された菌株

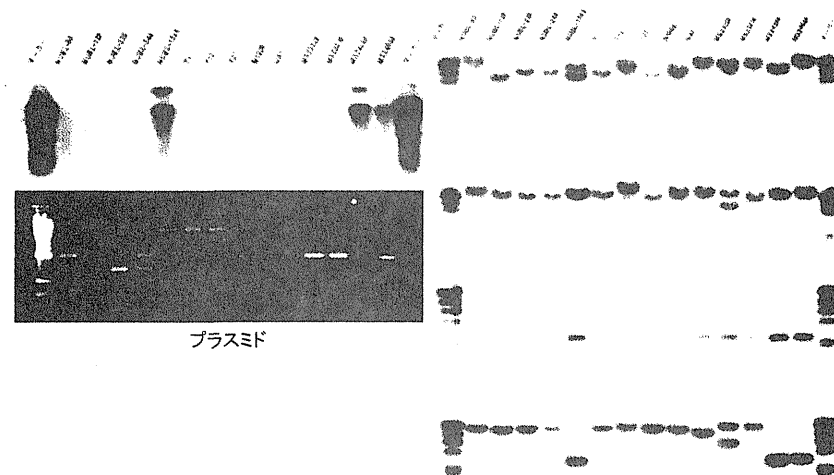


図3 aac(6')/aph(2")サザンブロッティング
ゲノムDNA (上段: EcoRI, Pst I, ClaI, EcoRV)

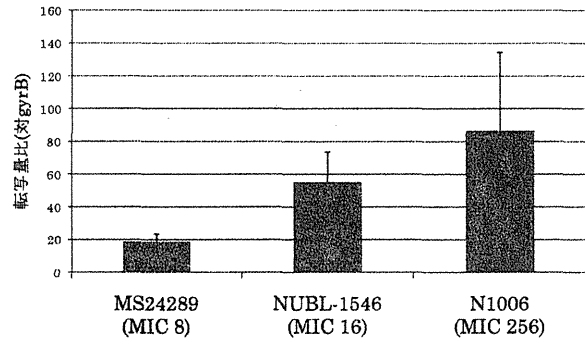


図4 *aac(6')/aph(2'')* mRNA 転写量の比較

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

MDRP、MRSA 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・教授)
研究協力者	鈴木匡弘	(愛知県衛生研究所・細菌研究室・主任研究員)
研究協力者	馬場尚志	(金沢医科大学・臨床感染症学・准教授)

研究要旨

本研究では、MDRP 等の薬剤耐性菌の感染伝播様式の解析のため、再現性が高く実施が比較的容易な分子疫学解析法の開発及び評価を目的とした。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に関する研究を行い、緑膿菌においては ORF の保有パターンが菌株毎に異なることを発見し、ORF 保有パターンにもとづく菌株タイピング開発の可能性が示された。

A. 研究目的

本研究では、施設内あるいは施設を超える院内感染伝播や予後不良に関わる MDRP や MRSA の菌株 (danger strain) を遺伝学的に解析し、その簡易同定法の開発を目指す。本年度は、新たなタイピング法としての質量分析 (MALDI-TOF) による MRSA の解析を試みた。また、昨年度まで開発を行ってきた緑膿菌の PCR を用いたタイピング法 (PCR-based ORF typing (POT) 法) の MLST や PFGE 法との比較検討を行った。

B. 研究方法

1) MALDI-TOF (ブルカー社) を用いた MRSA および緑膿菌の質量分析解析

1. MRSA POT 法で同一パターンを示し、施設内伝播が疑われる MRSA 臨床分離株を用いて、MALDI-TOF による質量分析解析を行った。

2. POT 法にて遺伝子型の判明している緑膿菌保存株について同様に質量分析解析を行った。

3. 通常と同定に加えて、波形パターンの解析を専用ソフトウェアである ClinPro Tools を用いて行った。

2) PCR-based ORF typing 法による緑膿菌の解析

1. 1 医療機関にて 7 ヶ月間に連続して分離された緑膿菌 214 株を POT 法で解析し、緑膿菌の遺伝子型の多様性を評価した。

2. 臨床分離株および ATCC 標準株の合計 179 株を MLST 解析し、POT 法による結果と比較した。

3. 臨床分離株 183 株 (集団感染 2 事例を含む) を PFGE 解析し、POT 法と比較した。

倫理面への配慮 臨床データを不可逆的に切り離した菌株のみを扱う研究であり、倫理的な問題は発生しない。

C. 研究結果

1) MALDI-TOF (ブルカー社) を用いた MRSA および緑膿菌の質量分析解析

1. POT 型で分類される 6 グループ (それぞれのグループに 2~10 株の同一 POT 型の MRSA 菌株あり) の質量分析波形パターンを解析した。それぞれのグループ間でのパターンはよく保存されており、同一遺伝子型の MRSA は同一質量分析パターンを示す傾向がみられた。一方で、異なる POT 型の株においても多くの波形が類似しており、遺伝子型毎の特徴的な波形を見いだすことは容易ではなかった (図 1)。

2. 緑膿菌については、菌種同定については良好な判定が可能であったが、同一の遺伝子型の菌においても多様性が高く、質量分析による株レベルでの判定は困難であった。

2) PCR-based ORF typing 法による緑膿菌の解析

1. 7 ヶ月間に分離された緑膿菌は 132 の POT 型に分類された。同一 POT 型となった株数は POT 型 823-0 が 15 株と最も多く、次いで 646-48 の 9

株、28-16 および 634-0 の 6 株と続いた。他の 178 株は 128 の POT 型に分けられた。同一 POT 型株が多く見られた 823-0 と 646-0 については病院内の水平伝播が強く疑われた。

2. MLST 解析との比較から POT 型の最初の数値 (POT1 値) と MLST 解析による clonal complex (CC) 型との相関が見られた。52 種類の POT1 値は CC 型との間に 1 : 1 の関係が見られた (表 1)。一方 20 種類の POT1 値には複数の CC 型が含まれた (表 2)。

3. PFGE 解析に用いた 183 株は POT 法では 76 遺伝子型に分けられた。POT 法による菌株識別能力は PFGE 法で homology 80% を同一とした場合 (68 遺伝子型) と同等かやや上回っていた。集団感染由来株はおおのの事例内で同一 POT 型となった (図 2)。一方 PFGE 解析では同一集団感染由来株のホモロジーは 78.99%~93.97% となった。

D. 考察

MALDI-TOF による質量分析解析結果から、MRSA については専用ソフトを用いる事により、疫学的な解析が可能となる可能性が示された。一方で、本研究課題の目的である danger strain の判定については、さらなる菌株解析が必要であると考えられた。緑膿菌については、解析時の菌株の調整方法など、波形データの安定性を高める処理が必要であると考えられた。

緑膿菌 POT 法の菌株識別能力はおおむね PFGE パターンのデンドログラム解析による homology 80% 程度に相当した。これは MLST 解析の識別能力とほぼ一致する菌株識別能力と考えられるが、CC 型との相関を想定して設計した POT1 値が主な菌株識別能を担っていることから妥当な結果と考えられる。臨床分離される株の POT 型の多様性は非常に高いことも確認され、院内感染疑い時の分子疫学解析法として十分な菌株識別能力があると考えられた。

E. 結論

質量分析により、MRSA の菌株識別の可能性が示唆された。緑膿菌 POT 法の菌株識別能力はおおむね MLST 解析程度であった。臨床分離株の多様性が非常に高いことから、十分な菌株識別能力が備わっていると結論された。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsushima A, Takakura S, Yamamoto M, Matsumura Y, Shirano M, Nagao M, Ito Y, Iinuma Y, Shimizu T, Fujita N, Ichiyama S. Regional spread and control of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Kyoto, Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 31(6):1095-100.

2. 学会発表

- 1) 鈴木匡弘、他、市中獲得型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 USA300 の市販抗菌薬軟膏耐性、第 86 回日本感染症学会 (2012 年 4 月) 長崎市
- 2) 鈴木匡弘、他、緑膿菌集団感染事例の緑膿菌 POT 法および PFGE 法による分子疫学解析、第 61 回日本感染症学会東日本地方会 (2012 年 10 月) 東京都
- 3) 鈴木匡弘、他、緑膿菌のデジタル分子疫学法の開発、第 41 回耐性菌研究会 (2012 年 10 月) 岐阜県下呂市
- 4) Baba H, Suzuki M, Iinuma Y, Investigation of the Clonality of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Ishikawa Prefecture of Japan by Using Phage-Derived Open Reading Frames Typing. *IDWeek 2012, San Diego, Oct 2012.*
- 5) 馬場尚志、飯沼由嗣、PCR-based open reading frames typing 法によるカルバペネム耐性緑膿菌の疫学的解析、第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 (2012 年 11 月)、京都市
- 5) 鈴木匡弘、他、緑膿菌の PCR-based ORF typing (POT) 法の開発と性能評価、第 24 回日本臨床微生物学会 (2013 年 2 月) 横浜市
- 6) 細羽恵理子、鈴木匡弘、他、MLST 解析との比較による緑膿菌用 PCR-based ORF typing (POT) 法の評価、第 24 回日本臨床微生物学会 (2013 年 2 月) 横浜市

- 7) 鈴木匡弘、他、緑膿菌のPCR-based ORF typing法の開発、第47回緑膿菌感染症研究会(2013年2月)札幌市
- 8) 鈴木匡弘、他、ORF検出パターンによる緑膿菌の迅速簡易分子疫学解析法の開発、第86回日本細菌学会(2013年3月)千葉市

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得 特願 2012-10593 緑膿菌の遺伝子型別分類法およびこれに用いるプライマーセット
2. 実用新案登録 なし
3. その他

図1 MALDI-TOF を用いた MRSA の波形分析結果

Group	株数	POT
1	2	65-152-80
2	4	70-152-80
3	10	93-201-103
4	5	93-219-111
5	10	93-223-117
6	4	106-9-80

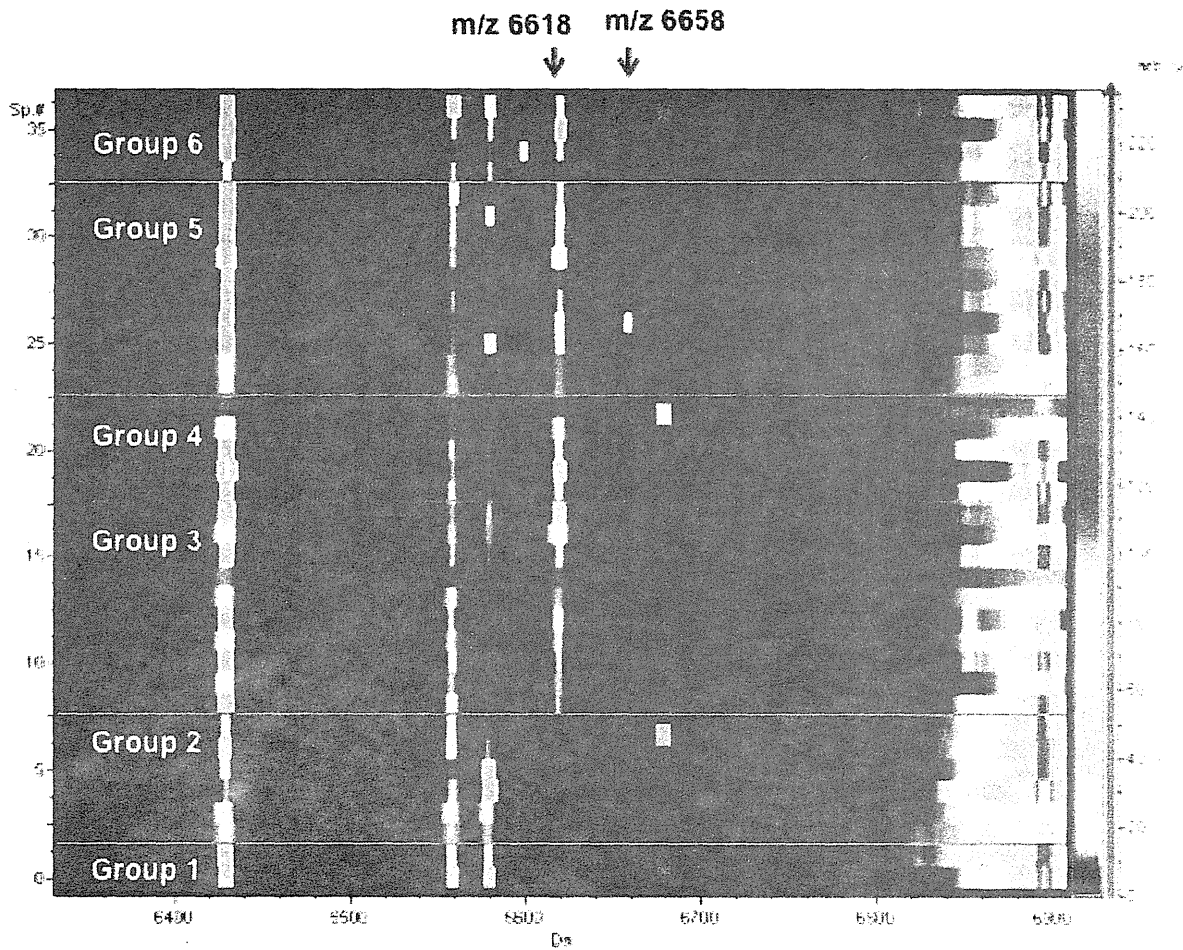


表1 POT1 値と ST 型 (CC 型) が 1:1 で対応した組み合わせ

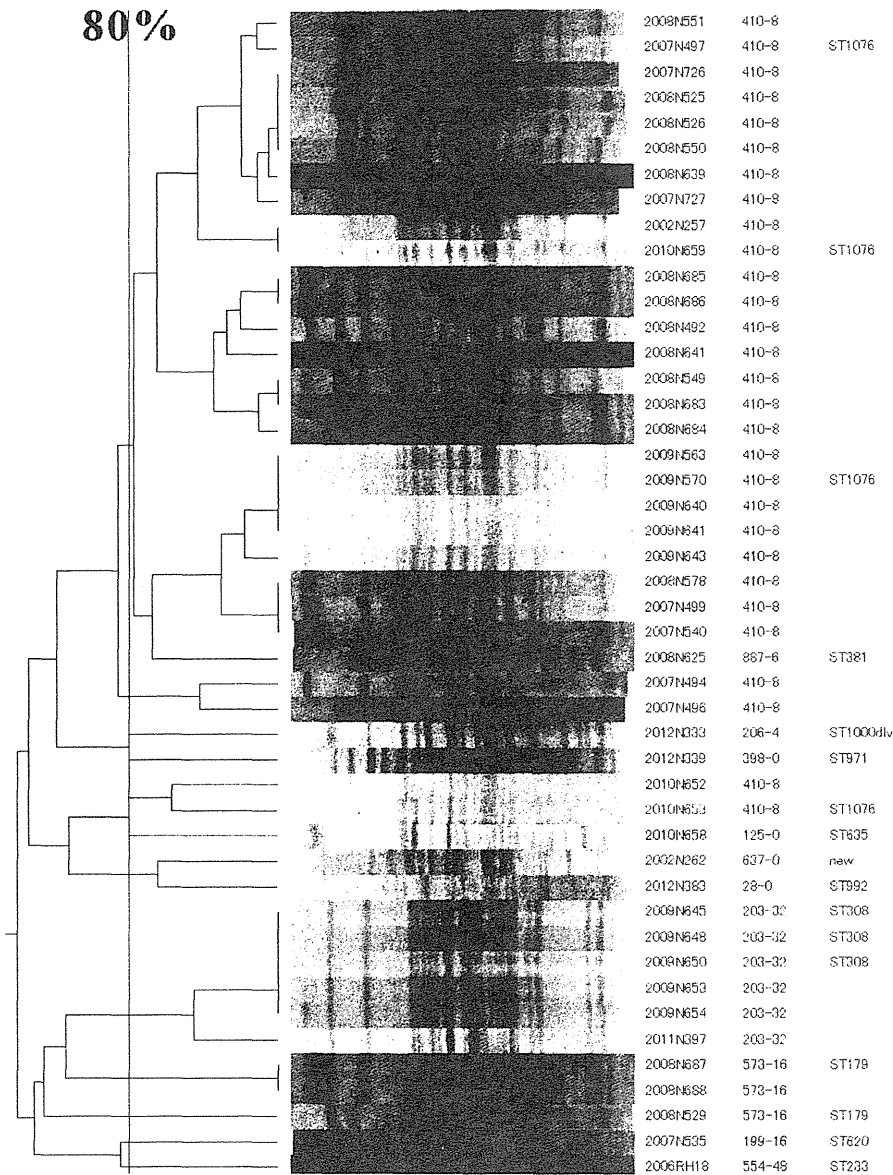
POT1	ST	株数	POT1	ST	株数	POT1	ST	株数
14	new	1	207	CC235	14	574	CC360	2
44	CC1239	2	249	ST164	5	604	CC687	1
45	new	1	278	new	1	622	ST447	1
46	CC241	2	287	CC875	1	634	CC242	5
56	ST966	1	302	CC406	1	635	new	1
70	CC859	1	307	new	1	636	CC155	6
74	new	1	311	ST209	1	646	CC3657	8
92	new	1	314	CC260	2	656	ST532	2
105	ST252	2	316	ST1129	2	706	ST319	3
108	ST654	4	318	ST245	2	822	CC569	1
118	CC879	1	319	ST270	1	823	ST274	6
123	CC464	1	392	ST313	3	879	ST4	1
126	ST439	1	398	ST971	1	886	new	1
136	ST1051	1	410	ST1076	6	887	CC381	2
199	ST620	1	450	ST1203	1	894	ST132	2
201	ST829	1	458	ST1027	1	974	CC446	3
203	ST308	5	467	ST1197	1			
206	new	1	554	ST233	5			

表2 一つの POT1 値に複数の ST 型 (CC 型) が見られた組み合わせ

POT1	POT2	ST	株数	POT1	POT2	ST	株数
28	16	ST186	2	382	4	CC852	1
	0	CC992	1		0	ST549	1
60	0	ST262	2	383	52	CC244	1
	0	new	1		44		1
62	0	ST291	1	572	0/48/58	CC282	3
	16	ST412	1		76	ST983	1
63	0	new	1	639	0	new	1
	4	ST272	1		8	new	1
109	0	new	1	643	0	ST1284	1
	4	new	1		0	new	1
122	0	ST859	1	573	2/16	CC179	4
	0/8	new	3		16	new	1
124	0	ST389	1	637	0	ST882	1
	0	ST641	1		0	ST1033	1
	0	ST988	1		52	new	1
	0	new	1		380	0	CC17
125	0	ST635	1	575	16		3
	0	CC1058	2		45	ST1285	2
335	16	ST606	1	830	0	ST645	2
367	16		1		15	ST254	1
	0	CC1045	1				

図2 PFGE パターンのデンドログラム解析(抜粋)

集団感染事例は同一 POT 型となった (2008N625 株は集団事例由来株ではない)。POT 法はおおむね PFGE パターンのホモロジー80%程度の菌株識別能力であった。



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）
新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究班
分担研究報告書（平成 24 年度）

日本国内の小児侵襲性感染症由来 β-ラクタム剤非感受性肺炎球菌の解析

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所細菌第一部 部長
研究協力者 小川 道永 国立感染症研究所細菌第一部 室長
研究協力者 常 彬 国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官

研究要旨

2011 年および 2012 年日本国内の小児侵襲性感染症患者から分離された肺炎球菌の血清型別、薬剤感受性およびシークエンスタイピングを行った。2011 年と 2012 年のペニシリン G 低感受性肺炎球菌の分離率はそれぞれ 54.1% と 55.2% であり、明らかな変化が見られなかった。血清型別の結果で、7 価肺炎球菌コンジュゲートワクチンに含む血清型のペニシリン G 低感受性肺炎球菌の分離率の低下が認められた。その一方、ワクチンに含まれない 19A および 15A 型のペニシリン G 低感受性株の分離の増加が見られた。β-ラクタム剤に対する耐性機構を詳細に検討するための評価系の構築を目指した。

A. 研究目的

7 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン(PCV7)は、日本には 2010 年 2 月に導入され、PCV7 の接種率の増加と肺炎球菌による感染症の発症率の減少が期待されている。一方、PCV7 に含まれない血清型による侵襲性感染罹患率の増加 (Serotype replacement) および分離菌の化学療法剤に対する低感受性化/耐性化が懸念されている。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の血清型および薬剤感受性の解析を行った。本分担報告書では、2011 と 2012 年に日本国内小児侵襲性感染症患者から分離された肺炎球菌の比較解析を行い、PCV7 の普及による β-ラクタム剤非感受性肺炎球菌の血清型の推移を観測した。また、肺炎球菌の β-ラクタム剤耐性に関して耐性遺伝子としてはペニシリン結合タンパクの変異に依るものと考えられている。しかしながら、遺伝子配列レベルでの比較解析によって推測されているにとどまる報告が多く、詳細な機能解析がなされていない。そこで、耐性遺伝子候補の耐性に与える影響を評価する方法を構築することが必要であると考えた。そのために、肺炎球菌の持つ自然形質転換能を利用した、簡便な遺伝子導入方法の確立を目標とした。

B. 研究方法

2011 年および 2012 年に、日本国内の小児侵襲性感染症から分離された肺炎球菌 222 株

(2011 年：135 株；2012 年：87 株) を対象とした。分離された肺炎球菌に対して、Statens Serum Institute 製血清および自家調製血清を用い、莢膜膨潤法により行った。微量液体希釈法による薬剤感受性試験を行った。薬剤感受性試験の結果は 2007 年までの CLSI の基準によって、ペニシリン G の MIC が $\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.12\text{--}1 \mu\text{g/mL}$ 、 $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ をそれぞれ、ペニシリン感受性 (PSSP)、ペニシリン低感受性 (PISP)、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) と判別した。マルチローカスシークエンスタイピング (MLST) では、分離株の 7 つのアリル (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*) の配列を決定し、<http://spneumoniae.mlst.net> にて検索を行い、遺伝子型を決定した。

C. 研究結果

1: 2011 年と 2012 年に小児侵襲性感染症例から分離された肺炎球菌のペニシリン G およびメロペネムに対する感受性

2011 年と 2012 年に小児侵襲性感染症例から分離された肺炎球菌のうち、ペニシリン G の MIC が $\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$ と $\geq 0.12 \mu\text{g/mL}$ を示した肺炎球菌は、2011 年は 62 株 (45.9%) と 73 株 (54.1%) で、2012 年は 39 株 (44.8%) と 48 株 (55.2%) であった。MIC が $\geq 0.12 \mu\text{g/mL}$ のペニシリン G 非感受性肺炎球菌の分離率には変化が認められなかった。2011 年と 2012 年に、同一血清型から 5 症

例以上、ペニシリン G 非感受性肺炎球菌が分離された血清型を図 1 にまとめた。

2011 年に見られた 5 株以上ペニシリン G 非感受性肺炎球菌が分離された血清型のうち、PCV7 に含まれる 6B、19F、23F、14 型肺炎球菌のペニシリン G 非感受性株の割合はそれぞれ 88.0% (6B)、100% (19F)、88.9% (23F)、33.3% (14) であった。PCV7 に含まれない 19A 型肺炎球菌 23 株のうちペニシリン G 非感受性肺炎球菌は 12 株であった。

2012 年に 5 株以上ペニシリン G 非感受性肺炎球菌が分離されたのは血清型 6B、19A、15A で、それぞれの血清型の分離株のうちペニシリン G 非感受性株が占める割合はそれぞれ 85.7% (6B)、65.2% (19A)、100% (15A) であった。2011 年と比べて、2012 年のペニシリン G 非感受性肺炎球菌の血清型に変化が見られ、PCV7 に含まれる血清型の減少が見られた。一方、ペニシリン G 非感受性を示す PCV7 に含まれない 19A や 15A 型による小児侵襲性感染症の増加が見られた。

メロペネムに対する感受性を調べた結果、MIC が $\geq 0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ を示した株は 2011 年は 9 株 (6.7%)、2012 年は 15 株 (17.2%) で、増加傾向にあった。また、メロペネムの MIC が $\geq 0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 肺炎球菌の血清型は、19A (12 株)、6B (2 株)、6A (2 株)、15A (2 株)、14 (1 株)、35B (1 株) であった。2012 年に分離された 1 株の肺炎球菌 (19A 型) はメロペネムの MIC が $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ を示した。この株のペニシリン G に対する MIC は $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

2 : 19A と 15A 型肺炎球菌のペニシリン G およびメロペネムに対する感受性

2012 年にペニシリン G 非感受性肺炎球菌による侵襲性感染症例 48 例のうち、15 例は 19A 型、11 例は 15A 型肺炎球菌によるものであった。

19A 型肺炎球菌のうち、MLST 解析で ST320 を示す株のペニシリン G に対する MIC は $2\text{--}4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、メロペネムに対する MIC は $0.5\text{--}1 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。他のシークエンスタイプの 19A 型肺炎球菌と比べ、 β -ラクタム剤に対する感受性が低かった (図 2)。

15A は小児に使用できる PCV7、さらに海外で導入されている PCV13 および 10 価肺炎球菌結合型ワクチン (GSK 社) にも含まれていない血清型である。2011 年に 1 株、2012 年に 11 株が分離され、増加が見られた。これら 12 株のすべてはシークエンスタイプ 63 (ST63) 型ないしその近縁のあるシークエンスタイプ (clonal complex: CC63) で、ペニシリン G に非感受性 ($0.12\text{--}2 \mu\text{g}/\text{mL}$) を示した。また、メロペネムに対する MIC は $0.03\text{--}0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、3 株はメロペネムに対する MIC は $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、低感受性を示した (図 3)。

3: β ラクタム剤耐性の評価系の構築

肺炎球菌の培養には SYG 培地を用いることで安定した培養が可能となった。遺伝子導入のためにマーカー遺伝子を挿入した DNA 断片を Two-step PCR 法で作成することで、自然形質転換能を利用して耐性遺伝子候補を導入する系を構築した (図 4)。自然形質転換は、Pozzi らの方法を用いた。

Pre-competent cell の調製は、Starting culture 菌液を、SYG 培地 5 ml に $1/100$ 希釈し、 37°C 、好気培養 (対数増殖期初期まで、 $\text{OD}_{600} \sim 0.2$) を行なった。菌液 1 ml をとり集菌後 10% glycerol を 1 ml 加えて菌体を懸濁し、50 μl ずつ小分けにして -80°C で保存した。

Competent cell への分化および形質転換は、Competence 培地 1 ml に Two-step PCR 法で増幅した DNA ($1 \mu\text{g}$) および CSP (200 ng) 加え、さらに Pre-competent cell を 50 μl 加える。 37°C 、3h、好気培養 100 μl を抗生物質入りの SYG agar にプレーティングし、 37°C にて一晚培養を行なった。Competence 培地として 10% グリセロール加 TSB に、 CaCl_2 、BSA を加えて調整する。

マーカー遺伝子に Cm カセットを用いた系で形質転換効率 ($\text{Cm}^R \text{ CFUs} / \text{Total CFUs}$) は 3.2×10^{-6} の値を得た。

D. 考察

小児用肺炎球菌ワクチンの導入により、ワクチンに含まれる 7 種のポリサッカライドを産生する肺炎球菌の侵襲性感染症は減少することが期待される。しかしながら、ワクチンに含まれない血清型の肺炎球菌による侵襲性感染症には基本的には予防効果が期待されない。そのため、肺炎球菌感染症対策においては、薬剤耐性肺炎球菌のモニタリングは必須である。同時に、肺炎球菌の薬剤耐性機構を理解しておくことは、今後の対策を考える上で重要である。

β -ラクタム剤は、肺炎球菌感染症治療に重要な位置を占めている。ペニシリン耐性肺炎球菌が出現し、その分離頻度が高まっていることが知られている。現状では、MIC の値からは肺炎や血流感染においては治療効果が期待されるが、髄膜炎治療においてはペニシリン単独の治療効果が望めない菌株分離例も存在する。

そのため、ワクチンに含まれない血清型の薬剤耐性プロファイルと、その耐性機構についてさらに詳細な検討が必要である。 β -ラクタム剤に対する耐性機構は、ペニシリン結合タンパクの変異によるものと考えられている。しかし感受性株および耐性株のペニシリン結合タンパク遺伝子の塩基配列比較から予想されるアミノ酸変異と、耐性

との関連性を指摘するにとどまっているケースが多く、その全貌が明らかではない。本研究において、肺炎球菌へ容易に遺伝し導入を行なう系を確立した。この方法を用いて臨床由来株の変異ペニシリン結合タンパク遺伝子を受感性株に導入し、耐性に与える影響を評価することが可能となった。今後、各種変異遺伝子を導入し解析を進めていく。

E. 結論

小児用肺炎球菌ワクチン導入による侵襲性肺炎球菌感染症に対応するために、ワクチンに含まれていない血清型に焦点をあてて薬剤耐性株の分離頻度、耐性機構の解明のための基礎的な情報および解析系を確立した。より詳細な解析が可能となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. J. Tanaka, N. Ishiwada, A. Wada, B. Chang, H. Hishiki, T. Kurosaki, and Y. Kohno. Incidence of childhood pneumonia and serotype and sequence-type distribution in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Japan. *Epidemiology and Infection* 140:1111-1121, 2012.

2. Masahiro Ueno, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda, Yoshiko Anahara, Akiko Ebata, Masaei

Iida, Seiko Inamura, Kahori Takahata, Yoko Suzuki, Bin Chang, Akihito Wada, Minoru Sugita, Taichiro Tanaka, Yuji Nishiwaki. Prevalence and risk factors of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 66:22-25, 2013.

3. Tomohiro Oishi, Naruhiko Ishiwada, Kousaku Matsubara, Junichiro Nishi, Bin Chang, Kazuyo Tamura, Yukihiro Akeda, Toshiaki Ihara, Moon H. Nahm, Kazunori Oishi, the Japanese IPD Study Group. Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease. *Vaccine*. 31:845- 849, 2013.

学会発表

1. 久保徳彦、岡崎友里、澤部俊之、中本貴人、村武明子、常彬、和田昭仁。脾摘の既往のない健康成人に発症した劇症型肺炎球菌敗血症の1症例。第86回日本感染症学会総会・学術講演会、長崎、2012年4月。

2. 成相昭吉、常彬。2012年。7価肺炎球菌結合型ワクチン接種普及による乳幼児下気道感染症例の上咽頭から検出された肺炎球菌株における血清型および遺伝子型の変化。第16回日本ワクチン学会学術集会。横浜、2012年11月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 ペニシリン G 非感受性を示した肺炎球菌の血清型 5株以上分離された血清型について示した

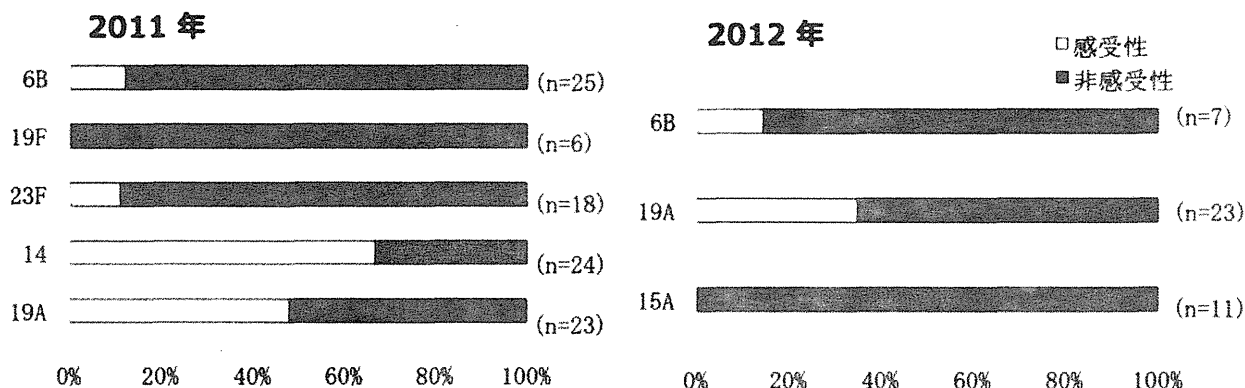


図2 血清型 19A 肺炎球菌の
PCG と MEPM に対する感受性とMLST型 (n=46)

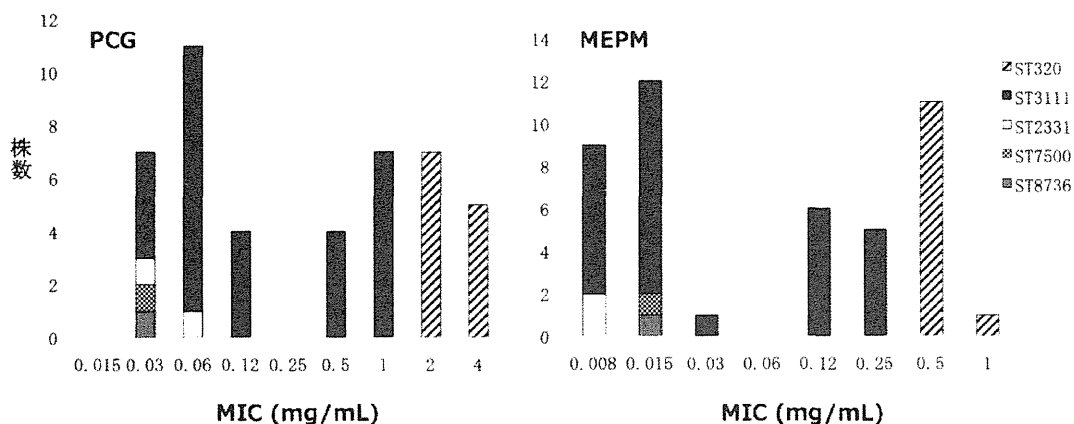


図3 血清型 15A 肺炎球菌の
PCG と MEPM に対する感受性 (n=12)

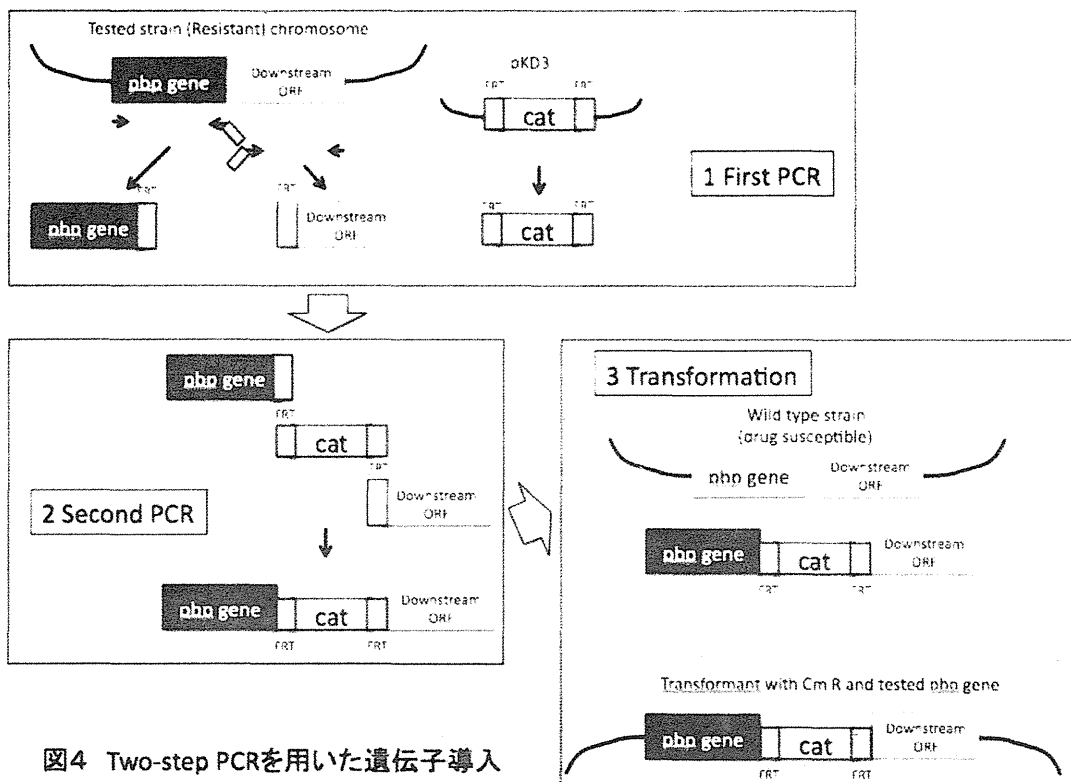
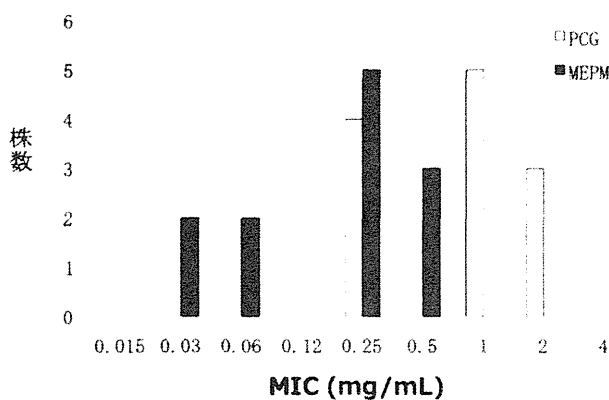


図4 Two-step PCRを用いた遺伝子導入

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 分担研究報告書

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

研究分担者 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）

研究要旨

本研究では、前回荒川班からの引き継ぎとして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ている。まず2012年に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の普及を行っている。2011年に作成した「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、全国のNICUに配布した。今年度は未熟児新生児学会感染対策・予防接種推進室と協同して、日本新生児感染対策研究会としてホームページを開設した。ここへ上記のハンドブックや、これまでの班研究による報告書を載せる。

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2011年から2012年にかけて施行したので、その結果を11月の未熟児新生児学会にて報告した。

さらに、新しい問題生起に対する検討項目として①早産児の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バチルス感染について報告する。

研究協力者

早川昌弘（名古屋大学医学部附属病院 周産母子センター/教授・副部長）

大木康史（群馬大学周産母子センター/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 周産母子センター新生児病棟/医長・助教）

堀越裕歩 ICD（東京都立小児総合医療センター 感染症科 感染管理室）

山田恭聖（愛知医科大学小児科/医長）

坂木晴世 ICN（国立病院機構西埼玉中央病院 医療安全管理室）

A. 研究目的

- 1) 全国NICU感染症データ収集に向けて準備を進め、NHSNに準拠した感染症診断基準の改訂も行う。この流れでJANISのNICUにおける感染症サーベイランス体制を改善するための方策を考える。
- 2) 「NICUにおける医療関連感染予防のためのハンドブック」を作成し全国のNICUへ配布し、新研究班ホームページからもダウンロード可能とした。
- 3) 全国総合病院の産科混合病棟と母子同室の実態を調査したので、周産期新生児医学会雑誌に掲載した。きわめて困難な産科混合病棟の解消方法に病院機能評価との連携を図るよう提言している。

4) NICU入院児における感染予防対策の検討項目として、①PICCの管理に関する全国アンケート調査、②NICU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、③2010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。

B. 研究方法

1) NICUにおける感染症の新診断基準改訂について

平成15年に作成した感染症診断基準を見直し、NHSNに準拠した新しい診断基準を作成する。NICU院内感染予防対策ガイドライン作成メンバーのメーリングリストに、両者の基準を流して、各メンバーの意見を取り入れながら3回改訂を行った。

2) 「NICUにおける医療関連感染予防のためのハンドブック」の作成と全国NICUへの配布

また、当研究グループのホームページを作成したので、ハンドブックをダウンロードできるように準備した。

3) 全国総合病院における産科混合病棟の状況について

日本周産期・新生児学会誌に投稿し掲載された。PDFとして添付する。

4) PICCの管理に関する全国アンケート調査

「末梢穿刺中心静脈カテーテルの管理に関する全国アンケート調査」として第54回未熟児新生児学会にて報告

5) 新生児集中治療室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

「新生児集中治療室 (NICU) におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 保菌・感染症に関する全国調査」として第 54 回未熟児新生児学会にて報告

6) 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

「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」として第 54 回未熟児新生児学会にて報告

7) NICU における新生児バチルス感染症についてのアンケート調査

「NICU における新生児バチルス感染症について」として第 54 回未熟児新生児学会にて報告

倫理面への配慮: 以上の研究に関しては、すべて個人情報特定されるような項目は含まれていない。

C. 研究結果

1) NICU における感染症の新診断基準改訂に付いて

新 NICU 感染症診断基準 2012 年版 これまでの感染症診断基準と大きく変わった所

血流感染を、基準 1 で血培陽性症例の敗血症

(BSI-LCBI)、基準 2 は主にカテーテル関連血流感染 (CRBSI) とした。臨床的敗血症は血培なしや血培陰性で、医師が敗血症と考えて治療すれば、診断に入れる。挿管や非挿管に関わらず肺炎を定義した。壊死性腸炎は、Bell の分類を参考として添付し、特発性腸穿孔でないことを基準に入れた。皮膚感染症に NTED と SSSS を入れた。

胃腸炎は腸炎に、中耳炎、口腔の炎症は削除した。

血流感染 (BSI)

以下の 2 つの判定基準の少なくとも 1 つを満たさなければならない。

基準 1 (BSI-LCBI)

1 回以上の血液培養から「認定された病原体」が検出される。

基準 2 (以下の 2 つをすべて満たすこと)

以下の徴候や症状を少なくとも 1 つ有している: 発熱 (直腸温で 38°C を超える)、低体温 (直腸温で 37°C 未満)、無呼吸、徐脈、末梢循環不全、元気がない

一般の皮膚汚染菌 (類ジフテリア [*Corynebacterium* 属], パシラス属 [*B. anthracis* は除く], *Propionibacterium* 属, コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 [*S. epidermidis* を含む], ビリダンス属連鎖球菌、*Aerococcus* 属、*Micrococcus* 属) が別々の機会に採取された 1 回以上の血液培養検体から培養される。

註 1、基準 1 において、「認定された病原体」とは、一般の皮膚汚染菌と考えられる微生物を含まない (皮膚汚染菌のリストは基準 2 を参照)。認定された病原体のいくつかの例として、*S. aureus*、*Enterococcus* 属、*E. coli*、*Pseudomonas* 属、*Klebsiella* 属、*Candida* 属、などがある。

臨床的敗血症 (CS)

以下の判定基準をすべて満たさなければならない

患者は他に確認された原因がなく、以下の臨床的徴候や症状を少なくとも 1 つ有している: 発熱 (直腸温で 38°C を超える)、低体温 (直腸温で 37°C 未満)、無呼吸、徐脈、末梢循環不全、元気がない

血液培養がなされていない、あるいは血液中に微生物が検出されない。

医師が敗血症に対する治療を開始する。

肺炎 (P) (挿管、非挿管をまとめました)

基準 1 の胸部レントゲン検査において 1 つ以上に該当し、かつ基準 2 の 2 つ以上に該当する場合に肺炎と診断する。

基準 1

浸潤影
 不透明像

基準 2

無呼吸 (20 秒以上) または徐脈 (80/分未満) または安静時頻脈 (150/分以上)
 新たに生じた多呼吸 (60/分を越す)
 新たに生じた呼吸困難 (陥没呼吸、鼻翼呼吸、呻吟)
 ラ音、もしくは呼吸音減弱
 人工呼吸器設定条件の上昇 (挿管時)

- 膿性の分泌物の増多や気管内吸引液より病原体を検出する
(挿管時)

髄膜炎、脳室炎(M)

以下の2つの判定基準の少なくとも1つを満たさなければならない。

基準1

- 脳脊髄液 (CSF) から微生物が培養される

基準2 (以下のすべてを満たすこと)

- 患者は他に確認された原因がなく、以下の徴候や症状を少なくとも1つ有している：発熱 (38℃を超える)、低体温 (直腸温で37℃未満)、無呼吸、徐脈、髄膜刺激徴候、痙攣、興奮性

以下のうち少なくとも1つにあてはまる

- CSF中の白血球の増加、蛋白質の上昇、かつ/またはブドウ糖減少

- CSFのグラム染色で微生物が認められる

- CSF、血液あるいは尿の抗原試験陽性 (B群レンサ球菌 (GBS)・インフルエンザ菌・髄膜炎菌など)

- 病原体に対する診断的シングル抗体価 (IgM) あるいはヘア血清でIgGが4倍以上の上昇

壊死性腸炎 (NEC)

基準1

以下の3つの判定基準のうち少なくとも2つを満たさなければならない：

- 新生児が他に確認された原因がなく、以下の症状や徴候を少なくとも2つ有している：

- 嘔吐、 腹部膨満、 ミルク投与前の胃の残渣

- 繰り返して起る潜血便や肉眼的血便

- 以下の腹部の放射線学的異常が少なくとも1つある：

- 腹腔気腫

- 腸気腫 (腸壁内ガス)

- 小腸の変化しない“硬直”輪

基準2

- 特発性腸穿孔ではない (感染が先行していないことと術中摘出病巣の病理所見を参考にする)

参考資料 実際の NEC 所見は Bell の Stage 分類における 2-A 以上であることが多い。

動 (静) 脈炎 (V)

以下の判定基準の少なくとも1つを満たさなければならない：

基準1 (以下の3つをすべて満たすこと)

- 他に確認された原因がなく以下の徴候や症状を少なくとも1つ有している：発熱 (直腸温で38℃を超える)、低体温 (直腸温で37℃未満)、無呼吸、徐脈、嗜眠、疼痛、紅斑、該当する血管部位の熱感。

- 血管内のカニューレ先端の培養が陽性。

- 血液培養が未施行か、または血液から微生物が培養されない。

基準2 (以下の2つを両方とも満たすこと)

- 該当する血管の部位から排膿がある。

- 血液培養が未施行か、または血液から微生物が培養されない。

➤ 血液から微生物が培養された血管内感染は、

BSI-LCBI とし、血流感染に入れる。

皮膚感染症 (SK)

以下の判定基準の少なくとも1つを満たさなければならない。

NTED と SSSS は皮膚感染症に入れる。

基準1

- 化膿性排液、膿疱、せつがみとめられる

基準2

他に確認された原因がなく、以下の徴候や症状が少なくとも2つある。：

- 疼痛か圧痛、 限局性の腫脹、 発赤、 熱感

さらに、以下の少なくとも1つにあてはまる

- 患部からの吸引物や排液より微生物が培養される。しかし、その微生物が正常常在細菌叢である場合は、純培養でなければならない。

- 血液から微生物が培養される。

- 感染組織や血液による検査で抗原陽性 (例えば、単純ヘルペス、带状疱疹、インフルエンザ菌、髄膜炎菌)

- 患部組織の顕微鏡検査で多核巨大細胞がみとめられる。

- 病原体に対して、シングル血清でIgMが高値を示すか、またはヘア血清でIgGが4倍以上上昇する。

基準3

新生児トキシックショック症候群様発疹症 (NTED)

全身に及ぶ発疹 (通常径2-3mmで始まり融合傾向のある紅斑、突発性発疹様) で原因が明らかな他の疾患を除き、*黄色ブドウ球菌 (MRSAが多い) が鼻腔や体表から分離された場合で、基準の