

II. 厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
平成30年度分担研究報告書

医療機関等における薬剤耐性菌の感染制御に関する研究

研究1. 医療機関における薬剤耐性菌の現状に関する研究

研究分担者

- 柳原 克紀(長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授)
賀来 満夫(東北大学大学院・医学系研究科・教授)
三嶋 廣繁(愛知医科大学大学院・医学研究科・教授)
山本 善裕(富山大学大学院・医学薬学研究部・教授)
大曲 貴夫(国立国際医療研究センター・国際感染症センター・センター長)

研究協力者

- 賀来 敬仁(長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・助教)

研究要旨

感染制御において、薬剤耐性菌の検出状況を把握することは重要である。厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(JANIS)や日本化学療法学会・日本感染症学会・日本臨床微生物学会の三学会合同抗菌薬感受性サーベイランスによって、薬剤耐性菌の割合を把握することは可能であるが、全国規模での薬剤耐性菌についての薬剤感受性や薬剤遺伝子などの詳細な検討はされていない。そこで、本研究では国内5施設からメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、基質拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生菌、多剤耐性緑膿菌(MDRP)、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)、アシネトバクター属、肺炎球菌の菌株を収集し、菌株の詳細な解析を行った。本年度はMRSAおよびCREの遺伝子解析を行った。

A. 研究目的

感染制御において、薬剤耐性菌検

出情報を把握することは重要であ

る。我が国では、厚生労働省院内感

染対策サーベイランス事業 (JANIS) や日本化学療法学会・日本感染症学会・日本臨床微生物学会の三学会合同抗菌薬感受性サーベイランスによって、薬剤耐性菌の割合については把握が可能である。しかし、実際にどのような特性の薬剤耐性菌が全国の医療機関で検出されているかは分かっていない部分が多い。

そこで、本研究では長崎大学病院および共同研究の施設から平成 28 年度に 5 施設から 991 株を収集し、平成 29 年度に薬剤感受性試験を行った。本年度は、MRSA および CRE の遺伝子解析を行い、我が国で拡散している薬剤耐性菌の現状を明らかにする。

B. 研究方法

平成 28 年度に東北大学病院、国立国際医療研究センター病院、富山大学附属病院、愛知医科大学病院、長崎大学病院から収集した菌株のうち、再培養が可能であった MRSA343 株と CRE95 株の遺伝子解析を行った。

MRSA については、multiplex real-time PCR 法 (Kaku N, Yanagihara K, et al. J Infect Chemother. 20: 350-5, 2014) を用いて SCC_{mec} typing (I, II, III, IV) および virulence genes である enterotoxin

C (*sec*)
toxic shock syndrome toxin 1 (*tsst*)
exfoliative toxin type b (*etb*)
Panton-Valentine leukocidin (*pvl*) の検出を行った。

CRE については、全自動遺伝子解析装置 GeneXpert のカルバペネマーゼ遺伝子検出キットである Carba R を用いて、CRE における KPC、NDM、VIM、OXA-48、IMP の保有状況を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は検出された菌株およびその情報を用いた。すでに同意能力がない、死亡している、通院していない研究対象者も含まれると考えられるため、研究の概要について情報公開を行い、研究が実施されることについて研究対象者または代諾者が拒否できる機会を保障した (長崎大学病院倫理委員会許可番号: 16072509)。

C. 研究結果

1. MRSA

MRSA343 株のうち 139 株 (40.5%) が呼吸器検体から検出され、皮膚・軟部組織から検出されたのが 65 株 (19.0%)、鼻腔が 40 株 (11.7%) であった。血液から検出されたのは 10

株 (2.9%) であった。

SCC*mec* typing では、SCC*mec* I が 18 株 (5.2%)、II が 119 株 (34.7%)、III が 5 株 (1.5%)、IV が 192 株 (56.0%)、untypable が 9 株 (2.6%) であり、SCC*mec* type IV が最も多かった (図 1A)。施設毎の SCC*mec* type でも、5 施設中 4 施設で SCC*mec* IV の割合が最も高かった (図 2)。検体毎の SCC*mec* type の割合の解析では、便 (n=14)、血液 (n=11) から検出された MRSA では SCC*mec* type II の割合が最も高かったが、呼吸器検体 (n=138)、皮膚・軟部組織 (n=64)、鼻腔 (n=40)、耳漏 (n=13)、尿 (n=10) から検出された MRSA では SCC*mec* type IV の割合が最も高かった (図 3)。

昨年度実施した薬剤感受性試験の結果を基に、SCC*mec* type 別の薬剤感受性の解析を行った (図 4)。CLSI の基準による薬剤感性率については、バンコマイシン (VCM)、テイコプラニン (TEIC)、リネゾリド (LZD)、ダプトマイシン (DAP) などの抗 MRSA 薬の感性率は SCC*mec* type での違いは認めなかった。一方で、クリンダマイシン (CLDM)、ミノサイクリンでは SCC*mec* type IV および untypable での感性率が 80%前後あったのに対して、II および III では感性率が 20%前後と非常に低かった。また、エリ

スロマイシン (EM) やレボフロキサシン (LVFX) では、SCC*mec* type IV および untypable で感性を示したのが 20%程度認められた。

Virulence genes の解析では、*etb* が 2 株 (0.6%)、*tsst* が 127 株 (37.0%)、*sec* が 122 株 (35.6%)、*pvl* が 4 株 (1.2%) であった (図 1B)。SCC*mec* type 別の virulence genes 保有率は、SCC*mec* II および IV で *tsst* と *sec* の保有率が 60%近くと高かったのに対して、SCC*mec* I、IV および untypable では保有率が非常に低かった。*Pvl* は SCC*mec* IV と untypable のみで認められたが、SCC*mec* IV での保有率は 1.6%と非常に低かった (図 5)。

2. CRE

各施設で CRE と判定された 95 株の遺伝子解析を行った。CRE が検出された検体としては、呼吸器検体が最も多く 30 株 (31.6%) であり、次いで尿検体が 20 株 (21.1%) であった。無菌検体から培養されたのは血液からの 6 株 (6.3%) のみであった (図 6A)。菌種としては *Enterobacter aerogenes* が 42 株 (44.2%)、*Enterobacter cloacae* complex が 36 株 (37.9%) と *Enterobacter* 属のみで 8 割以上を占めていた (図 6B)。その他には *K. pneumoniae* が 11 株

(11.6%)、*E. coli*、*Providencia rettgeri*、*Citrobacter* 属がそれぞれ 2 株ずつであった。

CRE の遺伝子解析の結果、95 株中 16 株 (16.8%) がカルバペネマーゼ遺伝子を保有しているカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) であった。CPE16 株のうち、15 株が IMP-1、1 株が NDM および OXA-48 を保有していた。CRE に占める CPE の割合は、0% ~87.5%と施設によって異なっていた (表 1)。

CPE と non-CPE の比較を行ったところ (表 2) 検体の種類では、尿から検出した割合が CPE では 31.3%と non-CPE の 6.3%よりも有意に高かった ($p = 0.023$)。菌種では、*Enterobacter aerogenes* において CPE が 6.3%と non-CPE の 43.2%と比較して有意に低かった ($p = 0.002$)。また、*Klebsiella pneumoniae* において CPE が 50.0%と non-CPE の 3.2%と比較して有意に高かった ($p < 0.001$)。薬剤感受性の比較では、CMZ 以外のほとんどの薬剤で CPE のほうが non-CPE よりも薬剤耐性率が高かった (図 7)。

D. 考察

MRSA では呼吸器検体から検出されたのが 40.5%で、皮膚・軟部組織から検出されたのが 19.0%であった。三学

会合同サーベイランスは感染症の領域毎にサーベイランスを行っており、実際にどの検体から MRSA が検出されているかの割合は不明であったが、本研究の結果から呼吸器検体からの検出が最も多いことが明らかとなった。しかし、本研究では感染症の原因菌が定着菌かの確認までは行っていない点に注意が必要である。MRSA の遺伝子解析では、SCC*mec* type IV が最も多かった。SCC*mec* type では I、II、III が医療関連型 MRSA (Healthcare-associated MRSA, HA-MRSA)、IV および V が市中関連型 MRSA (community-associated MRSA, CA-MRSA) と考えられており、日本で検出される MRSA の多くは HA-MRSA であった。しかし、長崎大学病院で血液培養から検出された MRSA の検討では、HA-MRSA である SCC*mec* type II が減少し CA-MRSA である IV が増加していることが明らかとなっている (Kaku N, Yanagihara K, et al. J Infect Chemother. 20: 350-5, 2014)。本研究でも 5 施設中 4 施設で CA-MRSA である SCC*mec* type IV が最も多くなっており、全国的に MRSA における CA-MRSA の割合が高くなっていると考えられる。海外でも CA-MRSA の割合が高くなっているが、今回の研究での SCC*mec* type IV における *pvl* 保有率は非常に低く、日本で拡散している CA-MRSA は海外と異なることが予想

される。

CRE の遺伝子解析では、CRE における CPE の割合が 16.8%であり、そのほとんどが我が国で報告の多い IMP であることが明らかとなった。これまでに CRE における CPE の割合についての全国的なデータはほとんどないため、今後この割合が増加してこないか注意する必要がある。また、施設によって CRE における CPE の割合が異なるため、地域による違いがある可能性がある。そのため、地域全体での CRE および CPE の現状について調査する必要があると考えられる。また、CPE と non-CPE の比較では CPE では *K. pneumoniae* の割合が多いことが明らかとなった。*K. pneumoniae* は肺炎などの重症感染症の主要な原因菌の一つであり、今後は CPE による重症感染症が増えてくる可能性がある。

E. 結論

MRSA および CRE の遺伝子解析を行い、全国的に同じような遺伝子の株が拡散していることが明らかとなった。今後は、その経時的変化についても明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報

なし。

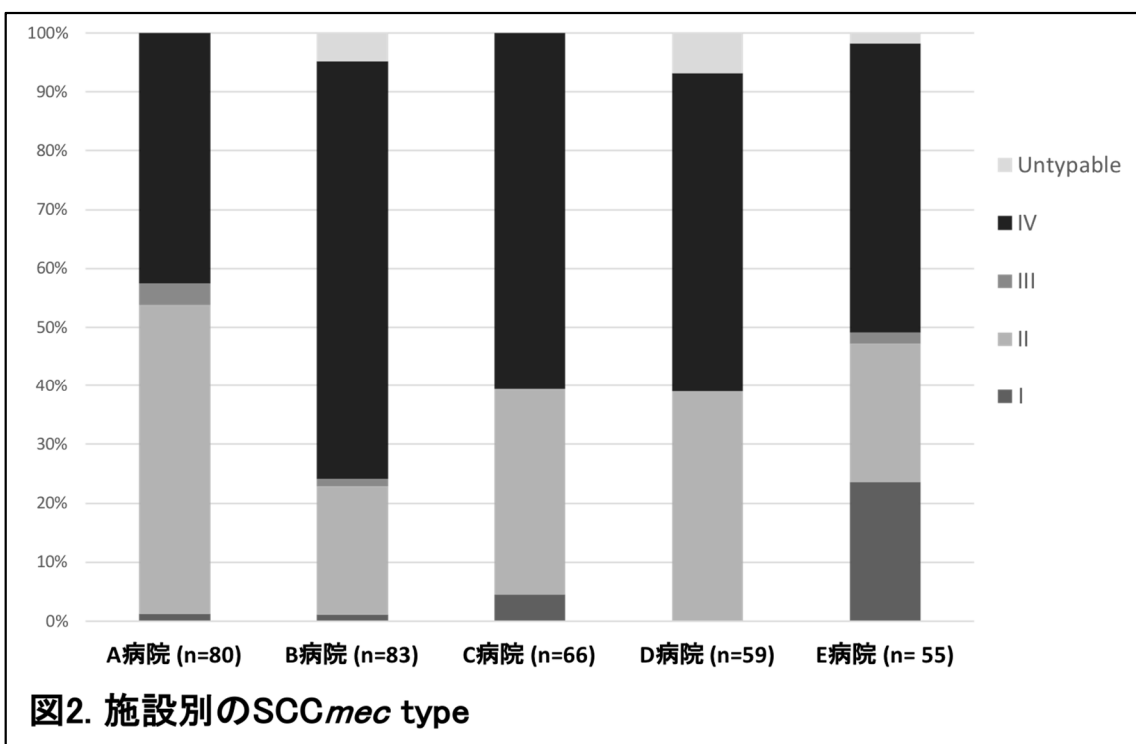
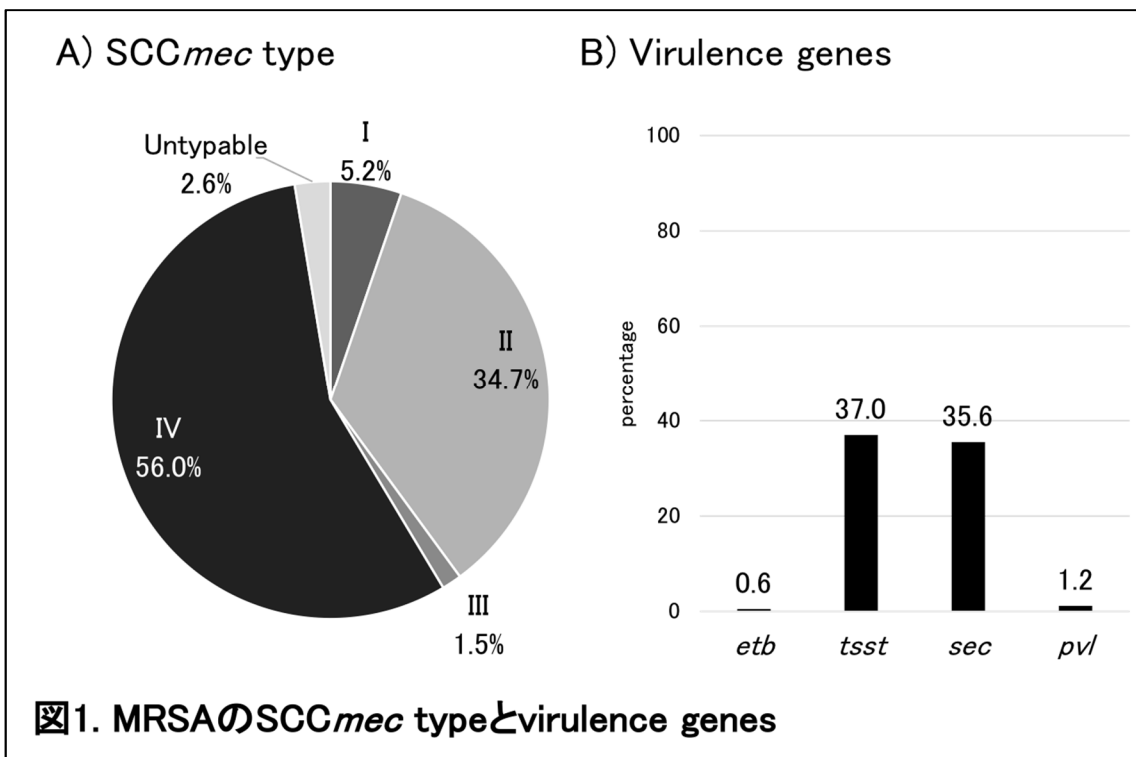
G. 研究発表

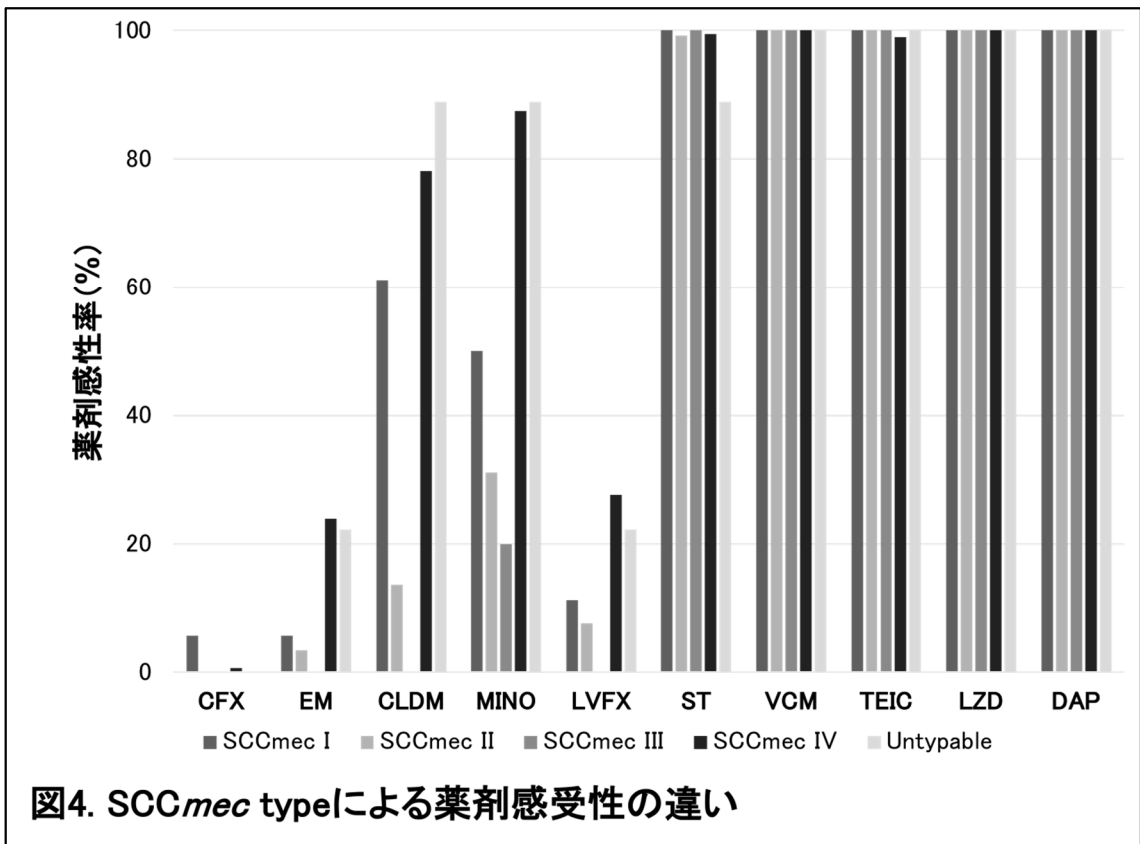
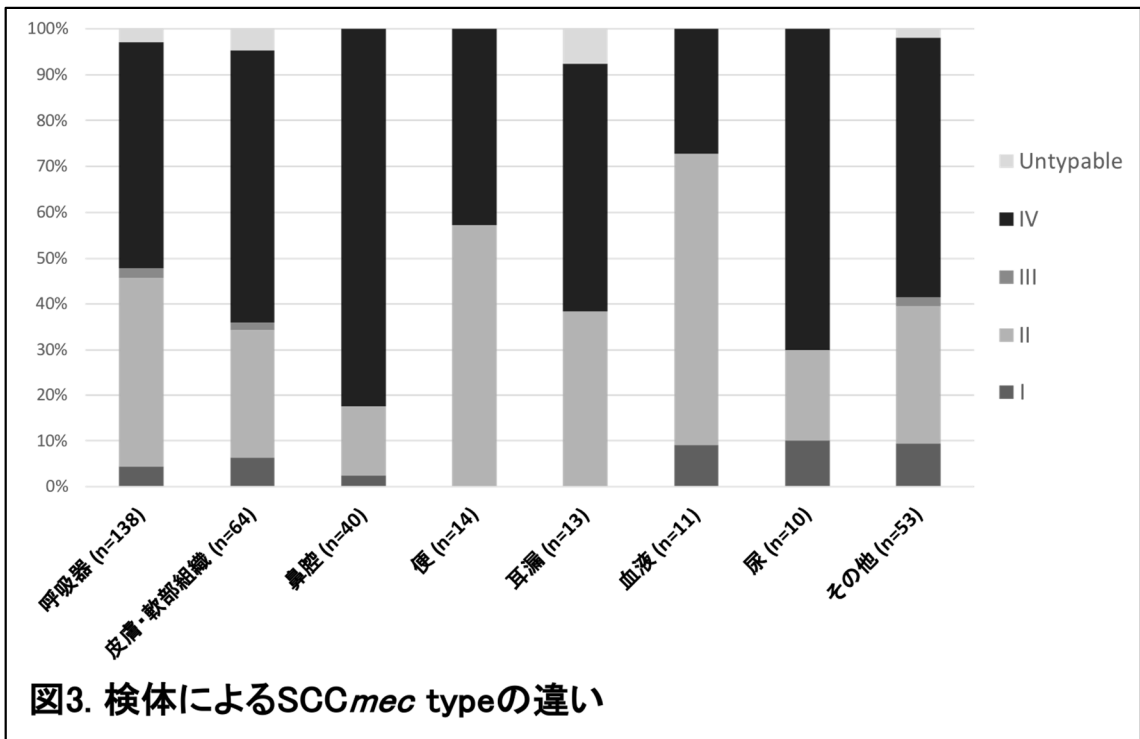
1. 論文発表

- 1) Kawamoto Y, Kosai K, Yamakawa H, Kaku N, Uno N, Morinaga Y, Hasegawa H, Yanagihara K. Detection of extended-spectrum -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae using the MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance- -Lactamase (MBT STAR-BL) assay. J Microbiol Methods. 160: 154-6, 2019.
- 2) Yamakawa H, Kosai K, Akamatsu N, Matsuda J, Kaku N, Uno N, Morinaga Y, Hasegawa H, Tsubouchi T, Kaneko Y, Miyazaki T, Izumikawa K, Mukae H, Yanagihara K. Molecular and epidemiological analysis of IMP-1 metallo- -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in a tertiary care hospital in Japan. J Infect Chemother. 25: 240-6, 2019.
- 3) Kawamoto Y, Kosai K, Yamakawa H, Kaku N, Uno N, Morinaga Y, Hasegawa H, Miyazaki T, Izumikawa K, Mukae H, Yanagihara K. Performance evaluation of the MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance- -Lactamase (MBT STAR-BL) assay for the detection of IMP metallo- -lactamase activity in Enterobacteriaceae. Diagn Microbiol Infect Dis. 92: 275-8, 2018.
- 4) Kaku N, Hashiguchi K, Iwanaga Y, Akamatsu N, Matsuda J, Kosai K, Uno N, Morinaga Y,

- Kitazaki T, Hasegawa H, Miyazaki T, Fukuda M, Izumikawa K, Mukae H, Yanagihara K. Evaluation of FilmArray respiratory panel multiplex polymerase chain reaction assay for detection of pathogens in adult outpatients with acute respiratory tract infection. J Infect Chemother. 24: 734-8, 2018.
- 5) Nishimura F, Morinaga Y, Akamatsu N, Matsuda J, Kaku N, Takeda K, Uno N, Kosai K, Hasegawa H, Yanagihara K. Plasmid-Mediated AmpC - Lactamase and Underestimation of Extended-Spectrum - Lactamase in Cefepime-Susceptible Elevated-Ceftazidime-MIC Enterobacteriaceae Isolates. Jpn J Infect Dis. 71: 281-5, 2018.
2. 学会発表
- 1) 賀来 敬仁、赤松 紀彦、松田 淳一、小佐井 康介、大曲 貴夫、泉川 公一、山本 善裕、三鴨 廣繁、賀来 満夫、大石 和徳、柳原 克紀 . 第 92 回日本日本感染症学会学術集会・第 66 回日本化学療法学会学術集会「医療機関における薬剤耐性菌の現状」2018 年 5 月 31 日 . 岡山 .
- 2) Masaki Ishige, Norihito Kaku, Naoki Uno, Yoshitomo Morinaga, Hiroo Hasegawa, Koichi Izumikawa, Hiroshi Mukae, Katsunori Yanagihara. ASM microbe 2019 「 Changing molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in bloodstream infection 」 . 2018.06.08. Atlanta, United States.
- 3) 太田 賢治、賀来 敬仁、森永 芳智、宮崎 泰可、泉川 公一、迎 寛、柳原 克紀. MRSA フォーラム 2018 「MRSA 院内肺炎の臨床的・微生物学的特徴」 . 2018 年 7 月 7 日 . 東京 .
- 4) 太田 賢治、賀来 敬仁、森永 芳智、宮崎 泰可、泉川 公一、迎 寛、柳原 克紀. 第 88 回日本感染症学会西日本地方会学術集会「MRSA 肺炎の原因菌の微生物学的特徴」 . 2018 年 11 月 17 日 . 鹿児島 .
- 5) 賀来 敬仁、森永 芳智、大曲 貴夫、泉川 公一、山本 善裕、三鴨 廣繁、賀来 満夫、大石 和徳、柳原 克紀 . 第 34 回日本環境感染学会学術集会「日本での ESBL 産生菌および CRE の現状」 . 2019 年 2 月 22 日 . 兵庫 .
- H. 知的財産権の出願・登録状況

なし





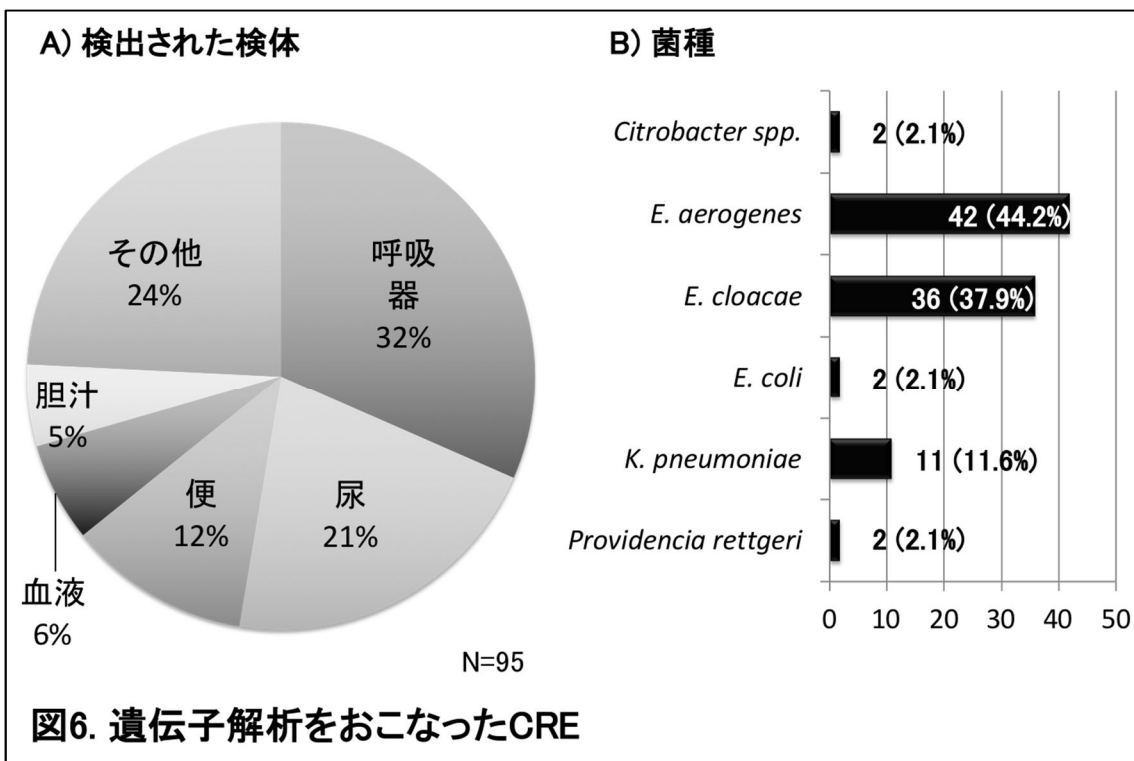
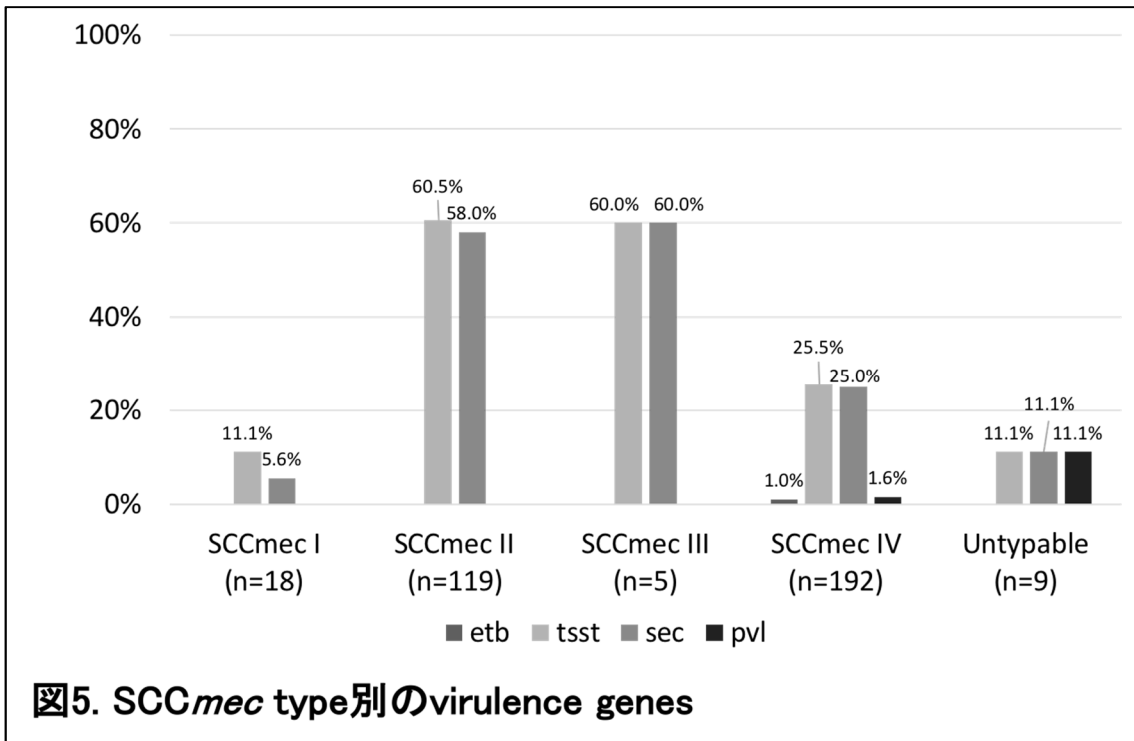


表1. CREにおけるカルバペネマーゼ遺伝子の保有

	A病院 n = 8	B病院 n = 8	C病院 n = 26	D病院 n = 3	E病院 n = 50	合計 n = 95
CPE	2株 (25.0%)	7株 (87.5%)	5株 (19.2%)	N.D.	2株 (4.0%)	16株 (16.8%)
IMP-1	2株 (25.0%)	7株 (87.5%)	4株 (15.4%)	N.D.	2株 (4.0%)	
NDM + OXA-48	N.D.	N.D.	1株 (3.8%)	N.D.	N.D.	
Non-CPE	6株 (75.0%)	1株 (12.5%)	21株 (80.8%)	3株 (100%)	46株 (92.0%)	79株 (83.2%)

N.D., not detected

表2. CPEとnon-CPEの比較

	CPE (n=16)		Non-CPE (n=79)		P値
	n	(%)	n	(%)	
検体の種類					
呼吸器	7	(43.8%)	23	(24.2%)	0.393
尿	5	(31.3)	6	(6.3%)	0.023
便	2	(12.5%)	15	(15.8%)	0.721
血液	0	(0.0%)	9	(9.5%)	0.342
胆汁	0	(0.0%)	5	(5.3%)	0.674
その他	2	(12.5%)	21	(22.1%)	0.379
菌種					
<i>Citrobacter spp.</i>	0	(0.0%)	2	(2.1%)	0.755
<i>E. aerogenes</i>	1	(6.3)	41	(43.2%)	0.002
<i>E. cloacae</i>	6	(37.5%)	30	(31.6%)	0.778
<i>E. coli</i>	0	(0.0%)	2	(2.1%)	0.340
<i>K. pneumoniae</i>	8	(50.0%)	3	(3.2%)	<0.001
<i>Providencia rettgeri</i>	1	(6.3%)	1	(1.1%)	0.755

