

MRSA: 市中感染型の代表としてUSA300株 1株、POT法でPOT1値が106である株の4株、院内感染型の代表としてPOT1値が93である株 4株をそれぞれオムニログにて解析した。M. abscessus sp.: 当センターで得られた臨床分離株5株を国立感染症研究所ハンセン氏病研究センター星野仁彦先生に分離同定してもらったM. abscessus 3株、M. massiliense 2株をオムニログにて解析した。市中感染株は、院内感染株に対して亜硝酸ナトリウム、ならびに安息香酸ナトリウムに対して抵抗性があることが明らかとなった。また、M. abscessusは、M. massilienseに対してNaClやエチレングリコールに対する濃度抵抗性がある事が判明した。

我々の研究にて化粧品等の防腐剤として使用される亜硝酸ナトリウム、ならびに安息香酸ナトリウムに抵抗性があることより外用剤に使用される亜硝酸ナトリウム、ならびに安息香酸ナトリウムの使用が市中感染型MRSAのリスクと関連する可能性が明らかとなった。さらに今回の研究によりSmall Genomic Islandの有無で判定するPOT表現法が細菌の機能と相関している可能性が示唆され、こんごPOT表記と表現系の関係が明らかになる可能性がある。また、M. abscessus sp.はそのシークエンス上、M. abscessus, M. massiliense, M. bollettiiと3つに分類できるがその意義が不明であった。我々の研究からNaClやエチレングリコールに対する濃度抵抗性に差異が認められた事より臨床的にも特徴の差異が認められる可能性が明らかとなった。

倫理面への配慮 検体の扱いには個人情報が入り込まないように配慮した。

C. 研究結果

市中感染株は、院内感染株に対して亜硝酸ナトリウム、ならびに安息香酸ナトリウムに対して抵抗性があることが明らかとなった。また、M. abscessusは、M. massilienseに対してNaClやエチレングリコールに対する濃度抵抗性がある事が判明した。

D. 考察

市中感染株は、院内感染株に対して亜硝酸ナトリウム、ならびに安息香酸ナトリウムに対して抵抗性があることが明らかとなった。また、M.

abscessusは、M. massilienseに対してNaClやエチレングリコールに対する濃度抵抗性がある事が判明した。

E. 結論

市中感染株は、院内感染株に対して亜硝酸ナトリウム、ならびに安息香酸ナトリウムに対して抵抗性があることが明らかとなった。また、M. abscessusは、M. massilienseに対してNaClやエチレングリコールに対する濃度抵抗性がある事が判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

松本智成, 尾形英雄, 豊田恵美子, 鈴木克洋, 斎藤武文, 藤田 明, 末竹寿紀, 近松絹代, 水野和重, 御手洗聡 ラインプローブ法による抗酸菌同定および結核菌薬剤感受性「結核」in press

2. 学会発表

1) 松本智成, 平山 幸雄, 白山 敬之, 岡藤 浩平, 板東 千昌, 久光 由香, 福村 恵, 平田 明美, 田中 久美, 黒川 雅史, 田村 嘉孝, 永井 崇之, 太田 三徳, 川瀬 一郎

「当センター同一職員 120 名検体における QFT2G と 3G の比較」第 87 回実験結核研究会 広島国際会議場・広島 2012/5/9(2)

2) 松本智成「当センター職員同一血液検体における QFT2G と 3G との比較試験、および 5 年前の QFT2G 結果との比較検討」第 2 回結核診断研究会 広島国際会議場・広島 2012/5/9

3) 黒川 雅史, 田村 嘉孝, 韓 由紀, 松本智成, 永井 崇之, 川瀬 一郎「当院における結核菌薬剤耐性率の推移について」第 87 回日本結核病学会総会 広島国際会議場・広島 2012/5/10

4) 松本智成「結核合併関節リウマチ患者 12 名に対する抗 TNF 製剤投与の安全性と有効性: 続報」第 87 回日本結核病学会総会 広島国際会議場・広島 2012/5/10

5) 永井 崇之、黒川 雅史、田村 嘉孝、韓 由
紀、松本 智成、川瀬 一郎「当院における多
剤耐性肺結核 89 例の治療成績」 第 87 回日
本結核病学会総会 広島国際会議場・広島
2012/5/11

(発表誌名、巻号、頁、年も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

フルオロキノロン耐性に関する研究

研究分担者 山根 一和（川崎医科大学・公衆衛生学・講師）

（研究要旨）

フルオロキノロン耐性の多くはフルオロキノロンの標的タンパクである DNA ジャイレースやトポイソメラーゼ遺伝子の変異によるアミノ酸変異であるが、1990 年代後半から、プラスミド上にフルオロキノロン耐性機構が存在することが明らかになった。本研究によって、4 種類存在するプラスミド性フルオロキノロン耐性機構のうち、*qepA* について LAMP 法による検出系を構築した。構築した検出系は理論上 5 コピー *qepA* が存在すれば、検出が可能であった。また、PCR 法によってプラスミド性フルオロキノロン耐性機構の遺伝子型が明らかとなっている臨床分離株を用いて、LAMP 法を行ったところ、*qepA* を保持する臨床菌株のみ陽性となった。この結果から、本研究で構築した検出系は PCR 法と同等の感度および特異度を有していると考えられた。LAMP 法は特別な実験機器が無くても実施可能なので、一般の医療機関でも *qepA* を検出することができる検査法を開発できたと考えられた。

A. 研究目的

フルオロキノロン系抗菌薬は様々な感染症の治療に用いられている。フルオロキノロン耐性の多くはフルオロキノロンの標的タンパクである DNA ジャイレースやトポイソメラーゼ遺伝子の変異によるアミノ酸変異である。しかし、1990 年代後半から、プラスミド上にフルオロキノロン耐性機構が存在することが明らかになった。現在 4 種類の耐性機構（*Qnr*、*AAC(6')Ib-cr*、*QepA*、*OqxAB*）が存在することが明らかになっている。プラスミド性の耐性機構は標的タンパクのアミノ酸変異と比較して最小発育阻止濃度の変化が小さく、標的タンパクのアミノ酸変異による耐性を保持する菌株では薬剤感受性検査だけでは検出が難しい。また、プラスミド性フルオロキノロン耐性遺伝子は多剤耐性プラスミド上にコードされていることが多いため、主に分子生物学的方法を用いた検出法の開発が進められている。本研究では、特別な機器を使用しない、LAMP 法を用いたプラスミド性フルオロキノロン耐性遺伝子の検出系の開発を目的とする。

B. 研究方法

本年度は、プラスミド性フルオロキノロン耐性の中で、*qepA* の検出系を構築することを試みた。*qepA* の全長を対象とし、LAMP プライマーの設計を行った。プライマーの設計には **Primer Explorer software, version 3** (<https://primerexplorer.jp/lamp3.0.0/index.html>) を利用した。鋳型 DNA には *qepA* をクローニングした pSTV*qepA* を用いた。LAMP 反応は **Loopamp DNA amplification kit**（栄研化学）を、増幅反応は、**LA-320C**（栄研化学）を用いた。反応後の反応液を 2% アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロミドで染色し、反応産物の確認を行った。また、プライマーの性能評価のために、*qepA* を 500 コピーから 10 倍ずつ希釈し、検出限界を調べた。

設計したプライマーによる LAMP 法の感度および特異度を、PCR 法でプラスミド性フルオロキノロン耐性機構の保有が確認された臨床分離株（*qepA* 陽性株 4 株、*qnrA* type 陽性株 4 株、*qnrB* type 陽性株 6 株、*qnrS* type 陽性株 3 株、*aac(6')Ib-cr* 陽性株 4 株）を用いて評価した。

<倫理面への配慮>

本研究はヒトゲノムを扱わない。また使用するデータに個人情報に含まれない。

C. 研究結果

3種類のプライマーを設計し、すべてのプライマーで *qepA* を検出できることを確認した。この中で、もっとも反応時間が短かったプライマーセットを採用した(表1)。このプライマーセットの検出限界は5コピーであることが明らかになった。臨床分離株のうち、*qepA* 陽性株はすべて LAMP法で陽性と判定されたが、その他のプラスミド性フルオロキノロン耐性機構を有する菌株はすべて陰性であった(表2)。

D. 考察

本研究でプラスミド性フルオロキノロン耐性遺伝子の1種である、*qepA* を検出する LAMP法のプライマーを設計した。プラスミド性フルオロキノロン耐性遺伝子の検出は従来では PCR法や real-time PCR法による方法を開発されていたが、これらの方法は専用の機器が必要であるため、一般の医療機関への導入が困難であった。今回の検討では、設計した LAMPプライマーは PCR法でプラスミド性フルオロキノロン耐性遺伝子の同定がなされた臨床分離株のうち、*qepA* のみ陽性と判定することができたことから、PCR法と同程度の感度および特異度を有していると考えられる。LAMP法は特別な機器が無くとも実施できる方法であることから、本研究で設計したプライマーによって、一般の医療機関でも *qepA* を保有するかどうかを確認することが可能になると考えられる。

今回設計したプライマーによる LAMP法では、理論上 *qepA* が5コピーあれば検出できることが明らかとなった。臨床検体に含まれる遺伝子の数は少数であるが、検出限界は低いため、臨床検体から直接検出することができると考えられる。今後検討する必要がある。

プラスミド性フルオロキノロン耐性機構は *qepA* 以外にも3種類知られており、*qnr* には *qnrA, B, S, C, D* など多くの variant が存在する。遺伝子の塩基変異部位を比較して、LAMP法による検出系の構築が可能であるか検討する必要がある。

E. 結論

プラスミド性フルオロキノロン耐性遺伝子の1種である、*qepA* を LAMP法で検出するためのプライマーを設計し、検出する系を構築した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

K. Yamane, A. Horino, S. Suzuki, J. Wachino, M. Matsui, Y. Arakawa. New LAMP method for simple screening of plasmid-mediated quinolone resistance genes, *qepA*. 52rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

表1 本研究で設計されたプライマー

プライマー	配列
F3	5'-TGCCGTGCCTGGTCTAC-3'
B3	5'-AGGCGAATGCGAAGAACG-3'
FIP	5'-GAGAAGCTGGGCGCTGGAGGGGACCTCACGGTGCTGAAC-3'
BIP	5'-CGTCGCCGGCTTCCTGATCCGCGCCGATCAACAAC-3'
LF	5'-TTCACGGCTGAGCACCG-3'

表2 PCR法で確認された臨床分離株の遺伝子型とLAMP法の結果の比較

遺伝子型*	菌株名	結果
<i>qepA</i>	<i>Escherichia coli</i> C316	+
	<i>Escherichia coli</i> MRY04-1060	+
	<i>Escherichia coli</i> MRY07-551	+
	<i>Escherichia coli</i> MRY06-100	+
<i>qnrA</i> type	<i>Enterobacter cloacae</i> MRY04-769	-
	<i>Enterobacter cloacae</i> MRY04-1155	-
	<i>Escherichia coli</i> ARS66	-
	<i>Klebsiella oxytoca</i> MRY04-725	-
<i>qnrB</i> type	<i>Enterobacter cloacae</i> MRY04-269	-
	<i>Enterobacter cloacae</i> MRY04-634	-
	<i>Escherichia coli</i> MRY17-739, EE36	-
	<i>Escherichia coli</i> EE36	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> MRY05-548	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> MRY05-478	-
<i>qnrS</i> type	<i>Enterobacter cloacae</i> MRY04-1272	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCB03-81, MRY05-2	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> MRY05-2	-
<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>Escherichia coli</i> MRY05-244	-
	<i>Escherichia coli</i> MRY07-128	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> MRY05-512	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> MRY09-945	-

中小規模医療機関のサーベイランスに関する研究

研究分担者 山根 一和（川崎医科大学・公衆衛生学・講師）

（研究要旨）

200床以上の医療機関を対象とした厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）に準ずる中小規模医療機関を対象としたサーベイランス体制を構築するために、岡山県下の8医療機関を対象に院内感染対策の体制、微生物検査の体制、院内感染対策に関するサーベイランス実施体制、各医療機関で実施している手術の内容について聞き取り調査を行った。JANISが施行している5部門のうち、集中治療室部門と新生児集中治療室部門については該当する部署が無いため、実施は不可能であるが、残りの検査部門、全入院患者部門、手術部位感染症部門については、導入が可能であると思われた。但し、サーベイランスデータの質を担保するために、参加医療機関の条件、新たな判定基準の作成、提出用データを作成するシステムの導入等が必要である。今後、本聞き取り調査の結果をもとに、アンケートを作成し、全国の中小規模医療機関の現状、ニーズ等を調査する必要がある。

A. 研究目的

平成24年度診療報酬改定により、感染防止対策加算が患者入院初日に新設された。この施設条件の中に、地域や全国のサーベイランスに参加していることが望まれ、薬剤耐性菌等のサーベイランスを行い、現状を把握することが求められている。全国レベルの薬剤耐性菌サーベイランスとして厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）がある。しかしJANISは200床以上の医療機関を対象とすることから、中小規模医療機関がJANISに参加することは難しい。一方で、薬剤耐性菌による院内感染は大規模医療機関のみならず、中小規模医療機関でも発生している。また、中小医療機関と大規模病院の患者の移動に伴って薬剤耐性菌の移動も頻繁に起こっているものと推定される。このような現状から、大規模医療機関と同様に中小規模医療機関においても、全国規模の薬剤耐性菌に関するサーベイランスシステムの構築が必要と考えられる。

本研究では、中小医療機関の感染対策の現状を把握し、JANISに準ずる中小規模医療機関を対象としたサーベイランスシステムを構築すること

を目的とする。

B. 研究方法

岡山県下の8医療機関を対象に医療機関を訪問し、院内感染対策の体制、微生物検査の体制、院内感染対策に関するサーベイランス実施体制、各医療機関で実施している手術の内容について聞き取り調査（表1）を行った。

<倫理面への配慮>

本研究はヒトゲノムを扱わない。また使用するデータに個人情報に含まれない。

C. 研究結果

聞き取り調査を行った医療機関の概要を表2に示す。病床数は中央値141.5床、平均値128.1床（60～183床）であった。8医療機関のうち、6医療機関は一般病床と療養病床またはリハビリテーション病床を併設しており、療養病床のみは1医療機関のみであった。ほとんどの医療機関は周辺地域の医療の中心を担う医療機関で、急性期医療のみならず、慢性期に移行した患者のケアも

担当している。

院内感染対策を実施する体制としては、Infection control team (ICT) の構成人数は平均 8.9 人で職種では看護師の人数が多く、1 人だけの医療機関もあるが、各部署から 1 人ずつ選出されている医療機関も多かった。院内感染対策のための病棟ラウンドを 4 医療機関 (①②④⑤) は週に 1 回、2 医療機関 (③⑥) は月に 1 回行っており、行っていない医療機関は 2 つ (⑦⑧) だった。院内感染対策のためのサーベイランスは 4 医療機関 (①②④⑥) で行われており、薬剤耐性菌に関するサーベイランスが 3 医療機関 (①④⑥)、手術部位感染症 (SSI) サーベイランス (④) と消毒剤の使用量のモニタリング (②) を行っている医療機関がそれぞれ 1 つあった (表 3)。

微生物検査体制は、6 医療機関 (①②③⑤⑥⑧) は外部業者に業務委託をしており、1 医療機関 (⑦) は一部の検査 (主に薬剤感受性検査) を外部業者に委託していた。自施設で微生物検査を実施している医療機関は 1 医療機関 (④) のみであった。薬剤耐性菌を保菌しているか否かを明らかにするためのスクリーニング検査は 4 医療機関 (①②④⑥) で行われており、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) のスクリーニング検査およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌のスクリーニング検査がそれぞれ 1 医療機関で、残りの 2 医療機関は薬剤耐性菌全般を対象にスクリーニング検査を実施していた。対象はいずれの医療機関も、他の医療機関や老人保健施設などからの転院患者であったが、VRE のスクリーニングは入院中の患者も対象になっていた。スクリーニングに用いられる検体は呼吸器系、尿、便などが主であった。感染症の診断のために採取された検体についても、呼吸器系、尿が比較的多く採取されており、血液や髄液の占める割合は小さかった (表 4)。

各医療機関の手術実施状況は、③以外の医療機関で実施されていた。手術手技の多くは骨折の観血的整復術であり、次いで前立腺などの泌尿器系の手術が実施されていた。脳神経系の手術は実施されておらず、心臓血管系は人工透析のためのシャント作成術のみが行われていた。腹部臓器の手術については、2 医療機関 (④⑤) で実施されており、合計 6 件のみで手術部位はまちまちであった。

D. 考察

本研究による聞き取り調査で、岡山県下の中小規模医療機関の院内感染対策の実施体制、微生物検査の実施体制、手術実施体制を明らかにすることができた。

JANIS ではサーベイランスは 5 つの部門に分かれているが、集中治療室部門と新生児集中治療室部門については該当する部署が無いため、実施することができない。SSI 部門については個々の医療機関における手術について、骨折の観血的整復術以外はサーベイランスに耐えうる十分な手術件数がなされていなかった。しかし一方で有床診療所レベルでも、特定の手術に特化して実施している医療機関も存在する。SSI 部門については、医療機関の病床規模ではなく、一定期間の手術実施件数をもとに参加医療機関を選定するほうが良いと思われる。

検査部門は検査部門独自のデータ提出用フォーマットに各医療機関で実施した微生物検査結果を変換する必要があり、多くの場合、個々の医療機関で初期投資が必要となる。中小規模医療機関は外部業者に業務を委託していることがほとんどであるため、各医療機関でデータ提出のためのシステムを構築するよりも、外部業者で提出用に変換されたデータを作成し、それを各医療機関が提出する方法が導入できれば、多くの医療機関のデータを収集できると思われる。聞き取り調査明らかになったこととして、中小医療機関においても薬剤耐性菌による院内感染の重大性が理解されており、積極的なスクリーニング検査を行っている医療機関が少なくないということである。全国規模のサーベイランスシステムが構築できたとしても、中小医療機関の本当のニーズは全国データと自施設データの比較ではなく、自分の医療機関が所属する医療圏における薬剤耐性菌の種類や分離頻度である可能性が高い。さらに、薬剤耐性菌の分離率を把握するには、十分量の培養検体が採取されている必要がある。療養病床においては、医療費が包括化されており、急性期病床や大規模医療機関と比較して採取される培養検体が少ない。これは薬剤耐性菌の保菌状況を過小評価してしまう危険性がある。これらの点については、今後本研究で検討し、中小医療機関に有用な情報を還元できるサーベイランスシステムの

ひな形を作成する必要がある。

全入院患者部門については、感染症が疑われる患者に対して適切な培養検査が行われていれば、比較的容易に導入することは可能と思われる。サーベイランスデータの質を担保するために、感染症か否かを判定する医師は、主治医以外のサーベイランス担当医、感染症専門医（あるいは感染制御チーム等）である必要があるが、中小医療機関には必ずしも感染症を専門とする医師がいないため、中小医療機関の現状に即し、かつサーベイランスの質を担保できる診断基準を検討する必要がある。

E. 結論

参加医療機関の負担を軽減し院内感染対策に資する情報を還元するためにどのようなニーズが中小規模医療機関にあるか、今年度岡山県下で実施した聞き取り調査の結果をもとに、全国の中規模医療機関を対象とした調査を行う必要がある。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

表1 医療機関に対し行った聞き取り調査の質問項目

項目	内容
病院の概要	<ul style="list-style-type: none"> ・ 病床数 ・ 病床の種類（一般病床、療養病床など） ・ 平均在院日数
院内感染対策の実施体制	<ul style="list-style-type: none"> ・ 対策に携わる人数と職種 ・ 院内感染対策のための院内ラウンドの頻度
微生物検査の体制	<ul style="list-style-type: none"> ・ 検査を院内で行っているか？ ・ 2012年10月の微生物検査件数 ・ 薬剤耐性菌のスクリーニング検査実施状況 ・ 薬剤耐性菌のスクリーニング検査の対象となる患者の条件 ・ 薬剤耐性菌のスクリーニング検査の対象となる検体
院内感染対策サーベイランス	<ul style="list-style-type: none"> ・ 実施の有無 ・ サーベイランスの種類
手術の実施状況	<ul style="list-style-type: none"> ・ 2012年10月の手術件数と手術の種類

表2 聞き取り調査実施医療機関の概要

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
病床数	183	150	86	136	147	148	115	60
病床の種類	一般+療養	一般 + リハビリ	療養	一般+療養	一般+療養	一般+療養	一般+療養	一般+療養
平均在院日数	16日 (一般)	18日 (一般) 98日 (障害者)	不明	20日	17日 (一般) 207日 (療養)	14日	11日	15日 (一般) 35日 (療養)

表3 院内感染対策の実施体制と院内感染対策サーベイランスの実施状況

		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
ICTのメンバー (人数)	医師	1	1	1	1	2	2	1	1
	看護師	3	1	5	7	7	5	5	1
	薬剤師	1	1	1	1	1	1	1	0
	検査技師	1	1	1	1	1	1	1	1
	その他の職種	0	0	1	0	5	2	3	1
	計	6	4	9	10	16	11	11	4
ICTラウンド	頻度	週1回	週1回	月1回	週1回	週1回	月1回	なし	なし
院内感染対策サーベイランスの実施		薬剤耐性菌	消毒剤の 使用量	なし	SSI* 薬剤耐性菌	なし	薬剤耐性菌	なし	なし

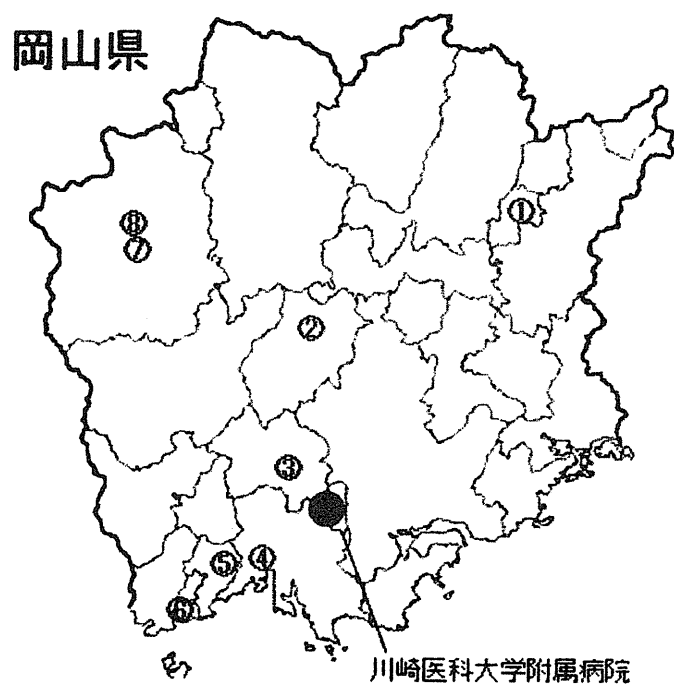
*手術部位感染症

表4 微生物検査の体制と検体採取状況

		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
微生物検査の外部業者への委託		あり	あり	あり	なし	あり	あり	なし	あり
薬剤耐性菌スクリーニング	スクリーニングの実施	あり	あり	なし	あり	なし	あり	なし	なし
	対象患者	転院患者 全入院患者	転入患者		転入患者		転院患者		
	対象検体	便	尿		鼻腔 喀痰 そけい部		喀痰		便
検体採取状況*	呼吸器系	26	9	4	74	11	152	7	3
	尿	21	50	0	20	27	122	5	1
	血液	11	1	0	5	7	35	3	1
	便	203	6	3	13	4	36	2	1
	髄液	0	0	0	1	0	0	0	0
	その他	5	15	2	33	25	26	9	5
	計	266	81	9	146	74	371	26	11

*2012年10月の採取状況

図1 聞き取り調査を行った医療機関



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）
分担研究報告書

肺炎球菌のケトライド耐性機構ならびに耐性伝搬機構に関する研究

研究分担者 山本 友子 （千葉大学・大学院薬学研究院・教授）
研究協力者 高屋 明子 （千葉大学・大学院薬学研究院・准教授）
佐藤 慶治 （千葉大学・大学院薬学研究院・助教）

研究要旨

本研究では、国内の肺炎球菌のケトライド耐性化の現況、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テリスロマイシン（ケトライド系抗菌薬）耐性に関する多面的な研究を行い、テリスロマイシン耐性菌がわずかながら出現していることを明らかにした。耐性機構に関する分子遺伝学的解析を行い、テリスロマイシン耐性の主要因は高発現 *ermB* 遺伝子の獲得であることを明らかにした。又、実験室分離のテリスロマイシン高度耐性菌の耐性機構を検討し、新型のテリスロマイシン耐性機構を明らかにした。本研究は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。

A. 研究目的

呼吸器感染症の主要な起因菌である肺炎球菌の多剤耐性化が進行し、なかでも繁用されるマクロライド系抗菌薬に対する高度耐性化が深刻な問題となっている。Telithromycin (TEL) はマクロライド高度耐性菌にも有効なケトライド系抗菌薬で、マクロライド耐性肺炎球菌性肺炎の治療に使用されてきたが、既に欧米ではTEL低感受性肺炎球菌の増加と高度耐性菌が報告されている。わが国においても、耐性菌の出現と増加が懸念されることから、それを防止する為に調査と監視を継続しつつ、さらに実効ある対策を講じる事が急務となっている。本研究では、肺炎球菌のTEL耐性化の現況を明らかにし、耐性機構と耐性因子の伝播機構の解明をめざす。

B. 研究方法

- MIC (最小発育阻止濃度)についてはCLSI法に準じて測定した。培地は血液寒天培地（ミューラーヒントン寒天培地+5%馬脱繊維血）を用い、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。
- 薬剤：TELは、ケテック錠（サノフィ・アベンティス）から抽出後、再結晶化した。構造はC-13NMRにより確認し、力価は、ATCC29213株を用いてMIC測定とディスク

ク拡散法によって評価した。その他の薬剤は市販のものを用いた。

3. PCR, DNA塩基配列決定は定法に従った。

4 Primer extension法によるrRNAメチル化の検討は、我々の確立した方法を用いた（Antimicrob. Agents Chemother.投稿中）

倫理面への配慮

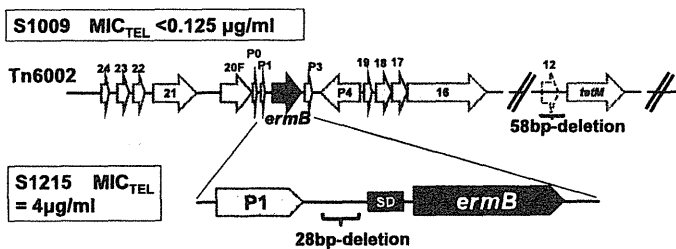
本研究で得られる菌株は、分離した医療機関において、連結可能匿名化することにより、研究者に患者の特定ができないよう配慮した。また、研究成果の発表にあたっては、患者の氏名などは一切公表しないこととする。

C. 研究結果

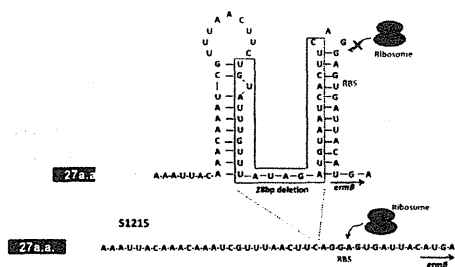
(1) 2009年~2010年に全国の医療機関で分離された500株の肺炎球菌からTEL耐性菌1株(MIC=4μg/ml)、中等度耐性菌2株(MIC=2μg/ml)、低感受性株17株(MIC=1μg/ml)が検出された。耐性菌S1215の耐性の原因は*ermB*遺伝子をコードするTn6002の獲得であった。従来から報告されてきたように、構成的に発現する*ermB*遺伝子を獲得した肺炎球菌はマクロライド高度耐性を示すがTELには感受性である。S1215

の *ermB* 遺伝子構造を詳細に検討した結果、*ermB* 遺伝子の SD 配列の上流に 28bp の欠失が見つかった。この欠失で SD が露出したことによりリボソームが結合しやすくなり、*ermB* 遺伝子の超高発現をもたらしたと考えられた。23S rRNA 2058A のメチル化のレベルを測定してこの仮説を実証することができた。

TEL耐性菌S1215 と低感受性菌S1009の保有する*ermB*遺伝子



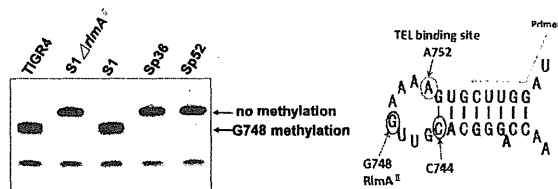
TEL耐性菌S1215 の保有する*ermB*遺伝子構造



(2) 臨床由来の TEL 低感受性株より実験室において高度耐性菌 Sp36 (MIC_{TEL}=32 µg/ml) を分離し、耐性機構を検討した。次世代シーケンス解析により全ゲノム配列の比較検討を行った結果、肺炎球菌のケトライドの耐性菌では *rlmAII* (23S rRNA G748 メチル化酵素遺伝子) に変異が起きていることを見出した。分離したすべての TEL 耐性菌で *rlmAII* の変異を確認した。*rlmAII* ターゲティングによる欠失株もまた TEL 耐性を示した。さらに 2002 年にアルゼンチンで臨床より分離された TEL 高度耐性菌 M4243 (MIC_{TEL}=256 µg/ml) においても *rlmAII* に変異を見出した。*RlmAII* による G748 のメチル化は TEL の A752 への結合を強めた。以上の研究結果より、*RlmAII* は TEL の強い抗肺炎球

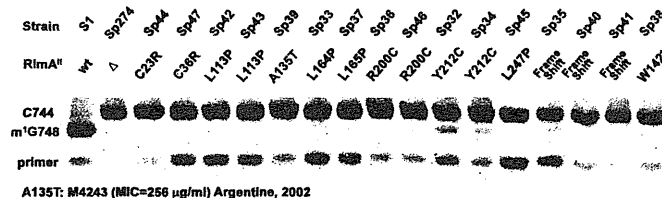
菌活性の原因であり、*RlmAII* の変異がケトライド耐性をもたらすと結論することができる。

***RlmAII* メチル化活性とTEL耐性**



MIC _{TEL} (µg/mL)					
S1	2	Sp36	32	Sp52	>512
S1Δ <i>rlmAII</i>	16	Sp36Δ <i>rlmAII</i>	32	Sp52Δ <i>rlmAII</i>	>512

TEL耐性菌の*RlmAII*変異とメチル化活性



D. 考察

先行の 2005~2008 年分離菌 339 株の調査では、低感受性菌が 11 株検出されたものの耐性菌は分離されなかった。今年度の研究成果は、国内で肺炎球菌の TEL 耐性化が少ないながら進行していることを示している。*ermB* 遺伝子の高発現により TEL 耐性化がもたらされること、*ermB* の獲得に *RlmAII* の変異が加わることにより肺炎球菌は TEL 高度耐性化すると考えられる。

E. 結論

国内で肺炎球菌の TEL 耐性化が少ないながら進行している。*ermB* 遺伝子の高発現により TEL 耐性化がもたらされた。外来性遺伝子 *ermB* の獲得にゲノム上 *rlmAII* の変異が加わることにより肺炎球菌は TEL 高度耐性化した。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takaya, A., Sato, Y., Shoji, T., Sone, K., Yamamoto, T. Methylation of 23S rRNA nucleotide G748 by RlmA^{II} methyltransferase renders *Streptococcus pneumoniae* telithromycin-susceptible. Antimicrob. Agents Chemoter

2. 学会発表

- 1) 高屋明子・佐藤慶治・山本友子 肺炎球菌におけるテリスロマイシン作用機構 第85回日本細菌学会総会 長崎 日細菌誌 67(1): 135, 2012
- 2) 柴田智久・高屋明子・佐藤慶治・山本友子 臨床分離肺炎球菌のテリスロマイシン耐性機構 第85回日本細菌学会総会 長崎 日細菌誌 67(1): 138, 2012.
- 3) 高屋明子・庄司竜麻・佐藤慶治・山本友子 肺炎球菌のリボゾームメチル化とマクロライド・ケトライド耐性 第41回薬剤耐性菌研究会 下呂 2012.
- 4) A. Takaya, Y. Sato, T. Shoji, K. Nagamatsu and T. Yamamoto. Inactivation of RlmA^{II} confers the telithromycin-resistance to *Streptococcus pneumoniae*. 2nd International Conference on Antimicrobial Research. Lisbon. 2012.
- 5) 庄司竜麻・高屋明子・佐藤慶治・山本友子 RlmA^{II} 不活化による肺炎球菌のテリスロマイシン耐性化機構 第85回日本細菌学会総会 千葉 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Rimbara E, Mori S, Matsui M, Suzuki S, Wachino J, Kawamura Y, Shen Z, Fox JG, <u>Shibayama K</u>	Molecular epidemiologic analysis and antimicrobial resistance of <i>Helicobacter cinaedi</i> isolated from seven hospitals in Japan.	J Clin Microbiol.	50(8)	2553-60	2012
Suzuki S, Matsui M, Suzuki M, Sugita A, Kosuge Y, Kodama N, Ichise Y, <u>Shibayama K.</u>	Detection of Tripoli metallo- β -lactamase 2 (TMB-2), a variant of blaTMB-1, in clinical isolates of <i>Acinetobacter</i> spp. in Japan.	J Antimicrob Chemother.	In press		2013
Wachino J, Yamaguchi Y, Mori S, Kurosaki H, Arakawa Y, Shibayama K.	Structural Insights into the Subclass B3 Metallo- β -Lactamase SMB-1 and the Mode of Inhibition by the Common Metallo- β -Lactamase Inhibitor Mercaptoacetate.	Antimicrob Agents Chemother.	57(1)	101-109	2013
Kimura K, Nagano N, Nagano Y, Suzuki S, Wachino J, Shibayama K, Arakawa Y.	High frequency of fluoroquinolone- and macrolide-resistant streptococci among clinically isolated group B streptococci with reduced penicillin susceptibility.	J Antimicrob Chemother	In press	In press	2013

Kimura K, Nagano N, Nagano Y, Wachino JI, Shibayama K, Arakawa Y.	Ability of the VITEK(R) 2 system to detect group B streptococci with reduced penicillin susceptibility (PRGBS).	J Antimicrob Chemother	In press	In press	2013
Nagano N, Endoh Y, Nagano Y, Toyama M Matsui M, Shibayama K, Arakawa Y	First Report of OXA-48 Carbapenemase-Producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Escherichia coli</i> in Japan from a Patient Returned from Southeast Asia	Jpn. J. Infect. Dis.	66	79-81	2013
K. Kimura, Y. Nishiyama, S. Shimizu, J. Wachino, M. Matsui, S. Suzuki, K. Yamane, K. Shibayama, Y. Arakawa	Screening for Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility (PRGBS) in Clinical Isolates Obtained between 1977 and 2005	Jpn. J. Infect. Dis.	In press	In press	2013
K. Kimura, K. Matsubara, G. Yamamoto, K. Shibayama, Y. Arakawa	Active Screening of Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility and Altered Serotype Distribution, Isolated from Pregnant Women in Kobe, Japan	Jpn. J. Infect. Dis.	In press	In press	2013
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 I.	J Antimicrob Chemother	67	849-856	2012

Wachino J, Arakawa Y.	Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update	ELSEVIER	15	133-148	2012
Matsushima A, Takakura S, Yamamoto M, Matsumura Y, Shirano M, Nagao M, Ito Y, Iinuma Y, Shimizu T, Fujita N	Regional spread and control of vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> in Kyoto, Japan.	Eur J Clin Microbiol Infect Dis.	31	1095-1100	2012
Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimajima M, Kirikae T	Novel 6'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase, AAC(6')-Iaj, from a clinical isolate of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Antimicrob Agents Chemother	57 (1)	96-100	2013
Hamada Y, Watanabe K, Tada T, Mezaki K, Takeuchi S, Shimizu T, Kirikae T, Ohmagari N, Kirikae T.	Erratum to: Three cases of IMP-type metallo- β -lactamase-producing <i>Enterobacter cloacae</i> bloodstream infection in Japan.	J Infect Chemother			In press
Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Tanaka M, Tanaka M, Narahara K, Shimajima M, Kitao T, Shimada K, Kirikae T.	Development of an immunochromatographic assay for rapid detection of AAC(6')-Ib-producing <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	J of Microbiol. Methods.	91	114-116	2012

Kitao T, Tada T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Shimada K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T.	Emergence of a novel multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain producing IMP-type metallo- β -lactamases and AAC(6')-Iae in Japan.	Int J Antimicrob Agents	39(6)	518-521	2012
Nomura T, <u>Tanimoto K</u> , Shibayama K, Arakawa Y, Fujimoto S, Ike Y, Tomita H.	Identification of VanN-type vancomycin resistance in an <i>Enterococcus faecium</i> isolate from chicken meat in Japan.	Antibicrobial Agents Chemotherapy.	56(12)	6389-6392	2012
Inamasu, T. Sudo, K. Kato, S. Deguchi, H. Ichikawa, M. Shimizu, T. Maeda, T. Fujimoto, S. Takebayashi, T. Saito, T.	Pandemic influenza virus surveillance, izu-oshima island, Japan.	Emerg Infect Dis	18-11	1882-1885	2012
松本智成, 尾形英雄, 豊田恵美子, 鈴木克洋, 斎藤武文, 藤田明, 末竹寿紀, 近松絹代, 水野和重, 御手洗聡	ラインプローブ法による抗酸菌同定および結核菌薬剤感受性判定の臨床評価	雑誌「結核」	In press		2013