

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌の サーベイランスに関する研究

分担課題 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 副部長 / 検査部門長）

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（東京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）、大花 昇（福島県立医科大学）
柳沢 英二（ミロクメディカルラボラトリー）

研究要旨

本研究では、JANIS データからの CRE 検出状況および JANIS データの要確認データの検証を行った。CRE 検出率は 0.3%～9.4%であったが、感染症法で定義されている判定薬剤 MEPM と IPM+CMZ および測定機種で乖離があり、CRE 判定における薬剤感受性検査結果のみの限界、機種間差、そして判定基準の見直しが必要と考えられた。MRSA のリネゾリド（LZD）の測定器種別データおよび *Stenotrophomonas maltophilia* の IPM の薬剤感受性成績について検討し、測定機種による乖離や特定施設による誤報告が認められた。また、アミノグリコシド耐性株における 16S rRNA メチラーゼ遺伝子の保有状況について測定し、2008 年の分離株の検討とほぼ同様で増加傾向は認められなかった。

A. 研究目的

現在、薬剤感受性検査の各施設における精度管理の現状や自動細菌検査装置の機種によるデータ傾向が正確に把握出来ていない。また、微生物検査室で検査すべき薬剤耐性菌の種類や検査方法についてのガイドや指針が無く、各施設で検出できる薬剤耐性菌が異なっている現状である。さらに、JANIS データの薬剤感受性成績からでは検出状況が判断できない基質特異性拡張型ラクタマーゼ（ESBL）産生菌やカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）薬剤耐性菌など検出状況が把握できていないものもある。

今回我々は、薬剤感受性検査における精度管理および検出法の確立と普及、そして検査室で一般的に実施していない薬剤耐性菌の検出状況把握を行うことを目的とし、

特に CRE の検出状況等について検討した。また、アミノグリコシド耐性株における 16S rRNA メチラーゼ遺伝子の保有状況についても検討した。

B. 研究方法

1. JANIS データからの CRE 検出状況

2014 年 4 月～5 月に JANIS 検査部門に報告された *Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter cloacae*、*Citrobacter freundii*、*Serratia marcescens*、*Proteus mirabilis* のうちメロペネム（MEPM）or/and イミペネム（IPM）とセフメタゾール（CMZ）の MIC 値が入力されている菌株を対象とした。

なお、MIC 値が MEPM 2 μ g/mL、IPM 2 μ g/mL、CMZ 64 μ g/mL を CRE とした。

2. JANIS データの要確認データの検証

今年度は、MRSA のリネゾリド (LZD) の測定器種別データおよび *Stenotrophomonas maltophilia* の IPM の薬剤感受性成績について検討した。

3. アミノグリコシド耐性株における 16S rRNA メチラーゼ遺伝子の保有状況

我々の開発した LAMP 法による 16S rRNA methylase genes (*rmtA*, *rmtB* および *armA*) の保有状況について検討を行った。

東北大学病院、山形大学病院およびミロクメディカルラボラトリーの 3 施設において 2013 年 8 月から 2014 年 5 月までの期間に分離された *Enterobacteriaceae* 1,873 株、*P. aeruginosa* 399 株、*Acinetobacter* spp. 177 株、合計 2,449 株中、アミノグリコシド (ゲンタマイシン; GM or/and アミカシン; AMK) 耐性であった *Enterobacteriaceae* 41 株、*P. aeruginosa* 11 株、*Acinetobacter* spp. 7 株の合計 59 株を収集した。なお、薬剤感受性の判定基準は、CLSI M100 S-18 に準じ、GM 16 μ g/mL および AMK 64 μ g/mL を耐性と判定した。

LAMP 法の操作法は、Loopamp DNA amplification kit (Eiken Chemical Co., Ltd.) を用いた。Loopamp reaction tube に、2 \times reaction mixture 12.5 μ L、各プライマー 1 μ L ずつ、Bst-DNA polymerase 1 μ L、検体菌株を 95、10 min で抽出し遠心して得た上清液 2 μ L、Loopamp fluorescent detection reagent 1 μ L、蒸留水 2.5 μ L を入れ、65、60 min 反応し、目視判定を行った。

倫理面への配慮

1 および 2: JANIS データ使用に関しては、統計法第 33 条に基づく調査票情報の利用に係る誓約書を厚生労働大臣に提出し承認を得ている。

3: 提供を受けた菌株に添付される情報は、菌種名および薬剤感受性検査成績のみであり、臨床データなどの情報提供は受けていない。

C. 研究結果

1. JANIS データからの CRE 検出状況

(1) 集計菌株数

各菌種の菌株数は表 1 に示した通りであった。感染症法の CRE 判定に必要な MEPM または IPM の 2 μ g/mL が判定できない、すなわち感染症法の CRE が判定不能な菌株が菌種により異なるが、10% ~ 15% 存在した。

(2) 判定不能菌株の推移 (図 1)

MEPM の 2 μ g/mL が判定不能な株数を 2013 年 4 月と 2014 年 4 月で比較した結果、判定不能菌株数がほぼ半減していた。

(3) 菌種別 CRE 検出状況

実際の菌種別 CRE 検出割合を表 2 および図 2 に示した。*E. cloacae* の IPM による判定は約 10% と他と比較して高い結果となった。他の菌種では 0.03% ~ 2.4% の検出率であった。また、*E. coli*、*K. pneumoniae*、*P. mirabilis* の ESBL 産生が多い菌種では MEPM による判定の方が IPM による判定よりも検出率が高い結果となった。一方、*E. cloacae*、*C. freundii*、*S. marcescens* など AmpC を持つ菌種に関しては MEPM による判定の方が IPM による判定より検出率が低い結果となった。また、MEPM、IPM 両薬剤の MIC 値を測定している菌株についても同様の傾向があった。

(4) 測定器種別の CRE 検出率 (表 3)

測定機器別に CRE の検出割合を比較した結果、測定機器 12 が他の機器と比較し検出率が高い結果となった。

2. JANIS データの要確認データの検証

(1) MRSA における LZD の薬剤感受性の測定機種別による成績

MRSA における LZD の薬剤感受性の測定機種 (方法) 別の成績を表 4 に示した。測定方法によって耐性率が 0% から 12.2% であった。

(2) *S. maltophilia* の IPM の薬剤感受性成績

S. maltophilia における IPM の薬剤感受性成績は、2014 年 4 月に検出された 225 施設中 211 施設はすべて耐性であったが、13 施設はすべて感受性と報告されていた。

また、13 施設のうち 11 施設での測定機種は同一の機種であった。

3. アミノグリコシド耐性株における 16S rRNA メチラーゼ遺伝子の保有状況 (表 5) *Enterobacteriaceae* (*E. coli*) で *rmtB*

陽性が 1 株検出された。なお、*rmtA* および *armA* は検出されなかった。検出率は、*Enterobacteriaceae* では総株数に対しては 0.05%、アミノグリコシド耐性株に対しては 2.4%であった。

表 1 . CRE 判定基準による集計菌株数

	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. freundii</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>P. mirabilis</i>
総菌株数	53,109	6,381	18,692	2,829	4,539	3,920
MEPM	41,487	5,123	15,404	2,147	3,483	3,195
不能	5,010	553	1,780	317	436	338
不能%	12.1	10.8	11.6	14.8	12.5	10.6
IPM	43,120	4,924	14,442	2,278	3,597	2,047
不能	3,922	422	1,504	261	338	475
不能%	9.1	8.6	10.4	11.5	9.4	23.2

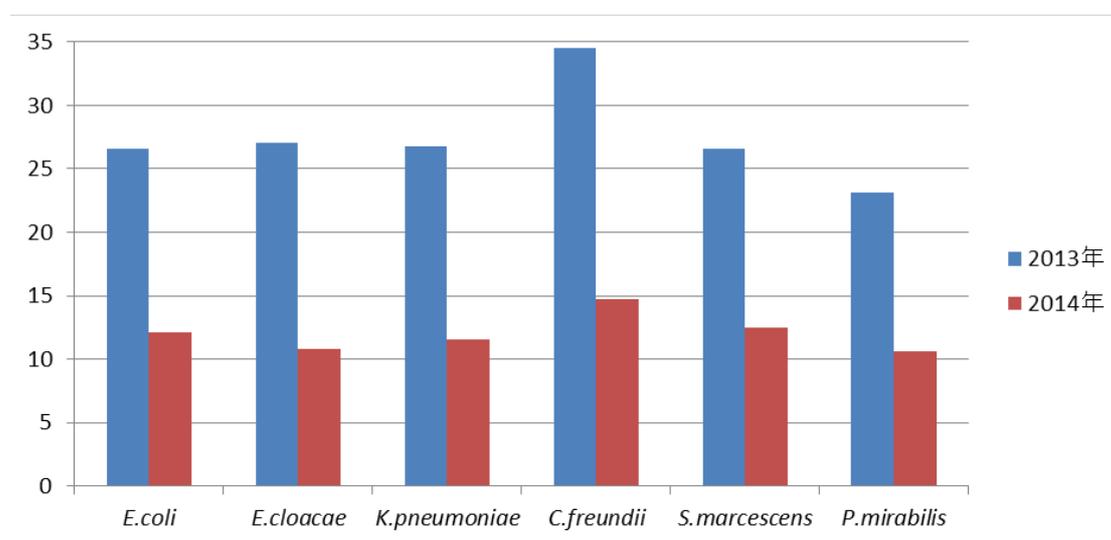


図 1 . CRE 判定不能菌株数の推移

表 2 . 菌種別および判定基準による CRE 検出状況

	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. freundii</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>P. mirabilis</i>
実株数	27,870	3,268	9,759	1,353	2,252	1,054
MEPM	194	58	112	14	40	25
%	0.7	1.8	1.1	1.0	1.8	2.4
IPM+CMZ	9	307	31	28	54	10
%	0.03	9.4	0.3	2.1	2.4	0.9
両条件	8	35	22	6	14	1
%	0.03	1.1	0.2	0.4	0.6	0.1

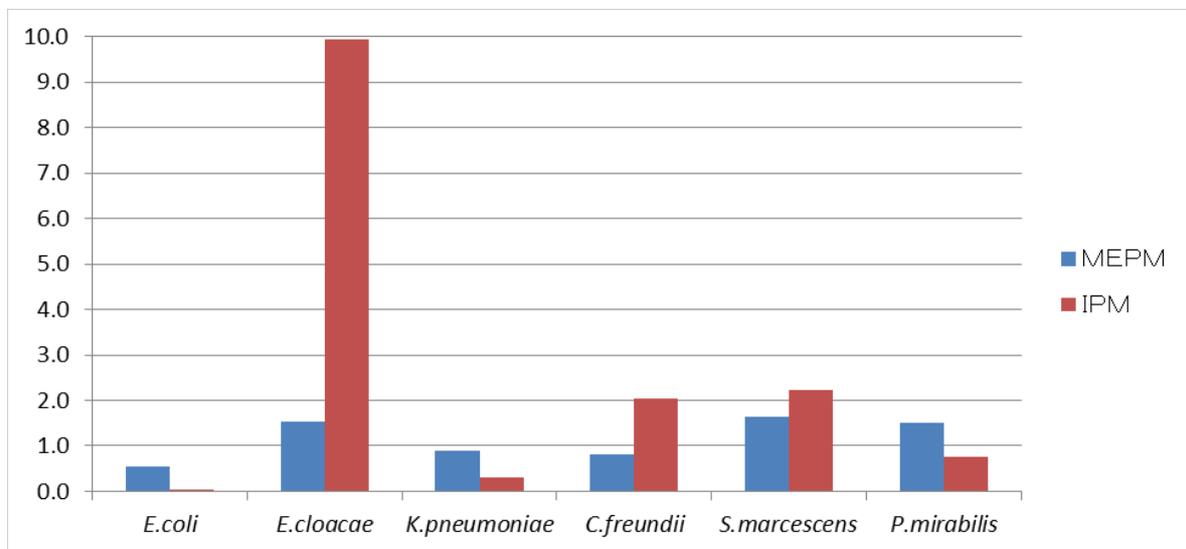


図 2 . 菌種別および判定基準による CRE 検出状況

表 3 . 測定器種別の CRE 検出率

測定機器	菌株数	CRE 株数	CRE%
11	26,408	125	0.47
12	528	53	10.04
13	1,250	5	0.40
22	2,262	1	0.04
23	9,240	15	0.16
24	1,731	4	0.23
36	873	1	0.11
39	1,221	4	0.33
99	632	1	0.16

表 4 . MRSA の LZD 感受性成績

方法	株数	2	4	4%
12	181	159	22	12.2
17	134	120	14	10.4
13	257	234	23	8.9
11	6520	6012	508	7.8
99	431	400	31	7.2
22	538	504	34	6.3
36	254	247	7	2.8
23	1634	1594	40	2.4
31	158	155	3	1.9
39	203	202	1	0.5
24	327	327	0	0

表 5 . アミノグリコシド耐性株における 16S rRNA メチラーゼ遺伝子の保有状況

Bacterial species	Isolated	Resistant to AMK or GM		Harboring 16S rRNA methylase gene, n			Rate of 16S rRNA methylase-producing strains, %
		n	%	rmtA	rmtB	armA	
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,873	41	2.19	0	1	0	0.05
<i>E. coli</i>		29	-	-	1	-	-
<i>K. pneumoniae</i>		4	-	-	-	-	-
<i>E. cloacae</i>		3	-	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>		2	-	-	-	-	-
<i>P. stuartii</i>		2	-	-	-	-	-
<i>S. plymuthica</i>		1	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> sp.	177	7	3.95	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	399	11	2.76	0	0	0	0
Total	2,449	59	2.41	0	1	0	0.04

D . 考察

JANIS データからの CRE の検出状況について検討したが、CRE 判定に必要な MEPM または IPM の 2 μ g/mL が判定できない施設が 10% ~ 15% 存在した。これらの施設で使用している機器が CLSI 2008 の判定基準のままで、現在の CLSI 2012 年判定基準にバージョンアップされておらず、感染症法に規定された耐性菌の判定ができないことになり問題である。早急に使用パネル(カード)を 2 μ g/mL が判定可能なものに変更することが必要である。しかし、MEPM の 2 μ g/mL が判定不能な株数を 2013 年 4 月と 2014 年 4 月で比較した結果、判定不能菌株数がほぼ半減していたことから、各施設でパネルの変更が進行中であると考えられ、2015 年度初めにはほとんどの施設で感染症法の CRE 判定が可能となると思われるが、CLSI 判定基準の変更に迅速に対応できるシステム作りが重要と考えられる。

CRE の検出率は 0.3 ~ 9.4% であったが、判定方法が MEPM と IPM+CMZ では検出率に差があり、特に *E. cloacae* では 1.8%、9.4% と大きく乖離した結果となった。また、測定機種によっても大きく乖離していることなどから、CRE 判定における薬剤感受性検査結果のみの限界、機種間差、そして判定基準の見直しが必要と考える。

MRSA の VCM の薬剤感受性結果に測定機種間差が認められることを報告してきた

が、MRSA の LZD に関しても機種間差が認められた。原因は不明であるが、他の薬剤と菌種の組み合わせについても機種間差の詳細な検討が望まれる。

S. maltophilia はカルバペネム系薬は耐性であるが、225 施設中 13 施設はすべて感受性と報告しており、菌株の誤同定もしくは薬剤感受性の誤判定が強く疑える。微生物検査における日常の精度管理の必要性を痛感する。しかし、施設内でこのようなデータが報告されていることは少々疑問であり、JANIS 報告用ファイル作成時のコード変換の誤り等の可能性もあるのではないかと考える。

アミノグリコシド耐性株における 16S rRNA メチラーゼ遺伝子の保有状況については、平成 21(2009)年の我々の本研究で 2008 年の臨床分離株において、アミノグリコシド耐性であった *Enterobacteriaceae* 52 株、*Acinetobacter* sp. 3 株、*P. aeruginosa* 77 株の合計 132 株を用いた。その結果、*Enterobacteriaceae* で *rmtB* 陽性が 2 株(菌種は *Enterobacter cloacae* と *Citrobacter freundii* がそれぞれ 1 株)、*Acinetobacter* sp. で *armA* 陽性が 2 株、*P. aeruginosa* で *rmtA* 陽性が 3 株検出された。検出率は、*Enterobacteriaceae* では総株数に対しては 0.07%、アミノグリコシド耐性株に対しては 3.8% であった。同様に、*Acinetobacter* sp. では 3.51%、66.6%、*P. aeruginosa* では 0.10%、3.9% であったと報告した(平成 21

年度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「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」。

今回の2013年8月から2014年5月までの臨床分離株を用いた検討でも、*E. coli*で *rmtB* 陽性が1株検出されたのみで、本法での16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有株は増加していないことが確認されたが、欧米等での検出状況から、今後も病院などの臨床検査室においてアミノグリコシド耐性株では16S rRNA methylase geneの検査を行い、監視を行っていくことが重要と考える。

E. 結論

JANIS データを解析し、CREの検出状況、MRSAにおけるLZDのMIC値とその変動因子、*S. maltophilia*のIPM薬剤感受性成績について検討を行った。また、アミノグリコシド耐性株における16S rRNA メチラーゼ遺伝子の保有状況について測定を行った。

今後、JANIS事業において日本の耐性菌検出状況を正確に把握するためには薬剤感受性試験の内部精度管理実施率を高めると

ともに、測定機器における機種間差、新規に参加する施設に対しては精度管理の実施状況を確認し、データの信頼性を高めることが必要と考える。また、日常検査における薬剤感受性検査の精度管理法の確立(方法および菌株)と日常検査で実施すべき薬剤耐性菌の種類についてガイドライン等を作成する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Mitsuaki Nagasawa, Mitsuo Kaku, Kazunari Kamachi, Keigo Shibayama, Yoshichika Arakawa, Keizo Yamaguchi, Yoshikazu Ishii, Loop-mediated isothermal amplification assay for 16S rRNA methylase genes in Gram-negative bacteria. *Journal of Infection and Chemotherapy* 20 (10) : 635-638, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし。