

とにより、OXA51-like 遺伝子 PCR が偽陰性となる *A.baumannii* が少数ではあるが存在することが確認された。このような株では IS の挿入位置と IS のサイズにもよるが、OXA51-like 遺伝子 PCR において設計サイズよりも大きなエキストラバンド様の増幅断片が検出される可能性も考えられ、そのような分離株に遭遇した場合には *rpoB* 遺伝子のシーケンスを行うことにより *A.baumannii* の確認が必要と考えられる。

昨年度、我々は秋田県と愛知県で分離株の菌種分布に明瞭な違いがあることを示し、アシネトバクター属菌においては地域に特異的な感染疫学が成立している可能性を指摘した。今回 SNP 系統樹解析により秋田県と愛知県の株は非常に近縁であることを示したが、さらに詳しく見ると、秋田県と愛知県由来株は各県内由来株で小さなサブクラスターを形成していた。この結果は、昨年指摘したアシネトバクター属菌全般についてのみならず、*A. baumannii* International Clone II についても地域に特異的な感染疫学が成立している可能性を示唆するものとして興味深い。

一方、SNP 系統樹解析により、国内で分離された *A. baumannii* International Clone II は非常に近縁な株であること、また、国内で分離された MDRA はこれらとはやや距離が離れたクラスターに属することが示された。このことは、国内に侵淫している *A. baumannii* International Clone II の中で MDRA が他のクラスターに属する株と異なる起源と感染疫学を持つ可能性を示唆することとして興味を持たれる。

今回、我々が検討した範囲では、*A. baumannii*645 株中 MDRA に該当する株は 2 株のみであった。このことは、諸外

国とは異なり、国内には MDRA が未だに殆ど侵淫していないことを示すものと考えられ、現時点では国内における MDRA による院内感染発生リスクは大きくはないものと推察される。しかしながら、国内においては MDRA による深刻な院内感染がこれまで実際に発生していることから、MDRA の感染予防策を構築することは重要である。MDRA については国内における分離数が少ないことにより解析データも少なく、感染予防策の構築に重要な知見が非常に乏しい。そのため、今後、国内における MDRA について更に広範囲・長期間にわたる調査を行い、感染疫学に関するデータを集積することが重要と考えられる。

多剤耐性菌の耐性遺伝子を特定することは、従来、極めて困難であった。今回、我々は次世代シーケンサーによる全ゲノム解析とオンラインサーチサイトを併用することにより耐性 *A.baumannii* の耐性遺伝子の検索を試行した。その結果、供試した株により 5 種類から 12 種類の薬剤耐性遺伝子が特定された。このような耐性遺伝子の検索は、次世代シーケンサーを使用する以前の、従来の方法では実現不可能であった。但し、この方法ではキノロン耐性やマクロライド耐性の機構として重要である標的遺伝子の SNP 変異による耐性機構を特定することはできない。しかしながら、次世代シーケンサーとオンラインサーチサイトを併用して薬剤耐性遺伝子を検索する方法は、薬剤耐性機構の解明に極めて有効であり、他の菌種の薬剤耐性機構の研究にも広く応用可能であると考えられる。

アミカシン耐性を示した AC18 は、アミノグリコシド耐性に関与する *aadA1*、

aac(6')iB-cr、*armA* 遺伝子を保有することが示された。これらの遺伝子のうち、*armA* 遺伝子はアミノグリコシドの高度耐性に関与する *methylase* 遺伝子の一種であり、AC18 株のアミノグリコシド耐性機構で重要な役割を果たしているものと推定された。また、AC18 株は *sulI* 遺伝子を保有し、スルファメトキサゾールにも耐性を示したことから、Class 1 Integron を保有する可能性が高いものと考えられ、Class 1 Integron の特定と構造解析が今後の課題となる。

今回解析に供した株はいずれもイミペネム感受性であり、MDRA の報告基準は満たしていない。イミペネムにも耐性を獲得した MDRA のイミペネム耐性機構の詳細について興味を持たれる。

E. 結論

886 株のアシネトバクテリウム属菌を供試して実施した今年度の研究により、*rpoB* 遺伝子の解析はアシネトバクテリウム属菌の同定に有用であることが改めて確認された。OXA51-like 遺伝子を標的とする PCR 法が *A.baumannii* の同定法として有用であ

ることも同時に確認されたが、IS の挿入による偽陰性の可能性について考慮する必要がある。次世代シーケンサーによる全ゲノム解析は *A.baumannii* の SNP 解析による分子疫学解析に有用であるのみならず、従来は困難であった薬剤耐性遺伝子の検索にも極めて有用であることが示されたことから、今後もこの方法を応用してアシネトバクテリウムの耐性機構の解明に取り組む必要がある。

国内において MDRA は稀であり、侵淫は深刻な状況には至っていないと考えられるが、院内感染防止策構築の基礎となる MDRA の感染疫学に関して、さらなる調査が必要である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1 *rpoB*遺伝子系統樹による*Acinetobacter*属菌同定結果

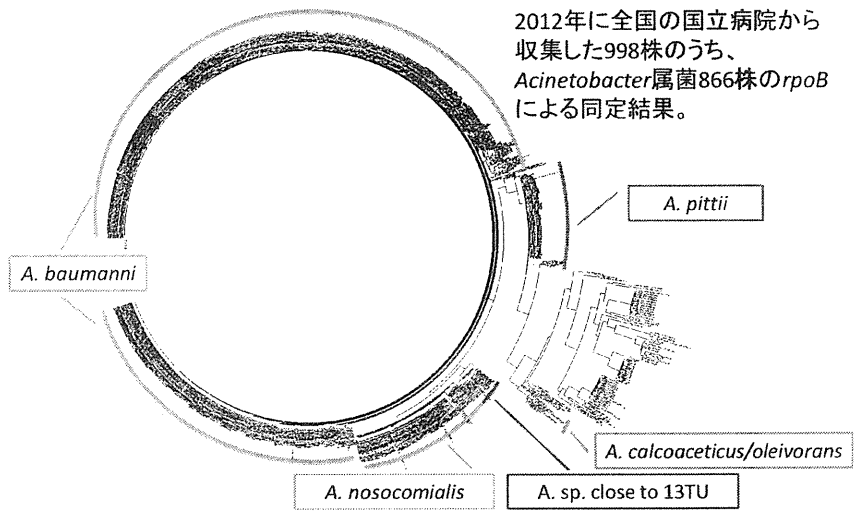


図2 *Acinetobacter* 属菌866株の同定結果

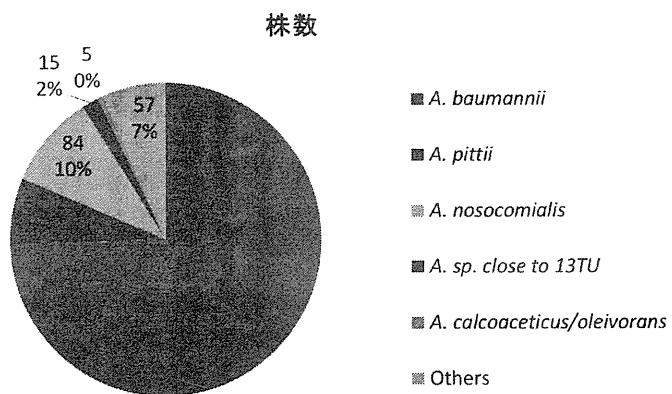


図3 全ゲノムSNP解析による系統解析

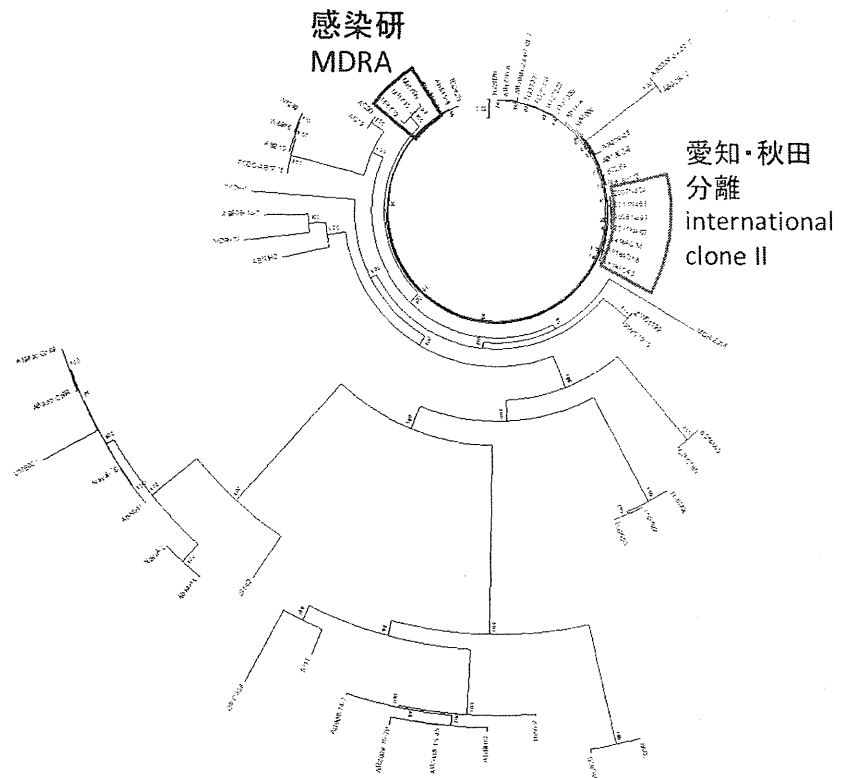


表1 *A. baumannii* のMLST (Pasteur)

	愛知	秋田
ST2	9 (45%)	17
ST22	0	1
ST33	2	0
ST34	1	0
ST151	1	0
ST152	2	0
ST213	1	0
ST235slv	1	0
new	3	0
合計	20	18

表2 耐性*A.baumannii*の薬剤耐性遺伝子と薬剤感受性

	2007N42 4	2008N49 3	2011N46 3	2011N46 5	AC18	AC34	AC45	
aadA1	-	-	+	+	+	-	-	Aminoglycoside resistance
aac(6)'lb-cr	-	+	+	+	+	-	-	Fluoroquinolone and aminoglycoside resistance
strA	+	+	+	+	+	+	+	Aminoglycoside resistance
strB	+	+	+	+	+	+	+	Aminoglycoside resistance
armA	+	-	+	+	+	-	-	Aminoglycoside resistance
blaOXA-66	+	+	+	+	+	+	+	Beta-lactam resistance
blaADC-25	+	+	+	+	+	+	+	
blaTEM-1	-	-	-	-	+	-	+	Beta-lactam resistance
mph(E)	+	-	+	+	+	-	+	Macrolide resistance
msr(E)	+	-	+	+	+	-	+	Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B resistance
sul1	-	-	+	+	+	-	-	Sulphonemide resistance
sul2	+	+	+	-	-	-	-	Sulphonemide resistance
tet(B)	+	+	+	+	+	+	+	Tetracycline resistance
セフトキシム					R	R	R	
セフトキシム					R	R	R	
イメペネム					S	S	S	
メロペネム					S	S	R	
アストラシアム					R	R	R	
セフェピム					I	I	R	
ビヘラシリン					R	R	R	
アミカシン					R	S	S	
シプロフロキサシン					R	R	R	
ミノサイクリン					S	S	I	
コリスチン					S	S	S	
スルフィソキサゾール					R	S	S	

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

JANIS 還元情報公開情報のありかたに関する研究
バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）分離率の年次推移の解釈について

研究分担者 鈴木里和 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨 JANIS 検査部門においてバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）の分離率は 2009 年、2010 年頃上昇したが、その後低下している。この年次推移が限られた医療機関からの報告に依存しているのか、特定の医療機関に関わらず VRE の分離率が全国的に増減しているのかを検討した。JANIS 検査部門の VRE 分離率および分離患者数を医療機関別に検討したところ、2007 年～2012 年にかけて JANIS 検査部門に報告された VRE 分離患者数の 66.9% が 8 施設からの報告に偏っていた。これら 8 施設の報告を除くと、VRE 分離率は 2007 年～2012 年にかけてほぼ一定の水準を推移していた。一方、多くの分離患者を報告していた 8 施設についても 2, 3 年のうちに分離患者数は激減しており、VRE のアウトブレイクとその後の対応で事例を収束させていたことが推測された。2007 年～2012 年の 6 年間継続して JANIS 検査部門に参加し、かつ VRE の分離を報告した医療機関では 1 年、もしくは 2 年のみの報告がほとんどであり、年余にわたって VRE が分離されている病院はほとんど無かった。VRE は我が国では依然として稀な耐性菌であり、地域からの持ち込みも限られるため、分離された場合の感染対策を適切におこなうことで、制御可能であることが示唆された。

A. 研究目的

厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）事業検査部門は 2007 年に大きなシステム更新をおこない、それまでの血液髄液検体情報のみの収集から、全検体の収集に切り替えた。システム更新から 6 年が経過し、新システムにおけるデータが蓄積され、各薬剤耐性菌分離率の年次推移も明らかとなりつつある。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）のように、国内に広く蔓延しており、かつ分離数が非常に多い薬剤耐性菌であれば、限られた医療機関のデータが全体集計に影響を及ぼす可能性は少ない。一方バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）や多剤耐性アシネトバクター（MDRA）のように、比較的稀な薬剤耐性菌の場合は、限られた医療機関のデータが全体集計に影響を及ぼす可能性が危惧される。VRE は 2012 年年報によると、集計対象医療機関 660 施

設のうちの約 1 割に当たる 71 施設から分離が報告されている。また VRE 分離率の年次推移をみると 2008 年に検体提出患者数からの分離率が 0.03%であったのが、2009 年と 2010 年には 0.05%とやや上昇したのち、2012 年には 0.02%と 2008 年よりも低くなっている。この年次推移が、限られた医療機関からの報告に依存しているのか、特定の医療機関に関わらず VRE の分離率が全国的に増減しているのかを検討した。

B. 研究方法

JANIS 事業検査部門に提出された 2007 年 7 月～2012 年 9 月までのデータを対象とした。2007 年については 7 月から 12 月までの 6 ヶ月分、2012 年については 1 月～9 月までの 9 ヶ月分のデータである。JANIS 検査部門データは統計法に基づく研究利用申請を経て承認されたものである。公開情報

年報の結果を検討することが目的のため、集計対象医療機関の入院検体のみを対象とした。同一患者からの複数検体については重複検体処理をおこなった。本研究では研究期間中の同一患者はすべて重複処理としたが、公開情報年報では30日単位での重複処理をおこなっており、重複処理の方法は公開情報年報の方法と本研究では異なる。VRE 分離率の算出方法は、公開情報年報と同じ方法とし、分母は検体提出患者数、分子は VRE 分離患者数である。VRE の定義も JANIS と同様に、菌種が同定された腸球菌のうちバンコマイシンの MIC が $16\mu\text{g/ml}$ 以上の分離菌、もしくは VRE の菌コードで報告された分離菌とした。

倫理面への配慮

JANIS データの研究利用は統計法に基づいて実施した。個々の医療機関や個人を特定しうるデータは解析に含めなかった。

C. 研究結果

重複処理の方法の違いが分離率の推移に差異を及ぼさない事を確認するため、公開情報年報の分離率と本研究の分離率の年次推移を比較した。図 1 に示すように、分離率の推移は公開情報と本研究とで大きな違いは認めなかった。

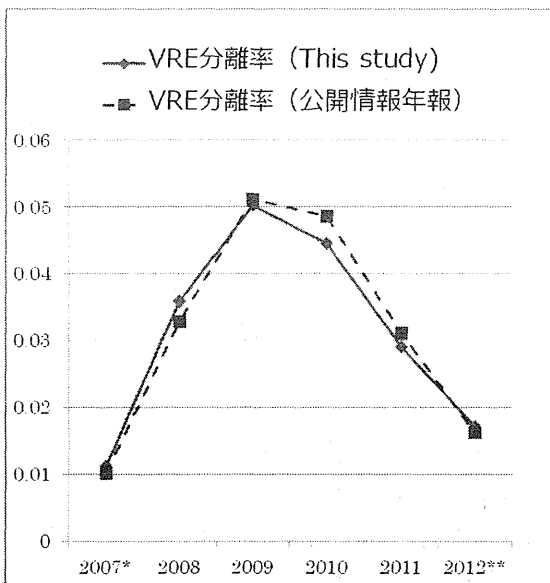


図1 JANIS 公開情報年報と本研究における分離率 (*2007年は6月-12月の6ヶ月のみ。 **2012年の本研究における分離率は9月までの9ヶ月分のデータ)

図 2 に年別の VRE 分離率の分布を、全集計対象医療機関と VRE 分離有りの医療機関とで分けて、年別に箱ヒゲ図で示す。VRE は国内の医療機関の 90%では分離されないため、全医療機関での分布では検討が困難なであった (図 2a)。VRE 分離されていない病院を除いた分離率分布を検討したところ、

図2a 全集計対象医療機関 分離率分布

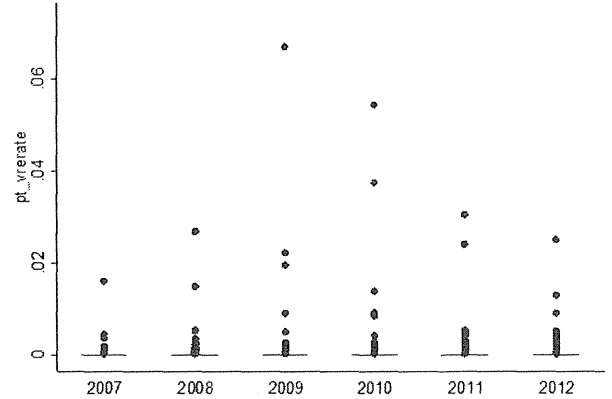
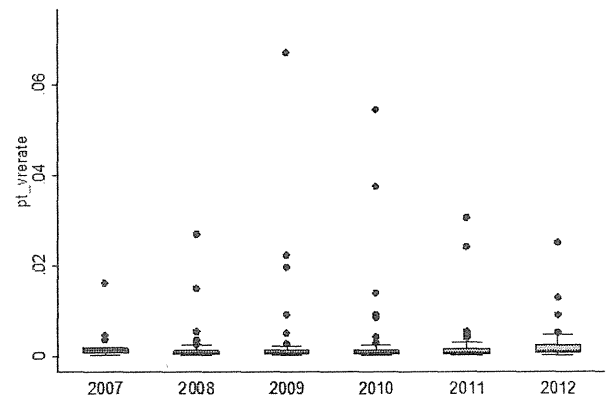


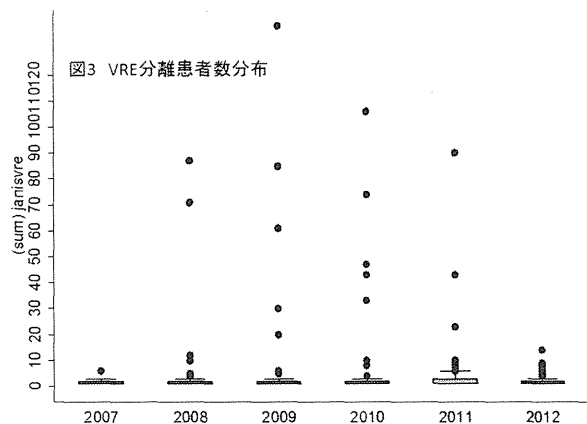
図2b VRE分離医療機関のみの 分離率分布



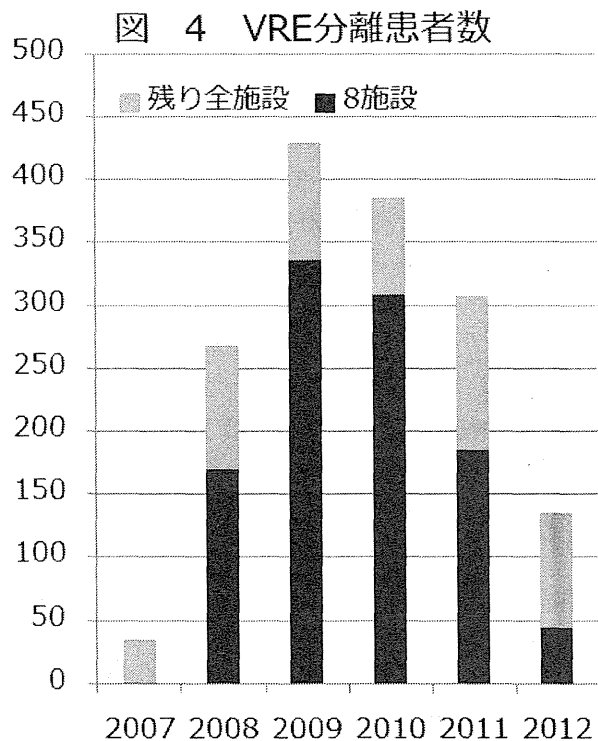
(図 2b) VRE が分離された事のある医療機関に限定した場合であっても、分離率の分布には大きな偏りがあることが明らかとなった。ただし、毎年 5 施設程度の外れ値の医療機関を除くと、比較的正規分布を示唆する箱ひげ図となっており、特定の医療機関が極端に高い分離率を示していた。

分離率は分母を検体提出患者数としているため、検体提出数が少ない医療機関では、分離率が高く算出される可能性がある。分母の影響の有無を確認するため、VRE 分離患者数の分布を図 3 に示す。年間 VRE 患者数の分布についても、外れ値がみられ、年間の VRE 分離患者数が 20 人を超えていたの

は、8施設からの15データのみであった。

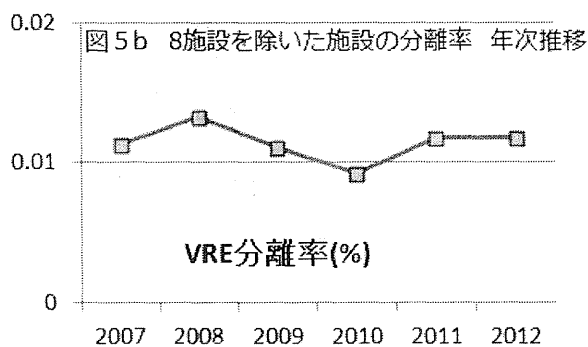
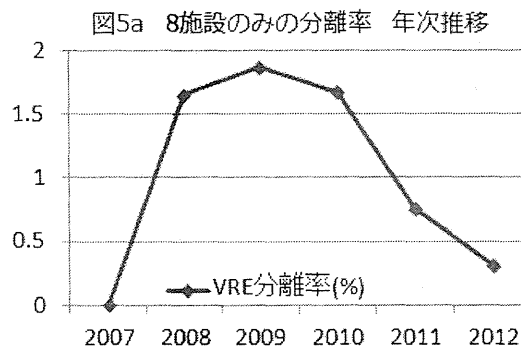


2007年から2012年までのVRE分離患者数を上記8施設とそれ以外に分けて年別に図4に示す。研究対象期間中1560名のVRE分離患者あり、うち1043名(66.9%)が8施設由来であった。

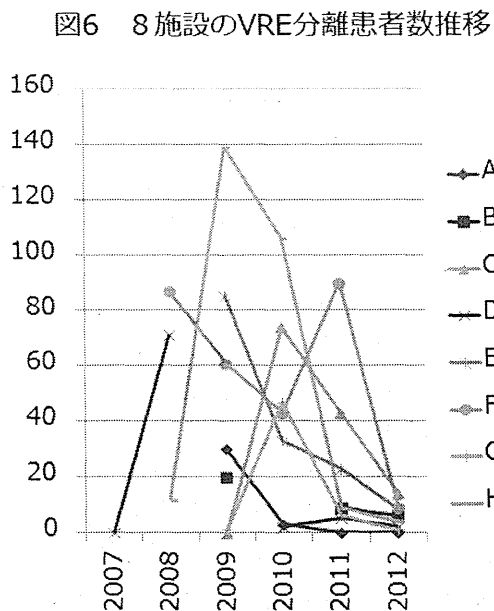


分離患者数の多い8施設とその8施設を除いた全施設の分離率年次推移を図5に示す。図5aに示すように8施設における分離率は、図1に示す全体の分離率と同様の年次推移を示していた。一方、8施設をのぞいた場合の分離率は、2007年～2012年の期間中0.01%前後を推移しており、図1に示

す分離率の推移とは異なるものであった。なお、VRE分離施設のみ絞った分離率の推移については2008年～2010年にかけてはむしろ減少しており、図1とは対照的な年次推移であった。

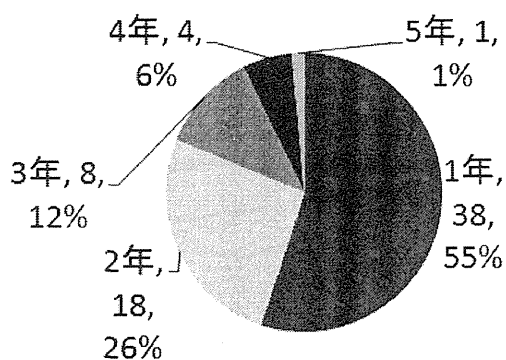


分離率の高かった8施設の分離患者数年次推移を医療機関別に図6に示す。8施設はいずれも多く分離患者が検出された後、急速に分離患者数が減少していた。



VRE が一度分離された施設においてどの程度 VRE の分離が継続するののかについて検討するため、2007 年から 2012 年まで 6 年間継続して参加し、集計対象医療機関であった 214 施設の分離状況を検討した。214 施設のうち、一度でも VRE が分離されたことがあるのは 69 施設 (32.2%) であった。この 69 施設において、6 年間のうち VRE が分離された年数ごとの割合を図 7 に示す。

図7 6年間のVRE分離年数
(分離病院のみ、N=69)



69 施設中 38 (55%) の施設が 1 年のみの分離であった。一方 3 年以上分離されている医療機関は 13 (19%) 施設であり、6 年間毎年分離されていた医療機関は無かった。

D. 考察

VRE は米国や韓国等にみられるように、高度に蔓延しうる耐性菌であるが、我が国での分離率は低い水準を維持している。VRE 感染症は感染症法による届け出疾患であり、それによると 2010 年をピークに報告数はやや減少している。JANIS における分離率もこの傾向とほぼ一致していた。しかし 2010 年以降、JANIS で見られるような VRE の分離率の明らかな減少を説明する要因については明らかでは無かったため今回 JANIS データを検討することとした。

JANIS では各薬剤耐性菌分離率の分母を検体提出患者数、分子を耐性菌分離患者数にして算出している。分母となる検体提出患者数は 2012 年年報では約 145 万人 (1,453,969 人) である。分子の分離患者数は MRSA のように国内に広く蔓延している耐性菌であれば約 11 万人 (117,209) であり、限られた医療機関の分離数が影響す

る可能性は低いと思われる。一方、VRE の分離患者数は集計対象医療機関 660 施設から 236 人となっている。VRE のアウトブレイクが医療機関で発生した場合、スクリーニング等により多くの保菌者が検出され、50-60 人規模の分離患者数となることは珍しくない。そのため、JANIS 検査部門における VRE 分離率はアウトブレイクが発生した医療機関の分離患者数と分離率が大きく影響している可能性があった。

2007 年からの JANIS 検査部門集計対象医療機関における VRE 分離患者の報告医療機関を見ると、その約 6 割強が 8 施設からの報告に偏っていた。この 8 医療機関を除くと VRE 分離率の年次推移は、公開情報年報の年次推移とは大きく異なり、2007 年以降ほとんど増減無く推移していた。

VRE 分離数が逸脱していたこれら 8 医療機関の年別の分離患者数を見ると、いずれも、ある年に多くの患者から分離されていたがその後急速に分離数が減っており、最終的には VRE の分離が見られなくなった医療機関もあった。これは VRE 陽性患者の分離を契機にして積極的なスクリーニングをおこない、感染対策を実施していた事を示唆していた。

2007 年から 2012 年まで継続して JANIS に参加していた医療機関のみを対象に、一度 VRE が分離された後も継続的に VRE が分離され続けるのかを検証したところ、ほとんどの医療機関が単年もしくは 2 年のみでの分離であった。薬剤耐性菌が継続的に長年にわたって分離される要因として、施設内伝播が制御できない場合のほか、MRSA でみられるように地域的な蔓延のため継続的に持ち込まれる事が考えられる。この観点からすると我が国において VRE の地域的な蔓延を示唆するデータは少なく、持ち込み例も極めて限られるため、現時点で日本の各医療機関は VRE 分離率ゼロを目標に対策を講じることが可能であると考えられた。

E. 結論

JANIS 検査部門公開情報年報における VRE の分離率の推移には 8 医療機関のデータが大きく影響していることが分かった。

国内では比較的稀な薬剤耐性菌の分離率を評価する場合には、このようにアウトブレイクが発生したと推測される医療機関データの影響があり得ることを考慮する必要があると思われる。一方、参加医療機関における VRE 分離医療機関の割合については大きな変動はなく、VRE の分離は減少とはいえないものの、増えている事を示唆するデータは現時点では認めない。今後もこの分離状況を維持するため、各医療機関における感染対策を支援することが重要と思われる

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

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

複数の医療施設から分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生
*Enterobacter cloacae*に関する分子疫学的検討

研究分担者 氏名 舘田 一博（東邦大学医学部微生物・感染症学講座）
研究協力者 氏名 石井 良和（東邦大学医学部微生物・感染症学講座）
青木 弘太郎（東邦大学医学部微生物・感染症学講座）

研究要旨

カルバペネム系薬耐性腸内細菌科細菌の分離頻度が諸外国で増加しており、社会的な問題として捉えられている。都内3医療施設で、イミペネム低感性あるいは感性であってもオキシイミノセファロスポリン系薬に耐性を示す、メタロ-β-ラクタマーゼ (MBLs)を産生する *Enterobacter cloacae* の分離頻度が上昇したことから、これらの菌株の関連性の解明を試みた。全71株の MBL 産生 *E. cloacae* の薬剤感受性検査、MBLs 型別および分子疫学解析を実施した。さらにインテグロン構造の解析を実施した。イミペネムおよびアミカシンに対する耐性率はそれぞれ 22.5%および 0%であった。供試した 71 株の *E. cloacae* が産生する MBLs はすべて IMP-1 型であった。供試菌株は PFGE により 7 クラスタに大別された。インテグロン構造解析対象 12 株がインテグロン内に保有していた遺伝子カセットは、*bla_{IMP-1}*、*aac(6′)-IIc* および *bla_{IMP-1}*、*aac(6′)-Ib* であった。PFGE 解析の結果、分離施設毎に個別のクラスタが存在したことから、同一菌株の院内伝播が示唆された。また、同一遺伝子カセットを有するインテグロン構造が複数施設で分離された *E. cloacae* 菌株において確認されたことから、同一起源のインテグロンあるいはプラスミドが MBLs をコードする遺伝子を伝播している可能性が示唆された。

A. 研究目的

Enterobacter cloacae は院内感染の病原菌として、注目されている。近年、グラム陰性菌による感染症治療に使用されるカルバペネム系薬に耐性を示す腸内細菌科細菌が増加しており、諸外国で問題視されている。東邦大学医療センター大森病院で、イミペネム (IPM) に低感性あるいは感性であってもオキシイミノセファロスポリン系薬に耐性を示す *E. cloacae* が特定期間に分離された。同時期に、都内の2医療施設でも同様の薬剤感受性を示す菌株が分離頻度されていた。そこで、3施設が保存していた71菌株の *E. cloacae* を対象に分子疫学的手法を用いて、これらの菌株間の関連性について検討した。

B. 研究方法

都内3医療施設の検査材料から約4年間に分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ (MBLs) 産生 *E. cloacae* 全71株を供試菌株とした(表1)。薬剤感受性検査は微量液体希釈法、MBLs 産生の確認はメルカプト酢酸ナトリウム SMA ディスクとセフトジジムディスクを用いたダブルディスクシナジーテスト、MBLs のグループ型別は PCR 法により決定した。分子疫学解析は、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を実施し、大別された7つのクラスタか

ら1株ずつ、さらに同一クラスタ内でも IPM もしくはセフトタキシム (CTX)、アミカシン (AMK) の MIC 値が2管以上乖離している菌株を合わせた12菌株をインテグロン構造の解析対象とした。5′側および3′側に存在する共通の塩基配列を基にインテグロン構造の全長を増幅し、その増幅産物の塩基配列を直接決定した。

表1. 供試菌株の材料別分離頻度

材料	医療施設		
	A	B	C
血液	0(0%)	0(0%)	4(36.3%)
喀痰	9(45%)	6(15%)	1(9.1%)
尿	5(25%)	7(17.5%)	3(27.3%)
便	0(0%)	18(45%)	0(0%)
咽頭・鼻腔	3(15%)	1(2.5%)	1(9.1%)
気管吸引物	0(0%)	5(12.5%)	0(0%)
その他	3(15%)	3(7.5%)	2(18.2%)
計	20	40	11

倫理面への配慮

東邦大学医学部「病原微生物の取り扱いの標準化に関わる倫理的規範構築に関する見解」(東邦医倫発第 25-2 号) に準じて対応している。

C. 研究結果

保存された 71 菌株は、薬剤感受性検査の結果、CTX、モキシサラクタム(MOX)の耐性率は 100%であったのに対し、IPM の耐性率は 22.5%であった(表 2)。アミカシンの耐性率は 0%であった。それら 71 菌株は MBLs 確認検査の結果、全ての菌株においてのその産生が確認された。保存株は PFGE で 7 つのクラスタに大別された(図 1)。そのうち 5 つのクラスタはそれぞれ同一の施設で分離された菌株であった。インテグロン構造解析の結果、対象の 12 菌株のインテグロン構造内の遺伝子カセットは、5'側から *bla_{IMP-1}*、*aac(6')-IIc* (パターン A) あるいは *bla_{IMP-1}*、*aac(6')-Ib* (パターン B) の 2 種類であった(図 2)。パターン B はクラスタ 6 のみであり、その他のクラスタの代表株は全てパターン A に属するインテグロン構造を有していた。

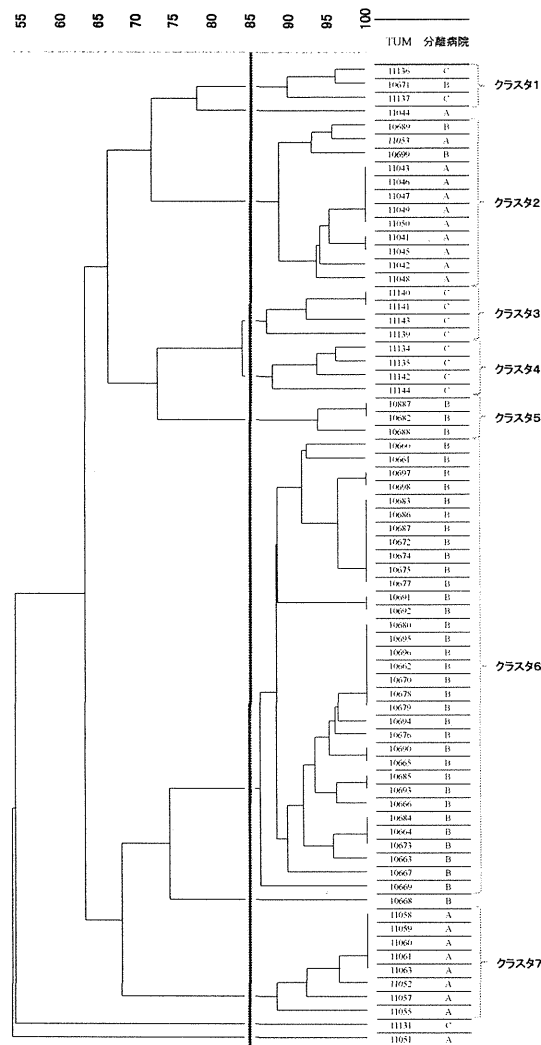
表 2. *E. cloacae* の薬剤感受性検査成績

抗菌薬	MIC レンジ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μg/mL)	MIC ₅₀ (μg/mL)	耐性率(%)
IPM	≤0.125-64	8	2	22.5
CTX	16-512	>512	256	100
CFPM	1-512	128	32	52.1
AZT	0.25-512	256	16	54.9
PIPC/TAZ	2/4->512/4	256/4	32/4	29.6
MOX	512->512	>512	>512	100
AMK	1-16	8	2	0
CPFX	0.25-64	2	2	46.5

IPM: イミペネム, CTX: セフトキシム, CFPM: セフェピム, AZT: アズトレオナム, PIPC/TAZ: ピペラシリン/タゾバクタム, MOX: モキシサラクタム, AMK: アミカシン, CPFX: シプロフロキサシン, MIC: 最小発育阻止濃度

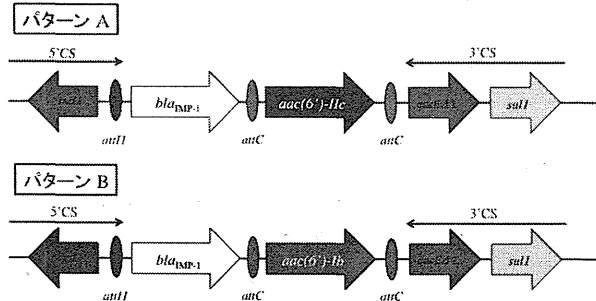
図 1. 全 71 株の PFGE デンドログラム

Dice (Opt:1.50%) (Tot 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]



供試菌株の PFGE バンドパターンに基づいて Fingerprinting II を用いて描画したデンドログラム。解析係数は Dice、デンドログラムタイプは UPGMA を用いた。解析パラメータは optimization: 1.50%、position tolerance: 1.50% のとき、85% 以上の相同性がある菌株を同一クラスタとした。

図 2. インテグロンに含まれる遺伝子カセット



5'CS, 5' conserved segment (5'保存領域); 3'CS, 3' conserved segment (3'保存領域); *intI1*, クラス 1 インテグロンの部位特異的組換え酵素 (クラス 1 インテグラーゼ) をコードする遺伝子; *attI1*, インテグロンに関連する遺伝子カセット組換え部位; *attC* site, 59-base element と呼ばれる薬剤耐性遺伝子カセット組換え部位; *bla_{IMP-1}*, IMP-1 型 MBL をコードする遺伝子; *aac(6')-IIc*, アミノ配糖体アセチル化酵素 (aminoglycoside acetyltransferase) をコードする遺伝子。小文字のアルファベットは酵素名、ローマ数字は酵素型、カッコ内の数字は修飾部位をそれぞれ示す。; *qacEΔ1*, 第四級アンモニウム塩耐性に関する遺伝子の一部; *sulI*, サルファ剤耐性に関する遺伝子

D. 考察

MBLs を含むカルバペネマーゼ産生腸内細菌科に属する菌株は、カルバペネム系薬に耐性を示すことは稀であると報告されている。本研究で対象とした MBLs 産生 *E. cloacae* 菌株は、IPM に耐性を示した菌株が 22.5%であったことから、カルバペネム系薬の薬剤感受性検査成績のみを頼りに MBLs 産生菌株を検出することは困難であることが再確認された。また、PFGE による解析の結果、特定の期間内に分離された MBLs 産生 *E. cloacae* 菌株は、分離施設毎に個別のクラスタが存在した。このことは、同一菌株が院内で伝播したことを示唆すると考えられた。すなわち、特定の MBLs 産生 *E. cloacae* 菌株が都内に拡散しているのではないことが明らかとなった。一方、本研究では複数施設の分離株から、同様の遺伝子カセットを持つインテグロン構造が確認された。この結果から、都内の医療施設で同一起源のインテグロンあるいはプラスミドが MBLs をコードする遺伝子の伝播に関与した可能性が示唆された。

E. 結論

IMP-1 型 MBLs 産生 *E. cloacae* は、オキシイミノセファロスポリン系薬である CTX やオキサセフェム系薬の MOX に対しては全株が耐性を示したが、カルバペネム系薬の IPM には 22.5%の菌株が耐性を示したにすぎなかった。同一施設から分離された菌株の多くは、PFGE による解析の結果、特定のクラスタに分離され、MBLs 産生 *E. cloacae* が施設内で伝播している可能性が示唆された。さらに、複数の施設から分離された菌株が有するインテグロン構造を解析したところ、同一の構造を有する菌株が存在したことから、同一起源のインテグロンあるいはプラスミドが *bla*_{IMP-1} の拡散に関与したことが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) 第 24 回臨床微生物学会総会. 2013 年 2 月 2 日 横浜. 『複数の医療施設から分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Enterobacter cloacae* に関する分子疫学的検討』
 - 2) The 53th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Denver, USA. September 13. 2013. A molecular epidemiological study of clinical metallo-β-lactamase producing *Enterobacter cloacae* isolated in Japan』

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

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

グラム陽性菌（腸球菌、黄色ブドウ球菌）の多剤耐性に関する研究

研究分担者 富田 治芳 （群馬大学大学院医学系研究科細菌学分野）

研究協力者 谷本 弘一 （群馬大学大学院医学系研究科薬剤耐性菌実験施設）

研究要旨.

主要な院内感染症起因菌とされる多剤耐性のバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）、およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の薬剤耐性について研究を行った。臨床分離 VRE 株としてフランスで報告された新規の VanN 型 VRE 株を日本国内で発見し、解析結果を学術雑誌へ報告した（世界で 2 例目）。類似の VRE 株が国内産鶏肉に複数存在することを明らかにした。臨床分離 MRSA 株の各種抗 MRSA 薬に対する感受性試験では感受性に大きな変動は見られず、これまでと同等の治療効果が期待できることが示された。特にバンコマイシン高度耐性株の出現やバンコマイシン感受性低下傾向は認められず、また臨床で治療困難が指摘され問題と考えられている MIC 値 2 mg/L を示す株の多くは 1.5 mg/L であった。

A. 研究目的

日本で増加中のバンコマイシン耐性腸球菌 VRE に関する耐性機構の解析、伝播・拡散機構の解明、分子疫学研究は国内では十分に行われていない。本研究では国内で分離される VRE について解析しその情報を発信し、国内の医療施設における VRE の院内感染予防対策に寄与する。

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA の治療薬として使用される各種抗菌薬（抗 MRSA 薬）の感受性動向調査が組織的には行われていないため、治療薬選択、投与方法について臨床現場で混乱が生じている。組織的かつ高精度管理の下、MRSA の薬剤感受性試験を行い、科学的根拠に基づく正確で適切な耐性菌情報を臨床へ発信することを目的とする。

B. 研究方法

国内で分離された臨床分離 VRE 株、MRSA 株について収集し、各種薬剤に対する感受性検査、および耐性遺伝子の分子遺伝学的解析を行った。VRE に関してはヒトへの伝

播拡散の一要因とされる環境（食肉）由来株についても解析を行った。さらに VRE よる国内最初の院内感染アウトブレイク事例の VRE 株が生産する新規バクテリオシンの生化学的解析を行った。

倫理面への配慮 全ての臨床分離株は患者個人を同定できる情報を含まない検体として収集し、本研究に用いた。

C. 研究結果

未知の Van 型 VRE (*E. faecium*) 株を国内産鶏肉から分離し、解析の結果、フランスの臨床分離株として報告された VanN 型 VRE と同一型であり、世界で 2 例目の株として報告した。さらに類似の VanN 型 VRE 株が過去においても複数の食肉検体から分離されていたことを明らかにした。VRE の新規バクテリオシンが細胞壁溶解酵素型バクテリオシンであることを明らかにした。

これまでに収集した臨床分離 MRSA 株（2004 年、2008 年、2011 年、2012 年、2013 年分離の合計 3,576 株）の各種抗 MRSA 薬（バンコマイシン、テイコプラニン、リネゾリ

ド、アルベカシン、キノプリスチン・ダルホプリスチン)のMIC値に明らかな変動は認めなかった。またバンコマイシン高度耐性株、感受性の低下傾向も認めなかった。バンコマイシンのMIC値2 mg/Lの株を詳細に調べたところ、その大部分は1.5 mg/Lであった。

D. 考察

VanN型VRE(*E. faecium*)は2011年にフランスの臨床株として初めて報告された新規のVan型VREである。今回、日本の環境中(複数の食肉検体)から同一型VREを分離した。レトロスペクティブな解析の結果、VanN型VREは2009年に収集された食肉検体に既に存在しており、一部の株で、宿主の遺伝型はフランスの臨床分離株と類似しており遺伝的な関連性を認めた。これらの結果は、新規VanN型VREは既に環境中に拡散していることを示唆している。VREの新規バクテリオシンが細胞壁溶解酵素型バクテリオシンであることを初めて明らかとした。

国内で臨床分離されるMRSA株の各種抗MRSA薬の感受性に大きな変動は無かったことから、細菌学的には臨床効果が期待できることが示された。特に臨床で最も多く用いられているバンコマイシンのMIC値の上昇傾向や、バンコマイシン高度耐性株は存在せず、また治療困難とされるMIC値2 mg/Lの株は少数であったことからバンコマイシンの治療効果は以前と同等であることが期待される。

E. 結論

新規VanN型VREを国内産食肉から複数株分離した。国内の臨床分離MRSA株の抗MRSA薬の感受性分布に明らかな変動は無く、多くの株が感受性を示した。収集株にバンコマイシン耐性MRSA株は存在しなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nomura T, Tanimoto K, Shibayama

K, Arakawa Y, Fujimoto S, Ike Y, Tomita H. Identification of VanN-type vancomycin resistance in an *Enterococcus faecium* isolate from chicken meat in Japan. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2012; 56:6389-6392.

- 2) Kurushima J, Hayashi I, Sugai M, Tomita H. Bacteriocin protein BacL1 of *Enterococcus faecalis* is a peptidoglycan D-isoglutamyl-L-lysine endopeptidase. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288:36915-36925.
- 3) Hirakawa H, Tomita H. Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. *Frontiers Microbiology*. 2013; 4: 114.

2. 学会発表

- 1) 野村隆浩、柴山恵吾、荒川宜親、池康嘉、富田治芳. VanN型バンコマイシン耐性腸球菌の解析. 第86回日本細菌学会総会. 2013年3月20日 千葉.
- 2) 富田治芳、谷本弘一、山田景子、荒川宜親. 臨床分離黄色ブドウ球菌株の各種抗MRSA薬に対する感受性の動向調査. 第96回日本細菌学会関東支部総会. 2013年10月31日 東京.

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

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
～サーベイランスに用いる日常検査データの問題点と対策の検討～

研究分担者 長沢 光章（東北大学病院 診療技術部）

研究要旨

JANIS データを解析し、①MRSA における VCM の MIC 値とその変動因子、②日常業務および JANIS データの精度管理、③ESBL の検出状況の推定および Modified-Hodge test (MHT) 対象株について検討を行った。

2007 年と 2012 年の JANIS データを用いて検討を行ったが、CLSI ブレークポイントの変更、自動機器のシステムのバージョンアップ、ブレークポイントパネルの濃度変更などにより、単純に比較することが不可能であったが、耐性化の傾向は認められなかった。また、測定機器による機種間差の検討により大きな変動が認められた。JANIS データの地域別の *S. aureus* に対する MRSA の割合として、東北および関東甲信越地区で 42%と低い傾向で、高い傾向である中国地区は 57%で約 15%の開きがあった。また、東北地区の施設別の MRSA 割合は 15%から 100%まで大きな格差があった。

薬剤感受性結果から *E. coli* の ESBL 産生菌を推定した結果、全国平均 15%であったが、地区別では東北地区の 10%から九州・沖縄地区の 24%と地域差が認められた。また、*E. coli* におけるカルバペネマーゼ産生菌についても、薬剤感受性結果から 2.22%において可能性が示唆され、MHT などのスクリーニング検査対象になると推定した。

2010 年の本研究で JANIS 参加施設への薬剤感受性検査に関するアンケート調査を実施した。その後の動向について再調査の目的で、愛知県および千葉県の施設を対象に実施し、検査方法については大きな変化はなかったが、ペニシリナーゼ産生ブドウ球菌の確認、クリンダマイシン誘導耐性試験が約 80%の施設で実施されており、MHT による KPC 型カルバペネマーゼ産生菌スクリーニングも 28%の施設で実施されるようになってきた。しかし、内部精度管理に関しては約半数の施設で実施されていなかった。

研究協力者

犬塚 和久（JA 愛知厚生連）
郡 美夫（東京医学技術専門学校）
佐藤 智明（山形大学医学部附属病院）
堀 光広（岡崎市民病院）
静野 健一（千葉市立海浜病院）
柳沢 英二（ミロクメディカルラボラトリー）
大花 昇（福島県立医科大学）

我々は、①日常検査で検出すべき薬剤耐性菌の種類、検査法および内部精度管理について施設規模別の提言、②薬剤耐性菌検出のための内部精度管理法の作成、③JANIS データの機器・施設別等の詳細解析により問題点を明らかにし対策案の提唱を研究目的としている。

感染症治療において臨床材料からの主要検出菌の薬剤感受性成績を経年的に把握しておくことは重要である。我々は、平成 9 年より主要検出

A. 研究目的

菌の薬剤耐性率の年次推移について集計を行ってきた。その後、JANIS 検査部門においてデータが集積されてきたので、JANIS データからみた薬剤感受性データの問題点について解析を継続している。

2013 年度は、JANIS データを解析し、①メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) におけるバンコマイシン (VCM) の MIC 値とその変動因子、②日常業務および JANIS データの精度管理、③

B. 研究材料および方法

1. MRSA における VCM の MIC 値と変動因子

現在、MRSA における VCM の MIC 値が $2\mu\text{g/mL}$ の株が増えているとの報告がある。今回、JANIS データなどから MIC 値の推移や変動因子について検討した。

MRSA の VCM の MIC 分布については、東北大学病院、山形大学病院、B 大学病院の 2002 年から 2013 年までの総データを使用した。

なお、VCM のブレイクポイントは CLSI M100-S22 の規定に従い MIC 値が $\leq 2\mu\text{g/mL}$ を感性 (S)、 $4\mu\text{g/mL}$ を中間 (I)、 $\geq 8\mu\text{g/mL}$ を耐性 (R) とした。

2. 日常業務および JANIS データの精度管理

現在、JANIS に各施設から送られてくるデータは、一定の基準を満たしていない場合は集計から除外している。しかし、現在の基準のみではチェックしきれない疑問または異常データがあり、どのように精度管理を行うかが問題となっている。そこで、JANIS データを用いて MRSA 率の地域差などについて検討を行った。

2007 年、2012 年および 2013 年に JANIS に報告された *Staphylococcus aureus*、2007 年 9 月および 2012 年 9 月の MRSA および 2012 年 7 月から 9 月までの *Stenotrophomonas maltophilia* の JANIS データを使用した。なお、判断基準は CLSI M100-S22 の規定に従い、MRSA は MIPIC の MIC が $\geq 4\mu\text{g/mL}$ とした。

ESBL の検出状況の推定および Modified-Hodge test (MHT) 対象株について検討を行った。

また、2010 年に実施した JANIS 参加施設のアンケート調査から、各施設で報告可能な薬剤耐性菌、内部精度管理方法には差があることが確認されていた。今回、千葉県、愛知県の施設に再度アンケート調査を行い、検査室で備えるべき薬剤耐性菌検査体制、内部精度管理の実施方法について考察した。

3. ESBL の検出状況の推定および MHT 対象株

2012 年 7 月から 9 月までの *Escherichia coli* の JANIS データを使用し、同一患者、同一月、同一菌種を 1 株として集計した約 50,000 株、カルバペネマーゼ産生に関する MHT 対象株の推定は約 61,000 株を調査対象とした。

ESBL 産生菌の推定は、AZT、CAZ、CTX、CTR、CPDX のうち 1 薬剤以上に耐性かつ CMZ に感受性の株とした。また、MHT 対象株の基準とし CLSI M100-S23 に準じ、通常 1 剤以上のカルバペネム系薬 (IPM または MEPM) に対して、「I: $2\mu\text{g/mL}$ 」または「R: $\geq 4\mu\text{g/mL}$ 」と判定され、第Ⅲ世代セファロsporin 系薬 (CTX、CTR および CAZ) の 1 剤以上に対して「R」と判定される菌株とした。

4. 薬剤感受性検査に関するアンケート調査

報告可能な薬剤耐性菌と検査方法、内部精度管理の実施状況について、千葉県 31 施設 (28 病院、3 検査センター)、愛知県 20 施設 (19 病院、1 検査センター) の 51 施設にアンケート調査を行った。

5. JANIS データ使用に関して

上記 1~4 の JANIS データについては、厚生労働省へ院内感染対策サーベイランスに係る調査情報の提供申請を行い、許可を得ている。

C. 研究結果

1. MRSA における VCM の MIC 値と変動

因子

1) JANIS データの解析

2007年と2012年のデータ比較を図1に示した。2007年は、 $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ (7,042株; 23%)、 $1 \mu\text{g/mL}$ (1,304株; 4%)、 $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ (15,884株; 52%)、 $2 \mu\text{g/mL}$ (3,213株; 10%)、 $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ (2,566株; 8%) などであった。また、2012年は $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ (7,644株; 13%)、 $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ (2,915株; 5%)、 $1 \mu\text{g/mL}$ (31,374株; 53%)、 $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ (5,220株; 10%)、 $2 \mu\text{g/mL}$ (10,271株; 17%) などであった。2007年と2012年では、CLSIのブレイクポイントの変更およびブレイクポイントパネルの薬剤濃度の変更により同一の濃度となっていない。従って、単純な比較はできないが、2007年ではMICが $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ の株は29%から89%であり、 $2 \mu\text{g/mL}$ の株は10%から71%であった。また、2012年ではMICが $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ の株は72%から81%であり、 $2 \mu\text{g/mL}$ の株は17%から27%であった。

なお、カテゴリ判定が不能なMICとして2007年のデータで $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ が2,566株(8%)、2012年のデータでは ≥ 2 、 ≤ 4 および $3 \mu\text{g/mL}$ が279株(0.5%)報告されていた。

2) 機種別による変動

表1に機種別によるMRSAにおけるVCMのMIC値を示した。MICが $2 \mu\text{g/mL}$ と報告している機種は、マイクロスキャンW/Aが23%、バイテック2が17.3%、60a(ドライプレート)が16.5%であり、 $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ を含めるとMR-5000(フローズンプレート)で98.8%、オートスキャン4で63.8%、マイクロスキャンA/Wで36%などであった。一方、オートエプター、BDフェニックス、ライサス、栄研ドライプレートでは、90%以上が $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ と報告している。

3) 3大学病院における変動

東北大学病院の年次推移を図2に、山形大学病院およびB大学病院の推移を図3に示した。それぞれの施設とも、測定機器や機器ソフトのバージョン変更に伴い変動しており、年次的に $1 \mu\text{g/mL}$ から $2 \mu\text{g/mL}$ へと耐性傾向となっている

とは言えなかった。

2. 日常業務およびJANISデータの精度管理

1) 地区、県、施設別の *S. aureus* に対する MRSA 割合

JANISデータの地域別の*S. aureus*に対するMRSAの割合を図4に示した。東北および関東甲信越地区で42%と低い傾向で、高い傾向である中国地区は57%で約15%の開きがあった。また、東北地区を県別に集計した結果を図5に示した。山形県、宮城県で低い傾向で青森県とは25%もの開きがあった。さらに東北地区の施設別のMRSA割合を図6に示したが15%から100%まで大きな格差があった。

2) MRSA および *S. maltophilia* の薬剤感受性結果の精度管理

CLSI M100-S22では、「MRSAの β -ラクタム系薬はMIC値に関わらず耐性とする。」と定義されているが、表2に示したように2012年の報告ではCEZ 1.7%、CMZ 4.6%、IPM/CS 1.7%がSまたはIと報告されていた。

また、*S. maltophilia*におけるIPM/CSは自然耐性でありRとなるべきであるが、表3に示したように、223施設はSが0%であったが、28施設においては1~100%となっていた。表4には、20施設の内訳を示したが、施設AからOまでは100%感性(S)と報告していた。

3. ESBL の検出状況の推定および MHT 対象株の推定

*E. coli*の主要抗菌薬に対する感受性を図7に示した。CPDX、LVFXおよびCPFXで約30%が耐性であった。そのうち、薬剤感受性結果よりESBLと推定される菌株とESBLが否定されると推定される(non-ESBL)菌株のそれぞれの感受性を図8に示した。ESBLと推定される菌株ではAZT、CPDX、CTX、CTRXおよびCAZにおいて80%以上が耐性であった。しかし、non-ESBLs群ではLVFXおよびCPFXのニューキノロン系薬のみで約20%耐性であったが、他の抗菌薬はほとんどが感受性株であった。

また、ESBLs（推定）と non-ESBLs（推定）の地域別検出率を図 9 に示した。ESBLs 推定として東北地区の 10%から九州・沖縄地区の 23.8%と 2 倍以上の格差があった。

さらに、E. coli の主要抗菌薬に対する感受性成績から carbapenemase 産生に関する MHT 対象株では、61,136 株中 1,335 株 (2.22%) であった (図 10)。

4. 薬剤感受性検査に関するアンケート調査

1) アンケート回答施設の概要

図 11 に JANIS 参加施設の割合、感染対策管

理加算取得病院の割合を示した。

図 12 に薬剤感受性検査測定方法および使用機種を示した。

2) 報告可能な薬剤耐性菌

表 5 から表 7 に、前回調査の結果を含め報告可能な薬剤耐性菌の種類とコストを示した。

3) 内部精度管理の実施状況

図 13 に内部精度管理の実施状況について示した。実施率は 56.9%で、前回調査とほぼ同様であった。

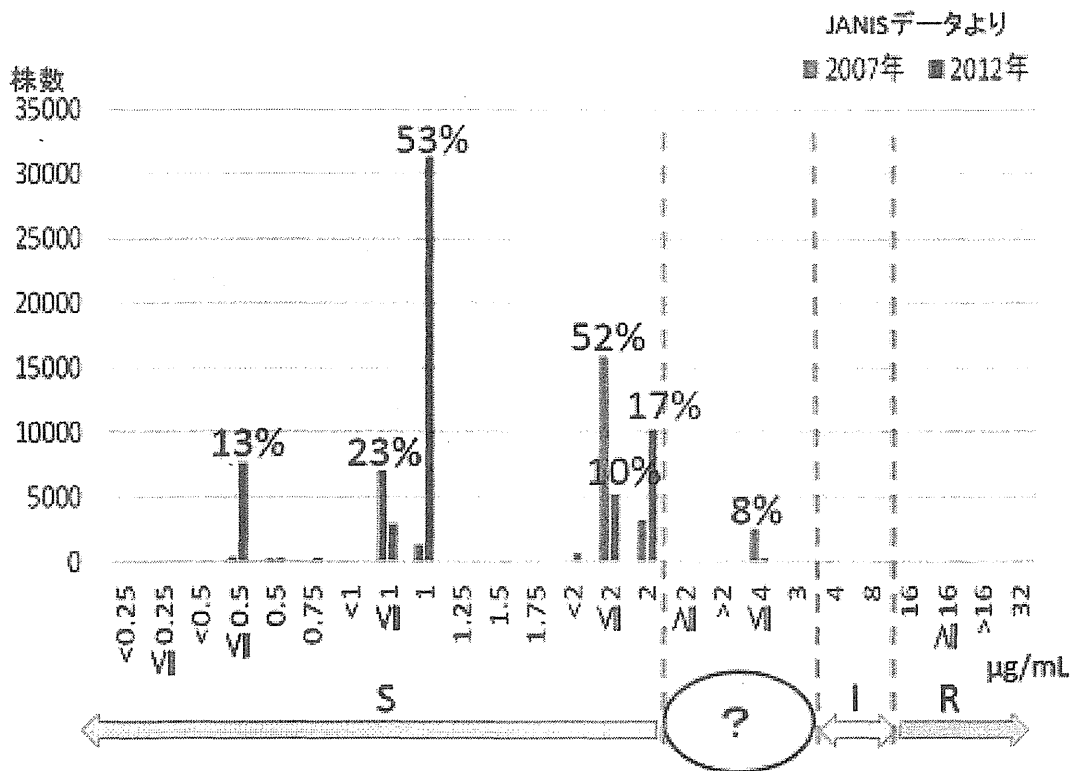


図 1. MRSA の VCM に対する MIC 分布

表1. MRSA における VCM の MIC 値 ～機種別～

JANISデータより

測定装置	株数	≤1	≤2	=2	≤4	=4	>4
マイクロスキンW/A	31,703	64.0	13.0	23.0	0.0	0.1	0.0
オートスキン4	580	35.9	47.8	16.0	0.0	0.2	0.2
ハイテック	1,864	78.0	9.5	12.5	0.0	0.0	0.0
ハイテック2	9,775	82.2	0.2	17.3	0.2	0.1	0.0
BD7cニックス	3,415	98.6	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0
オートセフター セフター	252	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ライナス	1,832	91.5	0.0	6.5	0.0	0.0	0.0
IS60(ドライプレート)	1,030	90.8	0.0	9.1	0.0	0.1	0.0
60a(ドライプレート)	388	83.5	0.0	16.5	0.0	0.0	0.0
IA20MIC(ドライプレート)	394	91.1	0.0	1.8	7.1	0.0	0.0
栄研ドライプレート	961	92.6	3.1	4.3	0.0	0.0	0.0
栄研70-スプレート	105	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IA01MIC(ドライプレート)	511	51.7	45.4	2.9	0.0	0.0	0.0
IA20MICmk II(ドライプレート)	602	74.8	22.9	2.2	0.0	0.0	0.0
IA01MICmk II(70-スプレート)	100	98.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0
IA01MICmk II(ドライプレート)	96	91.7	0.0	8.3	0.0	0.0	0.0
MR-5000(70-スプレート)	84	1.2	98.8	0.0	0.0	0.0	0.0
MR-5000(ドライプレート)	203	52.2	43.8	3.9	0.0	0.0	0.0
その他	771	57.2	14.1	4.9	23.5	0.3	0.0

%

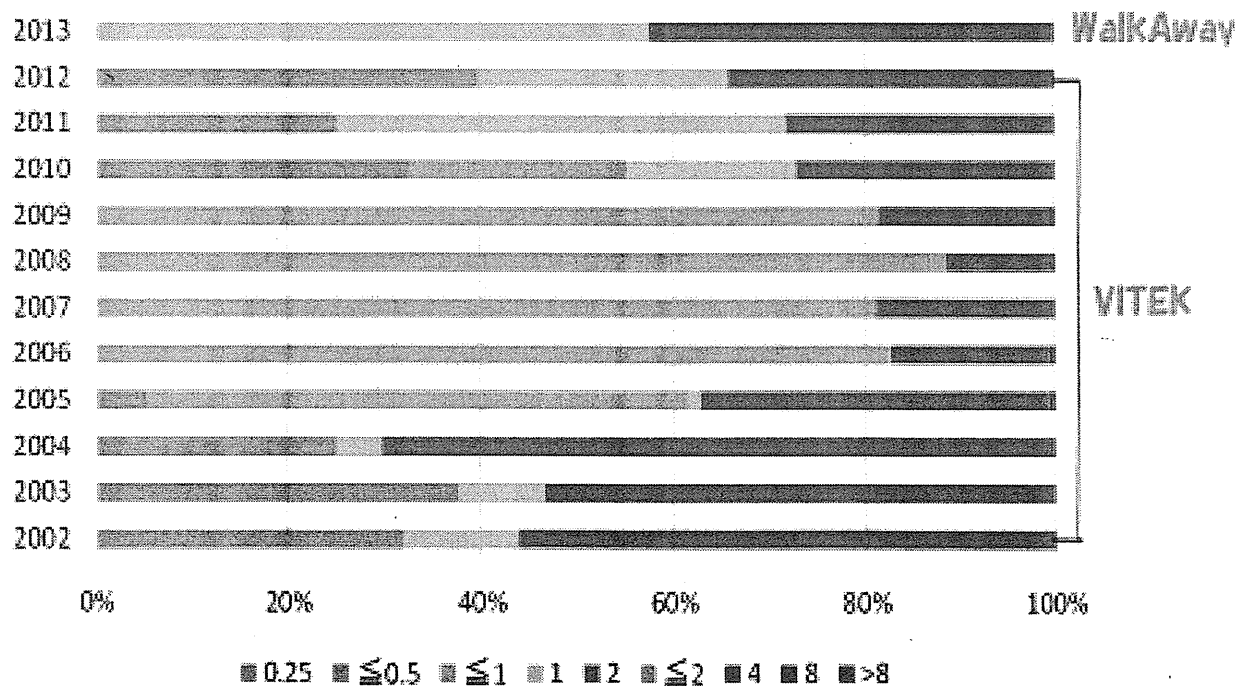


図2. MRSA における MIC 分布 (1) ～東北大学病院～