

平成26年度 厚生労働省委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発研究事業）
（委託業務題目）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

分担研究報告書

分担研究課題：海外からの耐性菌収集体制の構築

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）
鈴木 仁人（国立感染症研究所・細菌第二部第一室・主任研究官）
筒井 敦子（国立感染症研究所・細菌第二部第一室・研究員）

本研究では、国内外の入院患者由来のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を主な対象として、薬剤耐性のプラスミドのデータベースを構築し、国際社会における薬剤耐性菌、耐性遺伝子の動態を体系的に把握するシステムを構築することを目指している。今年度は国内医療機関から菌株を収集するとともに、アジア各国の耐性菌を収集するための体制構築を進めた。国内医療機関からは、カルバペネムに耐性または低度感受性の腸内細菌科細菌を266株受け入れ、それぞれの菌株からプラスミドを精製して696プラスミドの全塩基配列を決定し、データベースに格納した。タイ、ミャンマーについては、菌株の解析について共同研究を行うことで合意した。タイからは実際に8株のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を送付してもらい、菌株の輸送、解析の体制を構築できた。カンボジアについては、共同研究を開始することで双方が合意し、今後具体的な内容を検討することとした。台湾については、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が、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。来年度以降、海外からも本格的に菌株を収集し、プラスミドを精製して解析を進める予定である。インドネシアについては、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。

A．研究目的

世界では新たな薬剤耐性菌が次々と出現し、国境を越えて拡散している。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。これらの耐性菌は日本にも輸入例がある。米国でも、CDCが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が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する必要がある。WHOは2013年に薬剤耐性菌対策に関するAdvisory Groupを組織し、各国にサーベイランスの強化を求めている（Global Report on Surveillance, 2014）。

このような背景から、本研究は国内外の入院患者由来のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を主な対象として、疫学的情報を含めた薬剤耐性菌の耐性遺伝子のデータベースを構築し、社会におけ

る耐性遺伝子の動態を時間軸と空間軸で俯瞰的に把握することを目指している。今年度は国内医療機関から菌株を収集するとともに、アジア各国の研究機関との共同研究体制の構築を進めた。

B．研究方法

1. 国内の医療機関からの菌株収集

医療機関でカルバペネム耐性腸内細菌科細菌が分離された場合に、遺伝子解析を引き受け、プラスミドの解析を行った。

2. アジア各国との共同研究体制の構築

J-GRIDとの連携により、各国との共同研究体制の構築を進めた。大阪大学微生物病研究所のタイ拠点とは、マヒドン大学ラマチボディ病院、ウドンタニ病院、ミャンマー保健省のDepartment of Medical Research、インドチェンナイのVellore、Christian Medical College & Hospitalと共同研究体制の構築を進めた。神戸大学のインドネシア拠点とは、スラバヤのアイランガ大学熱帯病研究所、ストモ病院と共同研究体制の構築を進めた。その

ほか、WHO からの紹介で、カンボジア保健省と共同研究体制の構築を進めた。また、国立感染症研究所細菌第二部が従来から他研究プロジェクトで共同研究を行っていた台湾 CDC に、新たに本プロジェクトでの共同研究について協議した。

(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. 国内の菌株の収集

H26年4月から、H27年1月までに、カルバペネムに耐性または低度感受性の腸内細菌科細菌を266株受け入れ、それぞれの菌株からプラスミドを精製して696プラスミドの全塩基配列を決定し、データベースに格納した。これらについて、研究代表者が開発しているプラスミドの解析ツール GPAT(Global Plasmidome Analyzing Tool)と、プラスミド相互ネットワーク解析ツール(Inter Plasmid Analyzing Tool)による解析を進めている。

2. 大阪大学微生物病研究所との連携による共同研究体制

大阪大学微生物病研究所の研究者らと、9月にバンコクのラマチボディ病院、ウドンタニのウドンタニ病院を訪問し、先方で分離されるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の耐性遺伝子の解析について、共同研究の打ち合わせを行った。

これらの病院はいずれも1000床規模の病院であるが、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の分離は年間10-20株程度とのことだった。これは日本と比較して若干高い程度である。ベトナムやインドなどの医療機関では、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の分離頻度は非常に多いが、タイのこれらの病院は医療のレベルが高く、感染対策が充実しているものと思われた。タイではカルバペネム耐性の遺伝子はNDM-1型が最も多いとのことだった。ただ、耐性遺伝子が同定出来ない耐性株が半数程度あるとのことだった。これら2病院で分離されるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を提供してもらい、大阪大学のタイ拠点、感染研が連携して、耐性遺伝子をもつ Plasmid の全塩基配列を決定し、解析を行うことで合意した。大阪大学微生物研究所が先方と契約を交わした。

そして、H27年1月末にラマチボディ病院で分離された *Klebsiella pneumoniae* 8株が送付されて来た。これらの遺伝子型は、ST231が2株、ST11が2株、ST340が2株だった。すべての株がカルバペネム耐性遺伝子NDM-1を保有していた。現在、ゲノム解析を進めている。

日本の厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)を先方に説明したところ、関心をめしただため、今後先方の若手研究者に感染研に来てもらい、実際にJANISを見てもらうこととした。タイにはJANISのようなNational surveillanceがないため、今後これらの病院にJANISを展開していくことを念頭に、技術的な課題を整理していくこととした。

12月には大阪大学微生物病研究所の研究者らと、ミャンマー保健省のDepartment of Medical Researchを訪問した。Director General、Director、Deputy Director、微生物担当の研究者、Yangon General Hospitalの微生物検査ラボの現場担当者と共に共同研究について協議を行った。Department of Medical Researchは、薬剤耐性菌のゲノムデータベース構築に高い関心を示し、今後Yangon General Hospitalで分離される耐性菌株を使って共同研究を行うことに同意した。当面、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌に焦点を当てて菌株収集を行うこととした。まず先方の若手研究者に感染研で研修を行った上で、あちらで菌株を収集してもらうこととした。Yangon General HospitalからはJANISの導入を積極的に進めたいとの意向が示された。ただ、現場では薬剤耐性の検査について、コンピュータ管理がなく、報告は全て紙ベースで行われているなど、基本的なインフラに整備が必要であったので、今後お互いに情報交換をし、また研修を実施しながらJANISの導入を図っていくこととした。

3月に大阪大学微生物病研究所の研究者らとインドチェンナイのVellore、Christian Medical College & Hospitalを訪問し、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌に関する共同研究について交渉を行うことになった。

3. 神戸大学との連携による共同研究体制

神戸大学の研究者らとH27年2月にインドネシアスラバヤのJ-GRID神戸大学拠点のアイランガ大学熱帯病研究所及びストモ病院を訪問し、感染対策サーベイランス(JANIS)の概要及び日本の薬剤耐性菌の状況を解説した。日本で開発した

JANIS のシステムを紹介して、薬剤耐性菌の状況が継続的にビッグデータをもとに集計されていることを説明した。米国や一部の東南アジアの国では腸内細菌科細菌においてカルバペネム耐性菌が急速に増加しているが、日本ではまだ1%未満と、比較的少ないこと等を紹介した。また薬剤耐性遺伝子のデータベースについて紹介した。アイルランガ大学熱帯病研究所からは、小児の下痢性疾患の起病病原体についての調査の結果が報告された。雨期にロタウイルス、ノロウイルスによる下痢が多く、その他腸管出血性大腸菌、赤痢菌などによる下痢も多いことが報告された。

ストモ病院では、病院を見学するとともに、検査室にて JANIS を導入するためのソフトウェアのインストール、動作確認を行った。ストモ病院は病床数がおよそ1500床で、主に低所得層が対象であり、常に満床で廊下にもベッドがある状況であった。こちらの臨床検査室部門はインドネシアで最も大きく、20名ほどのスタッフから構成されている。インドネシア東部のレファレンスセンターとして機能しており、他の病院から検体が送られてくることもあるようであった。自動検査機器はBD社 Phoenix と Vitek2 の2つを有し、細菌検査については前者が利用されていた。1日あたり100-150検体が処理され、培養陰性検体は手書きで管理されていた。培養陽性検体(1日あたり60-70検体)は、Phoenixにより菌種同定および抗菌薬感受性測定されていた。ストモ病院における JANIS システムの導入に向け、検査システム EpiCentre で集計されたデータを JANIS データに変換するため、日本 BD 社により予め JANIS データ抽出用フィルターを作成してもらった。しかし、現地でフィルターを使用しても EpiCentre からデータを抽出できず、日本 BD 社の EpiCentre サポート担当者に国際電話で調整を行い、ストモ病院の臨床検査医とともに問題の確認と対応を行って、最終的に、JANIS 用 CSV ファイルの作成が可能となった。事前に作成していた BD 社の CSV ファイルを JANIS データフォーマットに変換するツールにより、JANIS データに変換されたファイルがデータベースに取り込まれる形式に整ったことを確認した。一部エラーデータもみられたため、今後 BD 社のコードと JANIS マスタとのすり合わせなどをしていく必要があることが分かった。

アイルランガ大学では最近新たに大学病院が設立されたが、現在は稼働しているのが部分的で

あるため、細菌検査の数は非常に少ないが、今後病院が本格稼働すれば大きな数になるとのことだった。将来的に JANIS の導入を働きかけることとした。

薬剤耐性遺伝子に関する共同研究については、引き続き内容について協議を継続することになった。

4. WHO を通じたカンボジアとの共同研究体制構築

WHO の紹介により、カンボジア厚生省を訪問し、厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)の概要及び日本の薬剤耐性菌の状況を発表した。またカンボジア WHO 事務所も訪問し、同様の説明を行った。感染研で開発した JANIS のシステムを紹介し、薬剤耐性菌の状況が継続的にビッグデータをもとに集計されていることを説明した。そして多くの外国と比較して日本では肺炎球菌等の市中感染症の原因となる細菌でマクロライド耐性が多く、一方で院内感染を起こす大腸菌や *Klebsiella* 属、腸球菌、*Acinetobacter* 属ではβラクタム系薬剤の耐性が少ないことを説明した。

カンボジア厚生省の Department of Hospital Services の Director の Dr. Srun Sok から、カンボジアでは微生物検査を行う専門スタッフが不足していることや、検査は主に市中感染症を起こす病原体について実施されていること、さらに院内感染については対応する疫学の専門家や Infection control doctor も限られているという状況が説明された。まずは専門家を日本に派遣して研修を受けさせたいとの意向が示された。Department of Communicable Disease Control の Dr. Bun Srengからは、カンボジアの医療現場や社会の状況についてさらに詳細な説明があった。現在、厚生省として耐性菌対策のための行動計画を策定しつつあるが、サーベイランスについては基本的なインフラ整備から始めなければならない状況であることが説明された。また、国に承認されていない抗菌薬で粗悪なものが密輸され市中で安価で売られていることや、売り手も全く知識がなく、医師も病院の収入のために抗菌薬を多く処方することがあるようだった。法律や、その他の規制など、多くの面で制度が未整備であるようだった。しかしながら、Dr. Bun Sreng は薬剤耐性菌対策に関して日本との連携を要望しており、その後カンボジア厚生省から共同研究に合意する旨の正式な文

書が送付された(サインは Professor ENG HUOT、SECRETARY OF STATE)。

カンボジアの WHO 事務所では、Technical officer の Dr. Alex Costa、Dr. Tsuyuoka と WHO との協力関係について協議を行った。Dr. Alex は、JANIS のシステムについて高い関心を示し、カンボジアでの薬剤耐性菌のサーベイランスのキャパシティを向上させるため、日本にインフラの整備の支援を行ってほしいとの意向が示された。Dr. Tsuyuoka からは、カンボジアの医療現場スタッフの意欲の問題や、専門家を育成し活用する制度が十分でないことから、慎重に進めるよう助言があった。当方としてはこの研究班で出来る限りのことをやる旨回答し、今後も協議を継続することとした。WHO としても、カンボジア厚生省との橋渡しを積極的にやりたいとの意向が示された。

5. 台湾との共同研究体制構築

9月に台湾 CDC を訪問し、これまで国立感染症研究所細菌第二部と別プロジェクトで共同研究を行っていた台湾 CDC と、カルバペネム耐性腸内細菌会細菌に関する共同研究について交渉を行った。厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)についても解説し、日本の薬剤耐性菌の状況について紹介した。また、台湾での薬剤耐性菌の状況について情報収集を行った。

台湾では KPC 型カルバペネマーゼを産生する *Klebsiella* 属菌の増加が著しいことが紹介された。これは輸入例を発端として、台北から徐々に南の地方に拡散しているとのことだった。途上国で多く見られる NDM 型も頻繁に分離されることが紹介されていた。台湾 CDC にて収集している菌株の耐性遺伝子について、共同研究を行うことで合意した。11月に台湾 CDC で薬剤耐性菌の研究室の研究者が来所し、台湾で分離されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌のサンプルを持参してゲノム研究センターと細菌第二部で解析を行った。

台湾では院内感染に関するサーベイランスとして、Taiwan Nosocomial Infections Surveillance (TNIS)がある。このサーベイランスは、台湾で医療機関に参加が義務づけられており、ほとんどの医療機関が参加しているとのことだった。このサーベイランスは、JANIS でいうと ICU 部門と SSI 部門に限られており、薬剤耐性菌の実態を調査する検査部門にあたるサーベイランスは実施されていないとのことだった。台湾 CDC の担当者に

JANIS の検査部門を紹介したところ、導入に関心を示したため、今後共同研究を始めることを視野にいれつつ、さらに情報交換を行うこととした。

D . 考察

国内の医療機関からの菌株収集については、従来からの感染研細菌第二部の体制をさらに強化することが必要である。海外の研究機関との連携については、海外の研究者が必ずしも薬剤耐性菌の分離や解析に精通していないことから、研修を通じて知識と技術を普及させることが必要である。

菌株の移動については、アジアの国では国外へ持ち出すことを禁止または制限していることがある。その場合でも DNA であれば可能のことも多いので、今後 Material Transfer Agreement を必要に応じて整備する必要がある。

JANIS の海外展開については、先方の国が薬剤耐性菌の分離状況に関する情報を無制限に海外に提供することに難色を示す場合が多い。JANIS は、提供されたデータを Confidential に扱うこと、またデータの所有権は病院にあることを十分説明し、公式に契約を交わす必要がある。

E . 結論

国内医療機関から、カルバペネムに耐性または低度感受性の腸内細菌科細菌を 266 株受け入れ、それぞれの菌株からプラスミドを精製して 696 プラスミドの全塩基配列を決定し、データベースに格納した。

タイ、ミャンマーについては、菌株の解析について共同研究を行うことで合意がされた。タイからは、8 株のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を送付してもらい、菌株の輸送、解析の体制を構築できた。カンボジアについては、共同研究を開始することで双方が合意し、今後具体的な内容を検討することとした。台湾については、今年度は先方の研究者にこちらの解析の流れを体験してもらったが、来年度以降の共同研究の継続については、今後協議を行う予定である。インドについては、これから協議予定である。インドネシアについては、JANIS の導入を始めた。データの送信にあたり、プログラム上の問題点を明らかにした。今後、本格稼働にむけてプログラムの改良を行う予定である。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表
なし

2 . 学会発表
なし

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