

### 3. 耐性菌メッセージファイル 定義

耐性菌メッセージの各情報の定義を説明します。

#### 3.1. 基本情報

名称やメッセージなど耐性菌の基本となる情報が定義されます。

##### 3.1.1. 【メッセージ区分】 - 必須項目 -

こちらの情報が[基本情報]であることを示す区分が「1」固定で設定されます。

##### 3.1.2. 【菌名(略称)】 - 必須項目 -

警告として表示される際の菌の略称が設定されます。

##### 3.1.3. 【メッセージバージョン】 - 必須項目 -

定義された耐性菌のバージョンが設定されます。

##### 3.1.4. 【重要度】 - 必須項目 -

対象の菌が分離された際の重要度が低い順から1~5で設定されます。

また、菌名(略称)が変更された場合や不要になった場合など対象菌を削除する場合は、こちらに[-1]が設定されます

<重要度>

- 1:表示のみ
- 2:強調表示
- 3:注意
- 4:警告
- 5:最重要

-1:削除

##### 3.1.5. 【菌名(正式名)】 - 必須項目 -

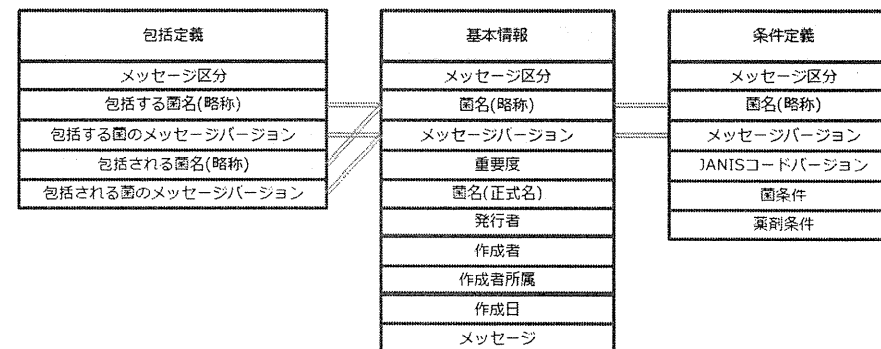
警告として表示される際の菌の正式名称が設定されます。

##### 3.1.6. 【発行者】 - 任意項目 -

耐性菌条件の発行者名が設定されます。

#### 2.5.1. 各メッセージファイルの関連

各メッセージファイルは下記の図に示す項目で関連付けられます。



#### 2.6. ファイルの形式

文字コード「Shift\_JIS」を使用したテキスト形式のファイルです。ファイルの拡張子には、カンマで区切られたファイルを示す[.csv]が使用されます。

また、耐性菌のメッセージファイルでは各データ(レコード)を改行で区切りますが、改行コードにはWindows表示である「CRLF」(文字コード「0D 0A」)が使用されず、

## 3.2. 条件定義

[基本情報]で定義された耐性菌の、条件が設定されます。1つの耐性菌であっても、菌と薬剤の条件の組み合わせによって、[条件定義]は複数行で設定される場合があります。

### 3.2.1. 【メッセージ区分】 - 必須項目 -

こちらの情報が[条件定義]であることを示す区分が「2」固定で設定されます。

### 3.2.2. 【菌名(略称)】 - 必須項目 -

対応する[基本情報]の【菌名(略称)】と同じ値が設定されます。

### 3.2.3. 【メッセージバージョン】 - 必須項目 -

対応する[基本情報]の【メッセージバージョン】と同じ値が設定されます。

### 3.2.4. 【JANIS コードバージョン】 - 必須項目 -

3.2.5【菌条件】 - 必須項目 -、3.2.6【薬剤条件】 - 任意項目 -、で使用される菌名コードマスタ、抗菌薬コードマスタのバージョンが、JANIS 検査部門データフォーマット【バージョン情報】形式で設定されます。例えばこちらに[V501]が設定されている場合、使用されている菌名コードマスタのバージョンは「Ver. 4.0」、抗菌薬コードマスタのバージョンは「Ver. 4.0」となります。

バージョン情報と各マスタのバージョンの対応は、下記のサイトを参照してください。

<http://www.nih-janis.jp/section/kensa.html>

JANIS サイト トップページ > 各部門について > 検査部門 ページ

「検査部門提出データの概要と作成の手引き」

設定例：「V501」

### 3.2.5. 【菌条件】 - 必須項目 -

耐性菌となる条件の菌コードが設定されます。複数の菌コードが条件になる場合は各菌コードが「OR」で結ばれます。

設定例：「4400 OR 4401 OR 4402 OR 4403」

### 3.1.7. 【作成者】 - 任意項目 -

耐性菌条件の作成者名が設定されます。

### 3.1.8. 【作成者所属】 - 任意項目 -

耐性菌条件の作成者の所属名が設定されます。

### 3.1.9. 【作成日】 - 任意項目 -

条件を作成した日付が、YYYYMMDD形式で設定されます。

### 3.1.10. 【メッセージ】 - 必須項目 -

対象の菌が分離された際に表示する警告メッセージが設定されます。警告メッセージに改行が含まれる場合は、HTML タグの『<BR>』が使用されます。

### 3.3. 包括定義

複数の抗菌薬に対する耐性菌の警告と、単一の抗菌薬に対する耐性菌の警告がそれぞれ設定され、それらが包括する関係にある場合、こちらの情報を設定します。例えば「多剤耐性緑膿菌」と「カルバペネム耐性緑膿菌」を定義する場合、「多剤耐性緑膿菌」を包括する菌、「カルバペネム耐性緑膿菌」を包括される菌として設定します。

包括する関係がない場合はこちらの情報は設定されません。

各項目は、対応する[基本情報]で定義された耐性菌の項目と同じ値が設定されます。

また、こちらは包括する菌と包括される菌が常に1対1で設定されます。3剤耐性菌～1剤耐性菌など2段階以上で包括する場合は下記のように設定されます。

- ・3剤耐性菌(包括する菌) - 2剤耐性菌(包括される菌)
- ・3剤耐性菌(包括する菌) - 1剤耐性菌(包括される菌)
- ・2剤耐性菌(包括する菌) - 1剤耐性菌(包括される菌)

#### 3.3.1. 【メッセージ区分】 - 必須項目 -

こちらの情報が[包括定義]であることを示す区分が「3」固定で設定されます。

#### 3.3.2. 【包括する菌名(略称)】 - 必須項目 -

包括する菌が、対応する[基本情報]の【菌名(略称)】と同じ値で設定されます。

#### 3.3.3. 【包括する菌のメッセージバージョン】 - 必須項目 -

包括する菌が、対応する[基本情報]の【メッセージバージョン】と同じ値で設定されます。

#### 3.3.4. 【包括される菌名(略称)】 - 必須項目 -

包括される菌が、対応する[基本情報]の【菌名(略称)】と同じ値で設定されます。

#### 3.3.5. 【包括する菌のメッセージバージョン】 - 必須項目 -

包括される菌が、対応する[基本情報]の【メッセージバージョン】と同じ値で設定されます。

### 3.2.6. 【薬剤条件】 - 任意項目 -

耐性菌となる条件の抗菌薬コードと感受性検査の結果が下記の形式で設定されます。

[抗菌薬コード] + 「(」 + [検査結果(\*)] + 「|」 + [検査結果(\*)]… + 「)」

\* 検査結果は検査方法別に1～3つ設定され、各検査結果は「|」で区切ります。検査方法は3種類あり、形式は下記の通りです。また、検査方法が複数設定されている場合は、どれか1つでも条件に当てはまれば、その抗菌薬の条件に該当することとなります。

・SIRを条件とする場合：「CAT」 + 「=」 + [SIR]

[SIR]には、[S][I][R][NS](not S) [IR](I or R)が設定されます。

(設定例) CAT=NS

・MIC値を条件とする場合：「MIC」 + [不等号] + [MIC値]

[不等号]には、「=」、「<」(より小さい)、「>」(より大きい)、「<=」(より小さい又は等しい)、「>=」(より大きい又は等しい)が設定されます。

[MIC値]には、数字でMIC値が設定されます。

(設定例) MIC>=16

・阻止円径を条件とする場合：「ZOD」 + 「<=」 + [阻止円径(mm)]

[阻止円径(mm)]には、数字で阻止円径(mm)が設定されます。

(設定例) ZOD<=14

抗菌薬が複数になる場合は、「AND」「OR」で各条件が結ばれ、また括弧「( )」によって優先する条件が設定されます。括弧の中に括弧が設定される場合があります(入れ子構造、ネスト)、ネストは16段階までです。なお、右記の例ではネストは2段階と数えます。『(A OR (B AND C))』

また、「AND」と「OR」では、「AND」が優先されます。例えば「A OR B AND C」という条件は「A OR (B AND C)」と同じ扱いになります。

設定例：「((1401[IPM/GS](CAT=R||MIC>=16||ZOD<=13) OR 1411[MEPM](CAT=R||MIC>=16||ZOD<=13)) AND (1816[AMK](CAT=I||MIC>=16||ZOD<=12) OR 1816(CAT=IR) OR 1816(CAT=R))) OR (2301[VCM](MIC>=16||ZOD<=22))」

(ブラケット[]で囲ったものは、コメントです。)

## 4.2. 条件定義

| No. | 項目名            | 属性 | 最大長<br>(byte) | 内容                      | 設定例  |
|-----|----------------|----|---------------|-------------------------|--|
| 1   | メッセージ区分        | 数字 | 1             | [2]固定                   | 2  |
| 2   | 菌名(略称)         | 文字 | 50            | 菌の略称                    | MDRA   |
| 3   | メッセージバージョン     | 数字 | 3             | メッセージのバージョン             | 100  |
| 4   | JANIS コードバージョン | 文字 | 4             | 使用マスタのバージョン             | V501   |
| 5   | 菌条件            | 文字 | 500           | 菌の条件                    | [Acinetobacter spp.]4400 OR<br>4401 OR 4402 OR 4403  |
| 6   | 薬剤条件           | 文字 | 500           | 薬剤の条件<br>「抗菌薬コード(検査結果)」 | (1401[IPM/CS](CAT=R  MIC>=16<br>  ZOD<=13) OR<br>1411[MEPM](CAT=R  MIC>=16  Z<br>OD<=13)) AND<br>(1816[AMK](CAT=I  MIC>=16  ZO<br>D<=12) OR 1816(CAT=IR) OR<br>1816(CAT=R) AND<br>(2521[CPFX](CAT=R  MIC>=4)<br>OR 2516[LVFX](CAT=R  MIC>=8)<br>OR<br>2561[GFLX](CAT=R  MIC>=8)) |

## 4.3. 包括定義

| No. | 項目名               | 属性 | 最大長<br>(byte) | 内容                | 設定例  |
|-----|-------------------|----|---------------|-------------------|------|
| 1   | メッセージ区分           | 数字 | 1             | [3]固定             | 3    |
| 2   | 包括する菌名(略称)        | 文字 | 50            | 包括する菌の略称          | MDRP |
| 3   | 包括する菌のメッセージバージョン  | 数字 | 3             | 包括する菌のメッセージバージョン  | 100  |
| 4   | 包括される菌名(略称)       | 文字 | 50            | 包括される菌の略称         | CRP  |
| 5   | 包括される菌のメッセージバージョン | 数字 | 3             | 包括される菌のメッセージバージョン | 100  |

## 4. 耐性菌メッセージファイル 項目一覧

耐性菌メッセージの各情報の項目の一覧です。

## 4.1. 基本情報

| No. | 項目名        | 属性 | 最大長<br>(byte) | 内容                          | 設定例   |
|-----|------------|----|---------------|-----------------------------|---|
| 1   | メッセージ区分    | 数字 | 1             | [1]固定                       | 1   |
| 2   | 菌名(略称)     | 文字 | 50            | 菌の略称                        | MDRA  |
| 3   | メッセージバージョン | 数字 | 3             | メッセージのバージョン                 | 100   |
| 4   | 重要度        | 数字 | 2             | 重要度 1(低)~5(高)、<br>-1(削除)    | 5   |
| 5   | 菌名(正式名)    | 文字 | 200           | 菌の正式名称                      | 多剤耐性アシネトバクター属   |
| 6   | 発行者        | 文字 | 100           | 発行者名                        | 耐性菌管理センター   |
| 7   | 作成者        | 文字 | 20            | 作成者名                        | 警告太郎  |
| 8   | 作成者所属      | 文字 | 100           | 作成者の所属名                     | KEYWARE   |
| 9   | 作成日        | 文字 | 8             | 作成した日(YYYYMMDD)             | 20120223  |
| 10  | メッセージ      | 文字 | 1000          | 対象の菌を分離した際に<br>表示するメッセージ、警告 | 菌株を保存し、国立感染症研究<br>所へ連絡してください。<BR>国内<br>での報告がまれな薬剤耐性菌で<br>す。 |

## 6. お問い合わせ

こちらの資料に関する質問は下記までお問い合わせください。

東海大学医学部基礎医学系 生体防御学 藤本 修平

キーウェアソリューションズ株式会社 ソリューション事業本部 医療事業部 中川 岳人

## 5. 設定例

耐性菌メッセージファイルの設定例です。

下記の例では、MRSA、MDRA、CRP（カルバペネム耐性緑膿菌）、MDRP を定義しています。また、カルバペネム耐性緑膿菌を、MDRP に包括される菌として設定しています。

（こちらは例ですので、実際の条件とは異なります）

\*\*\*\*\*

1, MRSA, 100, 1, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌, 耐性菌管理センター, 警告太郎, KEYWARE, 20120223, 件数をカウントし、ICT に報告してください。

1, MDRA, 100, 5, 多剤耐性アシネトバクター属, 耐性菌管理センター, 警告太郎, KEYWARE, 20120223, まれな耐性菌です。<BR>再検してください。

1, CRP, 100, 2, カルバペネム耐性緑膿菌, 耐性菌管理センター, 警告太郎, KEYWARE, 20120223, 件数をカウントし、ICT に報告してください。

1, MDRP, 100, 4, 多剤耐性緑膿菌, 耐性菌管理センター, 警告太郎, KEYWARE, 20120223, 件数をカウントし、ICT に報告してください。

2, MRSA, 100, V501, 1301, 1208=R

2, MRSA, 100, V501, 1303

2, MDRA, 100, V501, 4400 OR 4401 OR 4402 OR 4403, (1401 (CAT=R)) AND (1816 (CAT=I) OR 1816 (CAT=IR) OR 1816 (CAT=R)) AND (2516 (CAT=R) OR 2521 (CAT=R) OR 2561 (CAT=R))

2, CRP, 100, V501, 4001, 1401 (CAT=R) OR 1411 (CAT=R)

2, MDRP, 100, V501, 4001, (1401 (CAT=R)) AND (1816 (CAT=I) OR 1816 (CAT=IR) OR 1816 (CAT=R)) AND (2516 (CAT=R) OR 2521 (CAT=R) OR 2526 (CAT=R) OR 2561 (CAT=R))

3, MDRP, 100, CRP, 100

\*\*\*\*\*

「抗酸菌の omnilog による測定法の確立に関する研究  
- 結核菌分子疫学解析法の簡便化を目指して」に関する研究

研究分担者 松本 智成 （大阪府結核予防会大阪病院）

研究要旨.

結核菌株の遺伝子型別は、感染源の追跡調査や感染防止策を検討する上で重要である。現在では、VNTR 法が広く利用されるようになった。結核菌の VNTR 型別判定を正確に行なうには、正確に PCR 産物サイズを測定し、そのサイズから推定される。しかしながら PCR 産物サイズが大きくなるにつれ、分離能が低下し、正確なサイズ測定が困難になるなど注意すべき点がある。今回、より簡便に結核菌の VNTR 法による型判別を行なう目的で、キャピラリー電気泳動装置を使用して特定の VNTR loci において、今まで検出できた全ての反復数における DNA 断片を 1 つにプールした VNTR ラダーマーカを作成し検討を行った。本 VNTR ラダーマーカを用いた同定方法は熟練を要さずより正確な結核菌の型判別が行なえることを明らかにした。

A. 研究目的

結核菌株の遺伝子型別は、感染源の追跡調査や感染防止策を検討する上で重要である。現在では、VNTR 法が広く利用されるようになった。結核菌の VNTR 型別判定を正確に行なうには、正確に PCR 産物サイズを測定し、そのサイズから推定される VNTR 内の反復数を算出する必要がある。通常、アガロースゲル電気泳動が多く用いられているが、PCR 産物のサイズ測定は、泳動ごとに手作業にて分子量マーカと比較しなければならないが、PCR 産物サイズが大きくなるにつれ、分離能が低下し、正確なサイズ測定が困難になるなど注意すべき点がある。今回、より簡便に結核菌の VNTR 法による型判別を行なう目的で、キャピラリー電気泳動装置を使用して特定の VNTR loci において、今まで検出できた全ての反復数における DNA 断片を 1 つにプールした VNTR ラダーマーカを作成し検討を行った。

B. 研究方法

Supply' s 15-MIRU において、反復数が同定済みの結核菌ゲノム DNA は反復数を再確認後、各反復数の PCR 産物を混合して Supply' s 15-MIRU の領域ごとの VNTR ラダーマーカを作成し、QIAxcel Advanced System 付属の ScreenGel Software に登録した。130 株の結核菌分離株 DNA の各領域における PCR 産物を QIAxcel Advanced System で測定し、VNTR ラダーマーカと直接比較を行ない、各結核菌株の VNTR 反復数を決定した。また、現在使用している i-chip SV1210(日立化成株式会社)より検出された遺伝子型別を QIAxcel Advanced System で得られた遺伝子型別と比較した。

倫理面への配慮 既に同意が得られている患者から得られた結核菌 DNA を使用し名前は匿名化されているので倫理面では問題がない。

C. 研究結果

QIAxcel Advanced System で同定された各領域の反復数は、i-chip SV1210 で得られたそれらと比較検討した結果、高い相関を示した。また、QIAxcel Advanced System を用いた VNTR の反復数の同定は、従来の分子量マーカーを用いて PCR 産物の鎖長の推定を行なう方法と同等またはそれ以上の精度を持つことがわかった。

#### D. 考察

IS6110 RFLP 解析と比較して VNTR 解析は、迅速で、再現性があり、デジタルデータなので他のデータと比較がしやすく広域データベース構築に向いている。

結核菌の VNTR 型別判定を正確に行なうには、正確に PCR 産物サイズを測定し、そのサイズから推定される VNTR 内の反復数を算出する必要がある。通常、アガロースゲル電気泳動が多く用いられているが、PCR 産物のサイズ測定は、泳動ごとに手作業にて分子量マーカーと比較しなければならぬが、PCR 産物サイズが大きくなるにつれ、分離能が低下し、正確なサイズ測定が困難になるなど注意すべき点があった。誰でも正確に測定出来るという事は広域データベース構築に重要である。

本 VNTR ラダーマーカーを用いた同定方法は熟練を要さずより正確な結核菌の型判別が行なえることを明らかにした。

#### E. 結論

判別マーカーとしての本 VNTR ラダーマーカーを用いた同定方法は、熟練を要さずより正確な結核菌の型判別が行なえる。簡便かつ迅速な本同定法により、ヒューマンエラーを最小限度に抑えることのみならず、検査手法としての標準化も容易になる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1). Tomoshige Matsumoto, Yukio Hirayama, Yuka Hisamitsu, Megumi Fukumura, Akemi Hirata, Kumi Tanaka, Masashi Kurokawa, Yoshitaka Tamura, Hisakko Yoshida, Koichi Suzuki,

Takayuki Nagai, Ichiro Kawase, Yoshihiko Hoshino Simultaneous and Longitudinal Comparison of Interferon Gamma Release Assays Among Health Care Workers in Japan Mycobacterial Diseases in press.

(2). Tomoshige Matsumoto, Yuriko Koshii, Kazu Sakane, Tomomi Murakawa, Yukio Hirayama, Hisako Yoshida, Masashi Kurokawa, Yoshitaka Tamura, Takayuki Nagai, Ichiro Kawase

A novel approach to automated genotyping of Mycobacterium tuberculosis using a panel of 15 MIRU VNTRs. Journal of microbiological methods 04/2013

(3). Tomoshige Matsumoto, Hideo Ogata, Emiko Toyota, Katsuhiko Suzuki, Takefumi Saito, Akira Fujita, Toshinori Suetake, Kinuyo Chikamatsu, Kazue Mizuno, Satoshi Mitarai Clinical evaluation of a line probe assay kit for the identification of mycobacterium species and detection of drug-resistant mycobacterium tuberculosis Kekkaku: [Tuberculosis] 03/2013; 88(3):291-296.

##### 2. 学会発表

1) 松本智成、永井崇之、田村嘉孝、黒川雅史、川瀬一郎、藤井隆、相良憲幸 QIAxcel™ Advanced System を使用した結核菌 Supply' s 15-MIRU VNTR 解析 第89回日本結核病学会総会

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

厚生労働省院内感染対策サーベイランス検査部門データを用いた感染症発生数の推定

研究分担者 山根 一和 （川崎医科大学公衆衛生学）

### 研究要旨

厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）検査部門に提出されたデータを用い、①感染症法等で指定されていないが、公衆衛生的に重要な感染症、②感染症の経年的な発生頻度の変化の評価が可能かどうか検証した。

①については、リステリア症をモデルとして人口 100 万人当たりの罹患率を推計した。②については、2011 年から小児への公費負担の始まった、肺炎球菌ワクチンを対象とし、ワクチン導入前後の患者数の変化を調べた。その結果、①4 年間のリステリア症罹患患者合計は 307 例で、推定罹患率は 1.1～1.6/100 万人で、4 年間の平均年間罹患率は 1.4/100 万人であった。②肺炎球菌感染患者数は、10 歳以上では患者数の年次推移に大きな増減は認めなかったが、0～9 歳では 2010 年（442 人）と比較し、2012 年は 37.4%（173 人）に減少した。

今回の検討で、JANIS 検査部門のデータを用い、感染症発症患者の推定や、感染症の年次推移を調べることが可能であることが明らかになった。ただし、JANIS 検査部門に提出されたデータは患者の臨床情報が付与されていないため、感染症の判定をする際、無菌的な検査材料から分離された患者を対象とするなどの工夫が必要があると考えられた。

### A. 研究目的

厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）検査部門は参加医療機関で実施された培養検査のすべてのデータを対象とし、薬剤耐性菌や臨床現場で頻繁に分離される細菌の分離頻度等を解析している。解析対象となっている菌種は限られているため、収集された多くのデータは利用されていない。そこで、本研究は JANIS 検査部門に提出されたデータを用いて、①感染症法等で指定されていないが、公衆衛生的に重要でかつ、本邦での罹患率に関する情報がほとんど求められていない感染症、②ワクチン導入が近年なされた感染症の経年的な発生頻度の変化を明らかにし、ワクチンの有効性を評価することが可能かどうかを検証する。

### B. 研究方法

①感染症法等で指定されていないが、公衆衛生的に重要でかつ、本邦での罹患率に関する情報がほとんど求められていない感染症については、リステリア症をモデルとして、人口 100 万人当たりの罹患率を推計した。まず、リステリア症の定義を血液もしくは髄液から *Listeria monocytogenes* が分離された患者とし、同一の患者 ID から複数回 *L. monocytogenes* が分離された場合は、1 例と集計した。対象期間は 2008 年から 2011 年の 4 年間とした。次に血液培養を提出した JANIS 参加医療機関の病床数の合計を病床規模別に算出し、本邦における病床規模別の総病床数に占める割合を算出した。本邦の病床規模別総病床数は、厚生労



## 働省医療施設調査の結果

(<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/79-1.html>)を用いた。次に、JANIS 参加医療機関で発生したリステリア症患者数をこの割合で除することにより、病床規模別の推定リステリア症患者数を求めた。最後に、病床規模別の推定リステリア症患者数の総和を本邦の人口で除し、100万人当たりの罹患率を推計した。

② ワクチンの導入効果の検討については、2011年から小児への肺炎球菌ワクチン接種公費負担の始まった重症肺炎球菌感染症患者を対象とした。重症肺炎球菌感染症発症患者の定義は血液もしくは髄液から *Streptococcus pneumoniae* が分離された患者とした。最初の検体から *S. pneumoniae* が分離された後、1ヵ月以内に再度分離された場合は同一の事例と判定し、それ以降に分離された場合は別の事例と判断した。対象期間は2008年1月～2012年9月とし、2012年は9ヵ月分の患者数を12ヵ月に換算し、患者数を求めた。対象医療機関は対象期間中に継続して JANIS 検査部門にデータを提出した医療機関とした。

倫理面への配慮 JANIS 検査部門データは連結可能匿名化されており、研究者が患者個人を特定することはできない。また、データは統計法第33条に基づき申請を行い、承認を得た上で研究利用した。

## C. 研究結果

① 4年間のリステリア症罹患患者合計は307例、病床規模に応じた補正を行い算出された罹患率は1.1～1.6/100万人で、4年間の平均年間罹患率は1.4/100万人であった。血液培養を提出した集計対象医療機関は426医療機関(2008年)から579医療機関(2011年)に増加した(表1)。

罹患患者数の年齢分布は、65歳以上の高齢者が236人(77.6%)とその多くを占めていた。高齢者では性別による患者数の差は認められず、その他の年代では症例数が少ないため評価できなかった(図1)。

② 対象期間中に継続してデータを提出した医療機関は236医療機関であった。2008年～2010年は年間患者数が1200人程度であったが、2011年には1046人、2012年には848人(補正後の値)と減少傾向を示した(図2)。年代別では、10歳以上では患者数の年次推移は大きな増減は認めなかったが、0～9歳では2010年(442人)と比較し、2012年は37.4%(173人)に減少し、特に、ワクチンの接種対象年齢である0歳と1歳で患者数が減少していた。(図3)。

## D. 考察

今回の検討で、JANIS 検査部門のデータを用い、感染症発症患者の推定や、感染症の年次推移を調べることによってワクチン導入効果を推定することが可能であることが明らかになった。

JANIS 検査部門では、各参加医療機関から提出されるデータは、培養検査に提出されたすべてのデータが対象となっている。しかし、採取された患者の臨床情報は付随していないため、提出された検体が、感染症を疑い採取されたものか、サーベイランス等の目的で採取されたものか、目的はわからない。また、報告された微生物が真の感染症の原因菌であるか否かも明らかではない。このため、今回の検討に用いた、髄液や血液などの無菌的材料から分離された病原体を対象とし、かつ、皮膚の常在菌(採取時に検体に誤って混入する可能性がある)ではない病原体についてのみ感染症と判定し、集計する必要があることが明らかになった。

また、JANIS 検査部門への参加は、医療機関が任意に行っているため、経年的な変化を調べる場合には、対象期間にデータを継続して提出している医療機関を対象に選定することが必要であるため、調査期間が長期になればなるほど、調査対象の医療機関が少なくなる可能性がある。

今回の検討では、人口100万人当たりの感染症罹患率を推計するために、病床数を元に補正を行っている。JANIS 検査部門に参加している医療機関は地域の医療の中核

を担う比較的病床規模の大きい医療機関が多い。前述したとおり、JANIS 検査部門の情報を用いた場合、無菌材料から病原体が分離されるような重症感染症（菌血症、髄膜炎等）を対象とするべきであり、このような重症感染症発症患者の多くは病床規模の大きい医療機関で治療を受けることが多いと推定される。このため、病床規模の大きい医療機関から推定された患者数は実際の患者数との誤差は小さいと考えられる。これと比較して、参加率の低い 300 床以下の医療機関で患者が発生した場合、実際の患者数よりも多く患者数を推定してしまう危険性がある。罹患率の推定方法には、病床数を用いる方法以外に、参加医療機関が属する 2 次医療圏の人口等を用いても推定できる可能性があり、今後の検討が必要と考えられる。

#### E. 結論

JANIS 検査部門のデータを用いることによって、感染症法では把握することができない比較的稀な感染症（特に、菌血症や髄膜炎等の重症感染症）の本邦における発生頻度の推定、ワクチン等の感染症に対する介入効果の判定ができる可能性があることが明らかになった。

#### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
  - 1) 山根一和、鈴木里和、柴山恵吾 JANIS データを利用した本邦におけるリステリア症の罹患率の推定 第 86 回日本細菌学会 幕張
  - 2) 山根一和、鈴木里和、柴山恵吾 厚生労働省院内感染対策サーベイランス検査部門データを用いた本邦におけるリステリア症の罹患率の推定 第 87 回日本感染症学会 横浜
  - 3) Kunikazu Yamane, Satowa Suzuki, Keigo Shibayama. Estimation of the

prevalence of *Listeria monocytogenes* infection in Japan by Japan nosocomial infection surveillance. 23<sup>rd</sup> ECCMID Berlin, Germany

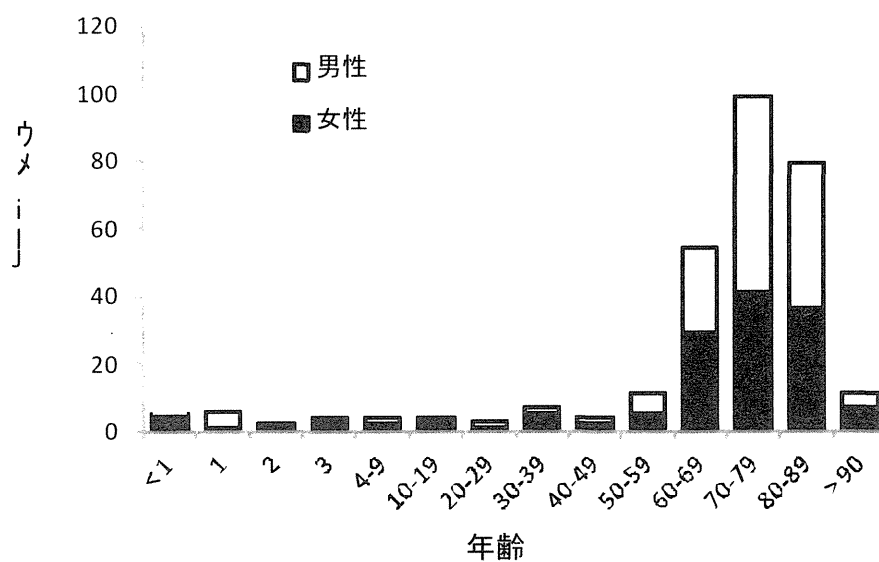
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1 推定リステリア症罹患率と JANIS 検査部門集計対象医療機関の年次推移

|                   | 2008年 | 2009年 | 2010年 | 2011年 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| 推定罹患率（/100万人・年）   | 1.06  | 1.38  | 1.58  | 1.57  |
| 推定リステリア症患者数(人)    | 135.2 | 176.0 | 202.1 | 200.9 |
| JANIS リステリア患者数(人) | 49    | 65    | 84    | 109   |
| 集計対象医療機関数         | 426   | 480   | 483   | 579   |

図1 年齢群、性別リステリア症罹患患者数（2008～2011年 n=293\*）



\*年齢、性別が明らかでない8例はグラフから除外

図2 重症肺炎球菌感染症患者数の年次推移

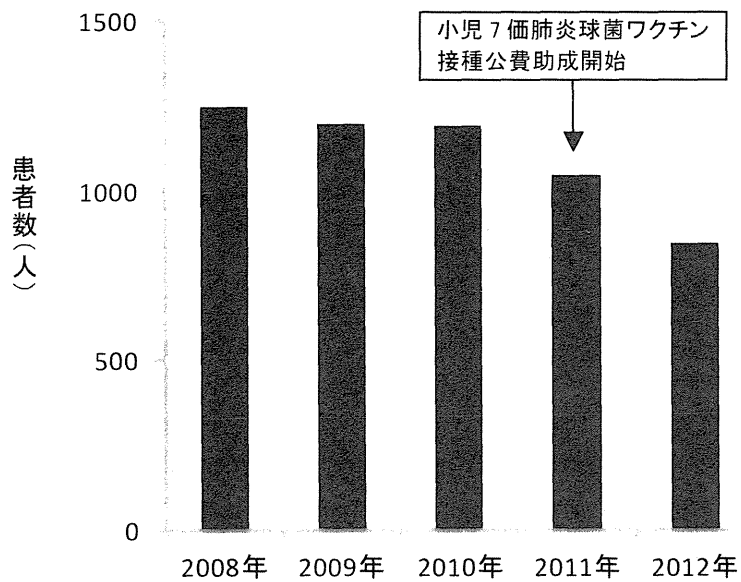
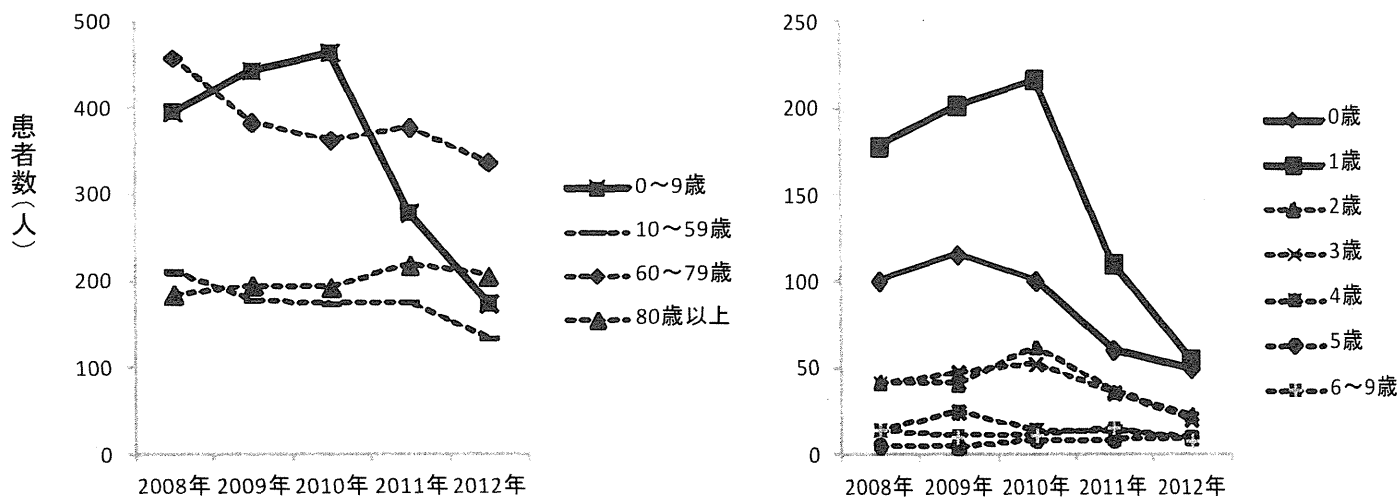


図3 年齢群別患者数の年次推移



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

グラム陽性菌の新型耐性機構に関する研究

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.

昨年度の肺炎球菌のテリスロマイシン耐性機構に関する研究成果を基に、さらに詳細な分子生物学的、生化学的研究を行い、新型耐性機構すなわち肺炎球菌の内因性 rRNA メチル化酵素の欠損がテリスロマイシン耐性を引き起こすことを明らかにした。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。一方、リネゾリドは日本ではじめて承認された VRE 感染症薬、4 番目の抗 MRSA 薬である。欧米ではすでに高度耐性を含む耐性菌の分離が報告されていることから我が国での出現と増加が懸念されている。本研究では、国内の臨床におけるリネゾリド耐性化の現況ならびに耐性機構を明らかにした。

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。テリスロマイシン (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。一方、リネゾリド (LZD) は日本ではじめて承認された VRE 感染症薬 (2001 年)、4 番目の抗 MRSA 薬 (2007 年) である。欧米ではすでに高度耐性を含む耐性菌の分離が報告されていることから我が国での出現と増加が懸念されている。これらの耐性菌の増加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 耐性化と広範なグラム陽性菌の LZD 耐性化の現況を明らかにし、新型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

1. 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% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

2. 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 測定とディスク拡散法によって評価した LZD は Pfizer より提供された。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. 2013, **57**:3789-3796)。

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) 肺炎球菌のテリスロマイシン耐性

先行した昨年度の研究により肺炎球菌において内因性 23S rRNA 修飾酵素 RlmA<sup>II</sup> による 748 位のグアニン (G748) のメチル化がケトライド系抗菌薬テリスロマイシン (TEL) の抗菌活性に深く関与することを見出した (Takaya et al., 2013, AAC 57: 3789-3796)。G748 は TEL が結合する Hairpin35 領域に存在する。そこで今年度は G748 に隣接する Hairpin35 内の U747 のメチル化の役割について検討した。まず肺炎球菌 U747 のメチル化及びその修飾酵素を同定するため *E. coli* U747 修飾酵素 RlmC のホモログを探索した。その結果、SP\_1029、SP\_1901 を得た。野生株及び各欠損株の rRNA を抽出し LC-MS/MS により解析したところ、SP\_1029 欠損株で U747 のメチル化が消失していた。このことから、肺炎球菌 23S rRNA の U747 は SP\_1029 にコードされる RlmCD によってメチル化されることが明らかとなった。RlmCD 欠損株の TEL の MIC を測定したところ、RlmCD<sup>+</sup> 株に対し 2 段階上昇した。RlmCD 欠損株での MIC 上昇に G748 修飾が関与する可能性について Primer Extension 法を行った結果、RlmCD 欠損株の G748 修飾は野生株に比べ減少していた。また、RlmCD 欠損株へ野生型 RlmA<sup>II</sup> を導入して MIC を測定したところ RlmCD<sup>+</sup> 株と同じ値を示した。

#### (2) ブドウ球菌のリネゾリド耐性

① 2014 年に国内の 1 臨床機関において分離された 6 株の LZD 耐性 coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) について耐性関連因子を解析した (表 1)。

② 耐性菌は主に 2576 位の G が U に変異していた。計算生物学的手法により、rRNA-LZD 結合のモデリングを行った結果、G2576 は、G2576-U2576-LZD ネットワークを形成するが、G2576U の変異により結合ネットワークが形成されず、LZD の rRNA への結合が阻害されると考えられた (図 1)。

③ LZD 耐性 CNS は、50S ribosome peptidyltransferase center (PTC) を形成する ribosome protein L3 に変異が生じていた。

(4) 海外で報告された耐性因子 *cfr* (gene

encoding an enzyme for methylation of the 23S rRNA at position A2503) は、すべての耐性菌で陰性であった。

表 1 国内で分離された LZD 耐性 CNS の耐性関連因子

| る CNS : coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> |                       |                            |                  |                       |
|--|-----------------------|----------------------------|------------------|-----------------------|
| strain   | species               | MIC <sub>LZD</sub> (µg/mL) | 23S rRNA domainV | L3                    |
| I-0553   | <i>S. capitis</i>     | 8                          | G2576U(※)        | Thr83Ala              |
| I-0676   | <i>S. capitis</i>     | 16                         | G2576U(※)        | Thr83Ala              |
| I-1184   | <i>S. capitis</i>     | 16                         | G2576U(※)        | Thr83Ala<br>Ala142Thr |
| 2648   | <i>S. capitis</i>     | 32                         | G2576U(※)        | Thr83Ala              |
| I-0202   | <i>S. epidermidis</i> | 4                          | U2500A           | Leu101Val             |
| I-0237   | <i>S. epidermidis</i> | 16                         | G2576U(※)        | Leu101Val             |

※ : 6 コピーの内少なくとも 1 つに変異がある

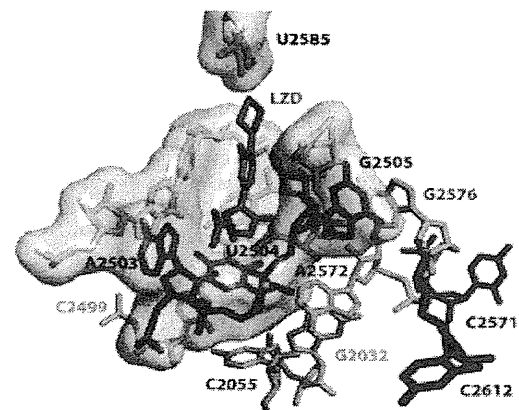


図 1 LZD と ribosome 50S subunit の結合模式 : LZD は、ribosome の A site pocket に結合して蛋白合成を阻害する。

### D. 考察

(1) RlmCD とそれに続く RlmA<sup>II</sup> による段階的な rRNA 修飾が肺炎球菌の TEL 感受性に寄与すると考えられた。

(2) 臨床より分離された LDZ 耐性 CNS の耐性機構は、23S rRNA G2576U の変異と ribosomal protein L3 の変異によるものと考えられた。

#### E. 結論

肺炎球菌は先行研究で明らかにした外来性 *ermB* メチル化酵素遺伝子の獲得と、本研究で明らかにした 23S rRNA の Hairpin35 領域の RlmCD と RlmA<sup>II</sup> メチル化システムの欠損によってもたらされることが明らかとなった。本年度の研究で解明した TEL の新型耐性機構の解明は、ケトライド耐性肺炎球菌の出現の予知情報の提供に貢献するものである。さらに本研究結果は、国内の臨床において LDZ 耐性化が進行していることを明らかにしたものであり、それらを防止する為に調査と監視を継続しつつ、実効ある対策が必要である。

#### 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<sup>II</sup> methyltransferase renders *Streptococcus pneumoniae* telithromycin-susceptible. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:3789-3796 (2013)

##### 2. 学会発表

- 1) 木村旭・高屋明子・石和田稔彦・渡邊正治・野村文夫・山本友子  
リネゾリド長期投与によるリネゾリド耐性 Coagulase-negative *Staphylococcus* の出現と耐性化機構  
第 96 回日本細菌学会関東支部総会 東京 2013
- 2) 庄司竜麻・高屋明子・鈴木勉・木村聡  
佐藤慶治・山本友子  
肺炎球菌の rRNA 段階的修飾によるテリ

スロマイシン感受性 日本細菌学会関東支部会インターラボセミナー 東京 2013

- 3) 庄司竜麻・高屋明子・佐藤慶治・山本友子  
肺炎球菌のテリスロマイシン感受性に寄与する rRNA 段階的修飾 第 86 回日本細菌学会総会 東京 2014

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

### 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  |
|---|---|-------------------------|----------------|---------------|------|
| Hagiya H, Murase T, Suzuki M, Shibayama K, Kokumai Y, Watanabe N, Maki M, and Otsuka F. | <i>Chromobacterium violaceum</i> nosocomial pneumonia in two Japanese patients at an intensive care unit.   | J Infect Chemother.     | in press       |               | 2014 |
| Suzuki M, Suzuki S, Matsui M, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K.                          | A subclass B3 metallo- $\beta$ -lactamase found in <i>Pseudomonas alcaligenes</i> .   | J Antimicrob Chemother. | In press       |               | 2014 |
| Wachino J, Matsui M, Tran HH, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K.                          | Evaluation of a Double-Disk Synergy Test with a Common Metallo- $\beta$ -Lactamase Inhibitor, Mercaptoacetate, for Detecting NDM-1-Producing <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter baumannii</i> . | Jpn J Infect Dis.       | 67(1)          | 66-8          | 2014 |
| Suzuki M, Suzuki S, Matsui M, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K.                          | Genome Sequence of a Strain of the Human Pathogenic Bacterium <i>Pseudomonas alcaligenes</i> That Caused Bloodstream Infection.   | Genome Announc.         | Oct 31<br>1(5) | e00919-<br>13 | 2013 |

|  |  |                              |        |           |      |
|--|--|------------------------------|--------|-----------|------|
| Matsui M, Shibayama K, Tsuji Y, Kamimura H, Karube Y, Yoshida M, Masuda Y, Hiraki Y, Takaki K, Kawano F. | Isolation of genetically indistinguishable carbapenem-resistant and -susceptible <i>Acinetobacter baumannii</i> Isolates from a single patient.                  | Antimicrob Agents Chemother. | 57(11) | 5781-2    | 2013 |
| Rimbara E, Mori S, Kim H, Shibayama K.   | Role of $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in the pathogenesis of <i>Helicobacter pylori</i> infection.  | Microbiol Immunol.           | 57(10) | 665-73    | 2013 |
| Rimbara E, Matsui M, Mori S, Suzuki S, Suzuki M, Kim H, Sekizuka T, Kuroda M, Shibayama K.               | Draft Genome Sequence of <i>Helicobacter fennelliae</i> Strain MR12-0050, Isolated from a Bacteremia Patient.  | Genome Announc.              | 1(4)   | e00512-13 | 2013 |
| Suzuki M, Matsui M, Suzuki S, Rimbara E, Asai S, Miyachi H, Takata T, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K.   | Genome Sequences of Multidrug-Resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> Strains from Nosocomial Outbreaks in Japan.   | Genome Announc.              | 1(4)   | e00476-13 | 2013 |
| Matsui M, Suzuki S, Suzuki M, Arakawa Y, Shibayama K.  | Rapid discrimination of <i>Acinetobacter baumannii</i> international clone II lineage by pyrosequencing SNP analyses of <i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> genes. | J Microbiol Methods.         | 94(2)  | 121-4     | 2013 |
| Rimbara E, Mori S, Kim H, Matsui M, Suzuki S, Takahashi S, Yamamoto S, Mukai M, Shibayama K.             | <i>Helicobacter cinaedi</i> and <i>Helicobacter fennelliae</i> transmission in a hospital from 2008 to 2012.   | J Clin Microbiol.            | 51(7)  | 2439-42   | 2013 |

|  |  |                         |       |        |      |
|--|--|-------------------------|-------|--------|------|
| Matsuoka M, Sasaki T, Seki N, Kobayashi M, Sawabe K, Sasaki Y, Shibayama K, Sasaki T, Arakawa Y. | Hemin-binding proteins as potent markers for serological diagnosis of infections with <i>Bartonella quintana</i> .   | Clin Vaccine Immunol.   | 20(4) | 620-6  | 2013 |
| Suzuki S, Matsui M, Suzuki M, Sugita A, Kosuge Y, Kodama N, Ichise Y, Shibayama K.               | Detection of tripoli metallo- $\beta$ -lactamase 2 (TMB-2), a variant of <i>bla</i> <sub>TMB-1</sub> , in clinical isolates of <i>Acinetobacter</i> spp. in Japan. | J Antimicrob Chemother. | 68(6) | 1441-2 | 2013 |
| Kimura K, Nagano N, Nagano Y, Wachino J, Shibayama K, Arakawa Y.                                 | Ability of the VITEK(R) 2 system to detect group B streptococci with reduced penicillin susceptibility (PRGBS)   | J Antimicrob Chemother  | 68(6) | 1442-4 | 2013 |
| Kimura K, Wachino J, Kurokawa H, Matsui M, Suzuki S, Yamane K, Nagano N, Shibayama K, Arakawa Y. | High cephalosporin resistance due to amino acid substitutions in PBP1A and PBP2X in a clinical isolate of group B <i>Streptococcus</i>                             | J Antimicrob Chemother  | 68(7) | 1533-6 | 2013 |
| Kimura K, Matsubara K, Yamamoto G, Shibayama K, Arakawa Y.                                       | 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.       | 66(2) | 158-60 | 2013 |

|   |  |                                     |           |        |      |
|---|--|-------------------------------------|-----------|--------|------|
| Kimura K, Nishiyama Y, Shimizu S, Wachino J, Matsui M, Suzuki S, Yamane K, Shibayama K, Arakawa Y | Screening for group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in clinical isolates obtained between 1977 and 2005                          | Jpn J Infect Dis.                   | 66(2)     | 158-60 | 2013 |
| Kimura K, Nishiyama Y, Shimizu S, Wachino J, Matsui M, Suzuki S, Yamane K, Shibayama K, Arakawa Y | Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamases and <i>Escherichia coli</i> Isolated from Retail Foods Including Chicken Meat in Japan | Foodborne Pathog Dis.               | 11(2)     | 104-10 | 2014 |
| Sato N, Kawamura K, Nakane K, Wachino J, Arakawa Y.   | First detection of fosfomycin resistance gene <i>fosA3</i> in CTX-M-producing <i>Escherichia coli</i> isolates from healthy individuals in Japan       | Microb Drug Resist.                 | 19(6)     | 477-82 | 2013 |
| Hattori T, Kawamura K, Arakawa Y.   | Comparison of test methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative bacteria  | Jpn J Infect Dis.                   | 66(6)     | 512-8  | 2013 |
| Kimura K, Yanagisawa H, Wachino J, Shibayama K, Arakawa Y.  | Rapid and reliable loop-mediated isothermal amplification method for detecting <i>Streptococcus agalactiae</i>   | Jpn J Infect Dis.                   | 66(6)     | 546-8  | 2013 |
| Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T.                                     | Novel 6'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase AAC(6')-Iaj from a Clinical Isolate of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .                                     | <i>Antimicrob Agents Chemother.</i> | Jan;57(1) | 96-100 | 2013 |