

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
平成 24 年度-26 年度 総括研究報告書

研究代表者 柴山 恵吾 （国立感染症研究所・細菌第二部・部長）

研究要旨

近年、国内外で様々な新型耐性菌が出現し、さらにそれらは世界中に拡散している。特に途上国では、新型のカルバペネム耐性菌が急速に拡散している。この研究班では、国内外の医療機関から耐性菌を収集して、新型耐性菌の出現や、海外からの耐性菌の流入がないかを監視し、特に注意を要するものが確認された時はゲノムの解析や酵素の構造機能解析などによりその耐性メカニズムを明らかにするとともに、簡便な検査法の開発を行った。国立感染症研究所細菌第二部では、この3年間に医療機関から916株の薬剤耐性菌株を受け入れて解析を行った。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌では、国内に以前から存在するIMPタイプが多かった。関西地区にはIMP-6が多く、その他の地区ではIMP-1が多い傾向があった。ゲノムを詳細に解析したところ、IMP型カルバペネム耐性遺伝子を持つプラスミドが接合伝達により腸内細菌科のいろいろな菌株、菌種に伝播して拡散し、院内感染を起こし、さらに地域で拡散していることが明らかになった。医療現場でのプラスミドの伝播を実際に明らかにしたのは、この研究が初めてである。これらの結果に基づいて、厚生労働省より注意喚起の事務連絡、課長通知が発出された。日本では従来からカルバペネム耐性遺伝子はIMP型が多いが、途上国を中心に海外に多い耐性遺伝子も国内分離株で検出した。これまでにNDM型カルバペネム耐性遺伝子を持つ株が16施設から25株、OXA-48型カルバペネム耐性遺伝子を持つ株が2施設から6株、KPC型カルバペネム耐性遺伝子を持つ株が4施設から15株確認された。これらはほとんどがアジアの途上国からの輸入例だった。これらの結果に基づき、厚生労働省から海外からの輸入例についての注意喚起の事務連絡が発出された。そしてこれら及びその他の知見に基づいて、感染症法にカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症を新たに加えること、薬剤耐性アシネトバクター感染症を5類定点把握疾患から全数把握疾患に変更することを提言した。またバンコマイシン耐性腸球菌感染症、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症の届け出基準の改定を提言した。これらは審議会の議論を経て感染症法の改定時に盛り込まれた。新たな耐性遺伝子としては、カルバペネム耐性遺伝子としてTMB-2、PAM-1、GES-24、IMP-43、IMP-44、NDM-8、アミノグリコシド耐性遺伝子としてAAC(6')-IaJ、aac(6')-Ian、腸球菌のバンコマイシン耐性遺伝子としてvanNを発見した。肺炎球菌ではテリスロマイシン耐性株を分離し、耐性メカニズムとして新たに23S rRNAのメチル化酵素の欠損が関与していることを明らかにした。これらについては、今後国内で拡散が見られないか、監視を継続する必要がある。なお、肺炎球菌では、7価ワクチンでカバーされない血清型19Aでペニシリン耐性が多いことが明らかになった。カルバペネム分解遺伝子SMB-1については蛋白を結晶化し、構造解析を行って、酵素の活性中心の構造を詳細に解明し、

今後阻害剤の開発に道を開いた。腸内細菌科細菌では、新規のホスホマイシン耐性遺伝子 fosK を発見し、その簡便な検出法を開発した。腸内細菌科細菌とともに院内感染をおこしやすいアシネトバクター属菌については、多剤耐性傾向があり医療現場で拡散しやすいタイプ International Clone II の簡便な検出法や、タイピング法を開発した。サーベイランスについては、厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)でバンコマイシン耐性腸球菌感染症など頻度が少ない感染症のバイアスの除去や、地域別、医療機関特特別の集計法を考案した。さらにサーベイランスデータを臨床現場で感染対策に活用するためのツールを開発した。また JANIS の集計結果を日本のナショナルデータとして WHO に提供し、WHO の 2014 年 Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance に掲載された。H26 年度は、J-GRID、WHO と連携してアジア各国との共同研究体制の構築も進めた。このように本研究班では、薬剤耐性菌の実態を把握し、新型耐性菌の耐性メカニズムを明らかにするとともに、医療現場に特に注意すべき情報を提供したり、感染症法の改定のための科学的エビデンスを提供して、厚生労働行政に貢献した。また新たな検査法や新薬など新技術の開発を行った。薬剤耐性菌は、今後も新たなものが次々と出現し、拡散していくことが予想される。今後も関連する基礎、および臨床の研究班、J-GRID、WHO などと連携し、グローバルな視点で薬剤耐性菌に関する研究を包括的に推進して、社会で薬剤耐性菌が拡散するのをできる限り阻止し、国民の健康を守っていく必要がある。

研究協力者

松井真理、鈴木仁人、筒井敦子、森茂太郎、
林原絵美子、金玄
(国立感染症研究所細菌第二部)

A. 研究目的

近年、国内外で様々な新型耐性菌が出現し、さらにそれらは世界中に拡散している。特に途上国では、新型のカルバペネム耐性菌が急速に拡散している。米国でも、CDC はカルバペネム耐性腸内細菌科細菌がこの 10 年で急速に増加したと報告した。国内でも類似の薬剤耐性菌による院内感染が散発しており、今後諸外国のように薬剤耐性菌が拡散していくことが危惧される。これらの耐性菌は有効な薬剤が無いか極めて限られるため、公衆衛生上深刻な問題である。薬剤耐性菌対策のためには、まず状況を的確に把握し、そして特に注意を要する耐性菌を明らかにして積極的に社会に情報発信する必要がある。同時に、簡便な検査法や型別法を開発して医療現場が容易に検査を

できるようにして、感染拡大防止策が適切に実施されるようにすることが重要である。日本においては、薬剤耐性菌のサーベイランスとして厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)があり、国立感染症研究所がその実務を担当しているが、このサーベイランスをより充実させ、精度を高めることも必要である。

この研究では、国内外の医療機関で分離される耐性菌を収集し解析して、どのような耐性菌が外国から流入したり、国内で新たに出現または拡散しているのかを把握すること、そしてその薬剤耐性機構について分子/遺伝子レベルで詳細な解析を行ない、特に重要な耐性菌については、医療機関の検査室でも実施可能な簡便迅速な検査法を開発することを目的とした。なお、H26 年度は J-GRID との連携で、アジア各国との連携を進め、海外の耐性菌を収集することも目標とした。また JANIS の精度管理の向上や、より適切な集計方法や解析ツールの開発を行い、薬剤耐性菌に関する正確なナシ

ョナルデータが得られ、かつ医療機関での感染対策のレベルの向上に資することも目的とした。国内でどのようなタイプの耐性菌が拡散し、特にどのようなタイプの耐性菌に注意すべきか、また海外から国内に流入、拡散が懸念される耐性菌について社会に情報発信して、社会において薬剤耐性菌が拡散するのをできる限り抑制することを最終目標とした。

この研究班では、基礎研究者、応用研究者、疫学研究者が有機的に連携し、日本及び国際社会における薬剤耐性菌の状況を俯瞰的に把握して、厚生労働行政上必要な政策提言を行うことも目的とした。

B. 研究方法

代表研究者、分担研究者が国内外の医療機関から耐性菌を収集して、新型耐性菌の出現や、海外からの耐性菌の流入がないかをモニタリングした。特に注意を要するものが確認された時は社会に情報発信した。

代表研究者柴山は協力研究者とともに国内の菌株収集と解析を行い、新型の耐性菌の出現や海外で蔓延している耐性菌の流入を監視した。また特にカルバペネム耐性腸内細菌科細菌については、耐性遺伝子を持つプラスミドの全塩基配列を決定し、「薬剤耐性菌サーベイランスとゲノムデータの集約・解析に関する研究班(黒田班)」と連携して、社会における耐性遺伝子の動態を解析した。既知の耐性遺伝子が検出されない菌株についてはゲノム解析を行い、新規の耐性遺伝子を同定した。これまでに同定した新型耐性遺伝子については、迅速簡便な検査法の開発を進めた。また H26 年度は J-GRID と連携して外国の耐性菌株について収集体制を構築した。JANIS については、精度向上に関する研究を進めるとともに、J-GRID と連携して海外展開を行った。また、研究班の成果をもとに、感染症法における薬剤耐性菌の位置づけを検討した。

各分担研究者の研究方法は以下のとおりである。

荒川は、腸内細菌科細菌から新型のカルバペネマーゼ遺伝子を発見し、構造機能解

析を行って耐性機構を明らかにした。ペニシリン低感受性連鎖球菌の分子疫学を解析した。新規のホスホマイシン耐性機構を明らかにし、その検出法を開発した。アシネトバクターの簡便な遺伝子型別法の開発も行った。

飯沼は、MRSA と多剤耐性緑膿菌についてどの遺伝子型タイプが特に拡散しやすく注意を要するのかを明らかにし、その簡便な検出法を開発した。

大西は、肺炎球菌ワクチンの接種率向上に伴って、侵襲性肺炎球菌感染症患者から分離される肺炎球菌の薬剤感受性パターンがどのように変化しているのかをモニターし、ワクチン施策に資するエビデンスを蓄積した。また淋菌の薬剤感受性試験の標準化を検討した。

北島は、NICU の感染症サーベイランスにおいて、新たに感染症入力シートを作成し、医療機関に普及させた。

切替は、腸内細菌科細菌、緑膿菌で新規に薬剤耐性遺伝子を同定し、その迅速診断キットを開発し、さらに実際に臨床現場で試用した。

黒崎は、創薬を目指してメタロベータラクタマーゼ阻害剤の候補化合物を探索した。また蛍光セファロsporin 物質を開発し、これを用いてカルバペネマーゼ産生菌の識別法を開発した。

佐多は、アシネトバクターのマルチプレックス PCR 同定法を開発した。またゲノム解析により流行株の分子疫学解析を行った。

鈴木は、JANIS で施設特性別の集計を行う場合、病床数や診療科など、どのような指標で施設を分類するのが最も適切かを明らかにし、JANIS 運営委員会に提案した。

館田は、OXA 型カルバペネマーゼ検出キットの開発、改良と評価を行った。また感染症法のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の届け出基準の検討を行った。

富田は、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)に関して新規の耐性遺伝子を見出した。MRSA については、バンコマイシンに対する感受性の経時的变化を解析した。

長沢は、JANIS において採用すべき薬剤

耐性のブレイクポイントを検討し、JANIS 運営委員会に提案した。その他、医療機関検査室において検出すべき薬剤耐性菌の種類と検査方法の提言を行った。

藤本は、JANIS データを臨床現場の感染対策に活用するツール開発を行った。

松本は、結核菌の新規遺伝子型別法を確立し、従来法と比較して評価した。

山根は、JANIS において特に小規模医療機関が参加する場合の課題について整理し、JANIS 運営委員会に提案した。JANIS 参加機関のサーベイランスの実施状況やサーベイランスの実施にあたっての課題を調査し整理した。

山本は、ケトライド耐性の肺炎球菌を分離し、耐性のメカニズムを明らかにした。

倫理面への配慮

臨床分離菌株を収集するにあたり、患者情報を集めた場合は所属機関の倫理委員会の審査を受け、承認を受けた上で研究を実施した。

C. 研究結果

柴山は、協力研究者とともに国内の医療機関からカルバペネム耐性腸内細菌科細菌など、臨床上、公衆衛生上問題が大きい臨床分離菌株を収集し、解析を行った。概略を以下に記載する。また、詳細については各研究協力者のレポートを添付資料として末尾に付す。

薬剤耐性菌の収集と解析について

国立感染症研究所細菌第二部では、この3年間に医療機関から916株(H24年度195株、H25年度240株、H26年度481株)の薬剤耐性菌株を受け入れて解析を行った。その中で、新規カルバペネム耐性遺伝子TMB-2、PAM-1、GES-24を同定した。また途上国を中心に海外で蔓延しているNDM型カルバペネム耐性遺伝子を持つ株が16施設から25株、OXA-48型カルバペネム耐性遺伝子を持つ株が2施設から6株、KPC型カルバペネム耐性遺伝子を持つ株が4施設から15株あった。これらはほとんどがアジアの途上国からの輸入例だった(発表論文1)。その他

は、国内に以前から存在するIMPタイプが主だった。関西地区にはIMP-6が多く、その他の地区ではIMP-1が多い傾向があった。プラスミドの伝播による院内感染事例の発見について

1. 九州地方の病院から、ICU、またはそのICUと患者の出入りがある病棟で、複数の患者からカルバペネムに低感受性の腸内細菌科細菌が分離されているが、菌種が多様で、院内感染かどうか判断がつかないとの相談が、国立感染症研究所細菌第二部にあった。耐性遺伝子の解析を実施した結果、分離されていた複数種類の菌種のほとんどが、同じプラスミドを保有していたことが分かった。このプラスミドは、カルバペネム耐性遺伝子IMP-1を持っており、IncL/Mタイプだった。疫学的解析をあわせると、その薬剤耐性遺伝子を持ったプラスミドが病棟内で、いろいろな菌種に拡散していたと考えられた。この解析結果については論文2にて発表した。

2. 大阪地区の中核医療機関において、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌が100名以上の患者から分離されており、院内感染が疑われることが報道発表された。これらの菌株を国立感染症研究所細菌第二部に送付してもらい、上記のアウトブレイク例と同様に、プラスミドの解析を実施した。ほとんど全てのプラスミドはカルバペネム耐性遺伝子IMP-6を持っており、IncNタイプだった。ここで、このIMP-6は薬剤感受性試験においてメロペネムを用いると耐性と判定されるが、イミペネムを用いると感性と判定されてしまうことが知られている。医療機関では薬剤感受性試験にイミペネムが用いられることが多いため、このIMP-6のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌が見逃された可能性がある。なお初期の解析結果から、このアウトブレイクは規模が大きく、疫学的な解析も大規模となることが予想されたため、後に別途研究班が組織され(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、H26-特別-指定-005、代表研究者、大石和徳)、柴山は引き続き分担研究者として解析を続

行した。解析の結果、この医療機関では、数年前からこのカルバペネム耐性遺伝子 IMP-6 をもつプラスミドが院内で多くの菌種に組み替えを起こしながら伝播しており、周辺の医療機関も含めて大規模に感染が拡散していることが明らかになった。この解析結果については論文 3 にて発表した。日本におけるアシネトバクター属菌の分子疫学

アシネトバクター属菌には、臨床現場で特にアウトブレイクを起こしやすいタイプ International Clone II (IC II) がある。この研究では、IC II に特異的な *bla*_{OXA-51-like} の配列を見出し、その部分をターゲットにして IC II を迅速に検出する方法を 2 種類開発した。1 つはパイロシーケンス法を用いるもので、研究機関で多量の検体を解析するのに適している。もう 1 つは、Qprobe-PCR 法を用いるもので、簡便性に優れ、医療機関で実施可能である。

さらに、国内の医療機関 86 施設に協力いただき、H24 年 10 月～H25 年 3 月に分離されたアシネトバクター属菌を分与してもらって、菌種の同定、ならびに上述の方法による 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。866 株が収集された。うち、*A. baumannii* が 645 株 (75%) と最も多く、うち 245 株 (28%) が IC II だった。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だった。特に、フルオロキノロンについては IC II は全ての株が耐性だった。なお、2000 年に実施された調査では IC II はわずかにしか検出されなかったため、近年国内においても IC II が増加していることが明らかになった。この結果の詳細は、添付資料 1 に示す。

また、IC II が特に拡散しやすいメカニズムについて基礎研究を行った。IC II は、薬剤耐性遺伝子だけでなく、病原性に関わる遺伝子をゲノム上やプラスミド上に集積させており、一緒に存在している別の細菌との間での競合に極めて強いことが分かった。この結果の詳細は、添付資料 2 に示す。

Helicobacter cinaedi による院内感染

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。この研究では *H. cinaedi* の PFGE および MLST 法を確立した。MLST 法については、Website を作成し、一般公開している (<http://pubmlst.org/hcinaedi/>)。そしてその方法を実際に院内感染事例の解析に応用し、対策に活用した。また菌株の解析から、日本の分離株は、全てシプロフロキサシンおよびクラリスロマイシンに耐性であることが分かった。この結果の詳細は、添付資料 3 に示す。

感染症法の改定

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌による感染症が世界的な問題となっており、また国内でも上記のような院内感染が起こっていることから、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症を新たに 5 類全数把握疾患とすることを提言し、届け出基準を作成した。届け出基準は、これまで国立感染症研究所が国内の医療機関から収集した菌株の解析結果をもとに、感度、特異度よく検出が出来る、かつ臨床現場で無理なく判定ができるように設定した。なお、基準の作成にあたっては、臨床微生物学会精度管理委員会と緊密に協議した。議論の詳細を添付資料 4 に示す。

薬剤耐性アシネトバクター感染症については、従来は定点把握となっていたが、報告数が少なく、実質的なサーベイランスとなっていなかったため、全数把握に変更することを提言した。

これらについては、厚生労働省健康局結核感染症課の審議会にて議論の後、H26 年 9 月に感染症法に盛り込まれた。届け出基準に関する Q&A 集を国立感染症研究所のホームページに掲載した。 (<http://www.niid.go.jp/niid/ja/id/495-source/drug-resistance/5011-carbapenem-qa2.html>、添付資料 5)。

バンコマイシン耐性腸球菌の届け出基準で、従来はバンコマイシン耐性遺伝子 (*vanA*,

vanB, または vanC) が検出された場合は届け出ると規定されていたが、特に vanC 遺伝子を持つ菌株の場合、バンコマイシンの耐性が極めて低いか感性的の場合が多いため、臨床現場で届け出対象になるのか否かについて混乱が生じていた。このため、届け出基準から遺伝子の検出を削除することを提言した。また、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症の届け出基準で、バンコマイシンの MIC が従来は 32 µl/ml 以上であったが、CLSI など諸外国の基準に合わせて 16 µl/ml 以上に変更することを提言した。これらについても、感染症法の改定時に盛り込まれた。

結核菌の薬剤耐性に関する研究

抗結核薬の 1 つであるピラジナミドの作用メカニズムの解明と、ピラジナミドを基にした新規抗結核薬の開発を試みた。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、NAD 代謝に関与する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阻害することが分かった。In silico で新規阻害剤の候補として 64 種類の化合物を選出し、実際に酵素阻害活性を調べたところ、顕著な活性は認められなかった。今後は候補化合物の構造最適化が必要である。この結果の詳細は、添付資料 6 に示す。

アジア各国との連携体制構築

J-GRID 大阪大学タイ拠点との連携で、タイマヒドン大学ラマチボディ病院、ウドンタニ病院、ミャンマー保健省 Department of Medical Research と共同研究を行うこととなった。また、インドの Vellore の Christian Medical College & Hospital とも年度内に共同研究について協議を行う予定である。うち、ラマチボディ病院からはカルバペネム耐性 *Klebsiella pneumoniae* 6 株が送付されてきた。これらは、すべて NDM 型カルバペネム耐性遺伝子を持っていた。現在、Illumina 社と Pacific Biosciences 社の次世代シーケンサーによるゲノム解析とプラスミド解析を行っている。解析の結果、特に注意を要する新規の耐性菌であることが明らかになれば、検査法の開発を

進める予定である。神戸大学のインドネシア拠点との共同研究ではスラバヤのアイランガ大学熱帯病研究所、ストモ病院に JANIS の導入を始めた。海外機関から自動検査機器のデータを送信するにあたり、プログラム上の問題点を明らかにできたので、今後本格稼働にむけて改良を行う予定である。また、多くの途上国の医療機関では、院内での薬剤耐性菌の分離状況の集計に、WHO が開発したツール WHONET を利用している。WHONET は、各医療機関が自分施設内の情報を集計するためのツールである。一方、JANIS は多くの医療機関の薬剤耐性菌の情報を集計し、地域や国レベルのデータを得るためのデータベースである。JANIS と WHONET を組み合わせれば、理論上は世界的なデータベースが構築できる。WHO の WHONET の開発者と協議を行ったところ、WHO は高い関心を示した。WHONET の開発者に、WHONET のデータを JANIS にエクスポートする機能を作成してもらうことになった。

WHO の仲介では、カンボジア厚生省の Department of Hospital Services と Department of Communicable Disease Control を訪問し、共同研究について協議した。先方は薬剤耐性菌の研究について日本との連携を強く要望していたため、共同研究を開始することで合意し、今後具体的な内容を検討することとした。

これまで感染研が他プロジェクトで共同研究を行っていた台湾 CDC については、今年度は台湾 CDC の研究者にこちらの解析の流れを体験してもらった。来年度以降の共同研究の継続について引き続き協議を行う予定である。また、ベトナム National Institute of Hygiene and Epidemiology とも、引き続き共同研究について協議を行う予定である。

なお、アジア各国からの菌株収集は来年度以降、「薬剤耐性菌サーベイランスとゲノムデータの集約・解析に関する研究班（黒田班）」と共同で実施されることになったので、H26 年度の活動内容の詳細についてはそちらの報告書に記載した。来年度以降、海外からも本格的に菌株を収集する予定で

ある。

研究分担者の研究結果の概要を以下に記す。詳細は各研究者の報告書にあるので省略する。

荒川

(1) 新型メタロ-β-ラクタマーゼ SMB-1 の X 線構造解析により酵素の活性中心の分子構造を詳細に解明した。

(2) ペニシリンに低感受性を獲得した B 群レンサ球菌 (PRGBS) の院内感染の事例を報告するとともにそのような PRGBS の分子疫学解析を行った。

(3) ホスホマイシン耐性に関与する FosA3 を産生する株を簡便に検出する方法および新しいホスホマイシン耐性酵素 FosK を発見した。

(4) アシネトバクターの分子疫学解析とともに、アシネトバクター・バウマニの国際流行クローンを一般の検査室で簡便、迅速に識別できる解析法を構築した。

飯沼

(1) 市中 MRSA の地域サーベイランスを実施し、病原性因子の解析を行ったところ、PVL 陽性株は少数であったが、小児において市中 MRSA の特定クローン (ETA 陽性 CC121、いわゆる Impetigo clone、および TSST-1 or ACME 陽性 CC8 [米国での主要 CA-MRSA clone]) の地域集簇性が確認された。

(2) 次世代シーケンサーを用いて 113 株のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) のゲノム解析を行い、ゲノム解析による MRSA 集団感染解析の可能性を検討した。1 塩基多型 (SNP) を用いた系統樹解析によって、集団感染由来株は近縁な位置関係にあったが、同一集団感染内における SNP 数はクローンによって差が大きかった。

(3) 薬剤耐性 (二剤以上) 緑膿菌の地域サーベイランスを実施し、病原性因子の解析を行ったところ、MBL 陰性、インテグロン遺伝子陰性推定 CC242 株の施設および時間を越えた地域での拡がり確認された。

大西

(1) 小児侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) 由来肺炎球菌 141 株の血清型別、薬剤感受性およびシーケンシングを行った。141 症例のうち、ペニシリン G 耐性肺炎球菌 (PRSP; MIC 2 μg/mL) は 16 症例 (11.3%)、メロペネム耐性菌 (MIC 1 μg/mL) は 2 症例 (1.4%) より分離された。16 株の PRSP のうち、Sequence type (ST) 320 型 19A 肺炎球菌は 9 株で最も多かった。すべての IPD 由来肺炎球菌はニューキノロン系薬トシル酸トスフロキサシンに感受性 (MIC 0.12-0.5 μg/mL) を示した。(2) 淋菌の薬剤感受性試験の標準法は煩雑であるため臨床現場で実施されていない。ディスク法において CLSI で提唱されている淋菌用培地を用いた方法と、チョコレート寒天培地を用いた方法で検討をおこなった。その結果、チョコレート寒天培地を用いたディスク法では CLSI 法との乖離があることが分かった。今後、臨床現場で実施可能な検査法を開発する必要があること分かった。

北島

(1) 感染症入力シートを作製し、全国の NICU において、新生児感染症のモニタリングを 2010 年から実施している。

(2) 全国の NICU における MRSA の保菌率と感染対策項目の解析を行い、予防対策を構築している。中部地方の 2 つの NICU において MRSA 感染症のアウトブレイクがあり、今後の MRSA 感染予防対策を小児科学会誌を通じて、提言を行なった。

(3) 全国の総合病院における産科混合病棟の問題点を把握し、看護協会とともに産科混合病棟におけるマネジメントのあり方を模索し、病院機能評価機構に未熟児新生児学会感染対策・予防接種委員会として看護協会とともに新しい提案を行なっている。

(4) 超低出生体重児に発生する劇症壊死性腸炎の原因とその他発病機序の解明にせまる。

切替

(1) 2011 年に分離された多剤耐性緑膿菌臨

床分離株より新規アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ AAC(6')-Iaj を同定し、その結果を Antimicrob Agents Chemother (Tada et al. 2013, 57:96-100) に発表した。

(2)2011 および 2012 年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株よりメロペネムを効率よく分解する IMP-type メタロ- β -ラクタマーゼの新規バリエーション IMP-43 および IMP-44 を同定し、その結果を Antimicrob Agents Chemother (Tada et al. 2013, 57:4427-4432) に発表した。

(3)日本の医療施設から分離された多剤耐性大腸菌から NDM-3 を同定し、その生化学的性状を明らかにした。その結果を Antimicrob Agents Chemother (Tada et al. 2014, 58:3538-3540) に発表した。

(4)日本の医療施設から分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株 49 株から ArmA 産生菌を分離し、その内の一株の全塩基配列を決定した。その結果を Antimicrob Agents Chemother (Tada et al. 2014, 58:2916-2920) に発表した。

黒崎

(1)IMP-2 メタロ- β -ラクタマーゼならびに IMP-1-クエン酸複合体の結晶構造を決定し、後者の構造情報を基にクエン酸誘導体によるメタロ- β -ラクタマーゼ阻害剤を設計・合成した。

(2)ファージディスプレイ法により IMP-1 メタロ- β -ラクタマーゼに特異的に結合するペプチドを同定した。

(3)蛍光性セファロスポリンを設計・合成しセリン型とメタロ型の β -ラクタマーゼ産生菌の検出剤を開発した。

佐多

(1)マルチプレックス PCR 法によるアシネトバクター属菌、特に医療機関で分離されるバウマニ類緑菌のうち、*A. baumannii*, *A. nosocomialis* 及び *A. pittii* を簡単に鑑別することができるスクリーニング法を開発した。医療機関で分離した株を用いた本法の評価を実施した。

(2)日本で分離された 17 株のアシネトバクター バウマニ 国際流行クローン II (ICII) を全ゲノム解析した。日本国内で分離された ICII の多くは互いに近縁で、海外で分離された主要な ICII とも比較的近縁であった。

鈴木

(1)JANIS 検査部門では、平均在院日数と病床規模によって分母となる 100 床あたりの検体提出患者数が有意に異なっていることがわかった。特に平均在院日数が病床規模よりも分母に与える影響が大きく、医療機関特性格集計を実施する際には平均在院日数を収集することが必要不可欠と考えられた。

(2)バンコマイシン耐性腸球菌など、国内での分離が稀な薬剤耐性菌は、10 施設程度の限られた医療機関における集団発生が、JANIS 全体の分離率に影響を与えていることを明らかにした。

(3)JANIS の集計にあたり、200 床未満の中小規模病院の参加、医療機関特性格集計、都道府県別集計、集計する菌種、抗菌薬の追加、変更、耐性の判定の基準などについて JANIS 運営委員会に提案した。概略を添付資料 7 に示す。

舘田

(1)東日本と西日本で分離された MBL 産生株が保有するプラスミドの全ゲノム解析を実施した。

(2)両方のプラスミドのうち IncN、pMLST5 に属するプラスミドの遺伝的背景は同一であったが、インテグロン構造内の遺伝子カセットのみが異なっていた。

(3)同一起源の MBL をコードする遺伝子を保有するプラスミドが東日本及び西日本に拡散している可能性が示唆された。

富田

(1)新規 VanN 型 VRE 株を国内で発見し、解析結果を学術雑誌へ報告した。(世界で 2 例目、環境分離は初めて) 新規の VanN 型 VRE の検出方法を確立した。

(2)MRSA のバンコマイシン高度耐性株は存在せず、これまでと同等の治療効果が期待できることを科学的に示した。

(3)本研究成果に基づき複数の臨床系学術集会においてバンコマイシン耐性 MRSA (VISA) についての招聘講演を行った。

長沢

(1)微生物検査室における薬剤耐性菌検査の現状調査アンケートの実施と解析を行い、2010年に実施した調査と比較し、実施している薬剤耐性菌検査の範囲が拡大していることが確認できた。

(2)MRSA におけるバンコマイシンの MIC 値と変動因子について検討を行い、機種間差やバージョンアップにより変動することが確認できたが、耐性化の傾向は認められなかった。

(3)我々の開発した LAMP 法により、日常業務では実施されていないグラム陰性桿菌における 16S メチラーゼ耐性遺伝子の検出状況について検討した結果、増加傾向は認められなかった。

藤本

(1)耐性菌検出・警告のための「耐性菌警告ファイル」のメッセージ定義第 1 版・第 2 版・第 3 版をそれぞれ作成、公開、意見収集、改良を行い、案として確定した。同メッセージを作成するインターフェイス、受信するインターフェイスの開発を行い、検証した。本年度中に、インターフェイスを含めて公開を行う予定。

(2)JANIS 検査部門 2DCM-web、epi-curve 機能の改良を行い、epi-curve の集計期間を 1 週、2 週、4 週から選択できるようにした。動作検証の上 JANIS 2DCM-web システムに実装した。

(3)(1)にもとづいて、2DCM-web 上で特定の耐性菌の拡散を可視化する仕組みの開発を行った。今年度中に検証重ね、成果として実装する予定。

(4)2DCM-web で耐性度を反映したカラーコード表示をさせる仕組みの開発を行った。今年度中に検証を重ね、成果として実装す

る予定。

(5)2DCM-web で同じ耐性パターンを示す菌株が検出されている患者をよりわかりやすく表示する方法の開発を行った。検証後に実装する予定。

(6)菌の異常集積自動検出 (Probability-based Microbial Dissemination Alert ; PMA) 簡易アルゴリズムの開発を行い、PMA にもとづいた、JANIS 検査部門レベルでの実装試験を実施している。本年度中に、PMA にもとづいた、-alert matrix の実装試験を行う。検証を行い、実装への提言を行う。

(7)JANIS 検査部門データの研究利用のため、厚生労働大臣から提供を受けた 2013 年 1 月～2014 年 7 月までのデータ、提出レコード数 12,384,867 件、変換後菌レコード数 10,056,840 件を表計算ソフトで利用可能なデータに変換する作業を行った。臨床検査技師グループ等でデータ解析を行う。

松本

(1)簡便で正確な VNTR マーカを用いた分子疫学解析測定法を開発した。

(2)抗酸菌に対する line probe assay の臨床評価を行った。

(3)結核菌遺伝子の機能を持つと思われる部位の有無による新しい遺伝子型別法 (TB-SGIP)を開発した。

山根

(1)JANIS 検査部門のデータを用いて、食中毒が原因で発症する *Listeria monocytogenes* による重症感染症の発生率を算出することができた。また、肺炎球菌ワクチンの導入によって、0 歳～1 歳の重症肺炎球菌感染症が半減したことを確認できた。

(2)JANIS 全入院患者部門、手術部位感染部門参加医療機関へのデータ精度を確認するための聞き取り調査シートを作成した。

山本

(1)2009 年～2010 年に全国の医療機関で分離された 500 株の肺炎球菌から TEL 耐性菌

1株を検出した。

(2) S1215(MIC=4 µg/ml)の TEL 耐性の主要因は、*ermB* がコードするメチラーゼによる 23S rRNA A2058 のメチル化であった。*ermB* 遺伝子の構造遺伝子とリーダーペプチド遺伝子の間に 28bp の欠失が ErmB メチラーゼ高発現を引き起こし、TEL 耐性をもたらしたと推論できた。

(3) S1215 の *ermB* 遺伝子は Tn6002 様トランスポゾンによって伝搬することを明らかにした。

(3) 2012 年～2014 年に国内の 1 医療機関で分離されたリネゾリド耐性コアグラセ陰性ブドウ球菌 5 株の耐性機構を検討し、23S rRNA の変異の蓄積による耐性度の上昇を明らかにした。さらに内因性 rRNA 修飾酵素遺伝子 *rlmN* の変異が耐性をもたらすことを明らかにした。

(4) 肺炎球菌の新型テリスロマイシン耐性機構を見出した。すなわち 23S rRNA の G748 位を修飾する内因性メチル化酵素 RlmA ならびに U747 位をメチル化する RlmCD の変異が TEL 高度耐性をもたらすことを明らかにした。

(5) RlmCD による U747 のメチル化は RlmA^{II} による G748 位のメチル化を促進することを明らかにした。

(6) RlmA^{II} による G748 位のメチル化がテリスロマイシンの A752 位への結合を強め、この安定した結合が肺炎球菌に対する強い抗菌活性の主要因であることを遺伝生物学的解析および構造エネルギー計算により明らかにした。

D. 考察

JANIS 公開情報によると、現在日本の医療機関で分離される腸内細菌科細菌においてカルバペネム耐性は 1%未満である。米国では約 4%、特に *Klebsiella* に限ると 10%以上と報告されている。またアシネトバクターでは、日本ではカルバペネム耐性は 2%程度だが、海外では 50%を超える国が多い。日本はこれら院内感染の原因となる細菌については薬剤耐性が比較的少ないと言える。

しかしながらこの研究班の研究の結果、国内でも一部の医療機関、あるいは地域でカルバペネム耐性腸内細菌科細菌によるアウトブレイクが起こっていることが明らかになった。また新たな耐性遺伝子を持つ株が分離されており、海外からも NDM 型、OXA-48 型、KPC 型カルバペネム耐性菌も輸入されていることが分かった。特に海外で蔓延しているタイプは、輸入例を発端に国内で拡散する恐れがあるので、十分な注意が必要である。今後も、感染対策上重要な耐性菌を特定し、臨床現場で実施可能な検査法を開発して、薬剤耐性菌の拡散をできる限り阻止していく必要がある。

九州地方の病院及び大阪地区の病院のアウトブレイクは、プラスミドが異なる菌株間を伝播して耐性菌の拡散が起こったと考えられた。一般的には、院内感染は同一の菌が伝播することによって起きると認識されており、実際にこれまでの厚生労働省の課長通知(H23 年医政局指導課)でも、アウトブレイクを疑う基準は同一菌種による症例の集積というのを念頭において規定されていた。今回の事例で、分離される菌種が異なっているにもかかわらず、院内感染が起きることがあることが分かった。このようにプラスミドの伝播による院内感染が実際に臨床現場で起こっているのを明らかにしたのは、この研究が初めてである。

アシネトバクター属菌は、海外の多くの国においてはカルバペネム耐性が半数以上を占めるが、日本においては 2%程度である。しかしながら、院内感染を起こしやすく、薬剤耐性傾向が強い IC II が日本においても増加傾向にあることが明らかになった。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である。

また、院内感染は、いわゆる医療関連感染により様々な菌種が原因で起こる。そのため、医療機関においては薬剤耐性菌だけでなく、様々な病原細菌についても通常から注意をする必要がある。

感染症法のカルバペネム耐性腸内細菌科

細菌感染症の届け出基準については、AmpC型ラクタマーゼを産生する *Enterobacter* 属菌を届け出対象に含めるかどうかについて当初から議論があった。現行の基準では含める形になっている。今後このタイプの耐性菌について公衆衛生上、臨床上の重要性を検討し、必要なら届け出基準の改定を提言することが必要である。ラタモキシフでスクリーニングをかけると、効率良くこのタイプを除外できることが明らかになっているが、ラタモキシフは医療機関で一般に薬剤感受性検査に用いられていないという問題がある。届け出基準は臨床現場の検査の実施状況を考慮しつつ、今後検討を続ける必要がある。

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌は、カルバペネム耐性遺伝子を持っていても、耐性が低いか感性的ことがある。これらは感染症法の届け出基準に該当しないものの、将来に菌体内で耐性遺伝子の発現量が増加したり、プラスミドの伝播により耐性遺伝子が他の菌株、菌種に拡散する可能性があるため、感染対策上は注意が必要である。臨床現場では、感染症法の届け出対象にならないと解釈される場合があるので、この点についても医療機関に引き続き注意喚起を行う必要がある。

国内における薬剤耐性菌感染症の発生動向については、今後も JANIS と感染症法で監視を継続し、増加が見られないかどうか注意する必要がある。研究班ではさらにサーベイランスを強化して新たなタイプや海外からの輸入について捕捉し、それらのゲノム解析や細菌学的、生化学的解析、また疫学的解析を行って性状を解明し、臨床的、公衆衛生上の重要性を明らかにして、特に注意を要するものについては注意喚起を行うとともに迅速検査法を開発するなどして、社会でできるだけ拡散しないようにしていく必要がある。今後も、院内感染に関する臨床の研究班、ゲノム解析に関する基礎の研究班、J-GRID、WHO などと連携し、グローバルな視点で薬剤耐性菌に関する研究を包括的に推進していく必要がある。また、

臨床現場で薬剤耐性菌によるアウトブレイクが起こった場合、多くの医療機関ではかならずしも薬剤耐性菌の解析ができる専門家がいないため、現場では医療機関だけで十分な対策ができない場合が多い。地域連携により協力関係にある大学や行政、または国立感染症研究所の支援が必須である。協力関係のあり方は各地域で様々で、中核となる大学が地域の全ての医療機関を取りまとめている場合や、また各病院が個別に行政や大学等の研究機関と協力関係を持っているところもあるようである。地域の実情に合わせて、全ての医療機関で適切な院内感染対策が実施されるように支援する体制の整備が必要であろう。

E. 結論

腸内細菌科細菌や緑膿菌、アシネトバクターのカルバペネム耐性は、海外の多くの国と比較するとまだ少ない状況にある。しかし、海外で蔓延している耐性菌や新型の耐性菌の出現が見られるので、監視を継続する必要がある。海外からの輸入については、厚生労働省結核感染症課から注意喚起の事務連絡(H25.3.22)を發出していただいた(添付資料8)。特にカルバペネム耐性腸内細菌科細菌については、国内の複数の医療機関で大規模な院内感染を起こしていることが明らかになった。これらの事例において、我々は耐性遺伝子を持つプラスミドが菌種を超えて伝播し、院内感染を起こしていることを初めて明らかにした。この結果を、厚生労働省医政局地域医療計画課の審議会である院内感染対策中央会議(H26.8.27)で説明し、アウトブレイクを疑って感染対策を開始する基準を検討する基本情報とした。そして腸内細菌科細菌ではプラスミドの伝播によるアウトブレイクが起こることがあり、注意が必要であることについて、厚生労働省医政局地域医療計画課から事務連絡(H26年6月23日)及び課長通知(H26年12月19日)で注意喚起をして頂いた(添付資料9)。また、感染症法の改定にあたり、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症を新たに5類全数把握疾患に追

加し、薬剤耐性アシネトバクター感染症を第5類定点把握から全数把握疾患に変更することを提言し、審議会での議論を経て盛り込まれた(H26年9月19日)。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌については、全国地方衛生研究所協議会と連携し、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症に関する地方衛生研究所レファレンスセンターを立ち上げることとした。アジア各国との連携も進め、情報共有体制や共同研究体制の構築を行った。

F. 健康危険情報

医療機関が海外から帰国した患者を受け入れる場合は、海外で蔓延しているカルバペネム耐性菌等を保菌している場合があるので、十分な注意が必要である。

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌においては、異なる菌種間でプラスミドの伝播が起こって院内感染を起こすことがあるので、注意が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 鈴木里和、松井真理、鈴木仁人、柴山恵吾 外来型カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌の検出状況、IASR、Vol. 35 p. 287-288: 2014年12月号
- 2) 安部朋子ら、プラスミド水平伝達が関与した院内感染事例、IASR Vol. 35 p. 289-290: 2014年12月号
- 3) 山岸拓也ら、<速報>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、IASR Vol. 35 p. 290-291: 2014年12月号
- 4) 柴山恵吾他、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症、IASR Vol. 35 p. 281-282: 2014年12月号
- 5) 松井真理他、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の検査、IASR Vol. 35 p. 285-287: 2014年12月号
- 6) 鈴木里和他、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状況、IASR Vol. 35 p. 288-289: 2014年12月号

7) 松井真理他、わが国で分離されるアシネトバクター属菌の分子疫学解析、IASR、Vol. 35 p. 291-293: 2014年12月号

8) Matsui M, Suzuki S, Suzuki M, Arakawa Y, Shibayama K. Rapid discrimination of *Acinetobacter baumannii* international clone II lineage by pyrosequencing SNP analyses of *bla*_{OXA-51-like} genes. J Microbiol Methods 2013, 94:121-4.

9) 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 *Acinetobacter baumannii* isolates from a single patient. Antimicrob Agents Chemother 2013, 7(11):5781-2

10) Matsui M, Suzuki S, Yamane K, Suzuki M, Konda T, Arakawa Y, Shibayama K. Distribution of carbapenem resistance determinants among epidemic and non-epidemic types of *Acinetobacter* species in Japan. J Med Microbiol. 2014 Mar; 63:870-7.

11) First report of metallo-β-lactamase NDM-5 producing *Escherichia coli* in Japan. Nakano, R., Nakano, A., Hikosaka, K., Kawakami, S., Matsunaga, N., Asahara, M., Ishigaki, S., Furukawa, T., Suzuki, M., Shibayama, K., and Ono, Y. Antimicrob Agents Chemother. 2014. 58(12): 7611-7612.

12) An emergence of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae at a Japanese critical care setting. Hagiya, H., Murase, T., Suzuki, M., Otsuka, F., and Shibayama, K. Acute Med Surg. 2014. 1(4): 256-258.

13) A subclass B3 metallo-β-lactamase found in *Pseudomonas alcaligenes*. Suzuki, M., Suzuki, S., Matsui, M., Hiraki, Y., Kawano, F., and Shibayama, K. J Antimicrob Chemother. 2014. 69(5): 1430-1432.

- 14) *Chromobacterium violaceum* nosocomial pneumonia in two Japanese patients at an intensive care unit. Hagiya, H., Murase, T., Suzuki, M., Shibayama, K., Kokumai, Y., Watanabe, N., Maki, M., and Otsuka, F. J Infect Chemother. 2014. 20(2): 139-142.
- 15) Genome sequence of a strain of the human pathogenic bacterium *Pseudomonas alcaligenes* that caused bloodstream infection. Suzuki, M., Matsui, M., Suzuki, S., Hiraki, Y., Kawano, F., and Shibayama, K. Genome Announc. 2013. 1(5): e00919-13.
- 16) Genome sequences of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from nosocomial outbreaks in Japan. Suzuki, M., Matsui, M., Suzuki, S., Rimbara, E., Asai, S., Miyachi, H., Takata, T., Hiraki, Y., Kawano, F., and Shibayama, K. Genome Announc. 2013. 1(4): e00476-13.
- 17) 高橋 俊司, 林原 絵美子. ヘリコバクター・シネディ, 臨床検査, 2014; 58(11), 1357-1361(2014)
- 18) Rimbara E, Mori S, Matsui M, Suzuki S, Wachino J, Kawamura Y, Shen Z, Fox JG, Shibayama K. Molecular epidemiologic analysis and antimicrobial resistance of *Helicobacter cinaedi* isolated from seven hospitals in Japan. J Clin Microbiol. 2012 Aug;50(8):2553-60.
- 19) Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. Fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: role of mutations at position 87 and 91 of GyrA on the level of resistance and identification of a resistance conferring mutation in GyrB. Helicobacter. 2012 Feb;17(1):36-42.
- 20) Li Y, Rimbara E, Thirumurthi S, Trespalacios A, Reddy R, Sabounchi S, Attumi TA, Graham DY. Detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* following noncryogenic storage of rapid urease tests for 30 days. J Dig Dis. 2012 Jan;13(1):54-9.
- 21) Deguchi R, Nakaminami H, Rimbara E, Noguchi N, Sasatsu M, Suzuki T, Matsushima M, Koike J, Igarashi M, Ozawa H, Fukuda R, Takagi A. Effect of pretreatment with *Lactobacillus gasseri* OLL2716 on first-line *Helicobacter pylori* eradication therapy. J Gastroenterol Hepatol. 2012 May;27(5):888-92.
- 22) Rimbara E, Matsui M, Mori S, Suzuki S, Suzuki M, Kim H, Sekizuka T, Kuroda M, Shibayama K. Draft Genome Sequence of *Helicobacter fennelliae* Strain MRY12-0050, Isolated from a Bacteremia Patient. Genome Announc. 2013 Aug 8;1(4).
- 23) Rimbara E, Mori S, Kim H, Matsui M, Suzuki S, Takahashi S, Yamamoto S, Mukai M, Shibayama K. *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* transmission in a hospital from 2008 to 2012. J Clin Microbiol. 2013 Jul;51(7):2439-42.
- 24) Rimbara E, Mori S, Kim H, Shibayama K. Role of -glutamyltranspeptidase in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Microbiol Immunol. 2013 Oct;57(10):665-73.
- 25) Rimbara E, Sasatsu M, Graham DY. PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples. Methods Mol Biol. 2013;943:279-87.
- 26) Trespalacios AA, Rimbara E, Otero W, Reddy R, Graham DY. Improved allele-specific PCR assays for detection of clarithromycin and fluoroquinolone resistant of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies: identification of N87I mutation in GyrA. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014 Dec 15.
- 27) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, Y,

Arakawa, and K. Shibayama. 2014. Roles of Ala-149 in the catalytic activity of diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Biosci. Biotechnol. Biochem., in press.

28) Kim, H., K. Shibayama, E. Rimbara, and S. Mori. 2014. Biochemical characterization of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and inhibition of its activity by pyrazinamide. PLoS One, 9(6):e100062.

29) Asai S, Umezawa K, Iwashita H, Ohshima T, Ohashi M, Sasaki M, Hayashi H, Matsui M, Shibayama K, Inokuchi S, Miyachi H. An outbreak of *bla*OXA-51-like- and *bla*OXA-66-positive *Acinetobacter baumannii* ST208 in the emergency intensive care unit. J Med Microbiol. 2014 Nov;63(Pt 11):1517-23.

30) Wachino J, Matsui M, Tran HH, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K. Evaluation of a double-disk synergy test with a common metallo-β-lactamase inhibitor, mercaptoacetate, for detecting NDM-1-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. Jpn J Infect Dis. 2014;67(1):66-8.

31) 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 *Bartonella quintana*. Clin Vaccine Immunol. 2013 Apr;20(4):620-6.

32) Hoang TH, Wertheim H, Minh NB, Duong TN, Anh DD, Phuong TT, Son TH, Izumiya H, Ohnishi M, Shibayama K, Hien NT. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains containing New Delhi metallo-β-lactamase isolated from two patients in Vietnam. J Clin Microbiol. 2013 Jan;51(1):373-4.

33) 柴山恵吾、地球規模で広がる耐性菌-抗菌薬の多角的使用とその功罪-医療機関における耐性菌のサーベイランス(JANIS)、化学療法の領域、29 巻 6 号、p1261-1265、2013 年

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

2. 学会発表

1) Matsui M, Suzuki S, Shibayama K, Arakawa Y. Application of pyrosequencing assay for rapid detection of epidemic clonal lineage of *Acinetobacter baumannii*. 52nd Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Sept. 9-12, 2012. San Francisco.

2) 松井 真理、鈴木 里和、鈴木 仁人、柴山 恵吾、荒川 宜親 パイロシーケンスを用いた *Acinetobacter baumannii* 流行株の迅速検出方法の検討 第 41 回薬剤耐性菌研究会 2012 年 10 月

3) 松井 真理、鈴木 里和、鈴木 仁人、荒川 宜親、柴山 恵吾 パイロシーケンスによる一塩基多型検出法を用いたアシネトバクター流行株の新規スクリーニング方法の検討 第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月、幕張メッセ、千葉

4) Matsui M, Suzuki S, Suzuki M, Arakawa Y, Shibayama K. Molecular characterization of epidemic and non-epidemic type *Acinetobacter* spp. isolated in Japan. 9th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter* (*Acinetobacter* 2013), June 19-21, 2013. Cologne, Germany

5) 松井 真理、鈴木 仁人、鈴木 里和、曾家 義博、柴山 恵吾 Qprobe-PCR による *Acinetobacter baumannii* 世界流行株の検出方法の検討 第 25 回日本臨床微生物学会総会、2014 年 2 月 1-2 日、名古屋国際会議場、愛知

6) 松井 真理、和知野 純一、Hoang Huy Tran、鈴木 里和、鈴木 仁人、柴山 恵吾 SMA ディスクを使った NDM 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株スクリーニング方法検討 第 25 回日本臨床微生物学会総会、2014 年 2 月 1-2 日、名古屋国際会議場、愛知

- 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タ 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ター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ター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- -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- -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 「アシネトバクター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 「アシネトバクター・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- -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, Shigetarou 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 γ -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*_{OXA-51-like} 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*_{OXA-51-like} 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、パイロシーケンス法と 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 *A. baumannii* IC II、*A. baumannii* 非 IC II、*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、流行株は細菌間競合に極めて強く、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 μ 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 μ g/ml 以上を示した株が 38 株(56%)だったが、MEPM のみが 2 μ g/ml 以上を示し、IPM では 1 μ 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 μ g/ml 以上を示し、MEPM では 1 μ g/ml 以下を示した株は 4 株(6%)だった。MEPM

のみで MIC が 2 μ 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- β -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繁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くても、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、メロペネムに感性でさらに他の β -ラクタム系抗菌薬でも感性の薬剤がある。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事が必要である。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、セフトリキサ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%)、セフトリキサソンは 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- 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/kekka-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 p22-27
5. Yano H et al., Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(8):4554-5.

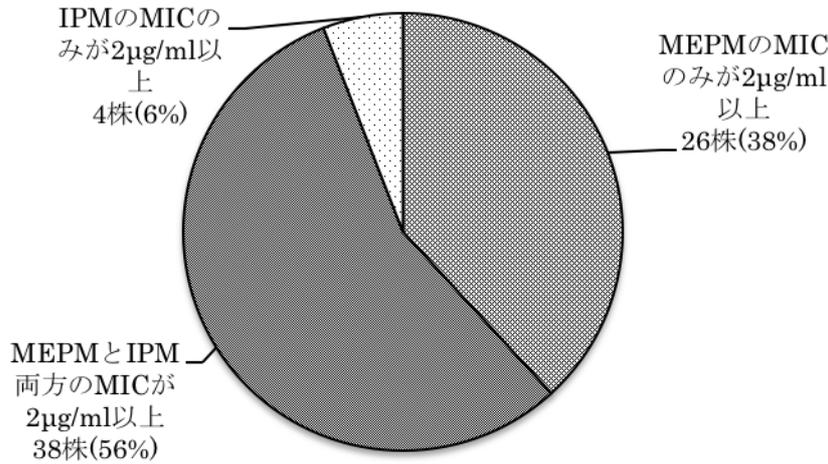


図1 IPM または MEPM の MIC が 2µg/ml 以上の菌株 68 株の内訳

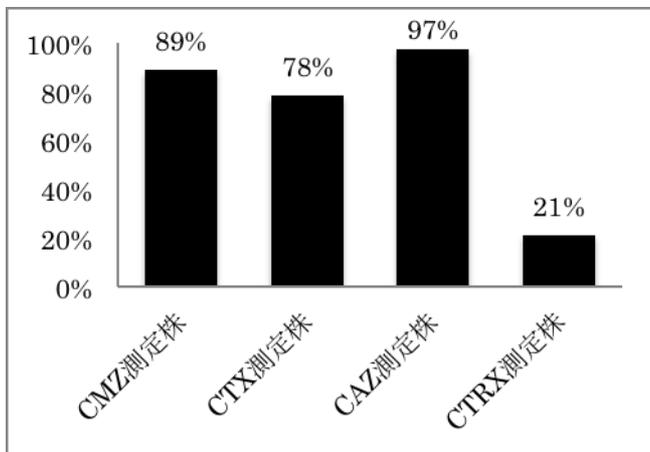


図2 医療機関においてイミペネムと同時に測定されていた各薬剤の割合

<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 - 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2 µg/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2 µg/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6.4 µg/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 - 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2 µg/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2 µg/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6.4 µg/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因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 μ g/ml 以下）、メロペネムには耐性（MIC 2 μ 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 β -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。ただし、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 β -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。ただし、このような菌株はメタロ β -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 β -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場合がありますので、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 β -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/drb-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ニン酸に変換される。ピラジナミドやピラジニ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/ピラジニ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/ピラジニ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、ピラジニ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ニン酸の作用機序の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ニン酸は結核菌の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。また医療機関特性格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格集計について

医療機関特性格の集計を行うため、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ったことになり、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

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〕 衛生主管部（局）
〔特別区〕 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お願いたします。

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、よろしくお願いたします。

（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

医政地発1219第1号
平成26年12月19日

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。