

- 7) 松井 真理、鈴木 里和、鈴木 仁人、荒川 宜親、柴山 恵吾 日本で分離されたアシネトバクテリア流行株と非流行株の分子疫学的特徴の比較 第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月、東京
- 8) Matsui M, Suzuki S, Suzuki M, Shibayama K. Molecular epidemiology of *Acinetobacter* spp. and distribution of *Acinetobacter baumannii* international clone II in Japan. 54th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Sept. 5-9, 2014. Washington DC.
- 9) 松井 真理、鈴木 里和、鈴木 匡弘、綿引 正則、平木 洋一、河野 文夫、柴山 恵吾. 我が国で分離されるアシネトバクテリア属菌の分子疫学解析 第 63 回日本感染症学会東日本地方総会学術集会 2014 年 10 月 29 日-31 日、東京ドームホテル、東京
- 10) 松井 真理、鈴木 里和、鈴木 仁人、鈴木 匡弘、八柳 潤、綿引 正則、平木 洋一、河野 文夫、柴山 恵吾. 国内 78 医療機関で分離されたアシネトバクテリア属菌の分子疫学解析 第 26 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 2015 年 1 月 31 日-2 月 1 日、京王プラザホテル、東京
- 11) 松井 真理、鈴木 里和、関塚 剛史、山下 明史、鈴木 仁人、黒田 誠、柴山 恵吾 IMP-1 メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ保有プラスミドの全塩基配列解読で判明した多菌種の腸内細菌科細菌の院内感染 第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月 26-28 日、長良川国際会議場、岐阜
- 12) 鈴木 仁人、松井 真理、鈴木 里和、関塚 剛史、黒田 誠、柴山 恵吾 「VI 型分泌エフェクター・免疫蛋白質の進化と多様性」 第 88 回日本細菌学会総会、長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市)、2015 年 3 月 26 日-28 日
- 13) 鈴木 仁人 「病原細菌における細菌間競合と進化」 感染症国際研究センター・全国共同利用共同研究拠点ジョイントシンポジウム、東京大学医科学研究所 (東京都港区)、2015 年 2 月 18 日
- 14) 鈴木 仁人、福井 康雄、梅田 豊、林寿朗、松井 真理、鈴木 里和、柴山 恵吾 「ダプトマイシン非感性 MRSA 株のゲノム解析」 第 43 回薬剤耐性菌研究会、加賀観光ホテル (石川県加賀市)、2014 年 10 月 31 日-11 月 1 日
- 15) Suzuki, M. Genomic epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Japan. The 11th Taiwan-Japan Symposium: New Technologies Applied to Public Health Including Foodborne Diseases and Drug Resistance, Centers for Disease Control, ROC (Taipei, Taiwan), 2014 年 9 月 11 日-12 日
- 16) Suzuki, M., Suzuki, S., Matsui, M., Hiraki, Y., Kawano, F., and Shibayama, K. A subclass B3 metallo- $\beta$ -lactamase found in *Pseudomonas alcaligenes*. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2014, Centre de Convencions Internacional de Barcelona (Barcelona, Spain), 2014 年 5 月 10 日-13 日
- 17) 鈴木 仁人、松井 真理、鈴木 里和、関塚 剛史、黒田 誠、柴山 恵吾 「アシネトバクテリアの薬剤耐性と拡散メカニズム」 第 87 回日本細菌学会総会、タワーホール船堀 (東京都江戸川区)、2014 年 3 月 26 日-28 日
- 18) 鈴木 仁人、松井 真理、鈴木 里和、柴山 恵吾 「アシネトバクテリア・バウマニと緑膿菌の細菌間競合」 第 48 回緑膿菌感染症研究会、長崎県医師会館 (長崎県長崎市)、2014 年 1 月 24 日-25 日
- 19) 鈴木 仁人、松井 真理、鈴木 里和、柴山 恵吾 「薬剤耐性菌流行株の分子遺伝学的解析」 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)、2013 年 12 月 3 日-6 日
- 20) 鈴木 仁人、松井 真理、鈴木 里和、平木 洋一、河野 文夫、柴山 恵吾 「新規メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* の解析」 第 42 回薬剤耐性菌研究会、ホテルニューさがみや (静岡県熱海市)、2013 年 10 月 17 日-18 日
- 21) 林原絵美子、柴山恵吾. *Helicobacter cinaedi* の分子疫学的解析と薬剤感受性. 第

18回日本ヘリコバクター学会学術集会  
2012年6月 岡山

22) Emiko Rimbara, Shigetaru Mori, Mari Matsui, Satowa Suzuki, Jun-ichi Wachino, Yoshiaki Kawamura, Zeli Shen, James G. Fox, Keigo Shibayama. Molecular epidemiologic analysis and antimicrobial resistance of *Helicobacter cinaedi* isolated from 7 hospitals in Japan. XXVth International Workshop of the Helicobacter Study Group. Sep. 2012, Slovenia

23) 林原 絵美子, 森 茂太郎, 金 玄, 柴山 恵吾. Role of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and asparaginase in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection.

第86回日本細菌学会, 2013年3月 千葉

24) 林原 絵美子, 森 茂太郎, 金 玄, 松井 真理, 鈴木 里和, 高橋 俊司, 山本 聡, 向井 正也, 柴山 恵吾. 同一の病院で分離された *H. cinaedi* と *H. fennelliae* の分子疫学的解析と薬剤感受性. 第19回日本ヘリコバクター学会学術集会 長崎

25) 林原 絵美子, 森 茂太郎, 金 玄, 柴山 恵吾. セフトリアキソン耐性 *Helicobacter cinaedi* におけるペニシリン結合タンパク質変異. 第88回日本細菌学会総会, 2015年3月, 岐阜

26) 森茂太郎, 金玄, 林原絵美子, 荒川宜親, 柴山恵吾. 結核菌由来ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの機能解析. 第86回日本細菌学会総会 2013年3月 千葉

27) 金玄, 柴山恵吾, 林原絵美子, 森茂太郎. Expression, Purification and Characterization of Enzymatic activities of QAPRTase from *M. tuberculosis*. 第86回日本細菌学会総会 2013年3月 千葉

28) 金玄, 横山和正, 中島千絵, 森茂太郎, 柴山恵吾, 鈴木定彦. 結核菌 DNA ジャイレースにおけるキノロン耐性決定領域外に見出されたアミノ酸置換のキノロン剤耐性への影響. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2013年5月29日-30日. 埼玉県産業文化センター、埼玉県さいたま市大宮.

29) 金玄, 横山和正, 中島千絵, 鈴木定彦. 結核菌 DNA ジャイレース上の菌系統特異的アミノ酸多型のキノロン剤耐性への影響. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会.

2013年5月29日-30日. 埼玉県産業文化センター、埼玉県さいたま市大宮.

30) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, and K. Shibayama. Structural insights into a diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv for the design of new anti-tuberculosis drugs. International Conference on Structural Genomics. 29 July-1 August, 2013, Sapporo, Japan.

31) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, and K. Shibayama. Structural insights into a novel diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.

32) Kim, H., S. Mori, E. Rimbara, and K. Shibayama. Enzymatic activities of Quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Sept. 10 - 13, 2013. Denver, Colorado.

33) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, and K. Shibayama. Structural insights into a novel diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*. The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector-Borne Diseases, 12-13 September, 2013, Tokyo, Japan.

34) 森茂太郎, 金玄, 林原絵美子, 柴山恵吾. Functions and structures of MAV\_3489 from *Mycobacterium avium* and MSMEG\_2932 from *M. smegmatis*. 第87回日本細菌学会総会. 2014年3月 東京

35) Kim, H., S. Mori, E. Rimbara, and K. Shibayama. Enzymatic activity of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and inhibition of its activity by pyrazinamide. 14th International Union of Microbiological Societies Congresses (IUMS). 28 July-1 August, 2014, Montreal, Canada.

36) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, Y. Arakawa, and K. Shibayama. Molecular characterization of nicotinate phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and inhibition of its activity by pyrazinoic acid.

FEBS-EMBO 2014. 30 August-4 September, 2014, Paris, France.

37) 金 玄, 森茂太郎, 林原恵美子, 柴山恵吾. Characterization of QAPRTase from *M. tuberculosis* H37Rv and inhibition of its activity by pyrazinamide. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会、9月29日-30日、2014年、埼玉.

38) Shibayama K. Japan Nosocomial Infections Surveillance: A Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance. 第17回韓国臨床微生物学会総会、6月19-20日、2014年、韓国南原

39) 柴山恵吾、カルバペネム耐性グラム陰性菌、第30回日本環境感染学会総会・学術集会、2月20-21日、2015年、神戸

研究分担者については、各研究者の報告書に記載のため省略。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

「*Acinetobacter baumannii* の検出」特願2014-014286、2014年1月29日出願、松井真理、鈴木仁人、鈴木里和、柴山恵吾、曾家義博

「抗菌剤、殺菌剤、抗菌材料、殺菌材料、抗菌方法及び殺菌方法」、特願2014-151608、2014年7月25日出願、鈴木仁人、松井真理、鈴木里和、柴山恵吾、一久和弘、成瀬秀則、井本裕顕、伊藤淳史、下川努

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

分担研究者については、各研究者の報告書に記載しているためここでは省略。

## 添付資料 1

アシネトバクターの分子疫学に関する研究

研究協力者：松井 真理（国立感染症研究所 細菌第二部）

### A. 研究目的

アシネトバクター属菌の多剤耐性化や院内感染は *Acinetobacter baumannii* 流行株（International clone II；以下 IC II）と呼ばれる遺伝子型との関連が示唆されている。IC II の簡便な検出法の開発と、国内で分離されたアシネトバクター属の分子疫学解析を実施した。

### B. 研究方法

アシネトバクター流行株（IC II）の検出法は、アシネトバクター属菌のうち *A. baumannii* のみが染色体上に有する *bla*<sub>OXA-51-like</sub> 遺伝子配列を比較し、その違いをもとに設計した。アシネトバクター属の分子疫学解析は、国立病院機構の医療機関 86 施設で平成 24 年 10 月～翌年 3 月に分離された菌株を対象に、菌種の同定、IC II の判定、薬剤感受性試験、カルバペネム耐性遺伝子の検出を行った。

#### 倫理面への配慮

アシネトバクター属菌の菌株収集は、国立感染症研究所の医学倫理審査委員会の承認を受けて実施した。

### C. 研究結果

*bla*<sub>OXA-51-like</sub> の配列を比較し、流行株（IC II）特異的な配列領域（nt106-108）を見出した。本領域は、パイロシークエンス法と Qprobe-PCR 法の 2 手法で検出条件を確立した。これにより、アシネトバクター属菌を①*A. baumannii* IC II、②*A. baumannii* 非 IC II、③*A. baumannii* 以外のアシネトバクター属菌の 3 つに分類可能であった。アシネトバクター属の分子疫学解析では、解析したアシネトバクター属 866 株のうち、*A. baumannii* が 645 株（75%）と最も多く、うち 245 株（28%）が IC II と判定された。多くの IC II はカルバペネム感性であり（耐性率 3.7%）、多剤耐性株は 2 株のみであったが、非 IC II 株に比べて多剤耐性傾向であった。IC II は、アシネトバクター属菌が送付された 78 施設のうち、36 施設（46%）で分離されていた。

### D. 考察

IC II の多くはカルバペネム感性であり、諸外国で報告されているような多剤耐性株はわずかであったが、非 IC II に比べると多剤耐性傾向にあった。IC II の特徴としてフルオロキノロン耐性を認めた。フルオロキノロン耐性のアシネトバクター属菌が分離された場合には、IC II の可能性を考え、多剤耐性株の出現により注意が必要と考えられた。

### E. 結論

アシネトバクター属菌の流行株（*A. baumannii* IC II）の迅速簡便な検出方法を確立した。我が国では、IC II は既に多くの医療機関に広まっている可能性が示唆された。IC II の多くが非 IC II に比べて耐性傾向にあり、今後の耐性化に注意が必要と考えられた。

## 添付資料 2

臨床分離菌株の薬剤耐性機構に関する研究

研究協力者：鈴木仁人（国立感染症研究所 細菌第二部）

### <目的>

多剤耐性グラム陰性菌感染症には有効な治療薬が極めて少ない。薬剤耐性菌の詳細な耐性機構や拡散機構を明らかにし、新たな検査薬や治療薬の開発を行うための分子基盤を確立する。

### <方法>

世界の公衆衛生上の問題となっている薬剤耐性の腸内細菌科細菌、シュードモナス属菌、アシネトバクター属菌などの臨床分離株のゲノム解析を行い、薬剤耐性流行株が有する耐性遺伝子を含む遺伝的特徴を精査する。

### <倫理面への配慮>

細菌の臨床分離株のみを使用し、患者由来の検体や患者が特定可能となるような個人情報はいない。

### <結果>

国内の医療機関で分離されたアシネトバクター属菌、シュードモナス属菌、エンテロバクター属菌のゲノム配列から、新たなカルバペネム耐性遺伝子（それぞれ TMB-2、PAM-1、GES-24）を同定した。国内外の医療機関で分離されたアシネトバクター属菌において、流行株と非流行株の比較ゲノム解析を行い、流行株が特異的に有し、細菌の拡散に関わる VI 型分泌機構関連遺伝子を発見した。企業との共同研究にて細菌細胞膜を標的とした新たな抗菌薬の開発を行った。

### <考察>

薬剤耐性菌感染症に対して、既存の薬剤とは異なる作用点を有する新たな治療薬の開発は急務であり、本研究で同定した薬剤耐性因子や、流行株特異的な細菌因子は創薬の分子標的となることが期待できる。

### <結論>

アシネトバクター属菌などの薬剤耐性菌には流行株が存在し、流行株は細菌間競争に極めて強く、耐性遺伝子や病原遺伝子などの有用な遺伝子をゲノムやプラスミド上に集積させていた。

## 添付資料 3

### *Helicobacter cinaedi* に関する研究

研究協力者：林原絵美子（国立感染症研究所 細菌第二部）

#### 目的

*Helicobacter cinaedi* は免疫不全患者における菌血症の原因菌として、近年その分離報告例が増加している。また院内感染が疑われる事例も報告されている。しかし、*H. cinaedi* の分子疫学的解析方法は確立されておらず、薬剤感受性に関する情報はほとんど報告されていない。そこで *H. cinaedi* の分子疫学的解析法の確立、薬剤感受性の調査および薬剤耐性機構の解明を研究の目的とした。

#### 方法

分子疫学的解析は pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST) により行った。薬剤感受性は寒天平板希釈法により測定した。また *gyrA*, *gyrB* 遺伝子、23S rRNA の DNA シーケンスを行い、標準株（感受性株）と比較した。

#### 倫理面への配慮

*Helicobacter* 属菌の収集に際しては、感染研の倫理委員会に申請し、承認を得た上で進めた。

## 結果

*H. cinaedi* の PFGE および MLST 法を確立し、アウトブレイク疑い事例において分離された菌株を解析結果、*H. cinaedi* の院内感染が示唆される結果を得た。また *H. cinaedi* 類似の *H. fennelliae* も *H. cinaedi* と同様に人から人へと伝播することを明らかにした。さらに薬剤感受性を調査したところ、日本由来の全ての *H. cinaedi* および *H. fennelliae* はシプロフロキサシンおよびクラリスロマイシン耐性を示し、これはそれぞれ GyrA および 23S rRNA 変異によるものであった。

## 考察

本研究で確立した分子疫学的解析法は、*Helicobacter* 属菌による院内感染対策や感染経路解明に役立つツールとなると考えられた。また本研究で解析した薬剤感受性データおよび耐性機構は *Helicobacter* 属菌による感染症治療のための有用な情報であると考えられる。

## 結論

*H. cinaedi* および *H. fennelliae* の分子疫学的解析法を確立し、薬剤耐性機構を明らかにした。厚労省に上げるべき健康危機情報

*H. cinaedi* および *H. fennelliae* は院内感染の原因菌となることが明らかになったことから、シプロフロキサシンおよびクラリスロマイシン耐性を含めた薬剤耐性の動向を監視する必要があると考えられた。

## 添付資料 4

### カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の感染症法の届け出基準の設定について

腸内細菌科の細菌は、市中および院内で様々な感染症を起こす。米国では近年、腸内細菌科でカルバペネム耐性菌の分離頻度が急速に増加していることが報告されている(1)。またアジアの途上国では、NDM 型などの新型カルバペネム耐性遺伝子を持つ耐性菌が急速に拡散して蔓延している。腸内細菌科のカルバペネム耐性菌は、同時に他の複数の系統の薬剤にも耐性のことが多く敗血症を起こした場合は、致死率が 40%以上との報告もある(2)。日本では、厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)で、様々な薬剤耐性菌の分離状況等について参加医療機関から提供されたデータをもとに調査が実施されている(3)。2012 年は、保菌例も含めて医療機関で分離された腸内細菌科の各菌種で、カルバペネム耐性は概ね 1%未満だった。実際に感染症を発症した症例数はさらにその一部なので、日本では現在のところ米国等よりも感染症例はかなり少ないと推測されるが、今後感染患者が増加する可能性もある。腸内細菌科カルバペネム耐性菌による感染症で、特に臨床的、社会的に注意を要するものについては発生動向を継続的に全数監視するのが望ましいと考えられるが、細菌のカルバペネム耐性は様々なメカニズムによるものがあり、それぞれで薬剤毎の耐性パターンが様々であり、臨床上の重要度も異なる。またカルバペネム耐性菌は、国や地域によって拡散している型が異なる。そのため、発生動向調査にあたってはその国、地域の実態に沿った検査方法を定める必要がある。本稿では、日本において腸内細菌科カルバペネム耐性菌による感染症を集計するにあたり、届け出基準で定める菌の検査に適した指標薬剤を検討した。

検討には、2010 年に実施された「我が国における新たな多剤耐性菌の実態調査」(4)で収集された株のうち、カルバペネム系薬剤のイミペネム(IPM)またはメロペネム(MEPM)の MIC が 2 $\mu$ g/ml 以上の中等度以上の耐性(非感性)を示し、かつ重複株を除いた 68 株を用いた。

解析対象菌株の IPM と MEPM の非感性の割合のまとめを図 1 に示す。68 株のうち、MEPM、IPM いずれに対しても MIC 2 $\mu$ g/ml 以上を示した株が 38 株(56%)だったが、MEPM のみが 2 $\mu$ g/ml 以上を示し、IPM では 1 $\mu$ g/ml 以下を示した株も 26 株(38%)存在することが分かった。IPM のみが 2 $\mu$ g/ml 以上を示し、MEPM では 1 $\mu$ g/ml 以下を示した株は 4 株(6%)だった。MEPM

のみで MIC が 2 $\mu$ g/ml 以上を示した 26 株について、その原因を明らかにするために耐性遺伝子を調べたところ、23 株が IMP-6 メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) 遺伝子を持っていた。IMP-6 MBL 遺伝子を持つ菌は、一般的に IPM に感性的で MEPM に耐性を示す傾向がある。このタイプの遺伝子は日本においてカルバペネム耐性菌から最も頻りに検出されるものの一つである(5)。このことを考えると、現在の日本においてはカルバペネム耐性の指標としてメロペネムは必須と考えられる。

ここで、腸内細菌科の中で *Proteus* 属菌はカルバペネム耐性遺伝子を持っていないとしても、イミペネムにのみ耐性を示すものがある。JANIS 検査部門の 2012 年公開情報によると、*Proteus mirabilis* では 6.8%、*Proteus vulgaris* では 2.2%がイミペネム耐性だった。これらの菌はほとんどの場合、メロペネムに感性的でさらに他の $\beta$ -ラクタム系抗菌薬でも感性的の薬剤がある。このような株は、いわゆる腸内細菌科カルバペネム耐性菌として集計に加える必要はないと考えられる。

以上より、日本において腸内細菌科カルバペネム耐性菌感染症を集計するには、メロペネム単剤を指標薬剤とするのが最も適切と考えられる。

しかし、臨床微生物学会から臨床現場では検査の指標薬剤としてイミペネムのみを用いている医療機関が相当あるため、届け出基準をメロペネム単剤にすると見逃される例が多くなるとの指摘があった。イミペネムで耐性を測定した場合に紛れ込んでくる *Proteus* 等のイミペネム耐性株を除外するためには、セフメタゾール等のセファマイシン系薬剤を同時に指標薬剤に加える必要がある。国内の医療機関が、イミペネムとセフメタゾールを同時に測定している場合がどれくらいあるのかを JANIS データを用いて調査した。セフメタゾールの他、セフォタキシム、セフトジジム、セフトリアキソンについても調査した。2013 年に JANIS 検査部門に参加していた医療機関で分離された腸内細菌科細菌 9 菌種 1,006,086 株(内訳、大腸菌 534,544 株、*Klebsiella pneumoniae* 209,850 株、*Enterobacter cloacae* 82139 株、*Enterobacter aerogenes* 40671 株、*Serratia marcescens* 46158 株、*Proteus mirabilis* 38308 株、*Proteus vulgaris* 9398 株、*Citrobacter freundii* 31966 株、*Citrobacter koseri* 13052 株)のうち、イミペネム測定株 677,424 株中で、同時にセフメタゾールが測定されていた株は 602,868 株(89%)、セフォタキシムは 529,899 株(78%)、セフトジジムは 658,719 株(97%)、セフトリアキソンは 143,744 株(21%)だった(図 2)。イミペネムを測定している場合は、セフメタゾールも同時に測定していることが多いことが分かった。以上の結果から、セフメタゾールを同時に指標薬剤として届け出基準に定めても、多くの医療機関で対応が可能であると考えられた。これらの結果を元に、届け出基準を表 1 のように提案することとした。

なお、*Enterobacter* 属菌においては、クラス C- $\beta$ ラクタマーゼを産生する株でイミペネムとセフメタゾール両方に耐性を示し、メロペネムには感性的を示すものが多い。届け出基準に従うと、このような菌株の場合も届け出の対象となる。しかしこのような株の臨床的、公衆衛生上の重要性については議論が分かれている。今後、この議論が続けられる予定である。

今後、国内には世界各国から様々なカルバペネム耐性菌が流入してくると予想される。届け出基準については、国内にどのようなメカニズムの耐性菌がどの程度存在するのかを把握し、それらの臨床的重要性を考慮しつつ、検討を続ける必要がある。

## 文献

1. J. T. Jacob et al., MMWR, 62(9):165-170, 2013.
2. Patel G, et al., Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2008;29:1099-106.
3. 厚生労働省院内感染対策サーベイランス(<http://www.nih-janis.jp/index.asp>)
4. [http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou19/cyousa\\_kekka\\_110121.html](http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou19/cyousa_kekka_110121.html)  
厚生労働省科学研究費補助金「新型薬剤耐性菌等に関する研究」平成 22 年度研究報告書 p 22-27
5. Yano H et al., Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(8):4554-5.

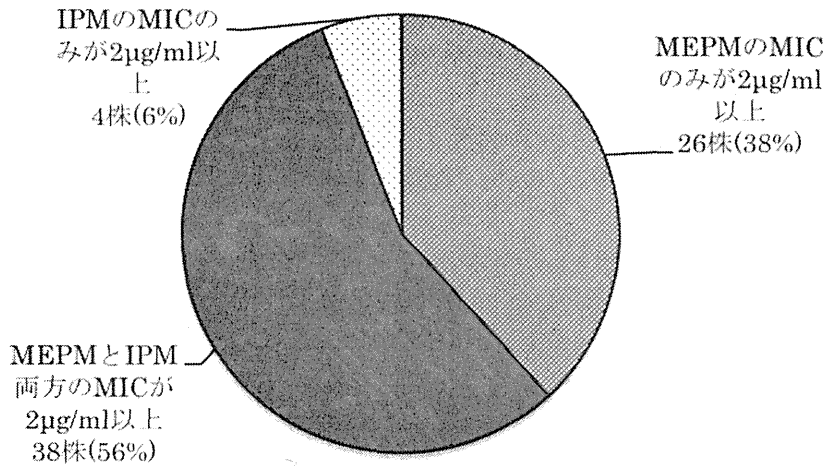


図1 IPM または MEPM の MIC が 2µg/ml 以上の菌株 68 株の内訳

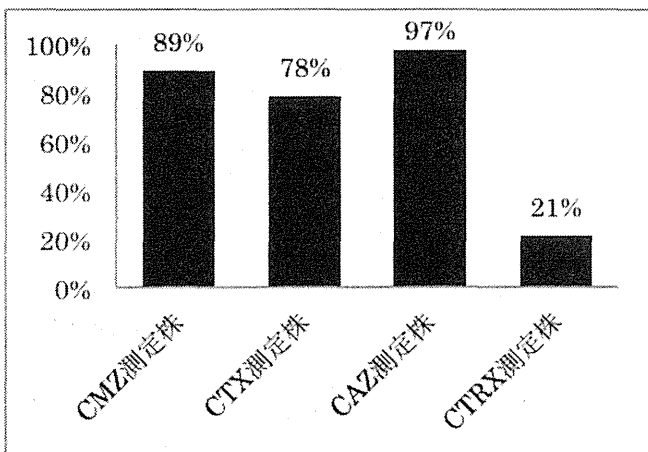


図2 医療機関においてイミペネムと同時に測定されていた各薬剤の割合

<p>分離・同定による腸内細菌科細菌の検出、かつ、次のいずれかによるカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対する耐性の確認</p> <p>ア メロペネムのMIC値が2µg/ml以上であること、又はメロペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が2.2mm以下であること</p> <p>イ 次のいずれにも該当することの確認</p> <p>(ア)イミペネムのMIC値が2µg/ml以上であること、又はイミペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が2.2mm以下であること</p> <p>(イ)セフメタゾールのMIC値が64µg/ml以上であること、又はセフメタゾールの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が1.2mm以下であること</p>	<p>血液、腹水、胸水、髄液その他の通常無菌的であるべき検体</p>
<p>次のいずれにも該当することの確認</p> <p>ア 分離・同定による腸内細菌科細菌の検出</p> <p>イ 次のいずれかによるカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対する耐性の確認</p> <p>(ア)メロペネムのMIC値が2µg/ml以上であること、又はメロペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が2.2mm以下であること</p> <p>(イ) 次のいずれにも該当することの確認</p> <p>a イミペネムのMIC値が2µg/ml以上であること、又はイミペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が2.2mm以下であること</p> <p>bセフメタゾールのMIC値が64µg/ml以上であること、又はセフメタゾールの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が1.2mm以下であること</p> <p>ウ 分離菌が感染症の起原菌と判定されること</p>	<p>喀痰、膿、尿その他の通常無菌的ではない検体</p>

表1 届け出のために必要な検査所見



## 添付資料 5

### 感染症法に基づくカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症の届出に関する Q&A

2014年9月24日

平成26年9月19日に、感染症法に基づく医師の届出対象の感染症に、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症が追加されました。届出にあたり、よくある質問とその答えをまとめました。

Q1: カルバペネムに耐性を示す腸内細菌科細菌が分離されましたが、感染症を起こしていない保菌者については、届出の対象ですか？

A1: 届出の対象ではありません。ただし、複数の入院患者からカルバペネム耐性腸内細菌科細菌が分離されるなど、院内でのアウトブレイクが疑われる場合は、保菌であっても別途医政局指導課長通知（平成23年6月17日：医政指発0617第1号）に基づき、保健所に相談、連絡をしてください。また、その菌株が入院中の患者より分離された場合は、他の入院患者へ伝播しないように院内感染対策を適切に実施することが必要です。

Q2: 届出のために必要な検査所見で、検査材料が通常無菌的ではない検体の場合は分離菌が感染症の起原菌と判定された場合、という条件が付されています。感染症の起原菌かどうかの判断はどのような基準で行うのですか？

A2: 感染症の起原菌かどうかの判断は、診断する医師に委ねられています。

Q3: 分離菌がイミペネムには感性（MIC 1 $\mu$ g/ml 以下）、メロペネムには耐性（MIC 2 $\mu$ g/ml 以上）を示した場合、届出の対象になりますか？

A3: メロペネムに耐性であれば、イミペネムに感性であっても届出の対象になります。なお、国内でカルバペネム耐性腸内細菌科細菌として比較的分離頻度が高い IMP-6 カルバペネマーゼ産生菌は、メロペネムには通常耐性を示しますが、イミペネムでは感性と判定されることが知られています。このため、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の検出にはメロペネムが推奨されます。

Q4: イミペネムをカルバペネム耐性の指標薬剤として用いる場合は、なぜセフメタゾールも同時に耐性を示すことが条件になっているのですか？

A4: 腸内細菌科細菌のうち、Proteus 属菌などでは、イミペネムにのみ耐性を示して他の多くのセフェム系薬剤には感性を示す菌株がしばしば分離されます。このような菌株は広域 $\beta$ -ラクタム剤に対していわゆる汎耐性を示すものではないので、集計の対象としていません。このような菌株を除外するために届出のために必要な検査所見としてセフメタゾール耐性を条件に加えています。

Q5: 分離菌がイミペネムに耐性と判定された場合で、同時にセフトキシムやセフトジジムにも耐性と判定されたが、セフメタゾールは測定していない場合、届出の対象になりますか？

A5: 届出基準上は届出の対象になりませんが、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌である可能性があるため注意が必要です。セフトキシムやセフトジジムに耐性を示すものには、カルバペネマーゼではなく ESBL の産生によるものなどが含まれます。このようなものを除外するために、セフメタゾールを用いることとしています。質問のような場合は、個別にセフメタゾールまたはメロペネムを用いて薬剤感受性検査を実施されることをお勧めします。

Q6: カルバペネム耐性の指標薬剤として、メロペネムとイミペネムのどちらがよいのでしょうか？

A6: Q3にありますように、国内でカルバペネム耐性腸内細菌科細菌として比較的分離頻度が高いIMP-6カルバペネマーゼ産生菌は、イミペネムには感性を示すことが知られています。イミペネムを指標薬剤として用いると、このタイプのカルバペネム耐性腸内細菌科細菌は見逃される可能性があります。メロペネムでは、このタイプの株でも通常は耐性を示しますので、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の検出にはメロペネムが推奨されます。

Q7: カルバペネムの耐性をメロペネムとイミペネムいずれでも測定せず、これら以外のカルバペネム系薬剤で測定して耐性と判定された場合は、届出の対象になりますか？

A7: 届出の対象にはなりません。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌である可能性があるため注意が必要です。メロペネムを用いて薬剤感受性検査を個別に実施されることをお勧めします。

Q8: メロペネムとイミペネムいずれも感性と判定され、これら以外のカルバペネム系薬剤について耐性と判定された場合は、届出の対象になりますか？

A8: メロペネムとイミペネムいずれも感性の場合は、届出の対象にはなりません。

Q9: メロペネムやイミペネムには感性（MIC値が $1\mu\text{g/ml}$ 以下）だったが、広域 $\beta$ -ラクタム剤に高度耐性の場合は、届出の対象になりますか？

A9: 届出の対象にはなりません。ただ、このような菌株はメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ等のカルバペネム耐性遺伝子を持っていることがあります。このような菌株は、耐性遺伝子の発現量や外膜蛋白が変化することで耐性化したり、耐性遺伝子が他の菌株に伝播したりして、今後新たな耐性株を生み出す原因になることがありますので、特に入院患者から分離された場合は感染対策の観点から十分な注意が必要です。遺伝子の検査については、自施設での実施が困難な場合は民間の衛生検査所（検査センター）に依頼して頂くか、地域の大学等の連携研究機関や自治体、地方衛生研究所、国立感染症研究所にご相談ください。

Q10: メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を持つ菌株であっても、メロペネムやイミペネムのMIC値が $1\mu\text{g/ml}$ 以下の株もあるようですが、これらも届出の対象ですか？

A10: 届出の対象にはなりません。ただし、このような菌株は、耐性遺伝子の発現量や細菌外膜が変化することで耐性化したり、耐性遺伝子が他の菌株に伝播したりして、今後新たな耐性株を生み出す原因となることがありますので、特に入院中の患者より分離された場合は感染対策の観点からは十分な注意が必要です。

Q11: メロペネムやイミペネムに耐性（MIC値が $2\mu\text{g/ml}$ 以上）であっても、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ等のカルバペネマーゼを産生していない菌株があると思いますが、これらも届出の対象になりますか？

A11: 薬剤耐性のメカニズムに関わらず、届出基準に該当していれば届出の対象になります。

Q12: カルバペネム耐性遺伝子に関する解析を希望する場合は、どこに相談すればよいでしょうか？

A12: 民間の衛生検査所（検査センター）で薬剤耐性遺伝子の解析を実施しているところに依頼して頂くか、地域の大学等連携研究機関や自治体、地方衛生研究所、国立感染症研究所にご相談ください。

Q13: カルバペネム耐性腸内細菌科細菌が分離された場合、菌株は全て自治体に送ることが求められるのですか？

A13: 院内感染が考えられる場合や、菌が地域の複数の医療機関に伝播している可能性があるなど、公衆衛生上や感染対策上、公的な対応が必要と行政が判断した場合は、関係法令に基づき自

治体が菌株の提供をお願いすることがあります。出来る限り、菌株の保存をお願いします。

文責 柴山恵吾 (国立感染症研究所 細菌第二部)

国立感染症研究所ホームページに掲載  
(<http://www.niid.go.jp/niid/ja/dr-b-m/5011-carbapenem-qa2.html>)

## 添付資料 6

### 結核菌の薬剤耐性に関する研究

研究協力者 森 茂太郎 (国立感染症研究所 細菌第二部)

研究協力者 金 玄 (国立感染症研究所 細菌第二部)

#### 目的

抗結核薬の1つであるピラジナミドは結核菌の菌体内に取り込まれた後に活性型のピラジン酸に変換される。ピラジナミドやピラジン酸はニコチン酸やキノリン酸の構造類縁体であることから、結核菌のNAD代謝に影響を与えていることが予想された。そこで、NAD代謝に関わる酵素に対するピラジナミド/ピラジン酸の阻害活性と阻害様式について調べるとともに、得られた結果に基づいて新規抗結核薬のデザインを行うことを目的とした。

#### 方法

NAD代謝に関与する結核菌由来の2種類の酵素、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼとキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼを精製してその酵素学的諸性質を明らかにするとともに、ピラジナミド/ピラジン酸による阻害活性を調べた。また、立体構造情報に基づいて阻害様式を明らかにするとともに、得られた知見に基づいて新規阻害剤の探索を行った。

#### 結果

ピラジナミドはキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの活性を、ピラジン酸はニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの活性をそれぞれ阻害することを明らかにした。さらに、どちらも競合阻害であることを示した。また、両酵素の活性を阻害する新規阻害剤の候補として64種類の化合物を選択して実際に阻害活性を測定したところ、弱い阻害活性は認められたが顕著な阻害活性を示す化合物はなかった。

#### 考察

NAD代謝経路がピラジナミドやピラジン酸の作用機序の1つであることが示唆された。また、NAD代謝経路を標的とした新規抗結核薬の開発に向けて、今後は候補化合物の構造最適化が必要であることが考えられた。

#### 結論

抗結核薬ピラジナミドやその活性型のピラジン酸は結核菌のNAD代謝経路に影響を与えていることが示唆された。

## 添付資料 7

### 厚生労働省院内感染対策サーベイランス運営委員会ワーキンググループ議事録

日時：平成25年7月10日 午前10時～12時

場所：国立感染症研究所戸山庁舎 共用第三会議室

出席者 14名（50音順 敬称略）：

#### 運営委員 8名

荒川宜親/名古屋大学  
岩田敏/慶應義塾大学病院 感染制御センター  
大久保憲/東京医療保健大学  
大曲貴夫/国立国際医療研究センター病院  
柴山恵吾/国立感染症研究所  
長沢光章/東北大学病院  
針原康/N T T 東日本病院  
村上啓雄/岐阜大学

#### 厚生労働省医政局指導課 2名

小笠原一希・梶野健太郎

#### 事務局 2名

鈴木里和・大木留美

#### キーウェアソリューションズ(株) 2名 ※オブザーバーとして参加

古川玲子・中川岳人

配布資料：別紙のとおり

#### (1) 200床未満の医療機関の参加について

マニュアルを資料1-2に示すように改訂する。改訂は、参加要件としての病床数に関する記載を削除するのみとする。精度管理など、参加にあたって求められる要件については、マニュアルに具体的に記載せず、説明会の時に説明することとする。また医療機関特性別の集計を今後検討する。

#### (2) 公開情報と還元情報の医療機関特性別集計について

医療機関特性別の集計を行うため、医療機関特性に関する情報を収集する。

医療機関特性としては病床数（精神・一般・療養・結核・感染症ごと）および平均在院日数、ICU病床数、NICU病床数を収集することとする。加算1、2の取得の有無は集めない。これらの情報については、年に1回責任者と担当者が必ず確認を行って最新の情報を入力するように現行システムを改変する。

#### (3) 都道府県別集計について

検査部門・全入院患者部門については原則、都道府県別データを公開することとする。ただし、都道府県内の集計対象医療機関数が1の場合は医療機関が特定できる可能性があるため、欠損値として公開しない。複数の都道府県を合算したブロック別集計は行わない。形式としては、現在の公開情報年報と同じ形式（資料5、ただし箱ひげ図は都道府県のデータで作り直す）と日本地図での色分け（資料4）を作成することとする。

運営委員会で決定した時点で、総務省に変更届を提出する。総務省の審査内容に基づき再検討を行う。

#### (4) 検査部門で集計する菌種、抗菌薬の追加、変更について

追加菌種

*Enterobacter cloacae*

*Enterobacter aerogenes*

*Citrobacter freundii*

*Citrobacter koseri*

*Proteus mirabilis*

*Proteus vulgaris*

*Neisseria gonorrhoeae* (PCG)

追加薬剤

MRSA→ダプトマイシン

*E. faecium* →ダプトマイシ

腸内細菌科、緑膿菌→PIPC/TAZ

腸内細菌科→MEPM

*S. marcescens*, *Enterobacter* spp. *C. freundii* 一部 CFPM

- (5) 検査部門で「特定の耐性菌」として集計する薬剤の追加、変更について  
箱ひげ図等の表から VRSA を外し、空いた枠に CRE (腸内細菌科カルバペネム耐性菌) を加える。  
VRSA 分離の無いことは別途記載する。
- (6) 検査部門の SIR 判定を CLSI 2007 で継続するかどうかについて  
現在は CLSI 2012 年バージョンを採用しているのは医療機関全体の 3% 程度である  
ため、現時点での切り替えは時期尚早。1 年半後くらいを目途に再検討し、今後 3 年間  
の中で変更時期を探るようになる。  
*S. pneumoniae* については、髄液検体と髄液検体以外を CLSI2007 と CLSI2013 とでそれぞれ集計し、  
その結果により今後の方針を決定する。
- (7) CDC の VAP 判定基準の変更にともない、ICU 部門の判定基準も変更するかどうかについて  
定義の変更については、CDC も変更中であり、環境感染学会も検討中である。まだ検討  
する時期ではない。ICU 部門については device day に変更するところから検討するべき  
である。
- (8) その他 JANIS NICU 部門における児の体重区分に関する検討  
体重区分変更の検討以前に、NICU 部門のサーベイランスの意味合いそのものから検討すべきである。  
岩田先生より感染症学会で意見を伺ってもらうことになり、今回は提案に留めた。

添付資料 8 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の注意喚起の事務連絡

事 務 連 絡  
平成 25 年 3 月 22 日

各 

都 道 府 県
保 健 所 設 置 市
特 別 区

 衛生主管部（局）御中

厚生労働省医政局指導課  
健康局結核感染症課

腸内細菌科のカルバペネム耐性菌について（情報提供及び依頼）

日頃より感染症対策へのご協力を賜り厚くお礼申し上げます。

最近、海外からの腸内細菌科の新型のカルバペネム耐性菌の輸入事例が報告されております。現在のところ、これらの耐性菌が国内で広がっている状況ではありませんが、輸入例を端緒に国内で感染拡大が起こらないよう、院内感染対策を実施することが重要です。院内感染対策については、「医療機関等における院内感染対策について」（平成 23 年 6 月 17 日医政指発 0617 第 1 号）等を参考に貴管下の医療施設に対策をお願いしているところです。

海外の医療機関において入院治療を受けていた患者を受け入れる際には各種の耐性菌のスクリーニングを実施するなど、特段のご留意いただき、カルバペネム耐性菌等が入院患者より分離された際は下記 Q&A を参考に適切な院内感染対策を講じるとともに、アウトブレイクが疑われる場合は速やかに保健所に報告するよう、貴管下医療施設に対する周知方、お願いいたします。

なお、カルバペネム耐性菌や多剤耐性菌が分離された場合は、遺伝子解析等の詳細な解析について、引き続き、国立感染症研究所に相談することができますので、地方衛生研究所及び貴管下医療施設への周知方、よろしくお願いいたします。

○連絡先

国立感染症研究所 細菌第二部

Eメール [taiseikin@nih.go.jp](mailto:taiseikin@nih.go.jp)

添付資料 9 プラスミドの伝播による院内感染の注意喚起に関する事務連絡と課長通知

事務連絡

平成26年6月23日

各 { 都道府県  
保健所設置市  
特別区 } 衛生主管部(局)  
院内感染対策主管課 御中

厚生労働省医政局指導課

医療機関等において多剤耐性菌によるアウトブレイクを疑う基準について

日頃より院内感染対策へのご協力を賜り厚くお礼申し上げます。病院内での感染症アウトブレイクへの対応については、「医療機関等における院内感染対策について」(平成23年6月17日付け、医政指発0617第1号)において、医療機関における院内感染対策の留意事項を示し、貴管下医療施設に対する指導方をお願いしているところです。その中で多剤耐性菌によるアウトブレイクを疑う基準を、「一例目の発見から四週間以内に、同一病棟において新規に同一菌種による感染症の発病症例(以下の四菌種は保菌者を含む:バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)、多剤耐性緑膿菌(MDRP)、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)、多剤耐性アシネトバクター・バウマニ(*Acinetobacter baumannii*))が計三例以上特定された場合、あるいは、同一機関内で同一菌株と思われる感染症の発病症例(抗菌薬感受性パターンが類似した症例等)(前記の四菌種は保菌者を含む)が計三例以上特定された場合を基本とすること。」としてきたところですが、昨今の研究から、菌種が異なっても耐性遺伝子が菌種の間で伝播して起こるアウトブレイクがあることが明らかになりました。

病院内において、菌種が異なっても多剤耐性菌による感染症例もしくは保菌例が複数見られた場合は、念のためアウトブレイクを疑い、保健所へ速やかに報告するとともに必要な対策をとるよう、貴管下医療施設に対して指導方よろしく願いいたします。

なお、上記通知に示されたアウトブレイクを疑う基準に関しては、今後、有識者からも意見を聴取し、改正の検討を進める予定です。

また、多剤耐性菌が分離された場合は、遺伝子解析等の詳細な解析について、引き続き国立感染症研究所細菌第二部に相談することが可能ですので、地方衛生研究所及び貴管下医療施設への周知方、よろしく願いいたします。

(連絡先・問い合わせ先)

国立感染症研究所 細菌第二部 Eメール: [taiseikin@nih.go.jp](mailto:taiseikin@nih.go.jp)

各 

都道府県
政令市
特別区

 衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医政局地域医療計画課長

（ 公 印 省 略 ）

### 医療機関における院内感染対策について

院内感染対策については、「医療機関等における院内感染対策について」（平成23年6月17日医政指発0617第1号厚生労働省医政局指導課長通知。以下「0617第1号課長通知」という。）、「良質な医療を提供する体制の確立を図るための医療法等の一部を改正する法律の一部の施行について」（平成19年3月30日医政発第0330010号厚生労働省医政局長通知）、「薬剤耐性菌による院内感染対策の徹底及び発生後の対応について」（平成19年10月30日医政総発第1030001号・医政指発第1030002号）等を参考に貴管下医療機関に対する指導方お願いしているところである。

医療機関内での感染症アウトブレイクへの対応については、平時からの感染予防、早期発見の体制整備及びアウトブレイクが生じた場合又はアウトブレイクを疑う場合の早期対応が重要となる。今般、第11回院内感染対策中央会議（平成26年8月28日開催）において、薬剤耐性遺伝子がプラスミドを介して複数の菌種間で伝播し、これらの共通する薬剤耐性遺伝子を持った細菌による院内感染のアウトブレイクが医療機関内で起こる事例が報告された。また、このような事例を把握するために医療機関が注意すべき点や、高度な検査を支援するための体制について議論された。これらの議論を踏まえ、医療機関における院内感染対策の留意事項を別記のとおり取りまとめた。この中では、アウトブレイクの定義を定めるとともに、各医療機関が個別のデータを基にアウトブレイクを把握し、対策を取ることを望ましいとしている。また、保健所、地方衛生研究所、国立感染症研究所及び中核医療機関の求められる役割についても定めている。貴職におかれては、別記の内容について御了知の上、貴管下医療機関に対する周知及び院内感染対策の徹底について指導方よろしく願います。



## II. 分担研究報告書

## 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

### 分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明

研究分担者 荒川宜親（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学／耐性菌制御学・教授）

研究要旨：2000 年代以降、カルバペネマーゼを産生する肺炎桿菌などのいわゆる CRE（カルバペネム耐性腸内細菌科細菌）や OXA 型カルバペネマーゼなどを産生する *Acinetobacter* 属菌などが欧米諸国のみならずアジアや中東さらにはアフリカ地域などの途上国でも広がり大きな問題となっている。そこで、分担研究者である荒川の研究グループは、平成 24-26 年の 3 年間に、国内の臨床分離株から発見された新型のメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ SMB-1 の X 線結晶構造解析に加え、新型アミノグリコシドアセチル化酵素 AAC(6')-Ib-an、さらに新型のホスホマイシン不活化酵素 FosK などを新たに発見しそれらについて解析を行うとともに、新型のメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ TMB-2 を産生する *Acinetobacter soli*、FosA3 を産生する健康人由来大腸菌、さらに、ペニシリン低感受性を獲得した B 群レンサ球菌(PRGBS)、フルオロキノロン耐性肺炎桿菌、肺炎患者の血液培養で分離された肺炎桿菌などの調査や分子疫学解析を行った。同時に、FosA3 などのホスホマイシン不活化酵素を産生する菌株の簡便検出法や *Acinetobacter* 属菌の簡便な同定法および *A. baumannii* 国際流行クローンの迅速簡便識別法などの新しい解析手法を構築した。以上のように、医療現場における多剤耐性菌の解析や対策に貢献すると期待される様々な成果を上げた。

#### 研究協力者

##### 名古屋大学大学院医学系研究科

川村久美子（准教授）、木村幸司（講師）、  
山田景子（助教）、和知野純一（助教）

##### 同上 大学院生

永坂由紀子、伊藤亮太、中根邦彦、横山覚、  
坂野弘嗣、北仲博光、後藤謙介、服部達也、  
村竜輝、佐藤夏巳

##### 同上 医学部学生

中村元気、鈴木健史、山田涼子

##### 愛知県衛生研究所

鈴木匡弘

##### 国立感染症研究所

松井真理、長野由紀子

##### 信州大学大学院

長野則之

##### 熊本大学大学院

黒崎博雅、山口佳宏

#### A. 研究目的

医療先進地域である欧米のみならず、途上国でもカルバペネムに耐性を獲得した腸内細菌科の細菌やアシネトバクター属菌などの新型多剤耐性菌が増加し深刻な問題となってい

る。それらに加え、様々な新しい薬剤耐性菌も出現しつつあるが、それらの獲得した新しい薬剤耐性機構には未解明な部分が多く残されている。さらに、新規に出現しつつある新型薬剤耐性菌を検出するための検査法や解析法も十分に考案や構築されていない。また、新型多剤耐性菌の実態や動向も十分に把握されているとは言い難い。そこで、荒川の研究グループは、このような事態の克服に貢献すべく新型多剤耐性菌を中心に、基礎的研究から分子疫学解析、新規の検査・解析法の開発等において多面的、総合的な研究を展開した。

#### B. 研究方法

##### a. 新規薬剤耐性機構に関する研究

##### 1. 新型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ SMB-1 に関する研究

2010 年に厚生労働省が実施したカルバペネム耐性腸内細菌科の菌種に関する全国調査で分離されたカルバペネム耐性セラチア・マルセスセンスについてカルバペネム耐性に関与

する遺伝子をクローニングし、その遺伝子の産物である酵素の精製と結晶化、および X 線結晶構造解析等を行った。

## 2. アミカシン高度耐性アシネトバクター属菌に関する研究

アミカシンに中等度耐性(MIC, 64-256  $\mu$ g/ml)を示す、アシネトバクター属菌から、アミカシン耐性に関与する遺伝子領域をクローニングし、その塩基配列とともにその遺伝子が担う酵素について詳しい解析を行った。

## 3. カルバペネム耐性アシネトバクター属菌に関する研究

外傷患者の血液培養から分離されたカルバペネム耐性アシネトバクター属菌について、菌種の同定とカルバペネム耐性に関与する遺伝子の解析を行った。

## 4. ホスホマイシン高度耐性アシネトバクター属菌に関する研究

前述の外傷患者の血液由来カルバペネム耐性アシネトバクター属菌のインテグロン構造を解析する過程で、新しいホスホマイシン耐性遺伝子を発見した。

## 5. 多剤耐性を獲得した腸内細菌科の臨床分離菌に関する研究

海外から帰国あるいは訪日した患者よりカルバペネムを含む多剤に耐性を獲得した腸内細菌科の細菌等が分離されたため、多剤耐性に関与する分子メカニズムを解析した。

## 6. ペニシリンに感性であるがセフチブテンに耐性を獲得した B 群レンサ球菌に関する研究

国内の医療機関で分離されたセフチブテン耐性でペニシリン感性の B 群レンサ球菌について PBP の解析などを実施した。

## 7. セフチゾキシムに高度耐性を獲得した B 群レンサ球菌に関する研究

国内の医療機関で分離されたセフチゾキシムの高度耐性(MIC, 256  $\mu$ g/ml)を示す B 群レンサ球菌について PBP の解析などを実施した。

## 8. 非溶血性で小コロニー形態を示す PRGBS の解析

臨床分離される PRGBS の中に、羊血液寒天平板上で小コロニー形態を呈し、しかも非溶血性を示す株があることに気がついたため、それらの解析を行なった。

## 9. QnrA 保有大腸菌の特性に関する解析

QnrA を保有する大腸菌における FQ 耐性獲得に対する影響について解析を行なった。

## b. 多剤耐性菌等の調査研究

### 1. 健常者から分離されたホスホマイシン耐性大腸菌の解析

健常者より分離されたホスホマイシン耐性大腸菌について PCR 増幅と DNA の塩基配列の決定を行った。

### 2. フルオロキノロン耐性肺炎桿菌の分子疫学解析

国内の 23 医療機関で分離されたセフェム耐性肺炎桿菌の中から、フルオロキノロン耐性株を抽出し、それらの株の遺伝的特長について解析を行った。

### 3. PRGBS の多剤耐性獲得状況に関する研究

国内の医療機関で臨床分離されたペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌(PRGBS)について、マクロライドおよびフルオロキノロンに対する耐性獲得状況を調査した。

### 4. 市販食肉等由来大腸菌の分子疫学解析

国内のマーケットで生の鶏肉等の食品を購入し、それらから分離された大腸菌について、ESBL などの遺伝子を検出し解析した。

### 5. 肺炎患者の血液由来肺炎桿菌の分子疫学解析

国内の医療機関で肺炎患者の血液培養で分離された肺炎桿菌について、それらの遺伝的特性を解析した。

### 6. ペニシリン低感受性 GBS の院内感染について報告した

国内の同一医療機関で分離された一連のペニシリン低感受性 GBS について分子疫学的な解析を行ない、それらの遺伝的クローナリティーについて解析した。

### 7. メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の簡便試験法の比較評価

メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生株を検出する複数の試験検査法についてその感度、特異度等を比較解析した。

### 8. 臨床分離株における PRGBS の調査

1977 年より 2005 年にかけて臨床分離された GBS について PRGBS の分離率を調査した。

### 9. 妊婦から分離された GBS の調査

妊婦より臨床分離された GBS について PRGBS の分離率を調査した。

### 10. 臨床分離された A 群レンサ球菌におけるペニシリンに対する感受性の調査

臨床分離された A 群レンサ球菌 (GAS) に

ついてペニシリンに対する感受性状況を調査した。

#### c. 新規の簡便試験法等の開発と評価

##### 1. ホスホマイシン不活化酵素産生株の簡便識別検査法の開発

大腸菌に対してホスホマイシンに高度耐性を与える FosA3 などのホスホマイシン-グルタチオン転位酵素を産生する株を簡便に検出可能な検査法を構築した。

##### 2. 多剤耐性アシネトバクターの迅速菌種同定と国際流行クローンの簡便識別法の開発

医療機関の検査室の業務では、菌種の同定が難しい *Acinetobacter* 属菌について、迅速・簡便に菌種を同定し、さらに *A. baumannii* の場合は、国際流行クローンか否かを迅速に識別できる解析法を開発した。

##### 3. GBSを高感度かつ迅速に検出するLAMP法の開発

新生児髄膜炎の原因となる GBS を迅速に検出、鑑別可能な LAMP 法を開発した。

##### 4. 自動検査装置によるPRGBSの検出感度の評価

VITEC(R)2システムを用いた場合のPRGBSの検出感度等を検討した。

#### d. その他

1. PRGBS 等の分類に関する提案を行なったペニシリンやセファロスポリンに低感受性や耐性を獲得した GBS について、それらの分類法を国際的に提案した。

##### 2. 16S rRNA メチレーズとその産生株に関する英文総説の執筆

プラスミド媒介性の 16S rRNA メチル基転移酵素（メチレーズ、メチルトランスフェラーズ）に多くのタイプが出現しつつあることから、それらの研究を促すため、関連する情報を整理し、英文総説を執筆した。

#### 倫理面への配慮

本研究では、原則として患者情報と完全に切り離された臨床分離株を使用した。しかし、患者の診療情報を含めた解析を実施する場合は、名古屋大学大学院医学研究科の医学研究、疫学研究の倫理委員会にあらかじめ研究計画書を提出し、疫学研究に関する倫理指針(文部科学省、厚生労働省)に基づき審査を受け承認

された後に、研究を実施した。

#### C. 研究結果

##### a. 新規薬剤耐性機構に関する研究

##### 1. 新型メタロ-β-ラクタマーゼ SMB-1 に関する研究(和知野、他)

臨床分離カルバペネム耐性 *Serratia marcescens* より発見したメタロ-β-ラクタマーゼ SMB-1 の X 線結晶構造解析を行い、その詳細な構造を決定した。SMB-1 の構造は他のサブクラス B3 であるメタロ-β-ラクタマーゼである L1 や BJP-1 と酷似していた。しかし、β-ラクタム薬に対する加水分解活性は3者で大きく異なるため、さらに個々のアミノ酸レベルで詳細な比較を行った。その結果、SMB-1 においては 157 番目のグルタミンの存在が基質認識に重要であるものと予測された。本アミノ酸は SMB-1 のみに存在し、L1 や BJP-1 には存在しない。そこで、アラニン変異体を作成し、酵素活性を測定したところ、触媒効率( $k_{cat}/K_m$ )が大きく低下した。したがって、157 番目のグルタミンは SMB-1 において、その酵素活性の発揮に重要な部位であることがわかった。さらに、メタロ-β-ラクタマーゼの阻害剤であるメルカプト酢酸との共結晶を作製し、その構造を決定した。メルカプト酢酸のチオール基は2つの亜鉛原子(Zn1 と Zn2)に配位していた。また、1つの酸素原子が Zn2 と結合しており、メルカプト酢酸は Zn2 との間にキレート環を形成していた。

##### 2. アミカシン高度耐性アシネトバクター属菌に関する研究(金、和知野、他)

本邦で分離される腸内細菌科細菌のアミカシン耐性に関する分子機構には不明な点が多く残されている。そこで、本研究では腸内細菌科細菌を対象に、アミカシン耐性機構の解明を試みた。その結果、アミカシンに対する主たる耐性因子として、16S rRNA MTase とともに、AAC(6')に分類されるアミノグリコシドアセチル化酵素が関与していることがわかった。AAC(6')-Ia や AAC(6')-Ib といった既知アミカシン耐性遺伝子の他、これらの新規亜型である AAC(6')-Ian を発見した。本研究により、腸内細菌科細菌におけるアミノグリコシド耐性機構が多様化しつつある状況をあきらかにした。

##### 3. カルバペネム耐性アシネトバクター属菌に