

201405004A

**厚生労働科学研究費補助金
厚生労働科学特別研究事業**

多剤耐性菌感染症の疫学と国内における対応策に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大石和徳

平成27年(2015) 3月

目 次

I. 総括研究報告書

- 多剤耐性菌感染症の疫学と国内における対応策に関する研究 …………… 1
大石 和徳

II. 分担研究報告書

1. 感染症発生動向調査におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌及び
薬剤耐性アシネトバクターの発生状況、2014年…………… 7
山岸 拓也 他
2. 大阪市内大規模病院におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の
長期間にわたる院内伝播 …………… 11
山岸 拓也 他
3. 関西地区の中核病院で発生したカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の
アウトブレイク事例の菌株とプラスミド解析 …………… 15
柴山 恵吾 他
4. *bla*_{IMP-6}保有プラスミドのネットワーク解析とパンゲノム解析…………… 19
黒田 誠 他
5. 関西地区の中核病院周辺医療機関より分離された
カルバペネム耐性腸内細菌科細菌のプラスミド解析 …………… 25
鈴木 里和 他
6. 関西地区の中核病院におけるMBL産生*K. oxytoca*による
院内感染事例のSNPs解析を用いた菌株間関連性に関する研究 …………… 31
石井 良和 他
7. 大阪市内で分離される腸内細菌科カルバペネム耐性菌の
分子疫学解析に関する研究 …………… 37
朝野 和典
8. 薬剤耐性淋菌の国内外の現状 …………… 42
大西 真
9. 多剤耐性菌対策に関する政策的研究…………… 47
齋藤 智也

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 53

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 57

I . 総括研究報告書

多剤耐性菌感染症の疫学と国内における対応策に関する研究

研究代表者：大石 和徳（国立感染症研究所感染症疫学センター長）

研究協力者：松井 珠乃（国立感染症研究所感染症疫学センター第一室・室長）

福住 宗久（国立感染症研究所実地疫学専門家養成コース（FETP））

研究要旨

- 感染症法の5類全数届出対象疾患となったカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: CRE）と薬剤耐性アシネトバクター感染症（Multidrug-resistant *Acinetobacter*: MDRA）に関し、2014年9月19日から同年12月31日までの感染症例の報告をまとめた。CREは317例の報告（腸内細菌科細菌以外の5例を除く）があり、分離菌は *Enterobacter* 属166例（52%）が最も多かった。男性が192例（61%）、年齢中央値は76歳（範囲0-99歳）であり、尿路感染が最も多かった。MDRAは17例の報告があり、男性が14例（82%）、年齢中央値は68歳（範囲35-89歳）であり、肺炎が最も多かった。
- 関西地区の中核病院（O病院）におけるCREによる大規模な院内感染事例が明らかになり、2014年2月21日より実地疫学調査が実施された。2013年7月1日から2014年3月15日の期間に、O病院において「採取された検体から、メタロ-β-ラクタマーゼ（Metallo-β-lactamase: MBL）産生をディスク拡散法で確認したMBL-Entが分離された入院患者」が計29症例確認された。性別は男性が20例（69%）、年齢の中央値は76歳（範囲：28-88歳）であった。外科患者において、腹部検体（腹水、腹部ドレーン先端・排液、腹部創）でMBL-Entを獲得するリスクを評価する症例対照研究を行ったところ、臍頭十二指腸切除術、透視室でのドレーン入れ替え、腹腔吸引・洗浄、腸瘻造設・使用がリスクとして認められた。
- 関西地区の中核病院で発生したCREによる大規模な院内感染に関して、国立感染症研究所で行政検査として菌株の解析を実施した。多くの株でIMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子及びCTX-M-2グループの基質拡張型β-ラクタマーゼ遺伝子が共通して検出された。パルスフィールドゲル電気泳動法によるタイピング解析の結果、*K. oxytoca*では、同一パターンの株が多くみられたため、クローナルな菌株が伝播したと考えられた。しかし一方で、*E. coli*や他のいくつかの菌種では分離された菌株の型は多様だった。これらの菌株からIMP-1型MBL遺伝子を持つプラスミドを抽出し、全塩基配列を決定し解析したところ、多くの株で bla_{IMP-6} を含むInc Nプラスミド、及びInc Nプラスミドと他のプラスミドが融合したと考えられるプラスミドが検出された。これらはお互いに高い相同性を示したため、プラスミドが菌株や菌種を超えて伝播し、その過程で少しずつ遺伝子の獲得や脱落を起こしていったと考えられた。
- 本事例の2011～2014年に分離されたCREの全プラスミドの配列解析を行った。網羅的全プラスミド解析の結果、 bla_{IMP-6} を持つプラスミドは、主にincompatibility group (Inc) Nレプリコンに属するプラスミド上に存在したが、全てのInc Nプラスミドは完全に一致するものではなく、部分的な配列の変異もしくは欠失を生じていた。また、年代が進むにつれ、Inc Nプラスミドと他のプラスミドとの融合プラスミドが生じていることも明らかにした。 bla_{IMP-6} 保有プラスミドは、Inc Nプラスミドの骨格を主体とする bla_{IMP-6} 保有プラスミドの塩基置換、挿入欠失、他のInc型との融合もしくは相同組換え、 bla_{IMP-6} を含む近傍領域の水平伝播、および、種・属を跨いだ広範なプラスミドの水平伝達が生じていたことが示唆された。
- 関西地区の中核病院周辺の9医療機関で分離された28株由来29プラスミドの解析を実施した。29プラスミドのうち、A病院分離株と同じ bla_{IMP-6} を保有するプラスミドが22個（76%）、異なる型

である *bla*_{IMP-1} を保有するプラスミドも7個(24%)分離されていた。*bla*_{IMP-6} を保有するプラスミドのうち、10個が、A病院分離株の多くが保有していた約50kbpの Inc N プラスミドであった。

- 関西地区の中核病院のCRE院内伝播事例において分離されたIMP-6産生株を含めた *K. oxytoca* 26株はSNPs解析に基づいた系統解析の結果、5つのサブクラスタに分けられた。病棟毎に特定のクローンが伝播していることが明らかとなり、菌株が収集され始めた時点で既に8系統のクローンの存在が示唆された。SNPs解析により、菌株収集期間以前からの長期に渡る院内伝播が発生していたことが明らかとなった。
- 関西地区の中核病院において、CREによる院内感染対策に *bla*_{IMP-1} 型のプライマーを用いたLAMP法による迅速スクリーニング法を導入し、陽性者のコホーティングを行った結果、新規の感染例を大幅に減少させることに成功した。
- 薬剤耐性淋菌の実態を把握するために、京都/大阪の泌尿器科クリニックにおける淋菌分離株の薬剤感受性試験を実施し、その耐性度を検討した。第一選択薬として推奨されているセフトリアキソンに対する感受性は最小発育阻止濃度(MIC) 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 以上の株が14.9%を占めていた。また、近年経口投薬可能なアジスロマイシンに対する感受性も上昇していた(耐性度14.9%)。セフトリアキシソンのMICが0.125 $\mu\text{g/ml}$ 以上の菌株が咽頭に存在する場合、その除菌が困難な場合があることが指摘されている。そのため京都大阪地域以外の現状の把握が必要である。
- 世界保健機関による薬剤耐性に関する世界行動計画の採択に伴い2年以内の国家行動計画策定が必要である。世界行動計画案(EB136/19)等の文献的レビューを行い、近年の国際的および国内の薬剤耐性に関する政策動向を検討した。国内の政策ランドスケープの整理と関係者(ステークホルダー)の可視化、統合的な政策推進母体の形成が早急に求められる。

研究分担者

- 石井良和(東邦大学医学部微生物・感染症学講座・教授)
- 大西 真(国立感染症研究所・細菌第一部・部長)
- 黒田 誠(国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長)
- 齋藤智也(国立保健医療科学院健康危機管理研究部・上席主任研究官)
- 柴山恵吾(国立感染症研究所・細菌第二部・部長)
- 鈴木里和(国立感染症研究所・細菌第二部第一室・室長)
- 朝野和典(大阪大学大学院医学系研究科感染制御学講座感染制御学・教授)
- 山岸拓也(国立感染症研究所・感染症疫学センター第一室・主任研究官)

A. 研究目的

近年、薬剤耐性菌の出現が世界的に問題となっている。2011年の世界保健デーには、WHOが『Post Antibiotic Era (抗菌薬の効かない時代)』、

2013年には米国CDCが、『薬剤耐性菌の脅威』といった標語を作り、世界的な薬剤耐性菌の蔓延について強い警戒を促している。一方、我が国においては、院内感染対策が1990年代後半に認知され始め、2000年からの10年程度で有効なシステムを構築することができたため、世界で問題となっている耐性菌、特にカルバペネム耐性細菌の出現頻度は諸外国に比べてかなり低い状況にある。

CREの地域的な広まりについては2011年以降、広島県での事例が報告されているが(Shigemoto N, et al. Diagn Microbiol Infect Dis. 72: 109-12, 2012)、その他の地域における調査研究はこれまで実施されていない。一方、海外では2000年代にオーストラリアでIMP-4メタロ- β -ラクタマーゼ遺伝子を持つプラスミドの地域的な広まりが報告されている(Peleg, AY, et al. Clin Infect Dis. 41: 1549-56, 2005)。ただし当時のプラスミド解析技術の限界により、由来を同じくするプラスミドが菌種間に拡散していたとの遺伝子学的なデータは断片的にしか得られていない。これまで耐性遺伝子の拡散において、伝達性プラスミドが重要な役割を果たしているとの指摘はあったが、

実際の臨床現場での疫学像や薬剤耐性プラスミドの水平伝達に関する調査研究は国内外においても皆無である。

2014年3月には関西地区の中核病院（O病院）において、広域抗菌薬として用いられるカルバペネム系抗菌薬に耐性を獲得した薬剤耐性菌である腸内細菌科カルバペネム耐性菌：Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) による大規模な院内感染が発生した。本事案では、入院患者に対する実際の健康被害にとどまらず、薬剤耐性菌による院内感染の拡散に対する不安が社会に広がった。このような背景から、本研究班の目的は、1) わが国の耐性菌に関する疫学的情報を集約し、薬剤耐性菌の疫学的特徴を把握すること、2) 2014年に関西地区の中核病院で発生したCRE院内感染事例の感染伝播様式を明らかにし、その可能な対応策を提示すること、3) 国内の薬剤耐性淋菌の実態を把握し、治療方法を提示することにある。

B. 研究方法

1. 疫学調査

2014年9月19日から12月31日までに報告されたMDRA感染症、CRE感染症の報告を感染症発生動向調査のデータベースから2015年2月3日（CRE）、2月10日（MDRA）に抽出し、疫学的解析を行った。

関西地区の中核病院入院中の患者より無作為に集めた検体に対し、*bla*_{IMP-1}型のプライマーを用いたLAMP法により、便、直腸スワブなどの臨床検体に対して、DNA抽出を行わずに直接遺伝子検査を実施する方法の確立を目指した。外科で手術を受け症例定義の期間に腹部創・ドレーン検体からMBL-Entが新規に検出された入院患者を症例として、症例対照研究を実施した。

2. 細菌学的解析

2011年から2014年12月に、O病院で分離されたCREで、保健所を通じて国立感染症研究所に行政検査が依頼された186株を対象とした。また、2014年3月以降、大阪市内の12の医療機関で分離され、大阪市保健所を通じて国立感染症研究所に行政検査が依頼された菌株を対象とした。また、大阪市内外ではあるが、大阪府内の医療機関において複数のCREが分離されたため、それらの株も

解析に追加した。

PCR法による薬剤耐性遺伝子の検出（担当：細菌第二部）、パルスフィールドゲル電気泳動法（pulsed-field gel electrophoresis: PFGE）によるタイピング解析（担当：細菌第二部）、S1-PFGEによるプラスミドの分離精製（担当：細菌第二部）、プラスミド断片の配列解読を行った（担当：病原体ゲノム解析研究センター）。また、プラスミド配列解析：実施した（担当：病原体ゲノム解析研究センター）。一方、2011年12月2日から2014年1月14日の期間にO病院において分離されたMBL産生*K. oxytoca* 26株および、2013年12月4日から2014年11月25日までに東邦大学医療センター大森病院において血液培養から分離された*K. oxytoca* 3株を、SNPs解析に供試した（担当：東邦大学）。

京都大阪地区の5つの泌尿器科医院において分離された淋菌株を収集した。2014年分離株は121株について解析した。比較対象として、2011、2012、2013年分離された各年度、131株、231株、236株についても利用した。また、1995-1999年分離株（神奈川衛生研究所収集株の国立感染症研究所において保存している株を使用）345株を用いた。GC寒天培地にIsoVitaleXを添加した培地を用いてEtestを使って最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。セフトリアキソン、セフィキシム、アジスロマイシンに加え、シプロフロキサシン、ペニシリンGについてもMIC測定を実施した（担当：細菌第一部）。

C. 研究結果

1. 感染症発生動向調査

2014年9月に開始された感染症発生動向調査ではCREは317例が報告され、分離菌は*Enterobacter* 属が最多で166例（52%）を占めており、次いで*Klebsiella pneumoniae*（40例、13%）、*Escherichia coli*（38例、12%）が多かった。男性が192例（61%）、年齢中央値は76歳（範囲0-99歳）であった。病型（重複有）は尿路感染症が115例と最も多く、次いで肺炎66例であった。63例が医療器具関連感染と報告されており、カテーテル関連尿路感染症40例、カテーテル関連血流感染11例、人工呼吸器関連肺炎4例、その他（末梢カテーテル感染など）10例であった。

MDRAは17例報告されており、男性が14例(82%)で、年齢中央値は68歳(範囲35-89歳)であった(表5)。病型は肺炎が11例で多数を占めていた。医療関連感染は6例報告されており、カテーテル関連尿路感染症が1例、人工呼吸器関連肺炎が2例、その他が3例であった。

2. O病院におけるCRE院内感染事例

(1) 疫学調査

O病院におけるLAMP法を用いたCRE陽性症例の検出を試みた。臨床検体を煮沸後、遠心分離を行い、その上清を用いることで、感度: 94.1% (95%CI: 74.5-99.7)、特異度: 96.5% (95%CI: 92.7-97.6)と、良好な結果を得ることができた。実際にこの検体処理方法を用い、病院内のサーベイランスを行うことで、院内感染の新規事例を大幅に減少させることに成功した。

2013年7月1日から2014年3月15日の期間に、O病院において「採取された検体から、メタロ-β-ラクタマーゼ(Metallo-β-lactamase: MBL)産生を同センターにおいてディスク拡散法で確認したMBL-Entが分離された入院患者」が計29症例が確認された。MBL-Entとしては、*Escherichia coli*、*Klebsiella oxytoca*、*Enterobacter cloacae*、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter aerogenes*の5菌種が検出された。また、プラスミドの全塩基配列解析ではIMP-6 MBL遺伝子を保有するプラスミドが確認された。外科患者において、腹部検体(腹水、腹部ドレーン尖端・排液、腹部創)でMBL-Entを獲得するリスクを評価する症例対照研究を行ったところ、臍頭十二指腸切除術、透視室でのドレーン入れ替え、腹腔吸引・洗浄、腸瘻造設・使用がリスクとして認められた。これらの所見を受けて、透視室でのドレーン入れ替え、腹腔吸引・洗浄、腸瘻造設・使用における感染対策が強化された。

(2) 細菌学的解析

検討したCRE菌株186株のうち、164株においてPCR法でIMP-1型MBL遺伝子が検出された。うち158株は、CTX-M-2グループのESBL遺伝子も検出された。IMP-1型MBL遺伝子が検出された164株の菌種内訳は、*K. pneumoniae* 56株、*K. oxytoca* 45株、*E. coli* 33株、*E. cloacae* 26株が主

体であり、2013年から2014年6月にかけての分離株は*K. oxytoca*、*E. coli*、*E. cloacae*の占める割合が増加した。*K. oxytoca*は、多くの株が類似のバンドパターンを示したのに対し、*E. cloacae*及び*K. pneumoniae*は、いくつかのクラスターに分類され、*E. coli*はほとんどの株が互いに異なるバンドパターンを示した。

プラスミド解析では、139株由来の155個のプラスミドにIMP-1型MBL遺伝子が確認され、うち153個のプラスミドでその配列は bla_{IMP-6} と一致した。また、 bla_{IMP-6} を含む153個のプラスミドのうち、144個(94%)がInc N型の配列を有していた。また、2011~2012年では、*K. pneumoniae*の bla_{IMP-6} 保有Inc N型プラスミドの検出が多かった。2013年には、*E. coli*のInc N型および*K. oxytoca*のInc N, R融合型が多く検出された。

O病院で分離されたIMP-6産生株を含めた*K. oxytoca* 26株はSNPs解析に基づいた系統解析の結果、5つのサブクラスターに分けられた。病棟毎に特定のクローンが伝播していることが明らかとなった。

大阪府内の医療機関由来45株のうち、PCRで bla_{IMP} が検出されたのは、9医療機関の30株(67%)であった。プラスミド解析を行ったのは、*K. pneumoniae* 12株、*E. coli* 10株、*E. cloacae* 5株、*Proteus mirabilis* 1株の28株であった。解析した29個のプラスミドのうち、22個(76%)が bla_{IMP-6} であり、このうち約50kbpのInc Nタイプのプラスミド(IMP-6/IncN/50kb)が10個(34%)を占めていた。残りの7個(24%)は bla_{IMP-6} であった。

淋菌株に対するセフトリアキソンのMICの分布では、1995-1999年分離株に対するセフトリアキソンMICは0.008 μg/mlにピークが存在し、0.016 μg/ml以下のMIC値を示す株は86.4%を占めた。最高のMIC値は0.125 μg/mlであり0.016 μg/ml以下のMIC値を示す株は0.9%に過ぎなかった。しかしながら、2011年以降の株のセフトリアキソンMIC値は0.063 μg/mlにピークを示し、明確な耐性度の上昇が観察された。0.016 μg/ml以下のMIC値を示す株の割合は36.1%に減少し、最高のMIC値である0.125 μg/mlを示す株は10.5%を占めた。

WHOは、加盟国に対し薬剤耐性に関する世界

行動計画案 (EB136/19) の中で、以下の5つの目標を提示している。1) 薬剤耐性についての意識を高め理解を向上する。2) 研究とサーベイランスを通じて地方衛生研究所を強化する。3) 感染の発生を抑制する。4) 抗菌薬使用を適正化する。5) 薬剤耐性に対する持続的な投資を確保する。

D. 考察

CREは広い地域から感染症患者が報告されており、今回アウトブレイクが起きた大阪近辺のみならず、国内で広く検出されていることが分かった。MDRAは国内で感染症患者の届け出数が少ないことが分かった。これは厚生労働省院内感染対策サーベイランス (JANIS) 事業全入院患者部門のデータとも合致している。また、現在の発生动向調査の届け出がmeropenem及びimipenemのMIC値を基準としていることから、CRE報告例中の耐性遺伝子保有割合を定期的に調べていくことが重要と考えられた。また、検出菌は腸内細菌科細菌の中で感染症を最も多く起こす大腸菌より*Enterobacter*属の報告が多く、耐性化傾向が腸内細菌科細菌の中でも異なっていることが推測された。

関西地区の中核病院におけるCRE院内感染事例において、LAMP法の特徴を生かして臨床検体をほぼ直接サンプルとして用いることができることを確認した。同時に感度特異度ともに優れた簡便かつ迅速な検査方法であり、スクリーニングに適していることが判明した。

IMP-6 MBL遺伝子を持つ耐性菌は過去に国内で報告されているが、検査上イミペネムに耐性を示さず検出されにくいこと、プラスミド上の耐性遺伝子が菌種を超えて水平伝達することから、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の中でも特にアウトブレイク探知が困難である。O病院において多数の症例が検出されていた外科における腹部検体MBL-Ent獲得リスクには、改善できる因子として、1) 透視室でのドレーン入れ替え、2) 腹腔吸引・洗浄、3) 腸瘻造設・使用が認められた。透視室でのドレーン入れ替えについては、処置中の手指衛生の強化が図られた。腹腔吸引・洗浄、腸瘻造設に単回使用の紙コップへの切り替えなど対策が強化された。

関西地区の中核病院におけるCRE院内感染事例の細菌学的解析から、*bla*_{IMP-6}を含む約50kbpのInc N型プラスミドが、2011年より院内で*K. pneumoniae*や*K. oxytoca*など菌種を超えて水平伝達し、それぞれの株が患者間に伝播した可能性が示唆された。さらに、本事例が発生した4年間に於いて、Inc N backboneを主体とする*bla*_{IMP-6}保有プラスミドの塩基置換、挿入欠失、他のInc型との融合もしくは相同組換え、*bla*_{IMP-6}を含む近傍領域の水平伝播、および、種・属を跨いだプラスミドの水平伝達が生じてきたことが示唆された。

また、関西地区の中核病院周辺医療機関において分離された*bla*_{IMP}陽性腸内細菌科細菌のうちの76%が*bla*_{IMP-6}であったが、O病院の事例とは異なる*bla*_{IMP-1}陽性株の存在も確認された。

0.25 µg/ml以上のMIC値を示す淋菌株は治療抵抗性を示す可能性があるという考え方はコンセンサスが得られつつある。国内ではセフトリアキソン1g静注のみでは困難であることが懸念されている。

2017年5月を目処にわが国でも薬剤耐性に関する国家行動計画の作成と進捗の報告が求められている。国家行動計画作成には、政策の現状認識、統合的な政策推進母体の形成が必要であり、また将来的には政策遂行の裏付けとなる予算措置も求められる。

E. 結論

O病院でのCREの院内アウトブレイクにおいて、*bla*_{IMP-1}型のプライマーを用いたLAMP法が院内感染対策に有用なツールとなることを示唆された。MBL-Entを獲得するリスクを評価する症例対照研究を行ったところ、臍頭十二指腸切除術、透視室でのドレーン入れ替え、腹腔吸引・洗浄、腸瘻造設・使用がリスクとして認められた。

細菌学的解析から、*bla*_{IMP-6}を含む約50kbpのInc N型プラスミドが、2011年より*K. pneumoniae*をはじめとする腸内細菌科細菌の菌種を超えて水平伝達し、それぞれの株が患者間に伝播したことが示唆された。

F. 健康危険情報

2014年3月に関西地区の中核病院において、CREが分離された患者が多数確認され、分離されたCRE株の解析の結果、多くのCRE分離株で *bla*_{IMP-6}を含むInc N型プラスミドが検出されたことから、腸内細菌科細菌の菌種を超えて水平伝達し、それぞれの株が患者間に伝播した可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamaguchi S, Akeda Y, Yamamoto N, Seki M, Yamamoto K, Oishi K, Tomono K. Origin of circulating free DNA in sepsis: Analysis of the CLP mouse model. Med Inflammation, 2015 (in press)
- 2) Hirose T, Hamaguchi S, Matsumoto N, Irisawa T, Seki M, Tasaki O, Hosotsubo H, Yamamoto N, Yamamoto K, Akeda Y, Oishi K, Tomono K, Shimuzu T. Presence of neutrophil extracellular traps and citrullinated histon H3 in the blood stream

of critically ill patients. PLoS One 9(11) e111755, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0111755.

2. 学会発表

- 1) Kanayama A, Tabuchi A, Yamagishi T, Goto K, Kobaru Y, Takano M, Morisada K, Kawahara R, Ukimura A, Kawanishi F, Matsui T, Oishi K. An outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) in a long-term care hospital in Osaka prefecture, Japan. European Scientific Conference on Applied Infectious Diseases Epidemiology. Stockholm, Sweden, November 2014.

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

Ⅱ. 分担研究報告書

感染症発生動向調査におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌及び 薬剤耐性アシネトバクターの発生状況、2014年

研究分担者：山岸 拓也（国立感染症研究所感染症疫学センター）

研究協力者：福住 宗久（国立感染症研究所実地疫学専門家養成コース（FETP））

研究要旨 2014年9月19日から感染症法の5類全数届出対象疾患となったカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: CRE）と薬剤耐性アシネトバクター感染症（Multidrug-resistant *Acinetobacter*: MDRA）に関し、同年12月31日までの感染症例の報告をまとめた。CREは317例の報告（腸内細菌科細菌以外の5例を除く）があり、分離菌は*Enterobacter*属が166例（53%）と最も多かった。菌名はアルファベット記載間違いが多数見受けられた。男性が192例（61%）、年齢中央値は76歳（範囲0-99歳）であり、尿路感染が最も多かった。また、国内の広い地域から報告されていた。MDRAは17例の報告があり、男性が14例（82%）、年齢中央値は68歳（範囲35-89歳）であり、肺炎が最も多かった。両疾患とも海外渡航の有無はほぼ全例で記載がなかった。

保菌者を含まない感染症発生動向調査では医療現場における耐性菌アウトブレイク探知は困難であり、耐性菌感染症の疾病負荷把握が第一の目的であると考えられる。感染原因・感染経路・感染地域の入力項目は疾病負荷の把握には不要であり、実際に未記載が多かった。また、医療器具関連感染や手術部位感染はどの定義に従った報告か不明であり、精度管理が重要であると考えられた。一方、市中感染か院内感染かの判断に必要な入院後48時間以内の検体からの検出か、病床数などの病院特性の情報は、より詳細な疾病負荷の把握に重要と考えられた。

A. 研究目的

グラム陰性桿菌は多彩な薬剤耐性機序を持ち、近年医療機関における薬剤耐性化が進んでおり、特にグラム陰性桿菌への抗菌薬の切り札といわれているカルバペネムに対し耐性を持つカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: CRE）が問題となっている。腸内細菌科細菌には大腸菌や肺炎桿菌など、病原性が強い細菌が含まれており、日和見感染だけでなく市中肺炎、尿路感染を引き起こす点で、他の薬剤耐性菌と比べ問題が大きい。そのため、米国疾病管理予防センター（Centers for Disease Control and Prevention）は2013年に緊急の脅威がある3つの薬剤耐性菌の一つとしてCREを定めた¹⁾。

国内では2014年3月に国立病院機構大阪医療センターにおいて、同菌による大規模なアウトブレイクが報告された²⁾。これを受けて同菌による感

染症は感染症発生動向調査5類全数報告対象疾患に定められ、2014年9月19日より報告が開始された。また、同様に国内医療機関におけるアウトブレイクが報告されている薬剤耐性アシネトバクター感染症（Multidrug-resistant *Acinetobacter*: MDRA）に関しても、5類定点把握対象疾患から5類全数報告対象疾患に変更された。

これらの薬剤耐性菌の動向は十分に明らかにされていないため、2014年末までのCRE及びMDRAの感染症発生動向調査の結果をまとめた。また、サーベイランス評価を一部加えた。

B. 研究方法

2014年9月19日から12月31日までに報告されたMDRA感染症、CRE感染症の報告を感染症発生動向調査のデータベースから2015年2月3日（CRE）、2月10日（MDRA）に抽出した。

CREの届出基準はMeropenem MIC $\geq 2\mu\text{g/ml}$ (阻止円径 $\leq 22\text{mm}$) またはImipenem MIC $\geq 2\mu\text{g/ml}$ (阻止円径 $\leq 22\text{mm}$) かつCefmetazole MIC $\geq 64\mu\text{g/ml}$ (阻止円径 $\leq 12\text{mm}$) である。MDRAの届出基準はImipenem MIC $\geq 16\mu\text{g/ml}$ (阻止円径 $\leq 13\text{mm}$) かつAmikacin MIC $\geq 32\mu\text{g/ml}$ (阻止円径 $\leq 24\text{mm}$) かつCiprofloxacin MIC $\geq 4\mu\text{g/ml}$ (阻止円径 $\leq 15\text{mm}$) であり、Imipenemは他のカルバペネム系、Ciprofloxacinは他のフルオロキノロン系でも可とされている。両疾患とも保菌患者は対象外で感染症患者のみが対象である。

本研究で用いた感染症発生動向調査のデータには個人情報が含まれるが、データ解析は国立感染症研究所内で行われ、また個人を特定できる情報を除外して利用しており、倫理上の問題が発生する恐れはない。

C. 研究結果

CREは322例が報告されており、うち5例の腸内細菌科細菌以外の報告 (*Enterococcus faecium*,

Corynebacterium 緑膿菌、*Aeromonas*, *Stenotrophomonas maltophilia* という入力) を除くと317例が該当した (表1)。分離菌は *Enterobacter* 属が最多で166例 (53%) を占めており、次いで *Klebsiella pneumoniae* (40例、13%)、*Escherichia coli* (38例、12%) が多かった (表2)。菌名の入力間違いが多数見受けられた (表3)。検査法はMeropenemで検査していた報告が176例 (55%) であり、Imipenem+Cefmetazoleのみでの報告が129例 (41%) であった。男性が192例 (61%)、年齢中央値は76歳 (範囲0-99歳) であった。病型 (重複有) は尿路感染症が115例と最も多く、次いで肺炎66例であったが、腸内細菌科細菌の医療関連感染としては考えにくい腸炎という報告も8例で認めていた。診断から報告までは中央値で3日 (範囲0-39日) であった。90日以内の海外渡航歴は1例があり (中国) という報告であったが、大多数の311例で記載がなかった。63例が医療器具関連感染と報告されており、カテーテル関連尿路感染症40例、カテーテル関連血流感染11例、人工呼吸

表1 CRE、2014年9月~2015年1月 (n=317)

性別 男性	192例 (61%)
年齢 中央値 (範囲)	76歳 (0-99)
病型 (重複あり)	尿路感染症115例 肺炎66例 菌血症/敗血症65例 胆嚢炎41例 膿・創34例 腹膜炎22例 腸炎8例 その他10例
死亡	10例
診断-報告日数 中央値 (範囲)	3日 (0-39)
90日以内の海外渡航歴	有1例 (中国) 無4例 不明1例 記載なし 311例
検体 (重複あり)	尿110例、血液75例、喀痰57例、膿・創31例、胆汁22例、腹水15例、その他18例
以前からの保菌	117例
感染経路	院内感染 7例 医療器具関連感染 63例 : BSI11例、CAUTI40例 VAP4例 その他10例 手術部位感染 45例

表2 CRE分離菌

菌名	総数	割合
<i>E. cloaca</i>	94	30%
<i>E. aerogenes</i>	72	23%
<i>K. pneumoniae</i>	40	13%
<i>E. coli</i>	38	12%
<i>S. marscecens</i>	9	3%
<i>C. freundii</i>	7	2%
その他	35	11%
未記入	22	7%

検査法	Meropenem	99 (31%)
	Imipenem+Cefmetazole	129 (41%)
	両者	77 (24%)
	記載無し	12 (4%)

表3 CRE菌名誤記入の例

E.Colt	Enterobacter cloaceae
E - C o l i (全角)	Enterobacter aeroghes
Escherichia Cori	Enterobacter doacae
K.pneamohiae	Enb.aerogenes
kiesbiella pneumoniae	E.uerogenes
klesbsiella oxytoca	E nterobacter cerogenes
klebsiella pneymoniae	コリネバクテリウム
カルバペナム耐性koxytoca	Mefallo-beta-luctamase産生E10F
Enterbacter cloacae	メタロβラクタマーゼ産生菌
Enterobocter Cloacae	CRE
Enterobacter gerogenes	腸内細菌科細菌以外の5報告
Enterobacter aerogehes	Enterococcus faecium
Enterobactor agerogenes	Corynebacterium
Enterobacter aeragenes	緑膿菌
Enterobacter eloecre	Aeromonas
	Stenotrophomonas maltophilia

表4 CRE地理的分布

地域	医療機関数	患者数	医療機関当たり報告数
北海道東北	11	14	1 - 2
関東	60	115	1 - 8
東海北陸	34	57	1 - 8
近畿	45	69	1 - 5
中国四国	24	34	1 - 5
九州	20	28	1 - 6

報告ゼロ

山形県、新潟県、岐阜県、和歌山県、鳥取県、島根県、徳島県、熊本県、大分県

表5 MDRA、2014年9月～2015年1月(n=17)

性別 男性	14例 (82%)
年齢 中央値 (範囲)	68歳(35-89)
病型 (重複あり)	肺炎 11例 腹膜炎 1例 菌血症/敗血症 2例 尿路感染症 1例 その他 5例
死亡	0例
診断-報告日数 中央値 (範囲)	3日 (0-39)
90日以内の海外渡航歴	有 0例 無 9例 記載なし 6例
検体	血液3例、ドレーン排液1例、喀痰12例、尿1例
以前からの保菌	9例
感染経路 院内感染	3例
医療器具関連感染	CAUTI 1例 VAP2例 その他3例
手術部位感染	1例

表6 MDRA地理的分布

地域	医療機関数	患者数	医療機関当たり報告数
北海道東北	3	3	1
関東	11	12	1 - 2
東海北陸	0	0	0
近畿	1	1	1
中国四国	1	1	1
九州	0	0	0

器関連肺炎4例、その他(末梢カテーテル感染など)10例であった。地理的には14例の北海道東北地方から115例の関東地方まで全国から報告され

ていたが、山形県、新潟県、岐阜県、和歌山県、鳥取県、島根県、徳島県、熊本県、大分県からは報告を認めなかった(表4)。

MDRAは17例報告されており、男性が14例(82%)で、年齢中央値は68歳(範囲35-89歳)であった(表5)。病型は肺炎が11例で多数を占めていた。診断から報告までは中央値で3日(範囲0-39日)であった。医療関連感染は6例報告されており、カテーテル関連尿路感染症が1例、人工呼吸器関連肺炎が2例、その他が3例であった。関東地方から11例が報告されていた(表6)。

D. 考察

CREは広い地域から感染症患者が報告されており、今回アウトブレイクが起きた大阪近辺のみならず、国内で広く検出されていることが分かった。これらCRE報告例の中での耐性遺伝子保有割合を適切なサンプルで定期的に調べていくことが重要と考えられた。検出菌は腸内細菌科細菌の中で感染症を最も多く起こす大腸菌より *Enterobacter* 属の報告が多く、耐性化傾向が腸内細菌科細菌の中でも異なっていることが推測された。菌名には腸内細菌科細菌ではない菌が5つ含まれていた。また、菌名のアルファベットの間違いも多数見受けられた。英語表記が中心で多種におよぶ菌名は、臨床医や地方自治体担当者にわかりづらいため、届出・データ入力方法に工夫が必要と考えられた。感染症としては尿路感染症が多数を占めており、一般的な腸内細菌科細菌と特徴は変わらないと考えられた。医療器具関連感染症や手術部位感染はしばしば米国医療安全ネットワークの定義が使われているが、どの定義に従った報告かは不明であり、本調査の情報を信頼できる情報として発信していくためには、報告の精度管理が必要と考えられた。海外渡航歴の有無は国内で発生した感染症課の判断に重要な情報であり、自由記載項目(欄)ではないため報告を徹底すべき項目

であるが、ほとんど全ての報告で記載を認めなかった。報告用紙の中で、多くの列挙されている項目に埋まってしまっており、臨床医に重要性が認識されていないものと考えられた。

MDRAは国内での感染症患者の届出数が少ないことが分かった。これは厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)事業全入院患者部門のデータとも合致している。報告が少ないためその特徴を把握することは難しいが、関東地方に集中していた。

感染症発生動向調査は感染症患者のみを対象にしているため、両疾患とも医療現場における耐性菌アウトブレイク探知は困難であり、耐性菌感染症の疾病負荷把握が第一の目的であると考えられる。感染原因・感染経路・感染地域の入力項目は疾病負荷の把握には不要であり、実際に未記載が多かった。一方、市中感染か院内感染かの判断に必要な入院後48時間以内の検体からの検出か、病床数などの病院特性の情報こそがより詳細な疾病負荷の把握に重要と考えられた。

E. 参考文献

- 1) Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013.
- 2) IASR Vol. 35. p. 290-291: 2014年12月号

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし

大阪市内大規模病院におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の 長期間にわたる院内伝播

研究分担者：山岸 拓也（国立感染症研究所感染症疫学センター）

研究協力者：伊東 宏明（国立感染症研究所実地疫学専門家養成コース（FETP））

福住 宗久（国立感染症研究所実地疫学専門家養成コース（FETP））

鈴木 里和（国立感染症研究所細菌第二部）

松井 真理（国立感染症研究所細菌第二部）

柴山 恵吾（国立感染症研究所細菌第二部）

黒田 誠（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター）

関塚 剛史（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター）

山下 明史（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター）

朝野 和典（大阪大学医学部附属病院感染制御部）

松井 珠乃（国立感染症研究所感染症疫学センター）

大石 和徳（国立感染症研究所感染症疫学センター）

研究要旨 2010年7月に大阪市内大規模病院（O病院）においてカルバペネムを含む複数の抗菌薬に耐性を示すメタロ- β -ラクタマーゼ（Metallo- β -lactamase: MBL）産生腸内細菌科細菌（MBL-producing *Enterobacteriaceae*: MBL-Ent）の *Klebsiella pneumoniae* が分離され、症例を「O病院に2013年7月1日から2014年3月15日の期間に入院しており、入院中に採取された検体から、MBL産生を同センターにおいてディスク拡散法で確認したMBL-Entが分離された患者」と定義したところ、計29症例が確認された。性別は男性が20例（69%）、年齢の中央値は76歳（範囲：28～88歳）であった。MBL-Entとしては、*Escherichia coli*、*Klebsiella oxytoca*、*Enterobacter cloacae*、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter aerogenes* の5菌種が検出された。検体採取時の主な診療科は外科15例（52%）、脳外科4例（14%）であり、主な分離検体は腹部創・ドレーン12例（41%）、尿9例（31%）であった。20例（69%）が手術を受けており、入院後比較的長期間（中央値22日）を経てMBL-Entが検出されていた。プラスミドの全塩基配列解析を実施したところ、菌種やPFGEのパターンが一致しない菌株においても、IMP-6 MBL遺伝子を保有し、それ以外の遺伝子構造も共通のプラスミドを保持していた。外科患者において、腹部検体（腹水、腹部ドレーン先端・排液、腹部創）でMBL-Entを獲得するリスクを評価する症例対照研究を行ったところ、臍頭十二指腸切除術、透視室でのドレーン入れ替え、腹腔吸引・洗浄、腸瘻造設・使用がリスクとして認められた。IMP-6 MBL遺伝子を持つ耐性菌は、検査上イミペネムに耐性を示さず検出されにくいこと、プラスミド上の耐性遺伝子が菌種を超えて水平伝達することから、大阪近郊を含めた国内での検出状況を把握し、適切に予防策を行っていく必要がある。

A. 研究目的

2010年7月に大阪市内大規模病院（O病院）においてカルバペネムを含む複数の抗菌薬に耐性を示すメタロ- β -ラクタマーゼ（Metallo- β -lactamase: MBL）産生腸内細菌科細菌（MBL-producing *Enterobacteriaceae*: MBL-Ent）の *Klebsiella*

pneumoniae が分離され、その後も複数の診療科、病棟、種々の検体から複数菌種のMBL-Entが分離された。病院の対策にも関わらず新規症例の発生が続いたため、報告を受けた大阪市保健所とともに2014年2月21日より実地疫学調査を行った。ここでは、本調査で行った直近半年の症例に絞っ

た記述、及び症例が集積していた外科患者において、腹部検体（腹水、腹部ドレーン尖端・排液、腹部創）でMBL-Entを獲得するリスクを評価する症例対照研究について紹介する。

B. 研究方法

症例を「O病院に2013年7月1日から2014年3月15日の期間に入院しており、入院中に採取された検体から、MBL産生を同センターにおいてディスク拡散法で確認したMBL-Entが分離された患者」と定義した。そして、疫学的リンクを「当該症例でMBL-Entが分離された培養施行前に同一菌種のMBL-Ent分離症例と1日以上同病棟滞在歴があること」とした。

<症例対照研究>

外科では術後の腹部創・ドレーン検体からのMBL-Ent分離が多数であったため、「外科患者では、手術または術前・術後管理における医療行為を介して、腹部創やドレーン周辺にMBL-Entを獲得した」という仮説を立て、症例対照研究を行った。症例対照研究の症例は外科で手術を受け症例定義の期間に腹部創・ドレーン検体からMBL-Entが新規に検出された入院患者とした。また対照は外科で手術を受け、同期間に腹部創・ドレーン検体からMBL-Ent以外の腸内細菌科細菌が検出され、かつ他の部位も含めMBL-Entが検出されなかったものとした。症例対照比は1:2とした。

本研究は感染症法における実地疫学調査として大阪市が行った調査をもとにしており、患者個人から同意を得てはならず、倫理審査も不要である。しかし、個人が同定できる情報は国立感染症研究所で厳重に管理し、匿名化して解析されている。

C. 結果

計29症例が確認された。性別は男性が20例(69%)、年齢の中央値は76歳(範囲:28~88歳)であった。MBL-Entとしては、*Escherichia coli*、*Klebsiella oxytoca*、*Enterobacter cloacae*、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter aerogenes*の5菌種が検出された。検体採取時の主な診療科は外科15例(52%)、脳外科4例(14%)等であり、分離検体は腹部創・ドレーン12例(41%)、尿9例

(31%)等であった。20例(69%)が手術を受けており、入院後比較的長期間(中央値22日)を経てMBL-Entが検出されていた。18症例(62%)で疫学的リンクを認め、その多くは外科症例であった。29症例の内、調査時に解析可能であった25症例27菌株が国立感染症研究所細菌第二部で解析された。27菌種の内訳は、*E. coli*が9株と最も多く、次いで*K. oxytoca* 8株、*E. cloacae* 7株、*K. pneumoniae* 3株であった。パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-field gel electrophoresis: PFGE)によるタイピングでは、*K. oxytoca* 8株、*E. coli* 2株、*E. cloacae* 2株ではそれぞれのバンドパターンが同一又は類似の菌株であり、同一の遺伝的背景を持つ株であることが示唆された。また、調査時に解析可能であった17症例18菌株のプラスミドの全塩基配列解析を実施したところ、菌種やPFGEのパターンが一致しない菌株においても、IMP-6 MBL遺伝子を保有し、それ以外の遺伝子構造も共通のプラスミドを保持していた。院内視察では全病棟でドレーン・胃管排液、尿の回収に用いられていたプラスチック製容器が、洗浄消毒が不十分なまま複数の患者で共有されていた。また、ガーゼ交換等の外科処置における手指衛生は十分でなかった。

<症例対照研究>

症例13例、対照24例が該当し、両群では年齢、性別、観察期間に差を認めなかった。腹部創・ドレーン検体でのMBL-Ent獲得と関連していたのは、臍頭十二指腸切除術(オッズ比(Odds Ratio: OR) 5.8、95%信頼区間(confidence interval: CI) 1.2-27.0、p値0.03)、透視室でのドレーン入れ替え(OR計算不可、p値<0.01)、腹腔吸引・洗浄(OR7.7、95%CI 1.4-42.6、p値0.02)、腸瘻造設・使用(OR6.1、95%CI 1.4-27.0、p値0.03)であった(表)。

D. 考察

本事例は高度医療を担う大規模病院において数年間続いている、IMP-6 MBL遺伝子を持つ複数菌種のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌による院内感染事例であった。プラスミドによる耐性遺伝子伝達が一因となったアウトブレイクの報告は国内で2例目である¹⁾。IMP-6 MBL遺伝子を持つ

表 腹部創・ドレーン検体でのメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌獲得リスク

リスク因子	症例 n=13	(%)	中央値 (範囲)	対照 n=24	(%)	中央値 (範囲)	オッズ比	95%信頼区間	p
年(歳)			72(52-88)			71(46-89)			0.92
性(男)	10	(77)		15	(63)		2	0.4	9.3
ASAスコア			2(1-3)			2(2-3)			0.2
糖尿病	1	(8)		2	(8)		0.9	0.1	11.2
プロトンポンプ阻害剤	10	(77)		19	(80)		0.9	0.2	4.4
6か月以内の内視鏡検査	10	(77)		16	(67)		1.7	0.4	7.8
症例との同室歴	7	(54)		10	(42)		1.6	0.4	6.4
集中治療室(ICU)入室	10	(77)		16	(67)		1.7	0.4	7.8
ICU入室期間(日数)			2(0-76)			1(0-16)			0.58
臍頭十二指腸切除	7	(54)		4	(17)		5.8	1.2	27.0
手術部位感染症	13	(100)		19	(80)		-	-	-
創洗浄	6	(46)		7	(29)		2.1	0.5	8.5
手術時ドレーン挿入本数			2(0-5)			2(0-4)			0.38
ドレーン入れ替え回数(日数)			2(0-8)			0.5(0-6)			0.79
透視室でのドレーン入れ替え	13	(100)		13	(54)		-	-	-
腹腔吸引・洗浄	11	(85)		10	(42)		7.7	1.4	42.6
動脈ライン	13	(100)		19	(80)		-	-	-
中心静脈ライン	11	(85)		15	(63)		3.3	0.6	18.4
腸瘻造設・使用	8	(62)		5	(21)		6.1	1.4	27.0
人工肛門	1	(8)		10	(42)		0.1	<0.1	1.0
経管栄養	7	(54)		8	(33)		2.3	0.6	9.3
カルバペネム使用	3	(23)		10	(42)		0.4	0.1	1.9
培養回数			7(1-10)			7.5(1-23)			0.38
観察期間(日数)			20(4-244)			17(2-88)			0.77

ASA : American society of anesthesiology 米国麻酔科学会

耐性菌は過去に国内で報告されているが^{2,3)}、(1) 検査上イミペネムに耐性を示さず検出されにくいこと、(2) プラスミド上の耐性遺伝子が菌種を超えて水平伝達することから、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の中でも特にアウトブレイク探知が困難である。

多数の症例が検出されていた外科における腹部検体MBL-Ent獲得リスクには、改善できる因子として、①透視室でのドレーン入れ替え、②腹腔吸引・洗浄、③腸瘻造設・使用が認められた。①は日常的に汚染がありえた状況が観察で確認され、その後看護師が常に介助につくよう処置が切り替わり、手指衛生の強化が図られた。②、③はともに前述の回収用容器が使用されており、同容器は廃止され、単回使用の紙コップに切り替わった。これらの対策の評価を行うため、今後症例が減少するかどうか経過を見ていく必要がある。

本事例を受けて2014年9月19日からカルバペネム耐性腸内細菌科細菌が感染症法における5類全数報告対象疾患となった。今後大阪市近辺以外でどの程度MBL-Entが広がっているかが明らかになる可能性がある。しかし、本サーベイランスは感染症発症患者に限定した報告であり、保菌患者を含めたMBL-Entの広がりを明らかにするためには、無症状患者を含めたサンプリングで検査を行う必要がある。

本調査研究には以下の制約がある。まず、対照となったのは2013年7月以降の入院患者であり、その前の患者は十分把握できていない。実際にMBLは2010年から大阪医療センターでスクリーニングされるようになり、そのころから院内で確認されていた。次に、症例対照研究では腹部検体以外の検体における獲得リスクは評価できていない。

E. 参考文献

- 1) 安部朋子, 永田由美, 青木知信, 他. プラスミド水平伝達が関与した院内感染事例. IASR. 2014; 35: 289-290.
- 2) Yano H, Kuga A, Okamoto R. et al. Plasmid-encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(5): 1343-1348.
- 3) Shigemoto N, Kuwahara R, Kayama S, et al. Emergence in Japan of an imipenem-susceptible, meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaIMP-6. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 72(1): 109-112.

F. 研究発表

- 1) Kanayama A, Tabuchi A, Yamagishi T,

Goto K, Kobaru Y, Takano M, Morisada K, Kawahara R, Ukimura A, Kawanishi F, Matsui T, Oishi K. An outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) in a long-term care hospital in Osaka prefecture, Japan. European Scientific Conference on Applied Infec-

tious Diseases Epidemiology. Stockholm, Sweden, November 2014.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし

関西地区の中核病院で発生したカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の アウトブレイク事例の菌株とプラスミド解析

研究分担者：柴山 恵吾（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）

研究協力者：鈴木 里和（国立感染症研究所・細菌第二部第一室・室長）

松井 真理（国立感染症研究所・細菌第二部第一室・主任研究官）

黒田 誠（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長）

関塚 剛史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）

山下 明史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）

研究要旨 平成26年3月に関西地区の中核病院でカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*; CRE）による大規模な院内感染が起きていることが明らかになり、国立感染症研究所で行政検査として菌株の解析を実施した。多くの株でIMP-1型メタロ- β -ラクタマーゼ遺伝子及びCTX-M-2グループの基質拡張型 β -ラクタマーゼ遺伝子が共通して検出された。パルスフィールドゲル電気泳動法によるタイピング解析の結果、*K. oxytoca*では、同一パターンの株が多くみられたため、クローナルな菌株が伝播したと考えられた。しかし一方で、*E. coli*や他のいくつかの菌種では分離された菌株の型は多様だった。これらの菌株からIMP-1型MBL遺伝子を持つプラスミドを抽出し、全塩基配列を決定し解析したところ、多くの株で bla_{IMP-6} を含むInc Nプラスミド、及びInc Nプラスミドと他のプラスミドが融合したと考えられるプラスミドが検出された。これらはお互いに高い相同性を示したため、プラスミドが菌株や菌種を超えて伝播し、その過程で少しずつ遺伝子の獲得や脱落を起こしていったと考えられた。プラスミドの塩基配列の解析から、本事例では少なくとも2011年から bla_{IMP-6} を含むInc Nプラスミドを有する*Klebsiella pneumoniae*の患者間伝播が起こり、途中で*Enterobacter cloacae*や*Escherichia coli*などの他菌種へプラスミドが水平伝達したことが、*Klebsiella oxytoca*ではInc NプラスミドにInc Rプラスミドが融合したと考えられるプラスミドが水平伝達し、これらの株が患者間で伝播した可能性が示唆された。2014年後半には、分離菌株数が減少傾向に転じ、本研究での解析が院内感染事例の探知の一助となった。

A. 研究目的

近年、世界中でカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*）の増加が問題となっている。我が国では、平成26年9月より、CRE感染症が感染症法に基づく感染症発生動向調査の5類全数把握疾患に追加された。平成26年3月に、関西地区の中核病院（以下、O病院）でカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の院内感染が発生していることが明らかになり、地域保健所より国立感染症研究所細菌第二部にCRE菌株の行政検査が依頼された。同病院で

2011年5月から2014年12月にかけて142名の患者より分離されたCRE 186株が送付された。菌種は、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca*、*Escherichia coli*、*Enterobacter cloacae*、*Citrobacter freundii*、*Enterobacter aerogenes*だった。薬剤耐性遺伝子のスクリーニングの結果、186株のうち158株でIMP-1型メタロ- β -ラクタマーゼ（metallo- β -lactamase: MBL）遺伝子及びCTX-M-2グループの基質拡張型 β -ラクタマーゼ（Extended-spectrum β -lactamase: ESBL）遺伝子が検出された。菌種は異なっているが、共通の

薬剤耐性遺伝子を保有する株の集積が認められた。IMP-1型MBL遺伝子が検出された株のうち、20株のプラスミド塩基配列を解析した結果、共通の配列を有していたことから、本事例ではIMP-1型MBL遺伝子を持つプラスミドを有する菌が伝播したことに加え、菌種間でプラスミドの水平伝達がおこり薬剤耐性が拡散した可能性が示唆された。本研究では、この病院におけるIMP-1型MBL遺伝子の動態をより詳細に評価するために、収集された株186株全てを対象に、プラスミド遺伝子解析を実施した。

B. 研究方法

1. 解析菌株

2011年から2014年12月に、O病院で分離されたCREで、保健所を通じて国立感染症研究所に行政検査が依頼された186株を対象とした。

菌種の内訳は、*K. pneumoniae* 57株、*K. oxytoca* 53株、*E. coli* 41株、*E. cloacae* 31株、*C. freundii* 3株、*E. aerogenes* 1株であった。

2. 解析方法

PCR法による薬剤耐性遺伝子の検出: IMP-1型MBL遺伝子及び、CTX-M-1グループ、CTX-M-2グループ、CTX-M-9グループのESBL遺伝子をPCR法で検出した。(担当：細菌第二部)

パルスフィールドゲル電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE) によるタイピング解析: 2013年7月以降の分離株を対象に、*K. pneumoniae*、*K. oxytoca*、*E. coli*、*C. freundii*は、制限酵素 *Xba*I、*E. cloacae*は制限酵素 *Spe*I で切断し、バンドパターンを比較した。(担当：細菌第二部)

S1-PFGEによるプラスミドの分離精製: DNAプラグをS1 nuclease処理後、電気泳動にてプラスミド断片を分離した。確認できた全てのプラスミド断片を回収し、DNAを抽出した。(担当：細菌第二部)

プラスミド断片の配列解読: 回収したプラスミド断片のDNAライブラリーは、Nextera XT ライブラリーキット (Illumina) を用いて作成した。その後、MiSeq (Illumina) にて300×300 merのpaired-end解読を行った (担当：病原体ゲノム解析研究センター)。

プラスミド配列解析: 得られたMiSeq解読リードは、A5 MiSeqもしくはA5 assemblerを用いて *de novo* assembleを行った。得られたcontigから *progid*alを用いてORF抽出を行った。PCR-based replicon typing (PBRT) 法によるInc typing及び薬剤耐性遺伝子の確認は、BLASTN及びTBLASTNにてそれぞれ行った。S1処理後に回収したプラスミドのサイズに対するtotal contig sizeの比率が0.5~1.5の範囲に含まれない解読サンプルは、解析から除外した。(担当：病原体ゲノム解析研究センター)。

(倫理面への配慮)

菌株分離患者の個人情報、国立感染症研究所へは送付されていない。遺伝子配列解析は分離菌株のみが対象であり、患者の遺伝子情報は含まれない。従って、患者個人が特定できる情報は本研究では一切扱っていない。

C. 研究結果

1. PCR法による薬剤耐性遺伝子の検出

送付菌株186株のうち、164株においてPCR法でIMP-1型MBL遺伝子が検出された。うち158株は、CTX-M-2グループのESBL遺伝子も検出された。IMP-1型MBL遺伝子が検出された164株の菌種内訳は、*K. pneumoniae* 56株、*K. oxytoca* 45株、*E. coli* 33株、*E. cloacae* 26株、*C. freundii* 3株、*E. aerogenes* 1株であった。図1にIMP-1型MBL遺伝子が検出された164株の分離年及び菌種の内訳を示す。2011年、2012年の分離株は、*K. pneumoniae*が多かったが、2013年から2014年6月にかけての分離株は*K. oxytoca*、*E. coli*、*E. cloacae*の占める割合が増加した。

2. PFGEによるタイピング解析

分離菌株の遺伝的背景を検討するため、2013年7月以降の分離株を対象にPFGEによるタイピング解析を実施した。*K. oxytoca*は、多くの株が類似のバンドパターンを示し、共通の遺伝的背景を有する株が患者間に伝播した可能性が示唆された。*E. cloacae*及び*K. pneumoniae*は、いくつかのクラスターに分類され、*E. coli*はほとんどの株が互いに異なるバンドパターンを示した。以上の結果より、*K. oxytoca*を含め一部の菌株で同一の遺伝的背景を有する株の伝播が示唆されたもの